

Agnieszka Katarzyna Dettlaff-Pokora

**AKTYWNOŚĆ TELOMERAZY I POZIOM
KATALITYCZNEJ PODJEDNOSTKI FOSFATAZY
BIAŁEK TYPU 2A W RAKU PĘCHERZA MOCZOWEGO**

Rozprawa doktorska została wykonana

w Katedrze i Zakładzie Biochemii

Akademii Medycznej w Gdańsku

Promotor: Prof. dr hab. Julian Świerczyński

Gdańsk 2005

Praca wykonana w ramach grantu KBN 6 P05A 092 20

Część wyników zawartych w rozprawie
jest opublikowana w *Cancer Letters* 2005; 22(1):83-88

SPIS TREŚCI

1. Wykaz stosowanych skrótów	5
2. Streszczenie	7
3. Wstęp	10
3.1 Rak pęcherza moczowego	10
3.2 Biologia telomerów	13
3.2.1 Telomery	13
3.2.2 Telomeraza	15
3.3 Fosfataza białek 2A (PP2A)	21
4. Cel pracy	25
5. Materiały i metody	26
5.1 Pacjenci	26
5.2 Ekstrakty tkankowe pęcherza moczowego	31
5.3 Ekstrakty osadów komórek z moczu	32
5.4 Analiza poziomu izoformy α katalitycznej podjednostki fosfatazy białek typu 2A w ekstraktach pęcherza moczowego	32
5.5 Analiza aktywności telomerazy w ekstraktach raka pęcherza moczowego i osadach komórek z moczu chorych na raka pęcherza moczowego	37
5.6 Analiza statystyczna	47
5.7 Odczynniki	47

6. Wyniki	49
6.1 Analiza poziomu PP2A α	49
w raku pęcherza moczowego	
6.2 Analiza aktywności telomerazy	56
w raku pęcherza moczowego	
6.3 Analiza aktywności telomerazy	66
w osadach komórek z moczu chorych	
na raka pęcherza moczowego oraz osób zdrowych	
6.4 Porównanie aktywności telomerazy	68
w rakach pęcherza moczowego z aktywnością	
telomerazy w osadach komórkowych z moczu	
6.5 Porównanie poziomu izoformy α katalitycznej	70
podjednostki fosfatazy białek typu 2A z aktywnością	
telomerazy w raku pęcherza moczowego	
7. Dyskusja	73
7.1 Poziom PP2A α w raku pęcherza moczowego	74
7.2 Aktywność telomerazy w raku pęcherza	78
moczowego oraz w osadach komórek z moczu	
chorych na raka pęcherza moczowego i osób	
zdrowych	
7.3 Porównanie poziomu PP2A α z aktywnością	84
telomerazy w raku pęcherza moczowego	
8. Wnioski	88
9. Piśmiennictwo	89

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

APS	siarczan amonu
CHAPS	siarczan 3-[(3-chloroamidopropyl)dimetyloamono]- -1- propanu
EF-2	czynn timer elongacyjny 2
ELISA	test immunoenzymatyczny
G	stopień złośliwości histologicznej nowotworu
hTEP1	ludzkie białko związane z telomerazą 1
hTERT	ludzka białkowa składowa telomerazy o aktywności odwrotnej transkryptazy
hTR	ludzka rybonukleinowa składowa telomerazy
MAPK	kinaza aktywowana przez mitozę
PBS	bufor fosforanowy
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
PKB/Akt	kinaza białkowa B
PKC α	kinaza białkowa C, izoforma α
PP1 γ_1	fosfataza białkowa 1, izoforma γ_1
PP2A	fosfataza białek 2A
PP2A α	izoforma α podjednostki katalitycznej fosfatazy białek 2A
POT1	białko telomerów 1
PR65	podjednostka strukturalna PP2A
RF1	translacyjny czynnik uwalniający
TBE	bufor boranowy
TCC	przejęciowonabłonkowy rak pęcherza moczowego
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylodiamina
TIF2 α	podjednostka α czynnika inicjacyjnego translacji 2
TIF2 β	podjednostka β czynnika inicjacyjnego translacji 2

TIN2	białko wchodzące w interakcję z czynnikiem TRF1
TMB	3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna
TNM	stopień zaawansowania klinicznego nowotworu
TP1	białko związane z telomerami 1
TRAP	reakcja powielania powtórzeń telomerowych
TRF1	białko wiążące się z powtórzeniami telomerowymi 1
TRF2	białko wiążące się z powtórzeniami telomerowymi 2
SDS	dodecylosiarczan sodu

2. STRESZCZENIE

Pierwszym celem rozprawy doktorskiej była ocena relacji pomiędzy poziomem katalitycznej podjednostki fosfatazy białek typu PP2A w przejściowonabłonkowym raku pęcherza moczowego a stopniem zaawansowania nowotworu. Fosfataza białek typu 2A jest enzymem zaangażowanym w szereg procesów komórkowych, od regulacji replikacji po regulację metabolizmu, przez rearanżację cytoszkieletu i morfogenezę, co sugeruje że aktywność PP2A może ulegać zmianie w komórkach nowotworowych. Jest to enzym złożony z wielu podjednostek występujących w wielu izoformach i kombinacjach. Każdy typ powstałego holoenzymu ma charakterystyczny poziom aktywności, specyficzność substratową oraz jest w różny sposób regulowany. Założyłam, że podstawowym parametrem będzie oceniany z wykorzystaniem metody Western-blotting poziom dominującej ilościowo podjednostki katalitycznej PP2A α . Stwierdziłam, że poziom PP2A α w raku pęcherza moczowego uległ obniżeniu u 30% pacjentów (w stosunku do kontroli). Poziom ten było podwyższony u 40% pacjentów, zaś nie zmienił się u 30%.

Drugim celem rozprawy doktorskiej była ocena relacji pomiędzy poziomem katalitycznej podjednostki PP2A a aktywnością telomerazy w raku pęcherza moczowego. Telomeraza jest rybonukleoproteiną jądrową odpowiedzialną za odbudowywanie traconych wraz z każdym podziałem komórkowym końców chromosomów zwanych telomerami. Jest to enzym złożony z części białkowej o funkcji katalitycznej, oraz składowej rybonukleinowej będącej dla niej matrycą. Podstawową funkcją telomerów jest ochrona informacji genetycznej przed nukleazami. Stopniowe skracanie telomerów stanowi zegar komórkowy. Komórka może ulec określonej ilości podziałów do momentu gdy telomery zostaną zdegradowane. Gdy to nastąpi komórka umiera śmiercią apoptotyczną.

U zdrowego, dorosłego człowieka telomeraza jest aktywna tylko w komórkach pnia i aktywowanych limfocytach. Aktywność telomerazy jest charakterystyczna dla komórek nowotworowych, co może być wykorzystywane zarówno w diagnostyce, jak i terapii nowotworów. Aktywność telomerazy jest regulowana głównie na poziomie ekspresji genu. Na podstawie wyników badań na liniach komórkowych zaproponowano model regulacji aktywności telomerazy przez odwracalną fosforylację. W modelu tym telomeraza ma być aktywowana przez kinazy białek C i B/Akt, zaś inaktywowana przez fosfatazę białek typu 2A (PP2A). Aktywność telomerazy w tych samych tkankach guzów nowotworowych oznaczano metodą TRAP ELISA. Metoda ta oparta jest na wydłużaniu przez telomerazę sztucznego substratu, powielaniu powstałego produktu w łańcuchowej reakcji polimerazy, a następnie wykrywaniu produktów PCR. Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem PP2A a aktywnością telomerazy w raku pęcherza moczowego. Może to świadczyć bądź o braku wpływu PP2A na aktywność telomerazy, bądź też o braku relacji pomiędzy aktywnością holoenzymu PP2A a poziomem podjednostki katalitycznej tego holoenzymu.

Trzecim celem projektu była ocena przydatności klinicznej oznaczania aktywności telomerazy w osadzie komórek z moczu chorych na przejściowonabłonkowego raka pęcherza moczowego. Komórki raka pęcherza moczowego złuszcza się do jego światła i są wydalone z moczem. Jedną ze standardowych metod wykrywania raka pęcherza moczowego jest badanie mikroskopowe osadu z moczu (inaczej cytologia moczu). Zwiększone złuszczenie się komórek jest obserwowane szczególnie w zaawansowanych stadiach nowotworu. Szuka się zatem metod, które umożliwiłyby wczesne i nieinwazyjne wykrywanie zmian nowotworowych. Jednym z potencjalnie użytecznych testów może być badanie aktywności telomerazy w osadzie komórek z moczu.

Stwierdziłam, że aktywność telomerazy w raku pęcherza moczowego znajduje swoje odzwierciedlenie w aktywności telomerazy w osadzie komórek z moczu u 98% badanych pacjentów. Analiza zarówno tkanek guzów nowotworowych pęcherza moczowego, jak i osadu komórek z moczu wykazała, że oznaczanie aktywności telomerazy w osadzie komórek z moczu chorych na raka pęcherza moczowego jest metodą czułą i specyficzną. Nie stwierdziłam aktywności telomerazy w osadach komórek z moczu osób zdrowych, co dodatkowo potwierdza przydatność diagnostyczną badania aktywności telomerazy. W świetle uzyskanych wyników wydaje się że badanie aktywności telomerazy może stać się doskonałym uzupełnieniem standardowych metod diagnostycznych, przyczyniając się do wczesnego wykrywania raka pęcherza moczowego. Metoda ta nie jest przydatna do oceny stopnia zaawansowania zmian nowotworowych, gdyż telomeraza jest aktywna w osadach komórek z moczu pochodzących od pacjentów z różnymi etapami zaawansowania nowotworu. Zastosowane przeze mnie testy służące do oceny aktywności telomerazy są testami jakościowymi. Zarówno dostępne w ostatnim czasie testy ilościowe, jak i pojawienie się w przyszłości testu oceniającego aktywność telomerazy opartego na zupełnie innej metodzie mogłyby umożliwić ocenę stopnia zaawansowania nowotworu w oparciu o badanie aktywności telomerazy.

3. WSTĘP

3.1 RAK PĘCHERZA MOCZOWEGO

Rak pęcherza moczowego stanowi poważny problem zdrowotny zarówno w skali światowej, jak i w Polsce. Rokrocznie odnotowuje się na świecie ponad 350 000, a w Polsce ponad 6300 zachorowań i odpowiednio ponad 140 000 i 2500 zgonów spowodowanych przez ten nowotwór. Wśród mężczyzn rak pęcherza moczowego plasuje się na świecie na dziewiątym miejscu wśród nowotworów najczęściej diagnozowanych, a w Polsce na czwartym. Jest odpowiednio dwunasty i szósty wśród nowotworów będących najczęstszą przyczyną zgonu [1].

Tab.1 Zapadalność i umieralność na raka pęcherza moczowego w Polsce i na Świecie. Dane liczbowe wyrażają ilość zarejestrowanych przypadków, zaś cyframi rzymskimi (w nawiasach) oznaczono miejsce raka pęcherza moczowego w rankingu nowotworów. Dane statystyczne dotyczą roku 2000 [1].

RAK PĘCHERZA MOCZOWEGO	POLSKA		ŚWIAT	
	<i>Zapadalność</i>	<i>Umieralność</i>	<i>Zapadalność</i>	<i>Umieralność</i>
Mężczyźni	5215 (IV)	2065 (V)	273858 (VII)	108310 (IX)
Kobiety	1181 (XIII)	498 (XIV)	82699 (XIV)	36699 (XIV)
SUMA	6396 (IV)	2563 (VI)	356557 (IX)	145009 (XII)

Prześciowonabłonkowy rak pęcherza moczowego TCC (*ang.: Transitional Cell Carcinoma*) stanowi około 90-95% nowotworów pęcherza moczowego [2]. Obejmuje on szerokie spektrum heterogennych zmian neoplastycznych, od zmian powierzchniowych, dobrze zróżnicowanych do zmian inwazyjnych i słabo zróżnicowanych. Zmiany nowotworowe o charakterze TCC mogą występować w obrębie całego

układu moczowego, od miedniczek nerkowych poprzez moczowody, pęcherz moczowy do proksymalnych dwóch trzecich cewki moczowej. Pozostałe 5-10% nowotworów pęcherza moczowego, stanowią różnego typu zmiany nowotworowe z których najczęstsze to płaskonabłonkowy rak pęcherza moczowego oraz gruczolakorak (adenocarcinoma). Rak płaskonabłonkowy stanowi od 3 do 5% nowotworów pęcherza moczowego [3]. Jego geneza jest związana z długotrwałymi podrażnieniami ściany pęcherza moczowego spowodowanymi np. długotrwałym cewnikowaniem oraz chronicznymi zapaleniami. Nowotwór ten rzadko daje przerzuty, nawroty naciekają jednak okoliczne tkanki powodując śmierć 60-70% pacjentów w okresie 5 lat [3]. Gruczolakorak stanowi 0,5-2,0% nowotworów pęcherza moczowego [4]. Występuje on często u osób, u których wystąpiło wynicowanie pęcherza moczowego. Ma on postać gruczołową i zazwyczaj produkuje duże ilości mucyn [5,6].

Dla uproszczenia w dalszej części rozprawy przejściowonabłonkowy rak pęcherza moczowego będę nazywać rakiem pęcherza moczowego, gdyż badane były tylko tkanki pacjentów z udokumentowanym rakiem przejściowonabłonkowym.

Na raka pęcherza moczowego chorują przede wszystkim mężczyźni, którzy stanowią ogólnie około 70-80% chorych. Jest to nowotwór wykrywany najczęściej u osób po 65 roku życia, rzadko diagnozowany u osób poniżej 40 roku życia. Nowotwór ten jest wiązany z ekspozycją na dym papierosowy, czy kancerogeny środowiskowe związane z pracą w przemyśle barwników, gumy i kaletnictwem [7]. Od pierwszej ekspozycji na czynnik kancerogeny do wykrycia nowotworu upływa średnio 18 lat, co teoretycznie daje dużo czasu na określenie ryzyka oraz diagnostykę prewencyjną. Dodatkowymi czynnikami ryzyka są prawdopodobnie niska podaż płynów, dieta bogata w smażone tłuszcze, nadmierne spożycie alkoholu etylowego oraz kofeiny. Nie można

wykluczyć, że czynniki te, razem z paleniem papierosów, są charakterystyczne dla osób z grupy wysokiego ryzyka [8].

Rak pęcherza moczowego diagnozowany jest zazwyczaj jako rak powierzchniowy w 75% przypadków, w 20% jako rak inwazyjny, a w 5% jako metastatyczny. Spośród zdiagnozowanych raków powierzchniowych do 20% przechodzi w stadium inwazyjne. Jest to nowotwór charakteryzujący się dużym prawdopodobieństwem wystąpienia wznowy.

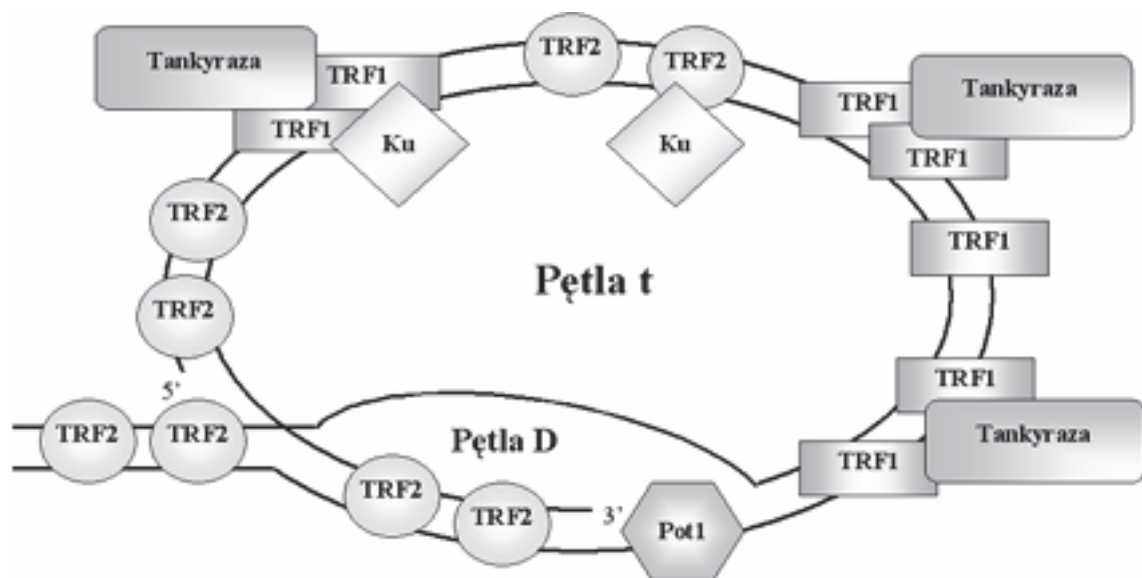
3.2 BIOLOGIA TELOMERÓW

3.2.1 Telomery

Komórka eukariotyczna przechowuje materiał genetyczny w postaci wielu chromosomów. Ma to na celu ułatwienie przeniesienia bardzo dużego (w porównaniu z komórką prokariotyczną) materiału genetycznego z komórki macierzystej do komórek potomnych, jak również umożliwienie szybszego postępu ewolucyjnego i zwiększenie różnorodności genetycznej populacji. Obecność wielu chromosomów ułatwia przetasowania materiału genetycznego i zwiększa częstość rekombinacji. Ceną za postęp ewolucyjny okazała się konieczność ochrony chromosomów przed nukleazami. Wolne końce chromosomów podobnie jak każde inne liniowe jednoniciowe DNA lub RNA w komórce stanowią substrat dla dezoksyrybonukleaz oraz rybonukleaz. Konieczne zatem było zabezpieczenie końców chromosomów poprzez ich odpowiednie zapętlenie oraz związanie z białkami. Jest to możliwe dzięki specyficznej sekwencji końców chromosomów nazwanych telomerami.

Telomer człowieka składa się z 1000 do 2000 powtórzeń sześcionukleotydu sekwencji 5'-TTAGGG-3', czyli 6000-12000 pz sekwencji powtarzających się na końcu każdego ramienia chromosomu [9-11]. Sekwencje te tworzą w większości dwuniciowe DNA, tylko 3' koniec chromosomu (o dużej zawartości guaniny) jest jednoniciowy [12-15]. Wielokrotne powtórzenia tej samej sekwencji umożliwiają powstawanie na końcach telomerów pętli oraz odcinków zarówno jedno-, dwu- jak i czteroniciowego DNA. Z powodu występowania dużej ilości sekwencji powtarzalnych, DNA tworzy tzw. quadrupleksy G (*ang.: G-quarduplexes*) inaczej zwane G4-DNA. Czteroniciowe DNA tworzy się na skutek powstawania wiązań Hoogsteen'a pomiędzy zasadami

guaninowymi. Struktury takie wpływają na oddziaływania telomerów z czynnikami regulacyjnymi oraz na stabilność końców chromosomów [16]. Podstawową strukturą występującą na końcu telomeru jest przypominająca łańcuszek pętla t (*ang.: t loop*). Pętla t, wysoce konserwatywna ewolucyjnie, została stwierdzona u ludzi, gryzoni i przedstawicieli protozoa [17]. Ma ona długość od 1 kpz u trypanosoma do 18 kpz w wątrobie myszy. Z kolei wolny koniec 3' DNA wypiera jedną z nici dsDNA tworząc pętlę D (*ang.: Displacement loop*) (Ryc. 1).



Ryc. 1 Kompleks telomerowy złożony z DNA oraz białek. Na końcu chromosomu DNA tworzy dwie pętle: t i D. Do pętli wiążą się białka, których funkcją jest zarówno ochrona i stabilizacja telomerów, jak i regulacja procesów replikacji, rekombinacji i transkrypcji.

Istotną rolę w powstawaniu oraz funkcji telomerów odgrywają białka trwale lub fakultatywnie z nimi związane. Podstawowym białkiem wpływającym na powstawanie i stabilizację pętli t jest TRF2 (*ang.: Telomeric Repeat binding Factor 2*) białko wiążące dsDNA na połączeniach z ssDNA zapobiegające powstawaniu fuzji interchromosomalnych. Inne białka zaangażowane w utrzymanie długości telomerów to m.in. TRF1 (*ang.: Telomeric Repeat binding Factor 1*) oraz

Pot1 (*ang.: Protein of telomeres 1*) chroniące wolny koniec 3'. Poza białkami stabilizującymi i chroniącymi telomer występuje wiele białek regulujących wiązanie tych pierwszych np. tankyraza (*ang.: TRF1-interacting, ANKYrin-related ADP-ribose polymerase*), TIN2 (*ang.:TRF1-Interacting Nuclear protein 2*) i białko Ku80 podjednostka kinazy białkowej zależnej od DNA [18,19]. Budowa przestrzenna telomeru wraz ze związanymi białkami ochrania wolny koniec 3' zarówno przed degradacją, jak i niekontrolowaną elongacją przez telomerazę.

3.2.2 Telomeraza

Podział komórki związany jest z koniecznością stworzenia nowej kopii chromosomalnego DNA. Kopiowanie nie jest jednak kompletne, gdyż wraz z każdą replikacją skracane są końce chromosomów. Jest to spowodowane brakiem możliwości syntezy DNA w sposób ciągły na obydwu niciach. Na nici wiodącej synteza odbywa się w sposób ciągły, aż do końca chromatydy, zaś na nici opóźnionej powstają krótkie (100-200 pz) fragmenty Okazaki. Każdy z tych fragmentów rozpoczyna się starterem RNA. Starter ten jest następnie usuwany, a w jego miejsce syntetyzowany jest fragment DNA. Jedynym fragmentem Okazaki, w którym wstawienie fragmentu DNA nie zachodzi jest ten, który powstał na końcu chromatydy. Dzieje się tak ponieważ DNA jest dosyntetyzowywane przez system replikacyjny do następnego fragmentu Okazaki traktowanego jak starter. Tak więc na końcu chromatydy powstaje wolny koniec DNA [20-24]. Dopóki degradowanym fragmentem chromosomu jest odcinek telomeru, dopóty komórka żyje, gdyż nie traci kodującej informacji genetycznej. Gdy zaś postępująca utrata DNA obejmie sekwencje kodujące, następuje apoptoza. Tak więc komórka ma

swego rodzaju zegar replikacyjny zwany „limitem Hayflick’a” determinujący ilość podziałów, którym może ulec komórka nim dojdzie do śmierci apoptotycznej [25,26]. Zegara takiego nie mają komórki, w których stwierdzono aktywność telomerazy, enzymu odbudowującego telomery (Ryc.2). Komórki takie stają się nieśmiertelne.

Telomeraza jest enzymem występującym w komórce w około 100 kopiach [27]. Składową katalityczną telomerazy jest część białkowa o masie cząsteczkowej 127 kDa i aktywności odwrotnej transkryptazy hTERT (*ang.: human Telomerase Reverse Transcriptase*) zbudowanej z 1132 aminokwasów [28-31]. U człowieka część niebiałkową stanowi 451-nukleotydowy RNA hTR (*ang.: human Telomerase RNA*), w którym znajduje się sekwencja 3'-CAAUCCCAAUC-5', stanowiąca matrycę dla hTERT [32]. Telomeraza tworzy formy multimeryczne, aczkolwiek nie jest jasne czy ma to wpływ na aktywność katalityczną tego enzymu *in vivo* [33]. Telomerazowe RNA pozostaje związane z białkiem hTEP1 (*ang.: human Telomerase Associated Protein 1*), które pełni funkcje zarówno rusztowania ułatwiającego uzyskanie przez telomerazę wyższego rzędu struktur białkowych, jak i białka zakotwiczonego dla czynników regulacyjnych wiążących się do telomerazy [34,35].

Telomeraza u człowieka jest aktywna w większości tkanek w życiu embrionalnym, nie jest zaś aktywna w prawidłowych komórkach dorosłego człowieka za wyjątkiem tzw. komórek pnia i aktywowanych limfocytów [36-43]. Możliwe jest również wyindukowanie aktywności telomerazy w komórkach prawidłowych poprzez działanie różnego typu promieniowania. Ekspozycja ludzkiej skóry na światło słoneczne, czy ekspozycja komórek ludzkich i króliczych na promieniowanie UV, γ czy X indukuje telomerazę [44-47].

Większość nieśmiertelnych komórek ma stabilne telomery nie ulegające skracaniu i wykazuje aktywność telomerazy. Aktywność telomerazy wykazano w około 85% ludzkich nowotworów i linii komórek nowotworowych [48], gdzie stabilizacja i utrzymanie telomerów są niezbędne do immortalizacji komórek, a w konsekwencji transformacji nowotworowej [49-51].

Mechanizmy regulacji aktywności telomerazy nie są w pełni poznane. W badaniach *in vitro* wykazano, że mieszanina podjednostek hTERT i hTR wykazuje śladową aktywność enzymatyczną [52].

Geny kodujące *hTR* oraz *hTEP1* ulegają ekspresji zarówno w tkankach prawidłowych, jak i komórkach nowotworowych nie wykazujących aktywności telomerazy. Natomiast ekspresja podjednostki białkowej hTERT jest skorelowana z aktywnością enzymu w tkankach i komórkach wykazujących aktywność telomerazy [29-32]. Nadprodukcja hTERT w komórkach prawidłowych spowodowała wydłużenie ich życia poprzez stabilizację długości telomerów [53,54]. Nadprodukcja hTERT w komórkach nieśmiertelnych może być spowodowana amplifikacją genu *hTERT*. Gen ten znajduje się na końcu ramienia krótkiego chromosomu 5, co może wpływać na częstotliwość jego amplifikacji. Zjawisko zwielokrotnienia ilości kopii genu *hTERT* stwierdzono w około 30% linii komórkowych oraz pierwotnych nowotworów [55,56]. Regulacja poziomu hTERT na etapie transkrypcji jest jednym z mechanizmów kontroli aktywności telomerazy. W prawidłowych komórkach somatycznych promotor hTERT jest nieaktywny. Jego aktywacja następuje pod wpływem bezpośredniego związania c-Myc [57,58]. Zwiększenie poziomu transkryptu hTERT stwierdzono również po wprowadzeniu do komórek takich białek jak E6 ludzkiego wirusa papilloma 16 (HPV16), v-K_i-ras czy Bcl-2 [59-62]. Zaś obniżenie poziomu po ponownym wprowadzeniu do zmutowanych

komórek Rb⁻/p53⁻ białka Rb [63]. Ponadto w promotorze genu hTERT znaleziono elementy odpowiedzi na szereg czynników transkrypcyjnych (NF-κB, Sp1, AP1, MZF-2, WT1) i hormonów (estrogen, progesteron, 1,25(OH)₂D3) [64]. Transkrypt hTERT może ulegać regulacji przez alternatywne składanie. Jak dotąd stwierdzono występowanie sześciu wariantów mRNA hTERT, z których nie wszystkie dają produkt w postaci aktywnego enzymu [65,66]. Wydaje się zatem, że dalsza analiza transkryptów, jak i systemów odpowiedzialnych za alternatywne składanie, może przynieść nowe informacje na temat regulacji aktywności telomerazy. Zaproponowano również udział regulacji epigenetycznej transkrypcji hTERT poprzez metylację promotora [67], jak i regulację poprzez modyfikację białek histonowych których acetylacja ułatwia wiązanie się czynników transkrypcyjnych do promotora przez rozluźnienie DNA [68].

Podobnie jak wiele innych białek telomeraza jest również regulowana na poziomie modyfikacji potranslacyjnych. Jest to białko o stosunkowo długim czasie półtrwania [69] wiążącym się z szeregiem białek regulatorowych, z których wymienię tu jedynie kilka. Peptyd będący N-końcem białka hTEP1 jest inhibitorem aktywności telomerazy. Wskazuje to na udział hTEP1 nie tylko w tworzeniu holoenzymu, ale również w mediowaniu interakcji pomiędzy telomerazą, a innymi białkami. Dzieje się tak na przykład w przypadku p53, gdzie hTEP1 koimmunoprecypituje z p53, ma zdolność do inhibicji aktywności telomerazy, jak i jego mutacje są związane z aktywacją telomerazy [70,71]. Inne białko telomerowe hTRF1 ulegające nadekspresji w komórkach wykazujących aktywność telomerazy, wpływa negatywnie na jej aktywność. Analogiczny efekt wywiera również białko Rap1p w komórkach drożdży. Widocznym efektem nadekspresji tych białek jest skrócenie telomerów [72,73]. Odwrotny efekt wywiera natomiast białko

Taz1, które z kolei powoduje wzrost długości telomerów [74]. Białkami regulującymi aktywność telomerazy są tankyrazy 1 i 2. Są to polimerazy poli(ADP-rybozy) rybozylujące hTRF1, a w konsekwencji powodujące jego oddzielenie od telomeru. Telomer pozbawiony hTRF1 staje się dostępny dla telomerazy [75].

Odrębnym aspektem regulacji aktywności telomerazy jest fosforylacja. Zarówno hTERT, jak i hTEP1 są białkami, fosforylowanymi przez kinazę białek C α (PKC α : *ang.: Protein Kinase C α*) [76]. Ciekawe wyniki uzyskano wykorzystując związki stymulujące lub hamujące aktywność PKC α . Wpływały one pośrednio na aktywność telomerazy [77,78]. Kinaza białek B (PKB/Akt: *ang.: Protein Kinase B*) również *in vitro* fosforyluje telomerazę i stymuluje jej aktywność. Inhibicja kaskady PKB powodowała (podobnie jak w przypadku PKC α) inhibicję telomerazy [79]. Tak więc telomeraza może być aktywowana przez fosforylację katalizowaną przez kinazy białek B i C α . Inaktywacja telomerazy zachodzi prawdopodobnie z udziałem fosfatazy białek 2A (PP2A: *ang.: Protein Phosphatase 2A*) (Ryc.3).

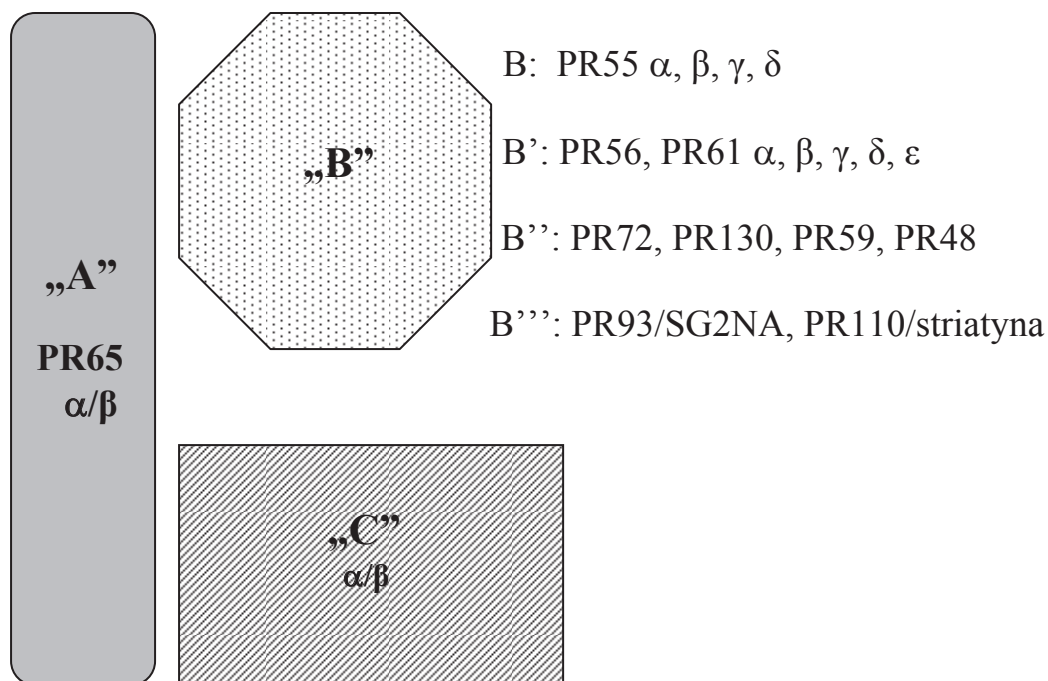


Ryc.3 Możliwa rola PP2A w regulacji aktywności telomerazy przez fosforylację i defosforylację.

3.3 FOSFATAZA BIAŁEK 2A (PP2A)

Fosfataza PP2A jest enzymem należącym do rodziny fosfataz serynowo/treoniniowych. Zaangażowana jest w kontrolę podziałów, remodeling cytoszkieletu, replikację, transkrypcję, translację, regulację metabolizmu, różnicowanie, morfogenezę, nowotworzenie, sygnalizację komórkową i.in. [80-86]. Podjednostkowa budowa PP2A sprawia, że spektrum procesów komórkowych w których zaangażowana jest PP2A jest tak szerokie. Holoenzym PP2A składa się z tzw. dimeru rdzeniowego, będącego połączeniem podjednostki strukturalnej z katalityczną, oraz podjednostki regulatorowej (Ryc. 4). Dimer rdzeniowy stanowi około jednej trzeciej całkowitej puli kompleksów PP2A komórki. Dimer jest formą nieaktywną [87]. Wszystkie podjednostki występują w co najmniej 2 izoformach i tworzą ponad 70 możliwych zestawień o zróżnicowanej aktywności (od bardzo niskiej do bardzo wysokiej) i specyficzności substratowej [88].

Podjednostka katalityczna PP2Ac (36-38 kDa) występuje w 2 izoformach α i β , których homologia wynosi 97% [89]. Izoformy te są obecne we wszystkich tkankach, z tym że izoforma α jest około 10 razy więcej niż izoforma β [90]. Sekwencja aminokwasowa PP2Ac wykazuje bardzo wysoką konserwatywność ewolucyjną, co dodatkowo podkreśla kluczową rolę PP2A w metabolizmie komórki [91]. Struktura PP2Ac nie została jak dotąd rozwiązana krystalograficznie, opracowany jednak został komputerowy model prawdopodobnej budowy tej podjednostki. Model ten powstał na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej PP2Ac oraz na podstawie struktury krystalograficznej PP1 γ ₁ (*ang.: Protein Phosphatase 1 γ subunit*), której sekwencja jest w wysokim stopniu homologiczna z PP2Ac [92].



Ryc.4 Schemat struktury holoenzymu PP2A. Zarówno podjednostka regulatorowa „B”, jak i katalityczna „C” wiążą się niezależnie z podjednostką strukturalną „A”. Podjednostki regulatorowe należą do czterech rodzin białek B, B', B'' i B'''. W obrębie każdej rodziny wyróżniamy wiele białek oraz ich izoform.

Zaproponowano model PP2Ac w którym jest to zwarta struktura eliptyczna z 10 α -helisami i 3 kartkami β , o wymiarach $\sim 50\text{\AA} \times 35\text{\AA} \times 35\text{\AA}$. Zawiera ona w swoim centrum katalitycznym jony Zn^{2+} i Fe^{2+} . Jony metali stabilizują ładunek ujemny grupy fosforanowej fosfoseryny i fosfotreoniny i czynią ją bardziej dostępną dla ataku nukleofilowego cząsteczki wody. Całość struktury można podzielić na dwie subdomeny z których region N-terminalny zawiera motyw β - α - β - α - β odpowiedzialny za wiązanie jonów metali, a więc katalizę, oraz region C-terminalny o mniej uporządkowanej strukturze, którego funkcją jest wiązanie substratów oraz inhibitorów [93-95].

Podjednostka strukturalna PP2A PR65 występuje również w 2 izoformach α i β . Jej funkcją jest tworzenie rusztowania do którego wiąże się zarówno podjednostka katalityczna, jak i podjednostki

regulatorowe. Izoformy są homologiczne w 86%. W większości tkanek forma α występuje w większej ilości niż β [96], stopień konserwatywności ewolucyjnej tego białka jest jednak dużo niższy. Jest to białko księżycowatego kształtu, złożone z piętnastu 39-aminokwasowych bogatych w leucynę motywów HEAT (*ang.: Huntington Elongation A subunit TOR*, gdzie TOR.: *Target of Rapamycin*) [97]. Motywy te składają się z dwóch antyrównoległych α -helis połączonych hydrofobową pętlą. Podjednostki regulatorowe wiążą się do 10 pierwszych motywów HEAT, zaś 5 ostatnich podjednostkę katalityczną [98].

Do dimeru rdzeniowego wiążą się podjednostki regulatorowe, wpływające na aktywność i specyficzność holoenzymu oraz jego lokalizację subkomórkową [84]. Jak dotąd opisano kilka rodzin podjednostek regulatorowych B, B', B'', B''' o masach cząsteczkowych od 54 do 130 kDa. W obrębie każdej z rodzin sklasyfikowano po kilka podjednostek regulatorowych, często w wielu alternatywnych wariantach, co generuje wiele typów holoenzymów, defosforylujących różne substraty w różnych kompartmentach komórki [99]. Ekspresja podjednostek regulatorowych jest zarówno tkankowo, jak i ontogenetycznie specyficzna. Część podjednostek regulatorowych jest ekspresjonowana we wszystkich tkankach (PR55 α i δ) [100], a niektóre specyficznie, na przykład PR55 β w jądrach i tkance nerwowej [101]. Olbrzymia różnorodność podjednostek regulatorowych oraz fakt odkrywania coraz to nowych białek, generują ogromną różnorodność holoenzymów PP2A. Podjednostki regulatorowe wpływają na takie właściwości holoenzymu jak jego specyficzność, sprawność katalizy oraz kompartmentację komórkową, mogą one również prawdopodobnie stanowić cel innych białek regulujących za pośrednictwem podjednostki regulatorowej aktywność PP2A [100, 102-105].

Regulacja aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych jest słabo poznana. Odbywa się ona zarówno na poziomie transkrypcji, składania genowego, epigenezy, jak i modyfikacji potranslacyjnej. Ta ostatnia odbywa się przez odwracalną fosforylację, katalizowaną przez kinazy białek B i C oraz prawdopodobnie przez fosfatazę białek typu 2A. Defosforylacja telomerazy przez PP2A wykazana została jak dotąd jedynie w badaniach na liniach komórkowych. Inhibitor PP2A (kwas okadejowy) stymulował aktywność telomerazy w komórkach linii raka piersi [106]. Te fragmentaryczne doniesienia sugerują, że PP2A odgrywa ważną rolę w regulacji aktywności telomerazy. Interesującym zatem wydawało się zbadanie poziomu podjednostki katalitycznej PP2A oraz porównanie go z aktywnością telomerazy, w raku pęcherza moczowego.

Aktywność telomerazy jest potencjalnym markerem diagnostycznym i prognostycznym w wielu typach nowotworów. Jest to spowodowane powszechnością jej występowania w różnego typu zmianach neoplastycznych, jak również niemal całkowitym brakiem aktywności w pozostałych tkankach. W raku pęcherza moczowego oznaczanie aktywności telomerazy w pobranych ze ściany pęcherza wycinkach może przyczynić się do poprawy czułości i specyficzności dotychczas stosowanych metod diagnostycznych. Poza badaniem aktywności telomerazy w tkankach, interesującym wydaje się sprawdzenie, czy możliwe jest wykorzystanie osadu komórek z moczu, jako materiału diagnostycznego. Przy niedoskonałości klasycznych metod diagnostyki moczu (cytologia) badanie aktywności telomerazy w osadzie komórek z moczu mogłoby przyczynić się do wcześniejszego wykrywania zmian nowotworowych. Dobra nieinwazyjna metoda diagnostyczna mogłaby w znacznym stopniu przyczynić się również do zwiększenia komfortu życia pacjentów.

4. CEL PRACY

1. Porównanie poziomu izoformy α katalitycznej podjednostki fosfatazy białek typu 2A w raku pęcherza moczowego i otaczających tkankach pozbawionych cech nowotworowych.
2. Porównanie poziomu izoformy α katalitycznej podjednostki fosfatazy białek typu 2A z poziomem aktywności telomerazy w raku pęcherza moczowego.
3. Ocena przydatności klinicznej badania aktywności telomerazy w raku pęcherza moczowego:
 - a) w materiale pochodzącym ze ściany pęcherza moczowego
 - b) w osadzie komórek z moczu.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1 PACJENCI

Wycinki przejściowonabłonkowych raków pęcherza moczowego oraz osady komórek z moczu pobrano od pacjentów Kliniki i Katedry Urologii Akademii Medycznej w Gdańsku. Każdy z pacjentów podpisał deklarację świadomej zgody na wykorzystywanie pobranego materiału do badań naukowych realizowanych w ramach projektu badawczego pt. „Mutacje w genie p53, aktywność telomerazy oraz niestabilności mikrosatelitarne w raku pęcherza moczowego” (Projekt KBN Nr 6 P05A 092 20). Projekt zyskał akceptację Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku. W niniejszej pracy została zachowana numeracja pacjentów zgodna z numeracją posiadanej przez Katedrę Biochemii kolekcji tkanek, z tego powodu numeracja pacjentów sięga numeru 64. Z powodu braku, bądź niewystarczającej do badań ilości materiału pobranego od kilku pacjentów, zestawienia przedstawiono dla 52 do 56 pacjentów, w zależności od typu wykonywanej analizy.

Od pacjentów w trakcie zabiegu pobierano wycinki raka pęcherza moczowego oraz wycinki otaczających nowotwór tkanek prawidłowego pęcherza moczowego pozbawionych cech nowotworowych, które w dalszej części pracy nazywać będę wycinkami tkanki prawidłowej. Rano, w dzień zabiegu, zbierany był również mocz. Spośród pacjentów kobiety stanowiły 25% (15 z 59), a mężczyźni 75% (44 z 59). Średnia wieku pacjentów wynosiła 63 lata; od 32 do 84 lat. Ważniejsze dane kliniczne pacjentów przydatne dalszych rozważaniach przedstawiono w Tabeli 2.

Tab. 2 Dane kliniczne badanych pacjentów

<i>Pacjent</i>	<i>Płeć</i>	<i>Wiek</i>	<i>Klasyfikacja TNM</i>	<i>G</i>	<i>Przeżywalność</i>
1	K	76	T3aNxM0	G2	żyje
2	K	66	T3aN0M0	G2	żyje
4	M	58	T4N0M0	G3	zgon
5	M	61	T3aN0M0	G2	żyje
7	K	65	T4N1M0	G3	zgon
8	M	65	T3aN0M0	G1	żyje
9	K	75	T3aN1M0	G2	zgon
10	K	50	T3bN0M0	G2	żyje
11	K	61	T4N1M0	G3	zgon
12	M	61	T3bN1M0	G3	zgon
13	M	73	T3bN1M0	G2	zgon
15	M	51	T3bN0M0	G3	żyje
16	M	52	T2N0M0	G2	żyje
17	M	58	T3bN0M0	G3	zgon
18	K	64	T3bN1M0	G3	zgon
19	M	55	T2N0M0	G1	żyje
20	M	53	T2N0M0	G1	żyje
21	M	34	T1N0M0	G1	żyje
22	M	63	TaNoM0	G1	żyje
23	K	69	T2NxM0	G2	żyje
24	M	68	T2N0M0	G3	żyje
25	M	72	T3bN1M0	G3	żyje
26	M	67	T3NxM0	G2	zgon
27	M	61	T2N0M0	G1	żyje
28	M	60	T1N0M0	G2	żyje
29	M	59	T3N0M0	G3	żyje
30	M	71	T3bN1M0	G3	zgon
31	K	45	T1N0M0	G1	żyje
32	M	84	T1N0M0	G1	żyje
33	M	46	T3bN1M0	G3	żyje
34	M	75	T1NxM0	G2	żyje
35	M	50	T3bN0M0	G3	żyje
37	M	74	T1NxM0	G2	żyje
38	M	57	T1NxM0	G1	żyje
39	M	62	T3N1M0	G2	zgon
40	K	58	T1NxM0	G1	żyje
41	M	50	T1N0M0	G1	żyje
42	K	62	T2NxM0	G2	zgon
43	M	66	T3N0M0	G2	żyje

44	K	63	T1NxM0	G1	żyje
45	M	77	T1NxM0	G1	żyje
46	M	75	T1N0M0	G1	żyje
47	M	69	T1N0M0	G2	żyje
48	M	60	TaN0M0	G1	żyje
49	M	72	T1N0M0	G2	zgon
50	M	57	T1N0M0	G1	żyje
51	M	56	T1N0M0	G2	żyje
52	M	69	T1N0M0	G2	żyje
53	M	70	TaN0M0	G1	żyje
54	M	57	T3N1M0	G2	żyje
55	M	68	T3NxM0	G2	żyje
56	M	64	T1N0M0	G1	żyje
57	K	54	T1N0M0	G1	żyje
59	M	79	T1N0M0	G1	żyje
60	M	78	T2N0M0	G3	zgon
61	M	32	TaN0M0	G1	żyje
62	M	76	T1N0M0	G2	żyje
63	K	bd	T1N0M0	G2	żyje
64	K	bd	TaN0M0	G1	żyje

K – kobieta; M – mężczyzna; bd – brak danych

Stopień zaawansowania klinicznego nowotworu został określony przez lekarza wykonującego zabieg na podstawie piątego wydania klasyfikacji TNM [107]. Klasyfikacja ta w przypadku raka pęcherza moczowego opisuje stopień naciekania nowotworu na głębiej położone tkanki i narządy. Zgodnie z tą klasyfikacją miejscowy zasięg nowotworu, przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych i stopień ich zajęcia oraz występowanie innych przerzutów odległych oznacza się odpowiednio: Tx-Tis-Ta-1-2-3-4, Nx-1-2-3 i Mx-0-1 (Tab.3).

Tab.3 Klasyfikacja nowotworów pęcherza moczowego oparta na ocenie stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu [107,108].

TNM	Opis
Tx	Nowotwór pierwotny nie mógł być oceniony
T0	Nie stwierdzono nowotworu pierwotnego
Tis	Rak przedinwazyjny (carcinoma in situ), guz „płaski”
Ta	Rak brodawczakowaty, nieinwazyjny
T1	Rak nacieka błonę podśluzową (lamina propria)
T2	Nowotwór nacieka powierzchniowe warstwy mięśni pęcherza (50%)
T3	Nowotwór nacieka głębokie warstwy mięśni pęcherza lub/i okołopęcherzową tkankę tłuszczową T3a - Nowotwór nacieka głębokie warstwy mięśni pęcherza T3b - Nowotwór nacieka tkankę tłuszczową okołopęcherzową
T4	Guz naciekający sąsiednie narządy (stercz, pochwę, macicę, cewkę moczową, powłoki brzuszne lub ściany miednicy) T4a – naciek na stercz, macicę lub pochwę T4b – naciek na ścianę miednicy lub powłoki brzuszne
Nx	Stopień zajęcia okolicznych węzłów chłonnych nie mógł być oceniony
N0	Brak przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych
N1	Przerzut do jednego węzła chłonnego miednicy o średnicy nie przekraczającej 2cm
N2	Przerzut do jednego lub przerzuty do wielu węzłów chłonnych o średnicy większej niż 5cm
N3	Przerzut do węzła chłonnego miednicy o średnicy przekraczającej 5cm
Mx	Występowanie odległych przerzutów nie mogło być ocenione
M0	Brak przerzutów odległych
M1	Przerzuty do węzłów chłonnych poza miednicą lub inne przerzuty odległe

Zgodnie z klasyfikacją przedstawioną w Tabeli 3 nowotwory podzielono na: nowotwory o stopniu zaawansowania klinicznego Ta- u 5 pacjentów, T1 u 22 pacjentów, T2 u 8 pacjentów, T3 u 21 pacjentów i T4 u 3 pacjentów. Oceniono również występowanie przerzutów i stopień zajęcia okolicznych węzłów chłonnych, gdzie nisko zaawansowane zmiany w węzłach chłonnych miednicy stwierdzono w 11 przypadkach.

Poza oceną stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu określono również stopień złośliwości histologicznej G. Klasyfikacja ta pozwala na podział pacjentów ułatwiający dalsze postępowanie kliniczne, umożliwia zrandomizowanie leczenia pacjentów, których zmiany nowotworowe należą do tej samej grupy złośliwości histologicznej. Pacjentów dzieli się na trzy grupy w zależności od stopnia zróżnicowania nowotworu (Tab.4). Określa on takie cechy nabłonka jak pleomorfizm i stopień polaryzacji jąder [109].

Tab.4 Klasyfikacja nowotworów oparta na ocenie stopnia złośliwości histologicznej nowotworu.

Stopień złośliwości histologicznej G	Opis
1	Nowotwór dobrze zróżnicowany
2	Nowotwór średnio zróżnicowany
3	Nowotwór słabo zróżnicowany lub anaplastyczny

Badane nowotwory podzielono również na podstawie tej klasyfikacji; do grupy G1 zaliczono 22 nowotwory (37%), do grupy G2 zaliczono 23 (40%), zaś do grupy G3 zaliczono 14 nowotworów (23%). Stopień złośliwości histologicznej nowotworów był określany przez Laboratorium Patomorfologii Akademickiego Centrum Klinicznego Akademii Medycznej w Gdańsku pod kierownictwem dr hab. Kazimierza Jaśkiewicza.

Oceniono także przeżywalność pacjentów na dzień zakończenia badań, tj. 30.11.2003 roku, zmarło 14 pacjentów (24%).

Poza osobami chorymi na raka pęcherza moczowego przeanalizowano również osady komórek z moczu 11 osób zdrowych. W grupie tej znalazło się 9 kobiet i 2 mężczyzn (średnia wieku w grupie wyniosła 57 lat). Z powodów etycznych nie jest możliwe pozyskanie wycinków tkanek prawidłowej ściany pęcherza moczowego od osób zdrowych, dlatego w tej grupie wykonano jedynie badanie aktywności telomerazy w osadzie komórek z moczu.

5.2 EKSTRAKTY TKANKOWE PĘCHERZA MOCZOWEGO

Wycinki tkanek pęcherza moczowego (guza i tkanki prawidłowej) po pobraniu zamrażano w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w -80°C . Ekstrakty tkankowe uzyskiwano poprzez homogenizację 100-120 mg wycinka w ciekłym azocie w moździerzu porcelanowym. Zhomogenizowany materiał umieszczano w probówce typu eppendorff i zalewano 200 μl zimnego buforu lizującego załączonego do zestawu do analizy aktywności telomerazy (bufor CHAPS: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM MgCl_2 ; 1 mM EGTA; 0,1 mM fluorek fenylo-metylosiarczanu; 5 mM β -merkaptotanol; 10% glicerol i 0,5% siarczan 3-[(3-chloroamidopropyl)dimetyloamono]-1-propanu (CHAPS)) i inkubowano przez 30 minut w lodzie. Po zakończeniu inkubacji ekstrakty wirowano 16 000 x g przez 20 minut w 4°C , osad odrzucano, zaś supernatant szybko zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C . Stężenie białka w ekstraktach tkankowych oznaczano metodą Bradford [110].

5.3 EKSTRAKTY OSADÓW KOMÓREK Z MOCZU

Mocz wirowano 1400 x g przez 8 minut w celu otrzymania osadu komórek. Otrzymany osad przemywano dwukrotnie buforem PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) w celu usunięcia czynników interferujących z wykonywanymi analizami. Przemyty osad komórek z moczu zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C. Po rozmrożeniu do próbówki z osadem dodawano 200 µl buforu lizującego (skład podano powyżej). Po zakończeniu inkubacji ekstrakty wirowano 16 000 x g przez 20 minut w 4°C, osad odrzucano, zaś supernatant szybko zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C. Stężenie białka w ekstraktach komórek z moczu oznaczano metodą Bradford [110].

5.4 ANALIZA POZIOMU IZOFORMY α KATALITYCZNEJ PODJEDNOSTKI FOSFATAZY BIAŁEK TYPU 2A W EKSTRAKTACH PĘCHERZA MOCZOWEGO

Rozdział elektroforetyczny

Do analizy poziomu PP2A α użyto ekstraktów, które otrzymano zgodnie z opisem z podrozdziału 5.2. Elektroforezę przeprowadzono w aparacie firmy SIGMA SV10-CDC. Rozdział białek prowadzono w żelu nieciągłym, złożonym z górnego żelu zagęszczającego i dolnego żelu rozdzielającego. Dolny żel rozdzielający sporządzano poprzez zmieszanie: 4 ml H₂O, 3,3 ml 30% roztworu akrylamidów (akrylamid/bis-akrylamid 29:1); 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 100 µl 10% roztworu dodecylosiarczanu sodu (SDS); 50 µl 10% roztworu siarczanu amonu (APS) i 5 µl katalizatora – N,N,N',N'-tetrametyloetylodiaminy (TEMED). Po wylaniu tej

mieszaniny między płyty nawarstwiano ją H_2O w celu wyrównania powierzchni polimeryzującego żelu oraz odcięcia dopływu tlenu, hamującego reakcję polimeryzacji. Po 20 minutach wodę usuwano, a na uzyskany żel dolny wylewano żel górny w składzie: 2,44 ml H_2O , 0,52 ml 30% roztworu akrylamidów (akrylamid/bis-akrylamid 29:1); 1 ml 0,5 M Tris pH 6,8; 40 μ l 10% SDS; 20 μ l 10 APS i 4 μ l katalizatora – TEMED. Natychmiast po wlaniu górnego żelu między płyty szklane umieszczano w nim grzebień. Po 30-minutowej polimeryzacji gotowy żel pomiędzy szklanymi płytami umieszczano w aparacie do elektroforezy. Rozdział białek prowadzono w buforze elektrodowym o składzie: 25 mM Tris; 190 mM glicyna, 0,1% SDS, pH 8,3. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 100V do momentu osiągnięcia przez błękit bromofenolowy dolnej krawędzi żelu rozdzielającego. Wzorcem masy cząsteczkowej była wstępnie barwiona mieszanina białek firmy Fermentas: Prestained Protein Ladder ~10-160 kDa (SM0671), oraz PP2A α wyizolowana z mięśnia szkieletowego królika. Ekstrakty tkankowe zawierające po 10 μ g białka przed naniesieniem na żel były denaturowane przez połączenie w stosunku 1:1 z buforem denaturującym Laemmliego o składzie: 4% SDS; 20% glicerol; 10% β -merkaptioetanol, 0,004% błękit bromofenolowy i 0,125 M Tris-HCl pH 6,8; dopełnienie buforem PBS do jednakowej objętości wszystkich nanoszonych prób w celu zniwelowania wpływu parowania oraz umieszczenie we wrzącej łaźni wodnej na 5 minut i zwirowane.

Transfer białek z żelu na membranę

Po zakończonej elektroforezie prowadzono elektrotransfer półsuchy w aparacie Biotec-Fisher w środowisku buforu transferowego o składzie: 39 mM glicyna, 48 mM Tris i 0,37% SDS i 20% metanol. Układano kolejno na mokro warstwami:

- 6 warstw bibuły Whatmann 3MM
- żel poliakrylamidowy (rozdzielający)
- membranę nitrocelulozową
- 6 warstw bibuły Whatmann 3MM

o wymiarach odpowiadających dokładnie wymiarom żelu rozdzielającego. Tak otrzymaną „kanapkę” umieszczano w aparacie do elektrotransferu membraną po stronie anody. Elektrotransfer prowadzono przez 45 minut przy natężeniu 1mA na 1 cm² membrany nitrocelulozowej.

Analiza „western-blotting” (immunobloting)

Po zakończeniu elektrotransferu membranę nitrocelulozową umieszczano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w buforze PBS na 2 godziny z łagodnym wytrząsaniem, aby wyblokować kazeinę zawartą w mleku wszystkie pozostałe na membranie nie związane miejsca. Tak wyblokowaną membranę inkubowano następnie przez noc w 4°C z roztworami pierwszych przeciwciał w mleku. Stosowano dwa rodzaje pierwszych przeciwciał: poliklonalną surowicę króliczą skierowaną przeciwko C-terminalnemu peptydowi PP2A α [111]:



Reszta lizyny K $\dagger$, charakterystyczna dla PP2A α drożdżowej, u człowieka jest zastąpiona przez arginę. Surowicę króliczą stosowano w rozcieńczeniu 1:100.

Zastosowano również mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko β -aktynie ludzkiej firmy Sigma które stosowano w rozcieńczeniu 1:2000.

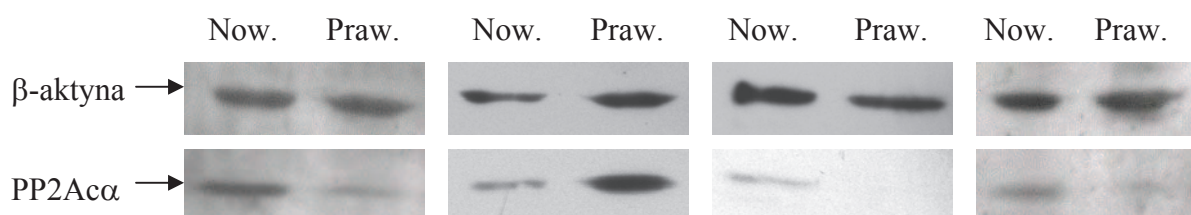
Nadmiar niezwiązanych i niespecyficznie związanych przeciwciał usuwano poprzez trzykrotne przemycie membrany buforem PBS z silnym wytrząsaniem po 10 min.. Membrany inkubowano następnie w roztworach przeciwciał skierowanych przeciwko pierwszemu przeciwciałom skoniugowanych z peroksydazą chrzanową: anti-królicze IgG i anti-mysie IgG (Sigma) w rozcieńczeniu 1:2000 przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Ponownie nie związane lub niespecyficznie związane przeciwciała usuwano poprzez trzykrotne przemycie buforem PBS z silnym wytrząsaniem. Koniugaty wykrywano chemiluminescencyjnie z użyciem substratu dla peroksydazy chrzanowej SuperSignal West Pico, Pierce, USA.

Analiza densytometryczna

Analizę densytometryczną wykonano z użyciem systemu do archiwizacji Gel Doc 2000, oraz oprogramowania Quantity One firmy Bio Rad. W celu określenia ilościowej relacji pomiędzy poziomami PP2A α w raku pęcherza moczowego i prawidłowym pęcherzu moczowym zastosowano następujący schemat obliczeniowy. Poziom białka PP2A α w badanej tkance standaryzowano wobec poziomowi β -aktyny w tej samej ilości próby. Standaryzacja ta dotyczyła zarówno tkanki guza nowotworowego, jak i tkanki prawidłowej pobranej od tego samego pacjenta. Porównywanie poziomów różnych białek do poziomu β -aktyny w raku pęcherza moczowego jest często stosowane z uwagi na stabilny poziom β -aktyny, nie zmieniający się wraz z postępem choroby [112-115]. Takie podejście do standaryzacji ilości użytego do analizy

całkowitego białka ekstraktu jest szczególnie wskazane w analizie nowotworów dla których charakterystyczne są zwłóknienia [50]. Duża ilość substancji międzykomórkowej może bowiem zafałszowywać otrzymany wynik, konieczne zatem jest wykorzystanie białkowego standardu takiego jak β -aktyna.

Pomimo, że rozdzielana była taka sama ilość białka (10 μ g) stwierdzono duże różnice poziomu PP2A α w wycinkach tkanek prawidłowego pęcherza moczowego (Ryc.5), co wymusiło wprowadzenie współczynnika R. Współczynnik R obrazuje wzajemne relacje między tkanką nowotworową a tkanką prawidłową pochodzącą od tego samego pacjenta (Ryc.5).



Ryc.5 Chemiluminescencyjna ocena poziomu PP2A α . Rozdzielono ekstrakty tkankowe zawierające po 10 μ g białka. Poziom PP2A α porównywano z poziomem białka β -aktyny. (Now. - nowotwór, Praw. – prawidłowy pęcherz moczowy)

Współczynnik R określany był na podstawie analizy densytometrycznej klisz z wykorzystaniem wzoru:

$$R = \frac{\text{Nowotwór}^{PP2A\alpha}}{\text{Nowotwór}^{\beta\text{-aktyna}}} / \frac{\text{Wycinek tkanki prawidłowej}^{PP2A\alpha}}{\text{Wycinek tkanki prawidłowej}^{\beta\text{-aktyna}}}$$

Gdzie danymi są bezwymiarowe współczynniki opisujące intensywność i wielkość prążka, z uwzględnieniem zaciemnienia tła. Współczynnik R większy od jedności wskazywał na podwyższony poziom

PP2A α w tkance guza nowotworowego w stosunku do wycinka tkanek prawidłowego pęcherza moczowego pobranego z pęcherza moczowego tego samego pacjenta.

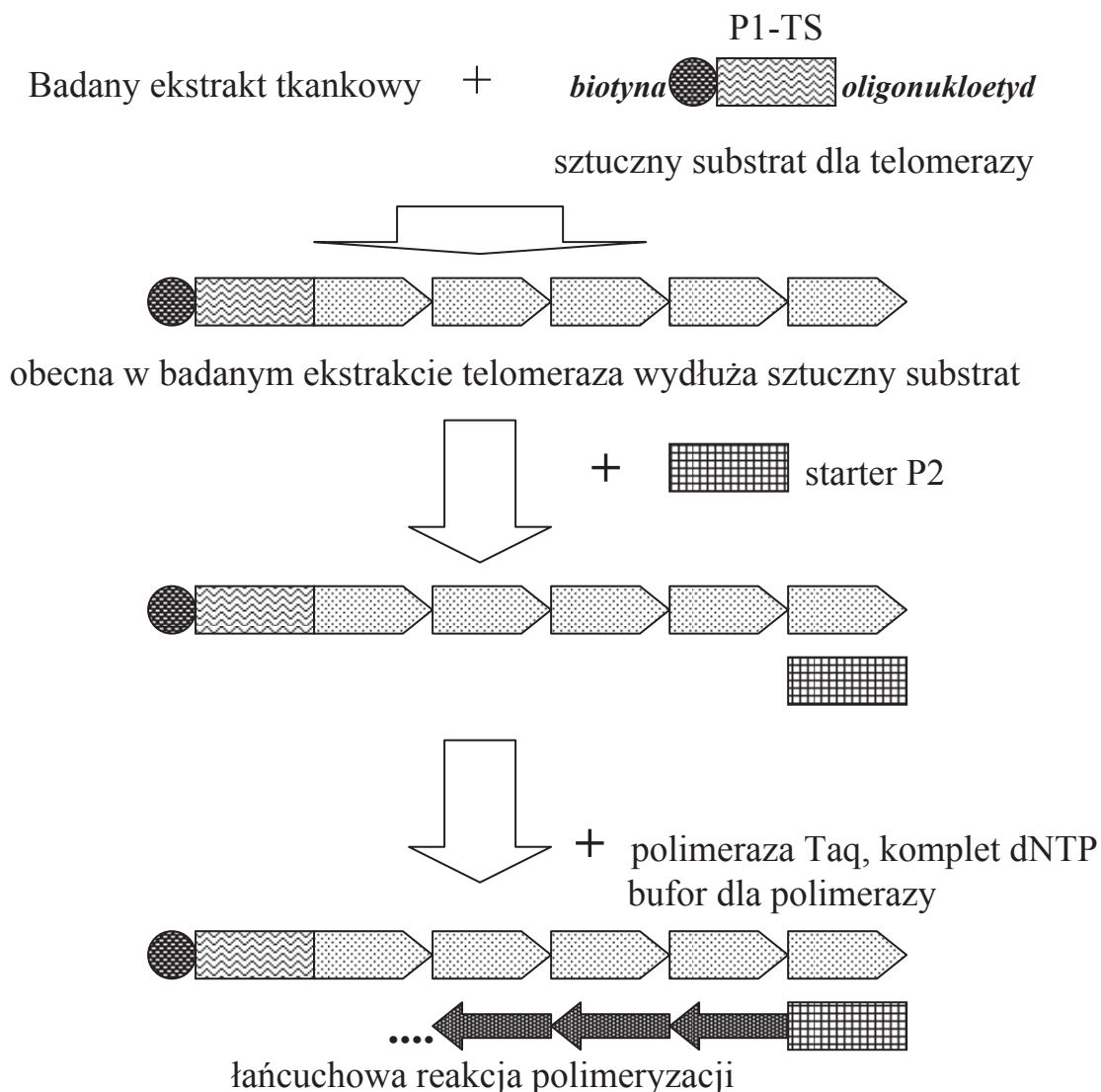
5.5 ANALIZA AKTYWNOŚCI TELOMERAZY W EKSTAKTACH RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO I OSADACH KOMÓREK Z MOCZU CHORYCH NA RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO

Zastosowano dwa komercyjne testy jakościowe: TRAPeze ELISA Telomerase Detection Kit Intergen, USA oraz TeloTTAGG Telomerase PCR ELISA Roche Diagnostics. Są one oparte na tej samej zasadzie, z niewielkimi różnicami metodologicznymi (sekwencje starterów, kontrole pozytywne i negatywne, czas inkubacji z poszczególnymi reagentami itp.). Poniższe schematy opisują test TRAPeze ELISA Telomerase Detection Kit, ważniejsze różnice metodologiczne zostały opisane w tekście.

Amplifikacja powtórzeń telomerowych: *TRAP (ang.: Telomeric Repeat Amplification Protocol)*

Pierwszym etapem oznaczania aktywności telomerazy w badanych ekstraktach tkankowych była reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) poprzedzona odwrotną transkrypcją (Ryc.6).

TRAP



Ryc.6 Schemat reakcji amplifikacji sekwencji telomerowych

Obecna w ekstrakcie tkankowym telomeraza syntetyzowała para-telomerowy produkt z wykorzystaniem sztucznego substratu P1-TS jako startera reakcji w czasie 30 minut w temperaturze 25°C. Powstały produkt był następnie powielany w łańcuchowej reakcji polimeryzacji PCR (*ang.: Polymerase Chain Reaction*) z wykorzystaniem sztucznego substratu P1-TS oraz drugiego oligonukleotydu P2 jako starterów reakcji. Reakcja PCR składała się z wstępnej 5 minutowej denaturacji w 94°C oraz 32 cykli: denaturacji w 94°C w czasie 30 s,

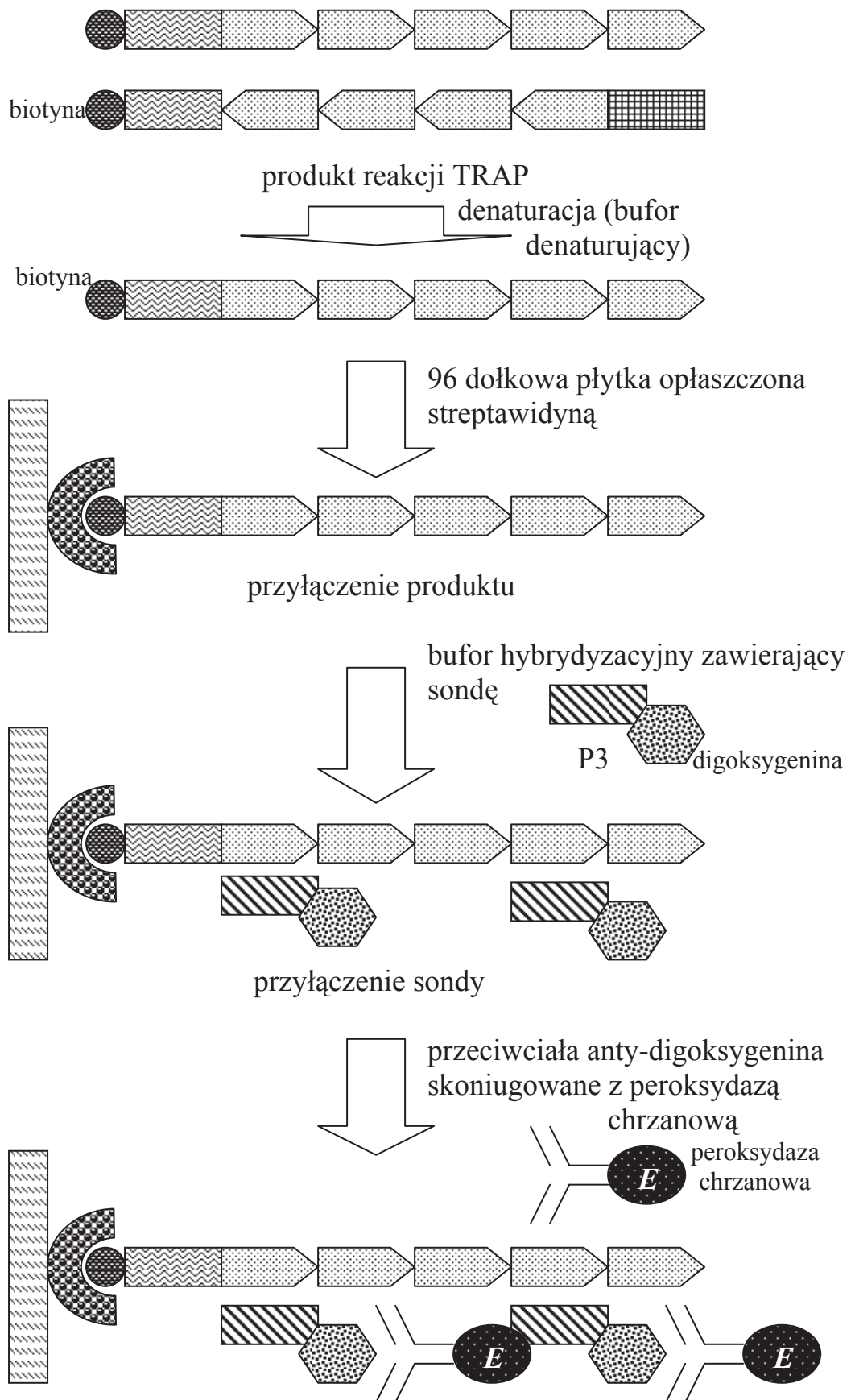
przylączania starterów w 50°C w czasie 30 s i polimeryzacji w 72°C w czasie 90 s katalizowanej przez polimerazę Taq. Po zakończeniu reakcji cyklicznej produkty reakcji były inkubowane przez 10 minut w temperaturze 72°C w celu dokończenia niekompletnych syntez i pełnej hybrydyzacji jednoniciowych komplementarnych produktów. Reakcje prowadzono w termocyklerze PTC-200, MJ Research, USA.

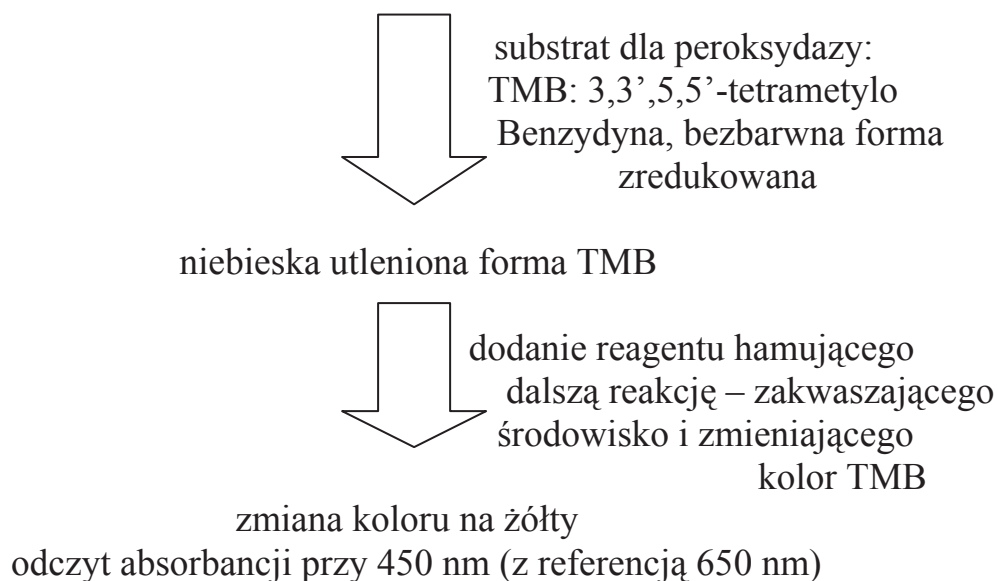
Sekwencja sztucznego substratu dla telomerazy wykorzystywanego w zestawie TeloTAGGG nie jest podawana przez producenta. W teście TRAPeże sztuczny substrat to biotynylowany oligonukleotyd b-TS: 5'-AATCGTCGAGCAGAGTT-3'. W teście tym wraz z amplifikacją produktu telomerazy namnażany jest również tzw. wewnętrzny standard będący kontrolą reakcji PCR. W mieszaninie reakcyjnej jest obecny dodatkowy zestaw oligomerów, które w warunkach TRAP dają produkt o długości 36 pz. Produkt ten jest widoczny na żelu poliakrylamidowym, zarówno w próbach w których jest aktywna telomeraza, jak i w próbkach nie wykazujących aktywności telomerazy. Nie jest on biotynylowany i nie bierze udziału w dalszej reakcji immunoenzymatycznej.

Analiza aktywności telomerazy w raku pęcherza moczowego – test immunoenzymatyczny

Otrzymane w wyniku reakcji TRAP produkty reakcji wykrywano przy pomocy testu immunoenzymatycznego ELISA (*ang.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Ryc.7).

ELISA





Ryc.7 Schemat reakcji immunoenzymatycznej służącej do wykrywania produktów reakcji TRAP

Produkty reakcji TRAP były wstępnie denaturowane a następnie, dzięki przyłączonej do startera P1-TS biotynie, przyłączane do dołków opłaszczonych streptawidyną.

Do 20 μ l roztworu denaturującego dodawano 5 μ l produktu reakcji i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po tym czasie dodawano 225 μ l buforu hybrydyzującego zawierającego sondy oligonukleotydowe skoniugowane z digoksygeniną. Po dokładnym wymieszaniu przenoszono po 100 μ l mieszaniny do dołków płytki opłaszczonej streptawidyną i inkubowano delikatnie wytrząsając w ciągu 2 godzin w 37°C. Koniugaty wykrywano poprzez związanie z przeciwciałami sprzężonymi z peroksydazą chrzanową. Bufor hybrydyzacyjny usuwano, płukano dołki 3 razy po 250 μ l buforu płuczącego i do studzienek наносzono 100 μ l roztworu przeciwciał anty-digoksygenina sprzężonych z peroksydazą chrzanową w stężeniu aktywności 10 mU/ml. Przeciwciała wiązały się z digoksygeniną 30 minut w temperaturze pokojowej z lekkim mieszaniem. Dodanie do środowiska 100 μ l zredukowanej formy

3,3',5,5'-tetrametylobenzydyny (TMB) powodowało utlenienie jej przez peroksydazę chrzanową do pojawienia się koloru niebieskiego. Reakcja była hamowana po 20 minutach przez dodanie 100 µl reagentu zakwaszającego środowisko i powodującego zmianę zabarwienia TMB na żółte. Absorbancję odczytywano przy długości fali 450 nm, z długością referencyjną 650 nm na czytniku mikropłytek 3550-UV, firmy Bio-Rad.

Kontrole testów

Test TeloTAGGG

Standardową kontrolą negatywną dla każdego ekstraktu tkankowego był ten sam ekstrakt inaktywowany termicznie po nałożeniu wszystkich substratów potrzebnych do zajścia reakcji TRAP przez 10 minut w 65°C. W tych warunkach telomeraza ulega nieodwracalnej inaktywacji, a więc próba taka może stanowić kontrolę „negatywną”.

Kontrolą pozytywną jest ekstrakt komórek linii komórkowej z aktywną telomerazą dołączony do testu. Ekstrakt ten był traktowany podobnie jak ekstrakty tkankowe guzów nowotworowych, zaś jego absorbancja we wszystkich wykonanych doświadczeniach przekraczała 2,0.

Test TRAPeze

W teście TRAPeze kontrolą negatywną dla każdego ekstraktu tkankowego był również ten sam ekstrakt inaktywowany termicznie przez 10 minut w 85°C przed rozpoczęciem reakcji TRAP. Był on następnie traktowany tak samo jak ekstrakt nie inaktywowany.

Kontrole pozytywne załączone do testu TRAPeze to także kontrola oparta na ekstrakcie komórek z aktywną telomerazą, jak również kontrola oparta na użyciu sztucznego oligonukleotydu TSR8 złożonego

z 8 powtórzeń sekwencji telomerowej, który służy za substrat reakcji PCR. Kontrola ta powinna mieć absorbancję przekraczającą 0,8. Dodatkową kontrolą użytą w tym teście jest tzw. kontrola primer/dimer, w której testuje się sam bufor lizujący. Kontrola ta pokazuje czy w wyniku reakcji nie powstały agregaty starterów, mogące dać fałszywie pozytywny wynik oraz czy użyte reagenty nie zawierają aktywnej telomerazy. Kontrola ta powinna mieć absorbancję nie przekraczającą 0,2.

W celu uniknięcia błędów każdą próbkę analizowano podwójnie. Przeanalizowano również ekstrakty prawidłowego pęcherza moczowego, nie znaleziono jednak w nich aktywnej telomerazy.

Analiza wyników

Test TeloTAGGG uznano za pozytywny, gdy absorbancja przekraczała 0,1. Producent testu wskazuje wartość absorbancji 0,2 jako graniczną. Na podstawie wykonywanych przeze mnie analiz uznałam wartość powyżej 0,1 i poniżej 0,2 za śladową. Było to spowodowane występowaniem widocznych w elektroforezie poliakrylamidowej produktów reakcji TRAP we wszystkich próbach których absorbancja przekraczała 0,1.

W przypadku testu TRAPeze w badanej tkance telomeraza była uznawana za aktywną, gdy różnica w absorbancji między badanym ekstraktem tkankowym nowotworu, a tym samym ekstraktem inaktywowanym termicznie przekraczała 0,15. Na podstawie wykonywanych przeze mnie analiz uznałam wartość powyżej 0,1 i poniżej 0,15 za oddającą aktywność śladową. Podobnie jak w teście TeloTAGGG tu również było to spowodowane występowaniem widocznych w elektroforezie poliakrylamidowej produktów reakcji TRAP w próbce, w której absorbancja przekroczyła 0,1.

Analiza aktywności telomerazy w osadach komórek z moczu

Produkty reakcji TRAP ekstraktów osadów komórek z moczu były uwidaczniane poprzez elektroforezę w żelu poliakrylamidowym oraz barwienie srebrem. Analiza taka pozwala na uzyskiwanie równie wiarygodnych wyników, jak test ELISA.

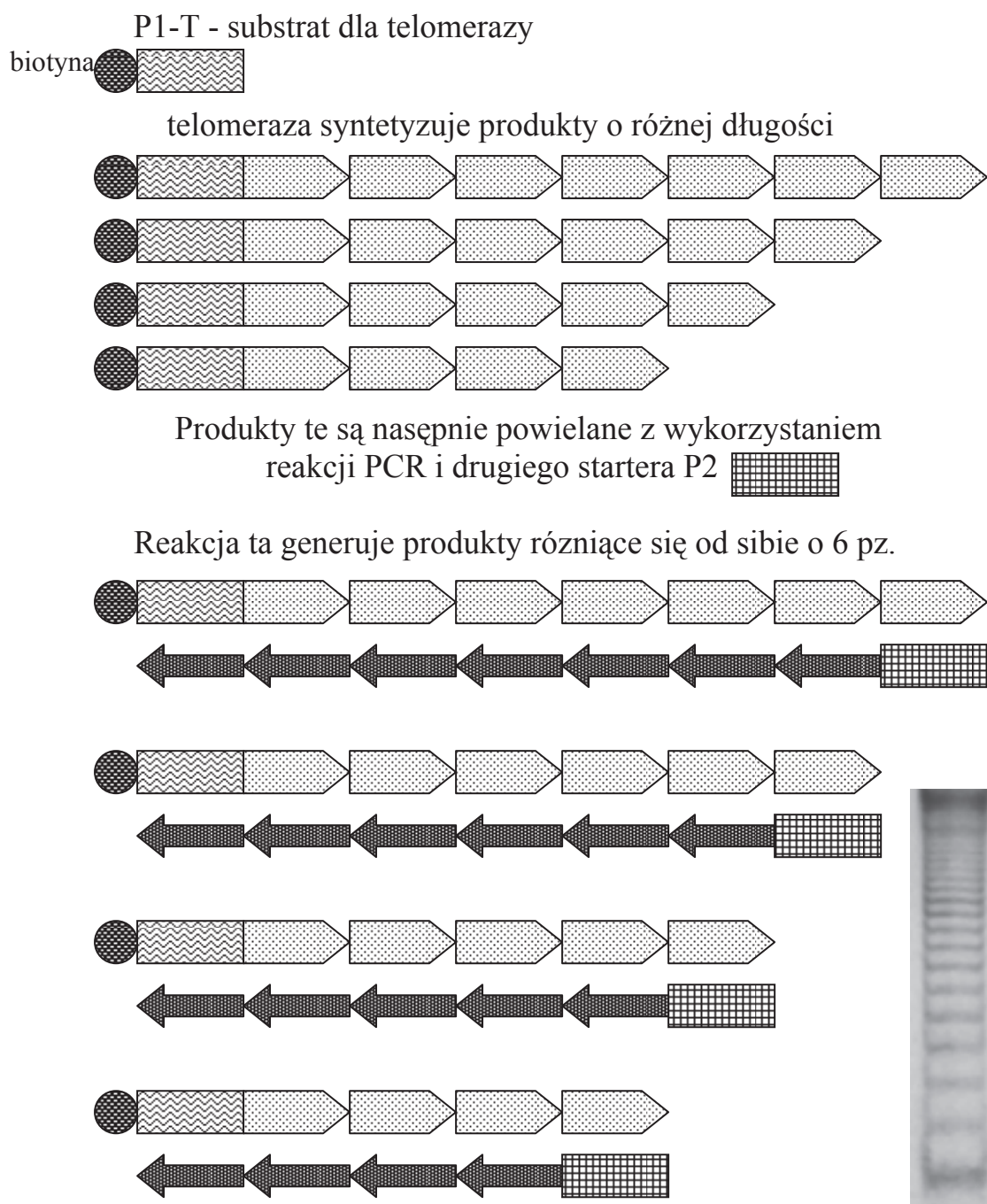
Rozdział elektroforetyczny:

Elektroforezę przeprowadzono w aparacie firmy SIGMA SV10-CDC. Rozdział DNA prowadzono w żelu ciągłym o stężeniu poliakrylamidów wynoszącym 12%. Żel sporządzano poprzez zmieszanie: 3 ml H_2O , 1,8 ml 40% gotowego roztworu akrylamidów (akrylamid/bis-akrylamid 15:1); 1,2 ml 5 x stężonego buforu TBE (o składzie dla 1x stężonego buforu: 0,089 M Tris Base, 0,089 M kwas borowy i 0,002 M EDTA pH 8,4), 50 μ l 10% APS i 5 μ l katalizatora TEMED. Natychmiast po wlaniu żelu między płyty szklane umieszczano w nim grzebień. Po 30-minutowej polimeryzacji gotowy żel pomiędzy szklanymi płytami umieszczano w aparacie do elektroforezy. Rozdział prowadzono w buforze TBE 1x przy napięciu 100 V przez 2,5 godziny. Produkty reakcji TRAP przed naniesieniem do studzienek były łączone w proporcji 1:4 z buforem obciążającym: 50% glicerol, 50 mM EDTA i 0,25% błękit bromofenolowy.

Barwienie metodą srebrową

Po zakończeniu elektroforezy żel poliakrylamidowy wyjmowano z aparatu do elektroforezy i umieszczano na 6 minut w 2% roztworze HNO_3 . Następnie żel płukano 3 razy po 2 minuty w wodzie i zalewano roztworem barwiącym (0,15% formaliny, 6 mM AgNO_3 w wodzie) na 30 minut. Po zakończeniu barwienia żel płukano w wodzie przez 30 sekund i umieszczano w schłodzonym roztworze wywołującym (0,3 M Na_2CO_3 , 0,15% formalina i 0,8 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) do czasu pojawienia się prążków produktów. Reakcję przerywano poprzez umieszczenie żelu w 10% roztworze kwasu octowego.

Istotą reakcji TRAP jest synteza produktów telomerazy różniących się od siebie o 6 pz. Produkty te są syntetyzowane przez telomerazę, a następnie powielane w reakcji PCR. Są one widoczne na 12% żelu poliakrylamidowym w postaci „drabinki” (Ryc.8).



Produkty te są widoczne na żelu w postaci „drabinki”

Ryc.8 Schemat generowania w reakcji TRAP produktów różniących się o 6 pz oraz drabinka produktów reakcji TRAP widoczna na 12% żelu poliakrylamidowym.

W teście TRAPeże dodatkowo widoczny był prążek 36 pz wewnętrznego standardu znajdujący się poniżej „drabinki”.

5.6 ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizę statystyczną wykonano przy pomocy programu STATISTICA (StatSoft, Polska). Znamienność statystyczną oszacowano z wykorzystaniem dwustronnego testu Fisher'a. Różnice między grupami uznano za znamienne gdy $P < 0,05$.

5.7 ODCZYNNIKI

AppliChem

Coomassie Brilliantblue G-250

Fermentas

białkowy wzorzec masowy

Fluka

akrylamidy (19:1)

Intergen

TRAPEze ELISA Telomerase Detection Kit

Kodak

klisza fotograficzna, wywoływacz, utrwalacz

Osmonics

membrana nitrocelulozowa

Sigma

akrylamidy (29:1), APS, TEMED, Trizma Base, SDS, Whatmann 3MM, BSA, przeciwciała poliklonalne przeciw mysim i króliczym przeciwciałom skoniugowane z peroksydazą chrzanową, przeciwciała monoklonalne przeciwko β -aktynie, kwas borowy, EDTA, wzorzec masowy DNA,

Pierce

substrat do chemiluminescencji SuperSignal West Pico

Polskie Odczynniki Chemiczne

NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, HNO₃, formalina, AgNO₃, Na₂CO₃, Na₂S₂O₃

Roche

TeloTTAGG Telomerase PCR ELISA

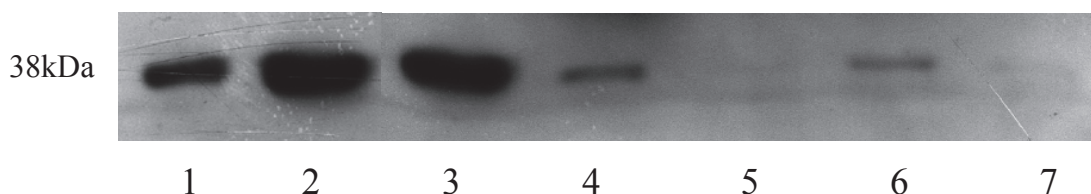
**Przeciwciała przeciwko PP2A α były darem Ś.P. Prof. dr hab.
Stanisława Żolnierowicza.**

6. WYNIKI

6.1 ANALIZA POZIOMU PP2A α W RAKU PĘCHERZA MOCZOWEGO

Na wstępie sprawdzono, czy królicza surowica zawierająca przeciwciała przeciwko drożdżowej PP2A α reaguje z ludzkim białkiem PP2A α . W tym celu rozdzielono na denaturującym żelu poliakrylamidowym ekstrakty tkanek guzów nowotworowych pęcherza moczowego i tkanek otaczających nowotwór pozbawionych cech nowotworowych (wycinków tkanek prawidłowych pęcherza moczowego) 2 losowo wybranych pacjentów, ekstrakty mięśni królika, częściowo oczyszczony preparat mięśni szkieletowych królika oraz oczyszczoną rekombinowaną PP2A α nadprodukowaną w drożdżach (Ryc.10). Przeprowadzono analizę western-blotting z wykorzystaniem surowicy króliczej skierowanej przeciwko C-terminalnemu fragmentowi PP2A α . Do studzienek nałożono ekstrakty zawierające po 10 μ g białka (Ryc.9).

Intensywny prążek surowicy z ekstraktami mięśni królika (ścieżka 1) wynika z bardzo dużego udziału PP2A α w ogólnej puli białek tej tkanki. W tych samych warunkach rekombinowana ludzka PP2A (ścieżka 3) migrowała z taką samą szybkością dając prążek podobny do tego z wstępnie oczyszczonego PP2A α z mięśnia szkieletowego królika (ścieżka 2).

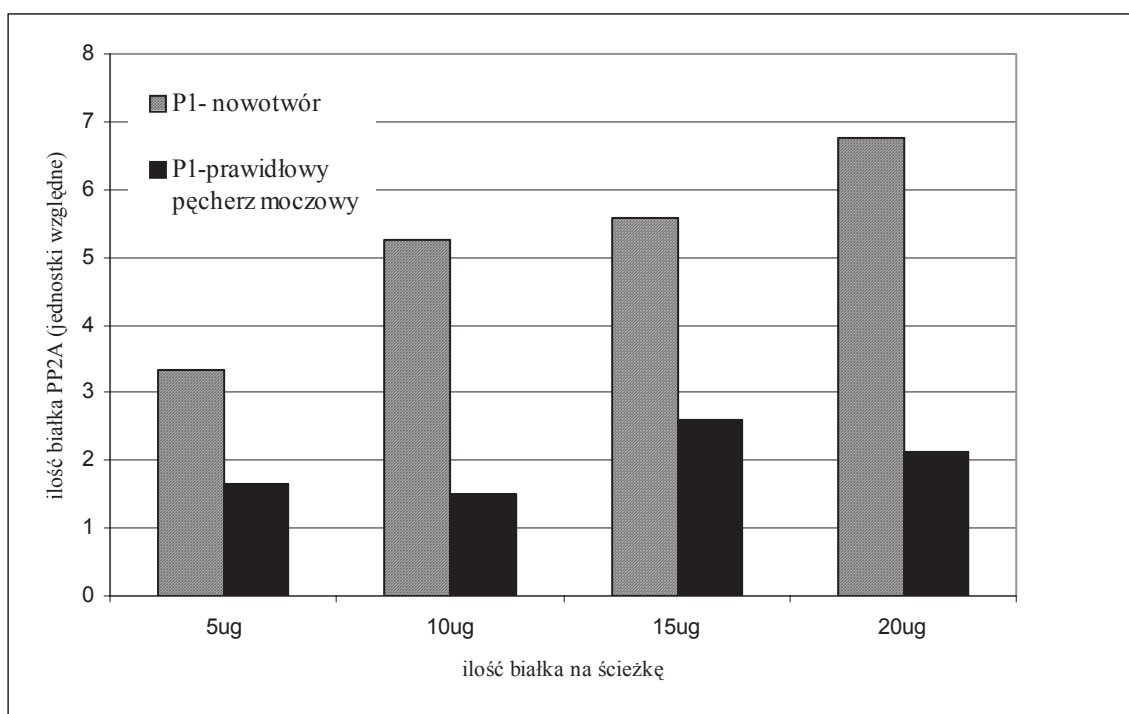


Ryc.9 Western-blotting:

1 - ekstrakt tkankowy mięśnia poprzecznie prążkowanego królika
 2 - częściowo oczyszczony preparat PP2A α mięśnia poprzecznie prążkowanego królika
 3 - rekombinowane izoformy α ludzkiej katalitycznej podjednostki fosfatazy PP2A otrzymane w drożdżach
 4,6 - ekstrakty tkankowe guzów nowotworowych pęcherza moczowego
 5,7- ekstrakty otaczających nowotwory tkanek nie wykazujących cech nowotworowych
 Do studzienek nałożono próby zawierające po 10 μ g białka.

Stwierdzono pojawienie się prążków odpowiadających masą cząsteczkową PP2A α w ścieżkach w których rozdzielono ekstrakty tkankowe guzów nowotworowych pęcherza moczowego (ścieżki 4 i 6) oraz słabo widoczne prążki w ścieżkach w których rozdzielono ekstrakty tkankowe pęcherzy prawidłowych (ścieżki 5 i 7). U obydwu losowo wybranych pacjentów stwierdzono dużo wyższy poziom PP2A α w ekstraktach tkankowych guzów nowotworowych pęcherza moczowego w stosunku do odpowiadających im ekstraktów tkankowych prawidłowej ściany pęcherza moczowego. Wyniki te sugerują, że surowica królicza może być stosowana do analizy poziomu PP2A α w tkankach ludzkich.

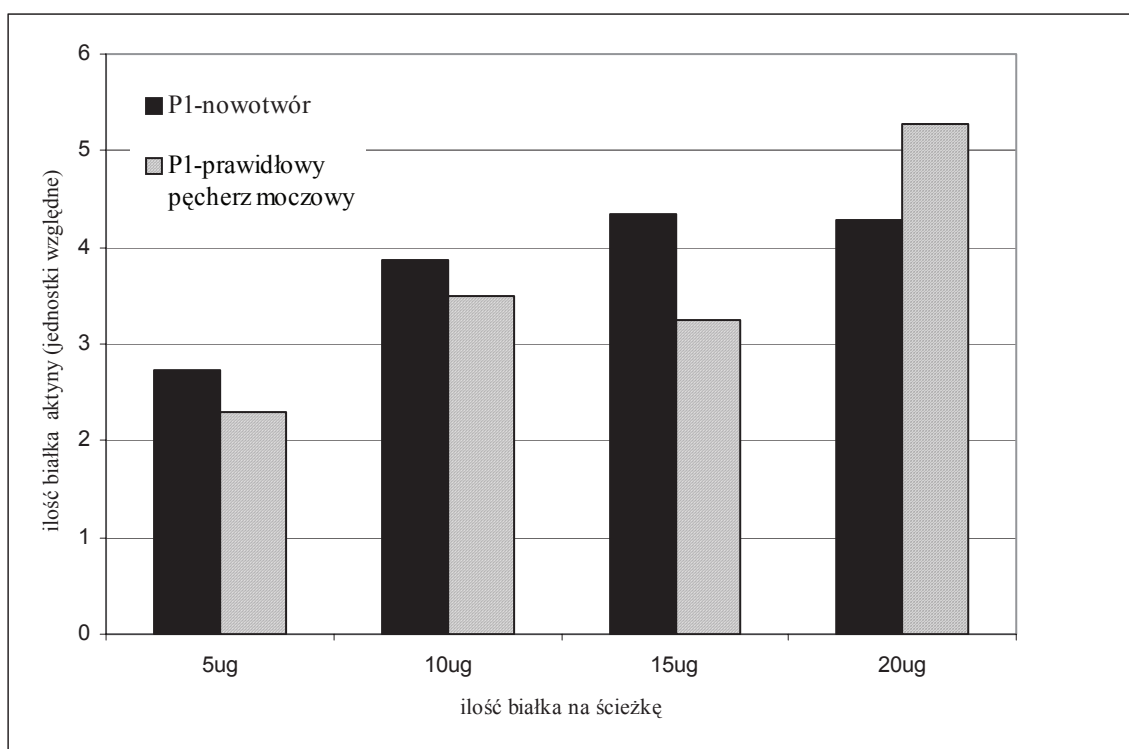
Określono optymalną ilość białka, którą należy użyć do oznaczenia poziomu PP2A α wykorzystując dowolnie wybrany ekstrakt. W badanym ekstrakcie poziom PP2A α był wyższy w tkance guza nowotworowego w stosunku do poziomu tego białka w wycinku tkanki prawidłowej pęcherza moczowego. Na denaturujący żel poliakrylamidowy nanoszono różne ilości ekstraktów, odpowiadające 5, 10, 15 i 20 μ g białka. Wykonano western-blotting z użyciem króliczej surowicy poliklonalnej przeciwko C-terminalnemu fragmentowi tego białka. Wyniki analizy densytometrycznej tego doświadczenia przedstawiono na Ryc.10.



Ryc.10 Przykładowe wyniki analizy densytometrycznej serii prążków o wzrastającej zawartości całkowitej białka, dla pacjenta o podwyższonym poziomie PP2A α w tkance guza nowotworowego.

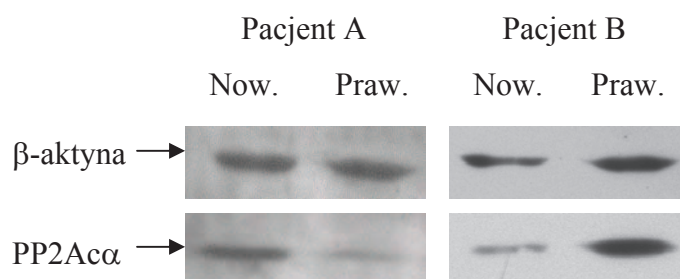
Wraz ze wzrostem ilości białka na studzienkę w zakresie od 5 do 20 μ g poziom PP2A α rósł w ekstrakcie tkankowym guza nowotworowego pęcherza moczowego. W ekstrakcie otaczającej guz nowotworowy tkanki prawidłowej pęcherza moczowego wzrost ten był mniej widoczny. Wzajemny stosunek tych poziomów (stosunek poziomu PP2A α w guzie do poziomu PP2A α w tkance prawidłowej) dla różnych ilości nałożonego do studzienki białka nie ulegał istotnym zmianom. Jakkolwiek wzrost ten nie był proporcjonalny do ilości użytego białka.

Podobną analizę przeprowadzono dla β -aktyny. Uzyskane wyniki przedstawiono na Ryc.11.



Ryc.11 Przykładowe wyniki analizy densytometrycznej serii prążków β -aktyny. Analizę tą przeprowadzono dla 4 różnych ilości białka naniesionego na studzienkę.

W przedziale od 5 μ g do 20 μ g całkowitego białka surowica przeciwko PP2A α i przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko β -aktynie dawały wiarygodne wyniki. Otrzymane wyniki sugerowały, że 10 μ g białka na studzienkę jest ilością optymalną.



Ryc.12 Western-blotting ekstraktów tkankowych 2 przykładowych pacjentów pokazujący różnice poziomu PP2A α . Rozdzielono ekstrakty tkankowe zawierające po 10 μ g białka. Poziom PP2A α porównywano z poziomem białka β -aktyny. (Now. - nowotwór, Praw. – prawidłowy pęcherz moczowy)

Metodą western-blottingu z użyciem surowicy skierowanej przeciwko C-terminalnemu fragmentowi białka przeanalizowano materiał pochodzący od 54 pacjentów. Badano zarówno wycinki guza nowotworowego, jak i prawidłowej ściany pęcherza moczowego. Dla każdego pacjenta określono tzw. współczynnik R określający relację pomiędzy poziomami PP2A α w raku i otaczającej nowotwór tkance prawidłowej (patrz „Materiały i Metody”). Przykładowe wyniki przedstawiono na Ryc.12. Stwierdzono różnice poziomu PP2A α u poszczególnych pacjentów. Poziom PP2A α był zarówno wyższy (pacjent A), jak i niższy (pacjent B) w guzie nowotworowym w stosunku do poziomu PP2A α w wycinku tkanek prawidłowego pęcherza moczowego. Obniżony poziom PP2A α (w stosunku do kontroli) stwierdzono w 16 (30%) guzów nowotworowych, zbliżony do obserwowanego w tkankach pęcherza prawidłowego w 16 (30%), natomiast podwyższony w 22 (40%). Wyniki przedstawiono w Tabeli 5.

Tab. 5 Poziom PP2A α w ekstraktach raków pęcherza moczowego w stosunku do otaczających tkanek prawidłowych.

<i>Poziom PP2Aα w ekstrakcie (w stosunku do kontroli)</i>	<i>Charakterystyka kliniczna pacjentów</i>
Obniżony (n=16) 1<<R	<i>Płeć:</i> 3 kobiety (19%), 13 mężczyzn (81%) <i>Wiek:</i> od 50 do 77 lat (średnia 64) <i>TNM:</i> Ta-1: 7 pacjentów (44%), T2-3-4: 8 pacjentów (56%), N1: 2 pacjentów (12%) <i>G:</i> G1: 5 pacjentów (31%), G2-3: 11 pacjentów (69%) <i>Przeżycia:</i> zmarło 2 pacjentów
Zbliżony do obserwowanego w pęcherzu prawidłowym (n=16) R$\approx$1	<i>Płeć:</i> 6 kobiet (37%), 10 mężczyzn (63%) <i>Wiek:</i> od 34 do 78 lat (średnia 61) <i>TNM:</i> Ta-1: 5 pacjentów (31%), T2-3-4: 11 pacjentów (69%), N1: 4 pacjentów (25%) <i>G:</i> G1: 6 pacjentów (37%), G2-3: 10 pacjentów (63%) <i>Przeżycia:</i> zmarło 6 pacjentów
Podwyższony (n=22) R>>1	<i>Płeć:</i> 4 kobiety (18%) i 18 mężczyzn (82%) <i>Wiek:</i> od 32 do 79 lat (średnia 62) <i>TNM:</i> Ta-1: 10 pacjentów (45%), T2-3-4: 12 pacjentów (55%), N1: 2 pacjentów 5 (23%) <i>G:</i> G1: 7 pacjentów (32%), G2-3: 15 pacjentów (68%) <i>Przeżycia:</i> zmarło 6 pacjentów

Obniżony poziom PP2A α w raku pęcherza moczowego stwierdzono u 3 kobiet i 13 mężczyzn. Średnia wieku w tej grupie pacjentów wynosiła 64 lata. U 7 pacjentów guz nowotorowy był w stadium powierzchniowym (Ta-1), a u 8 pacjentów był zaawansowanym nowotworem naciekającym (T2-3-4). Przerzuty do pojedynczych węzłów chłonnych stwierdzono u dwóch pacjentów. Niski stopień złośliwości histologicznej (G1) stwierdzono u 5, a wysoki (G2-3) u 11 pacjentów. Do czasu zakończenia projektu zmarło dwóch pacjentów.

Zbliżony do obserwowanego w pęcherzu prawidłowym poziom PP2A α stwierdzono w guzach nowotworowych 16 pacjentów, 6 kobiet

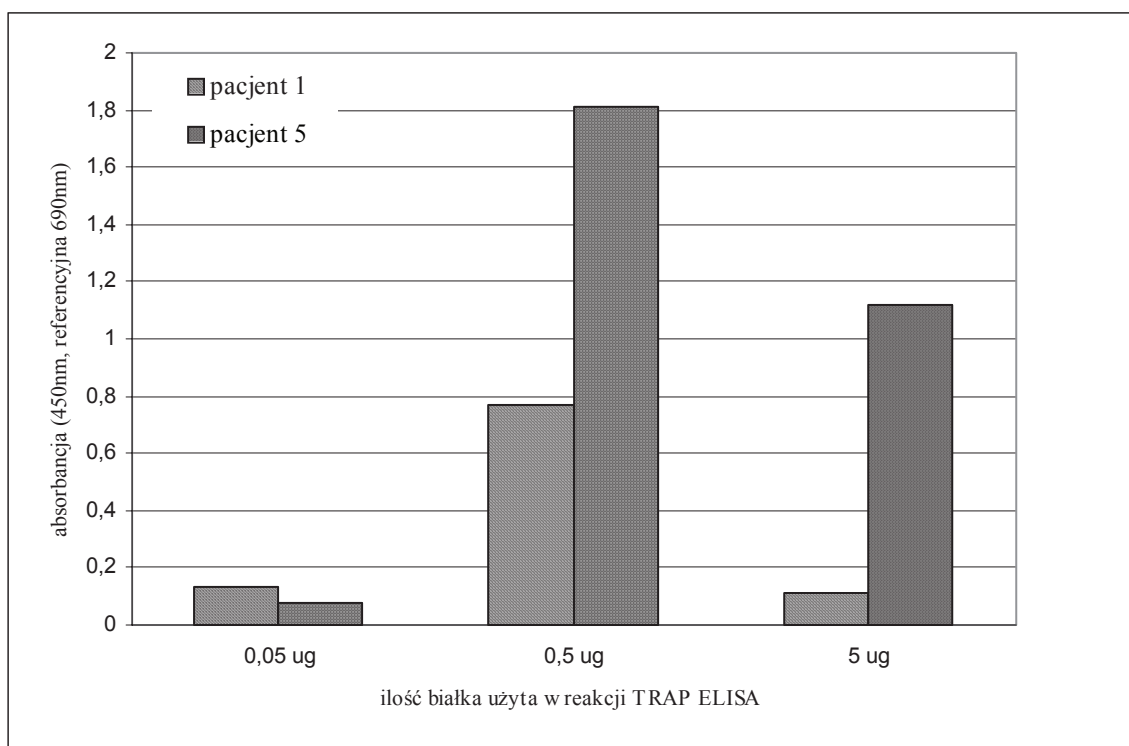
i 10 mężczyzn. Średnia wieku w tej grupie wynosiła 61 lat. Nowotwór powierzchniowy (Ta-1) stwierdzono u 5 pacjentów, a naciekający (T2-3-4) u 11; przerzuty do pojedynczych węzłów chłonnych stwierdzono u 4 pacjentów. Niskim stopniem złośliwości histologicznej (G1) charakteryzowało się 6 nowotworów, wysokim 9 (T2-3-4). Do czasu zakończenia projektu zmarło 6 pacjentów.

Podwyższony poziom PP2A α w tkance guza nowotworowego stwierdzono u 22 pacjentów, 4 kobiet i 18 mężczyzn (średnia wieku wyniosła 62 lata). W 10 przypadkach nowotwór był w stadium powierzchniowym (Ta-1), zaś w 12 w naciekającym (T2-3-4). Przerzuty do pojedynczych węzłów chłonnych stwierdzono u 5 pacjentów. Niski stopień złośliwości histologicznej (G1) stwierdzono w 7 przypadkach, wysoki (G2-3) w 15 przypadkach. W tej podgrupie do końca trwania projektu zmarło 6 pacjentów.

Nie stwierdzono zależności pomiędzy wiekiem pacjenta, TNM, stopniem złośliwości histologicznej, a współczynnikiem R (poziomem PP2A α).

6.2 ANALIZA AKTYWNOŚCI TELOMERAZY W RAKU PĘCHERZA MOCZOWEGO

W pierwszym etapie wykonano standaryzację metody oznaczania aktywności telomerazy w raku pęcherza moczowego stosując różne ilości białka w reakcji TRAP ELISA (Ryc.13) z wykorzystaniem testu Roche.



Ryc.13 Zależność aktywności telomerazy oznaczonej testem TRAP ELISA od ilości ekstraktu u dwóch dowolnie wybranych pacjentów (1 i 5).

Do eksperymentu użyto ekstraktów tkankowych guzów nowotworowych pęcherza moczowego pochodzących od dwóch dowolnie wybranych pacjentów. Dla każdego pacjenta wykonano analizę aktywności telomerazy w raku pęcherza moczowego używając trzech ilości białka: 0,05 μ g, 0,5 μ g i 5 μ g. Najwyższy poziom aktywności telomerazy w badanych próbach stwierdzono dla 0,5 μ g białka. Przy tym samym stężeniu białka aktywność telomerazy była różna u różnych pacjentów.

Otrzymane wyniki sugerowały, że 0,05 µg ekstraktu nie wystarcza do pomiaru aktywności telomerazy. Używając 5 µg białka do pomiaru aktywność telomerazy stwierdzono w tkance guza nowotworowego charakteryzującego się wysoką aktywnością enzymu. Na podstawie powyższego doświadczenia aktywność telomerazy oznaczano używając 0,5 i 5 µg białka. Stwierdzono również brak zależności liniowej pomiędzy ilością białka użytego w teście, a poziomem aktywności telomerazy, co może być spowodowane obecnością czynników interferujących.

Z wykorzystaniem testu TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA (Roche Diagnostics) przeanalizowano 29 raków pęcherza moczowego (Tab.6), z których 26 wykazało aktywność telomerazy. Początkowo aktywność oznaczano dla 0,5 i 5 µg białka, a za wynik pozytywny uważano taki, w którym absorbancja dla co najmniej jednej (0,5 lub 5 µg) ilości białka przekraczała 0,2. Śladową aktywność telomerazy wykazywały próby w których absorbancja przekraczała 0,1. Próby takie rozdzielone w elektroforezie poliakrylamidowej i wybarwione srebrem charakteryzowały się obecnością „drabinki”, charakterystycznej dla prób „dodatnich”. Później zrezygnowano z oznaczania aktywności telomerazy w 5 µg, z uwagi na konieczność redukcji kosztów wykonywanych analiz oraz potrzebę uproszczenia testu. W przypadkach w których badany ekstrakt tkankowy wykazywał niską aktywność telomerazy dla 0,5 µg przeprowadzano reakcję również dla 5 µg białka. Z drugiej strony niższe absorbancje dla 5 µg mogą wynikać z obecności w badanym ekstrakcie tkankowym inhibitorów reakcji.

Tab.6 Aktywność telomerazy w tkankach guzów nowotworowych pęcherza moczowego oznaczana testem TeloTTAGGG Telomerase PCR ELISA (Roche Diagnostics);
no - nie oznaczano

<i>Telomeraza</i>	<i>Pacjenci (Nr)</i>	<i>Absorbancja (450nm, z referencyjną 690nm)</i>		<i>Charakterystyka kliniczna pacjentów</i>
		<i>0,5µg białka/ reakcję</i>	<i>5µg białka/ reakcję</i>	
Brak aktywności telomerazy Absorbancja <0,1 n=3	11 59 60	0,017 0,035 0,021	0,011 no no	<i>Płeć:</i> 1 kobieta i 2 mężczyzn <i>Wiek:</i> od 61 do 79 lat <i>TNM:</i> Ta-1: 2 pacjentów, T2-3-4: 1 pacjent, N1: 1 pacjent <i>G:</i> G1: 1 pacjent, G2-3: 2 pacjentów <i>Przeżycia:</i> zmarło 2 pacjentów
Śladowa aktywność telomerazy Absorbancja 0,1<Abs<0,2 n=2	2 61	0,103 0,116	0,121 no	<i>Płeć:</i> 1 kobieta i 1 mężczyzna <i>Wiek:</i> 32 i 79 lat <i>TNM:</i> Ta-1: 1 pacjent, T2-3-4: 1 pacjent, <i>G:</i> G1: 1 pacjent, G2-3: 1 pacjent <i>Przeżycia:</i> wszyscy pacjenci żyją

Stwierdzona aktywność telomerazy n=24	1	0,132	0,767	<i>Płeć:</i> 9 kobiet (37%), 15 mężczyzn (63%) <i>Wiek:</i> od 34 do 76 lat (średnia 62) <i>TNM:</i> Ta-1: 6 pacjentów (25%) T2-3-4: 18 pacjentów (75%), N1: 6 pacjentów (25%) <i>G:</i> G1: 6 pacjentów (25%), G2-3: 18 pacjentów (75%) <i>Przeżycia:</i> zmarło 8 pacjentów
	4	0,235	0,172	
	5	1,811	1,118	
	7	1,051	1,175	
	8	0,364	0,244	
	9	0,670	0,242	
	10	1,448	2,635	
	12	0,251	0,201	
	13	0,237	0,026	
	15	0,265	0,268	
	16	0,066	0,403	
	17	0,349	0,124	
	18	0,034	0,309	
	20	>3,00	>3,00	
	21	>3,00	>3,00	
	23	>3,00	>3,00	
	24	1,629	1,959	
	25	0,642	1,248	
	26	>3,00	>3,00	
	56	0,873	no	
	57	0,393	no	
	62	1,004	no	
	63	1,141	no	
	64	0,751	no	

Brak aktywności telomerazy stwierdzono w tkankach guzów nowotworowych 3 pacjentów, jednej kobiety i dwóch mężczyzn (w wieku od 61 do 79 lat). Nowotwory były powierzchniowe (Ta-1) w dwóch przypadkach, jeden nowotwór był naciekający (T2-3-4), zaś u jednego pacjenta stwierdzono przerzut do pojedynczego węzła chłonnego. W jednym przypadku nowotwór pęcherza moczowego został sklasyfikowany jako dobrze zróżnicowany (G1), a w dwóch pozostałych przypadkach jako średnio i słabo zróżnicowany (lub anaplastyczny G2-3). W grupie chorych, których nowotwory pęcherza moczowego nie wykazywały aktywności telomerazy zmarło dwóch pacjentów.

W dwóch przypadkach badane raki pęcherza moczowego wykazały śladową aktywność telomerazy. Były to nowotwory pochodzące od jednej kobiety i jednego mężczyzny (w wieku 32 i 79 lat). Jeden nowotwór został sklasyfikowany jako powierzchniowy (Ta-1), drugi jako naciekający

(T2-3-4). Żaden z pacjentów nie miał przerzutów do węzłów chłonnych. Jeden rak pęcherza moczowego był dobrze zróżnicowany (G1), a drugi zaliczono do grupy G2. Pacjenci żyli na dzień zakończenia badań.

U pozostałych 24 pacjentów w tkankach guzów nowotworowych pęcherza moczowego stwierdzono aktywność telomerazy. Do grupy tej należy 9 kobiet i 15 mężczyzn (średnia wieku 62 lata). Nowotwory zaliczono do powierzchniowych (Ta-1) w 6 przypadkach, do naciekających (T2-3-4) w 18. U 6 pacjentów stwierdzono pojedyncze przerzuty do węzłów chłonnych. Dobrze zróżnicowane (G1) były nowotwory 6 pacjentów, u 18 były średnio, słabo zróżnicowane lub anaplastyczne (G2-3). Zmarło ośmiu pacjentów. U części pacjentów (np. pacjent 15) w obydwu stężeniach białka aktywność pozostawała na stosunkowo niskim poziomie, zaś u innych (np. pacjent 26) na bardzo wysokim poziomie. U niektórych pacjentów (np. pacjent 1) aktywność telomerazy była wyraźnie wyższa gdy użyto 5 µg białka na reakcję, u niektórych (np. pacjent 5) była ona wyższa gdy użyto 0,5 µg białka na reakcję.

Z uwagi na problemy z zakupem testu firmy Roche wynikające z fuzji firm produkujących test pozostałe raki pęcherza moczowego analizowano z wykorzystaniem testu firmy Intergen. I tak z wykorzystaniem testu TRAPeze ELISA Telomerase Detection Kit (Intergen, USA) przeanalizowano tkanki guzów nowotworowych 27 pacjentów. Uzyskane wyniki również podzielono na trzy grupy w zależności od poziomu aktywności telomerazy (Tab.7).

Tab.7 Aktywność telomerazy w tkankach raków pęcherza moczowego oznaczona testem TRAPeze ELISA Telomerase Detection Kit.

<i>Telomeraza</i>	<i>Pacjenci (Nr)</i>	<i>Absorbancja (450nm, z referencyjną 690nm)</i>	<i>Charakterystyka kliniczna pacjentów</i>
		<i>0,5µg białka/ reakcję</i>	
Brak aktywności telomerazy Absorbancja <0,1 n=2	41 45	0,094 0,050	<i>Płeć:</i> 2 mężczyzn <i>Wiek:</i> 50 i 77 lat <i>TNM:</i> Ta-1: 2 pacjentów <i>G:</i> G1: 2 pacjentów <i>Przeżycia:</i> obydwaj pacjenci żyją
Śładowa aktywność telomerazy Absorbancja 0,1<Abs<0,15 n=1	27	0,143	61 letni mężczyzna, T2N0M0, G1, żyje
Stwierdzona aktywność telomerazy n=24	19 28 29 30 31 33 34 35 37 38 39 40 42 43 44 46 47 49 50 51 52 53 54 55	0,449 1,692 2,590 3,195 0,431 2,991 2,858 2,055 0,523 0,450 0,297 1,367 2,481 0,252 1,933 0,849 2,798 0,450 1,391 2,776 1,101 0,681 0,929 2,453	<i>Płeć:</i> 4 kobiety (17%), 20 mężczyzn (83%) <i>Wiek:</i> od 45 do 75 lat (średnia 62) <i>TNM:</i> Ta-1: 14 pacjentów (58%) T2-3-4: 10 pacjentów (42%), N1: 4 pacjentów (17%) <i>G:</i> G1: 8 pacjentów (33%), G2-3: 16 pacjentów (67%) <i>Przeżycia:</i> zmarło 4 pacjentów

Brak aktywności telomerazy stwierdzono w tkankach guzów nowotworowych pęcherza moczowego dwóch mężczyzn, w wieku 50 i 77 lat. Obydwa nowotwory były powierzchniowe (Ta-1), dobrze

zróżnicowane (G1), bez przerzutów do węzłów chłonnych. Obydwaj pacjenci żyją.

Tkanka guza nowotworowego jednego pacjenta wykazała śladową aktywność telomerazy. Był to 61 letni mężczyzna, u którego rak pęcherza moczowego naciekał powierzchniowe warstwy mięśniówki pęcherza moczowego (T2), był dobrze zróżnicowany histologicznie (G1), bez przerzutów. Pacjent żyje.

Aktywność telomerazy w tkance guza nowotworowego pęcherza moczowego stwierdzono u 24 pacjentów: 4 kobiet i 20 mężczyzn (średnia wieku wynosiła 62 lata). Nowotwory były powierzchniowe (Ta-1) u 14 pacjentów, naciekające (T2-3-4) u 10. U 4 pacjentów stwierdzono występowanie przerzutów do węzłów chłonnych. W 8 przypadkach nowotwory były dobrze zróżnicowane (G1), w 16 średnio, słabo zróżnicowane lub anaplastyczne (G2-3). W tej grupie zmarło 4 pacjentów.

Obydwa użyte testy należą do tzw. testów jakościowych, dopuszczonych do stosowania jedynie w celach naukowych. Otrzymane wyniki w postaci absorbancji nie mogą służyć za podstawę oceny różnic w poziomie aktywności telomerazy pomiędzy pacjentami. Jest to spowodowane kilkoma problemami metodologicznymi. Po pierwsze, nowotwór nie jest w 100% homogeną populacją komórek nowotworowych. Przystępując do analizy poziomu aktywności telomerazy nie wiemy, czy w badanym wycinku komórek nowotworowych jest 100%, czy 10%. Nawet badanie histopatologiczne nie jest w stanie odpowiedzieć na to pytanie, bowiem, już 0,1 mm dalej ilość komórek nowotworowych może być zupełnie inna. Ponadto obecność hemoglobiny w każdym wycinku badanego nowotworu jest zróżnicowana, a co za tym idzie w różnym stopniu będzie ona wpływać na wiarygodność wykonywanych

oznaczeń. Zmienny osobniczo poziom czynników interferujących, takich jak hemoglobina, dodatkowo komplikuje wykonywane analizy, wymuszając bardzo zindywidualizowane podejście do każdego pacjenta. Widać to wyraźnie, gdy porównujemy ze sobą wyniki uzyskane w teście Roche, gdzie dla jednego pacjenta w dwóch różnych stężeniach białka uzyskujemy różne wyniki. Gdy poziom czynników interferujących był wysoki absorbancja była wyższa dla 0,5 µg białka na reakcję TRAP. Zaobserwowane różnice nie wpływają jednak na ogólny wynik, gdyż test ten jest testem jakościowym. Gdy poziom czynników interferujących był niski, absorbancja była wyższa dla 5 µg białka na reakcję TRAP. Po drugie testy tak skomplikowane, będące połączeniem metod opartych na genetyce z metodami immunoenzymatycznymi z powodu wielu etapów analizy narażone są na istotne przekłamanie spowodowane wielokrotnym przenoszeniem badanych próbek pomiędzy naczyniami inkubacyjnymi i wielokrotnym pipetowaniem roztworów. Po trzecie, z moich obserwacji wynika, że użyte w obydwu testach kontrole dodatnie wykazują stosunkowo wysokie wahania (sięgające 0,5 jednostek absorbancji) pomiędzy poszczególnymi płytkami testów, pozostając w zakresie wymaganym przez producentów do uznania eksperymentu za prawidłowo przeprowadzony. Przyczyny tego są nieznane, jednakże różnice takie sprawiają, że niewskazane jest porównywanie ze sobą w jakikolwiek sposób wyników absorbancji uzyskanych na różnych płytkach. Należy mieć nadzieję, że dostępne od pewnego czasu testy reklamowane jako ilościowe są pozbawione tych wad. Konieczne jest zatem bardzo ostrożne stosowanie tych testów, a co za tym idzie trudne będzie dostosowanie ich do rutynowej diagnostyki i prognozy klinicznej.

Z wykorzystaniem obydwu testów przeanalizowano łącznie 56 tkanek guzów nowotworowych pęcherza moczowego, z czego 51 na 56, czyli 91%, wykazało co najmniej śladową aktywność telomerazy (Tab.8).

Tab.8 Analiza aktywności telomerazy w tkankach guzów nowotworowych pęcherza moczowego

<i>Telomeraza</i>	<i>Pacjenci (Nr)</i>	<i>Charakterystyka kliniczna pacjentów</i>
Brak aktywności telomerazy n=5	11, 41, 45, 59, 60	<i>Płeć:</i> 1 kobieta i 4 mężczyzn <i>Wiek:</i> od 50 do 79 lat (średnia 67) <i>TNM:</i> Ta-1: 4 pacjentów, T2-3-4: 1 pacjent, N1: 1 pacjent <i>G:</i> G1: 3 pacjentów, G2-3: 2 pacjentów <i>Przeżycia:</i> zmarło 2 pacjentów
Śladowa aktywność telomerazy n=3	2, 27, 61	<i>Płeć:</i> 1 kobieta i 2 mężczyzn <i>Wiek:</i> od 32 do 79 lat <i>TNM:</i> Ta-1: 1 pacjent, T2-3-4: 2 pacjentów, N1: 0 pacjentów <i>G:</i> G1: 2 pacjentów, G2-3: 1 pacjent <i>Przeżycia:</i> wszyscy pacjenci żyją
Stwierdzona aktywność telomerazy n=48	1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 62, 63, 64,	<i>Płeć:</i> 13 kobiet (27%), 35 mężczyzn (73%) <i>Wiek:</i> od 34 do 76 lat (średnia 62) <i>TNM:</i> Ta-1: 20 pacjentów (42%), T2-3-4: 28 pacjentów (58%), N1; 10 pacjentów (21%) <i>G:</i> G1: 14 pacjentów (29%), G2-3: 34 pacjentów (71%) <i>Przeżycia:</i> zmarło 12 pacjentów

Aktywności telomerazy nie stwierdzono w tkankach guzów nowotworowych pęcherza moczowego 5 pacjentów: 1 kobiety i 4 mężczyzn (średnia wieku 67 lat). Cztery nowotwory były powierzchniowe (Ta-1), jeden naciekał ścianę pęcherza moczowego (T2-3-4). U jednego pacjenta znaleziono przerzut do pojedynczego węzła chłonnego. U trzech pacjentów raki pęcherza moczowego zostały sklasyfikowane jako dobrze

zróżnicowane histologicznie, a u dwóch jako średnio, słabo zróżnicowane lub anaplastyczne (G2-3). Zmarło dwóch pacjentów.

Śladową aktywność telomerazy w tkankach guzów nowotworowych pęcherza moczowego stwierdzono w wycinkach pochodzących od trzech pacjentów: jednej kobiety i dwóch mężczyzn. Nowotwór w jednym przypadku został sklasyfikowany jako powierzchniowy (Ta-1), a w dwóch jako naciekający (T2-3-4). Dwa raki były w niskim stopniu złośliwe histologicznie (G1), a jeden w wysokim (G2-3). Wszyscy pacjenci żyją.

Aktywność telomerazy stwierdzono w tkankach guzów nowotworowych pęcherza moczowego 48 pacjentów, 13 kobiet i 35 mężczyzn (średnia wieku 62 lata). Nowotwory te sklasyfikowano jako powierzchniowe (Ta-1) u 20 pacjentów i naciekające (T2-3-4) u 28. U 10 pacjentów znaleziono pojedyncze przerzuty do węzłów chłonnych. 14 Nowotworów było w niskim stopniu złośliwych histologicznie (G1), zaś 34 w wysokim (G2-3). Zmarło 12 pacjentów.

Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem aktywności telomerazy a parametrami klinicznymi badanych pacjentów.

6.3 ANALIZA AKTYWNOŚCI TELOMERAZY W OSADACH KOMÓREK Z MOCZU CHORYCH NA RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO ORAZ OSÓB ZDROWYCH

Wykonano pomiary aktywności telomerazy w osadach komórek z moczu chorych na raka pęcherza moczowego. Lizat każdego osadu analizowano używając pięciu różnych ilości białka w reakcji TRAP, aby uniknąć z jednej strony hamowania reakcji przez składniki chemiczne obecne w moczu, a z drugiej aby użyć wystarczającej ilości ekstraktu badanego osadu. Takie podejście pozwala uniknąć uzyskania fałszywie negatywnych wyników, z uwagi na bardzo duże różnice składu chemicznego moczu i ilości komórek w moczu pomiędzy badanymi pacjentami.

Aktywność telomerazy stwierdzono w około 89%, badanych osadów komórek z moczu pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Wyniki przedstawiono w Tabeli 9.

Tab.9 Aktywność telomerazy w osadach komórek z moczu pacjentów chorych na raka pęcherza moczowego.

<i>Telomeraza</i>	<i>Charakterystyka kliniczna pacjentów</i>
Brak aktywności telomerazy n=6	<i>Płeć:</i> 6 mężczyzn <i>Wiek:</i> od 50 do 79 lat (średnia 68) <i>TNM:</i> Ta-1: 4 pacjentów, T2-3-4; 2 pacjentów <i>G:</i> G1: 4 pacjentów, G2-3: 2 pacjentów <i>Przeżycia:</i> zmarło 2 pacjentów
Śladowa aktywność telomerazy n=1	61 letni mężczyzna T2N0M0, G1, żyje
Stwierdzona aktywność telomerazy n=48	<i>Płeć:</i> 12 kobiet (25%), 36 mężczyzn (75%) <i>Wiek:</i> od 32 do 84 lat (średnia 62) <i>TNM:</i> Ta-1: 23 pacjentów (48%), T2-3-4: 25 pacjentów (52%), N1: 7 pacjentów (15%) <i>G:</i> G1: 16 pacjentów (33%), G2-3: 32 pacjentów (67%) <i>Przeżycia:</i> zmarło 10 pacjentów

Aktywności telomerazy nie stwierdzono w osadzie komórek z moczu 6 pacjentów, byli to mężczyźni, których średni wiek wynosił 68 lat. Żaden z pacjentów nie miał przerzutów. U 4 pacjentów nowotwory pęcherza moczowego zostały sklasyfikowane jako powierzchniowe (Ta-1), u dwóch jako naciekające (T2-3-4). Podobnie cztery nowotwory były w niskim stopniu złośliwe histologicznie (G1) i dwa w wysokim (G2-3). Zmarło dwóch pacjentów.

Jeden pacjent miał śladową aktywność telomerazy w osadzie komórek z moczu. Był to 61 letni mężczyzna. Rak pęcherza moczowego naciekał powierzchniowe warstwy mięśniówki (T2), ale był dobrze zróżnicowany histologicznie (G1).

Aktywność telomerazy w osadach komórek z moczu stwierdzono u 48 pacjentów chorych na raka pęcherza moczowego: 12 kobiet i 36 mężczyzn (średni wiek wynosił 62 lata). Nowotwory te były powierzchniowe (Ta-1) u 23 pacjentów, u pozostałych 25 naciekały głębiej położone warstwy pęcherza moczowego (T2-3-4). U 7 pacjentów znaleziono pojedyncze przerzuty do węzłów chłonnych. Nowotwory były w niskim stopniu złośliwe histologicznie (G1) u 16 pacjentów, zaś u 32 w wysokim (G2-3). Zmarło 10 pacjentów.

Grupa pacjentów chorych na raka pęcherza moczowego, w których osadach komórek z moczu nie stwierdzono aktywności telomerazy była zbyt mało liczna aby była możliwa jakakolwiek analiza statystyczna zależności pomiędzy aktywnością telomerazy w osadzie, a parametrami klinicznymi pacjentów.

Analogiczną analizę przeprowadzono dla 11 osób zdrowych. W żadnym z badanych osadów komórek z moczu nie stwierdzono aktywności telomerazy.

6.4 PORÓWNANIE AKTYWNOŚCI TELOMERAZY W RAKACH PĘCHERZA MOCZOWEGO Z AKTYWNOŚCIĄ TELOMERAZY W OSADACH KOMÓREK Z MOCZU

Porównano aktywność telomerazy w tkankach guzów nowotworowych pęcherza moczowego i osadach komórek z moczu (Tab.10). Obecność lub brak aktywności telomerazy w tkankach guzów nowotworowych pęcherza moczowego odpowiadała obecności lub brakowi aktywności telomerazy w osadzie komórek z moczu u 51 na 52 pacjentów, dla których posiadano zarówno wycinki raka pęcherza moczowego, jak i osad komórek z moczu, co daje zgodność na poziomie 98%.

Tab.10 Porównanie aktywności telomerazy w tkankach raków pęcherza moczowego z aktywnością telomerazy w osadach komórkowych z moczu.

		<i>Aktywność telomerazy w osadzie komórek z moczu</i>		
		<i>dodatnia</i>	<i>śladowa</i>	<i>brak aktywności</i>
Aktywność telomerazy w raku pęcherza moczowego	Dodatnia	Pacjenci nr: 1, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 24, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 62, 63, 64	Pacjenci nr: 2, 61	
	Śladowa		Pacjent nr 27	
	Brak aktywności	Pacjent nr 17		Pacjenci nr: 41, 45, 59, 60

Dodatnia aktywność telomerazy w tkankach raków pęcherza moczowego pokrywała się z dodatnią aktywnością telomerazy w osadach komórek z moczu w 44 przypadkach. W dwóch przypadkach śladowej aktywności w tkance guza nowotworowego pęcherza moczowego

towarzyszyła dodatnia aktywność w osadzie komórek z moczu, zaś w jednym śladowa aktywność w tkance guza nowotworowego pęcherza moczowego odpowiadała śladowej aktywności w osadzie komórek z moczu. Brak aktywności w tkance raka pęcherza moczowego i w osadzie komórek w moczu stwierdzono w czterech przypadkach. Tylko u pacjenta numer 17 pomimo występowania aktywności telomerazy w tkance guza nowotworowego nie stwierdzono aktywności telomerazy w osadzie komórek z moczu.

6.5 PORÓWNANIE POZIOMU IZOFORMY α KATALITYCZNEJ PODJEDNOSTKI FOSFATAZY BIAŁEK TYPU 2A Z AKTYWNOŚCIĄ TELOMERAZY W RAKU PĘCHERZA MOCZOWEGO

Aktywność telomerazy w tkankach guzów nowotworowych pęcherza moczowego porównano ze względnym poziomem PP2A α . Zestawienie wyników przedstawiono w tabeli 11.

Brak aktywności telomerazy przy jednoczesnym niskim poziomie PP2A α stwierdzono w 3 przypadkach. Były to nowotwory pęcherza moczowego w różnym stopniu zaawansowania (dwa w stopniu T1 i jeden T4) oraz złośliwości histologicznej (dwa G1 i jeden G3). U jednego pacjenta (numer 59) brakowi aktywności telomerazy w tkance raka towarzyszył podwyższony poziom PP2A α . Nowotwór ten był powierzchniowy i dobrze zróżnicowany histologicznie.

Śladowa aktywność telomerazy w tkance guza nowotworowego towarzyszyła niskiemu poziomowi PP2A α u dwóch pacjentów chorych na raka pęcherza moczowego. Nowotwory były naciekające i średnio zróżnicowane. U jednego pacjenta (numer 61) śladowej aktywności w tkance raka pęcherza moczowego towarzyszył podwyższony poziom PP2A α . Nowotwór ten był we wczesnym stadium rozwoju (Ta).

Aktywność telomerazy w tkance guza nowotworowego pęcherza moczowego towarzyszyła niskiemu poziomowi PP2A α u 11 pacjentów. Pięć raków pęcherza moczowego było powierzchniowych, sześć naciekających. Dobrze zróżnicowane były dwa raki pęcherza moczowego, średnio zróżnicowane, niezróżnicowane lub anaplastyczne dziewięć.

Aktywność telomerazy w tkance raka pęcherza moczowego z jednoczesnym podwyższonym poziomem PP2A α stwierdzono u 20 pacjentów. Nowotwory u 8 pacjentów były powierzchniowe, a u 12 naciekające. Pięć było dobrze zróżnicowanych, a 15 średnio, słabo zróżnicowanych lub anaplastycznych.

Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem izoformy α katalitycznej podjednostki fosfatazy typu 2A a aktywnością telomerazy w raku pęcherza moczowego. Nie znaleziono również zależności pomiędzy parametrami klinicznymi pacjentów, a aktywnością telomerazą i poziomem PP2A α .

7. DYSKUSJA

Prześciowonabłonkowy rak pęcherza moczowego powoduje w Polsce rokrocznie ponad 2000 zgonów. Stosunkowo długi okres czasu jaki upływa od powstania ogniska nowotworowego do stwierdzenia pierwszych objawów klinicznych choroby oraz duże prawdopodobieństwo powstania wznowy powodują, iż nowotwór ten jest w ostatnich latach obiektem wzmożonego zainteresowania lekarzy praktyków i teoretyków. Jak dotąd znaleziono i scharakteryzowano wiele białek, o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym. Ich przydatność diagnostyczna i prognostyczna, jest cały czas badana. Do białek tych między innymi należy hemoglobina, która z powodu krwawienia powierzchni nowotworu pojawia się w moczu, jednak w zbyt niskim odsetku przypadków, aby test wykrywający hemoglobinę uważać za idealny. Od kilku lat diskutowana jest również przydatność kliniczna oznaczania aktywności telomerazy. Jest to nukleoproteina jądrowa wydłużająca telomery, której aktywność znaleziono w około 85% ludzkich nowotworów. Regulacja aktywności telomerazy nie jest dokładnie poznana. Wiadomo, że jej aktywność jest regulowana zarówno na poziomie transkrypcji, epigenezy, jak i przez modyfikacje potranslacyjne takie jak odwracalna fosforylacja. Telomeraza jest fosforylowana przez kinazy białek, głównie przez PKC α i PKB, zaś defosforylowana prawdopodobnie przez PP2A.

7.1 POZIOM PP2A α W RAKU PĘCHERZA MOCZOWEGO

Jednym z celów rozprawy doktorskiej było określenie relacji pomiędzy poziomem PP2A α , a stopniem zaawansowania nowotworu i parametrami klinicznymi.

Wysoki poziom PP2A α wpływa destabilizująco na metabolizm komórek, w tym na tak istotne dla homeostazy procesy jak regulacja osmolarności i procesy związane z podziałem komórki, a mianowicie na mitozę i cytokinezę. Ponadto stwierdzono zmiany kształtu komórki spowodowane dezorganizacją cytoszkieletu jak i zmianami osmotycznymi. Zbyt niski poziom homologów PP2A α wygenerowany poprzez delecję ich genów powodował obniżenie przeżywalności, zaburzenia mitozy i zaburzenie integralności cytoszkieletu. Wszystkie te anomalie komórkowe są często spotykane w komórkach nowotworowych, gdzie mamy do czynienia zarówno z deregulacją metabolizmu, jak i zaburzeniami występującymi podczas podziału komórki. Podobnie zaburzenia osmolarności, jak i kształtu komórek są powszechne w komórkach nowotworowych.

Niewątpliwym dowodem zaangażowania PP2A w transformację nowotworową jest efekt wywoływany przez specyficzne inhibitory tej fosfatazy takie jak kwas okadejowy, czy kalikuliny. Podanie myszom ektopowo okadejanu wywołuje transformację nowotworową fibroblastów skóry [134,135]. Również mutacje występujące w podjednostce strukturalnej (PR65) w nowotworach piersi, płuc, okrężnicy czy skóry wskazują na udział tej fosfatazy w nowotworzeniu. Postulowany jest również udział PP1 i PP2A w regulacji angiogenezy nowotworów. Inhibicja tych fosfataz okadejanem powodowała zwiększoną zdolność komórek endotelialnych do tworzenia nowych naczyń.

Dopatruje się tu możliwości zastosowania klinicznego syntetycznych aktywatorów fosfataz jako leków antyangiogennych [136].

Na wstępie sprawdzono, czy przeciwciała przeciwko C-końcowi drożdżowej PP2A α rozpoznają ludzką formę enzymu. Ludzka i drożdżowa forma PP2A α różnią się od siebie 1 aminokwasem w miejscu rozpoznawanym przez te przeciwciała. Różnica ta nie spowodowała utraty przez przeciwciała zdolności do wiązania PP2A α człowieka. Nie jest to zaskakujące, jeżeli weźmiemy pod uwagę bardzo wysoki stopień konserwatywności ewolucyjnej tego białka, spowodowany jego centralną rolą metaboliczną. Homologia sekwencji nukleotydowych PP2A α między tak odległymi organizmami, jak *S. cerevisiae* i człowiek sięga 86% [116]. Spodziewać się zatem można równie wysokiej homologii struktur białkowych wyższego rzędu, a więc podobieństw epitopów. Koniec N-terminalny drożdżowej PP2A jest homologiczny z końcem N-terminalnym formy człowieka.

Następnie analizie poddano wycinki tkanek raka pęcherza moczowego oraz tkanek prawidłowej ściany pęcherza moczowego pochodzące od 54 pacjentów. Tkanki prawidłowe były pobierane w celu uzyskania odnośnika podstawowej ekspresji białek, a dokładnie podstawowego poziomu białka β -aktyny, będącej standardem ilościowym w badaniach zmian poziomu białek obejmujących również pęcherz moczowy [112-115]. Stwierdzono, że w około 30% badanych nowotworów poziom PP2A α był obniżony, zaś w około 40% podwyższony w stosunku do poziomu PP2A α w wycinkach tkanek prawidłowego pęcherza moczowego. Poziom PP2A α nie był w żadnym stopniu związany z płcią i wiekiem pacjentów, oraz stopniami zaawansowania nowotworu (Tab.5).

Jednym ze sposobów regulacji aktywności holoenzymu PP2A α jest regulacja poziomu białka PP2A α . Poziom PP2A α jest w komórkach

w pewnym stopniu kontrolowany, czego dowodzą nieudane próby nadprodukcji tej podjednostki w różnych systemach zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Wprowadzenie do komórki wielu kopii genu nie powodowało wzrostu poziomu białka w liniach komórkowych [117]. Występowały jednak różnice ilościowe pomiędzy klonami z pojedynczą kopią kasety ekspresyjnej, a klonami z wieloma kasetami. Stwierdzono również różnice w poziomie uzyskiwanego białka pomiędzy różnymi szczepami drożdży, co może być spowodowane różnicami genetycznymi pomiędzy tymi szczepami [118]. Podobne prace prowadzone na komórkach ludzkich NIH/3T3 wykazały blisko 60% wzrost ekspresji PP2A α . Użyto wektora do którego wklonowano kasetę ekspresyjną złożoną z genu podjednostki katalitycznej oraz bardzo silnego promotora MLV pochodzącego z wirusa mysiej leukemii Moloney'a. W badaniach tych nie stwierdzono różnic w ekspresji PP2A pomiędzy poszczególnymi klonami [117]. Wartym podkreślenia jest fakt, że większość nowotworów jest klonalna. Obserwowane różnice poziomu PP2A α w nowotworach poszczególnych pacjentów mogą zatem wynikać z różnic pomiędzy klonami komórek tego samego typu nowotworu.

Uważa się, że PP2A ma zdolność kontrolowania własnej translacji poprzez defosforylację czynnika elongacyjnego EF-2 (*ang.: Elongation Factor 2*), podjednostek α i β czynnika inicjacyjnego translacji 2 TIF2 α i TIF2 β (*ang.: Translation Initiation Factor 2 α and β*) oraz wiązanie translacyjnego czynnika uwalniającego RF1 (*ang.: Releasing Factor 1*) [119-123]. Wpływ PP2A na własną translację poprzez wyżej wymienione białka jest jednak zagadnieniem spornym gdyż w transkrypcie PP2A α nie znaleziono sekwencji regulatorowych, na które wpływają wyżej wymienione białka [124]. Wydaje się więc, że autoregulacja PP2A jest procesem daleko bardziej złożonym, bezsporne jest jednak,

że wahania poziomu mRNA PP2A α nie powodują zmian ilości białka [125].

Zaobserwowany przeze mnie brak relacji pomiędzy poziomem PP2A α a parametrami klinicznymi może dowodzić różnorodności metabolicznej badanych nowotworów pęcherza moczowego nie związanej ze stopniem zaawansowania nowotworu. Nie można jednak wykluczyć, że poziom ekspresji PP2A α nie jest ściśle związany z aktywnością holoenzymu. Ta bowiem zależy od asocjacji z podjednostkami regulacyjnymi, jak również od fosforylacji i metylacji podjednostek [126-129]. Jednak jest to zagadnienie bardzo słabo poznane. Słabo poznane są relacje pomiędzy typami podjednostek PP2A α , a modyfikacjami, którym one ulegają [130-132]. Dodatkową trudnością jest zmiana lokalizacji oraz asocjacji holoenzymu ze strukturami komórkowymi powodowana przez zmiany struktury i modyfikacje holoenzymu. Dość powiedzieć, że częsta modyfikacja PP2Ac jaką jest karboksymetylacja leucyny występującej na C-końcu tego białka zmienia się wraz z progresją cyklu komórkowego, zmniejszając i zwiększając aktywność białka oraz wpływając na jego lokalizację subkomórkową [130,133]. Komórki nowotworowe ludzkiego guza nie stanowią hodowli komórek synchronicznie rosnących i dzielących się.

7.2 AKTYWNOŚĆ TELOMERAZY W RAKACH PĘCHERZA MOCZOWEGO ORAZ W OSADACH KOMÓREK Z MOCZU CHORYCH NA RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO I OSÓB ZDROWYCH

Analizę aktywności telomerazy w tkankach guzów nowotworowych wykonano przy użyciu dwóch jakościowych testów komercyjnych (TeloTAGGG telomerase PCR ELISA, Roche Diagnostics; TRAPeze ELISA Telomerase Detection Kit, Intergen), opierających się na tych samych podstawach teoretycznych: wydłużeniu przez telomerazę sztucznego substratu imitującego telomer, amplifikację otrzymanego produktu przy wykorzystaniu reakcji łańcuchowej polimerazy oraz detekcję immunoenzymatyczną produktów PCR. W analizie osadu komórek z moczu test immunoenzymatyczny był zastąpiony przez detekcję (barwienie srebrem) produktów w elektroforezie poliakrylamidowej. Analiza raków była prowadzona początkowo dla różnych stężeń białka ekstraktu. Analiza moczu była wykonywana dla 5 stężeń białka ekstraktu osadu komórek z moczu, co spowodowane było występowaniem interferencji pomiędzy wykonywaną reakcją łańcuchową polimerazy, a białkami (hemoglobina pochodzącą z krwawiącej powierzchni raka) i związkami niskocząsteczkowymi występującymi w moczu. Według piśmiennictwa aktywność telomerazy w osadach komórek z moczu była stwierdzana u od 7% do 85% badanych pacjentów. Tak duże rozbieżności spowodowane były prawdopodobnie różnicami w sposobie przechowywania i dalszego przygotowywania do analizy osadu komórek z moczu [137,138]. Używana w komercyjnym teście polimeraza Taq jest wrażliwa na obecną w moczu chorych hemoglobinę oraz mocznik, co w istotny sposób utrudnia prowadzenie analiz. Z uwagi na ciągłe

krwawienie, często masowe, powierzchni raka pęcherza hemoglobina występuje w moczu często w dużych ilościach. Arai i wsp. [139] przeprowadzili eksperyment w którym dodali hemoglobinę do moczu z aktywną telomerazą i stwierdzili bardzo duże obniżenie wydajności reakcji TRAP skorelowane z ilością dodanej hemoglobiny. Obfitość krwawienia raka pęcherza moczowego jest cechą osobniczo zmienną i nie zależy od stopnia zaawansowania nowotworu, co sprawia, że osad komórek z moczu musi być starannie przepłukany, zaś sama analiza powinna być przeprowadzana dla kilku stężeń białka (ekstraktu osadu komórek z moczu), aby uniknąć interferującego wpływu zbyt wysokich ilości hemoglobiny. Problem ten można by z łatwością obejść przez użycie polimerazy niewrażliwej na hemoglobinę. Producenci testów nie przewidzieli jednak, że badany materiał może ją zawierać w hamujących reakcję ilościach. Dodatkowym problemem jest szybka inaktywacja telomerazy w moczu. Spowodowało to konieczność zoptymalizowania sposobu przewozu i przygotowania moczu do analizy. Decydującą rolę odgrywa czas i temperatura w jakiej transportowany jest pobrany mocz. Niewskazane jest również wielokrotne rozmrażanie osadu komórek z moczu, gdyż powoduje to obniżenie aktywności telomerazy. Należy zatem wykonywać reakcję TRAP z wykorzystaniem świeżo przygotowanego, bądź też tylko jednokrotnie zamrożonego ekstraktu. Arai i wsp. [139] również zaobserwowali bardzo szybkie obniżenie aktywności telomerazy w moczu przechowywanym w temperaturze pokojowej, 37°C oraz „wymrażanie” aktywności. Ma to oczywiście kolosalny wpływ na potencjalne zastosowanie diagnostyczne tego testu, gdyż wymagałoby istotnych zmian w rutynowym sposobie postępowania z moczem w laboratoriach diagnostycznych. Do dodatkowych czynników generujących wyniki fałszywie negatywne zalicza się również obecne w moczu proteazy, mocznik, sole oraz pH moczu, które może ulegać

dużym wahaniom. Wszystkie te czynniki mogą hamować aktywność telomerazy, jak i interferować w wykonywany test, szczególnie na etapie reakcji łańcuchowej polimerazy [140,141].

Przeanalizowano 56 tkanek raków pęcherza moczowego, z których około 91% wykazało aktywność telomerazy. Otrzymane rezultaty pozostają w zgodzie z danymi z piśmiennictwa. W przeważającej większości prac aktywność telomerazy stwierdza się w 80-90% badanych tkanek raków pęcherza moczowego [142-145]. Aktywność telomerazy wykazywały zarówno nowotwory we wczesnych, jak i w późnych stadiach rozwoju, co może świadczyć o potencjalnej przydatności klinicznej badania aktywności telomerazy w tkankach pobranych z wczesnych zmian pęcherza moczowego. Wykrywanie zmian nowotworowych ściany pęcherza moczowego wiąże się z wykonaniem zabiegu cystoskopii i ewentualnym pobraniem fragmentu tkanki do badania histopatologicznego, co stanowi duży dyskomfort dla pacjenta. Dodatkowym problemem jest również subiektywność oceny stanu ściany pęcherza oraz trudność w ocenie występowania wczesnych zmian, w bardzo niskim stopniu odróżnicowanych. Podczas cystoskopii pobierana jest również tkanka do badania histopatologicznego. Problemem może okazać się pobranie do badania tkanki prawidłowej, zamiast słabo odróżnicowanej nowotworowej, znajdującej się kilka centymetrów dalej, bądź też występowanie zmiany wieloogniskowej, częściej w przypadku raka pęcherza moczowego. Możliwe jest zatem wybranie przez lekarza do analizy niekoniecznie najbardziej zaawansowanej zmiany. W tym wypadku wydaje się konieczność użycia osadu komórek z moczu jako materiału diagnostycznego, co mogłoby poprawić komfort pacjenta oraz trafność diagnozy.

Standardem badania moczu jest cytologia, oparta na mikroskopowej ocenie obecnych w moczu złuszczonych komórek nabłonkowych,

wśród których mogą znaleźć się złuszczone komórki nowotworowe [146]. Metodzie tej zarzuca się subiektywizm oceny [147,148], oraz częste nie rozpoznawanie wczesnych, słabo odróżnicowanych zmian nowotworowych, uwalniających stosunkowo mało komórek [147,149,150]. Istnieje potrzeba wprowadzenia testu uzupełniającego, który mógłby poprawić czułość, a co za tym idzie, w dalszej perspektywie, przeżywalność pacjentów. Jednym z proponowanych testów uzupełniających może być badanie aktywności telomerazy, która mogłaby stać się przydatnym narzędziem diagnostycznym.

Aktywność telomerazy wykazano w osadzie komórek z moczu 49 na 55 pacjentów (89%). Nie stwierdzono zależności pomiędzy stopniem zaawansowania choroby, oraz innymi parametrami klinicznymi, a obecnością aktywności telomerazy, co może świadczyć o niewielkiej przydatności prognostycznej testu. Wartość diagnostyczna jest jednak wysoka, gdyż nie stwierdzono aktywności telomerazy w żadnym z badanych osadów komórek z moczu osób zdrowych.

Ocena aktywności telomerazy w moczu pokrywała się z oceną aktywności telomerazy w tkance guza nowotworowego w 98%. Jeden pacjent wykazał aktywność telomerazy w tkance, która nie znalazła swego odzwierciedlenia w osadzie komórek z moczu. Może być to spowodowane zarówno inaktywacją telomerazy, jak i polimerazy Taq. We wcześniejszych badaniach aktywności telomerazy w osadach komórek z moczu z użyciem testu TRAP aktywność ta oscyluje od bardzo niskich 7% do 85% [137,138], ze specyficznością ponad 95% [139, 151-153]. Istotne jest, że aktywność telomerazy została wykryta w 88% osadów komórek z moczu pacjentów z wczesnymi zmianami nowotworowymi, co wskazuje na bardzo dużą czułość tego testu (Tab.13) nawet w trudnych dla cytologa przypadkach. Świadczy to o dużej

potencjalnej przydatności klinicznej wykonywania analizy aktywności telomerazy.

Nie można jednak zapomnieć o możliwości generowania fałszywie pozytywnych wyników. Może być to skutkiem obecności w moczu aktywowanych limfocytów.

Aktywacja limfocytów może być spowodowana zarówno przez proces nowotworowy jak i stan zapalny pęcherza moczowego [157]. Analiza markera molekularnego takiego jak telomeraza, mogłaby jednak zawęzić grupę pacjentów, których należałoby poddać cystoskopii. Zagadnienie to wymaga jednak dalszych badań.

Badanie przesiewowe całej populacji pod kątem występowania aktywności telomerazy w moczu z pewnością generowałyby bardzo wysokie koszty. Wydaje się jednak, że przesiewowa analiza osadów komórek z moczu osób narażonych na kancerogeny, takie jak składniki dymu papierosowego czy aminy aromatyczne mogłaby przyczynić się do poprawienia efektywności wczesnej diagnostyki, zwiększenia komfortu życia i przeżywalności pacjentów. Sprawą dyskusyjną może pozostać relacja kosztów diagnostyki przesiewowej i leczenia późno wykrytego, zaawansowanego raka.

7.3 PORÓWNANIE POZIOMU PP2A α Z AKTYWNOŚCIĄ TELOMERAZY W RAKU PĘCHERZA MOCZOWEGO

Zestawiono ze sobą aktywność telomerazy i poziom fosfatazy PP2A α dla 54 pacjentów. W grupie pacjentów, w tkankach nowotworowych których nie stwierdzono aktywności telomerazy, znalazło się trzech pacjentów o obniżonym i jeden o podwyższonym poziomie PP2A (u jednego pacjenta poziom PP2A α był zbliżony do obserwowanego w wycinku pęcherza prawidłowego). W grupie pacjentów, w których tkankach guzów nowotworowych stwierdzono aktywność telomerazy obniżony poziom PP2A w tkance guza nowotworowego miało 13 pacjentów, zbliżony do obserwowanego w tkance pęcherza prawidłowego 15, zaś podwyższony 21. Wyniki te nie wskazują na istnienie zależności pomiędzy aktywnością telomerazy, a poziomem białka PP2A.

Związek telomerazy z PP2A został zaproponowany przez Li i wsp. w roku 1997 [106]. Zespół ten wykonał doświadczenia na komórkach linii nowotworu sutka PMC42. Komórki te wykazywały aktywność telomerazy. Aktywność telomerazy obniżała się w trakcie inkubacji z podaną do płynu inkubacyjnego PP2A, nie była zaś podatna na działanie innych fosfataz (PP1 i PP2B). Dodanie do układu inhibitora PP2A (kwasu okadejowego) znosiło działanie fosfatazy i aktywowało telomerazę. Stymulację tę można tłumaczyć pośrednią inhibicją PP2A. Autorzy nie wykluczali interakcji PP2A z samą telomerazą, lecz dopuszczali również ewentualność oddziaływania fosfatazy z białkami regulatorowymi telomerazy. Inny zespół wykonał eksperymenty w których indukował apoptozę komórek HL-60 za pomocą salwicyny, leku przeciwnowotworowego naturalnego pochodzenia. W komórkach tych wraz ze wzrostem stężenia salwicyny wzrastała aktywność PP2A i obniżała się aktywność telomerazy,

zaś dodanie do układu okadejanu spowodowało zahamowanie apoptozy i wzrost aktywności telomerazy. Autorzy tej pracy wskazywali na możliwość pośredniej inaktywacji telomerazy za pośrednictwem białka regulatorowego TP1 (*ang.: TP1 - Telomerase-associated Protein 1*) [158].

Zmiany ilości podjednostki katalitycznej α nie muszą jednak odzwierciedlać aktywności fosfatazy. Aktywność ta zależy również od kompozycji powstałego holoenzymu, jego lokalizacji subkomórkowej oraz modyfikacji potranslacyjnych. Ekspresja PP2A α zmienia się także wraz ze stopniem zróżnicowania tkanki. W komórkach HL-60 traktowanych stymulatorem różnicowania jakim jest dla tych komórek kwas *all-trans* retinowy ATRA (*ang.: All-Trans Retinoic Acid*) stwierdzono obniżenie poziomu tylko PP2A α , bez zmiany poziomu podjednostek strukturalnych i regulatorowych [159].

Ze względu na niewielką ilość dostępnego do badań materiału niemożliwa była ocena aktywności PP2A, zaś ekspresja podjednostki regulatorowej nie była skorelowana z aktywnością telomerazy. Trzeba jednak zaznaczyć, że wcześniejsze badania nie były wykonywane na wycinkach nowotworów, lecz na liniach komórkowych wyprowadzonych z zupełnie innych pod względem zarówno genezy, jak i rozwoju nowotworów. Ponadto poziom PP2A α nie musi odzwierciedlać aktywności PP2A. Wahania poziomu PP2A α mogą wskazywać na wysoką heterogenność metaboliczną badanych nowotworów. Zmiany występujące u pacjentów mogą się od siebie różnić, wystarczy wspomnieć różną suplementację guza w tlen. Podobnie lity nowotwór nie jest hodowlą synchroniczną, w której wszystkie komórki pozostają na tym samym etapie rozwoju, co dodatkowo komplikuje interpretację otrzymanych wyników. W wielu nowotworach wykazano również wysoką ekspresję inhibitora PP2A I-2^{PP2A}/SET, który blokując PP2A powodował zniesienie wygaszania

kaskad kinaz mitogennych MAP i promował proliferację komórek. Jego ekspresja dodatkowo wpływa na aktywność holoenzymu PP2A [160].

Poziom PP2A α może wpływać na podatność komórek na transformację nowotworową. Komórki NIH/3T3 w których nadprodukowano PP2A α transformowane następnie konstruktami kodującymi geny Ha-*ras* lub *PymT* miały zredukowaną zdolność tworzenia kolonii. Mniejsza ilość kolonii klonów z podwyższoną ekspresją PP2A po transformacji Ha-*ras* potwierdza tezę o udziale PP2A w regulacji kaskady mitogennej MAP. Ponadto w niektórych koloniach wykazano niezwykle wysoką nadekspresję PP2A [161], co przeczy doniesieniom o bardzo ścisłej kontroli promotora PP2A α . Ja również zaobserwowałam wielokrotnie podwyższony poziom PP2A α w niektórych rakach pęcherza moczowego. Wykazano również wpływ PP2A na angiogenezę, białko to bowiem wpływa na migrację komórek endotelialnych poprzez utrzymywanie integralności cytoszkieletu. Blokada PP2A powoduje odróżnicowanie morfologiczne komórek spowodowane degradacją cytoszkieletu [136]. Nie znaleziono jak dotąd mutacji w genie PP2A α . Znaleziono mutacje w podjednostce strukturalnej, które stwierdzano w raku płuc i okrężnicy oraz wielu innych nowotworach. Mutacje te są różnego typu od delecji przez mutacje punktowe, mutacje zmiany ramki odczytu aż do mutacji zmieniających właściwości splicingowe powstałych transkryptów [162-164]. Nie jest jednak jasne w jaki sposób mutacje te zwiększają panel możliwości regulacji aktywności holoenzymu PP2A. Wykazano, że częstość i typ mutacji podjednostki strukturalnej znalezionych w raku jajnika, nie różniły się istotnie od podobnych zmian obserwowanych w grupie kontrolnej zdrowych kobiet. Tak więc mutacje podjednostki regulatorowej nie muszą być związane z transformacją nowotworową [165].

Fosfataza białek typu 2A jest enzymem, na którego aktywność wpływa wiele, słabo poznanych czynników komórkowych, takich jak skład holoenzymu, jego lokalizacja śródkomórkowa i modyfikacje, jak również inhibitory i modulatory aktywności. Nie są poznane wzajemne relacje ilościowe i interakcje między tymi czynnikami w organizmie człowieka jako całości i z pewnością temat ten wart jest szczegółowych badań. Może się on przyczynić zarówno do głębszego poznania metabolizmu, jak i stworzyć nowe możliwości oddziaływania na stany patologiczne takie jak nowotwory. Na obecnym etapie można jedynie hipotetyzować na temat modulacji wpływu PP2A *in vivo* na tak podstawowe szlaki sygnalizacyjne jak kinazy MAP, białko Rb, czy aktywność telomerazy.

Badana przeze mnie aktywność telomerazy w osadach komórek z moczu chorych na raka pęcherza moczowego wydaje się być obiecująca, szczególnie jeśli uświadomimy sobie, że mocz jest dużo łatwiejszym do pobrania materiałem badawczym, niż krew. Łatwy dostęp, oraz możliwość pozyskania dużych ilości moczu dobrze rokuje wszelkim testom opartym na analizie moczu i osadów komórek z moczu. Analiza aktywności telomerazy w osadach komórek z moczu chorych na raka pęcherza moczowego w skali laboratorium przyszpitalnego byłaby z pewnością trudna do realizacji, ale mogłaby przynieść bardzo dobre rezultaty diagnostyczne.

8. WNIOSKI

Poziom PP2A α w wycinkach prawidłowych tkanek pęcherza moczowego jest zmienny osobniczo.

Poziom PP2A α jest również różny w badanych tkankach guzów nowotworowych pęcherza moczowego. Różnice te nie są związane zarówno ze stopniem zaawansowania nowotworu, stopniem złośliwości histologicznej, jak i płcią i wiekiem pacjentów.

Nie stwierdzono aktywności telomerazy w osadach komórek z moczu osób zdrowych.

Aktywność telomerazy stwierdzono w 91% tkanek raków pęcherza moczowego, oraz w 89% osadów komórek z moczu pochodzących od pacjentów z udokumentowanym rakiem pęcherza moczowego.

Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem PP2A α a aktywnością telomerazy w tkankach guzów nowotworowych.

Aktywność telomerazy w osadach komórek z moczu może stanowić przydatny test diagnostyczny w przejściowonabłonkowym raku pęcherza moczowego, szczególnie w przypadkach wątpliwych diagnostycznie.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D. (2001) GLOBCAN 2000: Cancer incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0, IARC Cancer Base No.5. Lyon, IARC Press
2. Reuter V. (1990) Pathology of bladder cancer: assessment of prognostic variables and response to therapy. *Semin Oncol* 17:524-532
3. Serretta V., Pomara G., Piazza F., Gange E. (2000) Pure squamous cell carcinoma of the bladder in western countries. Report on 19 consecutive cases. *Eur Urol* 37:85-89
4. Wilson T., Pritchett T., Lieskovsky G., Warner N., Skinner D. (1991) Primary adenocarcinoma of bladder. *Urology* 38:223-226
5. Smeulders N., Woodhouse C. (2001) Neoplasia in adult extrophy patients. *Br J Urol Int* 87:623-628
6. Grignon D., Ro J., Ayala A., Johnson D., Ordonez N. (1991) Primary adenocarcinoma of the urinary bladder. A clinicopathologic analysis of 72 cases. *Cancer* 67:2165-2172
7. Silverman D., Levin L., Hoover R., Hartge P. (1989) Occupational risks of bladder cancer in the United States: I. White Men. *J Natl Cancer Inst* 81:1472-1480
8. Zeegers M., Kellen E., Buntinx F., van der Brandt P. (2004) The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol* 21:392-401
9. Moyzis R., Buckingham J., Cram L., Dani M., Deaven L., Jones M., Meyene J., Ratliff R., Wu J. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)_n present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6622-6626
10. Meyene J., Ratliff R., Moyzis R. (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7049-7053
11. de Lange T., Shiue L., Meyers R., Cox D., Naylor S., Killery A., Varmus H. (1990) Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10:518-527
12. Henderson E., Blackburn E. (1989) An overhang 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol Cell Biol* 9:345-348
13. Makarov V., Hirose Y., Langmore J. (1997) Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88:657-666
14. McElligott R., Wellinger R. (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J* 16:3705-3714

15. Wright W., Tesmer V., Huffman K., Levene S., Shay J. (1997) Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* 11:2801-2809
16. Wellinger R., Sen D.(1997) The DNA structures at the ends of eucaryotic chromosomes. *Eur J Cancer* 11:735-749
17. Griffith J., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R., Bianchi A., Moss H., de Lange T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97:503-514
18. de Lange T. (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21:532-540
19. Price C. (2001) How many proteins does it take to maintain a telomere? *Trends in Genetics* 17:437-438
20. Olovnikov A. (1971) [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Acad Nauk SSSR* 201:1496-1499
21. Olovnikov A. (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41:181-190
22. Watson J. (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature New Biol* 239:197-201
23. Hastie N., Dempster M., Dunlop M., Thompson A., Green D., Allshire R. (1990) Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346:866-868
24. Harley C., Futcher A., Greider C. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458-460
25. Hayflick L. and Moorhead P. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621
26. Goldstein S. (1990) Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249:1129-1133
27. Blackburn E. and Greider C. (1995) *Telomeres*. CHSL Press, Cold Spring Harbor, NY.
28. Harrington L., Zhou W., McPhail T., Oulton R., Yeung D., Mar V., Bass M., Robinson M. (1997) Human telomerase contains evolutionary conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev* 11:3109-3115
29. Meyerson M., Counter C., Eaton E., Ellisen L., Steiner P., Caddle S., Ziaugra L., Beijersbergen R., Davidoff M., Liu Q., Bacchetti S., Haber D., Weinberg R. (1997) hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:785-795

30. Nakamura T., Morin G., Chapman K., Weinrich S., Andrews W., Lingner J., Harley C., Cech T. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277:955-959
31. Kilian A., Bowtell D., Abud H., Hime G., Venter D., Keese P., Duncan E., Reddel R., Jefferson R. (1997) Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 6:2011-2019
32. Feng J., Funk W., Wang S., Weinrich S., Avilion A., Chiu C. Adams R., Chang E., Allsopp R., Yu J. (1995) The RNA component of human telomerase. *Science* 269:1236-1241
33. Beattie T., Shou W., Robinson M., Harrington L. (2001) Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* 21:6151-6160
34. Harrington L., McPhail T., Mar V., Zhou W., Oulton R., Bass M., Arruda I., Robinson M. (1997) A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275:973-977
35. Nakayama J., Saito M., Nakamura H., Matsuura A., Ishikawa F. (1997) TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* 88:875-884
36. Hiyama K., Hirai Y., Kyoizumi S., Akiyama M., Hiyama E., Piatyszek M., Shay J., Ishioka S., Yamakido M. (1995) Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 155:3711-3715
37. Hiyama E., Hiyama K., Tatsumoto N., Shay J. and Yokoyama T. (1996) Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol* 9:453-458
38. Buchkovich K., Greider C. (1996) Telomerase activity during entry into the cell cycle in normal human T cells. *Mol Biol Cell* 7:1443-1454
39. Yasumoto S., Kumimura C., Kikuchi C., Tahara H., Ohji H., Yamamoto H., Ide T., Utakoji T. (1996) Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 13:433-439
40. Harle-Bachor C., Boukamp P. (1996) Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6476-6481
41. Kyo S., Takakura M., Kohama T., Inoue M. (1997) Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 57:610-614
42. Kannan S., Tahara H., Yokozaki H., Mathew B., Nalinakumari K., Nair M., Tahara E. (1997) Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa. *Cancer Epidem Biomarkers Prev* 6:413-420

43. Villa A., Navarro-Galve B., Bueno C., Franco S., Blasco M., Martinez-Serrano A. (2004) Long-term molecular and cellular stability of human neural stem cell lines. *Exp Cell Res* 294:559-570
44. Ueda M., Ouhtit A., Bito T., Nakazawa K., Lubbe J., Ichihashi M., Yamasaki H., Nakazawa H. (1997) Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Res* 57:370-374
45. Hande M., Balajee A., Natarajan A. (1997) Induction of telomerase activity by UV-irradiation in Chinese hamster cells. *Oncogene* 15:1747-1752
46. Leteurtre F., Li X., Gluckman E., Carosella E. (1997) Telomerase activity during the cell cycle and in gamma-irradiated hematopoietic cells. *Leukemia* 11:1681-1689
47. Hyeon J., Hande M., Lansdorp P., Natarajan A. (1998) Induction of telomerase activity and chromosome aberrations in human tumour cell lines following X-irradiation. *Mutat Res* 401:121-131
48. Kim N., Piatyszek M., Prowse K., Harley C., West M., Ho P., Coviello G., Wright W., Weinrich S., Shay J. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011-2015
49. Cheng A., Lin J., Chang T., Wang T. (1998) Telomerase activity in benign and malignant human thyroid tissues. *Br J Cancer* 77:2177-2180
50. Tang R., Cheng A., Wang J., Wang T. (1998) Close correlation between telomerase expression and adenomatous polyp progression in multistep colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 58:4052-4054
51. Shay J., Bacchetti S. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33:787-791
52. Beattie T., Shou W., Robinson M., Harrington L. (1998) Reconstruction of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol* 8:177-180
53. Bodnar A., Ouellette M., Frolkis M., Holt S., Chiu C., Morin G., Harley C., Shay J., Lichtensteiner S., Wright W. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352
54. Counter C., Meyerson M., Eaton E., Ellisen L., Caddle S., Haber D., Weinberg R. (1998) Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of there (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* 16:1217-1222
55. Bryce L., Morrison N., Hoare S., Muir S., Keith W (2000) Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence *in situ* hybridization. *Neoplasia* 2:197-201
56. Zhang A., Zheng C., Lindvall C., Hou M., Ekedahl J., Lowensohn R., Yan Z., Yang X., Henriksson M., Blennow E., Nordenskjold M., Zetterberg A., Bjorkholm M., Gruber

A and Xu D. (2000) Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Res.* 60:6230-6235

57. Wu K., Grandori C., Amacker M., Simon-Vermot N., Polack A., Lingner J., Dalla-Favera R. (1999) Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* 21:220-224

58. Horikawa I., Cable P., Afshari C., Barrett C. (1999) Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res* 59:826-830

59. Klingelhutz A., Foster S., McDougall J. (1996) Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380:79-82

60. Burger A., Fiebig H., Kuettel M., Lautenberger J., Kung H., Rhim J. (1998) Effect of oncogene expression on telomerase activation and telomere length in human endothelial, fibroblast and prostate epithelial cells. *Int J Oncol* 13:1043-1048

61. Rhim J., Tsai W., Chen Z., Chen Z., van Waes C., Burger A., Lautenberger J. (1998) A human vascular endothelial cell model to study angiogenesis and tumorigenesis. *Carcinogenesis* 19:673-681

62. Mandal M., Kumar R. (1997) Bcl-2 modulates telomerase activity. *J Biol Chem* 272:14183-14187

63. Xu H., Zhou Y., Ji W., Perng G., Kruzelock R., Kong C., Bast R., Mills G., Li J., Hu S. (1997) Reexpression of the retinoblastoma protein in tumor cells induces senescence and telomerase inhibition. *Oncogene* 15:2589-2596

64. Takakura M., Kyo S., Kanaya T., Hirano H., Takeda J., Yutsudo M., Inoue M. (1999) Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res* 59:551-557

65. Ulaner G., Hu J., Vu T., Giudice L., Hoffman A. (1998) Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 58:4168-4172

66. Ulaner G., Hu J., Vu T., Oruganti H., Giudice L., Hoffman A. (2000) Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *Int J Cancer* 85:330-335

67. Dessain S., Yu H., Reddel R., Beijersbergen R., Weinberg R. (2000) Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res* 60:537-541

68. Cong Y., Bacchetti S. (2000) Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *J Biol Chem* 275:35665-35668

69. Holt S., Wright W., Shay J. (1996) Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Mol Cell Biol* 16:2932-2939

70. Li H., Cao Y., Berndt M., Funder J., Liu J. (1999) Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene* 18:6785-6794
71. Gollahon L., Shay J. (1996) immortalization of human mammary epithelial cells transfected with mutant p53. *Oncogene* 12:715-725
72. van Steensel B., de Lange T. (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385:740-743
73. Marcand S., Glison E., Shore D. (1997) A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* 275:986-990
74. Cooper J., Nimmo E., Allshire R., Cech T. (1997) Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* 385:744-747
75. Cook B., Dynek J., Chang W., Shostak G., Smith S. (2002) Role of the related poly(ADP-ribose) polymerases Tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol* 22:332-342
76. Li H., Zhao L-L., Yang Z., Founder J., Liu J. (1998) Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 273:33436-33442
77. Bodnar A., Kim N., Effros R., Chiu C. (1996) Mechanism of telomerase induction during T cell activation. *Exp Cell Res* 228:58-64
78. Ku W., Cheng A., Wang T. (1997) Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 241:730-736
79. Kang S., Kwon T., Kwon D., Do S. (1999) Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem* 274:13085-13090
80. Wheat W., Roesler W., Klemm D. (1994) Aimien virus 40 small tumor antigen inhibits dephosphorylation of protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol* 14:5881-5890
81. Alberts A., Deng T., Lin A., Meinkoth J., Schontal A., Mumby M., Karin M., Feramisco J. (1993) Protein phosphatase 2A potentiates activity of promoters containing AP-1 binding elements. *Mol Cell Biol* 13:2104-2112
82. Mermoud J., Calvio C. (1994) Uncovering the role of Ser/Thr protein phosphorylation in nuclear pre mRNA splicing. *Adv Prot Phosphatases* 8:99-118
83. Cobb M., Goldsmith E. (1995) How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270:14843-14846

84. Kinoshita K., Nemoto T., Nabeshima K., Kondoh H., Niwa H., Yanagida M. (1996) The regulatory subunits of fission yeast protein phosphatases 2A (PP2A) affect cell morphogenesis, cell wall synthesis and cytokinesis. *Genes Cells* 1:29-45
85. Shenolikar S. (1994) Protein serine/threonine phosphatases – new avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biology* 63:55-86
86. Mumby M., Walter G. (1991) Protein phosphatases and DNA tumor viruses: transformation through the back door. *Cell Regul* 2:14-27
87. Kremmer E., Ohst K., Kiefer J., Brevis N., Walter G. (1997) Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells. *Mol Cell Biol* 17:1692-1701
88. Kamibayashi C., Estes R., Lickteig R., Yang S., Craft C., Mumby M. (1994) Comparison of heterotrimeric protein phosphatase 2A containing different B subunits. *J Biol Chem* 269:20139-20148
89. Green D., Yang S., Mumby M. (1987) Molecular cloning and sequence analysis of the catalytic subunit of bovine type 2A protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4880-4884
90. Khew-Goodall Y., Hemmings B. (1988) Tissue-specific expression of mRNAs encoding α - and β -catalytic subunits of protein phosphatase 2A. *FEBS Lett* 238:365-368
91. Cohen P., Brewis N., Hughes V., Mann D. (1990) Protein serine/threonine phosphatases: an expanding family. *FEBS Lett* 268:355-359
92. Egloff M., Cohen P., Reinemer P., Bradford D. (1995) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol* 254:942-959
93. Evans D., Myles T., Hofsteenge J., Hemmings B. (1999) Functional expression of human PP2Ac in yeast permits the identification of novel C-terminal and dominant-negative mutant forms. *J Biol Chem* 274:24038-24046
94. Das A., Helps N., Cohen P., Bradford D. (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J* 16:6798-6809
95. Goldberg J., Huang H., Kwon Y., Greengard P., Nairn A., Kuriyan J. (1995) Three dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase 1. *Nature* 376:745-753
96. Hemmings B., Adams-Pearson C., Maurer F., Müller P., Goris J., Merlevede W., Hofsteenge J., Stone S. (1990) α - and β -forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry* 29:3166-3173

97. Chen S., Kramer G., Hardesty B. (1989) Isolation and partial characterization of a Mr 60,000 subunit of a type 2A phosphatase from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 264:7267-7275
98. Reudiger R., Roeckel D., Fait J., Berqvist A., Magnusson G., Walter G. (1992) Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Mol Cell Biol* 12:4872-4882
99. Zhao Y., Boguslawski G., Zitomer R., DePaoli-Roach A. (1997) *Saccharomyces cerevisiae* homologs of mammalian B and B' subunits of protein phosphatase 2A direct the enzyme to distinct cellular functions. *J Biol Chem* 272:8256-8262
100. Strack S., Chang D., Zaucha J., Colbran R., Wadziński B. (1999) Cloning and characterization of B delta, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *FEBS Lett* 460:462-466
101. Mayer R., Hendrix P., Cron P., Matthies S., Stone S., Goris J., Merevede W., Hofsteenge J., Hemmings B. (1991) Structure of the 55-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a neuronal specific isoform. *Biochemistry* 30:3589-3597
102. Millward T., Zolnierowicz S., Hemmings B. (1999) Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci* 24:186-191
103. Cohen P. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety in the spice of life. *Trends Biochem Sci* 22:245-251
104. Yan Z., Fedorov S., Mumby M., Williams R. (2000) PR48, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with Cdc6 and modulates DNA replication in human cells. *Mol Cell Biol* 20:1021-1029
105. Hubbard M., Cohen P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* 18:172-177
106. Li H., Zhao L-L., Funder J., Liu J-P. (1997) Protein Phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 272:16729-16732
107. Sobin L., Fleming I. (1997) TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition. Union Internationale Centre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 80:1803-1804
108. Atlas TNM (1994) UICC, International Union Against Cancer, Sanmedica, Warszawa
109. Epstein J., Amin M., Reuter V., Mostofi F. (1998) The World Health Organization / International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol* 22:1435-1448

110. Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annu Biochem* 72:248-254
111. Garcia A., Cereghini S., Sontag E. (2000) Protein phosphatase 2A and phosphatidylinositol 3-kinase regulate the activity of Sp1-responsive promoters. *J Biol Chem* 275:9385-9389
112. Rao J., Bonner R., Hurst R., Liang Y., Reznikoff C., Hemstreet G. 3rd (1997) Quantitative changes in cytoskeletal and nuclear actins during cellular transformation. *Int J Cancer* 70:423-429
113. Clasen S., Schulz W., Gerharz C., Grimm M., Chritoph F., Schmitz-Drager B (1998) Frequent and heterogenous expression of cyclin-dependent kinase inhibitor WAF1/p21 protein and mRNA in urothelial carcinoma. *Br J Cancer* 77:515-521
114. Van de Corput M., Dirks R., van Gijswijk R., van Binnendijk E., Hattinger C, de Paus R., Landegent J., Raap A (1998) Sensitive mRNA detection by fluorescence in situ hybridization using horseradish peroxidase-labeled oligodeoxynucleotides and tyramide signal amplification. *J Histochem Cytochem* 46:1249-1259
115. Chiu A., Huang Y., Huan S., Wang Y., Ju J., Chen M., Chou C (2002) Potential molecular marker for detecting transitional cell carcinoma. *Urology* 60:181-185
116. Groves M., Hanlon N., Turowski P., Hemmings B., Bradford D. (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* 96:99-110
117. Baharians Z., Schontal A. (1999) Reduction of Ha-*ras*-induced cellular transformation by elevated expression of protein phosphatase type 2A. *Mol Carcinogen* 24:246-254
118. Sreekrishna K., Brankamp R., Kropp K., Blankenship D., Tsay J., Smith P., Wierschke J., Subramanian A., Birkenberger L. (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190:55-62
119. Redpath N., Proud C. (1989) The tumour promoter okadaic acid inhibits reticulocyte-lysate protein synthesis by increasing the net phosphorylation of elongation factor 2. *Biochem J* 262:69-75
120. Buss W., Stepanek J., Queen S. (1994) Association of tissue-specific changes in translation elongation after cyclosporin with changes in elongation factor 2 phosphorylation. *Biochem Pharmacol* 48:1459-1469
121. Redpath N., Proud C. (1990) Activity of protein phosphatases against initiation factor-2 and elongation factor-2. *Biochem J* 272:175-180

122. Welsh G., Price N., Bladergroen B., Bloomberg G., Proud C. (1994) Identification of novel phosphorylation sites in the beta-subunit of translation initiation factor eIF-2. *Biochem Biophys Res Commun* 201:1279-1288
123. Adjelkovic M., Zolnierowicz A., Van Hoof C., Goris J., Hemmings B. (1996) *EMBO J* 15:7156-7167
124. Schöntal A., Feramisco J. (1993) Inhibition of histone H1 kinase expression, retinoblastoma protein phosphorylation, and cell proliferation by the phosphatase inhibitor okadaic acid. *Oncogene* 8:433-441
125. Kakinoki Y., Kitamura K., Matsuzawa S., Mizuno Y., Miyazaki T., Kikuchi K. (1992) Gene expressions and activities of protein phosphatases PP1 and PP2A in rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun* 185:291-297
126. Lee T. (1995) The role of protein phosphatase type-2A in the *Xenopus* cell cycle: initiation of the G2/M transition. *Semin Cancer Biol* 6:203-209
127. Mumby M., Water G. (1993) Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* 73:673-699
128. Sontag E., Fedorov S., Kamibayashi C., Robbins D., Cobb M., Mumby M. (1993) The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* 75:887-897
129. Yang S., Lickteig R., Estes R., Rundell K., Walter G., Mumby M. (1991) Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Mol Cell Biol* 11:1988-1995
130. Turowski P., Fernandez A., Favre B., Lamb N., Hemmings B. (1995) Differential methylation and altered conformation of cytoplasmic and nuclear forms of protein phosphatase 2A during cell cycle progression. *J Cell Biol* 129:397-410
131. Guo H., Damuni Z. (1993) Autophosphorylation-activated protein kinase phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2500-2504
132. Chen J., Martin B., Brautigan D. (1992) Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation *Science* 257:1261-1264
133. Favre B., Zolnierowicz S., Turowski P., Hemmings B. (1994) The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. *J Biol Chem* 269:16311-16317
134. Suganuma M., Fuijki H., Suguri H., Yoshizawa S., Hirota M., Nakayasu M., Ojika M., Wakamatsu K., Yamada K., Sugimura T. (1988) Okadaic acid: an additiorial non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1768-1771

135. MacKintosh C., MacKintosh R. (1994) Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *Trends Biochem Sci* 19:444-448
136. Gabel S., Benfield J., Meisinger J., Petruzzelli G., Young M. (1999) Protein Phosphatases 1 and 2A maintain endothelial cells in a resting state, limiting the motility that is needed for the morphogenic process of angiogenesis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 121:463-468
137. Muller M., Krause H., Heicappell R., Tishendorf J., Shay J., Miller K. (1998) Comparison of human telomerase RNA and telomerase activity in urine for diagnosis of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 4:1949-1954
138. Kavalier E., Landman J., Chang Y., Droller M., Liu B. (1998) Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine sampled by assaying for the presence of telomerase activity. *Cancer* 82:708-714
139. Arai Y., Yajima T., Yagihashi A., Kobayashi D., Kameshima H., Sasaki M., Tanaka K., Kuwajima K., Miyao N., Tsukamoto T., Watanabe N. (2000) Limitations of urinary telomerase activity measurement in urothelial cancer. *Clin Chem Acta* 296:35-44
140. Yoshida K., Sugino T., Tahara H., Woodman A., Bolodeoku J., Nargund V., Fellows G., Goodison S., Tahara E., Tarin D. (1997) Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 79:362-369
141. Kinoshita H., Ogawa O., Kakehi Y., Mishina M., Mitsumori K., Itoh N., Yamada H., Terachi T., Yoshida O. (1997) Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)* 89:724-730
142. Bhuiyan J., Akhter J., O'Kane D. (2002) Performance characteristics of multiple urinary tumor markers and sample collection techniques in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Chim Acta* 331:69-77
143. Lin Y., Miyamoto H., Fujinami K., Uemura H., Hosaka M., Iwasaki Y., Kubota Y. (1996) Telomerase activity in human bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2:929-932
144. Ito H., Kyo S., Kanaya T., Takakura T., Inoue M., Namiki M. (1998) Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. *Clin Cancer Res* 4:1603-1608
145. Gelmini S., Crisci A., Salvadori B., Pazzagli M., Selli C., Orlando C. (2000) Comparison of telomerase activity in bladder carcinoma and exfoliated cells collected in urine and bladder washings, using a quantitative assay. *Clin Cancer Res* 6:2771-2776
146. Papanicolaou G., Marshall V. (1945) Urine sediment smears as a diagnostic procedure in cancers of the urinary tract. *Science* 101:519-520
147. Umiker W. (1964) Accuracy of cytologic diagnosis of cancer of the urinary tract. *Acta Cytol* 8:186-193

148. Rife C., Farrow G., Utz D. (1979) Urine cytology of transitional cell neoplasms. *Urol Clin North Am* 6:599-612
149. Raab S., Lenel J., Cohen M. (1994) Low grade transitional cell carcinoma of the bladder: cytologic diagnosis by key features as identified by logistic regression analysis. *Cancer* 74:1621-1626
150. Farrow G. (1990) Urine cytology in the detection of bladder cancer: a critical approach. *J Occup Med* 32:817-821
151. Ramakumar S., Bhuiyan J., Besse J., Roberts S., Wollan P., Blute M., O’Kane D. (1999) Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J Urol* 161:388-394
152. Wu Y., Hruszkewycz A., Delgado R., Yang A., Vortmeyer A., Moon Y., Weil R., Zhuang Z., Remaley A. (2000) Limitations in the quantitative determination of telomerase activity by the electrophoretic and ELISA based TRAP assays. *Clin Chim Acta* 293:199-212
153. Bialkowska-Habrzanska H., Bowles L., Bukala B., Joseph M., Fletcher R., Razvi H. (2000) Comparison of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA and telomerase activity as urine markers for diagnosis of bladder carcinoma. *Mol Diagn* 5:267-277
154. Dalbagni G., Han W., Zhang Z-F., Cordon-Cardo C., Saigo P., Fair W., Herr H., Kim N., Moore M. (1997) Evaluation of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay for telomerase as a diagnostic modality in recurrent bladder cancer. *Clin Cancer Res* 3:1593-1598
155. Halling K., King W., Sokolova I., Karnes R., Meyer R., Powell E., Sebo T., Cheville J., Clayton A., Krajnik K., Ebert T., Nelson R., Burkhardt H., Ramakumar S., Stewart C., Pankratz V., Lieber M., Blute M., Zincke H., Seelig S., Jenkins R., O’Kane D. (2002) A comparison of BTA Stat, Hemoglobin Dipstick, telomerase and Vysis Urovysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Urol* 167:2001-2006
156. Saad A., Hanbury D., McNicholas T., Boustead G., Morgan S., Woodman A. (2002) A study comparing various noninvasive methods of detecting bladder cancer in urine. *Br J Urol Int* 89:369-373
157. Mayfield M., Shah T., Flannigan G. (1998) Telomerase activity in malignant and benign bladder conditions. *Int J Mol Med* 1:835-840
158. Liu W-J., Jiang J-F., Xiao D., Ding J. (2002) Down-regulation of telomerase activity via protein phosphatase 2A activation in salivine-induced human leukemia HL-60 cell apoptosis. *Biochem Pharmacol* 64:1677-1687
159. Nishikawa M., Omay S., Toyoda H., Tawara I., Shima H., Nagao M., Hemmings B., Mumby M., Deguchi K. (1994) Expression of the catalytic and regulatory subunits

of protein phosphatase type 2A may be differentially modulated during retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Cancer Res* 54:4879-4884

160. Fukukawa C., Shima H., Tanuma N., Ogawa K., Kikuchi K. (2000) Up-regulation of I-2^{PP2A}/SET gene expression in rat primary hepatomas and regenerationg livers. *Cancer Lett* 161:89-95

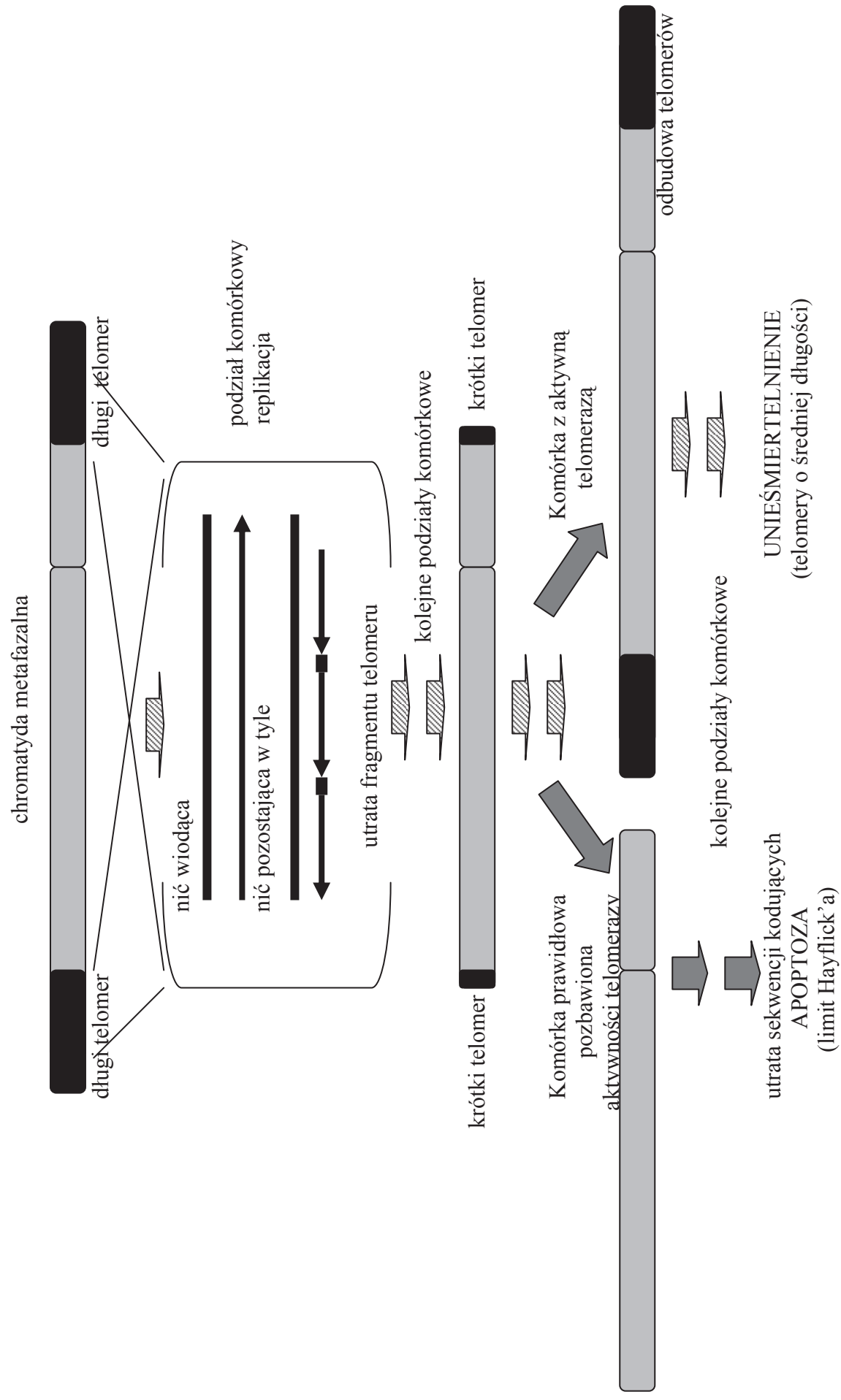
161. Baharians Z., Schontal A. (1998) Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. *J Biol Chem* 273:19019-19024

162. Wang S., Esplin E., Li J., Huang L., Gazdar A., Minna J., Evans G. (1998) Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. *Science* 282:284-287

163. Takagi Y., Futamura M., Yamaguchi K., Aoki S., Takahashi T., Saji S. (2000) Alterations of the PPP2R1B gene located at 11q23 in human colorectal cancers. *Gut* 47:268-271

164. Calin G., di Iasio M., Caproni E., Vorechovsky I., Natali P., Sozzi G., Croce C., Barbanti-Brodano G., Russo G., Negrini M. (2000) Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and beta (PPP2R1B) isoformas of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms. *Oncogene* 19:1191-1195

165. Campbell I., Manolitsas T. (1999) Absence of PPP2R1B gene alterations in primary ovarian cancer. *Oncogene* 18:6367-6369



Ryc.2 Schemat wyjaśniający rolę telomerazy w komórkach człowieka (nie zachowano skali).

Tab.11 Współczynnik R, a aktywność telomerazy w tkance raka pęcherza moczowego

<i>Telomeraza</i>		<i>Poziom PP2Aα w tkance raka pęcherza moczowego</i>	
	Obniżony 1 << R	Zbliżony do obserwowanego w pęcherzu prawidłowym R ≈ 1	Podwyższony R >> 1
Brak aktywności telomerazy Absorbancja <0,1	Pacjenci nr: 11 (T4N1M0, G3) 41 (T1N0M0, G1) 45 (T1NxM0, G1)	Pacjent nr: 60 (T2N0M0, G3)	Pacjent nr 59 (T1N0M0, G1)
Śladowa aktywność telomerazy 0,1 < Abs < 0,2	Pacjenci nr: 2 (T3aN0M0, G2) 27 (T2N0M0, G2)		Pacjent nr 61 (TaN0M0, G1)
Stwierdzona aktywność telomerazy Abs > 0,2	Pacjenci nr: 5 (T3aN0M0, G2) 17 (T3bN0M0, G3) 25 (T3bN1M0, G3) 28 (T1N0M0, G2) 29 (T3N0M0, G3) 34 (T1NxM0, G2) 40 (T1NxM0, G1) 43 (T3N0M0, G2) 51 (T1N0M0, G2) 53 (TaN0M0, G1) 55 (T3NxM0, G2)	Pacjenci nr: 1 (T3aNxM0, G2) 10 (T3bN0M0, G2) 12 (T3bN1M0, G3) 18 (T3bN1M0, G3) 20 (T2N0M0, G1) 21 (T1N0M0, G1) 24 (T2N0M0, G3) 26 (T3NxM0, G2) 38 (T1NxM0, G1) 39 (T3N1M0, G2) 42 (T2NxM0, G2) 44 (T1NxM0, G1) 46 (T1N0M0, G1) 54 (T3N1M0, G2) 57 (T1N0M0, G1)	Pacjenci nr: 4 (T4N0M0, G3) 7 (T4N1M0, G3) 8 (T3aN0M0, G1) 9 (T3aN1M0, G2) 13 (T3bN1M0, G2) 15 (T3bN0M0, G3) 16 (T2N0M0, G2) 19 (T2N0M0, G1) 23 (T2NxM0, G2) 30 (T3bN1M0, G3) 33 (T3bN1M0, G3) 35 (T3bN0M0, G3) 37 (T1NxM0, G2) 47 (T1N0M0, G2) 49 (T1N0M0, G2) 50 (T1N0M0, G1) 52 (T1N0M0, G2) 56 (T1N0M0, G1) 62 (T1N0M0, G2) 64 (TaN0M0, G1)

Tab. 13 Porównanie danych z piśmiennictwa dotyczących czułości oznaczania telomerazy z uwzględnieniem zaawansowania klinicznego oraz stopnia odróżnicowania tkanki.

Całkowita czułość (%)	Stopień zaawansowania klinicznego – czułość (%)							Stopień zaawansowania histopatologicznego - czułość (%)			Piśmiennictwo
	Ta	Tis	T1	T2	T3	T4		G1	G2	G3	
35 (n=37)	46 (n=11)	20 (n=5)	50 (n=10)	18 (n=11)							[154]
85 (n=104)		100 (n=5)						79 (n=29)	84 (n=38)	87,5 (n=32)	[138]
70 (n=57)	76 (n=25)	91 (n=11)	71 (n=14)					56 (n=9)	85 (n=26)	85 (n=25)	[151]
46 (n=70)	42 (n=36)	67 (n=18)	31 (n=16)					30 (n=10)	48 (n=25)	49 (n=35)	[155]
84 (n=31)	84 (n=13)	100 (n=5)	90 (n=10)	100 (n=7)				56 (n=9)	92 (n=12)	100 (n=10)	[156]
89 (n=52)	88 (n=24)		93 (n=28)					85 (n=20)	100 (n=21)	82 (n=11)	własne wyniki

Czułość została zdefiniowana jako % pacjentów z udokumentowanym rakiem pęcherza moczowego u których wykryto aktywność w osadzie komórek z moczu.