

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
Διευθυντής: Καθ. Ν. Βαμβακόπουλος**

**ΣΕ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ  
ΤΟΜΕΑ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ  
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
Διευθυντής: Καθ. Ι. Ε. Μεσσήνης**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ  
ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΠΡΟΣΒΕΒΛΗΜΕΝΑ ΑΠΟ  
ΤΟΝ ΙΟ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ (HPV) ΚΑΙ  
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΤΥΠΟ ΤΟΥ ΙΟΥ**

**ΠΑΓΩΝΑ Α. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ**

*Βιολόγος*

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2007**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7587/1  
Ημερ. Εισ.: 07-10-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
616.911  
ΟΙΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083725

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
Διευθυντής: Καθ. Ν. Βαμβακόπουλος

**ΣΕ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ**  
ΤΟΜΕΑ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ  
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
Διευθυντής: Καθ. Ι. Ε. Μεσσήνης

---

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ  
ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΠΡΟΣΒΕΒΛΗΜΕΝΑ ΑΠΟ  
ΤΟΝ ΙΟ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ (HPV) ΚΑΙ  
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΤΥΠΟ ΤΟΥ ΙΟΥ**

**ΠΑΓΩΝΑ Α. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ**

*Βιολόγος*

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΛΑΡΙΣΑ 2007**

### Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καθηγητής	κ. Ιωάννης Μεσσήνης
Επίκουρη Καθηγήτρια	κα. Παναγούλα Κόλλια
Επίκουρη Καθηγήτρια	κα. Ασπασία Τσέζου (επιβλέπουσα)

### Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής	κ. Νικόλαος Βαμβακόπουλος
Καθηγητής	κ. Γεώργιος Κουκούλης
Καθηγητής	κ. Ιωάννης Μεσσήνης
Καθηγητής	κ. Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς
Επίκουρος Καθηγητής	κ. Αθανάσιος Καλλιτσάρης
Επίκουρη Καθηγήτρια	κα. Παναγούλα Κόλλια
Επίκουρη Καθηγήτρια	κα. Ασπασία Τσέζου

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	σελ.11
<b><u>1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>	σελ.15
<b>1.1 Τελομερή</b>	σελ.17
1.1.1. Δομή και ρόλος τελομερών	σελ.17
1.1.2. Πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής	σελ.20
<b>1.2 Τελομεράση</b>	σελ.23
1.2.1. Δομή και λειτουργία τελομεράσης	σελ.23
1.2.1.1 RNA υπομονάδα τελομεράσης	σελ.24
1.2.1.2 Καταλυτική υπομονάδα τελομεράσης (hTERT)	σελ.24
1.2.1.3 Άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση	σελ.25
1.2.2. Λειτουργία τελομεράσης	σελ.27
1.2.3. Έκφραση της τελομεράσης	σελ.28
1.2.4. Ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης	σελ.29
1.2.4.1 Μεταγραφικοί παράγοντες	σελ.30
1.2.4.2 Επιγενετικοί μηχανισμοί ρύθμισης της hTERT	σελ.33
1.2.5.Μεθυλίωση του DNA του υποκινητή της hTERT	σελ.39
<b>1.3 Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας</b>	σελ.41
1.3.1. Μοριακή παθογένεια του καρκίνου του τραχήλου	σελ.43
1.3.2. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας και τελομεράση	σελ.50
<b>1.4 Σκοπός της διατριβής</b>	σελ.51
<b><u>2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>	σελ.53
<b>2.1 Υλικά και μέθοδοι</b>	σελ.55
2.1.1 Συλλογή δειγμάτων	σελ.55
2.1.2 Απομόνωση DNA	σελ.56
2.1.3 Απομόνωση ολικού κυτταρικού RNA	σελ.57
2.1.4 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	σελ.58
2.1.5 Ανίχνευση και τυποποίηση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.	σελ.60
2.1.6 Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP	σελ.68
2.1.7 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR)	σελ.69

2.1.8 Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) με την τεχνική της ποσοτικής PCR	σελ.70
2.1.9 Ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου του στελέχους 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων με την τεχνική της ποσοτικής PCR	σελ.77
2.1.10 Ανίχνευση των E6 και E7 mRNA μεταγράφων του ιού με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR)	σελ.79
2.1.11 Μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT)	σελ.80
2.1.12 Αξιολόγηση των δοκιμασιών ως προς τη χρήση τους ως πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες.	σελ.84
2.1.13 Στατιστική ανάλυση	σελ.84
<b>2.2. Αποτελέσματα</b>	σελ.87
2.2.1 Κυτταρολογική (κατά Bethesda) και ιστολογική (βιοψίες) ανάλυση τραχηλικών επιχρισμάτων	σελ.87
2.2.2 Ανίχνευση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human PapillomaVirus-HPV) στα τραχηλικά επιχρίσματα και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα	σελ.88
2.2.3 Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα και τη μόλυνση με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (Telomeric repeat protocol assay)	σελ.90
2.2.4 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR) και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα και τη μόλυνση με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων.	σελ.93
2.2.5 Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) με την τεχνική της ποσοτικής PCR και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα και τη μόλυνση με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων	σελ.96
2.2.6 Ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου του στελέχους 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων με την τεχνική της ποσοτικής PCR και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα.	σελ.101
2.2.7 Συσχέτιση της ποσοτικοποίησης του ιικού φορτίου και της ποσοτικοποίησης των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT)	σελ.103
2.2.8 Ανίχνευση των E6 και E7 mRNA μεταγράφων του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR) και συσχέτιση με τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA του HPV-16, καθώς και με την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης.	σελ.104
2.2.9 Μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή της καταλυτικής υπομονάδας	σελ.105

της τελομεράσης (hTERT) και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα και την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης.	
2.2.10 Αξιολόγηση των δοκιμασιών για τη χρήση τους ως πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες.	σελ.109
<b>2.3. Συζήτηση</b>	σελ.111
2.3.1 Συσχέτιση ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) με τα κυτταρολογικά ευρήματα.	σελ.111
2.3.2 Μελέτη της τελομεράσης και της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης.	σελ.113
2.3.3 Συσχέτιση της ενεργότητας του ολοενζύμου της τελομεράσης με τα κυτταρολογικά ευρήματα.	σελ.114
2.3.4 Συσχέτιση της ενεργότητας του ολοενζύμου της τελομεράσης με την παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.	σελ.115
2.3.5 Μελέτη και ποσοτικός προσδιορισμός της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα.	σελ.116
2.3.6 Συσχέτιση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με την παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων	σελ.119
2.3.7 Συσχέτιση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και των κυτταρολογικών ευρημάτων με το ιικό φορτίο του στελέχους 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων	σελ.120
2.3.8 Συσχέτιση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και των κυτταρολογικών ευρημάτων με την έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 του στελέχους 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.	σελ.122
2.3.9 Συσχέτιση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA του υποκινητή του γονιδίου της.	σελ.123
2.3.10 Κλινική χρησιμότητα των δοκιμασιών ανίχνευσης της τελομεράσης (TRAP), ανίχνευσης των επιπέδων έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης, ποσοτικού προσδιορισμού της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA του υποκινητή του γονιδίου στην αντιμετώπιση γυναικών με δυσπλασίες του τραχήλου της μήτρας.	σελ.127
Συμπεράσματα	σελ.129
<b>Περίληψη</b>	σελ.131
<b>Summary</b>	σελ.133
<b>Βιβλιογραφία</b>	σελ.135





**Στον πατέρα μου,  
Αντώνη  
και  
στη μνήμη της μητέρας μου,  
Βασιλικής**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στα φυσικά άκρα των γραμμικών χρωμοσωμάτων παρατηρούνται εξειδικευμένες νουκλεοπρωτεϊνικές δομές, που ονομάζονται τελομερή. Αποτελούνται από μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, καθώς και από πρωτεΐνες. Κατά τη διαδικασία αντιγραφής του DNA δημιουργείται το λεγόμενο «πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής», γιατί οι DNA πολυμεράσες δεν έχουν την ικανότητα αντιγραφής στην άκρη των χρωμοσωμάτων με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση του μήκους των τελομερών. Τη λύση στο πρόβλημα δίνει μια ειδική αντίστροφη μεταγραφάση, μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η τελομεράση. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, την RNA υπομονάδα που ονομάζεται hTR και την καταλυτική υπομονάδα hTERT που έχει δράση αντίστροφης μεταγραφάσης και αποτελεί τη βασική και απαραίτητη υπομονάδα για την έκφραση του ολοενζύμου. Επιπλέον, στη δημιουργία ενός ενεργού ολοενζύμου φαίνεται να συμμετέχει πλήθος άλλων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση. Αποτέλεσμα της δράσης της είναι να διατηρείται το μήκος των τελομερών παρέχοντας στα κύτταρα τη δυνατότητα για απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων, ενώ απουσία της τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού. Η τελομεράση δεν εκφράζεται στα περισσότερα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα, ωστόσο, παρατηρείται έκφραση σε κύτταρα με μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Η τελομεράση έχει ανιχνευτεί σε 85-95% των περιπτώσεων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης και ειδικότερα της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης στο επίπεδο της μεταγραφής επιτυγχάνεται τόσο μέσω μεταγραφικών παραγόντων όσο και μέσω επιγενετικών μηχανισμών, όπως η μεθυλίωση. Επιπρόσθετα, σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν και γενετικοί παράγοντες, όπως η μόλυνση από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων.

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας έχει συσχετιστεί με την παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) και ειδικότερα με τα στελέχη υψηλού κινδύνου, κυρίως το 16 και το 18. Η τελομεράση και ειδικότερα η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης τόσο σε καρκίνους όσο και σε περιπτώσεις δυσπλασίας τραχήλου, ενώ η χρησιμότητα της ως διαγνωστικού δείκτη παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Λαμβάνοντας υπόψη τη χαμηλή ειδικότητα του κυτταρολογικού τεστ Παπανικολάου, καθώς και το γεγονός ότι ένα μικρό ποσοστό των γυναικών που θα προσβληθούν από τον ιό θα εκδηλώσουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση των μηχανισμών που ενεργοποιούν την

έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και ενέχονται στην εμφάνιση δυσπλασιών καθώς και καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης αποτελεί τόσο η διερεύνηση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης σε φυσιολογικά και σε παθολογικά τραχηλικά επιχρίσματα με ποικιλία κυτταρολογικών ευρημάτων και η συσχέτιση της με την παρουσία του ιού όσο και η διερεύνηση μηχανισμών που ενέχονται στη ρύθμιση της. Για πρώτη φορά ποσοτικοποιήθηκαν τα μετάγραφα της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με τη χρήση της τεχνολογίας του Light Cycler και συσχετίστηκε με το ιϊκό φορτίο καθώς και συγκεκριμένοι επιγενετικοί μηχανισμοί ελέγχουν την έκφραση της τελομεράσης σε επιθηλιακά τραχηλικά επιχρίσματα. Η μελέτη μας χωρίζεται σε δύο κυρίως μέρη: το γενικό και το ειδικό. Στο γενικό μέρος γίνεται μια εκτενής ανασκόπηση και αναφορά σε ότι είναι ήδη γνωστό για την τελομεράση, για τον ρόλο των ανθρωπίνων θηλωμάτων και το ρόλο τους στην ανάπτυξη δυσπλασιών τραχήλου. Στο ειδικό μέρος περιγράφεται λεπτομερώς η μελέτη μας η οποία περιλαμβάνει:

- την ανίχνευση του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων και τη διερεύνηση του ρόλου της μόλυνσης από τον ιό στην εμφάνιση δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας
- την ανίχνευση της ενεργότητας του ολοενζύμου της τελομεράσης και τη συσχέτιση τους με τα κυτταρολογικά ευρήματα και την παρουσία του ιού
- την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και τη συσχέτιση με την παρουσία του ιού και τα κυτταρολογικά ευρήματα
- τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιϊκού φορτίου καθώς και την ανίχνευση των E6 και E7 μεταγράφων του ιού και τη συσχέτιση τους με την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης
- τον ποσοτικό προσδιορισμό της μεθυλίωσης του υποκινητή της hTERT, τη συσχέτιση της με το βαθμό δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας και με την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης
- τη διερεύνηση της κλινικής χρησιμότητας των παραπάνω παραμέτρων στην αντιμετώπιση των γυναικών με δυσπλασίες τραχήλου

Το υλικό μας αποτελείται από 280 ασθενείς με ποικιλία κυτταρολογικών ευρημάτων που ήταν υπό παρακολούθηση στο εξωτερικό ιατρείο κολποσκόπησης της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και από 45 γυναίκες που αποτέλεσαν εθελοντικά την ομάδα ελέγχου, έχοντας φυσιολογικό κυτταρολογικό αποτέλεσμα.

Η επεξεργασία όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την καθοδήγηση της Επίκουρου Καθηγήτριας κ. Ασπασίας Τσέζου.

Για την περάτωση της διδακτορικής μου διατριβής οφείλω να ευχαριστήσω ολόψυχα την Επίκουρο Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, κα. Ασπασία Τσέζου για την άρτια επιστημονική καθοδήγηση, αλλά και για την κατανόηση και υποστήριξη καθόλη την διάρκεια της διατριβής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας κ. Ιωάννη Ε. Μεσσήνη και την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας κα. Παναγούλα Κόλλια τόσο για την επίβλεψη της διατριβής όσο και για τις χρήσιμες συμβουλές τους. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Βιολογίας κ. Νικόλαο Βαμβακόπουλο για την συμβολή του στη διατριβή. Ακόμη, ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ. Γεώργιο Κουκούλη καθώς και όλο το προσωπικό του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την ιστολογική ανάλυση των δειγμάτων.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Επιμελητή Β΄ Μαιευτικής και Γυναικολογίας κ. Ιορδάνη Μαδεμτζή καθώς και την κα Χρύσα Κρατσαγκώνη για την άψογη συνεργασία μας στη συλλογή των δειγμάτων.

Ευχαριστώ πάρα πολύ όλους τους συναδέλφους Βιολόγους του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά όλα αυτά τα χρόνια και ιδιαίτερα τη Μαρία Σάτρα, Μαρία Σαμαρά, Βασίλη Παπανικολάου, Νίκο Στεφάνου, Ιωάννα Χιώτογλου, Ανδρομάχη Βαγενά, Φωτεινή Κωστοπούλου, Χριστίνα Γκουσγκούνη. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δημήτρη Ηλιόπουλο με τον οποίο συνεργάστηκα σε ένα τμήμα της συγκεκριμένης διατριβής.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Διοικητικό Συμβούλιο του Ιδρύματος Μποδοσάκη το οποίο μέσω της χορήγησης υποτροφίας με στήριξε οικονομικά σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Τέλος ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και την συνεχή υποστήριξη και ενθάρρυνση καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Παγώνα Οικονόμου

Βιολόγος

Λάρισα, 2007.



## **1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



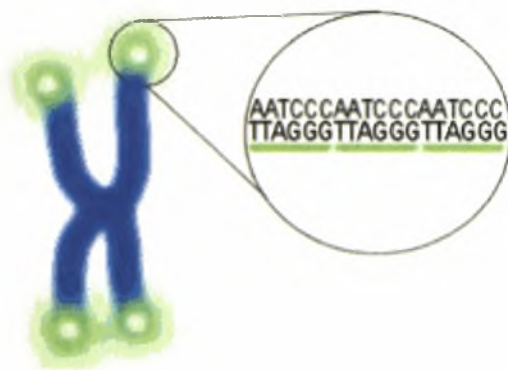


## 1.1 Τελομερή

### 1.1.1. Δομή και ρόλος τελομερών

Στα άκρα των χρωμοσωμάτων εδράζουν δομές που αποτελούνται από σύμπλοκα επαναλήψεων DNA και πρωτεϊνών και ονομάζονται τελομερή. Πρόκειται για τα φυσικά άκρα των χρωμοσωμάτων που κυρίως στον άνθρωπο αποτελούνται από τις εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις με το γενικό τύπο (TTAGGG)<sub>n</sub>, το μήκος των οποίων κυμαίνεται από 5-10 kb, με τα μακρύτερα τελομερή να εντοπίζονται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17<sup>1,2</sup> (Εικόνα 1).

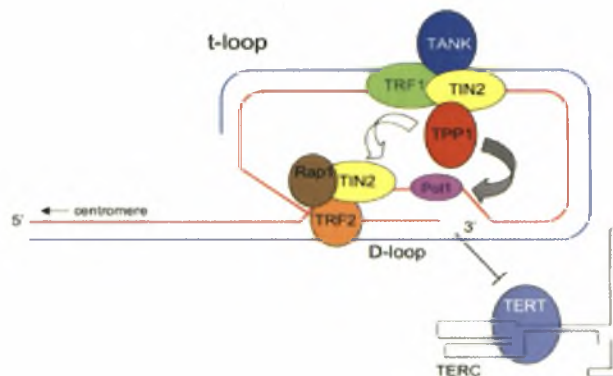
Το κύριο χαρακτηριστικό της δομής των τελομερών είναι ο τελομερικός βρόχος (*t-loop*) που σχηματίζεται στο 5' άκρο κάθε χρωμοσωμικού κλώνου. Αυτή η προεξοχή που έχει μήκος 150-250 περίπου βάσεων και είναι πλούσια σε γουανίνη (G), αναδιπλώνεται συναντώντας το δίκλωνο τμήμα του τελομερούς και σχηματίζοντας μία δομή που θυμίζει βρόχο<sup>3</sup> (Εικόνα 2).



Εικόνα 1: Τελομερή και τελομερική αλληλουχία στον άνθρωπο<sup>4</sup>.

Στη δημιουργία και διατήρηση του τελομερικού βρόγχου σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν διάφορες πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο μονόκλωνο άκρο του τελομερούς ή στο εσωτερικό δίκλωνο τμήμα του. Σημαντικότερες μεταξύ αυτών είναι η TRF2 (telomeric repeat-binding factor 2) η οποία προσδένεται στο βρόχο εμποδίζοντας τη χρωμοσωμική σύντηξη και σταθεροποιώντας το άκρο του τελομερούς, η TRF1 που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση<sup>5-9</sup>, η πρωτεΐνη Pot1 που προσδένεται στη μονόκλωνη 3' πλούσια σε G προεξοχή έχοντας πιθανώς προστατευτικό ρόλο, η πρωτεΐνη Rap1 που συμμετέχει στο σύμπλοκο μέσω της αλληλεπίδρασής της με την

TRF2, οι TIN2 και Ku (πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA) που αλληλεπιδρούν με τα τελομερή μέσω της πρόσδεσής τους στην TRF1 και η τακτοποίηση, η οποία έχει δράση πολυμεράσης και επάγει την επιμήκυνση των τελομερών εμποδίζοντας την πρόσδεση των TRF1 στο DNA του τελομερούς<sup>7,8,10</sup>. Ο ρόλος του τελομερικού βρόχου έγκειται στην προστασία του χρωμοσωμικού άκρου<sup>11</sup>, ενώ κατά την απουσία του παρατηρείται γενετική αστάθεια, σύντηξη των χρωμοσωμάτων και κυτταρική απόπτωση<sup>12</sup>. Γενικότερα, σε περιπτώσεις μη συντονισμένης λειτουργίας των τελομερών και των πρωτεϊνών τους παρατηρείται έντονη χρωμοσωμική και γενετική αστάθεια με τελική έκβαση τον καρκίνο ή την πρόωρη γήρανση<sup>13,14</sup>.



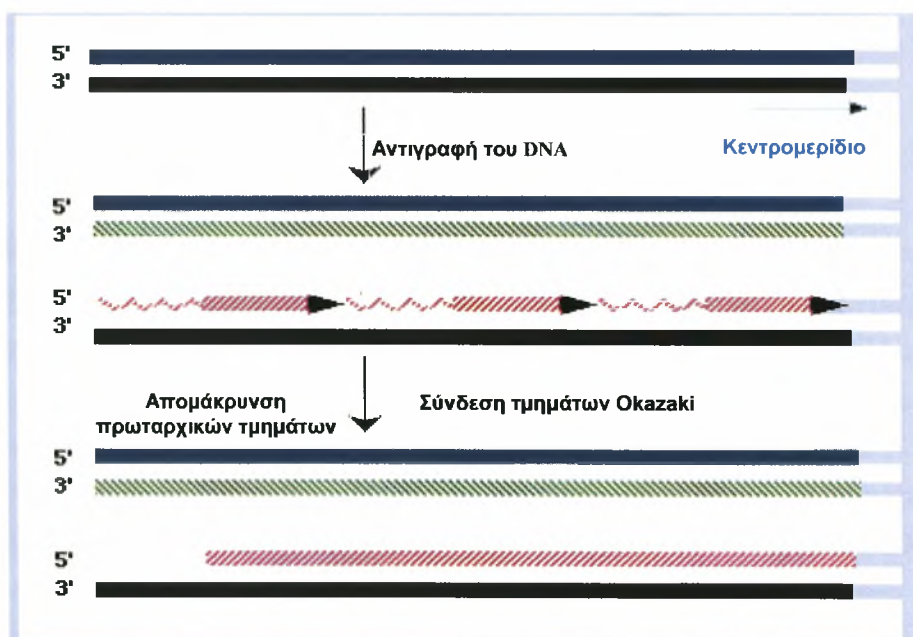
Εικόνα 2: Δομή τελομερικού βρόχου<sup>15</sup>

Προχωρώντας από τα τελομερή στο "κυρίως σώμα" του χρωμοσώματος εντοπίζονται οι υποτελομερικές περιοχές. Σε αυτές τις περιοχές παρατηρείται εκφυλισμός της αλληλουχίας του DNA, ενώ δεν περιέχονται πολλά γονίδια. Συγκεκριμένα, στις υποτελομερικές περιοχές ανιχνεύεται μια σειρά από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, που ονομάζονται TAS από τα αρχικά των λέξεων *telomeric-associated sequences*. Τέτοιες αλληλουχίες έχουν βρεθεί σε όλα τα είδη από τις ζύμες ως τον άνθρωπο και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ως προς την αλληλουχία, το μήκος και την πολυπλοκότητά τους, ακόμη και μεταξύ χρωμοσωμάτων του ίδιου είδους. Μεταξύ των αλληλουχιών αυτών συγκαταλέγονται και οι μικροδορυφορικοί δείκτες, στους οποίους και οφείλεται ο υψηλός βαθμός πολυμορφισμού των υποτελομερικών περιοχών<sup>5-7,16</sup>.

Τα τελομερή συμβάλλουν στην προστασία των χρωμοσωμικών άκρων με τη διατήρηση της χρωμοσωμικής ακεραιότητας, την αποτροπή της αποικοδόμησης των κλώνων του DNA καθώς και της σύντηξης ή αναδιάταξης των χρωμοσωμάτων. Επιπρόσθετα, διαμεσολαβούν στην πρόσδεση των χρωμοσωμάτων στο πυρηνικό στρώμα (*nuclear matrix*) και συμμετέχουν στην στοίχιση και στο διαχωρισμό τους κατά τη μείωση<sup>17-19</sup>. Τα τελομερή συμβάλλουν στην ολοκληρωμένη αντιγραφή των χρωμοσωμάτων και στη λειτουργική οργάνωση τους μέσα στον πυρήνα. Αποτελούν δε σημαντική θέση σύνδεσης για πολλά επιδιορθωτικά ένζυμα, όπως τα BRCA1, RAD50, MRE11, NBS1 και ταυτόχρονα επηρεάζουν τη μεταγραφή των γονιδίων που βρίσκονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Τέλος, λειτουργούν σαν ένας μοριακός μηχανισμός που ρυθμίζει την ικανότητα διαίρεσης των κυττάρων. Όταν τα τελομερή αποκτούν βραχύ μήκος, το κύτταρο χάνει την ικανότητά του να διαιρείται και οδηγείται σταδιακά στο θάνατο<sup>5-7,9,20-22</sup>.

### 1.1.2. Πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής (End-replication problem)

Η αντιγραφή του DNA είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία που πραγματοποιείται με μεγάλη ταχύτητα και εξαιρετική ακρίβεια. Ξεκινά από καθορισμένα σημεία του μορίου DNA που πρόκειται να αντιγραφεί τα οποία ονομάζονται θέσεις έναρξης της αντιγραφής και προχωρά ταυτόχρονα και προς τις δυο κατευθύνσεις του. Για την έναρξη και ολοκλήρωση της αντιγραφής απαιτείται σημαντικός αριθμός ενζύμων, με κυριότερες τις DNA πολυμεράσες. Βασικός ρόλος τους είναι η προσθήκη συμπληρωματικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων απέναντι από τις μητρικές αλυσίδες του αντιγραφόμενου μορίου DNA. Ωστόσο, οι DNA πολυμεράσες για να ξεκινήσουν τη διαδικασία της αντιγραφής χρειάζονται οπωσδήποτε εκκινητές (μικρά τμήματα RNA) και λειτουργούν μόνο σε κατεύθυνση 5' → 3', με αποτέλεσμα η μία θυγατρική αλυσίδα να συντίθεται συνεχώς και η άλλη να συντίθεται ασυνεχώς σε κομμάτια που ονομάζονται κλάσματα Okazaki. Ο RNA εκκινητής του τελευταίου κλάσματος Okazaki στο 5' άκρο του νεοσυντιθέμενου κλώνου δεν μπορεί να συντεθεί και οι DNA πολυμεράσες δεν έχουν την ικανότητα αντιγραφής στην άκρη του γραμμικού χρωμοσωμικού DNA με αποτέλεσμα η καινούρια αλυσίδα DNA να είναι ελαφρώς κοντύτερη σε σχέση με την μητρική αλυσίδα<sup>23</sup>. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως «πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής» (*end replication problem*)<sup>8,24,25</sup>(Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Το πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής του DNA<sup>4</sup>.

Αποτέλεσμα του προβλήματος ολοκλήρωσης της αντιγραφής είναι μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση τα χρωμοσώματα να χάνουν περίπου 20- 200 ζεύγη βάσεων από τα τελομερή τους, φθάνοντας ένα συγκεκριμένο όριο πέραν του οποίου τα χρωμοσώματα αποκτούν κολλώδη άκρα, αναδιατάσσονται και μεταλλάσσονται. Οι γενετικές αλλαγές που συμβαίνουν στα χρωμοσώματα δεν επιτρέπουν στα κύτταρα να συνεχίσουν με επιτυχία την κυτταρική διαίρεση, με αποτέλεσμα να εισέρχονται σε διαδικασία απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου. Κάθε τύπος κυττάρου έχει ένα περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων τις οποίες μπορεί να υποστεί, γνωστό ως όριο Hayflick<sup>26</sup>. Το όριο Hayflick ταυτίζεται πρακτικά με το σημείο M1 (*mortality stage 1*), κατά το οποίο το κύτταρο χάνει τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού, εμφανίζει μείωση του μήκους των τελομερών, με την πλειοψηφία των κυττάρων να διαθέτει τελομερή μήκους 5-10kb<sup>27</sup>, αλλά παραμένει μεταβολικά ενεργό. Η κατάσταση αυτή περιγράφει την κυτταρική γήρανση<sup>28</sup>. Το όριο Hayflick για ινοβλάστες από εμβρυϊκό ιστό είναι 60-80 διαιρέσεις, από νεαρό ενήλικο 20-40, ενώ σε ενήλικα άτομα φτάνει μόλις τις 10-20 διαιρέσεις, ανεξάρτητα από το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει κάθε κύτταρο στο σημείο αυτό<sup>29</sup>. Γενικά, η είσοδος των κυττάρων στο στάδιο M1 είναι μία μη αντιστρεπτή διεργασία. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, όπως κατά την απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και του ρετινοβλαστώματος (Rb) από ιικά ογκογονίδια, ο κυτταρικός πληθυσμός είναι δυνατόν να ξεπεράσει το φραγμό που δημιουργεί το στάδιο M1 και να συνεχίσει τη διαίρεση<sup>30</sup> οδηγώντας τα κύτταρα σε ένα στάδιο έντονης κρίσης που ονομάζεται M2 (*mortality stage 2*). Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, πολύ κοντά και δυσλειτουργικά τελομερή, γεγονότα που τελικά οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Η χρονική στιγμή εισόδου του κυττάρου στο στάδιο της κρίσης εξαρτάται από το αρχικό μήκος των τελομερών, δεδομένου του ότι έχει παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα που έχουν τελομερή μεγάλου μήκους μεταπίπτουν στην απόπτωση αργότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα με μικρό μήκος τελομερών<sup>31</sup> (Εικόνα 4).

Ελάχιστα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να ξεφύγουν από το στάδιο αυτό μέσω δύο μονοπατιών. Ένα από αυτά εξαρτάται από τη δράση της τελομεράσης και χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της hTERT<sup>28,32</sup>, ενώ το δεύτερο μονοπάτι είναι ανεξάρτητο της τελομεράσης και αναφέρεται σαν εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών (ALTernative, ALT). Στις ζύμες ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει ανασυνδυασμό των χρωμοσωμάτων, ενώ κάτι ανάλογο έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει και σε ανθρώπινα κύτταρα<sup>33</sup>. Συγκεκριμένα, σε κύτταρα στα οποία έχει κατασταλεί η δράση της τελομεράσης και άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται

στην επιμήκυνση των τελομερών, παρατηρήθηκαν δομές που σχετίζονται με ομόλογο ανασυνδυασμό χρωμοσωμάτων<sup>34</sup>. Σε ALT κύτταρα δεν παρατηρούνται άνισα και γενικά ασταθή τελομερή, γεγονός που αποδεικνύει πως ο ALT αναπληρώνει το κενό της τελομεράσης. Παραμένει άγνωστο το γιατί και πώς αναστέλλεται ο μηχανισμός ALT στα φυσιολογικά κύτταρα, ενώ αρκετοί ερευνητές υποστηρίζουν πως η λειτουργική συνύπαρξη του εναλλακτικού μηχανισμού επιμήκυνσης τελομερών και της τελομεράσης είναι βιολογικά δυνατή τουλάχιστον σε καρκινικά κύτταρα<sup>35,36</sup>.

Τα τελομερή, επομένως, λειτουργούν σαν το ρολόι της ζωής του κυττάρου, εφ' όσον επιτρέπουν στα κύτταρα συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων αποτρέποντας τη δημιουργία "αθάνατων" κυττάρων<sup>31</sup>.



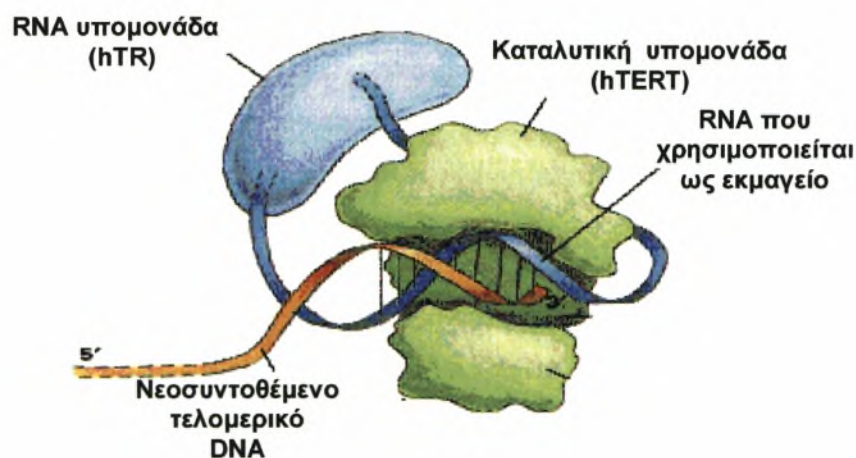
**Εικόνα 4:** Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ του μήκους των τελομερών και του αριθμού των κυτταρικών διαιρέσεων. Αναλυτικότερα παρατηρείται βράχυνση του μήκους των τελομερών όσο αυξάνονται οι κυτταρικές διαιρέσεις. Φαίνονται επίσης τα στάδια της κυτταρικής (αντιγραφικής) γήρανσης (replicative senescence) και της κρίσης (cellular crisis)<sup>37</sup>.

## 1.2. Τελομεράση

Το «πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής» επιλύει μια ειδική αντίστροφη μεταγραφάση, η τελομεράση, που για πρώτη φορά αναγνωρίστηκε στο ακραιόφιλο *Tetrahymena thermophila*. Η τελομεράση είναι μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, που συμμετέχει στη διεργασία της αντιγραφής του DNA και έχει την ικανότητα να προσθέτει επαναλήψεις νουκλεοτιδίων στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Η προσθήκη αυτών των επαναλήψεων έχει σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση και σταθεροποίηση του μήκους των τελομερών παρέχοντας στα κύτταρα τη δυνατότητα για απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων. Τα κύτταρα με δραστική τελομεράση διατηρούν το μήκος των τελομερών τους και επομένως την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους, ενώ με την απουσία της τελομεράσης τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και οδηγούνται στην κυτταρική γήρανση<sup>7-9,16,37-39</sup>.

### 1.2.1. Δομή και λειτουργία τελομεράσης

Η τελομεράση είναι ένα ριβονουκελοπρωτεϊνικό σύμπλοκο μεγέθους περίπου 1000kDa. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, μία RNA υπομονάδα που λειτουργεί σαν εκμαγείο για την σύνθεση συμπληρωματικού DNA (*human Telomerase RNA*, hTR ή *human Telomerase RNA Component*, hTERC)<sup>40-42</sup> και μία υπομονάδα με δράση αντίστροφης μεταγραφάσης (*human Telomerase Reverse Transcriptase*, hTERT)<sup>43,44</sup> (Εικόνα 5). Διαφορετικά γονίδια κωδικοποιούν για τις υπομονάδες hTR και hTERT. Η hTR με την hTERT αποτελούν τις κεντρικές υπομονάδες της τελομεράσης ενώ και άλλες πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση της δραστικότητας του ενζύμου<sup>45</sup> (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Δομή της τελομεράσης<sup>46</sup>.

### 1.2.1.1.RNA υπομονάδα τελομεράσης

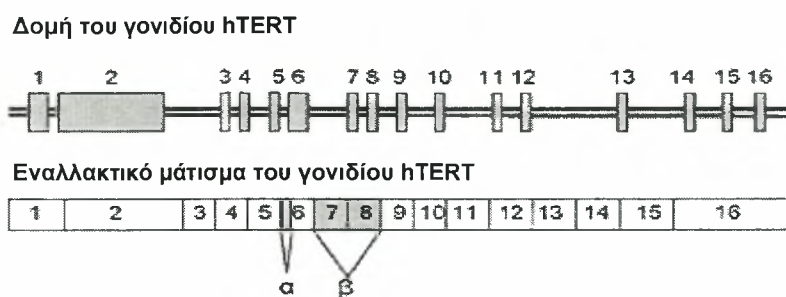
Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση της RNA υπομονάδας της τελομεράσης (hTR) εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 3 (3q26)<sup>47</sup>. Το hTR συστατικό μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση II και το ώριμο mRNA αποτελείται από 451 νουκλεοτίδια. Η hTR υπομονάδα που λειτουργεί ως εκμαγείο για την σύνθεση του DNA του τελομερούς βρίσκεται κοντά στο 5' άκρο του μορίου (45-55nt) και αποτελείται από 11 νουκλεοτίδια (5'-CUAACCCUAAC-3'), ενώ ιδιαίτερη σημασία έχει και η περιοχή που φέρει το όνομα H/ACA και βρίσκεται στο 3' άκρο<sup>8,39</sup>. Η hTR διαθέτει μία αρκετά σταθερή δευτεροταγή δομή που εμφανίζεται κατά μεγάλο ποσοστό διατηρημένη μεταξύ εξελικτικά απομακρυσμένων οργανισμών<sup>48</sup>. Επιπλέον, οι συντηρημένες περιοχές στο hTR μόριο αποτελούν θέσεις αναγνώρισης για πρωτεΐνες που προσδένονται σε αυτό (hTR binding proteins)<sup>9,40</sup>. Αντίθετα με την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης (hTERT), η υπομονάδα hTR παρουσιάζει σταθερή έκφραση σε όλους τους ιστούς, φυσιολογικούς και παθολογικούς, γεγονός που οδήγησε πολλούς επιστήμονες στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος της περιορίζεται στη λειτουργία της ως εκμαγείου για τη δράση της hTERT, και επομένως δεν μπορεί να αποτελέσει δείκτη της δράσης του ολοενζύμου της τελομεράσης<sup>49,50</sup>.

### 1.2.1.2 Καταλυτική υπομονάδα τελομεράσης (hTERT)

Το γονίδιο hTERT, που κωδικοποιεί τη σύνθεση της πρωτεϊνικής υπομονάδας της τελομεράσης εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 5 (5p15.33), περίπου 2Mb από το τελομερές και αποτελείται από 16 εξόνια και 15 ιντρόνια (Εικόνα 6). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 127 kDa που περιλαμβάνει 1132 αμινοξέα, αρκετά συντηρημένη και παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με άλλες ανάστροφες μεταγραφάσες<sup>43,52</sup>. Αποτελείται από ένα σχετικά μικρό καρβοξυτελικό τμήμα, μία κεντρική, ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή και ένα αρκετά μεγάλο αμινοτελικό άκρο<sup>53</sup>. Πιθανότατα, η κεντρική μαζί με την καρβοξυτελική περιοχή σχηματίζουν μια χαρακτηριστική δομή στις πολυμεράσες και στις ανάστροφες μεταγραφάσες που περιβάλλει το άκρο του χρωμοσώματος για να προσθέσει τις μονόκλωνες επαναλήψεις στα τελομερή<sup>54,55</sup>. Στο μεγάλο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης πρόσφατα αναγνωρίστηκε μία περιοχή, η N-GQ, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο κατά την πρόσδεση του ενζύμου στο 5' άκρο του DNA<sup>34</sup>. Έχει διαπιστωθεί τόσο σε *in vivo* όσο σε *in vitro* μελέτες ότι η περιοχή N-GQ θεωρείται απαραίτητη για τη δράση της hTERT<sup>56</sup>.



Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του mRNA που κωδικοποιεί την hTERT σχετίζεται άμεσα με τη δραστηριότητα της τελομεράσης<sup>57,58,59</sup>, ενώ το γονίδιο hTERT δεν εκφράζεται πάντοτε και σταθερά, σε αντίθεση με την hTR. Ο κύριος ρόλος της hTERT είναι η αύξηση και η διατήρηση του μήκους των τελομερών<sup>7,60</sup>, ενώ επίσης έχει προταθεί και η αντι-αποπτωτική της δράση στο κύτταρο<sup>61,62,63</sup>. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (*Epidermal Growth Factor Receptor*, *EGFR*) σε κύτταρα στα οποία έγινε εξωγενής επαγωγή της έκφρασης της hTERT<sup>63</sup>. Επιπλέον, η ίδια η hTERT αυξάνει τη σταθερότητα του γενετικού υλικού συμμετέχοντας, στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς<sup>64</sup>. Τέλος, πιθανολογείται ότι σε περιπτώσεις βραχέων τελομερών, προκαλείται «απελευθέρωση» του γονιδίου από την επίδραση του τελομερούς, που οδηγεί σε επαγωγή της δράσης της τελομεράσης<sup>65</sup>.



Εικόνα 6 : Οργάνωση του hTERT γονιδίου<sup>51</sup>.

### 1.2.1.3 Άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση

Έχει ήδη αναφερθεί πως για τον σχηματισμό και τη διατήρηση του τελομερικού βρόχου απαιτείται η παρουσία κάποιων πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση του μήκους του καθώς και στην προστασία και επιδιόρθωση του DNA<sup>45</sup>. Στο σύμπλοκο της τελομεράσης συμμετέχουν εκτός από τις TRF1 και TRF2, αγκυράση, TIN2, RAP1 και δυσκερίνη, που ήδη αναφέρθηκαν και άλλες πρωτεϊνικές υπομονάδες όπως η τελομερική πρωτεΐνη 1 (*Telomeric Protein 1* ή *TP1*), δύο υπομονάδες του ετεροδιμερούς Ku, οι πρωτεΐνες hTEP 1, Hsp90, p23, καθώς και ποικιλία άλλων πρωτεϊνών.

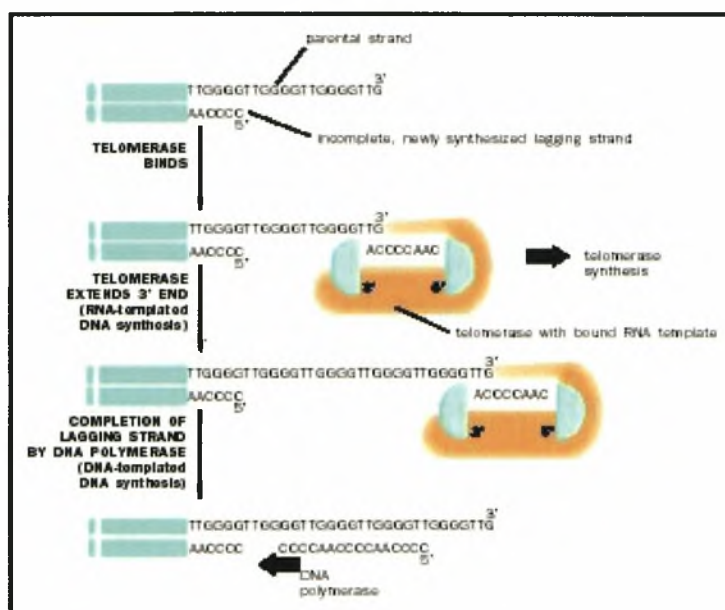
Αναλυτικότερα, η πρωτεΐνη TRF1 (*Telomeric Repeat binding Factor 1*) δρα ως καταστολέας της τελομεράσης, μειώνοντας το μήκος των τελομερών. Σε πρόσφατες μελέτες διαπιστώθηκε ότι στη λειτουργία της TRF1 διαμεσολαβούν δύο ακόμη πρωτεΐνες, η αγκυράση και η TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2). Η αγκυράση προσδένεται στην TRF1 μέσω πολυADP ριβοζυλίωσης, αφήνοντας το τελομερικό άκρο

ελεύθερο για την πρόσδεση της τελομεράσης. Η αυξημένη της δράση έχει ως συνέπεια την ανεξέλεγκτη αύξηση του μήκους των τελομερών στα κύτταρα που εκφράζουν τελομεράση<sup>66</sup>. Αντιθέτως, η TRF1 για να προσδεθεί στα τελομερικά άκρα και να παρεμποδίσει την δράση της τελομεράσης συνδέεται με την TIN2. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη TRF2 (*Telomeric Repeat binding Factor 2*) παρεμποδίζει τη σύντηξη των χρωμοσωμάτων διατηρώντας τα μονόκλινα άκρα. Συγκεκριμένα, η TRF2 αλληλεπιδρά με την RAP1 που θεωρείται αρνητικός ρυθμιστής του μήκους των τελομερών<sup>67</sup>. Ακόμη, η TRF2 έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιεί στα τελομερή παράγοντες που σχετίζονται με τον ανασυνδυασμό και την επιδιόρθωση όπως το σύμπλοκο Mre11/RAD50/NBS1<sup>68</sup>, τις ελικάσες RECQ WRN/BLM<sup>69</sup> και την ενδονουκλεάση ERCC1/XPF<sup>70</sup>. Τέλος, ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο που αποτελείται από τις πρωτεΐνες Ku70, Ku80 και την καταλυτική υπομονάδα της DNA-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (DNA-PKcs)<sup>71</sup>, σχετίζεται τόσο με την TRF1 όσο και την TRF2 και συμβάλλει με τη δράση της στην προστασία των τελομερών από τη σύντηξη των χρωμοσωμικών άκρων<sup>72</sup>.

Η TP1 δεσμεύει την ενεργή τελομεράση και πιθανότατα συμμετέχει στην προστασία των χρωμοσωμάτων και την επιμήκυνση των τελομερών, γι' αυτό και αναφέρεται από κάποιους επιστήμονες ως τρίτη υπομονάδα της τελομεράσης<sup>49</sup>. Επιπλέον το ετεροδιμερές Ku, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μη-ομόλογη ένωση των σπασμένων άκρων των χρωμοσωμάτων, φαίνεται ότι δεσμεύει την TERC. Η αλληλεπίδραση μεταξύ TERC και Ku, έχει προταθεί ότι προάγει την επιμήκυνση των σπασμένων άκρων των χρωμοσωμάτων<sup>73</sup>. Επίσης, η hTEP1 (human telomerase-associated protein 1) δρα ανάλογα με την hTERC και η έκφρασή της έχει παρατηρηθεί ότι δεν ταυτίζεται με την έκφραση της τελομεράσης. Τέλος, για τη σωστή συναρμολόγηση του συμπλόκου είναι απαραίτητες οι πρωτεΐνες Hsp90 και p23<sup>74</sup> καθώς και η αλληλεπίδραση με τη δυσκερίνη (dyskerin), μία πυρηνική πρωτεΐνη πρόσδεσης RNA και με άλλα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια-snoRNPs<sup>75,76</sup>.

### 1.2.2. Λειτουργία της τελομεράσης

Η αντιγραφή των τελομερών με το ένζυμο τελομεράση γίνεται με διαφορετικό μηχανισμό από αυτόν της αντιγραφής. Η δράση της τελομεράσης είναι σχετικά απλή: η hTERT προσθέτει εξανουκλεοτιδικές (5'-TTAGGG-3') επαναλήψεις στα άκρα των χρωμοσωμάτων χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το RNA της hTR σε μία έκταση που μπορεί να φτάσει τις 15-20 kb<sup>2,77</sup>. Αναλυτικότερα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7, δημιουργούνται ζεύγη βάσεων μεταξύ των συμπληρωματικών περιοχών της RNA υπομονάδας και των τελομερών (binding). Στη συνέχεια επιμηκύνεται το χρωμοσωμικό τμήμα χρησιμοποιώντας το "καλούπι" του RNA (polymerization) και τελικά το ένζυμο προχωρά (translocation) προς την 3' κατεύθυνση για να πραγματοποιήσει ξανά τη σύνδεση και τον πολυμερισμό. Μετά την επιμήκυνση της τελομερικής ακολουθίας στο μητρικό μόριο DNA, μπορεί να συνεχιστεί η αντιγραφή του DNA στο 3' άκρο της ασυνεχούς αλυσίδας του θυγατρικού μορίου, με τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για να προστεθούν περισσότερες επαναλήψεις τελομερών. Συμπερασματικά, η τελομεράση συνθέτει τον πλούσιο σε G κλώνο των τελομερών κατά την κατεύθυνση 5' προς 3'<sup>7,8,20</sup>.



Εικόνα 7: Απεικόνιση της δράσης της τελομεράσης<sup>78</sup>.

### 1.2.3. Έκφραση της τελομεράσης

Έκφραση της τελομεράσης παρατηρείται στα γαμετικά κύτταρα σε όλη τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης καθώς και σε φυσιολογικά κύτταρα που διαιρούνται συνεχώς<sup>79</sup>. Συγκεκριμένα, εκφράζεται σε ορισμένους τύπους αρχέγονων κυττάρων, όπως για παράδειγμα σε αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα, σε αναπαραγωγικά κύτταρα, σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, σε κύτταρα του μυελού των οστών, του ενδομητρίου κ.ά.<sup>80</sup>. Στα υπόλοιπα σωματικά κύτταρα που δεν έχουν μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού η τελομεράση εκφράζεται πολύ λίγο ή και καθόλου με αποτέλεσμα τη βράχυνση των τελομερών, την κυτταρική γήρανση και την απώλεια ικανότητας πολλαπλασιασμού<sup>81,82</sup>. Η τελομεράση έχει ανιχνευθεί στο 85-90% των περιπτώσεων καρκίνου, γεγονός που αποδεικνύει ότι η αύξηση της τελομεράσης είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση των κυτταρικών διαιρέσεων συνδέοντας την αναπόσπαστα με την αθανатоποίηση των κυττάρων και την καρκινογένεση<sup>9,39,58,83-87</sup>.

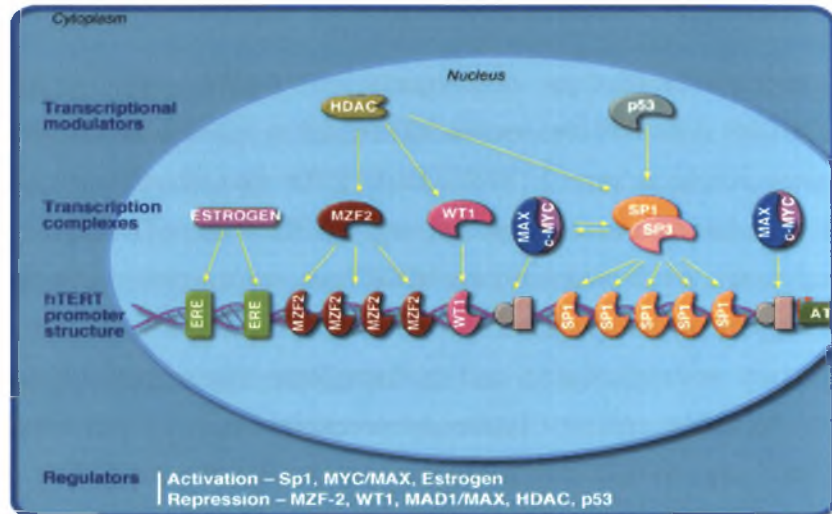
Αναλυτικότερα, η hTERT παρουσιάζει σταθερή έκφραση σε όλους τους ιστούς, εμβρυονικούς και σωματικούς, φυσιολογικούς και παθολογικούς<sup>49,88</sup>, γεγονός που οδήγησε πολλούς επιστήμονες στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος της περιορίζεται στη λειτουργία της ως εκμαγείο για τη δράση της hTERT και επομένως δεν μπορεί να αποτελέσει δείκτη της ενεργότητας της τελομεράσης<sup>50</sup>. Αντίθετα, η έκφραση της hTERT είναι στενά ελεγχόμενη και δεν παρατηρείται στα περισσότερα σωματικά κύτταρα<sup>58,89</sup>. Η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης παραλληλίζεται στενά με τις αλλαγές της έκφρασης της τελομεράσης, τόσο κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής διαφοροποίησης των κυττάρων<sup>90</sup> όσο και κατά το μετασχηματισμό των αντίστοιχων νεοπλαστικών. Επιπλέον, ο θεμελιώδης ρόλος της hTERT στην έκφραση της τελομεράσης αποδεικνύεται και από μελέτες που τονίζουν ότι η έκτοπη έκφραση της hTERT είναι καθοριστική για την ενεργοποίηση της τελομεράσης σε κυτταρικές σειρές αρνητικές στην έκφραση της τελομεράσης<sup>91</sup>.

#### 1.2.4. Ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης

Όπως προαναφέρθηκε οι κεντρικές υπομονάδες της τελομεράσης είναι η υπομονάδα RNA ή δομική υπομονάδα hTERC και η καταλυτική υπομονάδα με δράση αντίστροφης μεταγραφάσης hTERT. Η hTERC έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα ενώ η έκφραση της hTERT περιορίζεται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων, αναδεικνύοντας την hTERT ως την απαραίτητη υπομονάδα για την εκδήλωση της δράσης του ενζύμου.

Μελέτες που σχετίζονται με τη διερεύνηση των μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης της τελομεράσης έχουν επικεντρωθεί στην μελέτη της καταλυτικής υπομονάδας της (hTERT) και ειδικότερα στον υποκινητή της, στον οποίο πραγματοποιείται μεταγραφικός έλεγχος σε πολλαπλά επίπεδα. Η ανάλυση της αλληλουχίας και ο χαρακτηρισμός της ρυθμιστικής περιοχής του υποκινητή του γονιδίου της hTERT έχει διευκολύνει την προσπάθεια για την κατανόηση του τρόπου ρύθμισης της έκφρασης της hTERT και κατ'επέκταση της τελομεράσης, τονίζοντας την ύπαρξη ενός πολύπλοκου και πολυπαραγοντικού συστήματος ρύθμισης της<sup>92</sup>. Στον υποκινητή της hTERT εντοπίζονται πολυάριθμες περιοχές πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκφραση της τελομεράσης, ενώ η παρουσία υψηλού ποσοστού CpG νησιδίων αποκαλύπτει την επίδραση επιγενετικών μηχανισμών στη ρύθμιση της. Αναλυτικότερα στην περιοχή του υποκινητή έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει ένα CpG νησίδιο μήκους 4kb που εκτείνεται από τη θέση -1800 ζεύγη βάσεων πριν το σημείο έναρξης της μεταγραφής έως τη θέση +2200 ζεύγη βάσεων μετά το σημείο έναρξης της μετάφρασης. Σε αυτήν την περιοχή, το DNA έχει περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη (GC) περίπου 70% και αναλογία CG:GC 0,87<sup>93</sup>.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 8) απεικονίζονται οι διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούν και καταστέλλουν μέσω διαφόρων μονοπατιών την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT).



**Εικόνα 8:** Απεικόνιση μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιούν ή καταστέλουν την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT)<sup>95</sup>.

#### 1.2.4.1. Μεταγραφικοί παράγοντες

Στο σύνολο των μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν τη ρύθμιση, περιλαμβάνονται οι καταστολείς της hTERT, όπως η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, η Mad1, η πρωτεΐνη MZF-2 (myeloid-specific zinc finger protein 2) και οι πρωτεΐνες WT1 (προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου WT1 στον όγκο Wilms), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού TGF- $\beta$  και Menin και οι ενεργοποιητές της μεταγραφής της hTERT όπως οι στεροειδείς ορμόνες (οιστρογόνα και προγεστερόνη), οι πρωτεΐνες c-Myc και ο Sp1<sup>94</sup>.

Αναλυτικότερα, σχετικά με το ρόλο της p53 στον μεταγραφικό έλεγχο της hTERT έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της p53 και της τελομεράσης. Μελέτες σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου (SiHa) έδειξαν ότι η υπερέκφραση του p53 καταστέλλει άμεσα τη μεταγραφή της hTERT<sup>96</sup> ενώ η αποσιώπηση του p53 με μεθόδους siRNA ή με απαλοιφή του γονιδίου, δεν επαναφέρει την έκφραση της hTERT<sup>97</sup>, γεγονός που αναδεικνύει το p53 ένα μη αναστρέψιμο αναστολέα της hTERT.

Η Menin δεσμεύεται απευθείας στον υποκινητή της hTERT ενώ ο TGF- $\beta$  καταστέλλει τη μεταγραφή της μέσω του μονοπατιού TGF- $\beta$ /Smad. Επιπλέον, η παρουσία της πρωτεΐνης MZF-2 καταστέλλει τη μεταγραφή της hTERT, αλλά φαίνεται ότι η επίδραση της στη ρύθμιση της hTERT είναι αμελητέα<sup>98</sup>. Σε κύτταρα με όγκο Wilms

βρέθηκε ότι η πρόσδεση της πρωτεΐνης WT1 στον υποκινητή της hTERT καταστέλλει τη μεταγραφή της hTERT<sup>99</sup>.

Για τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 έχουν εντοπιστεί δύο κανονικές και τρεις εκφυλισμένες θέσεις πρόσδεσής του στον υποκινητή της hTERT, 100 βάσεις πριν το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Ο Sp1 συνεργάζεται με τον παράγοντα c-Myc με στόχο να προκαλέσουν τη μεταγραφή του γονιδίου, ενώ η σύνδεση του με την ομόλογή του πρωτεΐνη Sp3 είναι δυνατό να προκαλέσει την αποακετυλίωση των ιστονών και την καταστολή της έκφρασης της hTERT.

Ακόμη, στον υποκινητή της hTERT έχουν ανιχνευθεί δύο περιοχές πλούσιες σε CpG, γνωστές ως E-boxes που περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες Myc/Max/Mad. Ο Max μπορεί να ομοδιμεριστεί και να ετεροδιμεριστεί με τον Myc ή Max. Ανάλογα με ποιο διμερές σχηματίζεται, ασκείται και θετική ή αρνητική ρύθμιση. Όταν διμερίζεται με το Myc προκαλεί θετική ρύθμιση, ενώ όταν διμερίζεται με το Mad προκαλεί αρνητική ρύθμιση. Οι Myc και Mad ανταγωνίζονται για τη δημιουργία συμπλόκου με το Max<sup>100</sup>. Το πρωτο-ογκογονίδιο c-Myc εκφράζεται σε πολλαπλασιαζόμενα και πολλά νεοπλασμαστικά κύτταρα ενώ το Mad σε κύτταρα που διαφοροποιούνται και σε κύτταρα σε ηρεμία. Έχει ανιχνευθεί η παρουσία του ετεροδιμερούς Mad/Max στον υποκινητή της hTERT κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης προμυελοκυτταρικών λευχαιμικών κυττάρων HL60 που συνοδεύεται από αναστολή της hTERT. Αντίθετα το ετεροδιμερές Myc/Max έχει ανιχνευθεί κατά τον σχηματισμό εμβρυϊκών πνευμονικών ινοβλαστών, όπου απαιτείται η δράση της τελομεράσης<sup>100</sup>.

Επιπρόσθετα, οι στεροειδείς ορμόνες ενεργοποιούν την έκφραση του γονιδίου της hTERT. Στον υποκινητή της hTERT έχουν βρεθεί δύο θέσεις που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα των οιστρογόνων (ER) και οδηγούν στην ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της hTERT<sup>49,101</sup>. Σε πειράματα που έγιναν *in vitro*, βρέθηκε ότι ο ER δεσμεύεται ειδικά στον υποκινητή της hTERT και η απαλοιφή αυτού οδηγεί σε καταστολή της έκφρασής της<sup>49</sup>. Η άλλη θέση πρόσδεσης του ER εδράζει δίπλα στη θέση αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και αυτή η τοποθέτηση δίπλα-δίπλα επιτρέπει στον ER και τον Sp1 να δεσμεύονται συνεργατικά στο DNA<sup>102</sup>. Επιπλέον, σε πειράματα που αφορούσαν καρκίνο του μαστού, βρέθηκε ότι η προγεστερόνη ενεργοποιεί τη μεταγραφή της hTERT. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο αν ο υποδοχέας της προγεστερόνης είναι αυτός που ενεργοποιεί άμεσα τον υποκινητή της hTERT<sup>103</sup>. Αντίθετα, σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη παρατηρήθηκε ότι τα ανδρογόνα προκαλούν θετική ρύθμιση στον υποκινητή και ενισχύουν τη δράση της τελομεράσης. Φαίνεται ότι η επίδραση των ανδρογόνων καθυστερεί την εκδήλωση της έκφρασης της τελομεράσης, γεγονός που σημαίνει ότι

ασκούν έμμεση δράση<sup>104,105</sup>. Συνεπώς, παρόλο που γενικά οι στεροειδείς ορμόνες επάγουν την έκφραση της hTERT σε διάφορους ορμονο-εξαρτώμενους όγκους, ο πυρηνικός υποδοχέας της βιταμίνης D, ρυθμίζει αρνητικά τον υποκινητή της hTERT<sup>106,107</sup>.

Οι πρωτεΐνες ETS είναι μία οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων με χαρακτηριστικές διατηρημένες περιοχές πρόσδεσης στο DNA. Οι κυριότερες της οικογένειας είναι οι Ets1 και Ets2, οι οποίες ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση μέσω του μονοπατιού των MAP κινασών μετά την πρόσδεση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF) στον υποδοχέα του<sup>108,109</sup>. Συνεπώς, η πρόσδεση του EGF ενισχύει τη μεταγραφή της hTERT και θεωρείται ότι οι Ets1 και Ets2 διαμεσολαβούν στον έλεγχο της hTERT από τον EGF με το να προσδένονται στα E-boxes<sup>110</sup>.

Επιπρόσθετες μελέτες έχουν δείξει ότι πολλές ιικές πρωτεΐνες είναι δυνατό να προκαλέσουν αναστολή ή ενεργοποίηση της έκφρασης της τελομεράσης. Το ιικό DNA ενώνεται με το γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή σε διάφορες θέσεις όπου στη συνέχεια, προαγωγείς του ιού μεταγράφουν το γεινιάζον γονίδιο του ξενιστή. Αυτού του είδους η ενεργοποίηση της hTERT έχει περιγραφεί στην περίπτωση του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV), ο οποίος είναι σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος και στην περίπτωση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) που αποτελεί την κυριότερη αιτία καρκίνου τραχήλου της μήτρας και θα αναλυθεί παρακάτω<sup>111-114</sup>.



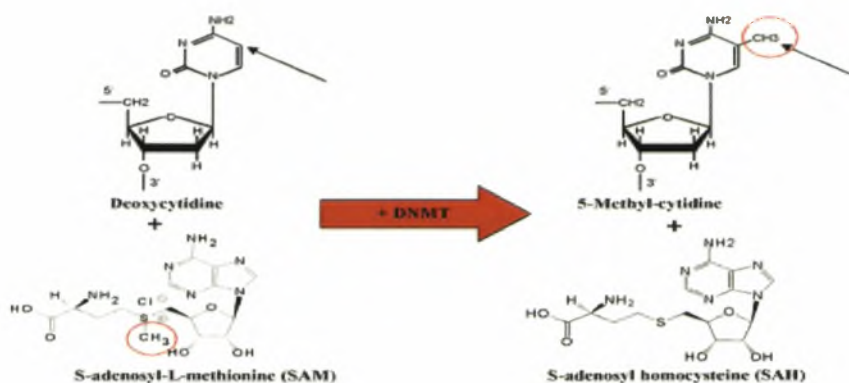
#### 1.2.4.2 Επιγενετικοί μηχανισμοί ρύθμισης της hTERT

Επιγενετικές ονομάζονται οι αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης των γονιδίων οι οποίες επιτυγχάνονται με μηχανισμούς που δεν αλλάζουν την αρχική αλληλουχία του DNA. Αυτοί οι μηχανισμοί αλλάζουν τη δεκτικότητα του DNA στους μεταγραφικούς παράγοντες μέσα από διαδικασίες που περιλαμβάνουν α) τη μεθυλίωση των κυτοσινών σε CpG περιοχές του DNA<sup>115-118</sup>, β) τις αλλαγές στο αμινοτελικό άκρο των ιστονών στα νουκλεοσώματα, που συνήθως είναι γνωστές ως 'κώδικας ιστόνης'<sup>119,120</sup>, γ) την αναδιαμόρφωση του συμπλόκου SW1/SNF μέσω ενός αδενοτριφωσφορικά εξαρτώμενου τρόπου<sup>121</sup> και δ) τη μεταγραφική ή μεταμεταγραφική «σιωπηλή» ρύθμιση των γονιδίων μέσω μικρών ρυθμιστικών μη νοηματικών μορίων RNA (micro RNAs)<sup>122</sup>.

##### 1.2.4.2.1. Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA προέκυψε σχετικά αργά κατά την εξελικτική διαδικασία και ενέχεται στην σταθερή και μακράς διάρκειας απενεργοποίηση της έκφρασης των περισσότερων γονιδίων<sup>123</sup>. Η μεθυλίωση πραγματοποιείται σε περιοχές του DNA πλούσιες σε βάσεις κυτοσίνης και γουανίνης που αποκαλούνται CpG νησίδια. Τα CpG νησίδια εντοπίζονται κυρίως σε περιοχές υποκινητών αλλά παρατηρούνται και διάσπαρτα στο γονιδίωμα και έχουν μήκος που κυμαίνεται από 0.5-5 Kbp<sup>124</sup>. Υπολογίζεται ότι το 60% των ανθρώπινων γονιδίων περιέχουν τουλάχιστον ένα CpG νησίδιο<sup>125</sup>.

Κατά τη διάρκεια της μεθυλίωσης πραγματοποιείται μια βιοχημική μετατροπή κατά την οποία προστίθεται μια μεθυλομάδα (s-αδενοσυλ-μεθειονίνη) στο 5' άνθρακα της κυτοσίνης που βρίσκεται σε αλληλουχίες CpG<sup>126,127</sup>. (Εικόνα 9). Οι CpG περιοχές του DNA μεθυλιώνονται από ένα από τα ένζυμα της οικογένειας των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMT1, DNMT3A και DNMT3B). Η απαλοιφή αυτών των ενζύμων σε διαγονιδιακά (knock-out) ποντίκια, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική ανάπτυξη του οργανισμού<sup>128,129</sup>.



**Εικόνα 9:** Βιοχημική μετατροπή του DNA κατά τη μεθυλίωσή του από τις μεθυλοτρανσφεράσες.<sup>130</sup>

Πρότυπα μεθυλίωσης DNA δημιουργούνται νωρίς κατά την εμβρυογένεση και συγκεκριμένα έχουν περιγραφεί δύο κύκλοι μεθυλίωσης DNA. Ο πρώτος συμβαίνει κατά την ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων, όπου οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες του πατρικού DNA αντιγράφονται στο γονιδίωμα των γαμετών και έτσι κληρονομείται η επιγενετική πληροφορία. Ο δεύτερος κύκλος συμβαίνει κατά τη γονιμοποίηση, όπου κάθε γαμέτης έχει διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης και καταλήγει να μεταβιβάζεται στο ζυγωτό ένα μωσαϊκό από επιγενετικές τροποποιήσεις. Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι πρέπει να γίνουν κάποιες τροποποιήσεις στο σπέρμα προκειμένου να επιτευχθεί η γονιμοποίηση. Φαίνεται δηλαδή ότι η μεθυλίωση του DNA συμβάλλει τόσο στη διατήρηση όσο και στη διαφοροποίηση<sup>131</sup>.

Πιθανότατα, υπάρχουν πολύ μηχανισμοί που συμμετέχουν στην απορρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων μέσω της μεθυλίωσης. Παρόλο που η μεθυλίωση του DNA αλληλεπιδρά άμεσα με την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων, οι μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs) έχει παρατηρηθεί ότι μεταβάλλουν την αναδίπλωση της μεταγραφικά ανενεργής χρωματίνης με άλλους μηχανισμούς εκτός της μεθυλίωσης. Ειδικότερα, αλληλεπιδρούν άμεσα με τις αποακετυλάσες των ιστονών κυρίως στους υποκινητές των γονιδίων, ενώ επιπρόσθετα μπορούν να προσδεθούν με άλλες πρωτεΐνες και να προκαλέσουν την καταστολή της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου. Πρέπει να διευκρινιστεί ότι μόνο η μεθυλίωση μέσα ή γύρω από τον υποκινητή ενός γονιδίου και όχι μέσα στο ίδιο το γονίδιο ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου. Επίσης, είναι δυνατό η μεθυλίωση του DNA από μόνη της να μην είναι ικανή να προκαλέσει την καταστολή της έκφρασης ενός γονιδίου και μόνο με την επίδραση πρωτεϊνών που διαμορφώνουν τη χρωματίνη γύρω από τις μεθυλιωμένες περιοχές να

απορρυθμίζεται η έκφραση των γονιδίων. Τα μέλη της οικογένειας των μεθυλ-CpG προσδενόμενων πρωτεϊνών, τα οποία προσδένονται στο μεθυλιωμένο DNA μπορούν να προσδεθούν και με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, αναστέλλοντας πάλι την έκφραση των γονιδίων<sup>115,116</sup>.

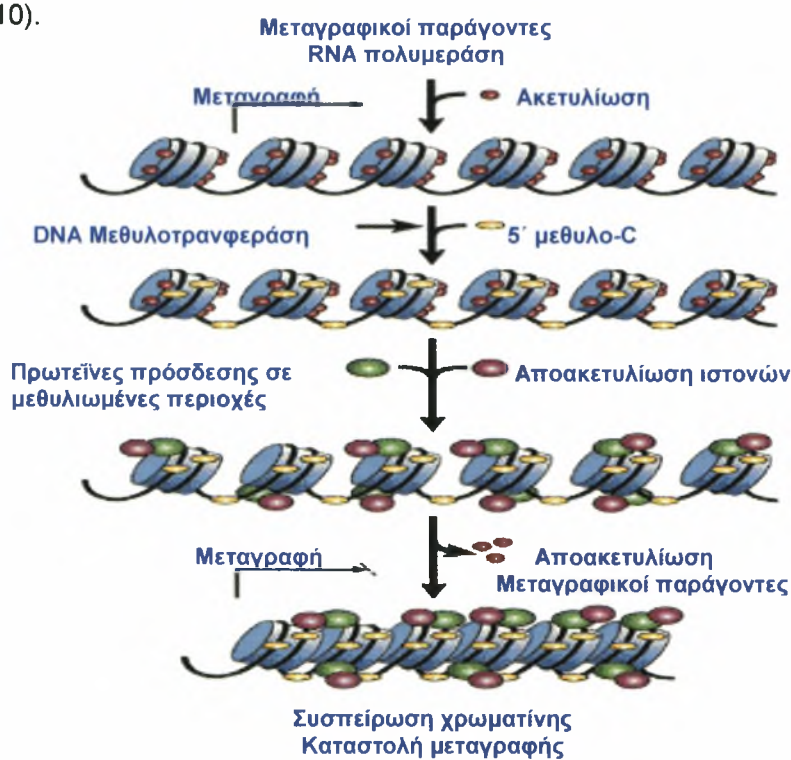
Η μεθυλίωση του DNA έχει συσχετιστεί στενά με την ανάπτυξη του καρκίνου. Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται απώλεια της ολικής μεθυλίωσης και επιλεκτική υπερμεθυλίωση των CpG νησιδίων στους υποκινητές συγκεκριμένων γονιδίων<sup>117,118</sup>. Αναλυτικότερα, η υπερμεθυλίωση όγκο-κατασταστατικών γονιδίων οδηγεί σε ογκογένεση, ενώ η υπομεθυλίωση σε οποιοδήποτε σημείο του γονιδιώματος επηρεάζει την έκφραση ογκογονιδίων και την σταθερότητα του γονιδιώματος. Σε ανθρώπινους όγκους έχουν ανιχνευθεί και οι τρεις μεθυλοτρανσφεράσες σε μέτρια επίπεδα<sup>132-135</sup>. Ουσιαστικά η υπερμεθυλίωση καταστέλλει τα όγκο-κατασταστατικά γονίδια, ενώ η υπομεθυλίωση ενισχύει την έκφραση των ογκογονιδίων<sup>136,137</sup>.

*1.2.4.2.2. Επιγενετική απορρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου μέσω μετατροπών στο οκταμερές των πυρηνικών ιστονών στα νουκλεοσώματα.*

Στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων, τα νουκλεοσώματα είναι οι ρυθμιστικές επαναλαμβανόμενες μονάδες χρωματίνης στις οποίες 146 ζεύγη βάσεων είναι σφικτά τυλιγμένα γύρω από ένα οκταμερές ιστονών. Κάθε οκταμερές αποτελείται από 2 μόρια από κάθε πυρηνική ιστόνη H2A, H2B, H3 και H4. Τα νουκλεοσώματα συνδέονται μεταξύ τους με μια μικρή αλληλουχία DNA 80 με 100 ζεύγη βάσεων, η οποία σταθεροποιείται με την πρόσδεση μιας άλλης ιστόνης, της H1. Η ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων απαιτεί μετατροπές στη δομή της χρωματίνης, μετατρέποντας το DNA από τη συσπειρωμένη και ανενεργή μορφή σε «καλούπι» για πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων. Υπάρχουν τρεις μηχανισμοί με τους οποίους η δομή της χρωματίνης μεταβάλλεται και γίνεται δεκτική σε ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων. Ο πρώτος αφορά στη μεταβολή της δομής των νουκλεοσωμάτων μέσω της επίδρασης συμπλόκων που έχουν δράση ATPάσης και ενεργοποιούν τα νουκλεοσώματα προκαλώντας μικρή μετακίνηση αυτών πάνω στο DNA. Ο δεύτερος αφορά στην ομοιοπολική μετατροπή των πυρηνικών ιστονών, ενώ ο τρίτος αναφέρεται στην αντικατάσταση των πυρηνικών ιστονών με άλλες ιστόνες που έχουν παρόμοια δομή με τις πυρηνικές (variant histones) π.χ H2AZ, H2AX και H3.3.<sup>119</sup>.

Οι πυρηνικές ιστόνες έχουν αμινοτελικά άκρα πλούσια σε λυσίνη και λόγω του ότι είναι θετικά φορτισμένα προεξέχουν από το νουκλεόσωμα. Μεταμεταγραφικές

ομοιοπολικές μετατροπές σε συγκεκριμένα αμινοξέα στα αμινοτελικά άκρα πραγματοποιούνται από ποικιλία ενζυμικών οικογενειών που αποτελούν τους βασικούς καθοριστές της δομής της χρωματίνης και της έκφρασης των γονιδίων. Οι παραπάνω μετατροπές περιλαμβάνουν την ακετυλίωση/αποακετυλίωση των λυσινών και θρεονίνων, την ουβικουϊτιλίωση των λυσινών και την ADP-ριβοζυλίωση των γλουταμικών οξέων. Οι περισσότερες μετατροπές στις ιστόνες είναι αναστρέψιμες και ο βαθμός της μετατροπής συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης. Οι μετατροπές πραγματοποιούνται αυστηρά σε περιοχές που μεταγράφονται, υποδεικνύοντας την σχέση της ρύθμισης με την ενεργότητα της πολυμεράσης. Τα συνδυαστικά μοτίβα των μετατροπών των ιστονών τονίζουν την κατάσταση της χρωματίνης και είναι γνωστά ως «κώδικας ιστονών» («histone code»). Αυτός ρυθμίζει την πρόσδεση στο DNA των μεταγραφικών-ρυθμιστικών συμπλόκων και ελέγχει επιγενετικά τη γονιδιακή έκφραση και την κληρονομικότητα των γονιδίων. Παρόλο που η ακετυλίωση των ιστονών σχετίζεται γενικά με τη μεταγραφική ενεργότητα, η μεθυλίωση τους, αντίθετα, μπορεί να συσχετιστεί τόσο με την ενεργοποίηση όσο και με την καταστολή της έκφρασης γονιδίων<sup>120</sup> (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Συνεργασία ακετυλίωσης και μεθυλίωσης στον έλεγχο της έκφρασης ενός γονιδίου. Η ακετυλίωση και η υπομεθυλίωση της χρωματίνης ενεργοποιούν τη μεταγραφή του γονιδίου, ενώ αντίθετα, η αποακετυλίωση και μεθυλίωσή της προάγουν την καταστολή της έκφρασής του<sup>138</sup>.

Οι ακετυλοτρανσφεράσες (Histone acetyl transferases-HATs) και αποακετυλοτρανσφεράσες (HDACs) των ιστονών αποτελούν δύο ομάδες ενζύμων που καταλύουν την ακετυλίωση και την αποακετυλίωση των ιστονών αντίστοιχα, στα συντηρημένα αμινοτελικά άκρα των λυσινών των πυρηνικών ιστονών. Η κατάσταση της ακετυλίωσης της χρωματίνης καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ των ακετυλασών και αποακετυλασών. Γενικά, ενώ η αύξηση της ακετυλίωσης σχετίζεται με αποσυσπειρωμένη και ενεργή χρωματίνη καθώς και αυξημένη μεταγραφικότητα, η αποακετυλίωση των ιστονών συνδέεται με συσπειρωμένη μορφή χρωματίνης και με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Οι ακετυλοτρανσφεράσες διαιρούνται σε τρεις υποοικογένειες, ανάλογα με την παρουσία των συντηρημένων μοτίβων, όπως οι GNAT, MYST και p300/CBP. Παρομοίως, οι αποακετυλάσες διακρίνονται σε τρεις τάξεις: τάξη I, τάξη II και τάξη III. Επιπρόσθετα, οι ακετυλάσες και αποακετυλάσες επηρεάζουν την κατάσταση ακετυλίωσης των λυσινών που βρίσκονται καθώς και στους μεταγραφικούς παράγοντες (p53, E2F1, GATA1, RelA, YY1, Mad/Max, TFII E και TFII F, υποδοχείς ορμονών) με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την πρόσδεση με το DNA. Τέλος, οι αποακετυλάσες αποακετυλιώνουν εκτός από τις ιστόνες και τους μεταγραφικούς παράγοντες και πρωτεΐνες όπως η ιμπορτίνη- $\alpha 7$ , η  $\alpha$ -τουμπουλίνη, η  $\beta$ -κατενίνη, η hsp90 τονίζοντας ότι οι αποακετυλάσες μεταβάλλουν και τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών<sup>120</sup>.

#### 1.2.4.2.3. *Επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου μέσω αναδιαμόρφωσης του συμπλόκου SWI/SNF.*

Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μέσω ενός ATP εξαρτώμενου μονοπατιού διεξάγεται μέσω των μελών μιας οικογένειας πρωτεϊνών που περιέχουν ένα καταλυτικό κέντρο με δράση ATPασης. Υπάρχουν τρεις οικογένειες που αναδιαμορφώνουν τη χρωματίνη, οι οποίες χρησιμοποιούν την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP για να μεταβάλουν την τοπολογία της χρωματίνης με τη διακοπή της αλληλεπίδρασης του DNA με τις πυρηνικές ιστόνες. Αυτό διευκολύνει το ξετύλιγμα (sliding) των νουκλεοσωμάτων και αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης του DNA με μεταγραφικούς παράγοντες. Οι τρεις οικογένειες είναι οι SWI2/SNF2, ISW1-ATPάσες και Mi2/CHD. Το σύμπλοκο SWI2/SNF2 αλληλεπιδρά με άλλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που σχετίζονται με την ογκογένεση. Πρωτεΐνες με παρόμοια δομή με αυτή των ιστονών πιθανότατα να παίζουν σημαντικό ρόλο σε επιγενετικούς ογκοκατασταλτικούς μηχανισμούς. Ενώ οι κανονικές ιστόνες επανατοποθετούνται μόνο στη φάση S, οι παρόμοιες αυτών επανατοποθετούνται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η

μέλετη του ρόλου των παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και των ομόλογων πρωτεϊνών με τις ιστόνες στην κυτταρική διαφοροποίηση και κατά συνέπεια στη θεραπεία του καρκίνου<sup>121</sup>.

1.2.4.2.4. *Επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου μέσω μικρών ρυθμιστικών συμπληρωματικών μη νοηματικών μορίων RNA.*

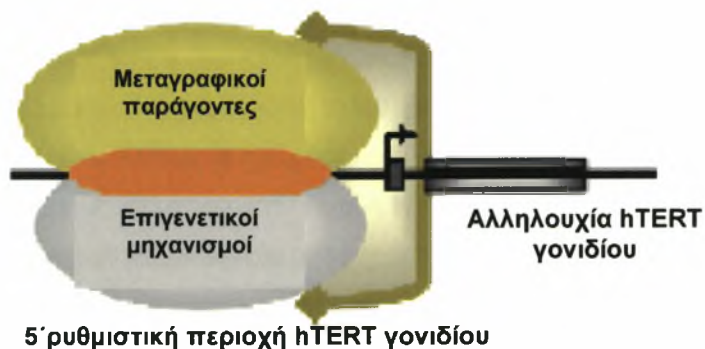
Έχει παρατηρηθεί ότι ο ρόλος των μη νοηματικών μορίων RNA (micro RNAs) στη δομική δυναμική της χρωματίνης και στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Σχετίζονται με την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X, με την πρόσδεση της HP1 στη χρωματίνη και πρόσφατα με την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της α-σφαιρίνης. Ένας μεγάλος αριθμός από μικρά ρυθμιστικά microRNAs έχουν ταυτοποιηθεί, τα οποία είναι πιθανό να παίζουν ρόλο στη βιολογία ενός μετασχηματισμένου κυττάρου. Συχνά εντοπίζονται σε γνωστές εύθραστες περιοχές και σημεία που σχετίζονται με τον καρκίνο. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η καταστολή των γονιδίων εξαρτάται από τα microRNAs, με μια διαδικασία κατά την οποία το δίκλωνο RNA σπάζει σε μικρά τμήματα 23 νουκλεοτιδίων (small interfering RNA). Τα τελευταία μπορούν να προκαλέσουν αποικοδόμηση των συμπληρωματικών RNA καθώς και την έναρξη της καταστολής των γονιδίων μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τις ιστόνες<sup>122</sup>.

### 1.2.5 Μεθυλίωση του DNA του υποκινητή της hTERT

Στον υποκινητή του γονιδίου της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης έχει παρατηρηθεί ένα νησίδιο CpG, με περιεκτικότητα σε GC πάνω από 70%, τονίζοντας ένα πιθανό ρόλο της μεθυλίωσης στη ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης. Σε αντίθεση με το γενικότερο πρότυπο στο οποίο η μεθυλίωση του DNA σε περιοχές πλούσιες σε GC αποτελεί τον πιο γνωστό μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης και οδηγεί σε απενεργοποίηση γονιδίων. Στην περίπτωση της ρύθμισης της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης, ο τρόπος με τον οποίο η μεθυλίωση επηρεάζει την έκφραση του hTERT δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί<sup>93</sup>.

Ορισμένες έρευνες έχουν δείξει ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή της hTERT οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης<sup>139,140</sup>, ενώ άλλες μελέτες σε μετασχηματισμένα και νεοπλαστικά κύτταρα δείχνουν ότι η hTERT εκφράζεται παρόλο που ο υποκινητής της είναι υπερμεθυλιωμένος<sup>141</sup>. Ακόμη, υπάρχουν μελέτες που έδειξαν ότι σε καρκινικά κύτταρα, τόσο από βιοψίες καρκινικών ιστών (οισοφάγου, τραχήλου της μήτρας) όσο και από καρκινικές κυτταρικές σειρές (μαστού, πνεύμονα, παχέος εντέρου, τραχήλου μήτρας), η υπερμεθυλίωση του υποκινητή της hTERT υπομονάδας αυξάνει και την έκφρασή της<sup>141-146</sup>. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι σε hTERT-αρνητικά κύτταρα, δηλαδή αδιαφοροποίητα και μη μετασχηματισμένα κύτταρα, ο υποκινητής της hTERT είναι υπομεθυλιωμένος. Αντιθέτως, σε διαφοροποιημένα και σε κύτταρα σε ηρεμία, ο υποκινητής βρέθηκε μεθυλιωμένος και δεν παρατηρήθηκε έκφραση της hTERT. Από όλα τα παραπάνω πιθανολογείται ότι η έκφραση της hTERT δεν σχετίζεται με τον βαθμό μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου και ότι ίσως αυτά τα κύτταρα αναπτύσσουν ένα μηχανισμό καταστολής της hTERT ανεξάρτητα από την κατάσταση του υποκινητή<sup>144,147</sup>. Γνωρίζοντας λοιπόν ότι γενικά η μεθυλίωση του DNA καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων, φαίνεται να υπάρχει μία αντιφατική σχέση μεταξύ της έκφρασης της hTERT και της μεθυλίωσης του υποκινητή της. Η αντίφαση αυτή μπορεί να οφείλεται στο μεγάλο πλήθος μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου και ρυθμίζουν τη μεταγραφή του, δεδομένου ότι η ισορροπία μεταξύ της ποικιλίας των μεταγραφικών παραγόντων θα καθορίσει την έκφραση της hTERT. Φαίνεται λοιπόν, ότι η μεθυλίωση σε μία συγκεκριμένη θέση εξαρτάται από το αν κάποιος μεταγραφικός παράγοντας προσελκύει ή απωθεί τις μεθυλοτρανσφεράσες στον υποκινητή της hTERT, ενώ η επίδραση της μεθυλίωσης στην έκφραση της hTERT

εξαρτάται τόσο από τον κυτταρικό τύπο όσο και από την παράλληλη παρουσία και δράση μεταγραφικών παραγόντων ή άλλων επιγενετικών μηχανισμών (εικόνα 11)<sup>141</sup>.



**Εικόνα 11.** Μοντέλο που απεικονίζει τη συνεργική ρύθμιση του υποκινητή της hTERT, υπό την επίδραση τόσο των μεταγραφικών παραγόντων, όσο και επιγενετικών γεγονότων. Η συμβολή του καθενός στην τελική απόφαση για έκφραση ή αναστολή του γονιδίου, εξαρτάται από το ίδιο το κύτταρο<sup>148</sup>.



### 1.3. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί μετά τον καρκίνο του μαστού, το δεύτερο πιο συχνό καρκίνο στις γυναίκες παγκοσμίως με περίπου 450.000 νεοδιαγνωσθέντα περιστατικά κάθε χρόνο και 233.000 θανάτους παγκοσμίως<sup>149</sup>. Τα περιστατικά που αναφέρονται είναι 10 ανά 100.000 άτομα σε βιομηχανικά κράτη και 40 ανά 100.000 άτομα στις αναπτυσσόμενες χώρες<sup>150</sup>

Η διάγνωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, καθώς και των προκαρκινικών διηθητικών αλλοιώσεων, οι οποίες ονομάζονται δυσπλασίες του τραχήλου ή ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες (*Cervical Intraepithelial Neoplasia-CIN*) πραγματοποιείται με τη χρήση της κολπικής και τραχηλικής κυτταρολογίας. Η κυτταρολογική εξέταση βασίζεται στη φυσιολογική αποφολίωση κυττάρων από τα επιθήλια διαφόρων ιστών και παγκοσμίως είναι γνωστή ως τεστ Παπανικολάου. Η κατάταξη των κυτταρολογικών επιχρισμάτων γίνεται κυρίως με την ταξινόμηση Bethesda σύμφωνα με την οποία η δυσπλασία του τραχήλου διακρίνεται σε άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας (*Atypical Squamous epithelial Cells of Undetermined Significance-ASCUS*), σε χαμηλού βαθμού δυσπλασία (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions-LGSIL*) και σε υψηλού βαθμού δυσπλασία (*High Grade Squamous Intraepithelial Lesions -HGSIL*)<sup>151</sup>. Η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας διακρίνεται επίσης αναλόγως με τη βαρύτητα της σε τρεις μορφές, την ελαφρά CIN 1, τη μέτρια CIN 2 και τη βαριά CIN 3. Η τελευταία αντιστοιχεί σε καρκίνο *in situ*. Η διάγνωση αυτών των μορφών γίνεται με την ιστολογική εξέταση του παρασκευάσματος κατόπιν βιοψίας του τραχήλου, μετά από παθολογικό τεστ Παπ. Επιπλέον, η κυτταρολογική εξέταση έχει οδηγήσει στη μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας κυρίως σε ανεπτυγμένες χώρες. Ωστόσο, παρόλο που το ψευδώς θετικό αποτέλεσμα είναι πολύ μικρό (1%) και η ευαισθησία της μεθόδου αγγίζει το 84.6%, το ποσοστό των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, δηλαδή η ειδικότητα της είναι μόνο 37%<sup>152</sup>.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (human papillomavirus-HPV), που αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα κινδύνου, δεδομένου ότι το DNA του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων ανιχνεύεται στο 90-100% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου. Πάνω από 35 τύποι του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων προσβάλλουν το αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας, ενώ πάνω από 20 τύποι έχουν συσχετιστεί με καρκινογένεση. Ο κύριος τρόπος μετάδοσης του ιού είναι μέσω της σεξουαλικής επαφής.

Έχει παρατηρηθεί ότι ο ιός ανιχνεύεται στο 20 με 40% των σεξουαλικά ενεργών νέων γυναικών. Η επικράτηση του ιού μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας, γεγονός που δηλώνει ότι στις περισσότερες γυναίκες η μόλυνση περιορίζεται από μόνη της χωρίς να προκαλεί σοβαρά προβλήματα. Σε μακροχρόνιες μελέτες παρατηρήθηκε ότι οι πιο «οξείες» μολύνσεις διαρκούν περίπου 8 με 10 μήνες. Μόνο κάποιες από αυτές θα επιμείνουν και θα προκαλέσουν δυσπλασία στα τραχηλικά επιθηλιακά κύτταρα<sup>153</sup>.

Ειδικότερα, οι γυναίκες που έχουν προσβληθεί από στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού HPV (HR-HPVs) έχουν τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν υψηλού βαθμού δυσπλασία σε σύγκριση με τις μη προσβεβλημένες από τον ιό γυναίκες. Οι μολύνσεις από στελέχη υψηλού κινδύνου είναι συχνές, κυρίως σε νεαρές γυναίκες μεταξύ 20-35 ετών, όπου πάνω από 30% παρατηρήθηκε να είναι μολυσμένες με HR-HPVs. Ο εντοπισμός νουκλεϊκών οξέων των στελεχών υψηλού κινδύνου ανιχνεύεται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις αλλοιώσεων υψηλού βαθμού και καρκίνου του τραχήλου της μήτρας καθώς και σε αντίστοιχες κυτταρικές σειρές. Στις περισσότερες μελέτες ο τύπος του ιού που εμφανίζεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα είναι ο τύπος 16 του ιού (HPV-16), ο οποίος εμφανίζεται σε φυσιολογικές καθώς και σε γυναίκες με CIN και καρκίνο τραχήλου. Η συνεχής έκφραση των γονιδίων E6 και E7 του ιού θεωρείται απαραίτητη στη διατήρηση της νεοπλαστικής ανάπτυξης των καρκινικών τραχηλικών κυττάρων. Επιπρόσθετες μελέτες των μοριακών μηχανισμών δράσης των γονιδίων τονίζουν την παρουσία ενός πολύπλοκου μοντέλου (pattern) αλληλεπιδράσεων με προϊόντα των γονιδίων του κυττάρου που επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο (fine tuning of the cell cycle), τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων και τη χρωμοσωμική ομοιόσταση και σταθερότητα<sup>154</sup>.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν τον παθογόνο ρόλο του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων και ειδικότερα των στελεχών υψηλού κινδύνου στην καρκινογένεση.

### 1.3.1. Μοριακή παθογένεια του καρκίνου του τραχήλου

Πειραματικά δεδομένα και επιδημιολογικές μελέτες τονίζουν αδιαμφισβήτητα την σχέση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (human papillomavirus) με την εκδήλωση του καρκίνου του τραχήλου από τα πρωταρχικά στάδια της μόλυνσης<sup>154</sup>.

Πάνω από 200 τύποι του ιού έχουν ταυτοποιηθεί με βάση την αλληλουχία τους και έχουν χωριστεί σε ομάδες σύμφωνα με την ογκογενετική τους ικανότητα. Η ταξινομική κατάσταση των τύπων των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων, των υποτύπων και των στελεχών βασίζεται στη διαφορετική αλληλουχία των γονιδίων L1<sup>155</sup>. Οι πρώτοι τύποι στους οποίους ολοκληρώθηκε η ανάλυση του γονιδιώματος τους ήταν ο τύπος 1 του ιού των θηλωμάτων στα βοοειδή (bovine papillomavirus type 1 -BPV-1) και ο τύπος 1α του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (human papillomavirus type 1a -HPV-1a)<sup>156,157</sup>. Για τις προηγούμενες δύο δεκαετίες ο ιός BPV-1 αποτελούσε τον πρωτότυπο ιό πάνω στον οποίο γινόταν οι μελέτες της μοριακής βιολογίας των Παπιλλοϊών (ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων-papillomaviruses).

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων πολλαπλασιάζονται και ενσωματώνονται στον πυρήνα των κερατινοκυττάρων της βασικής στοιβάδας του πλακώδους επιθηλίου που προσβάλλουν. Για αυτό άλλωστε η έκφραση του ιϊκού γονιδιώματος και ο πολλαπλασιασμός του εξαρτώνται στενά από τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων<sup>155</sup>.

Παρόλο που οι μολύνσεις με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων είναι καλοήθειες στα τραχηλικά κύτταρα, κάποιες φορές η μόλυνση μπορεί να προκαλέσει και κακοήθειες. Συγκεκριμένοι τύποι των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων, όπως οι HPV-16 και HPV-18 έχουν συσχετιστεί με πάνω από το 95% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και έχουν εντοπιστεί σε πάνω από το 50% αντίστοιχα των περιπτώσεων επιθηλιακού καρκινώματος (squamous cell carcinoma)<sup>153</sup>.

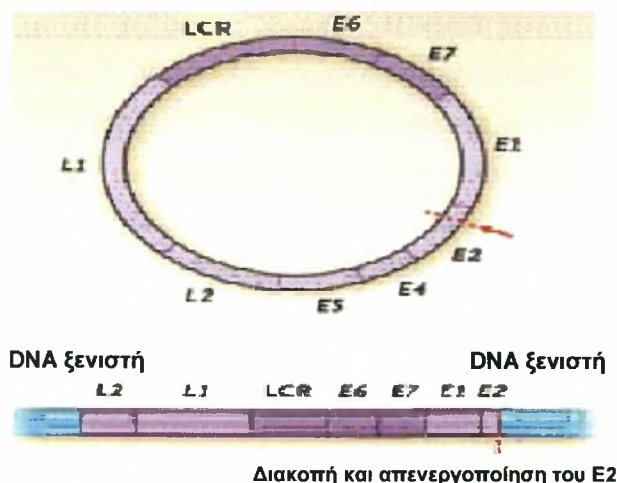
Αναλυτικότερα οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων ανάλογα με την ογκογενετική τους ικανότητα διακρίνονται σε: στελέχη υψηλού κινδύνου (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 και 82), πιθανά στελέχη υψηλού κινδύνου (26, 53 και 66) και στελέχη χαμηλού κινδύνου (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP141 και CP6308)<sup>158</sup>.

Αν και έρευνες έχουν δείξει ότι τα στελέχη υψηλού κινδύνου μπορούν να προκαλέσουν την κακοήγη εξαλλαγή των τραχηλικών κυττάρων, παρόλα αυτά μόνο ένα μικρό ποσοστό των γυναικών που έχουν προσβληθεί από τον ιό θα αναπτύξουν καρκίνο

του τραχήλου λαμβάνοντας υπόψη τις συχνές περιπτώσεις αυτοϊασης και το μεγάλο χρονικό διάστημα από τη μόλυνση έως την έναρξη της κακοήθειας<sup>159</sup>.

### 1.3.1.1. Δομή και λειτουργία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων ανήκουν στην οικογένεια των Παπιλλοϊών (papoviridae). Αποτελούνται από ένα 72-μερές καψίδιο το οποίο περικλείει το γενετικό υλικό. Τα καψομερή αποτελούνται από δύο δομικές πρωτεΐνες: μία 57 KD γνωστή ως «όψιμη» πρωτεΐνη L1, που αποτελεί και το 80% του ιϊκού μορίου και μια άλλη 43-53 KD μικρή καψιδιακή πρωτεΐνη γνωστή ως L2. Το ιϊκό γονιδίωμα είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA που αποτελείται από 8000 ζεύγη βάσεων. Σε όλους τους τύπους παρατηρούνται 8 με 10 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Το γονιδίωμα διαιρείται σε τρεις περιοχές: μια μεγάλη ρυθμιστική περιοχή που δεν έχει δυνατότητα κωδικοποίησης πληροφοριών, την περιοχή των πρώιμων πρωτεϊνών (E1-E7) και την περιοχή των «όψιμων» πρωτεϊνών (L1 και L2) (Εικόνα 12)<sup>160</sup>.

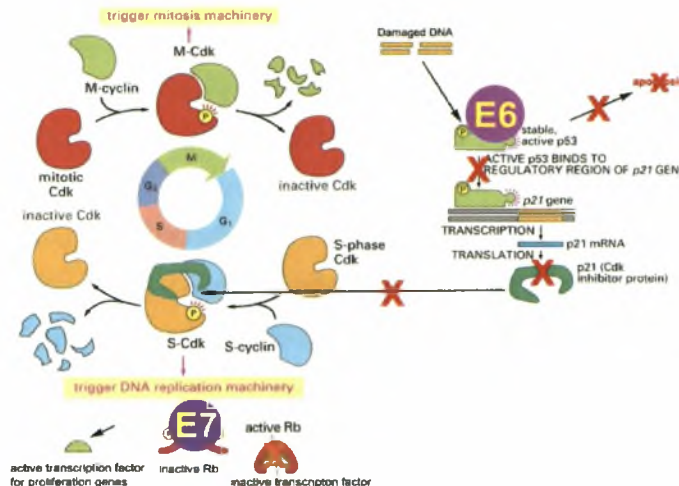


Εικόνα 12: Δομή του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων<sup>161</sup>.

**Γονιδιακά προϊόντα:** Τα γονίδια E1 και E2 κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την εξωχρωμοσωμική αντιγραφή του DNA και την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του ιού. Ένα κρίσιμο σημείο των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου που σχετίζονται με τη μόλυνση από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων είναι η απώλεια της έκφρασης της ιϊκής πρωτεΐνης E2. Το προϊόν σύντηξης που δημιουργείται αποτελείται από ένα μικρό αναγνωστικό πλαίσιο της E1 και ένα τμήμα της πρωτεΐνης E2 και μπορεί

να προκαλέσει καταστολή την αντιγραφής του DNA καθώς και της μεταγραφής και για αυτό φαίνεται ότι διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου στη βασική στοιβάδα των επιθηλιακών κυτάρων<sup>162,163</sup>. Η πρωτεΐνη E4 εκφράζεται σε μετέπειτα στάδια της μόλυνσης όταν καινούργια ιϊκά μόρια (virions) δημιουργούνται και παρόλο που δεν είναι γνωστή κάποια μετασχηματιστική ικανότητα, εντούτοις φαίνεται ότι παίζει βασικό ρόλο στην ωρίμανση και στον πολλαπλασιασμό του ιού<sup>164</sup>. Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο της E5 συχνά απουσιάζει στα καρκινικά τραχηλικά κύτταρα υποδεικνύοντας ότι δεν συνδέεται με τη διατήρηση της κακοήθους εξαλλαγής των κυττάρων ξενιστών. Επιπρόσθετα έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη E5 έχει μικρή μετασχηματιστική ικανότητα<sup>165</sup> (Εικόνα 9).

Οι E6 και E7 είναι οι σημαντικότερες ογκογενετικές πρωτεΐνες. Έχει διαπιστωθεί, ότι ο κύριος ρόλος των παραπάνω πρωτεϊνών είναι να αλληλεπιδρούν, η μεν E6 με την p53 και η δε E7 με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος Rb, μπλοκάροντας τη φυσιολογική λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Μεταγραφή και έκφραση των παραπάνω γονιδίων έχει παρατηρηθεί πάντα σε καρκίνο του τραχήλου, τονίζοντας το ρόλο που παίζουν στην καρκινογένεση σε σχέση με τον ιό HPV<sup>166</sup> (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13:** Ρόλος των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 στον κυτταρικό κύκλο<sup>167</sup>.

Η πρωτεΐνη E6 του ιού HPV εμφανίζει μικρή ογκογενετική ικανότητα σε πολλές κυτταρικές σειρές και η συνεργασία με την E7 θεωρείται απαραίτητη για την πλήρη μετασχηματιστική ικανότητα. Ουσιαστικά μόνο η E7 μπορεί να αθανатоποιήσει τα φυσιολογικά κερατινοκύτταρα της βασικής στοιβάδας του πλακώδους επιθηλίου, ενώ η

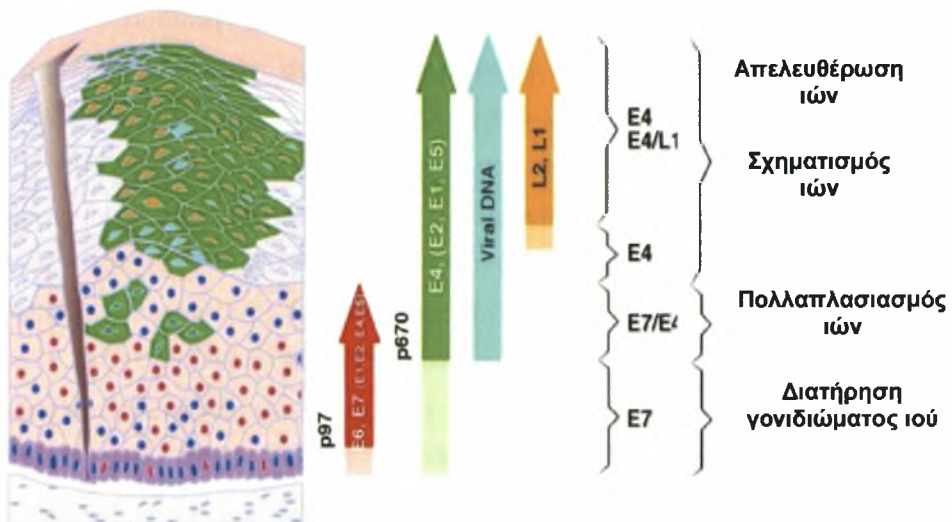
E6 ενισχύει την αποτελεσματικότητα της αθανατοποίησης που προκαλεί η E7. Η ανακάλυψη της αδρανοποίησης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος pRb παρέχει μια ικανοποιητική ερμηνεία για το πώς οι ιοί υψηλού κινδύνου προκαλούν γενετικές αλλαγές στα τραχηλικά κύτταρα<sup>168</sup>.

Αναλυτικότερα, υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ογκοκατασταλτικά γονίδια p53 και Rb παράγονται όταν το κύτταρο παθαίνει κάποια βλάβη στο DNA ή όταν ογκογονίδια εξαναγκάζουν το κύτταρο να πολλαπλασιάζεται. Αν η βλάβη είναι μικρή, η αύξηση της p53 οδηγεί στη συγκράτηση της μίτωσης και στην επιδιόρθωση της βλάβης στο DNA. Αν η βλάβη είναι εκτεταμένη, το κύτταρο οδηγείται σε κυτταρικό θάνατο ή σε απόπτωση. Η πρωτεΐνη E6 αλληλεπιδρά με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες, αλλά ο βασικός της ρόλος είναι η αναστολή της δράσης της p53 προκαλώντας την αποικοδόμηση της μέσω του μονοπατιού της ουβικουΐνης. Για να αδρανοποιήσει τη λειτουργία της p53, η E6 συνεργάζεται με μια άλλη πρωτεΐνη γνωστή ως E6-συσχετιζόμενη πρωτεΐνη, την E6AP. Στα μη μολυσμένα κύτταρα, η διαδικασία αποικοδόμησης της p53 μέσω της ουβικουΐνης ενεργοποιείται μέσω μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται mdm-2, ενώ στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από υψηλού κινδύνου στελέχη του ιού HPV, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο E6-E6AP αντικαθιστά την mdm-2 στον έλεγχο των επιπέδων της p53 στα κύτταρα. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση του χρόνου ημιζωής της p53 καθώς και των επιπέδων της στα μισά σε σύγκριση με τα αντίστοιχα σε ένα φυσιολογικό κύτταρο, η μείωση της απόπτωσης και η ενεργοποίηση των πρωτοογκογονιδίων c-myc και c-Ha-ras. Τα παραπάνω γεγονότα, με τη σειρά τους, οδηγούν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και πιθανή ανάπτυξη νεοπλασιών του τραχήλου. Για αυτό, τα κύτταρα που εκφράζουν την E6, διατηρούν χαμηλά τα επίπεδα της p53 αλλάζοντας την απόκριση του κυττάρου στην επιδιόρθωση του DNA και κάνοντας το ευάλωτο σε μεταλλάξεις<sup>169,170</sup>.

Η πρόσδεση της E7 στην πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος παρέχει μια συμπληρωματική λειτουργία και προκαλεί την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης 16 (p16) και της κυκλίνης E, οι οποίες οδηγούν το κύτταρο από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Επιπρόσθετα, η E7 αποικοδομεί την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb), απελευθερώνοντας τον μεταγραφικό παράγοντα E2F από την Rb. Υψηλά επίπεδα του E2F είναι πιθανό να οδηγήσουν σε απόπτωση των κυττάρων που εκφράζουν την E7. Αν όμως έχει αδρανοποιηθεί η λειτουργία της p53 μέσω της E6 πρωτεΐνης, το κύτταρο επιβιώνει στη φάση S του κυτταρικού κύκλου με μη επιδιορθωμένο DNA και μέσω της E7 αντιγράφει το HPV DNA<sup>171</sup>.

Οι δομικές πρωτεΐνες L1 και L2 δεν εκφράζονται σε προκαρκινικά και καρκινικά κύτταρα και ο μοναδικός και σημαντικός τους ρόλος αναφέρεται στην ανάπτυξη εμβολίων<sup>172</sup>.

Η είσοδος του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) στα τραχηλικά κύτταρα-ξενιστές μπορεί να συνοδευτεί από τρία γεγονότα: α) το DNA του ιού να παραμείνει επισωματικό προκαλώντας μια υποβόσκουσα (latent) μόλυνση, β) την μετατροπή της λανθάνουσας μόλυνσης σε ενεργοποιημένη που συνοδεύεται από το σχηματισμό ιών που προκαλούν μόλυνση και γ) την ενσωμάτωση του ιϊκού γονιδιώματος στο DNA του κυττάρου ξενιστή<sup>174</sup> (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14:** Ενεργοποίηση των γονιδίων του ιού HPV μετά από μόλυνση των κερατινοκυττάρων της βασικής στοιβάδας<sup>173</sup>.

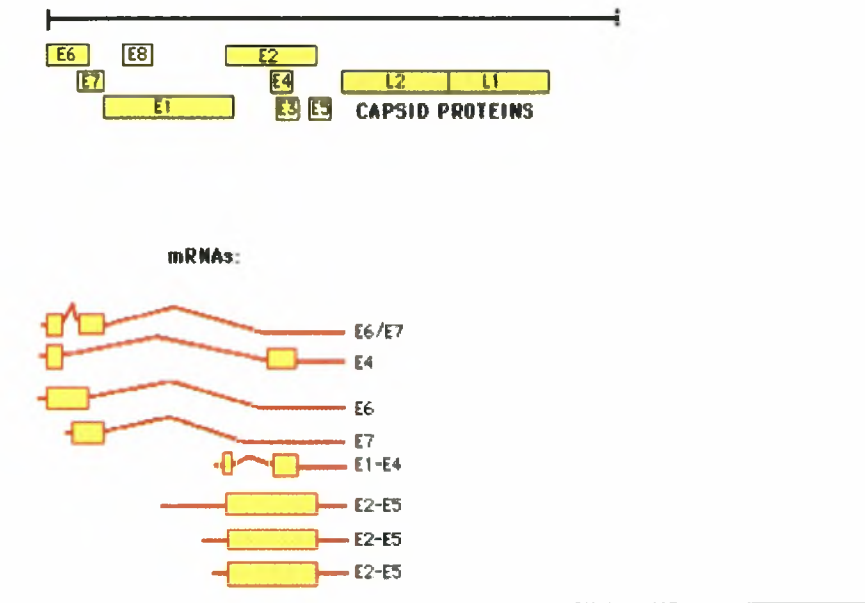
Το DNA του ιού είναι συνήθως εξωχρωμοσωμικό ή επισωματικό στα καλοήθη τραχηλικά επιχρίσματα. Στον καρκίνο καθώς και στις δυσπλασίες του τραχήλου της μήτρας είναι δυνατό να υπάρχει τόσο η επισωματική όσο και η ενσωματωμένη μορφή του DNA του ιού HPV. Κατά τη διαδικασία της ενσωμάτωσης το ιϊκό γονιδίωμα συνήθως σπάζει στην περιοχή E1/E2 και οι γονιδιακές περιοχές E1 και E2 χάνονται. Η απώλεια της γονιδιακής περιοχής E2 προκαλεί την ανεξέλεγκτη παραγωγή των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, που όπως έχει αναφερθεί απορρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο μέσω αλληλεπιδράσεων με διαφορετικές κυτταρικές πρωτεΐνες και προκαλούν την κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων ξενιστών και στον σχηματισμό όγκων<sup>175-177</sup>. Η ενσωμάτωση του ιϊκού γονιδιώματος είναι καθοριστική για την εξέλιξη από χαμηλού σε υψηλού βαθμού

δυσπλασίες. Σε διάφορες μελέτες έχει διαπιστωθεί η παρουσία ενσωματωμένου ιϊκού DNA των στελεχών HPV-16 και HPV-18 στην πλειοψηφία των καρκίνων και των κυτταρικών σειρών που απομονώθηκαν από καρκίνο του τραχήλου<sup>174</sup>. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος της ενσωμάτωσης του ιϊκού γονιδιώματος στο γενετικό υλικό του κυττάρου ξενιστή ως κύριος παράγοντας της γενετικής εξαλλαγής δεν έχει αποσαφηνιστεί.

Λιγότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί που να αφορούν στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης των πρώιμων γονιδίων στο επίπεδο του ματίσματος του RNA. Τα περισσότερα μετάγραφα των διαφόρων στελεχών του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων έχουν δείξει ότι είναι πολυιντρονικά, δηλαδή περιλαμβάνουν πολλά εξόνια και ιντρόνια, στα οποία πραγματοποιείται εναλλακτικό μάτισμα. Παρόλο που το γονιδίωμα είναι ιδιαίτερα μικρό, οι ιοί HPV μπορούν να παράγουν πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες που εξασφαλίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση (Εικόνα 15). Πρόσφατες μελέτες σχετικά με τη ρύθμιση και τον έλεγχο του ματίσματος του RNA του HPV-16 δείχνουν ότι τα μετάγραφα των στελεχών υψηλού κινδύνου κυρίως μεταγράφονται από ένα μοναδικό (single early promoter) υποκινητή, τον P97. Ειδικότερα τα E6 και E7 πρόδρομα mRNAs του HPV-16 μεταγράφονται ως διιντρονικά (bicistronic) E6E7 πρόδρομα mRNAs και έχουν ένα εξόνιο στην E6 κωδική περιοχή στο 5' κοινό άκρο και τρία εναλλακτικά 3' άκρα. Από το μάτισμα των τριών εναλλακτικών 3' άκρων του E6E7 πρόδρομου mRNA προκύπτουν τρία mRNA, τα E6<sup>I</sup>, E6<sup>II</sup>, and E6<sup>III</sup> mRNAs, αντίστοιχα. Αν το εξόνιο 1 παραμείνει, το E6E7mRNA που θα προκύψει εκφράζει ολόκληρη την ογκογενετική πρωτεΐνη E6. Από το εναλλακτικό μάτισμα του E6E7mRNA προκύπτει κυρίως το μετάγραφο E6<sup>\*I</sup> και λιγότερο το μετάγραφο E6<sup>\*II</sup> που όταν μεταφραστούν παράγουν την ογκοπρωτεΐνη E7. Στην περίπτωση που το εναλλακτικό μάτισμα αποτύχει, τότε εκφράζεται η ογκοπρωτεΐνη E6. Η αναλογία έκφρασης των πρωτεϊνών E6 και E7 εξαρτάται αντίστοιχα από την τελική αναλογία των μεταγράφων που προκύπτουν. Ο ρόλος ιϊκών και κυτταρικών παραγόντων στο εναλλακτικό μάτισμα του E6E7mRNA είναι ακόμη αδιευκρίνιστος<sup>178,179</sup>. Ωστόσο, αυτό που είναι γνωστό είναι ότι όταν δεν πραγματοποιείται μάτισμα στο E6E7mRNA, παράγεται μόνο η πρωτεΐνη E6 και όχι η E7 γιατί το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης της E6 απέχει μόλις δύο νουκλεοτίδια από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης της E7 και το ριβόσωμα αδυνατεί να μεταφράσει την τελευταία. Αντίθετα στο μετάγραφο E6<sup>\*I</sup> δημιουργείται ένα πρόδρομο κωδικόνιο λήξης στην περιοχή αμέσως μετά το μάτισμα αυξάνοντας την απόσταση μεταξύ του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου της E6<sup>\*I</sup> και του αντίστοιχου της E7 σε 130 νουκλεοτίδια με αποτέλεσμα τη δυνατότητα, μετάφρασης της E7<sup>180,181</sup>.



Επιπρόσθετα, επειδή έχει διαπιστωθεί ότι ο βαθμός της κυτταρικής διαίρεσης και κυτταρικής εξαλλαγής σχετίζεται με την έκφραση των mRNA μεταγράφων E6 και E7<sup>182</sup> και θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να μελετηθεί αν διαφορές στην έκφραση των μεταγράφων σχετίζονται με την εξέλιξη της ασθένειας.



Εικόνα 15: Εναλλακτικό μάτισμα των mRNA του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων<sup>153</sup>.

Τέλος, επιπρόσθετες μελέτες τονίζουν τη συσχέτιση του ιϊκού φορτίου του HPV και ειδικότερα του HPV-16, με την ανάπτυξη δυσπλασιών του τραχήλου της μήτρας. Ειδικότερα, υψηλά επίπεδα ιϊκού φορτίου, κυρίως στελεχών υψηλού κινδύνου αυξάνουν τον κίνδυνο για εκδήλωση υψηλού βαθμού δυσπλασιών του τραχήλου της μήτρας, ενώ η μείωση ή και εκμηδένιση του ιϊκού φορτίου ταυτίστηκε με μείωση του βαθμού δυσπλασίας και μεταβολή των δυσπλασιακών τραχηλικών περιπτώσεων προς φυσιολογικά<sup>183</sup>. Τα παραπάνω υποδεικνύουν τον πιθανό διαγνωστικό ρόλο του ιϊκού φορτίου του HPV-16 στο διαχωρισμό των περιπτώσεων που έχουν αυξημένο κίνδυνο να εξελιχθούν σε καρκίνο από αυτές που είναι λιγότερο πιθανό να εξελιχθούν.

### 1.3.2. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας και τελομεράση

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα των επιδημιολογικών μελετών που ήδη αναφέρθηκαν καθώς και στη χαμηλή ειδικότητα του κυτταρολογικού Τεστ Παπανικολάου, η χρήση μιας νέας διαγνωστικής δοκιμασίας κρίνεται απαραίτητη για την κλινική αντιμετώπιση των γυναικών με χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασίες τραχήλου<sup>184</sup>.

Η τελομεράση και ειδικότερα η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης τόσο σε καρκινικές όσο και σε προκαρκινικές περιπτώσεις, ενώ η χρησιμότητα της ως διαγνωστικός δείκτης παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα όμως παρουσιάζονται ιδιαίτερα συγχευμένα. Αναλυτικότερα, η ενεργοποίηση της έκφρασης της τελομεράσης και της καταλυτικής της υπομονάδας έχει παρατηρηθεί στο 83 με 100% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, στο 0-18% των φυσιολογικών, στο 0-100% των τραχηλικών επιχρισμάτων με χαμηλού βαθμού δυσπλασία και σε 26-100% των τραχηλικών επιχρισμάτων με υψηλού βαθμού δυσπλασία<sup>185-189</sup>. Όσον αφορά στον προσδιορισμό των επιπέδων της έκφρασης του hTERT mRNA σε τραχηλικά επιχρίσματα με ποικιλία κυτταρολογικών ευρημάτων μέχρι σήμερα η πλειοψηφία των μελετών έγινε με χρήση ημιποσοτικών μεθόδων<sup>187</sup>. Σε κάποιες από τις μελέτες έχει παρατηρηθεί συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα, ενώ σε άλλες όχι<sup>185,190-194</sup>.

Επιπρόσθετα, από τους πιθανούς παράγοντες που ελέγχουν την έκφρασή της, η μόλυνση από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων φαίνεται να διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο, ενώ αναφορικά με την κατάσταση της μεθυλίωσης του υποκινητή της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης σε τραχηλικά επιχρίσματα με ποικιλία κυτταρολογικών ευρημάτων, συμπεριλαμβανομένων χαμηλού και υψηλού βαθμού δυσπλασιών, δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες τόσο του ποσοστού της μεθυλίωσης όσο και του ρόλου της μεθυλίωσης στην έκφραση του γονιδίου.

Συνοπτικά, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι ο ρόλος της τελομεράσης και της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος. Φαίνεται ότι η τελομεράση αποτελεί μέρος μιας πολυπαραγοντικής διαδικασίας που αφορά στη συσσώρευση ποικίλων αλλαγών, γενετικών ή επιγενετικών που θα πρέπει να διερευνηθούν.

#### 1.4. Σκοπός της διατριβής

Στη συγκεκριμένη διατριβή μελετήθηκε η έκφραση της τελομεράσης και της καταλυτικής υπομονάδας της (hTERT) σε φυσιολογικά και σε παθολογικά τραχηλικά επιχρίσματα με ποικιλία κυτταρολογικών ευρημάτων και διερευνήθηκαν πιθανοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη ρύθμιση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT). Αναλυτικά, στα τραχηλικά επιχρίσματα μελετήθηκε:

- η ανίχνευση και τυποποίηση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV)
- η ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης
- η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT)
- η ποσοτικοποίηση του ιϊκού φορτίου (DNA) του HPV-16
- η ανίχνευση της έκφρασης των E6 και E7 mRNA (μεταγραφικό φορτίο) του HPV-16
- το πρότυπο μεθυλίωσης του υποκινητή της hTERT.

Αναλυτικότερα, διερευνήθηκε

- ο ρόλος της μόλυνσης από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων στην εμφάνιση δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας
- η συσχέτιση της ενεργότητας της τελομεράσης και της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας με τα κυτταρολογικά ευρήματα
- ο ρόλος του ιϊκού και μεταγραφικού φορτίου στην έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης
- η συσχέτιση της μεθυλίωσης του υποκινητή της hTERT με το βαθμό δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας και
- ο ρόλος της μεθυλίωσης στην έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης

Τέλος, προκειμένου να ελεχθεί η διαγνωστική ή προγνωστική αξία των παραπάνω παραμέτρων (ενεργότητα της τελομεράσης, έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της, ανίχνευση του στελέχους του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων) στην κλινική αντιμετώπιση των γυναικών με δυσπλασίες τραχήλου της μήτρας υπολογίστηκαν τα χαρακτηριστικά των διαγνωστικών δοκιμασιών: ευαισθησία, ειδικότητα, θετική προγνωστική τιμή και αρνητική προγνωστική τιμή.



## **2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1.1 Συλλογή δειγμάτων

**Ασθενείς:** Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 325 γυναίκες από τις οποίες οι 280 είχαν παθολογικά κυτταρολογικά ευρήματα, ενώ οι 45 φυσιολογικά. Ο μέσος όρος της ηλικίας των γυναικών με τα μη φυσιολογικά κυτταρολογικά ευρήματα ήταν 38.4 έτη (εύρος από 19 έως 58 έτη, SEM=8.42 έτη), ενώ ο μέσος όρος των γυναικών με φυσιολογικά κυτταρολογικά επιχρίσματα ήταν 37.4 έτη (εύρος από 24-50 έτη, SEM=8.27 έτη). Τα τραχηλικά επιχρίσματα ελήφθησαν στο εξωτερικό ιατρείο της Κολποσκόπησης της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Η λήψη των τραχηλικών επιχρισμάτων πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια κολποσκοπικής εκτίμησης για την κλινική αντιμετώπιση γυναικών με μη φυσιολογικά αποτελέσματα του τεστ Παπανικολάου, συμπεριλαμβάνοντας επαναλαμβανόμενη κυτταρολογική διάγνωση με άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας (*Atypical Squamous epithelial Cells of Undetermined Significance -ASCUS*) ή διάγνωση με χαμηλού βαθμού δυσπλασία (LGSIL) ή με υψηλού βαθμού δυσπλασία (HGSIL).

Η λήψη του τραχηλικού επιχρίσματος πραγματοποιήθηκε πριν από την έναρξη της διαδικασίας της κολποσκόπησης, αμέσως μετά τη συλλογή του τραχηλικού επιχρίσματος για την κυτταρολογική εξέταση ρουτίνας (τεστ Παπανικολάου) γιατί το οξικό οξύ που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της κολποσκόπησης για τον εντοπισμό των βλαβών, είναι δυνατό να καταστρέψει την ενεργότητα τόσο του ενζύμου όσο και την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Από κάθε γυναίκα ελήφθησαν δύο διαφορετικά τραχηλικά επιχρίσματα με τη χρήση ενδοτραχηλικής ψύκτρας σε ειδικά φιαλίδια. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στον πάγο και αμέσως ακολούθησε η επεξεργασία τους στο εργαστήριο. Το πρώτο δείγμα συλλέχθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα STE (pH=7.5, 0.05M Tris HCl, NaCl 0.1M, EDTA 1mM) και χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη: το πρώτο χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση DNA και στη συνέχεια για ανίχνευση και τυποποίηση των θετικών για τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV), για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιϊκού φορτίου του στελέχους 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων καθώς και για τη μελέτη της μεθυλίωσης ενώ το άλλο μισό για τη μελέτη της ενεργότητας του ενζύμου με τη μέθοδο TRAP.

Το δεύτερο τραχηλικό επίχρισμα συλλέχθηκε σε Trizol (Life Technologies, Inc., Paisley, UK) και χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση RNA και στη συνέχεια για την

ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT), καθώς και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των E6 και E7 mRNA μεταγράφων των τραχηλικών επιχρισμάτων που έχουν μολυνθεί με το στέλεχος 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.

Η λήψη τραχηλικού δείγματος για βιοψία πραγματοποιούνταν στο τέλος της κολποσκόπησης, εφόσον κρινόταν αναγκαίο. Η κυτταρολογική και ιστολογική εκτίμηση πραγματοποιήθηκε στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Όλη η διαδικασία λήψης δείγματος πραγματοποιήθηκε μετά τη συναίνεση της κάθε γυναίκας.

Η ομάδα των φυσιολογικών τραχηλικών επιχρισμάτων συλλέχθηκε μετά από εθελοντική προσφορά γυναικών με φυσιολογικό τεστ Παπανικολάου.

### 2.1.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε μετά από πέψη με πρωτεϊνάση K με τη βοήθεια του QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι στήλες (QIAamp Spin Columns) χρησιμοποιούνται για την απομόνωση νουκλεϊκών οξέων. Η απομόνωση βασίζεται στη χρήση μεμβρανών από πηκτική σιλικόνης η οποία δεσμεύει επιλεκτικά νουκλεϊκά οξέα, ενώ είναι διαπερατή από πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα που μπορεί να αναστείλουν την πολυμεράση κατά την αντίδραση PCR.

Το σετ αντιδραστηρίων περιέχει τις κατάλληλες στήλες, πρωτεϊνάση K, το διάλυμα AL (διάλυμα λύσης), τα διαλύματα AW1 και AW2 (διαλύματα για τις εκπλύσεις, απαιτείται αρχικά η προσθήκη αιθανόλης) και το διάλυμα AE (διάλυμα έκλουσης και επαναδιάλυσης του DNA).

#### *Διαδικασία:*

1. Προσθήκη 20μl πρωτεϊνάσης K, 200μl δείγματος (περίπου  $5 \times 10^6$  πλακώδη επιθηλιακά τραχηλικά κύτταρα σε 200μl PBS) και 200μl AL buffer (διάλυμα λύσης) σε σωληνάριο eppendorff (1,5ml)
2. Ανακίνηση ή vortex.
3. Επώαση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 56°C για 10 λεπτά.
4. Προσθήκη 200μl αιθανόλης (96%-100% αιθανόλη) στο σωληνάριο eppendorff και ανάδευση.
5. Μεταφορά του δείγματος σε στήλη QIAamp και φυγοκέντρηση (6000g, 1min).



6. Αντικατάσταση σωληναρίου συλλογής κάτω από την στήλη. Προσθήκη στην στήλη 500μl διαλύματος AW1. Φυγοκέντρηση (6000g, 1min).
7. Αντικατάσταση σωληναρίου συλλογής κάτω από την στήλη. Προσθήκη στην στήλη 500μl AW2 buffer. Φυγοκέντρηση (20000g (14000rpm, 3 min).
8. Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο erpendorff (1,5 ml) και προσθήκη στην στήλη 100μl AE buffer. Φυγοκέντρηση (6000g, 1min).
9. Η στήλη απομακρύνεται. Το σωληνάριο erpendorff περιέχει το DNA και φυλάσσεται για ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση με ηλεκτροφόρηση.

### 2.1.3 Απομόνωση ολικού κυτταρικού RNA

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε με την μέθοδο του ισοθειοκυανικού γουανιδινίου ως εξής:

#### *I. Ομογενοποίηση.*

Προσθήκη 1600μl Trizol και 160 μl χλωροφόρμιο στα κύτταρα και διαδοχικές αναρροφήσεις με πιπέτα και χρήση του Vortex με στόχο την λύση των κυττάρων.

#### *II. Διαχωρισμός φάσεων.*

Μετά την ομογενοποίηση, η οποία διαρκεί τουλάχιστον 15 λεπτά, κάθε δείγμα μεταγγίστηκε σε σωληνάριο των 2 ml και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 15min στις 12000rpm στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση σε κάθε σωληνάριο υπήρχαν τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη/ χλωροφόρμιο, η μεσόφαση και η ανώτερη υδατική φάση στην οποία έχει απομονωθεί και το RNA.

#### *III. Κατακρήμνιση.*

Η ανώτερη υδατική φάση που περιείχε το RNA και μεταφερόταν σε νέο σωληνάριο των 2 ml. Έγινε κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης, καλή ανάδευση και τελικά τοποθέτηση του δείγματος στους -20°C για 12-16 ώρες.

#### *IV. Έκπλυση του RNA.*

Μετά από 16 ώρες περίπου πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 30min στις 12000rpm στους 4°C. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και στο ίζημα προστέθηκε 1ml κρύας αιθανόλης 70%. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30min στις 12000rpm στους 4°C και επανάληψη του προηγούμενου βήματος.

#### V. Επαναδιάλυση του RNA.

Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αφού στεγνώσει πολύ καλά διαλυτοποιείται. Η διαλυτοποίηση του ιζήματος γίνεται με προσθήκη 80-100μl ddH<sub>2</sub>O και κάθε δείγμα αποθηκεύεται στους -80°C.

#### VI. Φωτομέτρηση-Έλεγχος ποσότητας

Για να ελεγχθεί η ποσότητα του RNA πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε κάθε δείγμα. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρήθηκαν στα 260 και 280 nm. Υπολογίστηκε ο λόγος 260/280 καθώς και η συγκέντρωση του RNA ως εξής:  
συγκέντρωση RNA = αραιώση x OD<sub>260</sub> x 40 (mgr/ml)

#### VII. Ηλεκτροφόρηση-Έλεγχος ποιότητας

Για να ελεγχθεί η ποιότητα του RNA πραγματοποιήθηκε σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%.

### 2.1.4 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η σύνθεση του cDNA έγινε με αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT) in vitro χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers, 500μg/ml). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 200U/μl).

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την αντίδραση σύνθεσης cDNA για όγκο RNA αντιστοιχεί σε 1μgr περιέχει:

➤ RNA	→	1	μgr
➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 5x	→	4	μl
➤ Τυχαία εξανουκλεοτίδια(500μg/m)	→	3	μl
➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια	→	2	μl
➤ MMLV RT (200U/μl)	→	1	μl
➤ δις απεσταγμένο νερό	→	μέχρι τελικού όγκου 20μl	

▪ Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Αρχικά το RNA διαλύθηκε σε ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα RNA με τα τυχαία εξανουκλεοτίδια θερμάνθηκε στους 65°C επί 5 min για την αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA.
- Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά για τη σταθεροποίηση της αποδιάταξης δευτεροταγών δομών του RNA.

- Μετά την προσθήκη και των υπολοίπων αντιδραστηρίων ακολουθούν οι παρακάτω συνθήκες
  - 37°C , 60 λεπτά
  - 65°C , 10 λεπτά
  - τελική θερμοκρασία: 4 °C

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα "αναφοράς"). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο "αναφοράς" χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου RARα (retinoic acid receptor α) το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος. Έτσι, ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA, το cDNA ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του RARα cDNA (RAR6/RAR8). Οι εκκινητές για το γονίδιο RARα είναι:

**RAR6:** 5' GGTGCCTCCCTACGCCTTCT 3'

**RAR8:** 5' GGCGCTGACCCCATAGTGGT 3'

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση του γονιδίου RARα περιέχει:

- |                            |   |      |    |
|----------------------------|---|------|----|
| ➤ cDNA                     | → | 3    | μl |
| ➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 10x   | → | 5    | μl |
| ➤ MgCl <sub>2</sub> (50mM) | → | 3    | μl |
| ➤ Εκκινητής RAR6 (50p/mol) | → | 1.5  | μl |
| ➤ Εκκινητής RAR8 (50p/mol) | → | 1.5  | μl |
| ➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια    | → | 0.5  | μl |
| ➤ DNA πολυμεράση           | → | 0.4  | μl |
| ➤ δισ απεσταγμένο νερό     | → | 35.1 | μl |
- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
    - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά
    - 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
      - αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό
      - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 53°C για 1 λεπτό
      - επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό
    - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

### 2.1.5 Ανίχνευση και τυποποίηση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.

#### ➤ Ανίχνευση του ιϊκού γονιδιώματος με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)

Για την ανίχνευση του ιού HPV με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές MY09 και MY11 για την ενίσχυση του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης L1. Κύριο γνώρισμα των παραπάνω εκκινητών συνιστά η ιδιότητα του «εκφυλισμού», η παρουσία δηλαδή θέσεων στις οποίες είναι δυνατή η ενσωμάτωση ενός η περισσοτέρων πιθανών νουκλεοτιδίων, λόγω της ύπαρξης μιας εξαιρετικά συντηρημένης αλληλουχίας μεγέθους περίπου 450 ζευγών βάσεων στο 3' άκρο του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου που κωδικοποιεί την L1<sup>194</sup>. Η αλληλουχία των «εκφυλισμένων» εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Η αξιολόγηση του αποτελέσματος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, δηλαδή η ανίχνευση ή όχι του προϊόντος που προέκυψε από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (περίπου 450 ζεύγη βάσεων) έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% και παρατήρηση κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

**Πίνακας 1:** Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV).

<i>Όνομασία εκκινητών</i>	<i>Αλληλουχία εκκινητών</i>
<b>MY09</b>	<b>5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3'</b>
<b>MY11</b>	<b>3'CGTCCMARRGGAWACTGATC 5'</b>
<b>GP5</b>	<b>5'TTTGTT ACTGTGGTAGATAC 3'</b>
<b>GP6</b>	<b>5' GAAAATAAACTGTAAATCA 3'</b>

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση του ιού HPV περιέχει:

- DNA → 8 μl
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x → 10 μl
- MgCl<sub>2</sub> → 3 μl
- Εκκινητής MY09 (50p/mol) → 2 μl
- Εκκινητής MY11 (50p/mol) → 2 μl
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια → 0.5 μl
- DNA πολυμεράση → 0.4 μl
- δις απεσταγμένο νερό → 76.1 μl

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
  - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά
  - 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
    - αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό
    - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 55°C για 1 λεπτό
    - επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό
  - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

Σε όποια δείγματα δεν παρατηρήθηκε ζώνη 450 ζεύγη βάσεων, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με εσωτερικούς εκκινητές, τους GP5 και GP6. Η αλληλουχία των «διατηρημένων» εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Το προϊόν που προέκυψε από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ήταν περίπου 140 ζεύγη βάσεων και παρατηρήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 3%.

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση του ιού HPV περιέχει:

- DNA (προϊόν PCR με εκκινητές MY09/11) → 5 μl
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x → 10 μl
- MgCl<sub>2</sub> → 3 μl
- Εκκινητής GP5 (50p/mol) → 1 μl
- Εκκινητής GP6 (50p/mol) → 1 μl
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια → 0.5 μl
- DNA πολυμεράση → 0.4 μl
- δις απεσταγμένο νερό → 79.1 μl

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
  - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά
  - 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
    - αποδιάταξη στους 95°C για 50 δευτερόλεπτα
    - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 42°C για 50 δευτερόλεπτα
    - επιμήκυνση στους 72°C για 50 δευτερόλεπτα
  - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

➤ **Τυποποίηση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με ειδικούς εκκινητές και με πολυμορφισμούς μήκους θραυσμάτων με ένζυμα περιορισμού (Restriction Fragment length Polymorphisms-RFLPs)**

Για την τυποποίηση του στελέχους του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων στα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης που προέκυψαν από τους εκκινητές MY09 και MY11, πραγματοποιήθηκε επώαση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI, Ddel, HaeIII, HinfI, PstI, RsaI και Sau3aI, από τις οποίες προκύπτει χαρακτηριστικό πρότυπο ζωνώσεων για τους τυπούς 6, 11, 13, 16, 18, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, MM4(W13B), MM7(PAP291), MM8(PAP155), MM9(PAP238A), LVX100, IS39, CP141, CP6108, CP8304, CP4173, CP8061 (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2:** Πρότυπο ζωνώσεων για την τυποποίηση του στελέχους του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.

HPV type	BamHI,	Ddel,	HaeIII,	HinfI	PstI	RsaI	Sau3aI
6b	449bp	382 bp 67 bp	217bp 124bp 108bp	234bp 215bp	449bp	161bp 149bp 72bp 67bp	366bp 63bp 20bp
11	336bp 83bp	447bp 2bp	217bp 124bp 108bp	234bp 215bp	242bp 207bp	216bp 135bp 72bp 26bp	366bp 63bp 20bp
13	372bp 83bp	326bp 62bp 67bp	204bp 127bp 124bp	240bp 215bp	213bp 242bp	175bp 135bp 73bp 72bp	372bp 63bp 20bp
16	452bp	452bp	444bp 8bp	452bp	216bp 210bp 26bp	310bp 72bp 70bp	369bp 63bp 20bp
18	372bp 83bp	432bp 23bp	455bp	455bp	242bp 213bp	135bp 125bp 85bp 72bp 38bp	372bp 63bp 20bp
26	455bp	455bp	455bp	455bp	102bp 353bp	365bp 72bp 18bp	372bp 63bp 20bp
31	452bp	283bp 167bp	328bp 124bp	237bp 215bp	216bp 210bp	380bp 72bp	369bp 63bp

		2bp			26bp		20bp
31b	452bp	285bp 90bp 77bp	328bp 124bp	237bp 215bp	216bp 210bp 26bp	380bp 72bp	369bp 63bp 20bp
32	366bp 83bp	320bp 21bp 108bp	317bp 124bp 8bp	234bp 215bp	449bp	216bp 161bp 96bp 15bp	366bp 63bp 20bp
33	366bp 83bp	320bp 77bp 52bp	449bp	234bp 215bp	242bp 207bp	236bp 102bp 72bp 39bp	267bp 162bp 20bp
34	458bp	211bp 151bp 88bp 8bp	334bp 124bp	458bp	253bp 179bp 26bp	186bp 161bp 96bp 15bp	438bp 20bp
35	452bp	294bp 135bp 23bp	261bp 180bp 8bp	452bp	426bp 26bp	177bp 161bp 72bp 42bp	369bp 63bp 20bp
39	455bp	324bp 131bp	455bp	355bp 100bp	330bp 125bp	260bp 123bp 72bp	249bp 123bp 63bp 20bp
40	240bp 132bp 83bp	297bp 158bp	447bp 8bp	455bp	455bp	365bp 90bp	240bp 132bp 63bp 20bp
42	366bp 83bp	341bp 108bp	449bp	234bp 215bp	449bp	342bp 135bp 72bp	366bp 63bp 20bp
44	455bp	297bp 112bp	223bp 124bp 108bp	455bp	455bp	222bp 161bp 72bp	405bp 30bp 20bp
45	372bp 83bp	324bp 131bp	447bp 8bp	455bp	242bp 213bp	338bp 72bp 45bp	372bp 63bp 20bp
51	237bp 215bp	362bp 90bp	379bp 73bp	452bp	452bp	380bp 72bp	237bp 132bp 63bp 20bp
52	449bp	357bp 92bp	258bp 183bp 8bp	449bp	423bp 26bp	449bp	366bp 63bp 20bp

53	449bp	206bp 158bp 85bp	232bp 217bp	368bp 81bp	449bp	449bp	342bp 87bp 20bp
54	369bp 83bp	452bp	217bp 127bp 108bp	234bp 218bp	452bp	138bp 125bp 117bp 72bp	369bp 63bp 20bp
55	455bp	112bp 111bp 101bp 85bp 46bp	215bp 124bp 108bp 8bp	215bp 207bp 33bp	455bp	165bp 161bp 72bp 57bp	405bp 30bp 20bp
56	449bp	307bp 142bp	275bp 166bp 8bp	449bp	242bp 207bp	310bp 72bp 49bp 18bp	429bp 20bp
57	449bp	211bp 142bp 50bp 46bp	449bp	449bp	296bp 153bp	449bp	328bp 38bp 33bp 26bp 24bp
58	449bp	348bp 101bp	449bp	235bp 214bp	216bp 207bp 32bp	306bp 111bp 32bp	366bp 57bp 20bp 6bp
59	452bp	452bp	396bp 56bp	452bp	426bp 26bp	452bp	402bp 24bp 20bp 6bp
61	455bp	455bp	212bp 211bp 24bp 8bp	455bp	455bp	185bp 180bp 72bp 18bp	372bp 63bp 20bp
62	449bp	449bp	232bp 217bp	499bp	341bp 108bp	359bp 72bp 18bp	399bp 30bp 20bp
64	375bp 83bp	211bp 151bp 87bp 9bp	334bp 124bp	367bp 91bp	253bp 179bp 26bp	186bp 161bp 72bp 39bp	375bp 63bp 20bp
66 (PAP88)	366bp 83bp	291bp 158bp	449bp	449bp	207bp 150bp 66bp 26bp	449bp	366bp 63bp 20bp
67	449bp	307bp 92bp 50bp	266bp 183bp	234bp 215bp	423bp 26bp	310bp 72bp 67bp	366bp 63bp 20bp



<b>68 (ME180)</b>	372bp 83bp	455bp	455bp	215bp 140bp 100bp	455bp	260bp 85bp 72bp 38bp	249bp 123bp 63bp 20bp
<b>69</b>	372bp 83bp	455bp	223bp 183bp 49bp	455bp	455bp	365bp 72bp 18bp	372bp 33bp 30bp 20bp
<b>MM4(W138)</b>	455bp	288bp 167bp	455bp	241bp 214bp	455bp	383bp 72bp	435bp 20bp
<b>MM7(PAP291) LVX82</b>	369bp 83bp	452bp	383bp 69bp	452bp	317bp 135bp	380bp 72bp	369bp 63bp 20bp
<b>MM8(PAP155)</b>	452bp	220bp 142bp 90bp	346bp 106bp	214bp 106bp 95bp 37bp	452bp	310bp 142bp	369bp 63bp 20bp
<b>MM9(PAP238A)</b>	458bp	243bp 215bp	458bp	458bp	432bp 26bp	201bp 161bp 96bp	408bp 30bp 20bp
<b>LVX100</b>	452bp	297bp 155bp	220bp 208bp 24bp	452bp	452bp	362bp 72bp 18bp	369bp 63bp 20bp
<b>IS39</b>	455bp	243bp 212bp	455bp	241bp 214bp	455bp	383bp 72bp	435bp 20bp
<b>CP141 LVX160</b>	372bp 83bp	455bp	232bp 117bp 106bp	240bp 215bp	242bp 213bp	231bp 123bp 72bp 29bp	372bp 63bp 20bp
<b>CP6108</b>	369bp 83bp	246bp 152bp 54bp	325bp 127bp	452bp	452bp	380bp 72bp	369bp 33bp 24bp 20bp 6bp
<b>CP8304</b>	452bp	452bp	127bp 121bp 108bp 96bp	452bp	341bp 111bp	452bp	432bp 20bp
<b>CP4173 LVX100</b>	455bp	300bp 155bp	220bp 211bp 24bp	455bp	455bp	365bp 72bp 18bp	372bp 63bp 20bp
<b>CP8061</b>	452bp	320bp 132bp	217bp 127bp 108bp	346bp 106bp	360bp 92bp	380bp 72bp	381bp 51bp 20bp

Επιπρόσθετα, για την τυποποίηση των στελεχών 16, 18, 6/11, 31 και 33 χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για την ενίσχυση περιοχής του γονιδιώματος των αντίστοιχων στελεχών. Οι αλληλουχίες των ειδικών εκκινητών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3:** Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV).

<i>Όνομασία εκκινητών</i>	<i>Αλληλουχία εκκινητών</i>
16 <sup>A</sup>	5'GTGGACCGGTTCGATGTATGT 3'
16B	5'CATGCAATGTAGGTGTATCT 3'
18 <sup>A</sup>	5'GCAGCACAGAAAACAGTCCA 3'
18B	5'CGCCATTTGTAGTTACCTGA 3'
33 <sup>A</sup>	5'ATGATAGATGATGTAACGCC 3'
33B	5'GCACACTCCATGCGTATCAG 3'
31 <sup>A</sup>	5'ATGGTGATGTACACAACACC 3'
31B	5'GTAGTTGCAGGACAACACTGAC 3'
6/11A	5'ATGTTATGGCAGCACAGTTA 3'
6/11B	5'TTGCACTATAGGCGTAGCTG 3'
CD1	5'TGCCTCTTTGCACATTCTA 3'
CD2	5'GACCTCCCACATTCCCTTTT 3'
όπου M=A+C, R=A+G, Y=C+T, W=A+T	

Σε κάθε αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιούνται εκτός των δειγμάτων, δύο επιπλέον σωληνάρια αντίδρασης. Στο πρώτο απουσιάζει πλήρως το DNA και θα αποτελέσει τον αρνητικό μάρτυρα κατά τη διεξαγωγή της PCR, ώστε να αποκλεισθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης και κατ'επέκταση η ανάγνωση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Το δεύτερο περιέχει πλασμιδιακό DNA από κλωνοποιημένα πλασμίδια που περιέχουν ολόκληρο το γονιδίωμα των στελεχών 6, 11, 16, 18, 31 και 33 και χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας για την ανίχνευση των συγκεκριμένων στελεχών κατά την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση των ειδικών στελεχών του ιού HPV (HPV 6/11, 16, 18, 31,33) περιέχει:

- DNA → 5 μl
  - Ρυθμιστικό διάλυμα 10x → 5 μl
  - MgCl<sub>2</sub> → 1.5 μl
  - Εκκινητής A (50p/mol) → 1 μl
  - Εκκινητής B (50p/mol) → 1 μl
  - Δεοξυριβονουκλεοτίδια → 0.5 μl
  - DNA πολυμεράση → 0.4 μl
  - δις απεσταγμένο νερό → 38.6 μl
- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
    - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά
    - 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
      - αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό
      - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 56°C για 1 λεπτό
      - επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό
    - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

Για τον έλεγχο της ποιότητας του DNA, σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για την ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής του γονιδίου αναφοράς της β-σφαιρίνης (CD1, CD2). Οι αλληλουχίες των γονιδίων αναφέρονται στον Πίνακα 3.

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση του γονιδίου αναφοράς (β-σφαιρίνης) περιέχει:

- DNA → 5 μl
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x → 5 μl
- MgCl<sub>2</sub> → 1.5 μl
- Εκκινητής CD1 (50p/mol) → 10 μl
- Εκκινητής CD2 (50p/mol) → 5 μl
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια → 1 μl
- DNA πολυμεράση → 0.3 μl
- δις απεσταγμένο νερό → 27.2 μl

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
  - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά
  - 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
    - αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό
    - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 55°C για 1 λεπτό
    - επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό
  - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

Για τον έλεγχο της μεθόδου ανίχνευσης και τυποποίησης του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αλληλουχίας προϊόντων (sequencing) που έδειξε ταύτιση των αποτελεσμάτων-επιβεβαίωση της ειδικότητας των εκκινητών.

#### **2.1.6 Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP**

Το πρωτόκολλο TRAP θεωρείται ευαίσθητη και ειδική PCR που βασίζεται στην ενζυμική δραστηριότητα. Πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία TeloTAGGG telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche, Indianapolis, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρωτόκολλο TRAP δείχνει πολύ μεγάλη ευαισθησία ανιχνεύοντας ένα θετικό κύτταρο για την τελομεράση ανάμεσα σε 10000 αρνητικά για την τελομεράση κύτταρα. Συνοπτικά, κάθε παγωμένο ίζημα ομογενοποιήθηκε σε 200μl διαλύματος λύσης κυττάρων. Μετά από επώαση 30 λεπτών στον πάγο, επακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 min στους 4°C, τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν σε καινούρια φιαλίδια και η πρωτεϊνική συγκέντρωσή τους προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Lowry. Στο σετ αντιδραστηρίων του πρωτοκόλλου συμπεριλαμβάνονται δείγματα τα οποία περιέχουν DNA θετικό για την τελομεράση και διαθέτουν την ίδια αλληλουχία με αυτή ενός προϊόντος τελομεράσης με 8 τελομερικές επαναλήψεις. Αρνητικά δείγματα ελέγχου ετοιμάστηκαν από κάθε κυτταρικό εκχύλισμα απενεργοποιώντας την ενεργότητα της τελομεράσης των δειγμάτων με υψηλή θερμοκρασία (10 λεπτά στους 85 °C). Η ανάλυση έγινε με ένα μίγμα αντίδρασης 30 μl που περιέχει 3μg πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αντίδρασης (internal standard) πολλαπλασιάστηκε από ανιχνευτές TS, ώστε να αποφευχθούν τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τα θετικά αποτελέσματα για την ενεργότητα της τελομεράσης επιβεβαιώθηκαν με TRAP, μετά από έκθεση των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε υψηλή θερμοκρασία (85°C για 15 λεπτά) για να βρεθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η

απορρόφηση των δειγμάτων στα 450 nm, με μήκος κύματος αναφοράς τα 650 nm μετρήθηκε χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο και θεωρήθηκε θετική όταν η διαφορά μεταξύ της απορρόφησης του δείγματος και της απορρόφησης του αρνητικού δείγματος ελέγχου ήταν 2 φορές μεγαλύτερη από την μη ειδική ενεργότητα (background). Τα δείγματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παράγοντας τη χαρακτηριστική τελομερική κλίμακα-δείκτη (ladder) 6 bp.

### **2.1.7 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR)**

Η ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) πραγματοποιήθηκε στις συμπληρωματικές αλληλουχιών DNA (cDNA). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν κατάλληλα ώστε να υβριδίζονται με περιοχές DNA που αντιστοιχούν μεταξύ των εξονίων 3 και 4 του γονιδίου της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT), για να αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η κατάλληλη επιλογή των εκκινητών έγινε με βάση το γεγονός ότι στην συγκεκριμένη περιοχή που υβριδίζονται οι εκκινητές δεν έχει αναφερθεί η ύπαρξη ποικίλων μεταγράφων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

A: 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3' και

B: 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3'

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) περιέχει:

➤ cDNA	→	5	μl
➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	→	5	μl
➤ MgCl <sub>2</sub> (50mM)	→	1.5	μl
➤ Εκκινητής hTERT A (50p/mol)	→	1	μl
➤ Εκκινητής hTERT B (50p/mol)	→	1	μl
➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια	→	0.5	μl
➤ DNA πολυμεράση	→	0.4	μl
➤ δις απεσταγμένο νερό	→	38.6	μl

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
  - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3 λεπτά
  - 30 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
    - αποδιάταξη στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα
    - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 57°C για 1 λεπτό
    - επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό
  - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

Κύτταρα από την ερυθρολευχαιμική σειρά K562 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Ανάλυση της αλληλουχίας των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) επιβεβαίωσε την ειδικότητα των εκκινητών.

#### **2.1.8 Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) με την τεχνική της ποσοτικής PCR**

##### *1. Γενικές αρχές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)*

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) στηρίζεται στην ενζυματική ενίσχυση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA in vitro, με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης και των εκκινητών. Η Taq πολυμεράση είναι μια θερμοανθεκτική πολυμεράση η οποία εξάγεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές (primers) είναι μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες, ολιγονουκλεοτίδια, οι οποίοι υβριδίζονται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του τμήματος του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Έτσι, λοιπόν, για να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός του συγκεκριμένου τμήματος του DNA το μείγμα αντίδρασης θα πρέπει να περιέχει: τη δίκλωνη ακολουθία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, Taq πολυμεράση με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα, το ζεύγος των εκκινητών, διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) τα οποία χρησιμοποιεί η πολυμεράση και διάλυμα MgCl<sub>2</sub> που διευκολύνει τη δράση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους (30-35), καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία στάδια:

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94°C

- σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης πια ακολουθίας-στόχου, σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών
- θέρμανση του μείγματος στους 72 °C, έτσι ώστε η πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA-στόχου με τη βοήθεια των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου εξαρτάται από το μήκος (σε bp) του υπό ενίσχυση τμήματος DNA και με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται η συλλογή ενός εκατομμυρίου περίπου αντιγράφων της επιθυμητής ακολουθίας, μια και κάθε θερμοκρασιακός κύκλος διπλασιάζει το προϊόν του προηγούμενου κύκλου.

## *II. Γενικές αρχές PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR)*

Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων συμβάλλει ουσιαστικά στη μελέτη των βιολογικών διεργασιών και στην κατανόηση της παθογένειας των ασθενειών. Για το σκοπό αυτό, πρόσφατα αναπτύχθηκαν μέθοδοι ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR, RQ-PCR) που αντικατέστησαν την πολύπλοκη και χρονοβόρα ημιποσοτική, συναγωνιστική ανάλυση PCR (competitive PCR).

Η ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου συνίσταται σε αξιόπιστη ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της PCR. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να μετρηθεί η ποσότητα του προϊόντος PCR ενώ η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση. Για να επιτευχθεί αυτό, χρειάζεται να έχουμε μια μέθοδο για την ανίχνευση της ποσότητας του προϊόντος PCR και ένα μηχάνημα στο οποίο να καταγράφονται τα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου PCR. Ένα από τα καταλληλότερα συστήματα καταγραφής αποτελεί το σύστημα LightCycler.

## *III. Γενικές αρχές λειτουργίας Light Cyclers*

Πρόκειται για ένα σύστημα ταχείας εκτέλεσης PCR με δυνατότητα καταγραφής και ταυτόχρονης παρακολούθησης της κινητικής της αντίδρασης, σε πραγματικό χρόνο. Τα γενικά χαρακτηριστικά του συστήματος είναι τα εξής:

- Η αρχή του συστήματος στηρίζεται στη χρήση ειδικών φθορίζουσών χρωστικών και στην ανίχνευση του φθορισμού, που εκπέμπεται κατά την ενσωμάτωση τους στο DNA του δείγματος, από ενσωματωμένο φθορισμόμετρο.
- Η λειτουργία του συστήματος βασίζεται στη χρήση τεχνολογίας θερμαινόμενου αέρα, ως μέσου μεταφοράς θερμότητας, για τη διεξαγωγή της PCR.
- Η διεξαγωγή της PCR και η ανίχνευση του παραγόμενου PCR προϊόντος από το φθορισμόμετρο πραγματοποιείται σε ειδικούς τριχοειδείς υποδοχείς δειγμάτων.
- Η ανίχνευση από τη μονάδα του φθορισμόμετρου πραγματοποιείται από οπτικό σύστημα με διαφορετικά φίλτρα που επιτρέπει την ανίχνευση του σήματος, σε διαφορετικά μήκη κύματος ανάλογα με τη φθορίζουσα χρωστική που θα επιλεγεί και την ανίχνευση περισσότερων του ενός σήματος, από το ίδιο δείγμα. Η ανίχνευση του σήματος γίνεται ξεχωριστά για κάθε δείγμα καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης.
- Το σύστημα συνοδεύεται από υπολογιστή στον οποίο γίνεται η παρακολούθηση και η αποθήκευση των πληροφοριών κατά τη διάρκεια της αντίδρασης καθώς και όλων των παραμέτρων που σχετίζονται με την παρακολούθηση της πορείας της PCR (θερμοκρασία διαγραμματικά και ψηφιακά, σήμα φθορισμού δείγματος, καμπύλη κινητικής PCR, και τον αριθμό των κύκλων).
- Ο υπολογιστής διαθέτει λογισμικό για τον προγραμματισμό, τον έλεγχο, την παρακολούθηση και ανάλυση των δεδομένων.

#### *V. Πρωτόκολλα PCR πραγματικού χρόνου*

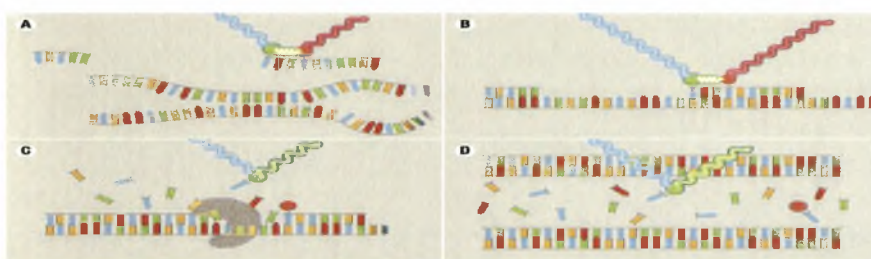
Οι εφαρμογές της RQ-PCR πραγματικού χρόνου είναι πολυάριθμες. Περιλαμβάνουν μελέτες για την έκφραση του mRNA, μετρήσεις αριθμού αντιγράφων σε γενωμικό ή ιϊκό DNA, μετρήσεις αριθμού διαγονιδιακών αντιγράφων, ποσοτικοποίηση χιμαιρικών μεταγράφων για την ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου σε ασθενείς με κακοήθειες, ανάλυση της έκφρασης των κυτταροκινών και πολλών άλλων παραγόντων<sup>195</sup>. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 2 κύριες τεχνικές RQ-PCR:

- ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης
- ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού



### A. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης

Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης (hydrolysis probes) εκμεταλλεύεται την 5'-3' ενεργότητα εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης για να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει τα ειδικά προϊόντα PCR που παράγονται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση. Ο ανιχνευτής υδρόλυσης είναι συζευγμένος με ένα φθορισμόχρωμα αναφοράς (π.χ. FAM) και με έναν καταστολέα φθορισμοχρώματος (π.χ. TAMRA), ο οποίος θα βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία-στόχο. Καθώς τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται σε μικρή απόσταση, όσο ο ανιχνευτής είναι άθικτος, ο φθορισμός που εκπέμπεται από το φθορισμόχρωμα αναφοράς απορροφάται από τον καταστολέα φθορισμού. Κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου, ο ανιχνευτής υδρόλυσης αντικαθίσταται αρχικά από την αλυσίδα DNA μέσω της Taq πολυμεράσης και σταδιακά υδρολύεται από αυτή λόγω της ενεργότητας εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης (Εικόνα 16). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό του φθορισμοχρώματος αναφοράς και του καταστολέα του και επιτρέπει τη σταδιακή ανίχνευση του φθορισμού που επέμπει το φθορισμόχρωμα αναφοράς<sup>196-198</sup>.

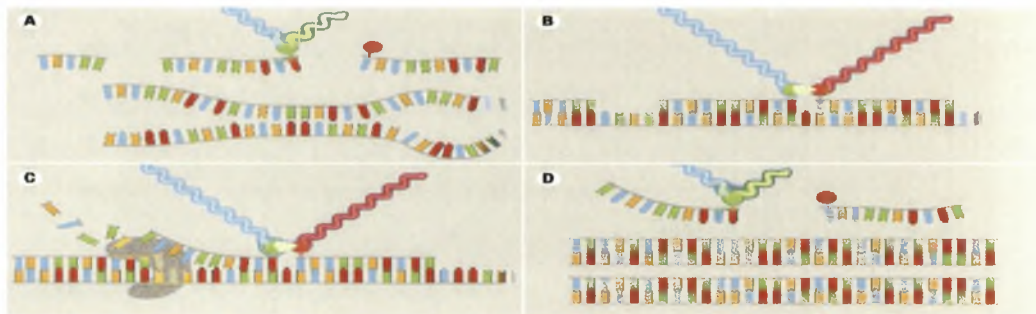


**Εικόνα 16:** Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υδρόλυσης.

### B. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού

Στην μελέτη μας εφαρμόσαμε την ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού. Η ανάλυση αυτή χρησιμοποιεί δύο αλληλοεπικαλυπτόμενους ανιχνευτές συγκεκριμένης αλληλουχίας. Ο ένας ανιχνευτής (δέκτης) είναι σημασμένος στο 5' άκρο με φθορισμόχρωμα LC Red 640. Ο άλλος ανιχνευτής (δότης) είναι σημασμένος στο 3' άκρο με φθορισμόχρωμα φλουορεσκίνη (Εικόνα 17). Οι δύο ανιχνευτές υβριδίζονται σε γειτονικές αλληλουχίες-στόχους στο πολυμερισμένο τμήμα DNA, οπότε τα δύο φθορισμοχρώματα συμπλησιάζουν (η απόσταση μεταξύ τους κυμαίνεται από 1-5 νουκλεοτίδια). Κατά την διέγερση του φθορισμοχρώματος-δότη, εκπέμπεται ακτινοβολία

μεγαλύτερου μήκους κύματος. Όταν τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται κοντά, το φως που εκπέμπεται από τον δότη θα διεγείρει το φθορισμόχρωμα του δέκτη, διαδικασία που αναφέρεται ως μεταφορά συντονισμένης ενέργειας φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Η προηγούμενη διαδικασία οδηγεί σε εκπομπή φθορισμού, ο οποίος ανιχνεύεται από τη συσκευή κατά το στάδιο υβριδοποίησης και στο πρώτο μέρος του σταδίου επιμήκυνσης της PCR<sup>196,198</sup>. Η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης υπάρχει η ένταση φθορισμού χωρίς ειδικότητα (background) και ο ειδικός φθορισμός. Το όριο στο οποίο ο ειδικός φθορισμός υπερβαίνει το background αποτελεί το διαχωριστικό σημείο (cut-off level). Ο κύκλος της PCR στον οποίο για πρώτη φορά ο φθορισμός υπερβαίνει το cut-off level ονομάζεται κύκλος μετάπτωσης, ενώ η τιμή των προϊόντων στον κύκλο αυτό είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι ανάλυσης με την RQ-PCR: η «σχετική» ποσοτικοποίηση και η ποσοτικοποίηση μέσω «πρότυπης καμπύλης» που καλείται επίσης και «απόλυτη» ποσοτικοποίηση<sup>199</sup>.



Εικόνα 17: Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υβριδισμού

#### IV. Σχετική ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT)

Για τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) εφαρμόστηκε η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού, με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit LightCycler TeloTAGGGhTERT Quantification Kit (Roche Molecular Diagnostics). Στην σχετική ποσοτικοποίηση γίνεται σύγκριση ανάμεσα στο δείγμα που αφορά το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και στο αντίστοιχο δείγμα που χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς. Για να ληφθεί μια στρογγυλοποιημένη τιμή για κάθε δείγμα, διαιρείται η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου που μας ενδιαφέρει προς τη συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς. Ο λόγος που προκύπτει είναι ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου προς μελέτη ως προς την

έκφραση του γονιδίου αναφοράς<sup>200</sup>. Συγκεκριμένα, ο υπολογισμός της σχετικής έκφρασης του hTERT επαναλήφθηκε 2 φορές για το ίδιο δείγμα. Από το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 200 ngr RNA, στα οποία πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή και PCR τόσο για το γονίδιο hTERT όσο και για το γονίδιο αναφοράς PBGD. Αναλυτικότερα:

- το mRNA του γονιδίου hTERT μεταγράφηκε αντίστροφα και ένα τμήμα 198 ζευγών βάσεων ενισχύθηκε με ειδικούς εκκινητές. Το προϊόν της αντίδρασης ανιχνεύθηκε μέσω φθορισμού, με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων ανιχνευτών, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Οι ανιχνευτές, που αποτελούνται από δύο διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια, προσδένονται λόγω συμπληρωματικότητας σε μια εσωτερική αλληλουχία του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος κατά τη διάρκεια της φάσης της υβριδοποίησης του εκκινητή. Με την τεχνική αυτή ανιχνεύονται μόνο τα λειτουργικά μετάγραφα του γονιδίου hTERT και όχι προϊόντα που πιθανόν να προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα (ωρίμανση) του πρόδρομου mRNA του γονιδίου. Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για το γονίδιο hTERT περιέχει:

➤ δις απεσταγμένο νερό	→	12.9	μl
➤ hTERT διάλυμα αντίδρασης	→	2	μl
➤ αντίστροφη μεταγραφάση	→	0.1	μl
➤ γλυκοζυλάση (UNG)	→	1	μl
➤ hTERT διάλυμα ανίχνευσης	→	2	μl
➤ RNA	→	2	μl (200 ngr)

- το mRNA του γονιδίου αναφοράς (PBGD) μεταγράφηκε αντίστροφα και ένα τμήμα 148 ζευγών βάσεων ενισχύθηκε με ειδικούς εκκινητές. Το προϊόν της αντίδρασης ανιχνεύθηκε μέσω φθορισμού, όπως και στην περίπτωση του γονιδίου του hTERT. Το γονίδιο PBGD εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (11q24.1-q24.2). Το PBGD κωδικοποιεί τη σύνθεση δύο ειδών mRNA, τα οποία εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς από το ίδιο γονίδιο. Ένα μετάγραφο mRNA εκφράζεται μόνο στα ερυθροποιητικά κύτταρα και κωδικοποιεί τη σύνθεση ενός ενζύμου που συμμετέχει στο βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης της αίμης. Το μετάγραφο του γονιδίου αναφοράς, που χρησιμοποιήθηκε στη δική μας μελέτη, εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Η επιλογή του γονιδίου PBGD πραγματοποιήθηκε με βάση το γεγονός ότι δεν έχει ψευδογονίδια και παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης, όπως και το γονίδιο hTERT<sup>201</sup>. Το προϊόν της ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς χρησιμεύει για τον

προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης του γονιδίου hTERT και για έλεγχο της ποιότητας του RNA, αφού στη μελέτη έχουν συμπεριληφθεί μόνο τα δείγματα στα οποία ενισχύθηκε επιτυχώς το γονίδιο PBGD.

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για το γονίδιο PBGD περιέχει:

- δισ απεσταγμένο νερό → 12.9 μl
- PBGD διάλυμα αντίδρασης → 2 μl
- αντίστροφη μεταγραφάση → 0.1 μl
- γλυκοζυλάση (UNG) → 1 μl
- PBGD διάλυμα ανίχνευσης → 2 μl
- RNA → 2 μl (200 ngr)

▪ Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- 10 λεπτά στους 60°C, για να πραγματοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή και η δημιουργία του cDNA
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
  - αποδιάταξη στους 95°C για 1 δευτερόλεπτο
  - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60°C για 10 δευτερόλεπτα
  - επιμήκυνση στους 72°C για 2 δευτερόλεπτα.

Όπως αναφέρθηκε, η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την συσκευή και το λογισμικό του Light Cycler. Κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη με βάση δείγματα που περιείχαν  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  και  $10^2$  αντίγραφα του mRNA του hTERT ανά 2 μl.

Με την παραπάνω τεχνική πραγματοποιείται προσδιορισμός του προϊόντος την στιγμή της σύνθεσής τους και όχι αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση της PCR<sup>202</sup>. Τελικά η τιμή που προκύπτει από το λόγο των αντιγράφων των mRNA του γονιδίου hTERT προς τα αντίγραφα των mRNA του γονιδίου PBGD, αποτελεί την «τροποποιημένη» τιμή του hTERT (NhTERT) και είναι ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου hTERT ως προς την έκφραση του PBGD.

### 2.1.9 Ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου του στελέχους 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων με την τεχνική της ποσοτικής PCR

Ο προσδιορισμός των αντιγράφων του ιικού DNA πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή και το λογισμικό του Light Cycler (version 3.5; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) με βάση τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR). Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές σχεδιάστηκαν από την εταιρία TIB MOLBIOL (Βερολίνο, Γερμανία) και είναι οι ακόλουθοι:

Primer S: 5' TRYRKgYYYTAAACgAAAg 3',

Primer A/Probe LC: 5' TTCCACTTCAgWAYAgCCATA3'

Probe FL: 5' TATTTgAAAgCgAAgACAgCgggT X 3'

Σε κάθε αντίδραση τελικού όγκου 20μl χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις:

0.5μM του εκκινητή S

0.5μM του εκκινητή A/ανιχνευτή LC (το 5' άκρο του είναι σημασμένο με χρωστική LC κόκκινη, που απορροφά το μέγιστο στα 640nm)

0.15μM του ανιχνευτή FL ( το 3' άκρο του είναι σημασμένο με τη χρωστική φλουορεσκίνη που απορροφά το μέγιστο στα 530 nm)

3.5μM MgCl<sub>2</sub>

1 μg DNA

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ποσοτικοποίηση του HPV-16 περιέχει:

- |   |                                 |   |     |    |
|---|---------------------------------|---|-----|----|
| ➤ | δισ απεσταγμένο νερό            | → | 7.2 | μl |
| ➤ | διάλυμα αντίδρασης (Master MIX) | → | 2   | μl |
| ➤ | γλυκοζυλάση (UNG)               | → | 1   | μl |
| ➤ | MgCl <sub>2</sub>               | → | 1.8 | μl |
| ➤ | Εκκινητής S                     | → | 1   | μl |
| ➤ | Εκκινητής A/ανιχνευτή LC        | → | 1   | μl |
| ➤ | Ανιχνευτής                      | → | 1   | μl |
| ➤ | DNA                             | → | 1   | μg |
- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
    - Αρχική αποδιάταξη 95°C για 5 λεπτά
    - 80 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
      - αποδιάταξη στους 95°C για 5 δευτερόλεπτο

-υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 55°C για 10 δευτερόλεπτα

-επιμήκυνση στους 72°C για 15 δευτερόλεπτα.

Η μέτρηση της φλουορεσκίνης πραγματοποιήθηκε στο τέλος του σταδίου της σύνδεσης-υβριδισμού.

Για να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα της μεθόδου πραγματοποιήθηκε ανάλυση πρότυπης καμπύλης τήξεως (melting curve analysis) μετά το τέλος της αντίδρασης,

- Οι συνθήκες για την πρότυπη καμπύλη τήξεως που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- 1 κύκλος κατά τον οποίο πραγματοποιείται σε τρία στάδια:

- αποδιάταξη στους 95°C για 20 δευτερόλεπτα

- υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 50°C για 20 δευτερόλεπτα

- επιμήκυνση στους 75°C για 1 δευτερόλεπτο.

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA του στελέχους 16 του ιού HPV, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες-δείγματα χωρίς DNA.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιϊκού DNA πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης που δημιουργήθηκε από διαδοχικές αραιώσεις πλασμιδιακού DNA του στελέχους 16 του ιού HPV γνωστής αρχικής συγκέντρωσης, από  $10^7$  έως  $10^1$  αντίγραφα του HPV 16 DNA. Κάθε δείγμα μετρήθηκε τουλάχιστον δύο φορές. Η ποσότητα του γονιδιώματος που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά υπολογίστηκε από το λόγο της ποσότητας του DNA προς το βάρος που αντιστοιχεί στο γονιδίωμα ενός κυττάρου και είναι ίσο με 6.6pg για κάθε κύτταρο. Η συγκέντρωση του DNA του ιϊκού φορτίου υπολογίστηκε από την ποσότητα που ανιχνεύτηκε προς τα μg του DNA που χρησιμοποιήθηκαν και εκφράστηκε ως αντίγραφα του DNA του ιού ανά μg του γενωμικού DNA.

### 2.1.10 Ανίχνευση των E6 και E7 mRNA μεταγράφων του ιού με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR)

Για την ανίχνευση των μεταγράφων E6 και E7 πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε cDNA με τη χρήση ειδικών εκκινητών για το στέλεχος 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη αντίδραση ήταν:

HPV 16A: 5'-GGGCGTAACCGAAAACGG -3' και

HPV 16B: 5'-TCCTCCTCCTCTGAGCTGTC -3'

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση της έκφρασης των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 (E6/E7±E6\*) (481bp) περιέχει:

- |                               |   |     |    |
|-------------------------------|---|-----|----|
| ➤ cDNA                        | → | 3   | μl |
| ➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 10x      | → | 2.5 | μl |
| ➤ MgCl <sub>2</sub> (50mM)    | → | 2   | μl |
| ➤ Εκκινητής HPV 16A (50p/mol) | → | 2   | μl |
| ➤ Εκκινητής HPV 16B (50p/mol) | → | 2   | μl |
| ➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια       | → | 1   | μl |
| ➤ DNA πολυμεράση              | → | 0.5 | μl |
| ➤ δις απεσταγμένο νερό        | → | 12  | μl |
- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
    - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά
    - 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
      - αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό
      - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 40°C για 1 λεπτό
      - επιμήκυνση στους 72°C για 2 λεπτά
    - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

Η δεύτερη αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του προϊόντος της παραπάνω αντίδρασης με τη χρήση εσωτερικών εκκινητών (nested PCR). Αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής HPV 16B και ενός νέου εκκινητή HPV 16A': 5' CACAGTTATGCACAGAGCTGC 3'.

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση της έκφρασης των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 (E6/E7±E6\*) καθώς και των μεταγράφων E6\*I και E6\*II (299bp και 182bp αντίστοιχα) που κωδικοποιούν την ογκοπρωτεΐνη E7 περιέχει:

- |                                |   |     |    |
|--------------------------------|---|-----|----|
| ➤ cDNA                         | → | 3   | μl |
| ➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 10x       | → | 2.5 | μl |
| ➤ MgCl <sub>2</sub> (50mM)     | → | 1   | μl |
| ➤ Εκκινητής HPV 16A' (50p/mol) | → | 2   | μl |
| ➤ Εκκινητής HPV 16B (50p/mol)  | → | 2   | μl |
| ➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια        | → | 1   | μl |
| ➤ DNA πολυμεράση               | → | 0.5 | μl |
| ➤ δις απεσταγμένο νερό         | → | 12  | μl |
- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
    - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά
    - 35 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
      - αποδιάταξη στους 94°C για 1 λεπτό
      - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 56°C για 45 δευτερόλεπτα
      - επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό
    - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

#### 2.1.11 Μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT)

Έγινε επεξεργασία του DNA με άλατα θειικού νατρίου σε αλκαλικό περιβάλλον<sup>203</sup>. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- επεξεργασία 1 μgr DNA με 3M NaOH και επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
- Προσθήκη 10 mM υδροκουινόνης και 3M αλάτων θειικού νατρίου και επώαση στους 50°C για 16 ώρες.
- Κατακρήμνιση του DNA με την χρήση εμπορικά διαθέσιμου αντιδραστηρίου (Wizard DNA Clean-up system- Promega).
- Έκλυση του DNA με προσθήκη 50 μl προθερμαινόμενου νερού (65-70°C) και 5.5 μl NaOH.
- Προσθήκη 1.2 μl γλυκογόνου και 3 όγκους 100% κρύας αιθανόλης για την βελτίωση της κατακρήμνισης του DNA



- Τοποθέτηση στους -20°C για 12-16 ώρες
- Φυγοκέντρηση στους 4°C για μισή ώρα και αφαίρεση υπερκειμένου
- Επαναδιάλυση του ιζήματος με προσθήκη 20 μl δις απεσταγμένου H<sub>2</sub>O

Η παραπάνω διαδικασία έχει το εξής αποτέλεσμα: η μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη μετατρέπεται σε ουρακίλη, σε όλο το γονιδίωμα, ενώ παράλληλα οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες δεν επηρεάζονται καθόλου. Με αυτόν τον τρόπο οι δύο αλυσίδες του DNA δεν είναι πια συμπληρωματικές. Συνήθως πολλαπλασιάζεται η μία από τις δύο αλυσίδες με βάση την οποία σχεδιάζονται και οι εκκινητές (primers).

Οι παραπάνω διαφορές μπορούν να ανιχνευθούν με ποσοτική PCR στηριζόμενη σε φθορισμό. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης. Σύμφωνα με αυτή κατασκευάζονται 2 ζεύγη εκκινητών (primers) και ανιχνευτών (probes), τα οποία χρησιμοποιούνται παράλληλα: τόσο για το μεθυλιωμένο DNA του υποκινητή του γονιδίου hTERT, όσο και για ένα γονίδιο αναφοράς που απαιτείται για τον εσωτερικό έλεγχο της ποιότητας/ ποσότητας του DNA σε κάθε δείγμα. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η β-ακτίνη. Το γονίδιο αναφοράς που επιλέγεται θα πρέπει να μην εδράζεται σε φυλετικό χρωμόσωμα ή σε θέση με γενετική αστάθεια, προϋποθέσεις που πληρεί το γονίδιο της β-ακτίνης.

Αναλυτικότερα, οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

#### α) hTERT:

Εκκινητής 1: 5'-GCGTCCGAGGTTAAGGTTGTT-3' (forward primer),

Εκκινητής 2: 5'-CTCTCCAAAATTACCGTACGCG-3' (reverse primer),

Ανιχνευτής 1: 5'-6FAM-AACTCGCTCGCCCGCCGAA-BHQ-1-3' (probe)

#### β) Ακτίνη:

Εκκινητής 3: 5'TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT3' (forward),

Εκκινητής 4: 5'AACCAATAAACCTACTCCTCCCTTAA3' (reverse),

Ανιχνευτής 2: 5'6FAM-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-TAMRA 3'(probe)

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ποσοτικοποίηση του μεθυλιωμένου γονιδίου της hTERT περιέχει:

➤	δισ απεσταγμένο νερό	→	9	μl
➤	διάλυμα αντίδρασης (Master MIX)	→	2	μl
➤	γλυκοζυλάση (UNG)	→	1	μl
➤	MgCl <sub>2</sub>	→	1.6	μl
➤	Εκκινητής 1	→	1	μl
➤	Εκκινητής 2	→	1	μl
➤	Ανίχνευτής 1	→	0.5	μl
➤	DNA	→	3	μl

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ποσοτικοποίηση του μεθυλιωμένου γονιδίου της ακτίνης περιέχει:

➤	δισ απεσταγμένο νερό	→	9.9	μl
➤	διάλυμα αντίδρασης (Master MIX)	→	2	μl
➤	γλυκοζυλάση (UNG)	→	1	μl
➤	MgCl <sub>2</sub>	→	1.8	μl
➤	Εκκινητής 3	→	1	μl
➤	Εκκινητής 4	→	1	μl
➤	Ανίχνευτής 2	→	0.5	μl
➤	DNA	→	3	μl

▪ Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Αρχική αποδιάταξη 95°C για 5 λεπτά
- 80 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
  - αποδιάταξη στους 95°C για 3 δευτερόλεπτο
  - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 58°C για 30 δευτερόλεπτα
  - επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα.

Σε κάθε αντίδραση θα πρέπει να τονιστεί ότι είναι απαραίτητο να κατασκευαστεί μια πρότυπη καμπύλη με διαδοχικές αραιώσεις που θα προέλθουν από ανάμιξη πλήρως μεθυλιωμένου γενωμικού DNA με πλήρως μη μεθυλιωμένο DNA. Ως πλήρως μεθυλιωμένο DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί γενωμικό DNA που έχει επεξεργασθεί με την SssI DNA μεθυλοτρανσφεράση (New England Biolabs), η οποία αναγνωρίζει το

δινουκλεοτίδιο CpG, ενώ ως πλήρως μη μεθυλιωμένο DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί το DNA του ανθρώπινου σπέρματος. Κατά τη μέτρηση του ποσοστού της μεθυλίωσης θα πρέπει να προκύψει μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ του συντελεστή αραιώσης και των επιπέδων μεθυλίωσης.

Η λογική της χρήσης των ανιχνευτών υδρόλυσης έχει αναλυθεί παραπάνω (κεφάλαιο 2.1.8-ενότητα V). Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Με βάση την ένταση του φθορισμού χωρίς ειδικότητα (background), καθορίστηκε το διαχωριστικό σημείο ή ουδός (cut-off level) για τον ειδικό φθορισμό. Αυτό το όριο (ή γραμμή μετάπτωσης) χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο κύκλος μετάπτωσης (Ct) κάθε δείγματος, που είναι ο κύκλος της αντίδρασης PCR στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει για πρώτη φορά τον ουδό μετάβασης. Η τιμή μετάπτωσης είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα<sup>204,205</sup>.

Αρχικά, σε κάθε δείγμα υπολογίζουμε την αναλογία του ποσοστού μεθυλίωσης στο γονίδιο hTERT προς το ποσοστό μεθυλίωσης στο γονίδιο αναφοράς. Στη συνέχεια, στο επεξεργασμένο με Sssl γενωμικό DNA υπολογίζουμε την αναλογία του ποσοστού μεθυλίωσης στο γονίδιο hTERT προς το ποσοστό μεθυλίωσης στο γονίδιο αναφοράς. Τελικά, η τιμή του σχετικού ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT αποδίδεται με τον όρο PMR (percent of methylated reference), το οποίο είναι το πηλίκο της αναλογίας hTERT/β-ακτίνη του δείγματος προς την αναλογία hTERT/β-ακτίνη του επεξεργασμένου με Sssl γενωμικού DNA πολλαπλασιαζόμενο με το 100. Όταν η τιμή PMR είναι μεγαλύτερη του μηδενός τότε το τμήμα του γονιδίου που μελετήθηκε θεωρείται μεθυλιωμένο. Για την πιστοποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων γινόταν πάντα σύγκριση της αναλογίας hTERT/β-ακτίνη του επεξεργασμένου με Sssl γενωμικού DNA.

#### *VII. Εύρεση της αλληλουχίας των βάσεων (sequencing)*

Στα δείγματα στα οποία μετρήθηκε το ποσοστό της μεθυλίωσης εφαρμόστηκε και η μέθοδος της ανάλυσης της αλληλουχίας των βάσεων, ώστε να βρεθούν και ποιοτικά ποιές ακριβώς CpG περιοχές είναι μεθυλιωμένες. Η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων έγινε με την συσκευή ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA), αφού είχε προηγηθεί η ενίσχυση των τμημάτων DNA μετά από επεξεργασία τους με άλατα θειικού νατρίου σε αλκαλικό περιβάλλον<sup>203</sup>.

### 2.1.12 Αξιολόγηση των δοκιμασιών ως προς τη χρήση τους ως πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες.

Για την αξιολόγηση των δοκιμασιών υπολογίστηκαν τα χαρακτηριστικά των διαγνωστικών δοκιμασιών: ευαισθησία (sensitivity), ειδικότητα (specificity), θετική προγνωστική τιμή-ΘΠΤ (positive predictive value-PPV) και αρνητική προγνωστική τιμή-ΑΠΤ (negative predictive value-NPV). Τα χαρακτηριστικά των διαγνωστικών δοκιμασιών υπολογίστηκαν από τις αναλογίες των γυναικών με φυσιολογικά προς παθολογικά (ASCUS, LGSIL, HGSIL) τραχηλικά επιχρίσματα σύμφωνα με τους παρακάτω τύπους<sup>206</sup>:

**Ευαισθησία:** το σύνολο των γυναικών που είχαν την ασθένεια και ήταν θετικές στη διαγνωστική δοκιμασία προς το σύνολο των ατόμων που είχαν την ασθένεια.

**Ειδικότητα:** το σύνολο των γυναικών που δεν είχαν την ασθένεια και ήταν αρνητικές στη διαγνωστική δοκιμασία προς το σύνολο των ατόμων που δεν είχαν την ασθένεια.

**Θετική Προγνωστική Τιμή:** η πιθανότητα μια γυναίκα που είναι θετική για μια δοκιμασία να έχει την ασθένεια.

**Αρνητική Προγνωστική Τιμή:** η πιθανότητα μια γυναίκα που είναι αρνητική για μια δοκιμασία να μην έχει την ασθένεια.

**Μια δοκιμασία μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει διαγνωστική αξία όταν όλες οι παραπάνω τιμές προσεγγίζουν το 100%.**

### 2.1.13 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS 12 και αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες δοκιμασίες:

- unipaired t-test,
- Mann-Whitney U (MWU),
- Kruskal – Wallis,
- analysis of variance (ANOVA)
- Fisher PLSD;
- the post-hoc test

Οι τιμές του  $p < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Αναλυτικότερα, προκειμένου να διεξαχθούν συμπεράσματα έγιναν και οι παρακάτω συσχετίσεις μεταξύ:

- παρουσίας του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων με τα κυτταρολογικά ευρήματα
- ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης με την παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων και με τα κυτταρολογικά ευρήματα
- ποσοτικοποίησης της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT) με την ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης, την παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων και με τα κυτταρολογικά ευρήματα
- ποσοτικοποίησης του ιϊκού φορτίου (DNA) του HPV-16 με την ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT) και με τα κυτταρολογικά ευρήματα
- έκφρασης των E6 και E7 mRNA του HPV-16 με την ποσοτικοποίηση του ιϊκού φορτίου (DNA) του HPV-16, την ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT) και με τα κυτταρολογικά ευρήματα.
- προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή της hTERT με την ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT) και με τα κυτταρολογικά ευρήματα.



## 2.2. Αποτελέσματα

### 2.2.1 Κυτταρολογική (κατά Bethesda) και ιστολογική (βιοψίες) ανάλυση τραχηλικών επιχρισμάτων.

Η μελέτη συμπεριλαμβάνει συνολικά 325 τραχηλικά επιχρίσματα από τα οποία 280 ήταν με παθολογικά ευρήματα και 45 φυσιολογικά. Από τα τραχηλικά επιχρίσματα με παθολογικά ευρήματα τα 73 (26%) είχαν διαγνωσθεί ως άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας (*Atypical Squamous epithelial Cells of Undetermined Significance* -ASCUS), τα 156 (55.7%) είχαν διαγνωσθεί με χαμηλού βαθμού δυσπλασίες (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions* -LGSILs) και τα 51 (18.3%) με υψηλού βαθμού δυσπλασίες (*High Grade Squamous Intraepithelial Lesions* -HGSILs). Από το σύνολο των τραχηλικών επιχρισμάτων με ASCUS, τα 15 (20.5%) ταξινομήθηκαν μετά από ιστολογική ανάλυση βιοψίας με ελαφρά μορφή ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας (*Cervical Intraepithelial Neoplasia* -CIN 1), ενώ μόνο μία περίπτωση διαγνώσθηκε με μέτρια μορφή ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας (CIN 2). Οι 153 περιπτώσεις από τις 156 (ποσοστό 98%) ταξινομήθηκαν με ελαφρά μορφή ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας CIN 1, 2 (1.3%) με μέτρια μορφή (CIN 2) και μία περίπτωση (0.6%) με βαρεία μορφή ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN 3). Σε σαράντα από τις 51 (78.4%) HGSIL περιπτώσεις διαγνώσθηκε μέτρια μορφή CIN 2, ενώ στα υπόλοιπα 11 (21.6%) παρατηρήθηκε βαρείας μορφής ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN 3). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Συνοπτική παρουσίαση των κυτταρολογικών και ιστολογικών ευρημάτων του συνόλου των τραχηλικών επιχρισμάτων της μελέτης.

ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ				
	Αρνητικά για δυσπλασία	CIN 1	CIN 2	CIN 3	Σύνολο
Φυσιολογικά	45/45 (100%)	0/45 (0%)	0/45 (0%)	0/45 (0%)	45
ASCUS	57/73 (78.1%)	15/73 (20.5%)	1/73 (1.4)	0/73 (0%)	73
LGSIL	0/156 (0%)	153/156 (98%)	2/156 (1.3%)	1/156 (0.6%)	156
HGSIL	0/51 (0%)	0/51 (0%)	40/51 (78.4%)	11/51 (21.6%)	51
Σύνολο	102/325 (31.4%)	168/325 (51.7)	43/325 (13.2%)	12/325 (3.7%)	325

### **2.2.11 Ανίχνευση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human PapillomaVirus-HPV) στα τραχηλικά επιχρίσματα και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα.**

Από την ανάλυση των τραχηλικών επιχρισμάτων για την ανίχνευση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human PapillomaVirus-HPV) προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα. Από το σύνολο των τραχηλικών επιχρισμάτων που μελετήθηκαν, η παρουσία του ιού HPV ανιχνεύτηκε σε 245 από τα 325, ποσοστό 75.4%. Αναλυτικότερα σε 10 από τα 45 φυσιολογικά (ποσοστό 22.2%) και σε 235 από τα 280 παθολογικά δείγματα (ποσοστό 84%) που μελετήθηκαν βρέθηκαν θετικά στη μόλυνση. Τα στελέχη υψηλού κινδύνου HPV-16, 18, 31, 33, 45, 61 και 58 ανιχνεύτηκαν σε 105 από τα 280 παθολογικά τραχηλικά επιχρίσματα (ποσοστό 37.5%) και σε 2 από τα 45 φυσιολογικά επιχρίσματα (ποσοστό 4.4%). Αντίστοιχα, τα στελέχη χαμηλού κινδύνου HPV-6, 11, 53, 54, CP141, CP8304 ανιχνεύτηκαν σε 85 από τα 280 παθολογικά τραχηλικά επιχρίσματα (ποσοστό 30.3%) και σε 8 από τα 45 φυσιολογικά επιχρίσματα (ποσοστό 17.7%). Σε τριάντα πέντε (35) από τα 280 παθολογικά τραχηλικά επιχρίσματα (ποσοστό 12.5%) ανιχνεύτηκαν στελέχη του ιού που δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίησή τους (unclassified), ενώ 55 από τα 280 (19.6%) ήταν αρνητικά για τον ιό. Στα περισσότερα τραχηλικά επιχρίσματα ανιχνεύτηκε ένα μόνο στέλεχος του ιού, ενώ σε μόνο 5 από τα 245, (ποσοστό 2%), ανιχνεύτηκαν πολλαπλές μολύνσεις με δύο στελέχη του ιού. Το στέλεχος του ιού HPV-16 εντοπίστηκε με τη μεγαλύτερη συχνότητα σε 51 από το σύνολο των 325 δειγμάτων που μελετήθηκαν (ποσοστό 15.7%). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Από την στατιστική επεξεργασία των παραπάνω δεδομένων παρατηρήθηκε συσχέτιση των θετικά μολυσμένων δειγμάτων με τα κυτταρολογικά ευρήματα. Ειδικότερα, η παρουσία των στελεχών υψηλού κινδύνου (high risk HPV types) συσχετίστηκε με τα τραχηλικά επιχρίσματα που φέρουν υψηλού βαθμού δυσπλασία (HGSIL) ( $p < 0.05$ ), ενώ τα στελέχη χαμηλού κινδύνου (low risk HPV types) με τα τραχηλικά επιχρίσματα που φέρουν χαμηλού βαθμού δυσπλασία (LGSIL) ( $p < 0.05$ ).

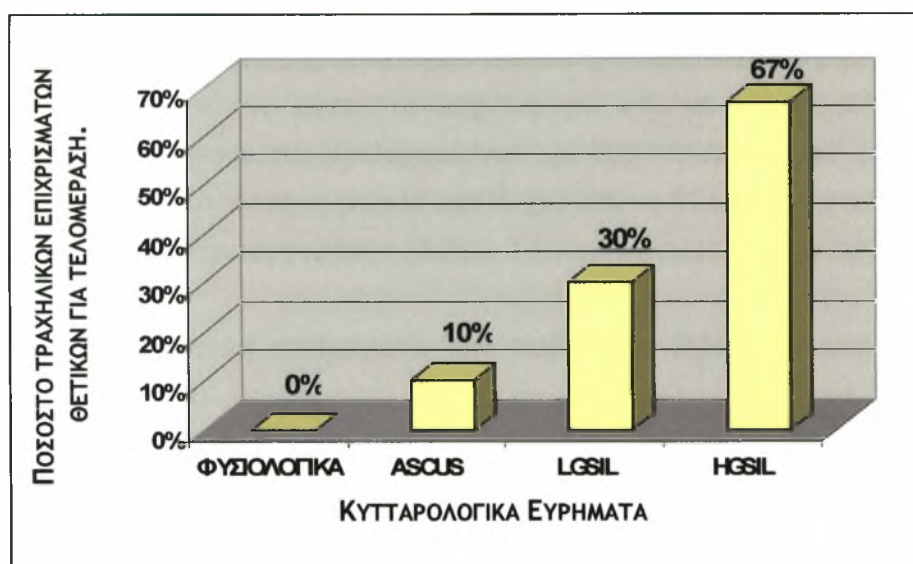


Πίνακας 5: Συνοπτική παρουσίαση των τραχηλικών επιχρισμάτων ανάλογα με την μόλυνση από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων.

ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΙΟ HPV				Σύνολο
	Αρνητικά	Στελέχη χαμηλού κινδύνου 6, 11, 53, 54 CP141, CP 8304	Στελέχη υψηλού κινδύνου 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 58,61,	Μη ταυτοποιημένα στελέχη	
<b>Φυσιολογικά</b>	35/45 (77.8%)	8/45 (17.8%)	2/45 (4.4%)	0/45 (0%)	45
<b>ASCUS</b>	25/73 (34.2%)	28/73 (38.4%)	11/73 (15.1%)	9/73 (12.3%)	73
<b>LGSIL</b>	30/156 (12.8%)	45/156 (25.6%)	57/156 (36.5%)	24/156 (15.4%)	156
<b>HGSIL</b>	0/51 (0%)	12/51 (23.5%)	37/51 (72.5%)	2/51 (4%)	51
<b>Σύνολο</b>	90/325 (27.6%)	93/325 (28.6%)	107/325 (33%)	35/325 (10.8%)	325

### 2.2.12 Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP (Telomeric Repeat Protocol Assay) και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα και τη μόλυνση με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων.

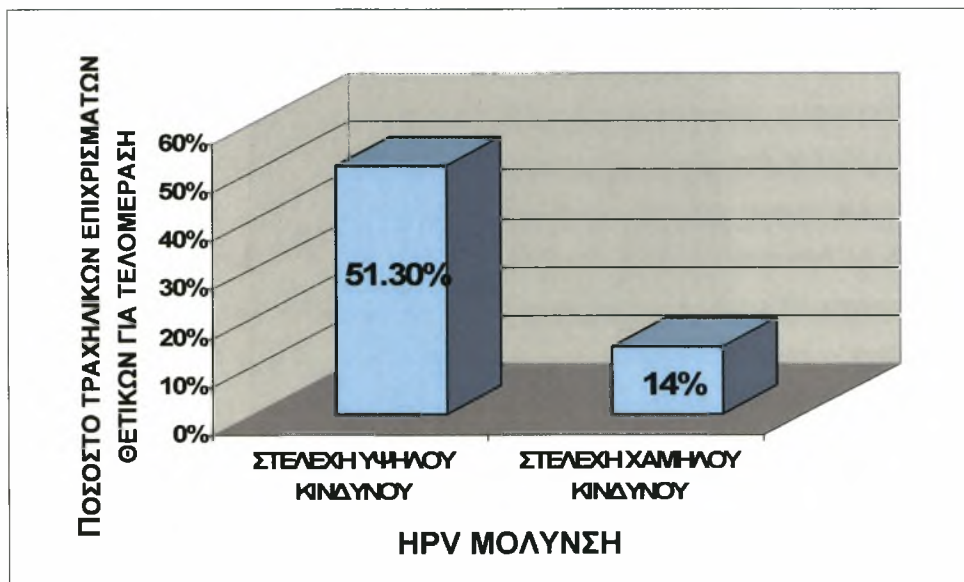
Από το σύνολο των 325 δειγμάτων που μελετήθηκαν, η ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης ανιχνεύτηκε σε 89 από τα 280 παθολογικά τραχηλικά επιχρίσματα (ποσοστό 31.7%), ενώ δεν παρατηρήθηκε ενεργότητα του ενζύμου σε κανένα από τα φυσιολογικά. Αναλυτικότερα η τελομεράση ανιχνεύτηκε σε 8 από τα 73 ASCUS δείγματα (ποσοστό 10%), σε 47 από τα 156 LGSIL δείγματα (ποσοστό 30%) και σε 34 από τα 51 HGSIL (ποσοστό 67%). Τα αποτελέσματα της ανίχνευσης της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης συσχετίστηκαν με τα κυτταρολογικά ευρήματα και διαπιστώθηκε συσχέτιση της ενεργότητας της τελομεράσης με τα τραχηλικά επιχρίσματα στα οποία εντοπίζονται υψηλού βαθμού δυσπλασίες (HGSIL) ( $p < 0.01$ ) (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Συσχέτιση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης (TRAP) με τα κυτταρολογικά ευρήματα.

Η ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης συσχετίστηκε και με την παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων. Αναλυτικότερα η τελομεράση ανιχνεύτηκε σε 73 από τις 143 (ποσοστό 51.3%) περιπτώσεις μόλυνσης με τα στελέχη υψηλού κινδύνου HPV-16, 18, 61 και 31 και σε 14 από τις 102 (ποσοστό 14%) περιπτώσεις μόλυνσης με στελέχη χαμηλού κινδύνου και με μη τυποποιημένα. Μόνο σε 2 περιπτώσεις τραχηλικών

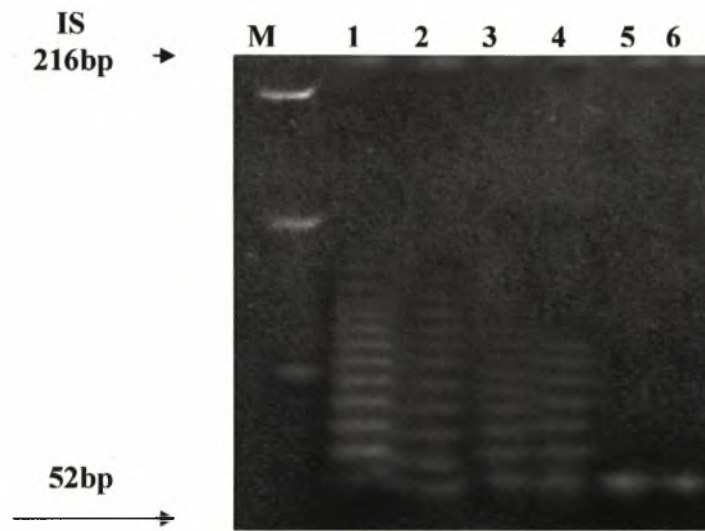
επιχρισμάτων αρνητικών για μόλυνση με τον ιό HPV, ανιχνεύτηκε η ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2: Συσχέτιση της έκφρασης της τελομεράσης με την παρουσία του ιού HPV.

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της έκφρασης της τελομεράσης και της μόλυνσης με τον ιό HPV, κυρίως με τα στελέχη υψηλού κινδύνου ( $p < 0.001$ ).

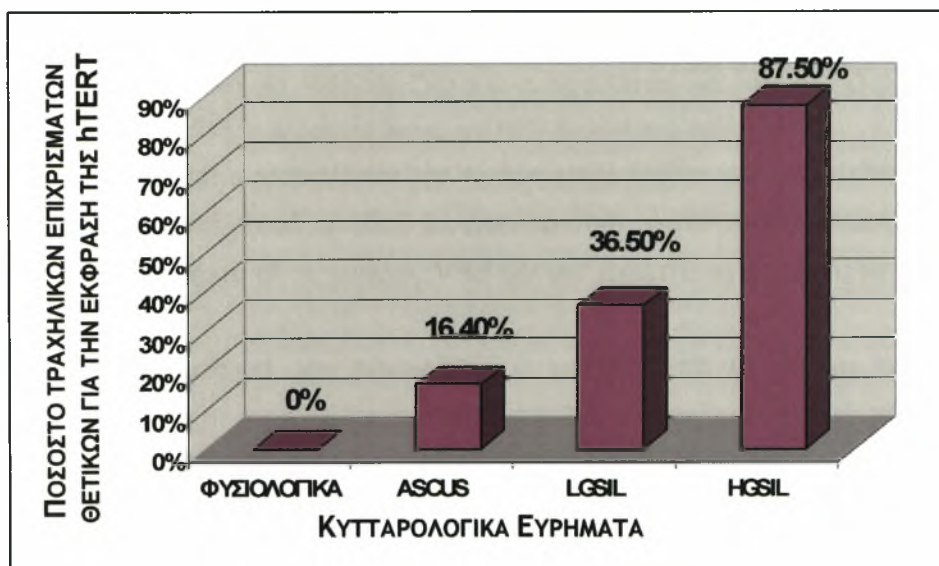
Στην Εικόνα 18 απεικονίζεται η ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP σε ενδεικτικά τραχηλικά επιχρίσματα μολυσμένα και μη μολυσμένα με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και στην εικόνα παρατηρείται η χαρακτηριστική τελομερική κλίμακα (ladder) 6 bp στα θετικά για την ενεργότητα του ενζύμου τραχηλικά επιχρίσματα.



**Εικόνα 18:** Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP σε τραχηλικά επιχρίσματα μολυσμένα και μη μολυσμένα με τον ιό HPV M: μάρτυρας, Στήλη 1: θετικό δείγμα υψηλής έκφρασης (διατίθεται από το kit), Στήλη 2: θετικό δείγμα χαμηλής έκφρασης (διατίθεται από το kit), Στήλη 3: Θετικό δείγμα μολυσμένο με τον ιό HPV-16, Στήλη 4: Θετικό δείγμα μολυσμένο με τον ιό HPV-18, Στήλη 5: Αρνητικό δείγμα μολυσμένο με τον ιό HPV-54 και Στήλη 6: Αρνητικό φυσιολογικό δείγμα.

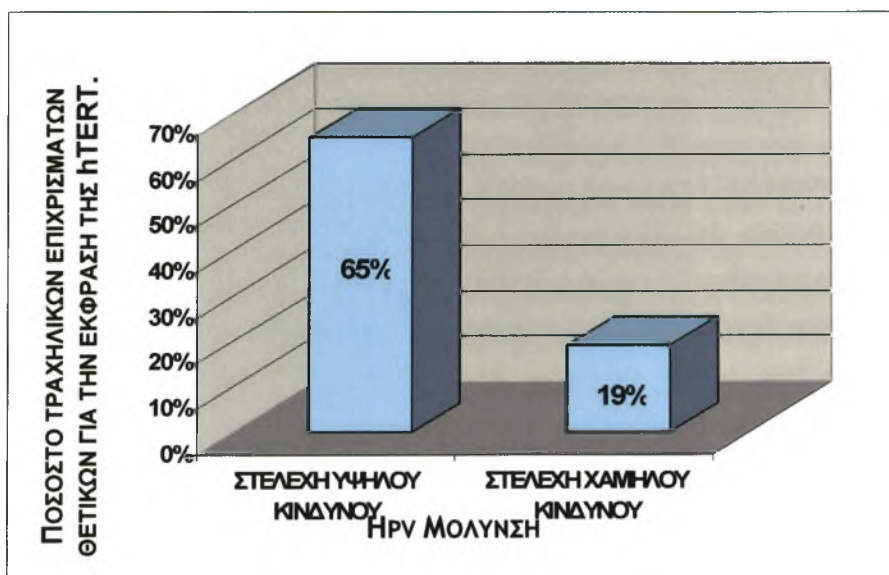
**2.2.13 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR) και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα και τη μόλυνση με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων.**

Η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT mRNA) ανιχνεύτηκε σε συνολικά 113 από τα 280 (ποσοστό 40.3%) παθολογικά τραχηλικά επιχρίσματα, ενώ δεν ανιχνεύτηκε σε φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα. Αναλυτικότερα, η έκφραση της παρατηρήθηκε 12 από τα 73 (ποσοστό 16.4%) ASCUS, σε 57 από τα 156 LGSIL (ποσοστό 36.5%) και σε 44 από τα 51 (ποσοστό 87.5%) τραχηλικά επιχρίσματα με υψηλού βαθμού δυσπλασίες (HGSIL) (Διάγραμμα 3). Από τα 113 τραχηλικά επιχρίσματα που βρέθηκαν θετικά για την έκφραση της hTERT, τα 84 ήταν θετικά και για την ενεργότητα του ενζύμου, ταύτιση σε ποσοστό 74.5%.



**Διάγραμμα 3:** Συσχέτιση των κυτταρολογικών ευρημάτων με την ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT).

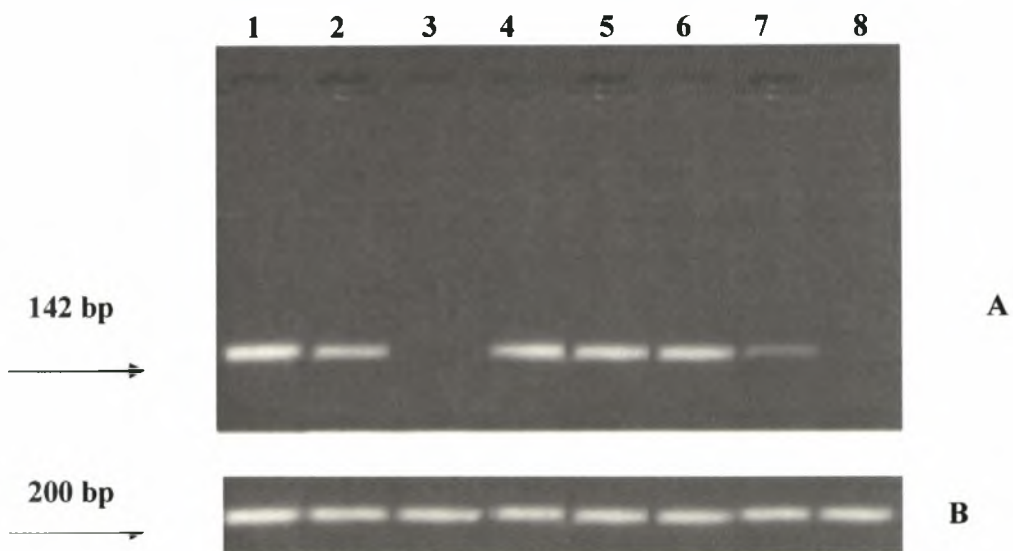
Η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης ανιχνεύτηκε σε 93 από τις 143 (ποσοστό 65%) περιπτώσεις με μόλυνση με τα στελέχη υψηλού κινδύνου HPV-16, 18, 61 και 31 και σε 19 από τις 102 (ποσοστό 19%) περιπτώσεις με μόλυνση με στελέχη χαμηλού κινδύνου (Διάγραμμα 4).



**Διάγραμμα 4:** Συσχέτιση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με την παρουσία του ιού HPV.

Η ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας του ενζύμου της τελομεράσης συσχετίστηκε τόσο με υψηλού βαθμού δυσπλασίες (HGSIL) ( $p < 0.01$ ) όσο και με τη μόλυνση με στελέχη του ιού HPV, κυρίως με τα στελέχη υψηλού κινδύνου ( $p < 0.001$ ).

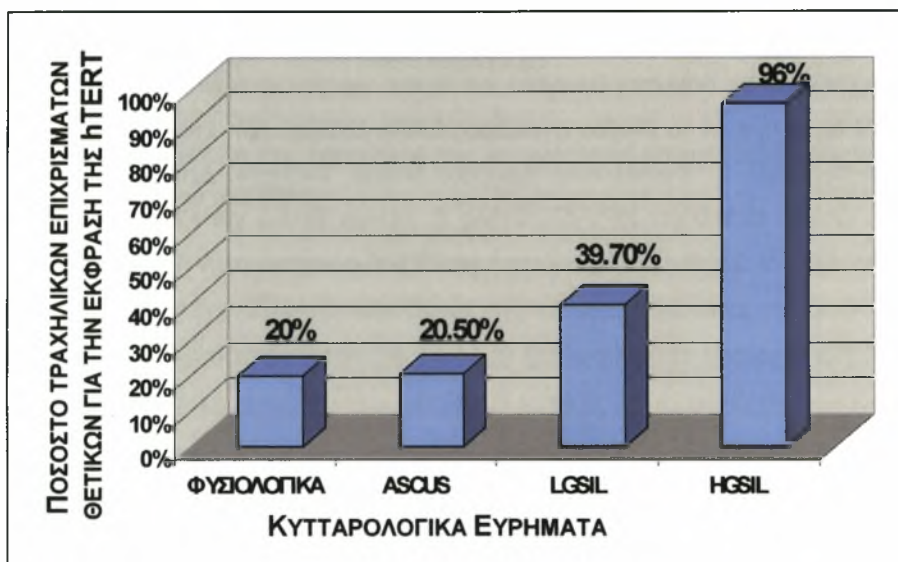
Στην εικόνα 19 απεικονίζεται η ανίχνευση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης σε ενδεικτικά δείγματα θετικά για τη μόλυνση με το ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων. Η παρουσία της ζώνης των 142bp δηλώνει ότι το δείγμα είναι θετικό για την ανίχνευση του mRNA της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT). Η παρουσία της ζώνης των 200bp αντιστοιχεί στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς RARa πιστοποιώντας την καλή ποιότητα του RNA.



**Εικόνα 19:** RT-PCR για την ανίχνευση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) (142bp) σε δείγματα αρνητικά και θετικά για τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) (A) σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς RARa (200bp) (B). Στήλη 1 και 2: Στήλη θετικό για HPV-16, Στήλη 3: Φυσιολογικό αρνητικό δείγμα, Στήλη 4: Δείγμα θετικό για HPV-45, Στήλη 5: Δείγμα θετικό για HPV-58, Στήλη 6: Δείγμα θετικό για HPV-61, Στήλη 7: Δείγμα θετικό για HPV-6b, Στήλη 8: Δείγμα θετικό για HPV-6-αρνητικό στην hTERT.

### 2.2.14 Ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) με την τεχνική της ποσοτικής PCR και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα και τη μόλυνση με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων

Ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας πραγματοποιήθηκε σε 126 από το σύνολο των 280 (ποσοστό 45%) παθολογικών τραχηλικών επιχρισμάτων και σε 9 από τα 45 (ποσοστό 20%) φυσιολογικά. Αναλυτικότερα, ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της έκφρασης της hTERT παρατηρήθηκε σε 15 από τα 73 ASCUS (ποσοστό 20.5%), σε 62 από τα 156 LGSIL (ποσοστό 39.7%), και σε 49 από τα 51 τραχηλικά επιχρίσματα με HGSIL (ποσοστό 96%)(Διάγραμμα 5).



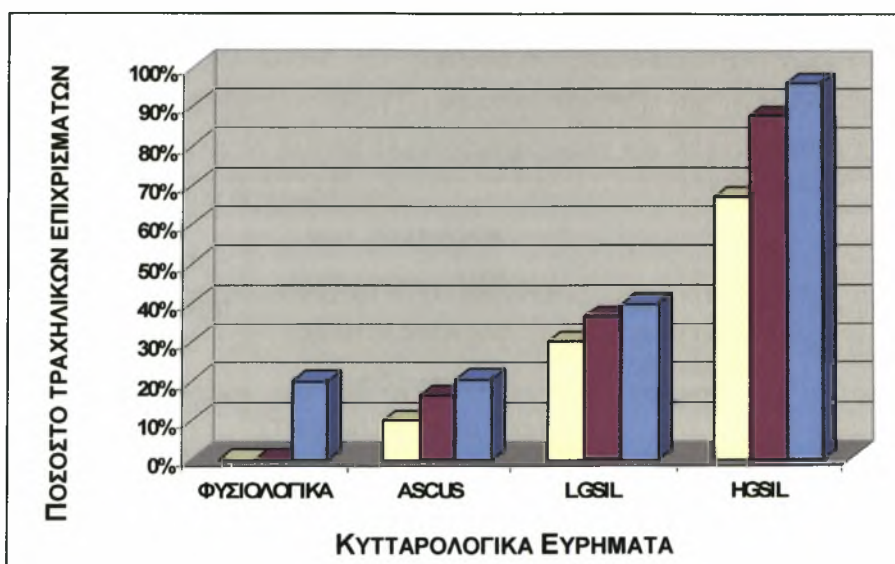
Διάγραμμα 5: Συσχέτιση των κυτταρολογικών ευρημάτων με τον ποσοτικό προσδιορισμό των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT).

Στον Πίνακα 6 και στο Διάγραμμα 6 παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα της ανίχνευσης του ενζύμου της τελομεράσης, της ανίχνευσης των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT) και του ποσοτικού προσδιορισμού των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας.



**Πίνακας 6:** Συγκριτικός πίνακας ανίχνευσης του ενζύμου της τελομεράσης, της ανίχνευσης των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης και του ποσοτικού προσδιορισμού των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας.

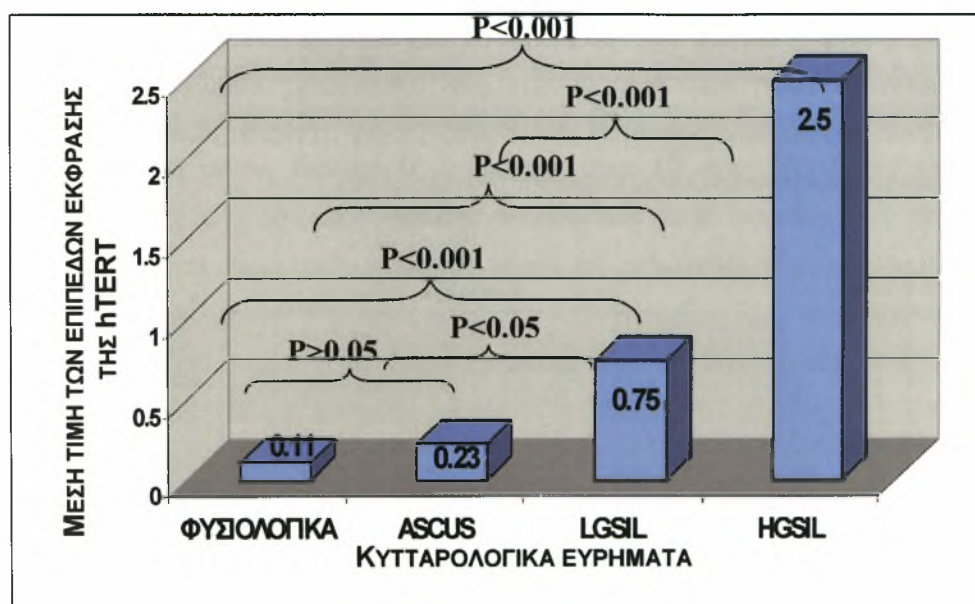
Κυτταρολογικά ευρήματα	Ανίχνευση της τελομεράσης (TRAP)	Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT)	Ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT)
Φυσιολογικά	0/45 (0%)	0/45 (0%)	9/45 (20%)
ASCUS	8/73 (10%)	12/73 (16.4%)	15/73 (20.5%)
LGSIL	47/156 (30%)	57/156 (36.5%)	62/156 (39.7%)
HGSIL	<b>34/51</b> <b>(67%)</b>	<b>44/51</b> <b>(87.5%)</b>	<b>49/51</b> <b>(96%)</b>
Σύνολο	89/325 (27.3%)	113/325 (34.7%)	135/325 (41.5%)



**Διάγραμμα 6:** Συγκριτικό διάγραμμα ανίχνευσης του ενζύμου της τελομεράσης, της ανίχνευσης των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης και του ποσοτικού προσδιορισμού των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται το ποσοστό των τραχηλικών επιχρισμάτων που βρέθηκαν θετικά στην ενεργότητα του ενζύμου μέσω της μεθόδου TRAP, με κόκκινο το ποσοστό των τραχηλικών επιχρισμάτων που βρέθηκαν θετικά στην ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης και με μπλε χρώμα το ποσοστό των τραχηλικών επιχρισμάτων που βρέθηκαν θετικά στον ποσοτικό προσδιορισμό των των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας (hTERT).

Οι διαφορές στη μέση τιμή έκφρασης της hTERT (λόγος του αριθμού των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης προς τον αριθμό των mRNA μεταγράφων του γονιδίου PBGD) σε κάθε μία από τις τέσσερις κυτταρολογικές ομάδες ήταν στατιστικά σημαντική. Η μέση τιμή έκφρασης των mRNA μεταγράφων στα φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα ήταν 0.11 (SEM=0.03, εύρος 0 - 0.8), στα τραχηλικά επιχρίσματα με ASCUS 0.23 (SEM=0.04, εύρος από 0 έως 1.6), στα αντίστοιχα LGSIL 0.75 (SEM=0.1, εύρος από 0 έως 4.5) και στα HGSIL 2.5 (SEM=0.17 εύρος από 0 έως 5.2). Στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης παρατηρήθηκε μεταξύ των φυσιολογικών και των τραχηλικών επιχρισμάτων με χαμηλού βαθμού δυσπλασίες (LGSIL)( $p < 0.001$ ), μεταξύ των φυσιολογικών και των τραχηλικών επιχρισμάτων με υψηλού βαθμού δυσπλασίες (HGSIL)( $p < 0.001$ ), μεταξύ των τραχηλικών επιχρισμάτων με άτυπα πλακώδη κύτταρα

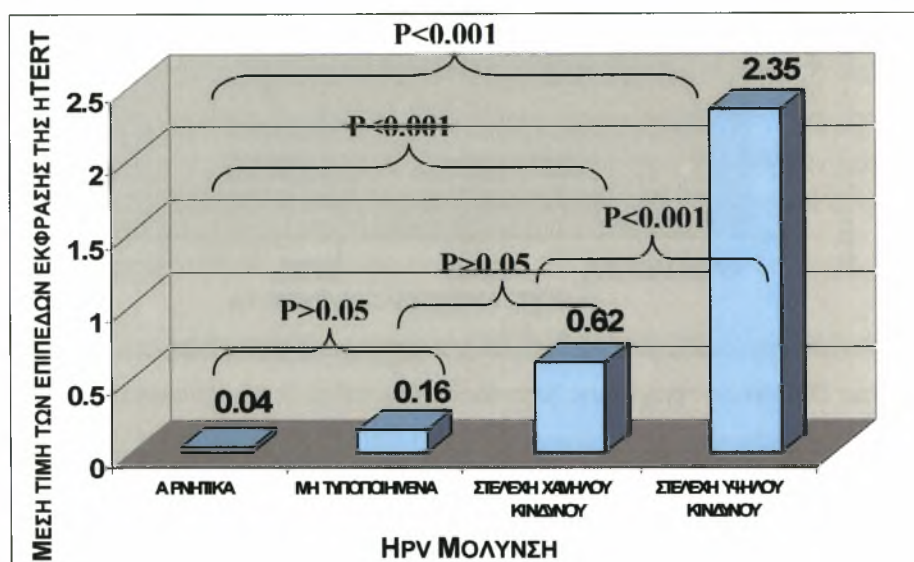
απροσδιορίστου σημασίας (ASCUS) και των τραχηλικών επιχρισμάτων με χαμηλού βαθμού δυσπλασίες (LGSIL)( $p < 0.05$ ), μεταξύ των τραχηλικών επιχρισμάτων με άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας (ASCUS) και των τραχηλικών επιχρισμάτων με υψηλού βαθμού δυσπλασίες (HGSIL)( $p < 0.001$ ) καθώς και μεταξύ των τραχηλικών επιχρισμάτων με χαμηλού βαθμού δυσπλασίες (LGSIL) και των τραχηλικών επιχρισμάτων με υψηλού βαθμού δυσπλασίες (HGSIL)( $p < 0.001$ ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των φυσιολογικών και των τραχηλικών επιχρισμάτων με άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας (ASCUS) ( $p > 0.05$ ) (Διάγραμμα 7).



**Διάγραμμα 7:** Μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (λόγος του αριθμού των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης προς τον αριθμό των mRNA μεταγράφων του γονιδίου PBGD) ανάλογα με τα κυτταρολογικά ευρήματα.

Τα επίπεδα έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης συσχετίστηκαν με την παρουσία του ιού HPV. Η μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης της hTERT ήταν 0.62 (SEM=0.13, εύρος από 0 έως 4.4) σε τραχηλικά επιχρίσματα στα οποία ανιχνεύτηκαν στελέχη χαμηλού κινδύνου του ιού HPV, 2.35 (SEM=0.17, εύρος από 0 έως 5.2) σε τραχηλικά επιχρίσματα στα οποία ανιχνεύτηκαν στελέχη υψηλού κινδύνου του ιού HPV, 0.16 (SEM=0.04, εύρος από 0 έως 1.3) σε τραχηλικά επιχρίσματα στα οποία ανιχνεύτηκαν μη τυποποιημένα στελέχη του ιού HPV and 0.04 (SEM=0.01, εύρος από 0 έως 0.6) σε τραχηλικά επιχρίσματα στα οποία δεν ανιχνεύτηκε ο ιός HPV. Η

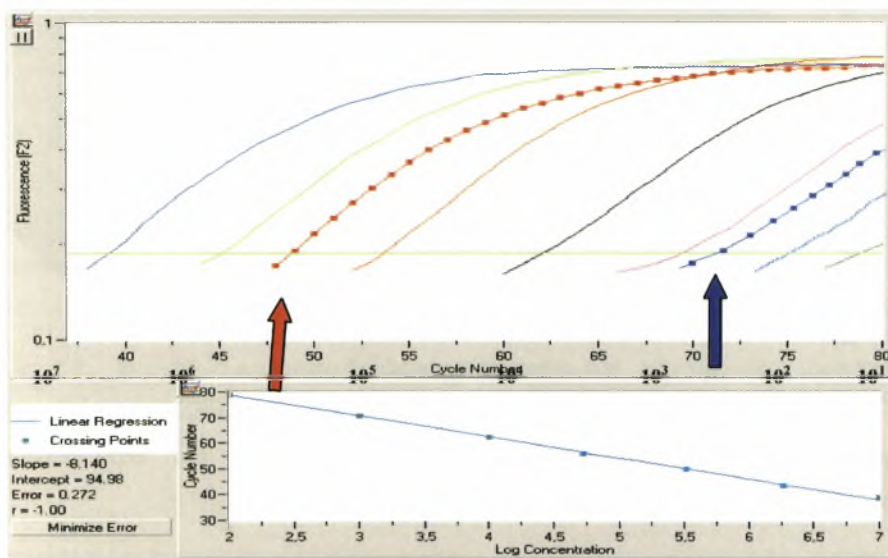
μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης της hTERT στα τραχηλικά επιχρίσματα μολυσμένα με στελέχη υψηλού κινδύνου ήταν κατά μέσο όρο 4 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη στα χαμηλού κινδύνου στελέχη, 17 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη στα μη τυποποιημένα στελέχη και 72 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη στα αρνητικά για τον ιό τραχηλικά επιχρίσματα. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στα επίπεδα έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης μεταξύ των τραχηλικών επιχρισμάτων μολυσμένων με στελέχη υψηλού κινδύνου και των αντίστοιχων μολυσμένων με στελέχη χαμηλού κινδύνου του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων ( $p < 0.001$ ), καθώς και μεταξύ των παραπάνω ομάδων και των αρνητικών για τη μόλυνση τραχηλικών επιχρισμάτων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τραχηλικών επιχρισμάτων που ήταν μολυσμένα με μη τυποποιημένα στελέχη και των αντίστοιχων αρνητικών, καθώς και μεταξύ των τραχηλικών επιχρισμάτων που ήταν μολυσμένα με μη τυποποιημένα στελέχη και των αντίστοιχων με χαμηλού κινδύνου στελέχη (Διάγραμμα 8).



**Διάγραμμα 8:** Μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (λόγος του αριθμού των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης προς τον αριθμό των mRNA μεταγράφων του γονιδίου PBGD) ανάλογα με την μόλυνση με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων.

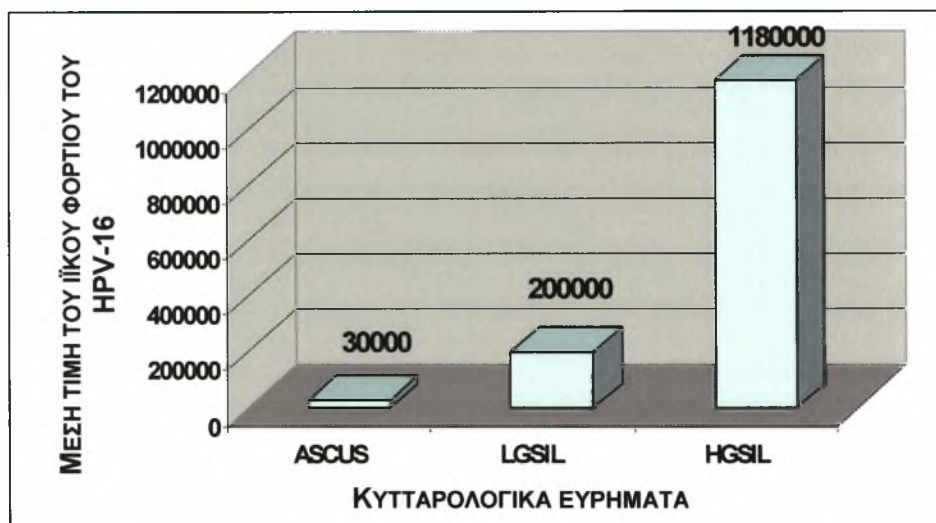
### 2.2.15 Ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου του στελέχους 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων με την τεχνική της ποσοτικής PCR και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα.

Το ιικό φορτίο του ιού HPV-16 ανιχνεύτηκε και ποσοτικοποιήθηκε σε 52 από τα 58 (89.6%) δείγματα μολυσμένα με το στέλεχος 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων. Αναλυτικότερα, από τα 52 τραχηλικά επιχρίσματα, τα 30 ανήκουν στην κατηγορία HGSIL, τα 20 ανήκουν στην κατηγορία LGSIL και μόνο τα 2 στην κατηγορία ASCUS. Σε έξι από τα δείγματα δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί η ποσοτικοποίηση λόγω χαμηλής συγκέντρωσης του DNA και για αυτό και εξαιρέθηκαν από τη διαδικασία ποσοτικοποίησης του ιικού φορτίου. Η ποσότητα του ιικού φορτίου του στελέχους 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων κάλυπτε ένα μεγάλο εύρος, από  $10^3$  έως  $10^7$  αντίγραφα σε κάθε  $\mu\text{g}$  του κυτταρικού DNA. Στην Εικόνα 20 παρατηρείται η πρότυπη καμπύλη με τις διαδοχικές αραιώσεις από  $10^7$  έως  $10^1$ , βάση της οποίας πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου των τραχηλικών επιχρισμάτων μολυσμένων με το στέλεχος 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται ο ποσοτικός προσδιορισμός δύο αντιπροσωπευτικών δειγμάτων, ενός με υψηλού βαθμού δυσπλασία (κόκκινο βέλος) και ενός άλλου με χαμηλού βαθμού δυσπλασία (μπλε βέλος).



**Εικόνα 20:** Ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου του στελέχους 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων με την τεχνική της ποσοτικής PCR. Διάγραμμα από το Light Cycler (συσκευή ποσοτικού PCR).

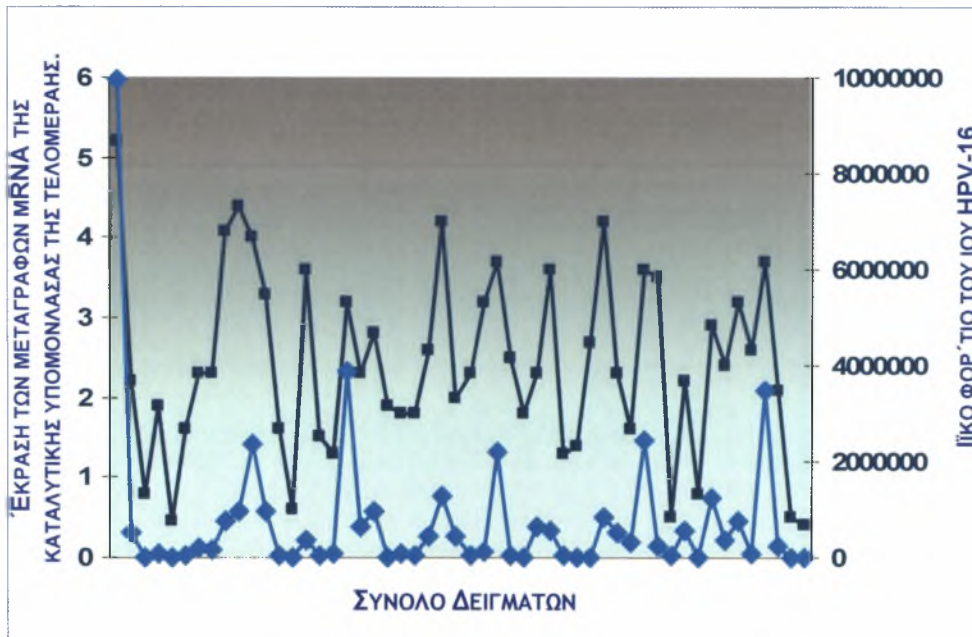
Η μέση τιμή των επιπέδων του DNA του ιϊκού φορτίου ανά μg του κυτταρικού DNA ήταν  $0.76 \times 10^6$  ( $SEM=0.37 \times 10^6$ , εύρος από  $0.0016 \times 10^6$  έως  $9.98 \times 10^6$ ). Αναλυτικότερα, η μέση τιμή του DNA του ιϊκού φορτίου ανά μg στα τραχηλικά επιχρίσματα που ανήκουν στην κατηγορία ASCUS ήταν  $0.03 \times 10^6$  ( $SEM=0.0004 \times 10^6$ , εύρος από  $0.0016 \times 10^6$  έως  $0.0034 \times 10^6$ ), στα LGSIL ήταν  $0.2 \times 10^6$  ( $SEM=0.075 \times 10^6$ , εύρος από  $0.0028 \times 10^6$  έως  $1.24 \times 10^6$ ) και στα HGSIL  $1.18 \times 10^6$  ( $SEM=0.4 \times 10^6$  εύρος από  $0.04 \times 10^6$  έως  $9.98 \times 10^6$ ) αντίστοιχα. Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ποσότητα του ιϊκού φορτίου και στις κατηγορίες των κυτταρολογικών ευρημάτων. Η μέση τιμή των επιπέδων του DNA του ιϊκού φορτίου ανά μg παρατηρήθηκε ότι ήταν στα HGSIL 6 φορές υψηλότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη στα LGSIL και 60 φορές υψηλότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη στα ASCUS. Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του DNA του ιϊκού φορτίου ανά μg αυξανόμενης της κυτταρικής δυσπλασίας από χαμηλό σε υψηλό βαθμό δυσπλασίας (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.001$ ) (Διάγραμμα 9).



**Διάγραμμα 9:** Μέση τιμή των επιπέδων των επιπέδων του DNA του ιϊκού φορτίου ανά μg κυτταρικού DNA σε σχέση με τα κυτταρολογικά ευρήματα.

### 2.2.16 Συσχέτιση της ποσοτικοποίησης του ιϊκού φορτίου και της ποσοτικοποίησης των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT)

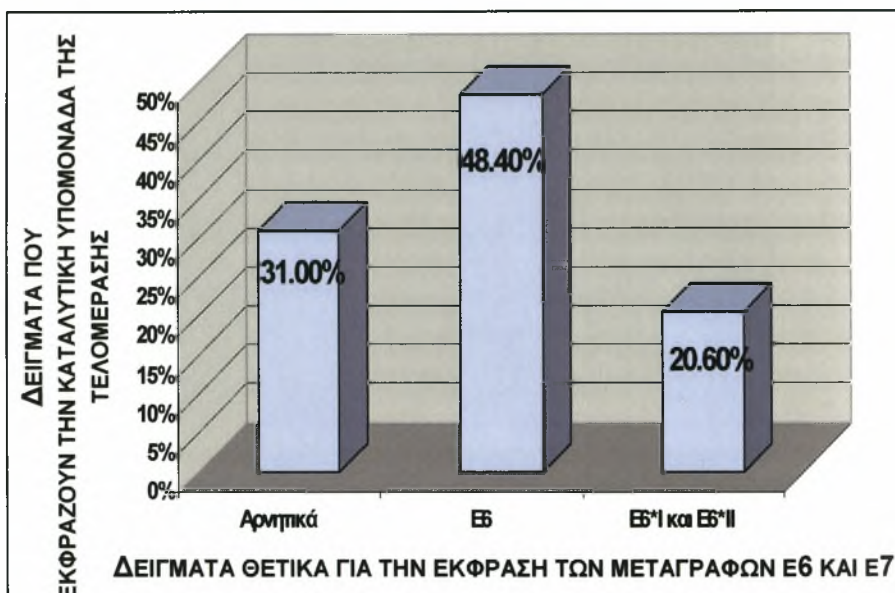
Στο σύνολο των δειγμάτων (52/52) που ποσοτικοποιήθηκαν για το ιϊκό φορτίο του στελέχους 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων, πραγματοποιήθηκε και ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT). Η μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης της hTERT στα παραπάνω δείγματα ήταν 2.2 (SEM=0.15, εύρος από 0.45 έως 5.2). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της hTERT και του ιϊκού φορτίου του στελέχους 16. (Pearson correlation,  $r=0.52$ ,  $p<0.001$ ) (Διάγραμμα 10).



**Διάγραμμα 10:** Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με το ιϊκό φορτίο του στελέχους 16 του ιού HPV.

**2.2.17 Ανίχνευση των E6 και E7 mRNA μεταγράφων του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR) και συσχέτιση με τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA του HPV-16, καθώς και με την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης.**

Στα 58 τραχηλικά επιχρίσματα που ήταν θετικά στο στέλεχος 16 του ιού HPV και στον ποσοτικό προσδιορισμό της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των E6 και E7 mRNA μεταγράφων του ιού με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR). Ανίχνευση των μεταγράφων του mRNA του HPV που κωδικοποιούν για τις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 (E6/E7±E6\*) παρατηρήθηκε σε 40/58 (ποσοστό 68.9%), ενώ στα 28/58 (ποσοστό 48.3%) ανιχνεύτηκαν τα μεταγγραφα E6\*I και E6\*II που κωδικοποιούν για την ογκοπρωτεΐνη E7. Η έκφραση των μεταγράφων που κωδικοποιούν τις ογκοπρωτεΐνες E6 και E7 συσχετίστηκε με την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας ( $p < 0.05$ ).

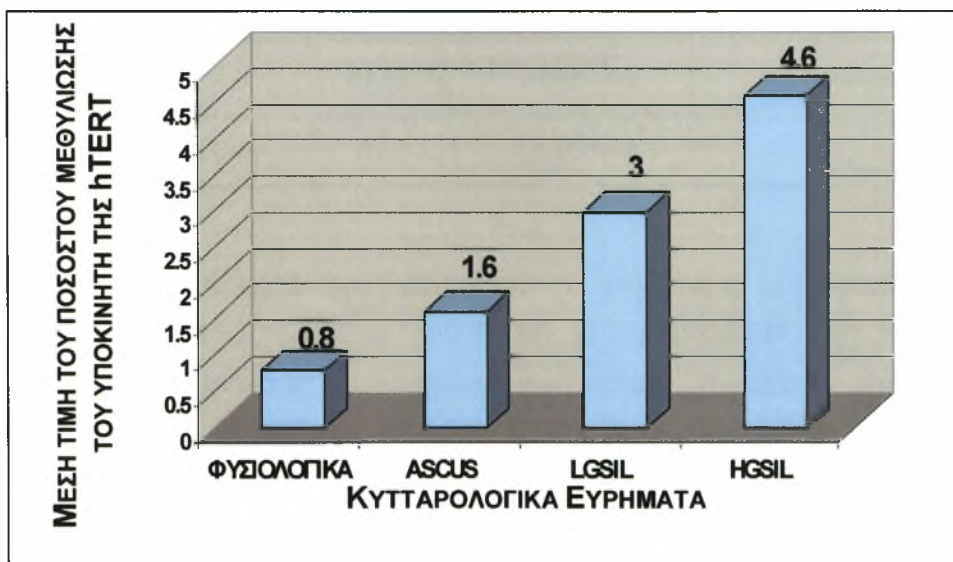


**Διάγραμμα 11:** Απεικόνιση των θετικών για τον ιό HPV-16 τραχηλικών επιχρισμάτων στα οποία ανιχνεύονται τα μεταγγραφα των E6 και E7 του ιού HPV-16. Τα μεταγγραφα E6 κωδικοποιούν για την ογκοπρωτεΐνη E6, ενώ τα E6\*I και E6\*II κωδικοποιούν για την ογκοπρωτεΐνη E7.



### 2.2.18 Μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα και την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης .

Για τη μέτρηση του ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT εφαρμόστηκε ποσοτική PCR με ειδικούς εκκινητές και ανιχνευτές υδρόλυσης. Η μεθυλίωση του DNA στον υποκινητή του γονιδίου της hTERT μελετήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε σε συνολικά 80 τραχηλικά επιχρίσματα, 26 φυσιολογικά και 54 με κυτταρολογικά ευρήματα. Αναλυτικότερα, μεθυλίωση του DNA παρατηρήθηκε σε 7 από τις 26 (ποσοστό 26.6%) περιπτώσεις φυσιολογικών επιχρισμάτων, σε 9 από τις 18 (ποσοστό 50%) περιπτώσεις των ASCUS, σε 19 από τις 28 (ποσοστό 68.2%) των LGSIL καθώς και σε 14 από 18 (ποσοστό 77.8%) των HGSIL. Η μέση τιμή των επιπέδων μεθυλίωσης που παρατηρήθηκε ήταν 0.8, 1.6, 3, και 4.6 σε φυσιολογικά, ASCUS, LGSIL και HGSIL αντίστοιχα (Διάγραμμα 12).



**Διάγραμμα 12:** Συσχέτιση της μέσης τιμής του σχετικού ποσοστού μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου με τα κυτταρολογικά ευρήματα.

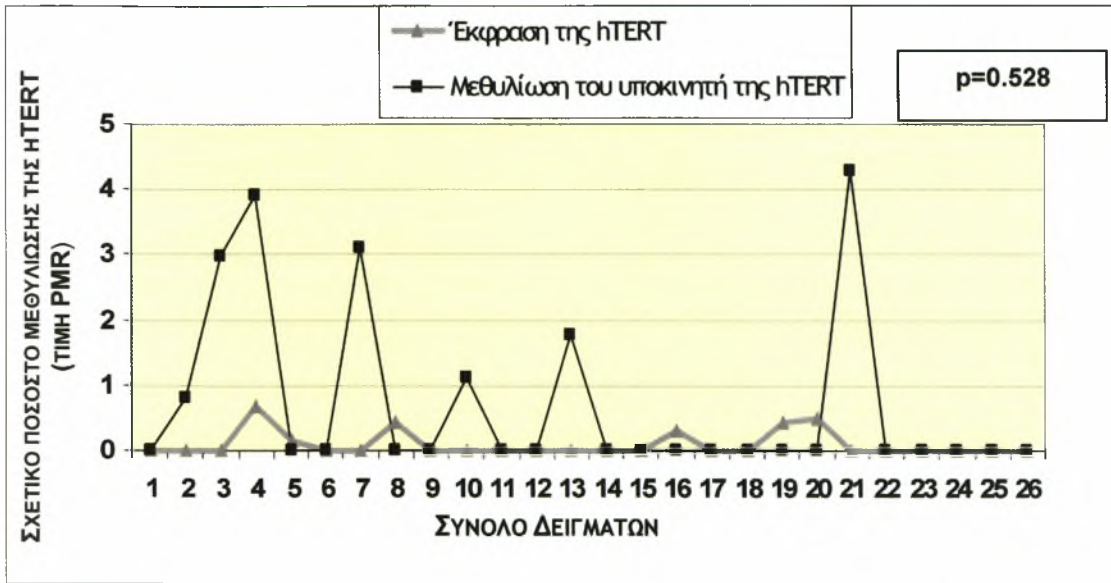
Παρατηρήθηκε συσχέτιση του βαθμού μεθυσίας και των κυτταρολογικών ευρημάτων. Αναλυτικότερα, η μεθυσία του υποκινητή μπορεί να διακρίνει τα φυσιολογικά κυτταρολογικά επιχρίσματα από τα αντίστοιχα με χαμηλού βαθμού δυσπλασία ( $p=0.05$ ), τα φυσιολογικά από τα αντίστοιχα με υψηλού βαθμού δυσπλασία ( $p=0.012$ ) και τα χαμηλού από τα υψηλού βαθμού ( $p=0.00$ ) (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7:** Συσχέτιση της μέσης τιμής του σχετικού ποσοστού μεθυσίας με τα κυτταρολογικά ευρήματα.

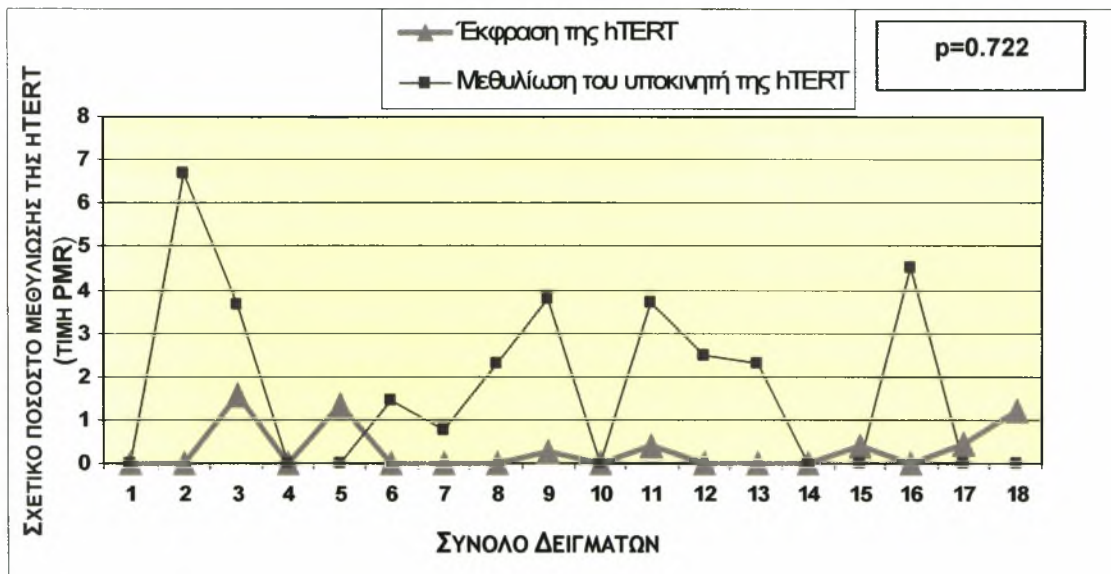
<b>Μεθυσία του υποκινητή του γονιδίου της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT)</b>				
	<b>Φυσιολογικά</b>	<b>ASCUS</b>	<b>LGSIL</b>	<b>HGSIL</b>
<b>Μέση τιμή του σχετικού ποσοστού μεθυσίας (95% CI)</b>	0.8 (0-1.13)	1.6 (0.2-3.2)	3 (0.25-4.8)	4.6 (0.9-7.14)
<b>Φυσιολογικά</b>	-	$p=0.092$	$p=0.05$	$p=0.012$
<b>ASCUS</b>	$p=0.05$	-	$p=0.548$	$p=0.16$
<b>LGSIL</b>	$p=0.548$	$p=0.548$	-	$p=0.00$
<b>HGSIL</b>	$p=0.012$	$p=0.16$	$p=0.05$	-

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η συσχέτιση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με το βαθμό μεθυσίας του υποκινητή. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των παραπάνω παραμέτρων σε φυσιολογικά επιχρίσματα (Pearson correlation,  $r=0.13$ ,  $p=0.528$ ), σε ASCUS (Pearson correlation,  $r=-0.09$ ,  $p=0.722$ ), σε LGSIL (Pearson correlation,  $r=0.04$ ,  $p=0.841$ ), σε HGSIL (Pearson correlation,  $r=-0.287$ ,  $p=0.248$ ) (Διαγράμματα 13-16).

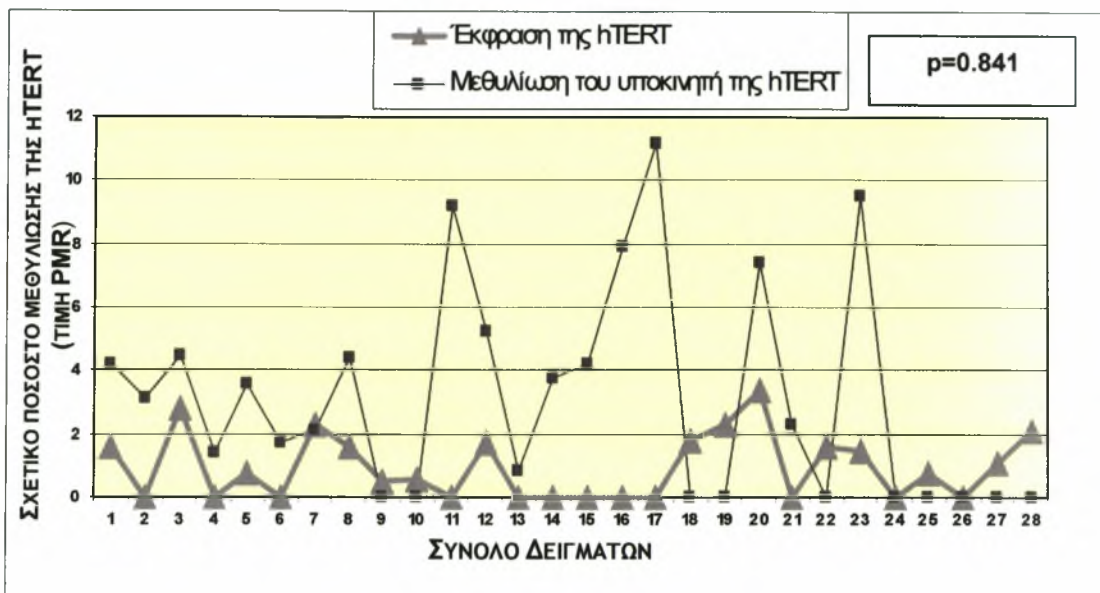
Τέλος, παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ του σχετικού ποσοστού μεθυσίας με την ηλικία των γυναικών ( $p<0.05$ ).



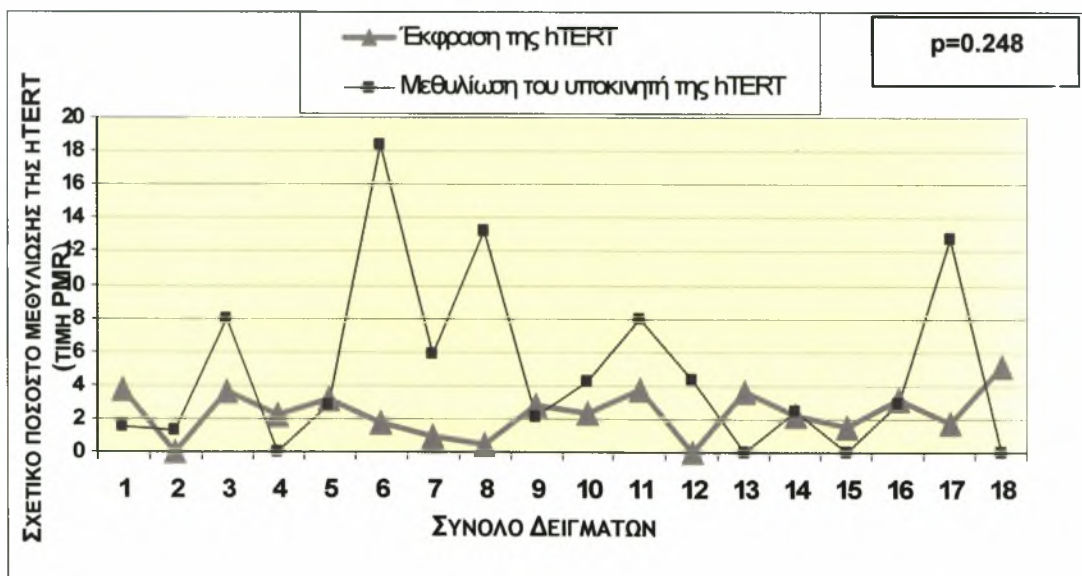
**Διάγραμμα 13:** Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου σε φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα.



**Διάγραμμα 14:** Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου σε τραχηλικά επιχρίσματα με άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιοριστου σημασίας (ASCUS).



**Διάγραμμα 15:** Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου σε τραχηλικά επιχρίσματα με χαμηλού βαθμού δυσπλασίες (LGSIL).



**Διάγραμμα 16:** Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου σε τραχηλικά επιχρίσματα με υψηλού βαθμού δυσπλασίες (HGSIL).

### **2.2.19 Αξιολόγηση των δοκιμασιών για τη χρήση τους ως πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες.**

Προκειμένου να ελεγχθεί η κλινική χρησιμότητα της τελομεράσης και της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) καθώς και η ανίχνευση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων για την κλινική αξιολόγηση των δυσπλασιών υψηλού βαθμού υπολογίστηκαν όλα τα χαρακτηριστικά των ανωτέρω διαγνωστικών δοκιμασιών.

Αναλυτικότερα, η ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης για τα τραχηλικά επιχρίσματα με υψηλού βαθμού δυσπλασίες ως διαγνωστική δοκιμασία παρουσίασε ευαισθησία και αρνητική προγνωστική τιμή 62.5% και 96.7% αντίστοιχα, ενώ η ειδικότητα και η θετική προγνωστική τιμή ήταν 80.5% και 19.2%. Η ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR) για τα τραχηλικά επιχρίσματα με υψηλού βαθμού δυσπλασίες ως διαγνωστική δοκιμασία έδειξε ευαισθησία και θετική προγνωστική τιμή 87.5% και 98.7%, ενώ η ειδικότητα και η θετική προγνωστική τιμή ήταν 76% και 21.2% αντίστοιχα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με την τεχνική της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR) παρουσίασε υψηλή ευαισθησία και αρνητική προγνωστική τιμή, 96% και 99% αντίστοιχα, ενώ η ειδικότητα και η θετική προγνωστική τιμή ήταν 72% και 36.2% αντίστοιχα. Ακόμη, η ανίχνευση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων στα τραχηλικά επιχρίσματα με υψηλού βαθμού δυσπλασίες παρουσίασε ευαισθησία και αρνητική προγνωστική τιμή 100%, ειδικότητα 79% και θετική προγνωστική τιμή 52%. Τέλος, η ευαισθησία και η αρνητική προγνωστική τιμή της μεθυλίωσης του DNA του υποκινητή του γονιδίου της hTERT ήταν 77.8% και 87% ,ενώ η ειδικότητα και η θετική προγνωστική τιμή ήταν 43.5% και 28.5% αντίστοιχα. (Πίνακας 8).

**Πίνακας 8:** Χαρακτηριστικά των διαγνωστικών δοκιμασιών για την κλινική αντιμετώπιση των γυναικών με υψηλού βαθμού δυσπλασίες (HGSIL).

	Ευαισθησία	Ειδικότητα	Θετική Προγνωστική Τιμή	Αρνητική Προγνωστική Τιμή
<b>Ανίχνευση της τελομεράσης (TRAP)</b>	62.5%	80.5%	19.2%	96.7%
<b>Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT)</b>	87.5%	76%	21.2%	98.7%
<b>Ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT)</b>	96%	72%	36.2%	99%
<b>Ανίχνευση των στελεχών υψηλού κινδύνου του ιού HPV</b>	75%	68.5%	19.2%	97.4%
<b>Μεθυλίωση του DNA του υποκινητή της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης</b>	77.8%	43.5%	28.5%	87%

## 2.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του τραχήλου της μήτρας, παρατηρείται πλήθος μοριακών αλλαγών που οδηγούν στην απορρύθμιση ενός αριθμού γονιδίων μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται και η τελομεράση και, ειδικότερα, η καταλυτική της υπομονάδα (human telomerase reverse transcriptase-hTERT)<sup>207</sup>. Δεδομένου ότι τόσο οι παράγοντες όσο και οι μηχανισμοί που προκαλούν τις ογκογενετικές αλλαγές παραμένουν άγνωστοι, η παρούσα διατριβή σχεδιάστηκε για να μελετήσει τους παράγοντες, οι οποίοι συμβάλλουν στην ενεργοποίηση και διατήρηση της έκφρασης της τελομεράσης σε τραχηλικά επιχρίσματα με ποικιλία κυτταρολογικών ευρημάτων καθώς και τους πιθανούς μηχανισμούς ενεργοποίησης της.

### 2.3.1 Συσχέτιση ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) με τα κυτταρολογικά ευρήματα.

Στη συγκεκριμένη διατριβή μελετήθηκε η παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) σε τραχηλικά επιχρίσματα με ποικιλία κυτταρολογικών ευρημάτων προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή συσχέτιση του ιού με τα κυτταρολογικά ευρήματα. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία στελεχών υψηλού κινδύνου του ιού HPV σχετίζεται με υψηλού βαθμού δυσπλασίες, ενώ η παρουσία στελεχών χαμηλού κινδύνου με χαμηλού βαθμού. Αυτά τα συμπεράσματα τονίζουν την ογκογενετική ικανότητα συγκεκριμένων στελεχών του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων και επιβεβαιώνουν το ρόλο του ιού στην ανάπτυξη δυσπλασιών και πιθανά καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων έχει ανιχνευτεί περίπου στο 93% των περιπτώσεων καρκίνου και έχει προταθεί ότι αποτελεί βασικό παράγοντα εκδήλωσης ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN)<sup>149</sup>. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας εμφανίζεται στην πλακωδοκυλινδρική σύνδεση της ζώνης μετάπλασης όπου τα μονόστιβα κυλινδρικά (αδενικά) επιθηλιακά κύτταρα του ενδοτραχήλου συναντώνται με τις στοιβάδες των πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων του εξωτραχήλου (πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο). Ερευνητικά δεδομένα τονίζουν ότι η μόλυνση με τον ιό παρατηρείται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις καρκίνου, οι ογκοπρωτεΐνες εκφράζονται κατά τη διάρκεια της νόσου και η παρουσία του ιού αυξάνει τον κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου. Το γεγονός ότι σε διαγονιδιακά ποντίκια η μόλυνση με στελέχη υψηλού κινδύνου οδήγησε στην ανάπτυξη καρκίνου, επιβεβαιώνει το σημαντικό ρόλο του ιού στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας<sup>208</sup>.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει την ύπαρξη συγκεκριμένων στελεχών του ιού, τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης τόσο στις δυσπλασίες όσο και στις περιπτώσεις καρκίνου<sup>209</sup>. Το στέλεχος 16 έχει ανιχνευτεί περίπου στο 50% των περιπτώσεων καρκίνου, ενώ το στέλεχος 18 περίπου σε ποσοστό 15%. Τα υπόλοιπα στελέχη εμφανίζονται σε χαμηλότερα ποσοστά<sup>149</sup>. Στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήσαμε ότι τα στελέχη 16, 18, 31, 33, 45, 61 και 58 ανιχνεύτηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό σε τραχηλικά επιχρίσματα με υψηλού βαθμού δυσπλασία, με πιο συχνό στέλεχος το 16, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες<sup>209</sup>, χωρίς ωστόσο να μην υπάρχουν και περιπτώσεις ανίχνευσή τους σε φυσιολογικά επιχρίσματα. Η παρουσία των στελεχών αυτών είναι δυνατόν να καθορίσει την εξέλιξη μιας δυσπλασίας και για αυτό άλλωστε κρίνεται σχεδόν απαραίτητη η ανίχνευση και τυποποίηση των στελεχών στις περιπτώσεις τραχηλικών δυσπλασιών. Έχει βρεθεί ότι γυναίκες που έχουν μολυνθεί με στελέχη υψηλού κινδύνου και δεν παρουσιάζουν κυτταρολογικά ευρήματα, αν η μόλυνση παραμείνει, σε περίπου 4 χρόνια θα εκδηλώσουν CIN 2 ή CIN 3, ενώ, αντίθετα, γυναίκες με ASCUS ή LGSIL που δεν έχουν μολυνθεί με στελέχη υψηλού κινδύνου, είναι αδύνατο σε διάστημα δύο χρόνων να αναπτύξουν CIN 2/3 και είναι πιθανόν μετά από δύο χρόνια να επανέλθουν σε φυσιολογική κατάσταση<sup>149</sup>.

Η μόλυνση με το ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων πιθανότατα αποτελεί την αρχική αιτία για συνεχείς γενετικές μεταβολές είτε μέσω μηχανισμών που σχετίζονται με την απευθείας ενσωμάτωση του ιϊκού γονιδιώματος στο DNA των προσβαλλόμενων κυττάρων, είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με κυτταρικές πρωτεΐνες, είτε με συνδυασμό και των δύο. Το αποτέλεσμα είναι η ανάπτυξη δυσπλασιών καθώς και καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ωστόσο, τόσο τα μονοπάτια που οδηγούν στην εξέλιξη της νόσου όσο ο ακριβής ρόλος της μόλυνσης των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων δεν έχουν αποσαφηνιστεί ακόμη. Αν λάβουμε υπόψη και το γεγονός ότι έχει παρατηρηθεί να υπάρχει μια ασυμφωνία μεταξύ των γυναικών που έχουν μολυνθεί με τον ιό και αυτών που τελικά θα αναπτύξουν νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας, διαπιστώνουμε ότι κρίνεται απαραίτητη η μελέτη των μηχανισμών που συμβάλλουν στην ανάπτυξη δυσπλασιών και πιθανότατα σχετίζονται με το ρόλο της μόλυνσης από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων με σκοπό την καλύτερη κλινική αντιμετώπιση των γυναικών με δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας.



### 2.3.2 Μελέτη της τελομεράσης και της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης.

Ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν το θεμελιώδη ρόλο της τελομεράσης στη διαδικασία της καρκινογένεσης<sup>210</sup>. Παρόλο που για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, η τελομεράση μπορεί να αποτελέσει έναν ικανοποιητικό δείκτη κακοήθειας<sup>211</sup>, ο ρόλος της τελομεράσης σε προκαρκινικές ή προδυσπλασιακές διαδικασίες δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως<sup>192</sup>. Προκειμένου να κατανοηθεί πληρέστερα ο ρόλος της τελομεράσης στην καρκινογένεση και να ελεγχθεί η δυνατότητα χρησιμοποίησης της ως διαγνωστικός ή προγνωστικός δείκτης κρίνεται αναγκαία η μελέτη μηχανισμών που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκφρασή της.

Η τελομεράση, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελείται από μία RNA υπομονάδα που περιέχει μια RNA αλληλουχία συμπληρωματική με την ακολουθία των τελομερών (TTTAGGG)<sub>n</sub> που ονομάζεται hTR και από μία καταλυτική υπομονάδα γνωστή ως hTERT. Ο Takamura και οι συν<sup>50</sup> παρατήρησαν συσχέτιση της ενεργότητας του ενζύμου και της καταλυτικής υπομονάδας χρησιμοποιώντας την τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Αντίθετα, η μελέτη της RNA υπομονάδας με την ίδια μέθοδο έδειξε ότι η ανίχνευση της δεν είναι ειδική για την κλινική χρησιμότητά της σε ασθένειες του τραχήλου της μήτρας<sup>50,186</sup>. Παρομοίως και οι συσχετιζόμενες με την τελομεράση πρωτεΐνες (TP1/TLP1) εκφράζονται ευρέως τόσο σε καρκινικά όσο και σε φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα, με αποτέλεσμα να μη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες. Σχετικές μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο η hTR όσο και η TP1 εκφράζονται τόσο σε φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα σε ποσοστά από 71% έως 100%, όσο και σε παθολογικά σε ποσοστά από 43% έως 100%<sup>50,212-214</sup>.

Για τη μελέτη της τελομεράσης σε τραχηλικά επιχρίσματα με ποικιλία κυτταρολογικών ευρημάτων ακολουθήσαμε τρεις πειραματικές προσεγγίσεις: η πρώτη και περισσότερο διαδεδομένη είναι η διαδικασία TRAP (Telomeric Repeat Protocol Assay) και αφορά την ανίχνευση του ολοενζύμου της τελομεράσης, η δεύτερη αναφέρεται στην ανίχνευση των μεταφράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και η τελευταία, που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά, είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας με και τη χρήση της τεχνολογίας του ποσοτικού PCR (Light Cycler).

Στην παρούσα διατριβή επιβεβαιώθηκε η σχέση μεταξύ της ενεργότητας του ενζύμου και της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες<sup>50,186</sup>. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι το 72.7% των τραχηλικών επιχρισμάτων ήταν θετικά τόσο στην ενεργότητα του ενζύμου, όσο και στην έκφραση της

καταλυτικής υπομονάδας. Στα υπόλοιπα δείγματα (ποσοστό 27.2%) ανιχνεύτηκε η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης αλλά όχι η τελομεράση, γεγονός που σημαίνει ότι η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης δεν έχει ως αποτέλεσμα πάντα την έκφραση ολόκληρου του ενζύμου. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στη μεταμεταγραφική ρύθμιση των μεταγράφων της hTERT που πιθανότατα πραγματοποιείται καθώς και ίσως στο γεγονός ότι για την ενεργοποίηση της τελομεράσης απαιτείται συγκεκριμένη συγκέντρωση μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης, κάτω από τα επίπεδα της οποίας δεν είναι δυνατή η ενεργοποίηση του ενζύμου<sup>186</sup>.

### *2.3.3. Συσχέτιση της ενεργότητας του ολοενζύμου της τελομεράσης με τα κυτταρολογικά ευρήματα.*

Η διαδικασία TRAP αποτελεί τον καλύτερο τρόπο για την εκτίμηση της ενεργότητας του ενζύμου σε κλινικά δείγματα. Η αρχική μέθοδος, που περιγράφηκε από τον Kim και συν<sup>83</sup>, μπορούσε να ανιχνεύσει την ενεργότητα της τελομεράσης σε λιγότερο από 100 καρκινικά κύτταρα από σύνολο  $10^6$  φυσιολογικών σωματικών κυττάρων. Οι μετέπειτα τροποποιήσεις στο αρχικό πρωτόκολο περιελάμβαναν τον ημιποσοτικό προσδιορισμό και μπορούσαν επιπλέον να χρησιμοποιηθούν στην εκτίμηση της παρουσίας πιθανών αναστολέων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αποφεύγοντας τα ψευδώς αρνητικά (false negative) αποτελέσματα. Τα πρωτόκολα που χρησιμοποιούνται σήμερα έχουν βελτιωθεί και μπορούν να ανιχνεύσουν μέχρι και 10 κύτταρα HeLa από σύνολο  $10^6$  φυσιολογικών σωματικών κυττάρων. Παρόλο που η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη, τα αποτελέσματα από τις διάφορες μελέτες σε τραχηλικά επιχρίσματα είναι ιδιαίτερα αμφιλεγόμενα, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε τροποποιήσεις του αρχικού πρωτοκόλου καθώς και σε άλλους παράγοντες που επηρεάζουν την ενεργότητα της τελομεράσης.

Προηγούμενες μελέτες ανίχνευσης της ενεργότητας της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP δεν έδωσαν συγκλίνοντα αποτελέσματα σχετικά με την έκφραση της τελομεράσης σε τραχηλικά επιχρίσματα με ποικιλία κυτταρολογικών ευρημάτων. Αναλυτικότερα, έχει παρατηρηθεί ανίχνευση της τελομεράσης σε 0-18% φυσιολογικών τραχηλικών επιχρισμάτων, σε 0-100% τραχηλικών επιχρισμάτων με χαμηλού βαθμού δυσπλασία και σε 29-96% τραχηλικών επιχρισμάτων με υψηλού βαθμού δυσπλασία<sup>49,186,192,211,212,213,215-221</sup>. Στη συγκεκριμένη διατριβή, παρατηρήθηκε συσχέτιση της ενεργότητας της τελομεράσης με τα κυτταρολογικά ευρήματα σε ποσοστά 0% σε φυσιολογικά, 10% σε ASCUS, 30% σε LGSIL και 67% στα HGSIL τραχηλικά

επιχρίσματα. Ειδικότερα, το μεγαλύτερο ποσοστό των τραχηλικών επιχρισμάτων που βρέθηκαν θετικά για την τελομεράση είχαν υψηλού βαθμού δυσπλασία. Τα ευρήματά μας συμφωνούν με αρκετές μελέτες<sup>217,221,223</sup>, ενώ υπάρχουν και κάποιες στις οποίες δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της τελομεράσης με τα κυτταρολογικά ευρήματα<sup>185,218,221,223</sup>. Γενικά, η τελομεράση ανιχνεύεται σε ένα μεγάλο ποσοστό των τραχηλικών επιχρισμάτων με υψηλού βαθμού δυσπλασία. Φαίνεται ότι ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης σε τραχηλικά επιχρίσματα με δυσπλασία αντανακλά την παρουσία ενός κυτταρικού φαινοτύπου ο οποίος χαρακτηρίζεται από απεριόριστες κυτταρικές διαιρέσεις είτε των ενδοθηλιακών ή των νεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων, γεγονός που επισημαίνει το πιθανό ρόλο της τελομεράσης ως διαγνωστικό δείκτη στην κλινική αντιμετώπιση των γυναικών με δυσπλασίες τραχήλου.

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης σε κανένα από τα φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα. Στις περισσότερες προηγηθείσες μελέτες έχει παρατηρηθεί χαμηλό ποσοστό θετικών για τελομεράση δειγμάτων σε φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα που κυμαίνεται από 0-3.7%<sup>186,216,217,218,221,224</sup>, ενώ αντιθέτως, σε δύο μόνο μελέτες παρατηρήθηκε ένα πολύ υψηλότερο ποσοστό που ανέρχεται στο 18%. Βασιζόμενοι σε προηγούμενες ιστοχημικές παρατηρήσεις για την παρουσία των πρωτεϊνών hTR και hTERT στο φυσιολογικό επιθήλιο<sup>225</sup>, θα περιμέναμε ένα υψηλότερο θετικό ποσοστό από αυτό που έχει ήδη ανιχνευτεί. Το γεγονός ότι δεν ανιχνεύτηκε τελομεράση σε φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα πιθανότατα οφείλεται στην παρουσία αναστολέων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης καθώς και κυρίως στο γεγονός ότι η έκφραση της τελομεράσης στο φυσιολογικό ιστό είναι κάτω από τα όρια που μπορεί να ανιχνεύσει η συγκεκριμένη μέθοδος.

#### *2.3.4. Συσχέτιση της ενεργότητας του ολοενζύμου της τελομεράσης με την παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.*

Στην παρούσα διατριβή η παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων συσχετίστηκε με την ενεργότητα της τελομεράσης. Αναλυτικότερα, η ενεργότητα του ενζύμου ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό τραχηλικών επιχρισμάτων θετικών για τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων, σε σύγκριση με τα τραχηλικά επιχρίσματα που ήταν αρνητικά για την παρουσία του ιού. Τα παραπάνω συμπεράσματα είναι σύμφωνα με το μεγαλύτερο μέρος της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, που αναφέρεται κυρίως στη συσχέτιση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων και κυρίως των στελεχών υψηλού κινδύνου με την ενεργότητα του ενζύμου<sup>216,226,227</sup>. Πιθανολογείται επομένως ότι η

παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της τελομεράσης.

Σε άλλες μελέτες, αμφισβητείται η συσχέτιση της τελομεράσης με την παρουσία του ιού υποστηρίζοντας ότι η ενεργοποίηση της τελομεράσης πραγματοποιείται στα τελευταία στάδια της καρκινογένεσης και ότι πιθανότατα επιπρόσθετες γενετικές αλλαγές απαιτούνται για την ενεργοποίηση της τελομεράσης και την καρκινική εξαλλαγή των τραχηλικών επιθηλιακών κυττάρων<sup>191,212,217,218,221,223,228-229</sup>.

### *2.3.5 Μελέτη και ποσοτικός προσδιορισμός της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και συσχέτιση με τα κυτταρολογικά ευρήματα.*

Προκειμένου να μελετήσουμε εκτενέστερα το ρόλο του ενζύμου της τελομεράσης στην ανάπτυξη δυσπλασιών του τραχήλου της μήτρας και λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η πρωτεϊνική υπομονάδα εκφράζεται συνεχώς επικεντρωθήκαμε στη μελέτη της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) και στην ανίχνευση των μεταγράφων της και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Εφόσον σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί ότι υπάρχουν ποσοτικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του ολοενζύμου της τελομεράσης μεταξύ των προκαρκινικών και καρκινικών τραχηλικών επιχρισμάτων με χαμηλότερα επίπεδα στα φυσιολογικά και υψηλότερα στα καρκινικά<sup>220,230,231</sup> θελήσαμε να μελετήσουμε αν αυτές οι διαφορές σχετίζονται με διαφορές στην έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης.

Η ανίχνευση της έκφρασης των μεταγράφων είναι πολύπλοκη λόγω του γεγονότος ότι υπάρχουν ποικίλα μετάγραφα που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και περιλαμβάνουν τέσσερις προσθήκες και δύο ελλείψεις (α και β)<sup>232,233</sup>. Όλα τα μετάγραφα που προκύπτουν από τις προσθήκες και τη μία έλλειψη (β-deletion variant) έχουν ως αποτέλεσμα τον πρόωρο τερματισμό των προϊόντων της μεταγραφής. Αντίθετα, το προϊόν που προκύπτει από την έλλειψη α πιθανότατα να είναι ένας αναστολέας στην έκφραση της τελομεράσης καθώς έχει παρατηρηθεί μείωση της ενδογενούς έκφρασης της τελομεράσης σε ποσοστό 85-95% σε μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές. Για αυτό άλλωστε η έκφραση του μεταγράφου με την έλλειψη α, θα μπορούσε να αιτιολογήσει περιπτώσεις στις οποίες ενώ εκφράζεται η καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης, δεν παρατηρείται ενεργότητα όλου του ενζύμου. Στην παρούσα μελέτη, η επιλογή των εκκινητών για την ανίχνευση των μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας έγινε με βάση την ανίχνευση ολόκληρου του μετάγραφου. Η χρήση επιπλέον εκκινητών που θα ανιχνεύουν και τα 6 μετάγραφα

που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα πιθανότατα να είναι απαραίτητη αλλά όχι τόσο πρακτική στα πλαίσια της χρήσης της hTERT ως κλινική δοκιμασία.

Κατά την ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης παρατηρήσαμε έκφραση σε 87.5% των τραχηλικών επιχρισμάτων με υψηλού βαθμού δυσπλασία, σε 36.5% με χαμηλού βαθμού δυσπλασία, σε 16.4% με άτυπα κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν mRNA μετάγραφα της hTERT σε κανένα από τα φυσιολογικά επιχρίσματα. Από τον ποσοτικό προσδιορισμό των mRNA μεταγράφων παρατηρήσαμε έκφραση σε 96% των τραχηλικών επιχρισμάτων με υψηλού βαθμού δυσπλασία, σε 39.7% με χαμηλού βαθμού δυσπλασία, σε 20.5% με άτυπα κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας και σε 20% των φυσιολογικών επιχρισμάτων. Αξίζει να τονιστεί ότι η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των mRNA μεταγράφων ήταν περισσότερο ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει κάτω από 10 καρκινικά κύτταρα από σύνολο  $10^6$  φυσιολογικών σωματικών κυττάρων.

Επιπρόσθετα τα επίπεδα της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης συσχετίστηκαν με τη σοβαρότητα των κυτταρολογικών ευρημάτων, δηλαδή χαμηλά επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν σε περιπτώσεις με χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις, ενώ υψηλά επίπεδα έκφρασης σε τραχηλικά επιχρίσματα με υψηλού βαθμού. Το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μία κλιμάκωση στην έκφραση της τελομεράσης με την αύξηση του βαθμού δυσπλασίας τονίζει σημαντικά ότι η ενεργοποίηση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης αποτελεί ένα γεγονός που συμβαίνει νωρίς κατά την πολύπλοκη διαδικασία της καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας<sup>192,222</sup>. Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταγράφων του γονιδίου της καταλυτικής υπομονάδας χρησιμοποίησαν ημιποσοτικούς τρόπους προσδιορισμού και έδειξαν έκφραση από 0 έως 33% σε φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα και από 80 έως 100% σε καρκινικά τραχηλικά επιχρίσματα<sup>185,186,188-190,214, 223</sup> και συμφωνούν με τα δικά μας αποτελέσματα. Ωστόσο, σε κάποιες άλλες μελέτες δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με τα κυτταρολογικά ευρήματα<sup>185,191,218, 228,234</sup>.

Το γεγονός ότι στον ποσοτικό προσδιορισμό των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης παρατηρήσαμε έκφραση της τελομεράσης και σε φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα έρχεται σε αντίθεση με τη γενική παραδοχή ότι η τελομεράση δεν ανιχνεύεται σε φυσιολογικούς μη ανανεώσιμους ιστούς. Τα θετικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στην παρουσία ποικίλων κυττάρων ενδοτραχήλου και ενδομητρίου, στην ύπαρξη λεμφοκυττάρων λόγω κάποιας φλεγονής, ερυθρών αιμοσφαιρίων ή σε διάφορα μικρόβια. Παρόλο που μετά τη  $10^{\text{n}}$  μέρα του

εμμηνορυσιακού κύκλου η παρουσία κυττάρων ενδομητρίου στον τραχηλικό επίχρισμα είναι αμελητέα, ωστόσο υπάρχει περίπτωση η επιμόλυνση με τέτοια κύτταρα να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Επιπρόσθετα, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις γυναικών θετικές για τελομεράση αλλά κυτταρολογικά φυσιολογικές, στις οποίες η παρουσία φλεγμονής στον τράχηλο (τραχηλίτιδα) φαίνεται να είναι η βασική αιτία ανίχνευσης της τελομεράσης σε φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα<sup>215</sup>. Αξίζει επιπλέον να σημειωθεί ότι ακόμη και στα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της τελομεράσης είναι άγνωστο σε τι έκταση η έκφραση που ανιχνεύεται προέρχεται από τα άτυπα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου που έχουν την ιδιότητα των βλαστικών κυττάρων (stem cells) και συμβάλλουν στην αναγέννηση των επιθηλιακών κυττάρων ή από ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα που εκφράζουν την τελομεράση και επομένως και την καταλυτική υπομονάδα της. Ο Yasumoto και οι συν ανίχνευσαν ενεργότητα του ενζύμου σε φυσιολογικό τραχηλικό επίχρισμα, γεγονός που οφείλεται στα αδιαφοροποίητα κύτταρα που εντοπίζονται στη βασική στοιβάδα των βλαστικών κυττάρων<sup>235</sup>. Έχει πραγματοποιηθεί μία μόνο μελέτη σχετικά με τον ρόλο των λεμφοκυττάρων στην ενεργοποίηση της τελομεράσης και παρόλο που δε βρέθηκε καμμία συσχέτιση, ωστόσο δεν μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα ότι η παρουσία λεμφοκυττάρων δεν σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα έκφρασης της τελομεράσης<sup>212</sup>.

Επιπρόσθετα, ο ποσοτικός προσδιορισμός της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης μπορεί να συμβάλει διαγνωστικά στο διαχωρισμό των σταδίων που παρατηρούνται από τα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης. Αναλυτικότερα, είναι δυνατό να διαχωριστούν τα φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα από τα αντίστοιχα με χαμηλό και υψηλό βαθμό δυσπλασιών, τα ASCUS από τα χαμηλού βαθμού και τα χαμηλού από τα υψηλού, τονίζοντας το πιθανό διαγνωστικό ρόλο της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης.

### 2.3.6. Συσχέτιση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με την παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.

Στην παρούσα διατριβή, η παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων συσχετίστηκε με την έκφραση της καταλυτικής της υπομονάδας. Αναλυτικότερα, τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας ήταν υψηλότερα στην ομάδα των τραχηλικών επιχρισμάτων στα οποία ανιχνεύτηκε ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων, σε σύγκριση με τα τραχηλικά επιχρίσματα που ήταν αρνητικά στην παρουσία του ιού. Έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης δεν παρατηρήθηκε μόνο σε τραχηλικά επιχρίσματα μολυσμένα με στελέχη υψηλού κινδύνου, αλλά για πρώτη φορά παρατηρήθηκε σε τραχηλικά επιχρίσματα μολυσμένα με τα στελέχη HPV-45, 58 και 61 και σε μία περίπτωση στελέχους χαμηλού κινδύνου HPV-6 τονίζοντας την ογκογενετική ικανότητα και άλλων στελεχών και τον πιθανό ρόλο της μόλυνσης με αυτά στην ενεργοποίηση της τελομεράσης. Το στέλεχος 6 έχει αναφερθεί να έχει σχέση με την τελομεράση και σε μία ακόμη μελέτη, στην οποία απλά αναφέρεται η ενεργότητα της τελομεράσης σε τραχηλικό επίχρισμα μολυσμένο με το στέλεχος χαμηλού κινδύνου του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων<sup>223</sup>. Επιπρόσθετα, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας παρατηρήθηκαν στις περιπτώσεις γυναικών μολυσμένων με στελέχη υψηλού κινδύνου. Τα ευρήματά μας συμφωνούν με το μεγαλύτερο μέρος της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, που αναφέρεται κυρίως στη συσχέτιση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων και κυρίως των στελεχών υψηλού κινδύνου με την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης <sup>188,190,213,216,221,236,237</sup>.

Υπάρχουν, όμως και μελέτες που υποστηρίζουν ότι η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης δε συσχετίζεται με το ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων<sup>191,212,217,218,221,223,227-229</sup>. Οι μελέτες αυτές υποστηρίζουν ότι γενετικές αλλαγές όπως έλλειψη των αλληλομόρφων στην περιοχή 3p, 3q 10p, 11, 13q και/ή 18q πιθανότατα σε συνδυασμό με μόλυνση με στελέχη υψηλού κινδύνου στην ενεργοποίηση της τελομεράσης συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της τελομεράσης<sup>238,239</sup>. Ειδικότερα, ανωμαλίες της περιοχής 3p έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ενώ ανωμαλίες στην περιοχή που έχει χαρτογραφηθεί το γονίδιο hTERT (5q) δεν έχουν συσχετιστεί με την έκφραση της τελομεράσης<sup>240</sup>.

Είναι, επομένως, πιθανό η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης να καθορίζει τα παθολογικά τραχηλικά επιχρίσματα τα οποία έχουν αποκτήσει έναν «αθάνατο» φαινότυπο και έχουν φτάσει σε ένα σημείο που δεν μπορούν να αποφύγουν την ανάπτυξη κακοήθειας. Αν αυτό αληθεύει τότε η ενεργοποίηση της

καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και επομένως και του ολοενζύμου τελομεράσης, που ακολουθεί τη μόλυνση με στέλεχος υψηλού κινδύνου του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων θα καθορίσει ποιά από τα CIN τραχηλικά επιχρίσματα θα εξελιχθούν σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, εφόσον το ποσοστό να εκδηλώσει καρκίνο μια γυναίκα που έχει κάποια ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία τραχήλου κυμαίνεται από 10-80%<sup>149</sup>. Ακόμη, έκφραση της τελομεράσης σε φυσιολογικά τραχηλικά επιχρίσματα αρνητικά στην παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων, μπορεί να υπονοεί την παρουσία μιας λανθάνουσας μόλυνσης, που δεν μπορεί να ανιχνευτεί την παρούσα στιγμή και για αυτό άλλωστε κρίνεται απαραίτητη η παρακολούθηση αυτών των γυναικών.

*2.3.7 Συσχέτιση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και των κυτταρολογικών ευρημάτων με το ιικό φορτίο του στελέχους 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.*

Διαπιστώνουμε, λοιπόν, ότι η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και η ενεργοποίηση του ενζύμου της τελομεράσης ελέγχονται κατά ένα μεγάλο ποσοστό από την παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων. Στα πλαίσια διερεύνησης των μηχανισμών που την ενεργοποιούν επικεντρωθήκαμε στη μελέτη του ιικού φορτίου του στελέχους 16. Η επιλογή του στελέχους 16 έγινε με βάση το γεγονός ότι παρουσιάζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα τόσο στην παρούσα διατριβή όσο και γενικότερα στη βιβλιογραφία<sup>242</sup>, καθώς επίσης ότι ανιχνεύεται στο 50% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Επιπλέον, βιβλιογραφικά δεδομένα έχουν υποδείξει το πιθανό ρόλο του ιικού φορτίου στην ανάπτυξη δυσπλασιών<sup>236,242,243-247</sup>, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα διατριβή. Παρατηρήσαμε αύξηση των επιπέδων του ιικού φορτίου του HPV-16 με την αύξηση του βαθμού δυσπλασίας υποδεικνύοντας ότι η παρουσία του στελέχους 16 συμβάλει καθοριστικά στην ανάπτυξη δυσπλασιών. Φαίνεται ότι η παρουσία υψηλών επιπέδων ιικού φορτίου είναι αποτέλεσμα του έντονου ιικού πολλαπλασιασμού. Έχει άλλωστε διαπιστωθεί ότι γυναίκες ηλικίας 25 ετών με υψηλά επίπεδα ιικού φορτίου HPV-16 έχουν τουλάχιστον 30 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας μέσα σε μια δεκαετία από την στιγμή της διάγνωσης<sup>248</sup>. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι μείωση των επιπέδων του ιικού φορτίου HPV-16 σε γυναίκες που παρακολουθούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση και του βαθμού δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας<sup>149</sup>. Το παραπάνω γεγονός δε σημαίνει απαραίτητα ότι όλες οι γυναίκες με υψηλά επίπεδα ιικού φορτίου θα αναπτύξουν υψηλού βαθμού δυσπλασία ή



καρκίνο του τραχήλου, αφού είναι γνωστό ότι πλήθος άλλων παραγόντων, όπως η απόκριση του ανοσοβιολογικού συστήματος σε συνδυασμό με την ηλικία, θα συμβάλλουν καθοριστικά στην τελική έκβαση της ασθένειας<sup>244</sup>. Επίσης, όταν μελετούμε το ιϊκό φορτίο πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη ότι αναφέρεται σε πολλά κύτταρα, κάποια από τα οποία μπορεί να μην έχουν μολυνθεί και ότι το ιϊκό DNA μπορεί να διασπαστεί κατά την ενσωμάτωση του στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή και να μην ενεργοποιηθεί<sup>245</sup>. Όσον αφορά στην προγνωστική αξία του υπολογισμού του ιϊκού φορτίου του HPV-16, παρατηρήθηκε μεγάλη ευαισθησία (89.6%), αλλά μόνο στην ανίχνευση του συγκεκριμένου στελέχους, επομένως ο ρόλος του είναι ιδιαίτερα περιορισμένος, στα πλαίσια της χρήσης του ως διαγνωστική δοκιμασία.

Ένα πολύ σημαντικό εύρημα της παρούσας διατριβής αποτελεί η συσχέτιση του ιϊκού φορτίου του HPV-16 με την έκφραση του ενζύμου της τελομεράσης και της καταλυτικής του υπομονάδας (hTERT), εύρημα που αναφέρεται για πρώτη φορά στην παγκόσμια βιβλιογραφία. Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνει το ρόλο της μόλυνσης με τον ιό HPV στην ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και κατέπτεκταση και του ολοενζύμου της τελομεράσης. Αναλυτικότερα, η ενσωμάτωση του ιϊκού γονιδιώματος στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή πραγματοποιείται σε χρωμοσωμικά «εύθραστες» περιοχές<sup>249,250</sup> καθώς και σε περιοχές που είναι κοντά στο πυρηνικό στρώμα<sup>251</sup>. Ειδικότερα, στον ιό HPV έχει παρατηρηθεί συσχέτιση της απώλειας του γονιδίου E2 με φτωχή πρόγνωση και μικρό διάστημα ελευθέρως νόσου. Στο γονιδίωμα του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων υπάρχουν αλληλουχίες υποκινητών, ενισχυτών, η δράση των οποίων καταστέλλεται λόγω της παρουσίας του γονιδίου E2<sup>252</sup>. Έχει διαπιστωθεί ότι η ενσωμάτωση ιϊκών γονιδιωμάτων αποτελεί μεταλλαξογόνο παράγοντα, πραγματοποιείται σε περιοχές που είναι πιο εύθραστες και ευάλωτες στο να δεχτούν ξένο DNA με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας γενικότερης γενετικής αστάθειας που θα οδηγήσει στην απορρύθμιση φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών και στην ανάπτυξη καρκίνου<sup>113</sup>. Ο Ferber και οι συν<sup>113</sup> παρατήρησαν ότι στην περιοχή του γονιδίου της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης υπάρχουν ελλείψεις σχετικά μικρών αλληλουχιών που προκαλούνται με την ενσωμάτωση του HPV. Η ενσωμάτωση του ιϊκού γονιδιώματος δε στοχεύει σε εκτεταμένες αλλαγές της αλληλουχίας του γονιδίου hTERT, ούτε σε αλλαγές στην κωδικοποιούσα περιοχή, γεγονός που δηλώνει ότι το γονίδιο hTERT αποτελεί στόχο της ενσωμάτωσης με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του και την ανάπτυξη ενός καρκινικού φαινοτύπου. Ακόμη το γεγονός ότι έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης παρατηρείται και σε τραχηλικά επιχρίσματα με χαμηλού βαθμού

δυσπλασίες αλλά μολυσμένα με στελέχη υψηλού κινδύνου, τονίζει το ρόλο του ιού στην ενεργοποίηση του ενζύμου.

*2.3.8. Συσχέτιση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και των κυτταρολογικών ευρημάτων με την έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 του στελέχους 16 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων.*

Στα πλαίσια μελέτης των μηχανισμών ενεργοποίησης της hTERT, στην παρούσα μελέτη, ανιχνεύτηκε η έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της τελομεράσης και πιθανόν και την καρκινογένεση. Η έκφραση των E6 και E7 συσχετίστηκε τόσο με την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης όσο και με την ίδια την τελομεράση. Η συσχέτιση αυτή έχει εκτεταμένα διαπιστωθεί, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*<sup>222,253,254,255</sup>. Η περιοχή από -211bp έως +40bp αποτελεί τη βασική περιοχή που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του γονιδίου της hTERT μέσω της E6<sup>253</sup>. Έχει παρατηρηθεί ότι κυρίως η E6 ενεργοποιεί την έκφραση της τελομεράσης, ενώ η παρουσία και των δύο δεν αυξάνει επιπλέον τα επίπεδα έκφρασης της hTERT. Ακόμη, έχει διαπιστωθεί ότι η E7 ενεργοποιεί το μετασχηματισμό των κυττάρων και ότι η E6 ολοκληρώνει την κακοήθη εξαλλαγή. Επιπλέον, πειράματα σε μετασχηματισμένα κερατινοκύτταρα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ογκοπρωτεΐνη E6 προκαλεί την ενεργοποίηση της τελομεράσης στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης<sup>256</sup>. Η απώλεια του γονιδίου E2 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων οδηγεί στην ενεργοποίηση των υποκινητών και ενισχυτών που προκαλούν την έκφραση ογκογενετικών πρωτεϊνών E6 και E7 αυξάνοντας τα επίπεδα τους, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν την ενεργοποίηση της τελομεράσης και διατηρούν την ικανότητα των κυττάρων για ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό<sup>257</sup>.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε επιπλέον συσχέτιση των μεταγράφων E6 και E7 και με τα κυτταρολογικά ευρήματα. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες στις οποίες αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα των ιικών ογκοπρωτεϊνών στην στοιβάδα των διαιρούμενων πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη δυσπλασιών. Έχει μάλιστα προταθεί ότι η ανίχνευση και πιθανότατα και η ποσοτικοποίηση των μεταγράφων μπορούν να αποτελέσουν μια πετυχημένη προγνωστική δοκιμασία<sup>258-262</sup>. Σε πρόσφατες μελέτες διαπιστώθηκε ότι η μη φυσιολογική έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 προκαλεί γενετική αστάθεια συμμετέχοντας σε σημαντικά μονοπάτια του κυτταρικού κύκλου. Αναλυτικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι τόσο η επισωματική όσο και η ενσωματωμένη κατάσταση του ιικού γονιδιώματος επάγει την έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 που συνεργάζονται για

να προκαλέσουν τη δημιουργία μη φυσιολογικού αριθμού κεντροσωματίων καθώς και μη φυσιολογική διαμόρφωση των πόλων της μιτωτικής ατράκτου με τελικό αποτέλεσμα τη γενετική αστάθεια<sup>263,264</sup>. Άλλωστε, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι μεταλλάξεις ογκογονιδίων, ιδιαίτερα των c-myc και TERT έχουν παρατηρηθεί συχνότερα σε ιστούς μολυσμένους με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων, τονίζοντας τη συσχέτιση της ιϊκής μόλυνσης με τη γενετική αστάθεια και την εμφάνιση δυσπλασιών του τραχήλου της μήτρας<sup>265</sup>.

*2.3.9. Συσχέτιση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA του υποκινητή του γονιδίου της.*

Όπως αναφέρθηκε, η έκφραση της hTERT υπομονάδας, η οποία καθορίζει και την έκφραση του ολοενζύμου της τελομεράσης, ρυθμίζεται τόσο μέσω μεταγραφικών παραγόντων όσο και μέσω επιγενετικών μηχανισμών. Η διαλεύκανση του μηχανισμού που ελέγχει την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης κρίνεται απαραίτητη για την κατανόηση της πολυπαραγοντικής διαδικασίας που οδηγεί στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Μεταξύ των επιγενετικών μηχανισμών που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων κυριαρχεί η μεθυλίωση του DNA, η οποία αποτελεί και τον πιο γνωστό μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης και πραγματοποιείται σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη. Στο γονίδιο της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης εδράζεται ένα CpG νησίδιο μεγάλου μεγέθους, περίπου 4kb. Το κεντρικό τμήμα του CpG νησιδίου περιλαμβάνει όλη την περιοχή του υποκινητή, το πρώτο και ένα τμήμα από το δεύτερο εξώνιο<sup>266</sup>.

Συνήθως η μεθυλίωση οδηγεί σε απενεργοποίηση γονιδίων, όπως για παράδειγμα η μεθυλίωση εντός της ρυθμιστικής περιοχής των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p16 και Rb, η οποία αναστέλλει την έκφρασή τους και οδηγεί σε καρκινογένεση, γενετική αστάθεια και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων<sup>267</sup>. Σε αντίθεση με το γενικότερο πρότυπο που επικρατεί σχετικά με το ρόλο της μεθυλίωσης στην έκφραση των γονιδίων, τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το ρόλο της μεθυλίωσης στη ρύθμιση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης είναι αμφιλεγόμενα<sup>139,141,146,147,268</sup>. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών έδειξαν ότι ο υποκινητής του γονιδίου ήταν υπομεθυλωμένος σε αδιαφοροποίητα και μη μετασχηματισμένα κύτταρα τα οποία δεν εξέφραζαν hTERT<sup>139,146,147,100</sup>. Αντιθέτως, σε διαφοροποιημένα κύτταρα καθώς και σε κύτταρα σε ηρεμία, ο υποκινητής βρέθηκε μεθυλωμένος και δεν παρατηρήθηκε έκφραση της hTERT<sup>139,146</sup>. Επιπλέον, σε μετασχηματισμένα και καρκινικά κύτταρα παρατηρείται έκφραση της hTERT παρόλο που

ο υποκινητής της είναι υπερμεθυλιωμένος<sup>141</sup>. Τέλος, σε άλλες μελέτες που έχουν γίνει πρόσφατα συγκρίνοντας τη μεθυλίωση του υποκινητή και την έκφραση του γονιδίου hTERT σε καρκινικές σειρές τραχήλου μήτρας, μαστού, πνεύμονα, παχέος εντέρου τραχήλου και εντέρου<sup>144,145,269</sup> παρατηρήθηκε υπομεθυλίωση σε όλα τα φυσιολογικά δείγματα που δεν εμφάνιζαν δράση τελομεράσης, ενώ παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση σε όλους τους όγκους και τις καρκινικές σειρές.

Γνωρίζοντας, επομένως, ότι η μεθυλίωση του DNA καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων, φαίνεται να υπάρχει μία αντιφατική σχέση μεταξύ της έκφρασης της hTERT και της μεθυλίωσης του υποκινητή της. Το αν τελικά θα μεταγραφεί το γονίδιο hTERT εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων, επιγενετικών μηχανισμών αλλά και από τον τύπο του κυττάρου<sup>270</sup>.

Μελέτες σχετικά με την κατάσταση μεθυλίωσης του DNA του υποκινητή του γονιδίου της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης σε τραχηλικά επιχρίσματα έδειξαν ότι μεθυλίωση ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 58.6% των καρκινικών δειγμάτων ενώ δεν παρατηρήθηκε μεθυλίωση σε φυσιολογικά δείγματα<sup>144,271</sup>. Στην συγκεκριμένη διατριβή για πρώτη φορά μελετήθηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης σε τραχηλικά επιχρίσματα με ποικιλία κυτταρολογικών ευρημάτων. Παρατηρήσαμε ανίχνευση της μεθυλίωσης στο 26.6% των φυσιολογικών τραχηλικών επιχρισμάτων, στο 50% των ASCUS, στο 68.2% των LGSIL και στο 77.8% των HGSIL. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την πρωτοποριακή τεχνική ποσοτικού προσδιορισμού της μεθυλίωσης με τη χρήση της τεχνολογίας του Light Cycler. Παρατηρήσαμε αύξηση της μέσης τιμής των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA του υποκινητή με την αύξηση του βαθμού δυσπλασίας. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα μεθυλίωσης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο διαχωρισμό των φυσιολογικών επιχρισμάτων από τα επιχρίσματα με υψηλού βαθμού δυσπλασία και των επιχρισμάτων με χαμηλού βαθμού από τα αντίστοιχα υψηλού.

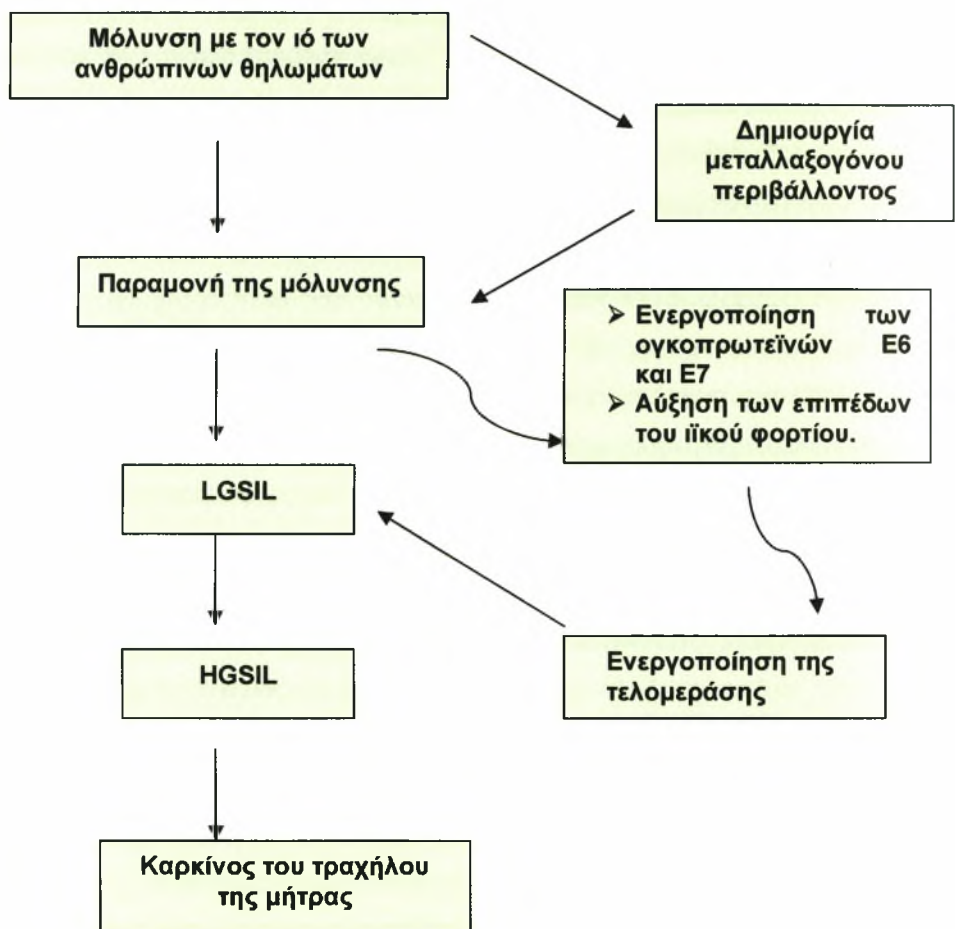
Μέχρι σήμερα δεν έχει πραγματοποιηθεί καμία μελέτη με στόχο τη διερεύνηση της σχέσης ανάμεσα στη μεθυλίωση του υποκινητή και την έκφραση της hTERT σε τραχηλικά επιχρίσματα με ποικιλία κυτταρολογικών ευρημάτων. Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και του ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT. Μέχρι σήμερα, έχει πραγματοποιηθεί μία μελέτη μόνο σε καρκινικά τραχηλικά επιχρίσματα στα οποία επίσης δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA του υποκινητή με την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης<sup>271</sup>. Η αλληλουχία του υποκινητή που μελετήθηκε (-442 έως -221)

περιλαμβάνει πολλές περιοχές πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη, γνωστές ως CpG sites και φαίνεται ότι η περιοχή αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο ρύθμισης του γονιδίου τόσο σε άλλου είδους ιστούς όσο και σε κυτταρικές σειρές<sup>141</sup>. Στα επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας, ωστόσο, δε φαίνεται μεθυλίωση του DNA του υποκινητή της hTERT να ελέγχει την έκφραση του γονιδίου.

Τα ευρήματα αυτά τονίζουν ότι τα φυσιολογικά κύτταρα, που γενικά δεν εκφράζουν την τελομεράση, διαθέτουν έναν ή περισσότερους μηχανισμούς καταστολής της έκφρασης της που δεν εξαρτώνται από τη μεθυλίωση του υποκινητή, ότι το γονίδιο hTERT μπορεί να μεταγράφεται από έναν υπερμεθυλιωμένο υποκινητή σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, όπως στα επιθηλιακά κύτταρα των τραχηλικών επιχρισμάτων και ότι είναι δυνατό να έχουν ενεργοποιηθεί εναλλακτικοί μηχανισμοί διατήρησης των τελομερών (ALT)<sup>65</sup>. Ωστόσο το γεγονός ότι παρατηρήσαμε αύξηση των επιπέδων της μεθυλίωσης μπορεί να οφείλεται σε διαδικασίες που δεν σχετίζονται απαραίτητα με τον μεταγραφικό έλεγχο των γονιδίων. Συνοπτικά, η υπερμεθυλίωση που παρατηρήθηκε μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι CpG περιοχές μέσα στον υποκινητή μεθυλιώνονται κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης νεοπλασιών όπως έχει παρατηρηθεί και στους υποκινητές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ακόμη, η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου δε συνεισφέρει στην ογκογένεση αλλά αντίθετα, θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ένας μη πετυχημένος μηχανισμός προφύλαξης από την καρκινογένεση εμποδίζοντας μηχανισμούς αθανατοποίησης που σχετίζονται με την τελομεράση<sup>268</sup>. Επιπρόσθετα, είναι πιθανή η ύπαρξη ενός άγνωστου μέχρι τώρα μηχανισμού που θα μπορούσε να ενεργοποιήσει την έκφραση της hTERT από τον υπερμεθυλιωμένο υποκινητή καθώς επίσης είναι γνωστό ότι σε πολλές αλληλουχίες υπάρχουν περιοχές πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη που όμως δεν έχουν κάποιο λειτουργικό ρόλο. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι πιθανότατα η έκφραση του hTERT να ελέγχεται από διαφορετικά φαινόμενα, όπως η μεθυλίωση, η σύνδεση μεταγραφικών παραγόντων, η ακετυλίωση των ιστονών αλλά και η παρουσία μη νοηματικών αλληλουχιών RNA (micro RNAs).

Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι πλήθος γενετικών και επιγενετικών αλλαγών πραγματοποιούνται στα επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας κατά τη διαδικασία ανάπτυξης δυσπλασιών και καρκίνου. Αυτό που μπορεί να διατυπωθεί με σαφήνεια είναι ότι η μόλυνση με το ιόν HPV δημιουργεί και το κατάλληλο μεταλλαξογόνο περιβάλλον το οποίο επάγει μια σειρά από γεγονότα που δημιουργούν κυτταρικές αλλαγές σε κάθε φυσιολογικό κύτταρο και που σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα της γυναίκας είναι δυνατό να οδηγήσουν στην καρκινογένεση. Η κυτταρική εξαλλαγή είναι

συνδυασμός της παρουσίας του ιού, της ποσότητας του ιϊκού φορτίου, της έκφρασης των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, της ενεργότητας του ολοενζύμου της τελομεράσης, καθώς και της αύξησης των επιπέδων των μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της. Η μεθυλίωση στον υποκινητή της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης δε φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραπάνω διαδικασία, δεδομένου ότι δεν επηρεάζει την έκφρασή της. Στη συνέχεια παρουσιάζεται μια διαγραμματική απεικόνιση των πιθανών σταδίων που ενέχονται στην καρκινογένεση μετά από μόλυνση με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων.



**Διάγραμμα 17:** Μοντέλο που απεικονίζει τα πιθανά στάδια που ενέχονται στην καρκινογένεση μετά από μόλυνση με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV).

2.3.10. Κλινική χρησιμότητα των δοκιμασιών ανίχνευσης της τελομεράσης (TRAP), ανίχνευσης των επιπέδων έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης, ποσοτικού προσδιορισμού της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης στην αντιμετώπιση γυναικών με δυσπλασίες του τραχήλου της μήτρας.

Η πιο διαδεδομένη κυτταρολογική εξέταση, γνωστή ως τεστ Παπανικολάου παρουσιάζει ευαισθησία 30-87% και ειδικότητα 86-100%. Η δοκιμασία της μοριακής ανίχνευσης του γονιδιώματος του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων, γνωστή ως HPV DNA τεστ, έχει ευαισθησία 65-98% και ειδικότητα: 52-74%<sup>184</sup>. Η ταυτόχρονη χρήση και των δύο δοκιμασιών στην παρακολούθηση των γυναικών με δυσπλασίες τραχήλου, έχει διαπιστωθεί ότι μειώνει τον κίνδυνο εκδήλωσης υψηλού βαθμού δυσπλασία<sup>272</sup>, χωρίς ωστόσο, ένα θετικό αποτέλεσμα στη μόλυνση με τον ιό HPV να αποτελεί απόλυτο δείκτη παρουσίας υψηλού βαθμού δυσπλασίας ή πιθανότητας ανάπτυξης. Για αυτό, άλλωστε, η χρήση μιας άλλης δοκιμασίας κρίνεται απαραίτητη.

Το ζήτημα της κλινικής χρησιμότητας της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης στην κλινική αντιμετώπιση των γυναικών έχει τεθεί σε αρκετές μελέτες, με τα αποτελέσματα να παραμένουν συγκεχυμένα και την ευαισθησία της πιο διαδεδομένης κλινικής δοκιμασίας για τη μελέτη του ολοενζύμου (μέθοδος TRAP) να κυμαίνεται από 3.7% έως 100%<sup>211,213,215,221</sup>. Στην παρούσα διατριβή, η μελέτη της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP και η έκφραση των μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας με τη συμβατική μέθοδο της αντίστροφης -conventional RT-PCR- έδωσαν ευαισθησία 62.5% και 87.5% αντίστοιχα, ενώ η αντίστοιχη τιμή της ευαισθησίας της μεθόδου του ποσοτικού προσδιορισμού της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης βρέθηκε σημαντικά αυξημένη, στο 96%. Η αυξημένη ευαισθησία της παραπάνω μεθόδου τονίζει ότι ο ποσοτικός προσδιορισμός της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης μπορεί να αποτελέσει έναν πιο ευαίσθητο δείκτη για την ανίχνευση τραχηλικών επιχρισμάτων με υψηλού βαθμού δυσπλασία. Παρόλο που η ειδικότητα και η θετική προγνωστική τιμή (PPV-Positive Predictive Value) παραμένουν σχετικά χαμηλές και αποτελούν μειονέκτημα στην εκτεταμένη εφαρμογή της δοκιμασίας, η βελτίωση στην ευαισθησία και στην αρνητική προγνωστική τιμή (NPV-Negative Predictive Value) κατατάσσει τον ποσοτικό προσδιορισμό της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης ως έναν επιπλέον επικουρικό δείκτη στην κλινική αντιμετώπιση των γυναικών με υψηλού βαθμού δυσπλασία.

Αντίθετα, σχετικά με την κλινική χρησιμότητα του ποσοτικού προσδιορισμού της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης στην αντιμετώπιση γυναικών με ατυπία

κυττάρων απροσδιορίστου σημασίας και χαμηλού βαθμού δυσπλασία, η χαμηλή ευαισθησία 33.6% που παρατηρήθηκε και η ανίχνευση της τελομεράσης στο 20% των φυσιολογικών τραχηλικών επιχρισμάτων τονίζει τη μειωμένη κλινική χρησιμότητα στις γυναίκες. Απαιτείται, ωστόσο, η παρακολούθηση των γυναικών με θετικές τιμές τελομεράσης προκειμένου να διαπιστωθεί αν ο βαθμός δυσπλασίας τους θα εξελιχθεί γρηγορότερα σε σύγκριση με τις γυναίκες που τα τραχηλικά τους επιχρίσματα ήταν αρνητικά στην ανίχνευση της τελομεράσης και της καταλυτικής της υπομονάδας.

Τέλος, οι τιμές της ευαισθησίας και της ειδικότητας της μεθόδου προσδιορισμού του ποσοστού μεθυλίωσης του DNA του υποκινητή της καταλυτικής υπομονάδας που παρατηρήθηκαν ήταν 77.8% και 43.5% αντίστοιχα, αμφισβητώντας την κλινική χρησιμότητα της μεθυλίωσης στην αντιμετώπιση γυναικών με δυσπλασίες τραχήλου της μήτρας.

Συμπερασματικά, λόγω της χαμηλής ειδικότητας του τεστ Παπανικολάου κρίνεται αναγκαία η χρησιμοποίηση επιπλέον διαγνωστικών δοκιμασιών με στόχο την καλύτερη πρόγνωση στις γυναίκες με χαμηλού βαθμού δυσπλασίες. Η χρήση του ποσοτικού προσδιορισμού της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης πιθανότατα θα μπορούσε να αποτελέσει διαγνωστικό δείκτη για την αντιμετώπιση των γυναικών με υψηλού βαθμού δυσπλασία. Μεγάλη σημασία ωστόσο πρέπει να δοθεί και στις γυναίκες με χαμηλού βαθμού δυσπλασία που είναι θετικές για τελομεράση, στις οποίες η συνεχής παρακολούθηση κρίνεται απαραίτητη. Η τελική εκτίμηση της αντιμετώπισης των γυναικών με δυσπλασίες του τραχήλου της μήτρας πρέπει να βασίζεται στην κλινική εικόνα σε συνδυασμό με το σύνολο των διαγνωστικών δοκιμασιών που υπάρχουν. Ο απώτερος στόχος όλων των αντίστοιχων μελετών είναι η ανάπτυξη τεχνικών που θα οδηγήσουν στην εξατομικευμένη διάγνωση αλλά και πρόβλεψη των δυσπλασιών του τραχήλου της μήτρας. Οι μελλοντικές πρακτικές εφαρμογές αυτών των μοριακών τεχνικών αλλά και η κατανόηση της δράσης της τελομεράσης στην διαδικασία της καρκινογένεσης ίσως τελικά να οδηγήσουν στη δημιουργία βελτιωμένων θεραπευτικών λύσεων έναντι του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.



## Συμπεράσματα

- Τα επίπεδα της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης συσχετίστηκαν με το βαθμό δυσπλασίας των κυτταρολογικών ευρημάτων. Η κλιμάκωση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με την αύξηση του βαθμού δυσπλασίας καθώς και η ανίχνευση της σε τραχηλικά επιχρίσματα με χαμηλού βαθμού δυσπλασία τονίζουν ότι η ενεργοποίηση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης αποτελεί ένα γεγονός που συμβαίνει νωρίς κατά την πολύπλοκη διαδικασία της καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας. Προτείνεται ότι η ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης σε τραχηλικά επιχρίσματα με δυσπλασία αντανακλά την παρουσία ενός κυτταρικού φαινοτύπου ο οποίος χαρακτηρίζεται από απεριόριστες κυτταρικές διαιρέσεις είτε των ενδοθηλιακών ή των νεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων.
- Η παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων, και ειδικότερα του στελέχους HPV-16 συσχετίστηκε τόσο με την ενεργότητα της τελομεράσης, όσο και με την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης. Η αύξηση των επιπέδων του ιικού φορτίου του HPV-16 καθώς και η έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7 φαίνεται να συμμετέχουν μεταξύ άλλων στη διαδικασία ενεργοποίησης τόσο της hTERT όσο και του ολοενζύμου της τελομεράσης, δημιουργώντας το κατάλληλο μεταλλαξογόνο περιβάλλον και προκαλώντας την κυτταρική εξαλλαγή των επιθηλιακών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας.
- Σχετικά με το ρόλο του επιγενετικού μηχανισμού της μεθυλίωσης στην ενεργοποίηση της hTERT παρατηρήθηκε ότι η μεθυλίωση στον υποκινητή της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης, παρόλο που αυξάνεται με το βαθμό δυσπλασίας, δε συσχετίζεται με την έκφρασή της, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή άλλων γενετικών/επιγενετικών μηχανισμών στην ενεργοποίηση της hTERT.
- Αναφορικά με την κλινική χρησιμότητα των παραμέτρων που μελετήθηκαν (HPV, hTERT, τελομεράση, μεθυλίωση) συμπεραίνουμε ότι ο ποσοτικός προσδιορισμός της hTERT, θα μπορούσε να αποτελέσει επιπρόσθετο διαγνωστικό δείκτη για την αντιμετώπιση γυναικών με υψηλού βαθμού δυσπλασία.



## Περίληψη

Τα φυσικά άκρα των χρωμοσωμάτων ονομάζονται τελομερή. Κατά τη διάρκεια αντιγραφής του DNA και λόγω του «προβλήματος ολοκλήρωσης της αντιγραφής» τα τελομερή χάνουν σταδιακά το μήκος τους. Το πρόβλημα αυτό επιλύει η τελομεράση που έχει την ικανότητα να προσθέτει επαναλήψεις νουκλεοτιδίων στα άκρα των χρωμοσωμάτων διατηρώντας το μήκος των τελομερών και παρέχοντας στα κύτταρα τη δυνατότητα για απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων. Πρόκειται για ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, που αποτελείται από μία RNA υπομονάδα που λειτουργεί σαν εκμαγείο για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (hTR), μία υπομονάδα με δράση αντίστροφης μεταγραφάσης (hTERT) και πλήθος άλλων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν συμβάλλοντας στη δημιουργία ενός ενεργού ολοενζύμου. Παρόλο που η hTR εκφράζεται ανεξάρτητα από την ενεργότητα του ενζύμου, η hTERT διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην ενεργότητα του ολοενζύμου. Φυσιολογικά, έκφραση της τελομεράσης παρατηρείται στα γαμετικά κύτταρα, σε όλη τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης καθώς και σε φυσιολογικά κύτταρα που διαιρούνται συνεχώς, όπως σε αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα, σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, σε κύτταρα του μυελού των οστών κ.ά. Επιπλέον, έχει βρεθεί έκφραση του ενζύμου σε 85-90% των περιπτώσεων καρκίνου, συμπεριλαμβάνοντας και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η ρύθμιση της έκφρασης της hTERT και κατ'επέκταση και του ολοενζύμου πραγματοποιείται τόσο μέσω γενετικών όσο και επιγενετικών μηχανισμών. Ανάμεσά τους, σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης της φαίνεται να διαδραματίζουν οι E6 και E7 πρωτεΐνες του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV), ενώ η παρουσία μεγάλου αριθμού CpG νησιδίων τονίζει το πιθανό ρυθμιστικό ρόλο της μεθυλίωσης.

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί το δεύτερο πιο συχνό καρκίνο παγκοσμίως και έχει συσχετιστεί με την παρουσία του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) και ειδικότερα με τα στελέχη 16 και 18. Ο ιός HPV προσβάλλει τα επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στοιβάδας του εξωτραχήλου και πιθανότατα επάγει την ενεργοποίηση της τελομεράσης. Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά την έκφραση της τελομεράσης και της hTERT τόσο σε καρκινικά όσο και σε προκαρκινικά τραχηλικά επιχρίσματα. Η διάγνωση των κυτταρολογικών ανωμαλιών πραγματοποιείται με το τεστ Παπανικολάου και η κατάταξη σύμφωνα με το σύστημα Bethesda περιλαμβάνει τα άτυπα πλακώδη κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας (ASCUS), τα τραχηλικά επιχρίσματα με χαμηλού βαθμού δυσπλασία (LGSIL) και με υψηλού βαθμού δυσπλασία (HGSIL). Ωστόσο, λόγω της μικρής ειδικότητας του κυτταρολογικού τεστ, κρίνεται αναγκαία η εύρεση νέων

διαγνωστικών δοκιμασιών που θα συμβάλλουν στην κλινική αντιμετώπιση των γυναικών με δυσπλασίες τραχήλου της μήτρας.

Στη συγκεκριμένη διατριβή μελετήθηκε η έκφραση της τελομεράσης και της καταλυτικής υπομονάδας της (hTERT) σε 45 φυσιολογικά και σε 280 παθολογικά τραχηλικά επιχρίσματα με ποικιλία κυτταρολογικών ευρημάτων και διερευνήθηκαν πιθανοί μηχανισμοί που ενέχονται στη ρύθμιση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT), όπως ο ρόλος του ιϊκού και των E6 και E7 μεταγράφων του ιού HPV-16 καθώς και η μεθυλίωση του DNA του υποκινητή του γονιδίου hTERT. Ακόμη, προκειμένου να ελεγχθεί η διαγνωστική ή προγνωστική αξία των παραπάνω παραμέτρων υπολογίστηκαν τα χαρακτηριστικά των διαγνωστικών δοκιμασιών: ευαισθησία, ειδικότητα, θετική προγνωστική τιμή και αρνητική προγνωστική τιμή.

Παρατηρήσαμε συσχέτιση της μεταξύ της τελομεράσης και των επιπέδων έκφρασης της hTERT με τα κυτταρολογικά ευρήματα, την παρουσία του ιού HPV, τα επίπεδα του ιϊκού DNA και την ανίχνευση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7. Επίσης, διαπιστώσαμε αύξηση της μέσης τιμής των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA του υποκινητή με την αύξηση του βαθμού δυσπλασίας, ενώ για πρώτη φορά δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και του ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT. Από όλα τα παραπάνω ευρήματα διαπιστώνουμε ότι η μόλυνση με το ιό HPV δημιουργεί το κατάλληλο μεταλλαξογόνο περιβάλλον και επάγει μια σειρά από γεγονότα όπως η αύξηση των επιπέδων του ιϊκού φορτίου του HPV-16, η έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, η έκφραση της τελομεράσης καθώς και η αύξηση των επιπέδων των μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της, που δημιουργούν κυτταρικές αλλαγές και επάγουν την καρκινογένεση, ενώ η μεθυλίωση στον υποκινητή της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης δε φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραπάνω διαδικασία. Πιθανότατα άλλοι γενετικοί ή και επιγενετικοί μηχανισμοί ελέγχουν τη ρύθμιση της hTERT.

Τέλος, σχετικά με την κλινική εφαρμογή των παραπάνω ευρημάτων, η χρήση του ποσοτικού προσδιορισμού της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης πιθανότατα θα μπορούσε να αποτελέσει διαγνωστικό δείκτη για την αντιμετώπιση των γυναικών με υψηλού βαθμού δυσπλασία, ενώ κρίνεται απαραίτητη η συνεχής παρακολούθηση των γυναικών με χαμηλού βαθμού δυσπλασία που είναι θετικές για τελομεράση. Η τελική εκτίμηση της αντιμετώπισης των γυναικών με δυσπλασίες του τραχήλου της μήτρας πρέπει να βασίζεται στην κλινική εικόνα σε συνδυασμό με το σύνολο των διαγνωστικών δοκιμασιών που ήδη υπάρχουν.

## Summary

The natural ends of chromosomes are called telomeres. During DNA replication telomeres are gradually shortened due to the “end replication problem”. This problem is being solved by telomerase, an enzyme which adds hexameric nucleotides repeats at the chromosome ends. The role of telomerase is to maintain the ends of chromosomes, so telomere lengths are extended or maintained and replicative senescence is avoided. Telomerase is composed of two major subunits contributing to its enzymatic activity, an RNA component (hTR) that serves as the template for the polymerase activity of the enzyme and a conserved catalytic subunit with reverse transcriptase activity (hTERT). A number of additional protein subunits, as well as a variety of proteins contributing to the assembly and maturation of the telomerase enzymatic complex have also been identified. Among these various telomerase components, hTR and hTERT are considered essential for reconstitution of telomerase activity. Although hTR is highly expressed in all tissues regardless of telomerase activity, with cancer cells having higher expression than normal cells, hTERT is presently considered to be the most important factor in the formation of functional telomerase and concomitant immortalization and is strongly associated with the enzyme’s activity. Most normal human somatic cells exhibit no detectable telomerase activity but highly proliferative cells and up to 85-90% of cancer cells, including cervical cancer cells show telomerase activity. Several genetic and epigenetic mechanisms exist which control the transcription of the hTERT gene, leading to repression or reactivation of telomerase activity in normal and cancer cells in a context-dependent manner. Among them several virus-encoded proteins have been suggested, which contribute to human cell transformation and carcinogenesis. Human papillomaviruses (HPV), especially high risk types 16 and 18, play an important role in immortalization and transformation of human ceratinocytes and their oncogenic activities are mainly attributed to the E6 and E7 oncoproteins. Also, analysis of the promoter region of hTERT gene has revealed the presence of a CpG island and a high overall GC content suggesting a possible role of methylation status in the regulation of hTERT expression.

Cervical cancer is a major cause of death and the second most common cancer in women worldwide, while certain types of human papillomavirus (HPV) being etiologically related to the development of most cases of cervical cancer. Cervical cytologic abnormalities are categorized in atypical squamous epithelial cells of undetermined significance (ASCUS), low-grade squamous intraepithelial lesions (LGSILs) including condylomata acuminata and mild dysplasia as well as high-grade

squamous intraepithelial lesions (HGSIL) including moderate to severe dysplasias and carcinoma in situ.

In the present thesis telomerase and hTERT mRNA expression were studied in 45 normal and 280 abnormal cervical specimens and possible mechanisms concerning hTERT regulation were investigated, as the role of HPV-16 DNA viral load, E6/E7 mRNA expression and hTERT DNA promoter methylation. Moreover, in order to examine the clinical utility of the above parameters sensitivity, specificity, negative and positive predictive values were evaluated.

Telomerase and hTERT mRNA expression levels were correlated with cytologic findings, HPV infection, HPV-16 DNA viral load and E6/E7 mRNA expression. Moreover, we observed an increase in hTERT DNA promoter methylation levels and the degree of dysplasia. In conclusion, our findings suggest that HPV infection either alone or in association with other insults activates the expression of the telomerase gene in the cervical mucosa. Telomerase activation and hTERT mRNA expression appears to be an early event in the malignant transformation of cervical epithelium, while, for the first time, we found that DNA promoter methylation does not seem to play any role in hTERT mRNA expression. Regarding the clinical utility of the above findings and based on our assessment values, we propose that quantitative hTERT mRNA could be used as an adjunctive marker to cervical cytology for HGSILs. However, it is suggested that the final evaluation of telomerase test performance must rely on a combination of all available test assessment data, cytologic and histologic diagnosis as well as the follow up of all women with low grade lesions that expressed telomerase activity.

## Βιβλιογραφία

1. Bouffler SD, Blasco MA, Cox R, Smith PJ. Telomeric sequences, radiation sensitivity and genomic instability. *Int J Radiat Biol* 2001 77(10): 995-1005.
2. Moyziz RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence (TTaGGG)<sub>n</sub> present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 85:6622-6626.
3. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, et al. Mammalian telomerases end in a large duplex loop. *Cell* 1999 97: 503-514
4. Greider CW, Blackburn EH. *Scientific American* 1996 2:92
5. De Lange T, Shiue L, Myers M.R., Cox R.D., Naylor L.S. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 1990 10(2): 518-527.
6. Wellinger RJ, Sen D. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer* 1997 33(5): 735-749.
7. Blackburn E. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001 106: 661-673
8. Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *Biol of Neoplasia* 2000 18(13): 2626-2634.
9. Cong Y-Sh, Wright EW, Shay WJ. Human telomerase and its regulation. *American Society for Microbiology* 2002 66(3): 407-425
10. Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 1998 282: 1484-1487.
11. De Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 1992 21:532-540.
12. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999 283:1321-1325.
13. Hackett JA, Greider CW. End resection initiates genomic instability in the absence of telomerase. *Molecular and Cellular Biology*. 2003 23:8450-8461.
14. Maser RS, DePinho RA. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science*. 2002 297:565-569
15. Middleman E, Choi J, Venteicher AS, Cheung Pand SE Artandi. "Regulation of cellular immortalization and steady-state protein levels of the telomerase reverse transcriptase through its carboxy-terminal domain." *Mol. Cell. Biol.* 2006 In press
16. Blackburn H.E. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991 350: 569-573.
17. Smith S, de Lange T. TRF1, a mammalian telomeric protein. *Trends in Genetics* 1997 13:21-26.
18. Smilenov LB, Dhar S, Pandita TK. Altered telomere nuclear matrix interactions and nucleosomal periodicity in ataxia telangiectasia before and after ionizing radiation treatment. *Molecular and Cellular Biology* 1999 19:6963-6971

19. Kirk KE, Harmon BP, Reichardt IK, Sedat JW, Blackburn EH. Block in anaphase chromosome separation caused by telomerase template mutation. *Science* 1997 275:1478-1481.
20. Buys Ch. Telomeres, telomerase and cancer. *Clinical Implications of Basic Research*, 2000 342(17): 1282-1283.
21. Erlitzki R, Minuk G. Telomeres, telomerase and HCC: the long and the short of it. *J Hepatol* 1999 31: 939-945.
22. Hodes R. Molecular targeting of cancer: Telomeres as targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2001 98(14):7649-7651.
23. Klapper W, Parwaresch R, Krupp G. Telomere biology in human aging and aging syndromes. *Mechanisms of Ageing and Development* 2001 122:695-712
24. Vaziri H, Schachter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 1993 52: 661-667.
25. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 1992 89: 10114-10118.
26. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular aging. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2000 1: 72-76.
27. Allsopp RC, Harley CB Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Experimental Cell Research* 1995 219: 130-136.
28. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990 345: 458-460.
29. Granger M, Wright W, Shay J. Telomerase in cancer and aging. *Oncology-Hematology* 2002 41: 29-40.
30. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res* 1991 196: 33-39.
31. Klapper W, Parwaresch R, Krupp G. Telomere biology in human aging and aging syndromes. *Mechanisms of Ageing and Development* 2001 122: 695-712.
32. Halvorsen TL, Leibowitz G, Levine F. Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. *Mol. Cell Biol.* 1999 19: 1864-1870.
33. Lundblad V and Blackburn EH. *Cell* 1993 73: 347-360.
34. Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T. Homologous Recombination Generates T-Loop-Sized Deletions at Human Telomeres. *Cell* 2004 119:355-368.
35. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nature Medicine* 1997 3:1271-1274.
36. Reddel RR, Bryan TM, Colgin LM, Perrem KT, Yeager TR. Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat Res* 2001 155:194-200.



37. Shay J, Wright W. Telomeres and telomerase: Implications for cancer and aging. *Radiation Research* 2001 155: 188-193.
38. Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, et al. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Development* 1999 13: 817-826.
39. Poole CJ, Andrews GL, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 2001 269:1-12.
40. Feng J, Funk DW, Wang SS, Weinrich LS, Avilion AA, Chiu CP, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995 269: 1236-1241.
41. Greider CW. Mammalian telomere dynamics: Healing, fragmentation, shortening and stabilization. *Current Opinion in Genetics & Development*.1994 4:203-211.
42. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 1997 276:561-567
43. Greider CW, Blackburn E.H. The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*. 1987 51:887-898.
44. Greider CW, Blackburn E.H. Tracking telomerase. *Cell*. 2004 116: 83-86.
45. Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L. Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr. Biol*. 1998 8:177– 180.
46. Maser RS, DePinho RA. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science* 2002 297:565-569
47. Soder AI, Hoare SF, Muir S, Going JJ, Parkinson EK, Keith W. Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene* 1997 14: 1013-1021.
48. Chen JL, Blasco MA, Greider CW. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*. 2000 100: 503-514.
49. Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Tanaka M, Inoue M. Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int J Cancer* 1999 80: 60–63.
50. Takamura M, Kyo S, Kanaya T, Tanaka M, Inoue M.. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res* 1998 58:1558–1561.
51. Anderson C J, Hoare S F, Ashcroft M, Bilisland A E and Keith W N. Hypoxic regulation of telomerase gene expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms *Oncogene*. 2006 5 25(1):61-9.
52. Stewart SA, Ben-Porath I, Carey VJ, O'Connor BF, Hahn WC, Weinberg RA: Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nature Genetics* 2003 33:492-496.
53. Nakamura TM, Cech TR. Reversing time: origin of telomerase. *Cell* 1998 92: 587-590.

54. Huard S, Moriarty T and Autexier C. The C terminus of the human telomerase reverse transcriptase is a determinant of enzyme processivity. *Nucleic Acids Res* 2003 31:4059-4070.
55. Hossain S, Singh S and Lue N. Functional analysis of the C-terminal extension of telomerase reverse transcriptase. A putative "thumb" domain. *J Biol Chem* 2002 277: 36174-36180.
56. Lue N.F. A physical and functional constituent of telomerase anchor site. 2005 In press
57. Harrington L, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Yeung D, Mar V, et al. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes and Development* 1997 11: 3109-3115.
58. Meyerson M, Counter MC, Eaton NE, Ellisen WL, Steiner P, Dickinson Caddle S, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997 90: 785-795.
59. Stanta G, Bonin S, Niccolini B, Raccanelli A, Baralle F. Catalytic subunit of telomerase expression is related to RNA component expression. *Federation of European Biochemical Societies* 1999 460: 285-288.
60. Chan SR, Blackburn EH. Telomeres and telomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 2004 359: 109-121.
61. Cao Y, Li H, Deb S, Liu JP. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 2002 21: 3130-3138.
62. Forsythe HL, Elmore LW, Jensen KO, Landon MR, Holt SE. Retroviral-mediated expression of telomerase in normal human cells provides a selective growth advantage. *International Journal of Oncology* 2002 20: 1137-1143.
63. Smith LL, Collier HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nature Cell Biology* 2003 5: 474-479.
64. Sharma GG, Gupta A, Wang H, Scherthan H, Dhar S, Gandhi V, et al. hTERT associates with human telomeres and enhances genome stability and DNA repair. *Oncogene* 2003 22: 131-146.
65. Horikawa I, Barrett JC. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* 2003 24: 1167-1176.
66. Smith S, T. de Lange. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* 2000 10:1299–1302.
67. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 2000 20:1659– 1668.
68. Zhu X.D, Kuster B, Mann M, Petrini JH, de Lange T: Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* 2000 25 :347– 352.

69. Opresko PL, von Kobbe C, Laine JP, Harrigan J, Hickson ID, Bohr VA. Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* 2002 277:41110–41119.
70. Zhu XD, Niedernhofer L, Kuster B, Mann M, Hoeijmakers JH, de Lange T. ERCC1/XPF removes the 3V overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol Cell* 2003 12:1489–1498.
71. Downs JA, Jackson SP. A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Mol Cell Biol* 2004 5:367–378.
72. Bailey SM, Meyne J, Chen DJ, Kurimasa A, Li GC, Lehnert BE, et al. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1999 96:14899–14904.
73. Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR, Gottschling DE. Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev* 2003 17:2384–95.
74. Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, et al. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* 1999 13: 817-26
75. Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human dyskeratosis congenital. *Nature* 1999 402: 551-555.
76. Pogacic V, Dragon F, Filipowicz W. Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionary conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol Cell Biol* 2000 20:9028–40.
77. Greider CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 1996 65: 337-365.
78. Alberts B. "DNA replication mechanisms" *Molecular biology of the cell*. 4th edition. Garland Science, New York. 2002 238-234.
79. Forsythe HL, Elmore LW, Jensen KO, Landon MR, Holt SE. Retroviral-mediated expression of telomerase in normal human cells provides a selective growth advantage. *International Journal of Oncology* 2002 20:1137-1143.
80. Mason PJ. Stem cells, telomerase and dyskeratosis congenital. *Bioessays* 2003 25:126–132
81. Nakayama J, Tahara H, Tahara E, Saito M, Ito K, Nakamura H, et al. Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.* 1998, 18:65–68.
82. Wright WE, Shay JW. The two-step mechanism controlling cellular enescence and immortalization. *Exp Gerontol* 1992 27, 383–389.
83. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994 266:2011-2015.

84. Hyman K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol.* 1995 155: 3711–5.
85. Bryce L, Morrison N, Hoare S, Muir S, Keith N. Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia* 2000 2(3): 197-201.
86. Harle-Bachor C, Boukamp P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996 93: 6476-6481.
87. Counter MC, Gupta J, Harley BC, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 1995 85(9): 2315-2320.
88. Paul-Samojedny M, Witek A, Samojedny A, Witkowska A, Wilczok T. Human telomerase RNA as endogenous control in endometrial tissue. *Int J Gynecol Cancer* 2005 15:343–348.
89. Nakamura T M, Cech TR. Reversing time: origin of telomerase. *Cell* 1998 92:587-590.
90. Xu D, Gruber A, BjoÈrkholm M, Peterson C, Pisa P. Suppression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in differentiated HL-60 cells: regulatory mechanisms. *Br. J. Cancer* 1999 80:1156-1161
91. Savoysky E, Yoshida K, Ohtomo T, Yamaguchi Y, Akamatsu K, Yamazaki T, et al. Down-regulation of telomerase activity is an early event in the differentiation of HL60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1996 226:329-334
92. Poole CJ, Andrews GL, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 2001 269:1-12.
93. Guilleret I. and Benhattar J. Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines, *Biochemical and biophysical Research Communications* 2004 325:1037-1043.
94. Janknecht P. On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Letters* 2004 564: 9-13
95. Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* 1998 12:1073–1085.
96. Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H, et al. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res* 2000 6:1239-47.
97. Lin SY, Elledge SJ. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* 2003 113:881-9.
98. Fujimoto K, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Kitagawa Y, Itoh H, et al. Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit

(hTERT) gene promoter: possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT. *Nucleic Acids Res* 2000 28:2557-62.

99. Oh S, Song Y, Yim J, Kim TK. The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J. Biol. Chem.* 1999 274:37473-37478.
100. Oh S, Song Y, Yim J, Kim T. Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene.* 2000 19:1485-90.
101. Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, Cong YS, Wen J, Hirte HW. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol* 2000 20:3764–3771.
102. Krishnan V, Wang X, Safe S. *Biol Chem* 1994 269:15912-15917.
103. Wang Z, Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Maida Y, et al. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Cancer Res* 2000 60:5376-5381.
104. Soda H, Raymond E, Sharma S, Lawrence R, Davidson K, Oka M, et al: Effects of androgens on telomerase activity in normal and malignant prostate cells in vitro. *Prostate* 2000 43, 161-168.
105. Guo C, Armbuster BN, Price DT, Counter CM. In vivo regulation of hTERT expression and telomerase activity by androgen. *J Urol* 2003 170: 615-618.
106. Ikeda N, Uemura H, Ishiguro H, Hori M, Hosaka M, Kyo S, et al. Combination treatment with 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 9-cis-retinoic acid directly inhibits human telomerase reverse transcriptase transcription in prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther* 2003 2:739-746.
107. Pendino F, Dudognon C, Delhommeau F, Sahraoui T, Flexor M, Bennaceur-Griscelli A et al. Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death. *Oncogene* 2003 22:9142-9150.
108. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001 2:827-837.
109. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001 2:127-137
110. Maida Y, Kyo S, Kanaya T, Wang Z, Yatabe N, Tanaka M, et al. Direct activation of telomerase by EGF through Ets-mediated transactivation of TERT via MAP kinase signaling pathway. *Oncogene* 2002 21, 4071-4079
111. Horikawa I, Barrett JC. Cis-Activation of the human telomerase gene (hTERT) by the hepatitis B virus genome. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001 93:1171-1173.
112. Gozuacik D, Murakami Y, Saigo K, Chami M, Mugnier C, Lagorce D, et al. Identification of human cancer-related genes by naturally occurring Hepatitis B Virus DNA tagging. *Oncogene* 2001 20:6233-6240.

113. Ferber MJ, Montoya DP, Yu C, Aderca I, McGee A, Thorland EC, et al. Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancer. *Oncogene* 2003 22: 3813-3820.
114. Paterlini-Brenchet P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik G, Mugnier C, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* 2003 22: 3911-3916
115. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002 16: 6-21.
116. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002 3:415-428.
117. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000 16: 168-174.
118. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004 4:143-153
119. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000 403: 41-45.
120. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001 293: 1074-1080
121. Roberts CW, Orkin SH. The SWI/ SNF complex-chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer* 2004 4:133-142
122. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004 116: 281-287.
123. Yoder JA, Walsh CP and Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997 13: 335-340.
124. Huck-Hui Ng and Adrian Bird. DNA methylation and chromatin modification. *Current Opinion in Genetics & Development* 1999, 9:158-163.
125. Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 1990 62: 503-514.
126. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003 349: 2042-2054.
127. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004 4: 988-993.
128. Li E, Bestor TH and Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992 69: 915-926.
129. Okano M, Bell DW, Haber DA and Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999 99: 247-257.
130. Robertson AK, Geiman TM, Sankpal UT, Hager GL and Robertson KD. Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA

- methyltransferases DNMT1 and Dnmt3a in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 322(1): 110-118.
131. Santos F. and Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in Mammals. *Reproduction* 2004 127: 643–651.
  132. De Marzo AM, Marchi VL, Yang ES, Veeraswamy R, Lin X and Nelson WG. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 1999 59: 3855–3860.
  133. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: Coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 1999 27: 2291–2298.
  134. Girault I, Tozlu S, Lidereau R and Bieche I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003 9: 4415–4422.
  135. Nagai K, Nakamura A, Makino R and Mitamura K. Expression of DNA (5-cytosin)-methyltransferases (DNMTs) in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 2003 26: 186–191.
  136. Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTaGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 85: 6622–6626.
  137. Kapil BN. Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 2005 23: 3971-3993.
  138. Robertson KD and Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nature Rev.Genet.* 2000 1:11-19.
  139. Shin KH, Kang MK, Dicterow E, Park NH. Hypermethylation of the hTERT promoter inhibits the expression of telomerase activity in normal oral fibroblasts and senescent normal oral keratinocytes. *Br J Cancer* 2003 89: 1473-1478.
  140. Bechter OE, Eisterer W, Dlaska M, Kühr T and Thaler J. CpG island methylation of the hTERT promoter is associated with lower telomerase activity in B-cell lymphocytic leukemia *Experimental Hematology* 2002 30: 26–33.
  141. Guilleret I, Yam P, Grange F, Braunschweig R, Bosman FT, Benhattar J. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int J Cancer* 2000 101: 335-341.
  142. Quante M, Heeg S, Werder A, Goessel G, Fulda C, Doebele M, et al. Differential transcriptional regulation of human telomerase in a cellular model representing important genetic alterations in esophageal squamous carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005 26(11): 1879–1889.
  143. Kumakura S, Tsutsui TW, Yagisawa J, Barrett JC and Tsutsui T. Reversible Conversion of Immortal Human Cells from Telomerase-Positive to Telomerase-Negative Cells. *Cancer Res* 2005 65(7):2778-86.

144. Widschwendter A, Muller M, Fiegl H, Ivarsson L, Wiedemair A, Muller E, et al. DNA Methylation in Serum and Tumors of Cervical Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 2004 10: 565–571.
145. Guilleret I and Benhattar J. Demethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter reduced hTERT expression and telomerase activity and shortened telomeres. *Experimental Cell Research* 2003 289: 326–334.
146. Lopatina LG, Pool JC, Saldanha SN, Hansen NJ, Key JS, Pita LG, et al. Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 306: 650-659.
147. Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beijersbergen RL and Weinberg RA. Methylation of the Human Telomerase Gene CpG Island. *Cancer Res* 2000 60: 537–541.
148. Liu L, Lai S, Andrews LG, Tollefsbol TO. Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease. *Gene* 2004 340: 1-10.
149. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002 55: 244–65.
150. NationalCancerInstitute. (2005) Cervical cancer main page, SEER Cancer Statistics Review, Estimated New Cancer Cases and Deaths for 2005, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2002/results\\_single/sect\\_01\\_table.01.pdf](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/results_single/sect_01_table.01.pdf), <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/cervical/>.
151. Μεσσήνης Ε. Ιωάννης. Επίτομη Μαιευτική και Γυναικολογία. Ενότητα XI. Έκδοση MD communications. Αθήνα 2005.
152. Walboomers JMM, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJF, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology* 1999189(1), 12-19.
153. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen MA, Peto J, et al. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: A Worldwide Perspective *J Natl Cancer Inst* 1995 87:796-802.
154. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2000 132(10):810-9. Review.
155. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004 324:17–27.
156. Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature.* 1982 299:529–534.
157. Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.* 1982 1:231–236.



158. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003 348:518–527.
159. zur Hausen. Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* 1999, 111:581-587.
160. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999, 189:12-19.
161. Goodman A, and Wilbur DC. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 32-2003. A 37-year-old woman with atypical squamous cells on a Papanicolaou smear. *N Engl J Med* 2003 349(16):1555-1564
162. Thierry F, Benotmane MA, Demeret C, Mori M, Teissier S, Desaintes O: A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis. *Cancer Res* 2004 64:895-903.
163. Stubenrauch F, Zoble T, Iftner T. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol* 2001 75:4139-4149.
164. Brown DF, Fan L, Jones J, Bryan J. Colocalization of human papillomavirus type 11 E1 E4 and L1 proteins in human foreskin implants grown in athymic mice. *Virology* 1994, 201:46-54.
165. Crucius K, Auvinen E, Alonso A. Enhancement of EGF and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* 1997, 15:1437-1444.
166. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002, 89:213-228.
167. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. *Molecular biology of the cell*, 2002 4th Ed.
168. Howley PM, Scheffner M, Munger K. Oncoproteins encoded by the cancer-associated papillomavirus target the products of retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes. *Quant Biol* 1991, 56:159-155.
169. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001, 20:7874-7887.
170. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990, 248:76-79.
171. Southern SA, Herrington CS. Disruption of cell cycle control by human papillomavirus with special reference to cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2000, 10:263-274.
172. Schiller JT, Davies P. Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2004 2:343–347.

173. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006 11: 2286–2302.
174. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol.* 2004 92(3):873-80
175. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991, 352:824-827.
176. Jeon S, Lambert PF. Intergration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased instability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 92:1654-8.
177. Park TW, Fujiwara H, Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursor. *Cancer* 1995 76: 1902-13.
178. Zheng ZM, Tao M, Yamanegi K, Bodaghi S, Xiao W. Splicing of a Cap-proximal Human Papillomavirus 16 E6E7 Intron Promotes E7 Expression, but can be Restrained by Distance of the Intron from its RNA 5' Cap. *JMolBiol.* 2004 337:1091–1108
179. Ordonez RM, Espinosa AM, Sanchez-Gonzalez DJ, Armendariz-Borunda J, Berumen J. Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *JGenVirol.* 2004 85:1433–1444.
180. Deng W, Jin G, Lin BY, Van Tine BA, Broker TR, Chow LT. mRNA splicing regulates human papillomavirus type 11 E1 protein production and DNA replication. *JVirol.* 2003 77:10213–10226
181. Hubert WG, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 replication modes during the early phases of the viral life cycle depend on transcriptional and posttranscriptional regulation of E1 and E2 expression. *JVirol.* 2002 76:2263–2273
182. Narimatsu R, Patterson BK. High-throughput cervical cancer screening using intracellular human papillomavirus E6 and E7 mRNA quantification by flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 2005 123(5):716-23.
183. Ambretti S, Mirasoli M, Venturoli S, Zerbini M, Baraldini M, Musiani M, et al. High-throughput polymerase chain reaction chemiluminescent enzyme enzyme immunoassay for typing and quantifying human papillomavirus DNAs *Analytical Biochemistry* 2004 332:349–357.
184. Howard M, Sellors JW, Lytwyn A, Roth P, Mahony JB. Combining Human papillomavirus testing or cervicography with cytology to detect cervical neoplasia. *Arch Pathol Lab Med,* 2004, 128, 1257-1262

185. Wisman GB, Knol JA, Helder NM, Krans M, de Vries EG, Hollema H, et al. Telomerase in relation to clinicopathologic prognostic factors and survival in cervical cancer. *Int J Cancer* 2001 91: 658-664.
186. Snijders PJF, Van Duin M, Walboomers MMJ, Steenbergen RD, Risse EK, Helmerhorst TJ, et al: Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. *Cancer Res* 1998 58: 3812-8.
187. Takamura M, Kyo S, Kanaya T, Tanaka M, Inoue M. et al. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res* 1998 58: 1558-1561.
188. Kanaya T, Kyo S, Takakura M, Ito H, Namiki M, Inoue M. hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma
189. Frost M, Bobak JB, Gianani R, Kim N, Weinrich S, Spalding DC, et al. Localization of telomerase hTERT protein and hTR in benign mucosa, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the cervix. *Am J Clin Pathol* 2000 114: 726-734.
190. Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, et al. Upregulation of telomerase (hTERT) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus, virus persistence, or disease outcome in cervical cancer. *Diagn Cytopathol.* 2006 34(11):739-48.
191. Reesink-Peters N, Helder MN, Wisman GB, Knol AJ, Koopmans S, Boezen HM, et al. Detection of telomerase, its components, and human papillomavirus in cervical scrapings as a tool for triage in women with cervical dysplasia. *J Clin Pathol* 2003 56: 31-35.
192. Jarboe EA, Liaw KL, Thompson LC, Heinz DE, Baker PL, McGregor JA, et al: Analysis of telomerase as a diagnostic biomarker of cervical dysplasia and carcinoma. *Oncogene* 2002 21: 664-673.
193. Galloway DA, Gewin LC, Myers H, Luo W, Grandori C, Katzenellenbogen RA, et al. Regulation of telomerase by human papillomaviruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005 70:209-15.
194. Ting Y, Manos MM: Detection and typing of genital human papillomaviruses, in Innis MA (cd): PCR protocols: A guide to Methods and Applications. Orlando FL. Academic Press 1990 356-367.
195. Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem.* 2002 48:1178-1185.
196. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002 30:503-512.
197. Cross, N. Quantitative PCR techniques and applications. *British Journal of Haematology,* 1995 89 693-697.

198. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 2002 8:257-260.
199. Lossos IS et al. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia* 2003 17:789-795.
200. Van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski t, Gabert J, van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003 17:1013-1034.
201. Finke J, Fritzen R, Ternes P, Lange W, Dolken G. An improved strategy and a useful housekeeping gene for RNA analysis from formalin-fixed, parafin- embedded tissues by PCR. *Biotechniques* 1993 14: 448- 453.
202. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, Real time quantitative PCR. *Genome Research* 1996 6: 986–994.
203. Trinh BN, Long TI, and Laird PW. DNA Methylation Analysis by MethyLight Technology. *Methods* 2001 25: 456–462.
204. Ong YL, Irvine A. Quantitative real-time PCR: a critique of method and practical considerations. *Hematology* 2002 7:59-67.
205. Gabert J, Beillard E, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G. et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukaemia - A Europe against cancer program. *Leukemia* 2003 17:2318-2357.
206. Rao G. Remembering the meanings of sensitivity, specificity, and predictive values. - Language of evidence: defining the terms of evidence-based medicine - Predictive value of tests *Medical. Journal of Family Practice.* 2004
207. Duenas-Gonzalez A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives *Molecular Cancer* 2005, 4:38
208. DiMaio D, Liao BJ. Human Papillomaviruses and cervical cancer. *Advances in virus research* 2006 66:125-159.
209. Graaf van der Y, Molijn A, Doornierwaard H, Quint W, Doorn van der L, Tweel van der J. Human Papillomavirus and the Long-term Risk of Cervical Neoplasia. *American Journal of Epidemiology* 2002 156 2: 158-164.
210. Shay JW, Zou Y, Hiyama E and Wright WE. Telomerase and cancer. *Human Molecular Genetics* 2001 10: 677-685.
211. Anderson S, Shera K, Ihle J, Billman L, Golf B, Greer B, et al. Telomerase activation in cervical cancer. *American Journal of Pathology* 1997 151: 25-31.
212. Yashima K, Ashfaq R, Nowak J, Gruenigen V, Milchgrub S, Rathi A, et al. Telomerase Activity and Expression of Its RNA Component in Cervical Lesions. *Cancer* 1998 82:1319-1327.

213. Reddy VG, Khann N, Jain SK. Telomerase: a molecular marker for cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2001 11:100-106.
214. Nakano K, Watney E, MDougall JK. Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer. *Am J Pathol* 1998 153: 857-864.
215. Shroyer KR, Thompson C, Enomoto T. Telomerase expression in normal epithelium, dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Am J Clin Pathol* 1998 109:153-162.
216. Kawai K, Yaginuma Y, Tsuruoka H, Griffin M, Hayashi H, Ishikawa M. Telomerase activity and human papillomavirus (HPV) infection in human uterine cervical cancers and cervical smears. *European Journal of Cancer* 1998 34: 2082-2086.
217. Mutirangura A, Sriuranpong V, Termrungranglert W, Tresukosol D, Lertsaguansinchai, Voravud N, et al. Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, premalignant and benign cervical lesions. *British Journal of Cancer* 1998 78: 933-939.
218. Wisman GBA, Hollema H, Jong de S, Schegget ter S, Tjong-A-Hung SP, Ruiters MHJ, et al. Telomerase activity as a biomarker for (pre)neoplastic cervical disease in scrapings and frozen sections from patients with abnormal cervical smear. *Journal of Clinical Oncology* 1998 16: 2238-2245.
219. Gorham H, Yoshida K, Sugino T, Marsch G, Manek S, Charnock M, et al. Telomerase activity in human gynecological malignancies. *J Clin Pathol* 1997 50: 501-504.
220. Zheng PS, Iwasaka T, Yokohama M, Nakao Y, Pater A, Sugimori H. Telomerase activation in in vitro and in vivo cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 1997 66: 222-226.
221. Zhang DK, Ngan HYS, Cheng RYS, Cheung ANY, Liu SS, Tsao SW. Clinical Significance of Telomerase Activation and Telomere Restriction Fragment (TRF) in Cervical Cancer. *European Journal of Cancer* 1999 35: 154-160.
222. Riethdorf S, Riethdorf L, Shulz G., Ikenderg H, Jänicke F, Löning T, et al. Relationship between telomerase activation and HPV16/18 oncogene expression in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *International Journal of Gynecological Pathology* 2001 20: 177-185.
223. Cheah PL, Looi LM, Ng M H, Sivanesaratnam V. Telomerase activation and human papillomavirus infection in invasive uterine cervical carcinoma in a set of Malaysian patients. *J Clin Pathol* 2002 55: 22-26.
224. Pao CC, Tseng CJ, Lin CY, Yang FP, Hor JJ, Yao DS, et al. Differential expression of telomerase activity in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions. *Hsueh S. Journal Of Clinical Oncology* 1997 15:1932-1937.
225. Frost M, Bobak JB, Gianani R, Nam K, Scott W, Spalding CD, et al. Localization of telomerase hTERT protein and hTR in benign mucosa, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the cervix. *Am J Clin Pathol* 2000 114: 726-734.

226. Wolf KJ, Franco LE, Arbeit MJ, Shroyer RK, Wu TC, Runowicz DC, et al. Innovations in understanding the biology of Cervical Cancer. *Cancer Supplement* 2003 98: 2064-2069.
227. Jarboe EA, Thompson CL, Heinz D, McGregor JA, Shroyer KR. Telomerase and Human Papillomavirus as diagnostic adjuncts for cervical dysplasia and carcinoma. *Human Pathology* 2004 35:396-402.
228. Saretzki G, Fischer H, Kaufmann IG, Schewe C, Nadjari B, Blohmer J, et al. Telomerase activity in cervical smears. *Analytical Cellular Pathology* 2001 23: 39-43.
229. Kazuo Y, Ashfaq R, Jan N, Von Vivian G, Milchgrub S, Asha R, et al. Telomerase activity and expression of its RNA component in cervical lesions. *Cancer* 1998 82: 1319-1327.
230. Kyo S, Kanaya T, Ishikawa H, Ueno H and Inoue M. Telomerase activity in gynecological tumors. *Clinical Cancer Res* 1996 2:2023-2028.
231. Nagai N, Oshita T, Murakami J and Ohama K. Semiquantitative analysis of telomerase activity in cervical cancer and precancerous lesions. *Oncology Rep* 1999 6:325-328.
232. Lim SH, Kim JH, Londoño-Vallejo A, Bui H, Tubacher E, Solomon G, et al. The human telomerase gene: complete genomic sequence and analysis of tandem repeat polymorphisms in intronic regions. *Oncogene* 2002 21: 769-777.
233. Wick M, Zubov D and Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 1999 232:97-106.
234. Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, et al. Upregulation of telomerase (hTERT) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus, virus persistence, or disease outcome in cervical cancer. *Diagn Cytopathol.* 2006 Nov;34(11):739-48.
235. Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, Tahara H, Ohji H, Yasumoto H, et al. Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 1996 13:433-439.
236. Zhang A, Maner S, Betz R, Angstrom T, Stendahl U, Bergman F, et al: Genetic alterations in cervical carcinomas: Frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 2002 101: 427-433.
237. Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Human Molecular Genetics* 1999 8: 137-142.
238. Mullokandov MR, Kholodilov NG, Atkin NB, Burk RD, Johnson Ab and Klinger HP. Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosome heterozygosity and human papilloma virus tumor status. *Cancer Res* 1996 56:197-205.
239. Rader JS, Kamarasova T, Huettner PC, Li L, Li Y and Gerhard DS. Allelotyping of all chromosomal arms in invasive cervical cancer. *Oncogene* 1996 13: 2737-2741.
240. Matthews CP, Shera KA and McDougall JK. Genomic Changes and HPV type in Cervical carcinoma. *Experimental Biology and Medicine* 2000 223 (3):316-325.

241. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2002 2: 342-350.
242. Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA Copy dependent on grade of cervical disease and HPV type. *Journal of Clinical Microbiology* 1999 37 (4): 1030-1034.
243. Hernández- Hernández MD, Ornelas-Bernal L, Guido-Jiménez M, Apresa-Garcia T, Alvarado-Cabrero I, Salcedo-Vargas M, et al. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecologic Oncology* 2003 90: 310-317.
244. Hart KW, Williams OM, Thelwell N, Fiander AN, Brown T, Borysiewicz LK, Gelder CM, et al. Novel method for detection, typing and quantification of human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Pathol* 2001 39 (9): 3204-3212.
245. Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson MA, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000 355: 2194-2198.
246. Abba MC, Mouron SA, Gomez MA, Dulout FN, Golijow CD. Association of human papillomavirus load with HPV-16 and high grade intraepithelial lesions. *Int J Gynecological cancer* 2003 13:154-158.
247. Castle PE, Wacholder S, Sheman ME, Lorinez AT, Glass AG, Scott DR, et al. Absolute risk of a subsequent abnormal pap among ontogeny human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. *Cancer* 2002 95:2145-51.
248. Joseffson AM, Magnusson PKE, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubbin P, Per Krag A, et al. Viral load of human papillomavirus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000 355:2189-93.
249. Thornald EC, Myers SL, Gostout BS and Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* 2003 22:1225-1237.
250. Thornald EC, Myers SL, Persing DH, Sarkar G, McGovern RM, Gostout BS, et al. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites *Cancer Res* 2003 60:5916-5921.
251. Shera KA, Shera CA and McDougall JK. Small tumor virus genomes are integrated near nuclear matrix attachment regions in transformed cells. *J Virol* 2001 75:12339-12346.
252. Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B and Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol* 1998 17:146-153.
253. Veldman T, Liu X, Yuan H and Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *PNAs* 2003 14:8211-8216.

254. Seo EJ, Kim HJ, Lee CJ, Kang HT and Hwang ES. The role of HPV oncoproteinw nad cellular factors in maintenance of hTERT expression in cervical carcinoma cells. *Gynecologic Oncology* 2004 94:40-47.
255. Baeye AC, Berger A, Schlegel R, Veldman T and Schlegel R. Cervical epithelial cells transduced with the papillomavirus E6/E7 oncogenes maintain stable levels of oncoprotein expression but exhibit progressive, major increases in hTERT gene expression and telomerase activity. *American J Pathology* 2002 160:1251-1257.
256. Klingelhutz AJ, Foster AJ, McDougall LK. Telomerase activation by E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*1996 380:79-82.
257. Lee D, Kim H, Jeong KW, Shim YS, Horikawa I, Barrett JC, et al. Human Papillomavirus E2 Down-regulates the human telomerase reverse transcriptase promoter. *J Biological Research* 2002 227:27748-27756.
258. Park TW, Riethdorf S, Schulz G, Riethdorf L, Wright T, Lönig T. Clonal expansion and HPV-induced immortalization are early molecular alterations in cervical carcinogenesis. *Anticancer Research* 2003 23: 155-160.
259. Lie AK, Risberg B, Borge B, Sandstad B, Delabie J, Rimala R, et al. DNA-versus RNA methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecological Oncology* 2005 97:908-915.
260. Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K, et al. Detection of high risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Vir* 2004 74:107-116.
261. Molden T, Nygard JF, Kraus I, Karlsen F, Nygard M, Skare GB, et al. Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-Proofer and consensus PCR: a 2-year follow up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *Int J Cancer* 2005 114: 973-976.
262. Cuschieri KS, Beattie G, Hassan S, Robetson K, Cubie H. Assessment of human papillomavirus mRNA detection over time in cervical specimens collected in liquid based cytology medium. *J Vir Methods* 2005 124:211-215.
263. Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, et al. The human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 97:10002-7.
264. Duensing S, Duensing A, Flores ES, Do A, Lambert FP, Munger K. Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes. *J Virol* 2001 75:7712-6.
265. Sastre-Garau X, Michel F, Coutourier J, Orth G. Disintct patterns of alteration of myc genes associated with intergration of human papillomavirus type 16 or type 45 DNA in two genital tumors. *J Gen Virol* 2000 81:1983-93.



266. Horikawa I, Cable PL, Afshari C, Barrett JC. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res* 1999 59: 826–830.
267. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002 21: 5427– 5440.
268. Devereux TR, Horikawa I, Anna CH, Anna LA, Afshari CA, Barrett JC. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res* 1999 59: 6087– 6090.
269. Nomoto K, Maekawa M, Sugano K, Ushiyama M, Fukayama N, Fujita S, et al. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase mRNA in relation to hypermethylation of the p16 gene in colorectal cancers as analyzed by bisulfite PCR-SSCP. *Jpn. J Clin Oncol* 2002 32: 3–8.
270. Casillas MA, Brotherton SL, Andrews LG, Ruppert JM, Tollefsbol TO. Induction of endogenous telomerase (hTERT) by c-Myc in WI-38 fibroblasts transformed with specific genetic elements. *Gene* 2003 316: 57– 65.
271. Widschwendter A, Muller HM, Hubalek MM, Wiedemair A, Fiegl H, Goebel G, et al. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase in ovarian and cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2004 93: 407–416.
272. Wright JTC, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical cancer screening. *N Engl J Med* 2003 348:489-490.



# The Role of Human Telomerase Catalytic Subunit mRNA Expression in Cervical Dysplasias

A. TSEZOU,\*<sup>1</sup> P. OIKONOMOU,\* P. KOLLIA,\* I. MADEMTZIS,† E. KOSTOPOULOU,‡ I. MESSINIS,† AND N. VAMVAKOPOULOS\*

\*Departments of Biology, †Obstetrics and Gynecology, and ‡Pathology, University of Thessalia, 22 Papakyriazi str, 41222 Larissa, Greece

Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA expression were investigated in cervical specimens and were correlated with cytologic findings and the presence of human papilloma virus (HPV) infection. Telomerase activity was evaluated by the telomeric repeat protocol assay and hTERT mRNA expression was evaluated by reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR). HPV DNA was detected by PCR, as well as restriction endonuclease digestion. HPV DNA was detected in all 82 specimens with abnormal cytologic findings and in 4 of 34 normal samples. Low-grade squamous intraepithelial lesions (LGSILs) were present in 74 of 82 specimens (90.2%) and high-grade squamous intraepithelial lesions (HGSILs) were present in 8 of 82 (9.75%) specimens. Seven of the eight HGSIL (87.5%) and 26 of 74 LGSIL (35.1%) specimens were hTERT positive, whereas all normal specimens were hTERT mRNA negative. Telomerase activity was detected in 21 of 74 (28.4%) LGSIL/atypical squamous epithelial cells of undetermined significance (ASCUS) and in five of eight (62.5%) HGSIL samples. A correlation was observed among telomerase activity, hTERT mRNA expression, and high-risk HPV infection in HGSIL samples ( $P < 0.001$ ). High-risk HPV infection assessment showed 75% sensitivity and 72.2% specificity for HGSILs. Telomerase activity assessment in cervical smears showed sensitivity and negative predictive value (NPV) for HGSILs 62.5% and 96.7%, whereas specificity and positive predictive value (PPV) were 80.5% and 19.2%, respectively. hTERT mRNA expression assessment showed 87.5% sensitivity and 98.7% NPV for HGSILs, whereas specificity and PPV were 76% and 21.2%, respectively. Based on the above-described telomerase assessment values, it is suggested that the telomerase system might not be an appropriate diagnostic marker for cytology, given that the final evaluation must rely on a combination of all available test assessment data, clinical diagnosis, as well as the

follow-up of all LGSIL samples that were positive for telomerase activation. *Exp Biol Med* 230:263–270, 2005

**Key words:** telomerase activity; hTERT; HPV; cervical cytology; cervical samples; cervical dysplasia

## Introduction

Cervical cancer is a major cause of death and the second most common cancer in women worldwide. Epidemiologic and molecular studies performed in women from various races and ethnic minority groups have demonstrated convincingly that certain types of human papillomavirus (HPV) are etiologically related to the development of most cases of cervical cancer (1, 2). More than 100 different HPV types have been characterized by nucleotide sequence analysis and more than 40 types have been found to infect the anogenital region. HPV types have been divided into low and high risk according to their oncogenic potential. Women infected with high-risk HPV types such as HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 61, 66, and 68 are considered to be at a higher risk for the development of cervical cancer than those who are not infected with HPV or are infected with low-risk HPV types such as HPV 6, 11, 42, 43, and 44 (3, 4). The majority of cervical cancers are squamous cell carcinomas, which are preceded by intraepithelial precursor lesions composed of atypical or dysplastic cells (5). Cervical cytologic abnormalities are categorized in atypical squamous epithelial cells of undetermined significance (ASCUS), low-grade squamous intraepithelial lesions (LGSILs) including condylo-mata acuminata and mild dysplasia, and high-grade squamous intraepithelial lesions (HGSILs) including moderate to severe dysplasia and carcinoma *in situ* (6). Although high-risk HPV strains have been detected in cervical smears with HGSILs, a small proportion of women with cytologic abnormalities or who are infected with high-risk HPV strains will eventually progress to invasive carcinoma. Therefore, additional criteria are needed to predict more

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed at Department of Biology, Medical School, University of Thessalia, 22 Papakyriazi str, 41222 Larissa, Greece. E-mail: atsezou@med.uth.gr

Received July 28, 2004.  
Accepted January 20, 2005.

1535-3702/05/2304-0263\$15.00  
Copyright © 2005 by the Society for Experimental Biology and Medicine

accurately the clinical outcome of cervical lesions in individual women (6).

Recent observations support the concept that a change of the enzyme telomerase may be a critical, if not obligate step in the development of cancer (7). Telomerase is a ribonucleoprotein DNA polymerase consisting of an RNA component, designated hTR, and a catalytic protein subunit, human telomerase reverse transcriptase (hTERT), involved in the synthesis of telomeric DNA repeats (8). Telomerase activity has been detected in high-grade cervical dysplasias as well as cervical carcinomas, whereas some investigators report telomerase activity in premalignant cervical lesions as well as normal cervical epithelial tissue (9–12). Given that HPV infection has been associated with the majority of cases of invasive cervical carcinoma, telomerase activation may be a central mechanism by which HPV infection results in malignant transformation of the cervical mucosa (11, 13). In recent reports telomerase activation has been detected in cervical biopsies infected with HPV types 16 and 18 (6, 11).

In the present study, we investigated telomerase activity and hTERT mRNA expression in cervical samples of different cytology. For the first time to our knowledge, hTERT mRNA expression was observed in cervical samples with low- and high-grade dysplasias infected with HPV types 45, 58, and 61 in addition to types 16 and 18, which have been reported previously. Furthermore, both telomerase activity and hTERT mRNA expression were observed in LGSILs and HGSILs and were absent in normal epithelial tissue. In the present study, we tested the specificity and sensitivity of telomerase activation and hTERT mRNA expression and correlated their detection with the presence of HPV infection in cervical samples with HGSILs and LGSILs.

## Materials and Methods

**Patients.** A total of 116 cases were studied, including 82 cases with abnormal cytologic findings and 34 normal cases. The mean age of women with abnormal findings was 35 years (range, 19–54 years; SD, 8.35 years) and of control group was 38 years (range, 25–50 years; SD, 8.24 years). Cervical cytology samples were obtained at the colposcopy unit of University Hospital of Larissa (Larissa, Greece). All samples were collected at the time of colposcopic evaluation for management of previous abnormal cytology test result.

Two separate cervical specimens were obtained from each woman in appropriate collection vials using an endocervical cytobrush before the performance of colposcopic examination and cervical biopsy, and immediately after collection of the routine cervical sample. The study was double blind. The samples were kept on ice and were immediately processed in the laboratory (14). The first specimen was divided into equal parts: one for DNA extraction and subsequent genotyping of HPV-positive specimens, and another for telomeric repeat protocol assay (TRAP) analysis, which was placed in phosphate-buffered saline and was centrifuged at 3000 g for 5 min. Cells were

counted using a hemacytometer (Neubauer chamber) and  $2 \times 10^5$  cells were immediately stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The second cervical specimen was used for RNA extraction and hTERT mRNA expression. Cervical biopsies for histologic examinations were performed at the end of the colposcopy and were evaluated at the Pathology Laboratory of University Hospital of Larissa. The ethics committee of the University Hospital of Larissa approved the protocol.

**HPV Analysis.** Human genomic DNA was extracted from the scraped cervical cells using a proteinase K/phenol-chloroform protocol. HPV detection was performed by polymerase chain reaction (PCR) using the consensus primers MY09 and MY11 for the amplification of the L1 region of the HPV genome, with an expected product size of about 450 base pairs (bp). A total of 40 cycles were performed with a thermal profile 1 min at  $94^\circ\text{C}$ , 1 min annealing at  $55^\circ\text{C}$ , and 1 min at  $72^\circ\text{C}$ . A second round of amplification with general primers GP5 and GP6 positioned inside the MY09 and MY11 primers was performed and amplified a 150-bp fragment (35 cycles: 50 secs at  $94^\circ\text{C}$ , 50 secs annealing at  $42^\circ\text{C}$ , 50 secs at  $72^\circ\text{C}$ ). Amplified MY09/11 PCR products were typed by restriction endonuclease digestion, using *Bam*HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hinf*I, *Pst*I, *Rsa*I, and *Sau*3aI enzymes for HPV types 6, 11, 13, 16, 18, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, MM4(W13B), MM7(PAP291), MM8(PAP155), MM9(PAP238A), LVX100, IS39, CP141, CP6108, CP8304, CP4173, and CP8061. Digestion products were electrophoretically separated on 3% agarose gels and visualized under UV light (15). Samples negative for MY09/11 that were positive with the GP5/6 PCR reaction were further processed with specific primers for HPV types 16, 18, 6/11, 31, and 33. Cloned plasmids with full HPV genomes (HPV types 6, 11, 16, 18, 31, and 33) served as positive PCR controls. Negative PCR controls were included in each experiment. PCR amplification of human  $\beta$ -globin gene fragment was used to determine the integrity of the specimens. Finally, samples that could not be typed with any of the above methods were processed with an HPV kit (Keymed S.r.l., Formello, Italy), which designates high- (16, 18, 31, 33, 35, 45, 42, and 58) and low-risk (6, 11, and 52) HPV types. Randomly selected PCR products, including the hTERT-positive sample infected with a low-risk HPV type (HPV-6), were sequenced to ensure the accuracy of the genotyping method being used.

**TRAP Assay.** TRAP assay is considered a sensitive and specific PCR-based functional enzyme assay. It was performed using TeloTAGGG telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup> kit (Roche, Indianapolis, IN) in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, each frozen pellet was homogenized in 200  $\mu\text{l}$  lysis reagent. After 30 mins incubation on ice, the lysate was centrifuged at 16,000 g for 30 mins at  $4^\circ\text{C}$  and the supernatant was aliquoted. Control templates were included in the kit, which contain positive-telomerase template DNA with the same sequence as a telomerase product with eight telomeric repeats. Lysates from HeLa cells were used as positive controls. The PCR-

**Table 1.** Correlation of Cytology with HPV Infection<sup>a</sup>

Cytology findings	HPV infection			Biopsy findings			
	HPV negative	HPV positive (low risk <sup>b</sup> and unclassified HPV types)	High risk <sup>c</sup> HPV positive	Negative for dysplasia	CIN1	CIN2	CIN3
Normal	30/34 (88.2%)	3/34 (8.9%)	1/34 (2.9%)	34/34 (100%)	—	—	—
ASCUS	—	3/5 (60%)	2/5 (40%)	4/5 (80%)	1/5 (20%)	—	—
LGSIL	—	41/69 (55.4%)	33/69 (44.6%)	—	69/69 (100%)	—	—
HGSIL	—	2/8 (25%)	6/8 (75%)	—	—	5/8 (62.5%)	3/8 (37.5%)
Total	30/116 (25.9%)	46/116 (39.6%)	40/116 (34.5%)	38/116 (32.7%)	70/116 (60.3%)	5/116 (4.3%)	3/116 (2.6%)

<sup>a</sup> HPV, human papilloma virus; CIN, cervical intraepithelial neoplasia; ASCUS, atypical squamous epithelial cells of undetermined significance; LGSIL, low-grade squamous intraepithelial lesions; HGSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion.

<sup>b</sup> 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 69.

<sup>c</sup> 6, 11, 42, 43, 44, 53, 83.

based analysis was carried out in a 30- $\mu$ l reaction mixture containing 2  $\mu$ l of cell extract. An internal standard was amplified by telomeric substrate primers, to avoid false-negative results. Telomerase-positive results were confirmed by repeat TRAP assay, with heat pretreatment (85°C for 15 mins) of cellular lysates to monitor for false-positive results. Lysis buffer reagent controls were included in each reaction to monitor for the possibility of reagent contamination. Positivity was detected when the substrate turned blue and then yellow on addition of the stop reagent; the color conversion maximized the sensitivity of the readings. Sample absorbance was measured within 30 mins using a spectrophotometer at 450 nm against a blank (reference wave length at 650 nm). Samples were also electrophoretically separated on a 12% polyacrylamide gel and samples were considered as positive when the difference between the absorbance of the sample and the absorbance of the negative control was higher than the 2-fold background activity and when they produced the characteristic 6-bp telomerase ladder. The sensitivity of the TRAP assay is extended to 10 Hela cell equivalents.

**hTERT mRNA Expression.** Total cellular RNA was isolated by the guanidinium isothiocyanate method and transcribed to cDNA using the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (RT) and random hexamers as primers. Retinoic acid receptor alpha cDNA sequences (RAR $\alpha$ ) were amplified in separate reactions as positive cDNA controls. Both in the RT reaction and in the ensuing amplification reactions, recommended measures to prevent cross-contamination of samples were followed. In addition, for each experiment, a control with no template was used to check for the presence of contaminants. hTERT cDNA sequences were amplified by PCR with the intron flanking primer pair A/B (A: 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3' and B: 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3') spanning between exons 3 and 4 of the corresponding gene to exclude cross-reactivity with genomic DNA. In contrast to other segments of this gene, no splice variants of hTERT mRNA have been detected in the genomic region selected for hTERT cDNA amplification (16, 17). K562 erythroleukemic

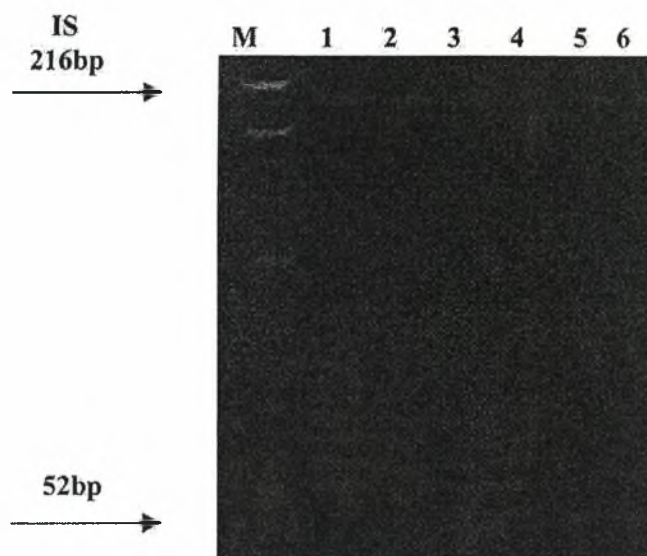
cells, which express hTERT mRNA, served as positive PCR control. Direct DNA sequencing was used to identify specific PCR products.

**Statistical Analysis.** Diagnostic test characteristics (sensitivity, specificity, positive predictive value [PPV], negative predictive value [NPV]) were calculated by using the proportion of women with normal cytology, LGSIL, and HGSIL. All statistical analyses were performed by Fischer's exact test to evaluate the significance of the differences using the statistical analysis program SPSS version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL). Only *P* values <0.05 were considered significant.

## Results

HPV DNA was detected in all 82 specimens with abnormal cytologic findings (100%) and in 4 of 34 normal specimens (11.7%). A single genotype was detected in most HPV-positive specimens 77 of 82 (93.9%), whereas 5 of 82 positive specimens (6%) had multiple HPV infections. High-risk HPV types 16, 18, 31, 33, 45, 61, or 58 were present in 39 of 82 specimens with abnormal cytologic findings (47.5%), and in 1 of 34 normal specimens (2.9%). Low-risk HPV types 6, 11, 53, 54, CP141, or CP8304 were detected in 24 of 82 cases with abnormal cytologic findings (29.3%) and in 3 of 34 normal samples (8.8%). Nineteen of the 82 cytologically abnormal specimens (23.2%) were HPV positive (nested PCR) with unclassified HPV types. ASCUS and LGSILs were present in 74 of 82 (90.2%) and HGSILs were present in 8 of 82 (9.75%) of the cytologically abnormal samples. When ASCUS samples were grouped together with LGSILs, there were no discrepancies between cytologic findings and histologic outcome. When ASCUS samples (*n* = 5) were evaluated separately, one of five samples (20%) was classified as CIN1. All remaining 69 LGSIL samples were classified as CIN1, five of eight HGSILs (62.5%) were classified as CIN2, and three of eight HGSILs (37.5%) were classified as CIN3 (Table 1).

Telomerase activity was observed in 26 of 82 (31.7%) specimens analyzed, which were infected with HPV types 16, 18, 61, and 31. hTERT mRNA expression was observed



**Figure 1.** Telomeric repeat protocol assay of representative human papilloma virus (HPV)-infected and normal samples. M, marker. Lane 1, positive control high (provided by the kit); lane 2, positive control low (provided by the kit); lane 3, positive HPV-16 sample; lane 4, positive HPV-18 sample; lane 5, negative HPV-54 sample; lane 6, negative normal sample.

in 33 of 82 (40.2%) specimens analyzed, which were infected with HPV types 16, 18, 61, and 58, and in one case with HPV type 6, which was also positive for telomerase activity. All normal samples were negative for both telomerase activity and hTERT mRNA expression. Among the 33 samples positive for hTERT mRNA expression, 24 were also positive for telomerase activity (72.7% concordance). Two samples positive for telomerase activity were found to be hTERT negative. Figure 1 shows telomerase activity in cervical samples revealing the progressive 6-bp ladder. Figure 2 shows hTERT mRNA expression relative to RAR $\alpha$  mRNA control in a representative number of HPV-infected and normal samples.

**Correlation Between HPV Infection Status and Cytology.** HPV test results were compared with the cytology of the samples. Four of the 34 normal specimens (11.7%) and all of 82 LGSIL and ASCUS and HGSIL specimens (100%) were HPV positive. The proportion of HPV-infected specimens differed significantly between normal samples and samples with either LGSIL and ASCUS or HGSIL ( $P < 0.001$ ; Table 1).

High-risk HPV types 16, 18, 31, 33, 45, 61, or 58 were

identified in one of 34 (2.9%) normal samples, in 33 of 74 (44.6%) LGSIL and ASCUS, and in six of eight (75%) HGSIL samples. Low-risk HPV types 6, 11, 53, 54, CP141, or CP8304 were identified in 3 of 34 (8.9%) normal samples, 41 of 74 (55.4%) LGSIL and ASCUS, and two of eight (25%) HGSIL samples. The most common HPV types detected were types 16 and 18, which were detected in 15 of 86 (18.6%) of positive cases. Among HPV-infected specimens, a significant difference was observed between viral risk type and cytologic findings. More specifically, a significant difference was observed between high-risk HPV types and HGSIL and low-risk HPV types and LGSIL ( $P < 0.05$ ; Table 1).

**Correlation Between Telomerase Activity, hTERT mRNA Expression, and Cytology.** Telomerase activity was detected in five of eight HGSIL (62.5%) and 21 of 74 LGSIL and ASCUS (28.4%) samples and was not detected in samples with normal cytology. Seven of eight HGSIL (87.5%) and 26 of 74 LGSIL and ASCUS (35.1%) specimens were positive for hTERT mRNA expression. Telomerase activity and hTERT mRNA expression differed

**Table 2.** Correlation of Telomerase Activity and hTERT mRNA Expression with Cytology<sup>a</sup>

Cytology	Telomerase positive	Telomerase negative	hTERT positive	hTERT negative
Normal	0/34 (0%)	34/34 (100%)	0/34 (0%)	34/34 (100%)
LGSIL	21/74 (28.4%)	53/74 (71.6%)	26/74 (35.1%)	48/74 (64.9%)
HGSIL	5/8 (62.5%)	3/8 (37.5%)	7/8 (87.5%)	1/8 (12.5%)
Total	26/116 (22.4%)	90/116 (77.6%)	33/116 (28.4%)	83/116 (71.6%)

<sup>a</sup>hTERT, human telomerase reverse transcriptase; LGSIL, low-grade squamous intraepithelial lesions; HGSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion.

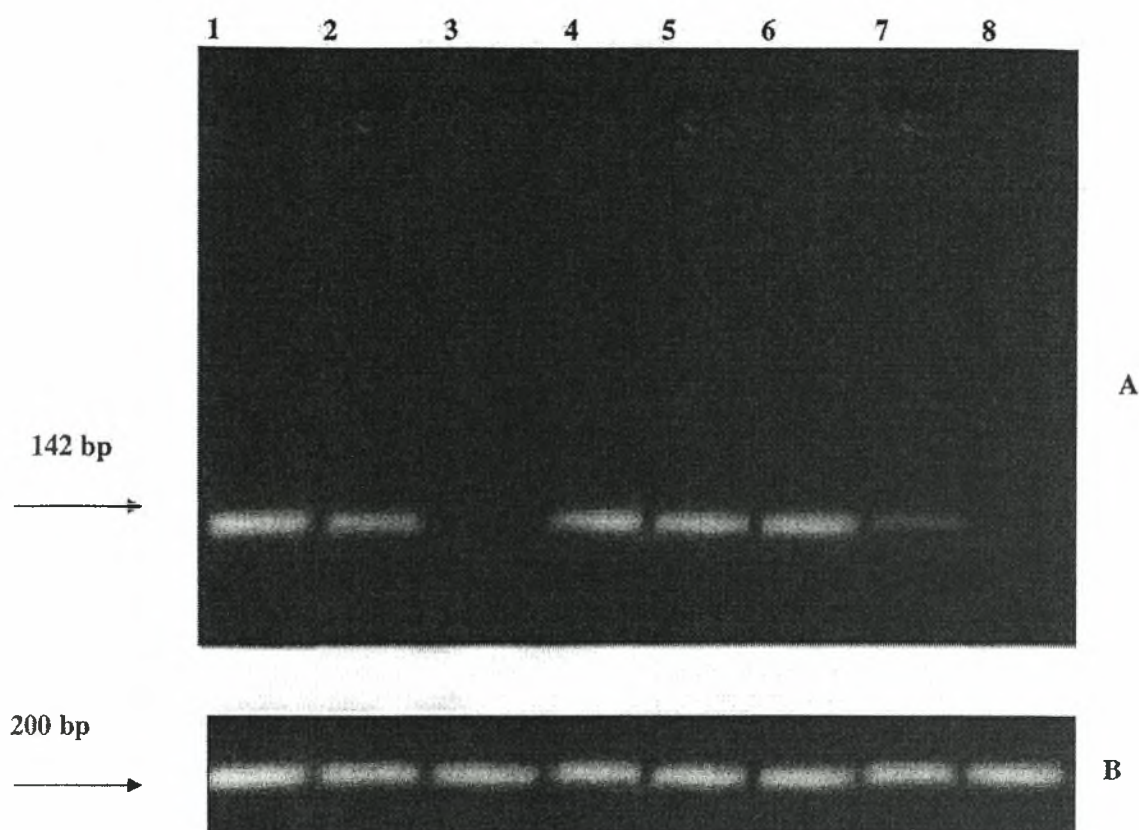


Figure 2. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) analysis of representative human papilloma virus (HPV)-infected and normal cervical specimens for the presence of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA (panel A) relative to retinoic acid receptor alpha (RAR $\alpha$ ) mRNA control (panel B). Lanes 1 and 2, HPV-16 sample; lane 3, normal sample; lane 4, HPV-45; lane 5, HPV-58; lane 6, HPV-61; lane 7, HPV-6b; lane 8, HPV-6. The PCR products of K562 positive control are shown below.

significantly between LGSIL and ASCUS and HGSIL ( $P = 0.004$  and  $P < 0.05$ , respectively; Table 2).

**Correlation Between Telomerase Activity, hTERT mRNA Expression, and HPV Infection.** The results of telomerase detection and hTERT mRNA expression were compared with the detection of HPV (Table 3). Telomerase activity was detected in 20 of 39 (51.3%) cases infected with high-risk HPV types and in 6 of 43 (14%) cases infected with low-risk types or with unclassified HPV types. hTERT mRNA expression was

observed in 25 of 39 (64.1%) cases positive for high-risk HPV type and in 8 of 43 cases (18.6%) positive for low-risk HPV types. A significant difference was observed between telomerase activity, hTERT mRNA expression, and HPV infection status ( $P < 0.001$ ).

**Assessment of Telomerase Activity, hTERT mRNA Expression, and HPV Infection Status for the Detection of HGSIL.** Sensitivity and NPV for telomerase activity assessment for HGSILs were 62.5% and 96.7%, respectively, whereas specificity and PPV were

Table 3. Correlation of Telomerase Activity and hTERT mRNA Expression with HPV Infection<sup>a</sup>

Infection type		Telomerase positive	Telomerase negative	hTERT positive	hTERT negative	Total
Normal	High-risk HPV	—	1/1 (100%)	—	1/1 (100%)	1
	Other types <sup>b</sup>	—	3/3 (100%)	—	3/3 (100%)	3
	Negative	—	30/30 (100%)	—	30/30 (100%)	30
LGSIL	High-risk HPV	16/33 (48.5%)	17/33 (51.5%)	19/33 (57.6%)	14/33 (42.4%)	33
	Other types <sup>b</sup>	5/41 (12.2%)	36/41 (87.8%)	7/41 (17%)	34/41 (83%)	41
HGSIL	High-risk HPV	4/6 (66.7%)	2/6 (33.4%)	6/6 (100%)	—	6
	Other types <sup>b</sup>	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	2
Total		26	90	33	83	116

<sup>a</sup> hTERT, human telomerase reverse transcriptase; HPV, human papilloma virus; LGSIL, low-grade squamous intraepithelial lesions; HGSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion.

<sup>b</sup> Low risk and unclassified HPV types.

**Table 4.** Test Characteristics of Telomerase Components and HPV When Used for the Detection of HGSIL<sup>a</sup>

Telomerase components and HPV	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
TRAP	62.5%	80.5%	19.2%	96.7%
hTERT	87.5%	76%	21.2%	98.7%
High-risk HPV	75%	68.5%	15%	97.4%

<sup>a</sup> HPV, human papilloma virus; HGSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion; TRAP, telomeric repeat protocol assay; hTERT, human telomerase reverse transcriptase.

80.5% and 19.2%, respectively. hTERT mRNA expression assessment showed a high sensitivity (87.5%), 98.7% NPV, 76% specificity, and 21.2% PPV for HGSIL (Table 4)

## Discussion

We investigated the relation between telomerase activity, hTERT mRNA expression, HPV infection status, and cytologic findings in cervical epithelial cells and evaluated telomerase activity and hTERT mRNA expression assessment in cervical smears with low- and high-grade lesions.

We studied the overall telomerase activity as well as hTERT mRNA expression, which correlate closely to telomerase activity, and not the RNA component (hTR), or telomerase-associated proteins (TP1/TLP1), given that the latter are expressed in both normal cervical tissue and neoplastic samples, and therefore are nonspecific for clinically significant cervical disease (10).

HPV infections are the single most potent insult leading to the development of cervical cancer and are present in more than 90% of such cases (2, 5, 9). The mechanism of malignant transformation by HPV appears to involve the integration of HPV DNA into the host cellular genome, resulting in constitutive expression of oncoproteins E6 and E7, which in turn inactivate tumor suppressor proteins and lead to the development of immortalizing or transforming phenotypes (13, 18–21). Testing for oncogenic types of HPV in cervical specimens is another possible method to triage women with low abnormalities on cytologic screening and has been found to have sensitivity and specificity ranging from 65% to 98% and from 52% to 74%, respectively, for detecting high-grade lesions (22). In our study, the sensitivity and specificity for high risk HPV types were 75% and 68.5%, respectively, for the detection of HGSIL, which is in agreement with previous studies (22–24).

The tight connection between HPV infection and cervical neoplasia has been supported by the presence of hTERT transcripts in human keratinocytes expressing the E6 protein of HPV type 16. In some reports a negative association between telomerase activity and HPV infection has been observed (6, 9, 12, 25, 26), whereas other studies report a positive association between telomerase activity and high-risk HPV types in cervical lesions (13, 27).

Until now, the evaluation of telomerase activity and hTERT mRNA expression as potential predictors of cervical cancer has been inconclusive. Some reports have detected

telomerase activity in normal cervical tissues as well as in benign LGSIL and ASCUS (6, 11, 22, 23), whereas some others have detected telomerase activity in HGSIL only (25, 28–31). hTERT mRNA expression has been observed in premalignant as well as in malignant lesions of cervical epithelium (6, 7, 9, 26, 27, 32, 33). In our study we observed hTERT mRNA expression in the majority of HGSIL (87.5%) samples and in 35% of LGSIL and ASCUS samples, whereas telomerase activity was observed in 62.5% of HGSIL and in 28.4% of LGSIL and ASCUS samples, in agreement with previous reports (6, 9, 10, 21, 26). However, the number of HGSIL samples in our study was too small to allow definite conclusions. We also observed, for the first time, hTERT mRNA expression in cervical samples with low- and high-grade dysplasias, infected with HPV types 45, 58, and 61, in addition to previously reported types 16 and 18. In agreement with Cheah et al (25) and Kawai et al (27), who reported the presence of low telomerase activity in four cases infected with non-high-risk HPV types using the TRAP assay (8, 27), we observed hTERT mRNA expression and telomerase activity in one specimen infected with low-risk HPV-6. The sample was sequenced and was found to be an HPV-6b variant. Overall, in our study a correlation was observed between telomerase activity, hTERT mRNA expression, and HPV infection status in cervical samples with low- and high-grade abnormalities.

Routine cervical cytology is the most effective screening test for cancer, but the practice of cervical cytology is limited by problems of false-negative diagnosis of HGSILs because of errors of interpretation and of poor specificity for clinically significant lesions in ASCUS and LGSILs. Reports of false-negative rates in cervical cytology vary from 1.6% to 28%, with mean sensitivity of 58% and specificity of 69% (10, 34). Because of this low sensitivity and specificity, the use of a second test in parallel with the Papanicolaou smear might be very useful. The issue of the clinical utility of telomerase assay and hTERT mRNA expression in cervical samples with low- and high-grade abnormalities has been addressed in few recent reports and there are conflicting results, with sensitivity ranging from 3.7% to 100% (12, 31, 35–37). Telomerase activity assessment in our study showed a relatively high sensitivity and a high specificity for HGSILs. hTERT mRNA assessment showed even higher sensitivity for HGSILs. More



specifically, the sensitivity and NPV of telomerase activity were 62.5% and 96.7% for HGSILs, whereas specificity and PPV were 80.5% and 19.2%, respectively. hTERT mRNA sensitivity was 87.5% and NPV 98.7%, whereas specificity and PPV were 76% and 21.2%, respectively. Although the sensitivity and specificity values of telomerase activity and hTERT assessment for HGSILs were high, the observed high NPV suggests that the telomerase system might not be a useful marker for predicting biologic behavior of a cervical lesion.

In conclusion, our findings suggest that HPV infection either alone or in association with other insults activates the expression of the telomerase gene in the cervical mucosa. Telomerase activation appears to be an early event in the malignant transformation of cervical epithelium, and based on our telomerase assessment values, it is suggested that the final evaluation of telomerase test performance must rely on a combination of all available test assessment data, cytologic and histologic diagnosis, and the follow-up of all women with low-grade lesions that expressed telomerase activity.

1. Saretzki G, Fischer H, Kaufmann IG, Schewe C, Nadjari B, Blohmer J, Hauptmann ST. Telomerase activity in cervical smears. *Anal Cell Pathol* 23:39–43, 2001.
2. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen MA, Peto J, Schiffman HM, Moreno V, Kurman R, Shah VK. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 87:796–802, 1995.
3. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2:342–350, 2002.
4. Cuzick J, Szarewski A, Terry G, Ho L, Hanby A, Maddox P, Anderson M, Kocjan G, Steele ST, Guillebaud J. Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet* 345:1533–1536, 1995.
5. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244–264, 2002.
6. Kazuo Y, Ashfaq R, Jan N, Von Vivian G, Milchgrub S, Asha R, Jorge AS, Shay WJ, Adi FG. Telomerase activity and expression of its RNA component in cervical lesions. *Cancer* 82:1319–1327, 2002.
7. Park TW, Riethdorf S, Schulz G, Riethdorf L, Wright T, Löning T. Clonal expansion and HPV-induced immortalization are early molecular alterations in cervical carcinogenesis. *Anticancer Res* 23:155–160, 2003.
8. Lim SH, Kim JH, Londoño-Vallejo A, Bui H, Tubacher E, Solomon G, Park JE, Horikawa I, Kouprina N, Barrett CJ, Larionov V. The human telomerase gene: complete genomic sequence and analysis of tandem repeat polymorphisms in intronic regions. *Oncogene* 21:769–777, 2002.
9. Zhang DK, Ngan HYS, Cheng RYS, Cheung ANY, Liu SS, Tsao SW. Clinical significance of telomerase activation and telomere restriction fragment (TRF) in cervical cancer. *Eur J Cancer* 35:154–160, 1999.
10. Jarboe EA, Liaw KL, Thompson LC, Heinz DE, Baker PL, McGregor JA, Dunn T, Woods JE, Shroyer KR. Analysis of telomerase as a diagnostic biomarker of cervical dysplasia and carcinoma. *Oncogene* 21:664–673, 2002.
11. Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, Tahara H, Ohji H, Yamamoto H, Ide T, Utakoji T. Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 13:433–439, 1996.
12. Jarboe EA, Thompson LC, Heinz D, McGregor JA, Shroyer KR. Telomerase and human papillomavirus as diagnostic adjuncts for cervical dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 35 (4):396–402, 2004.
13. Wolf KJ, Franco LE, Arbeit MJ, Shroyer RK, Wu TC, Runowicz DC, Tortolero-Luna G, Herrero R, Crum PC. Innovations in understanding the biology of cervical cancer. *Cancer Suppl* 98:2064–2069, 2003.
14. Zhang A, Maner S, Betz R, Angström T, Stendahl U, Bergman F, Zetterberg A, Wallin KL. Genetic alterations in cervical carcinomas: Frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 101:427–433, 2002.
15. Unger ER, Vernon SD, Lee RD, Miller LD, Reeves CW. Detection of human papillomavirus in archival tissues: comparison of in situ hybridization and polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 46:535–540, 1998.
16. Ulaner GA, Hu JF, Giudice CL, Hoffman RA. 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, 1998.
17. Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 8:137–142, 1999.
18. Anderson S, Shera K, Ihle J, Billman L, Golf B, Greer B, Tamimi H, McDougall J, Klingelutz A. Telomerase activation in cervical cancer. *Am J Pathol* 151:25–31, 1997.
19. Zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 186:131–156, 1994.
20. Ferber MJ, Montoya DP, Yu C, Aderca I, McGee A, Thorland EC, Nagomey DM, Gostout BS, Burgart LJ, Boix L, Bruix J, McMahon BJ, Cheung TH, Chung THH, Wong YF, Smith DI, Roberts LR. Intergrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancer. *Oncogene* 22:3813–3820, 2003.
21. Frost M, Bobak JB, Gianani R, Nam K, Scott W, Spalding CD, Cass GL, Thompson LC, Enomoto T, Lopez-Urbe D, Shroyer RK. Localization of telomerase hTERT protein and hTR in benign mucosa, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the cervix. *Am J Clin Pathol* 114:726–734, 2000.
22. Howard M, Sellors WJ, Lytwyn A, Roth P, Mahony BJ. Combining human papillomavirus testing or cervicography with cytology to detect cervical neoplasia. *Arch Pathol Lab Med* 128:1257–1262, 2004.
23. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous epithelial cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 188:1383–1392, 2003.
24. Lytwyn A, Sellors JW, Mahony JB, Daya D, Chapman W, Howard M, Roth P, Lorincz AT, Gafni A, Walter SD. Adjunctive human papillomavirus testing in the 2-year follow-up of women with low grade cervical cytologic abnormalities: a randomized trial and economic evaluation. *Arch Pathol Lab Med* 127:1169–1175, 2003.
25. Cheah PL, Looi LM, Ng MH, Sivanesaratnam V. Telomerase activation and human papillomavirus infection in invasive uterine cervical carcinoma in a set of Malaysian patients. *J Clin Pathol* 55:22–26, 2002.
26. Mutirangura A, Sriuranpong V, Termrunggraungler W, Tresukosol D, Lertsaguansinchai, Voravud N, Niruthisard S. Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, premalignant and benign cervical lesions. *Br J Cancer* 78:933–939, 1998.
27. Kawai K, Yaginuma Y, Tsuruoka H, Griffin M, Hayashi H, Ishikawa M. Telomerase activity and human papillomavirus (HPV) infection in human uterine cervical cancers and cervical smears. *Eur J Cancer* 34:2082–2086, 1998.
28. Wisman GB, Hollema H, de Jong S, ter Schegget J, Tjong-A-Hung SP, Ruiters MH, Krans M, de Vries EG, van der Zee AG. Telomerase activity as a biomarker for (pre)neoplastic cervical disease in scrapings

- and frozen sections from patients with abnormal cervical smear. *J Clin Oncol* 16:2238–2245, 1998.
29. Snijders PJF, Van Duin M, Walboomers MMJ, Steenberger DMR, Risse KJE, Helmerhorst JMT, Verheijen HMR, Meijer JLMC. Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. *Cancer Res* 58:3812–3818, 1998.
  30. Wisman GB, Knol JA, Helder NM, Krans M, De Vries GEE, Hollema H, Jong DES, Van Der Zee GJA. Telomerase in relation to clinicopathologic prognostic factors and survival in cervical cancer. *Int J Cancer* 91:658–664, 2001.
  31. Reesink-Peters N, Helder MN, Wisman GB, Knol AJ, Koopmans S, Boezen HM, Schuurin E, Hollema H, de Vries EG, de Jong S, van der Zee AG. Detection of telomerase, its components, and human papillomavirus in cervical scrapings as a tool for triage in women with cervical dysplasia. *J Clin Pathol* 56:31–35, 2003.
  32. Riethdorf S, Riethdorf L, Shulz G, Ikenderg H, Jänicke F, Löning T, Park TW. Relationship between telomerase activation and HPV16/18 oncogene expression in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 20:177–185, 2001.
  33. Lanham S, Herbert A, Walt P. HPV detection and measurement of HPV-16 telomerase and surviving transcripts in colposcopy clinic patients. *J Clin Pathol* 54:304–308, 2001.
  34. Fahey MT, Iwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 141:680–9, 1995.
  35. Kyo S, Takamura M, Ishikawa H, Sasagawa T, Satake S, Tateno M, Inoue M. Application of telomerase assay for the screening of cervical lesions. *Cancer Res* 57:1863–1867, 1997.
  36. Gorham H, Yoshida K, Sugino T, Marsch G, Manek S, Charnock M, Tarin D, Doodison S. Telomerase activity in human gynecological malignancies. *J Clin Pathol* 50:501–504, 1997.
  37. Zheng PS, Iwasaka T, Yokohama M, Nakao Y, Pater A, Sugimori H. Telomerase activation in *in vitro* and *in vivo* cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 66:222–226, 1997.



# Quantitative determination of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA expression in premalignant cervical lesions and correlation with human papillomavirus load

Pagona Oikonomou PhD<sup>a,b</sup>, Iordanis Mademtzis MD<sup>c</sup>,  
Ioannis Messinis MD, PhD<sup>c</sup>, Aspasia Tsezou PhD<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Cytogenetics and Medical Genetics, University of Thessalia Medical School, 41222 Larissa, Greece

<sup>b</sup>Department of Biology, University of Thessalia Medical School, 41222 Larissa, Greece

<sup>c</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, University of Thessalia Medical School, 41222 Larissa, Greece

Received 22 June 2005; revised 21 September 2005; accepted 23 September 2005

## Keywords:

Cervical cytology;  
Cervical dysplasia;  
hTERT;  
Human papillomavirus

**Summary** Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) messenger RNA (mRNA) and human papillomavirus (HPV)-16 load were quantified using real-time polymerase chain reaction and correlated with cytological findings and the presence of HPV infection in cervical specimens. Human telomerase reverse transcriptase mRNA expression was evaluated in 15 (20.5%) of 73 specimens of atypical squamous epithelial cells of undetermined significance, in 62 (39.7%) of 156 low-grade squamous intraepithelial lesions (LGSILs), in 49 (96%) of 51 high-grade squamous intraepithelial lesions (HGSILs), and in 9 (20%) of 45 normal samples, whereas viral load was quantified in 52 (89.6%) of 58 samples infected with HPV-16. The mean levels of hTERT mRNA expression were 0.11 in normal tissue, 0.23 in atypical squamous epithelial cells of undetermined significance, 0.75 in LGSILs, and 2.5 in HGSILs. Thus, a significant increase in hTERT mRNA expression was observed with increasing degrees of cervical dysplasia. The HPV-16 load was significantly higher in samples of HGSIL than in those of LGSILs ( $P < .001$ ). A significant correlation was observed between viral load and quantitative hTERT mRNA expression ( $r = 0.65$ ;  $P < .05$ ). Quantitative hTERT mRNA assessment showed 96% sensitivity and 100% negative predictive value for high-grade dysplasia, whereas the specificity and positive predictive value were 72% and 36.2%, respectively. It is suggested that quantitative hTERT has a very high sensitivity and negative predictive value, whereas the observed specificity was moderate, indicating that it cannot be used as a diagnostic marker but may be an adjunct in the management of women with high-grade cervical dysplasia. However, the final diagnosis must rely on the inclusion of clinical evaluation and additional assessment data.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

\* Corresponding author. Department of Biology, University of Thessalia Medical School, 41222 Larissa, Greece.

E-mail address: atsezou@med.uth.gr (A. Tsezou).

## 1. Introduction

The role of telomerase, the ribonucleoprotein responsible for maintaining the ends of chromosomes, has been the subject of intense investigation because of its association with cellular aging, immortalization, and cancer [1]. Telomerase is composed of 2 major subunits contributing to its enzymatic activity: an RNA component (human telomerase RNA [hTR]) that serves as the template for the polymerase activity of the enzyme and a conserved catalytic subunit with reverse transcriptase activity (human telomerase reverse transcriptase [hTERT]). Several additional protein subunits (Est 1p and Est 3p), as well as a variety of proteins contributing to the assembly and maturation of the enzymatic complex, have also been identified [2]. Among the various components, hTR and hTERT are considered essential for reconstitution of telomerase activity [3]. Although hTR is highly expressed in all tissues regardless of telomerase activity, with cancer cells having higher expression than normal cells, hTERT is considered to be the most important factor in the formation of functional telomerase and concomitant cell immortalization and is strongly associated with the enzyme's activity [4-7].

Studies of both tumor cell lines and human tumor specimens have shown that, in contrast to normal somatic cells, more than 90% of malignant cells express increased telomerase activity [8]. Several investigators have suggested that there are quantitative differences in the level of hTERT messenger RNA (mRNA) expression in premalignant and malignant cervical lesions, indicating a role for hTERT in early cancer detection [9,10]. Regulation of hTERT, however, is a complex and dynamic process that is tightly linked to the regulation of cell proliferation. Several mechanisms control the transcription of the hTERT gene, leading to repression or reactivation of telomerase activity in normal and cancer cells in a context-dependent manner [11]. Among these mechanisms, several virus-encoded proteins, which contribute to human cell transformation and carcinogenesis, have been suggested [3]. Human papillomaviruses (HPV), especially high-risk types 16 and 18, play an important role in immortalization and transformation of human keratinocytes, and their oncogenic activities are attributable mainly to the E6 and E7 oncoproteins, which are able to abrogate the tumor-suppressive function of the p53 and Rb signaling pathways [11]. It has been suggested that the HPV load varies with the type of cervical disease and HPV genotype and, furthermore, that a high viral load resulting from productive replication increases the risk of cervical cancer [12,13].

The present study was designed to test the hypothesis that there are quantitative differences in hTERT mRNA expression between normal and abnormal cervical mucosa and to evaluate the potential role of HPV load in the activation of hTERT and the development of cervical cancer. For the first time, to our knowledge, we used a real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction

(RT-PCR) assay based on LightCycler technology (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) to quantify hTERT mRNA in cervical samples with different cytological characteristics, as well as HPV-16 DNA load. A significant increase in quantitative hTERT mRNA expression was observed with increasing degrees of cervical dysplasia. In addition, for the first time, a significant correlation was observed between increasing hTERT mRNA values and HPV-16 load. The specificity and sensitivity of hTERT mRNA expression were assessed to test the value of hTERT as a marker of cervical dysplasia.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

A total of 325 cases were studied, including 280 cases with abnormal cytological findings and 45 normal cases. Among the 280 abnormal specimens, 73 were atypical squamous epithelial cells of undetermined significance (ASCUS), 156 were low-grade squamous intraepithelial lesions (LGSILs), and 51 were high-grade intraepithelial lesions (HGSILs). Of the ASCUS samples, 15 (20.5%) were classified as cervical intraepithelial lesion (CIN) 1, whereas 1 sample (1.4%) was classified as CIN 2. Most of the LGSIL samples (98% [153/156]) were classified as CIN 1, 2 (1.3%) as CIN 2, and 1 (0.6%) as CIN 3. Of the HGSIL, 40 (78.4%) were classified as CIN 2, and 11 (21.6%) as CIN 3. The mean age of the women with abnormal findings was 38.4 years (range, 19-58 years; SEM, 8.42 years) and that of the control group, 37.4 years (range, 24-50 years; SEM, 8.27 years).

Cervical cytology samples were obtained at the colposcopy unit of University Hospital of Larissa. All abnormal samples were collected at the time of colposcopic evaluation for the management of previous abnormal cytology results, including repeat diagnosis of ASCUS or previous diagnosis of LGSIL or HGSIL. Two cervical specimens were obtained from each woman in appropriate collection vials using an endocervical cytobrush before the colposcopic examination and cervical biopsy and immediately after collection of the routine cervical sample. The study was double-blind. The samples were kept on ice and were immediately processed in the laboratory. The first specimen was collected in sodium chloride, Tris, EDTA, Triton (STE) buffer (Tris HCl 0.05 mol/L, NaCl 0.1 mol/L, and EDTA 1 mmol/L; pH 7.5) and was used for DNA extraction and subsequent genotyping of HPV-positive specimens, whereas the second specimen was collected in Trizol (Life Technologies, Inc, Paisley, UK) and was used for RNA extraction and quantitative hTERT mRNA evaluation. Cervical biopsies for histological examination were obtained at the end of the colposcopy and were evaluated by the Pathology Laboratory of Larissa University Hospital. The Ethics Committee of Larissa University Hospital approved the protocol.

## 2.2. Human papillomavirus analysis

Human genomic DNA was extracted from the scraped cervical cells using a proteinase K/phenol-chloroform protocol. Detection and genotyping of HPV has been previously described using polymerase chain reaction (PCR) with the consensus primers MY09/11, HPV-specific primers, as well as restriction endonuclease digestion [14].

### 2.2.1. Total RNA isolation

Total RNA was extracted using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions. RNA was further purified using the RNase-free DNase kit (Qiagen, Hilden, Germany). Preservation of 28S and 18S ribosomal RNA species was used to assess RNA integrity. Only samples with prominent 28S and 18S ribosomal RNA components were included in the study. The yield was quantified spectrophotometrically.

### 2.2.2. Quantification of hTERT mRNA

A commercially available Telo TAGGG hTERT Quantification kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) was used for RT-PCR amplification and quantification of hTERT mRNA according to the manufacturer's instructions using LightCycler technology (Roche Molecular Biochemicals). Briefly, the hTERT mRNA was reverse-transcribed, and a 198-bp fragment of the complementary DNA was amplified with the specific primers in a 1-step RT-PCR procedure. The amplicon was detected by fluorescence using a pair of specific probes consisting of 2 oligonucleotides that hybridize with an internal sequence of the amplified fragment during the annealing phase of the amplification cycle. In a separate 1-step RT-PCR, mRNA encoding porphobilinogen deaminase (PBGD) was processed for use as a housekeeping gene. The reaction product served as both a control for RT-PCR performance and a reference for relative quantification.

For each tested sample, 2  $\mu\text{L}$  of the eluate total RNA (200 ng) was used. Quantification was performed by real-time monitoring for identification of the exact time at which the logarithmic linear phase could be distinguished from the background. External standards containing  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ , and  $10^2$  copies of hTERT mRNA per 2  $\mu\text{L}$  were used in each run. The cycle numbers of the logarithmic linear phase were plotted against the logarithm of concentration of hTERT mRNA. By comparing the crossing line intercept of an unknown sample with the standard curve, a quantitative estimate of the starting copy number of hTERT mRNA (as well as of the PBGD) was calculated. The normalized hTERT mRNA value (hTERT mRNA copies/PBGD copies), a measure of hTERT mRNA quantity, was calculated by dividing the amount of hTERT transcript by the amount of endogenous housekeeping gene PBGD mRNA in the same sample and multiplying by 100. All hTERT determinations were performed at least twice, and the intra-assay variability was  $0.1\% \times 100\%$ . To monitor the reaction,

control RNA supplied with the kit was included as a positive control in each run. For appropriate negative controls, in each run, the RNA template was replaced with nuclease-free water, and the reverse transcriptase was omitted. hTERT levels can be specifically and quantitatively detected with a 10- to 100-copy sensitivity. To study the sensitivity of hTERT detection in cytology specimens, hTERT mRNA expression was analyzed in serial dilutions of hTERT-positive cells in a background of 100 ng of RNA from normal hTERT-negative cells. Amplified hTERT mRNA expression was detectable down to 100 pg of cells. Thus, assuming that 1 cell contains approximately 10 pg of RNA, the quantitative RT-PCR method allowed the detection of hTERT mRNA in 10 cells of an abnormal specimen against a background of 10 000 hTERT mRNA-negative cells [6].

In contrast to other segments of this gene, no splice variants of hTERT mRNA have been detected in the region selected for complementary DNA amplification [15,16].

### 2.2.3. Viral load determination

The copy number of HPV-16 was determined using the LightCycler software (version 3.5; Roche Molecular Biochemicals). The sequences of the primers and probes were designed by TIB MOLBIOL (GmbH, Berlin, Germany) and were the following: primer S TRYRKgYYYTAAAC-gAAAg, primer A/probe LC TTCCACTTCAGWAYAgC-CATA, and probe FL TATTTgAAAgCgAAgACAgCgggT X. The PCR was set up in a volume of 20  $\mu\text{L}$ . Each mixture contained 0.5  $\mu\text{mol/L}$  of primer S and primer A/probe LC (5'-end labeled with LC red—maximum emission at 640 nm) and 0.15  $\mu\text{mol/L}$  of probe FL (3'-end labeled with fluorescein—maximum emission at 530 nm), 2  $\mu\text{L}$  of LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes mix (Roche Molecular Biochemicals), 3.5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MgCl}_2$ , and 1  $\mu\text{L}$  of template DNA. Real-time detection was performed in glass capillaries using a LightCycler instrument (Roche Molecular Biochemicals). The amplification conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 75 cycles of denaturation at 95°C for 5 seconds and annealing and extension at 55°C for 10 seconds and at 72°C for 15 seconds. Fluorescence was measured at the end of the 55°C step. To confirm the HPV-16 type, melting-curve analysis was performed after the end of the PCR amplification. For melting-curve analysis, samples were subjected to 1 cycle of 20 seconds at 95°C, 20 seconds at 50°C, and 1 second at 75°C. In each PCR run, plasmid HPV-16 DNA (provided by TIB MOLBIOL) was used as a positive control, and to minimize the chance of recording false-positive results, samples without template were used as negative controls.

Standard curves were created automatically by plotting the crossing point against the logarithm of the copy numbers of plasmid DNA standards, serially diluted 10-fold from  $10^7$  to  $10^1$  copies of HPV-16 DNA. Copy numbers of each sample were calculated from the standard

curve of HPV-16. Each sample was assayed at least twice. The number of genomes or cells input was calculated by dividing the DNA input by the weight of 1 genome equivalent (6.6 pg per cell). The viral load in each sample was expressed as the number of HPV copies per microgram of DNA [17].

**2.3. Statistical analysis**

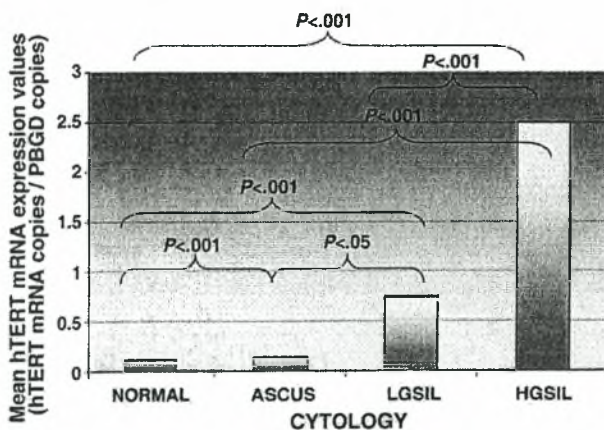
Data were analyzed by the unpaired *t* test, Mann-Whitney *U* test, or Kruskal-Wallis test, as well as analysis of variance and the Fisher PLSD; the post hoc test corrected for multiple comparisons where applicable. A 2-sided *P* value below .05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using SPSS 10 software. Diagnostic test characteristics (sensitivity, specificity, positive predictive value [PPV], and negative predictive value [NPV]) were calculated by using the proportion of women with normal cytology, LGSIL, and HGSIL.

**3. Results**

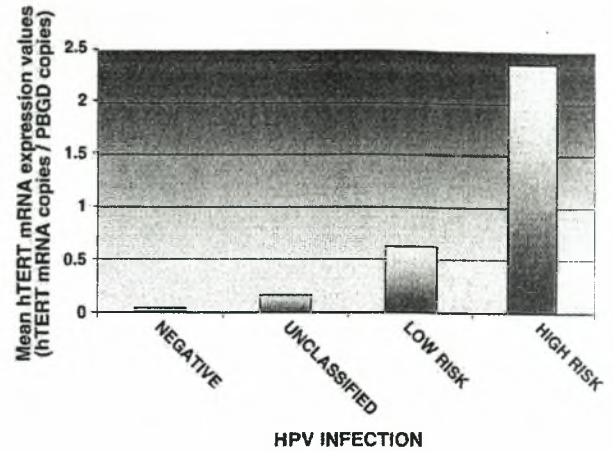
Human papillomavirus DNA was detected in 190 (67.8%) of 280 specimens with abnormal cytological findings and in 10 (22.2%) of 45 normal specimens. High-risk HPV types 16, 18, 31, 33, 45, 61, and 58 were present in 105 specimens (37.5%) with abnormal cytological findings and in 2 normal specimens (4.4%). Low-risk HPV types 6, 11, 53, 54, CP141, and CP8304 were detected in 80 cases (28.6%) with abnormal cytological findings and in 8 normal samples (17.7%). Thirty-five of the abnormal specimens (12.5%) were positive for unclassified HPV types, whereas 60 (21.4%) were negative for HPV infection.

**3.1. Human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in relation to cytological diagnosis**

Human telomerase reverse transcriptase mRNA expression was evaluated in 126 (45%) of the 280 abnormal



**Fig. 1** hTERT mRNA expression in cervical samples of different cytological characteristics.

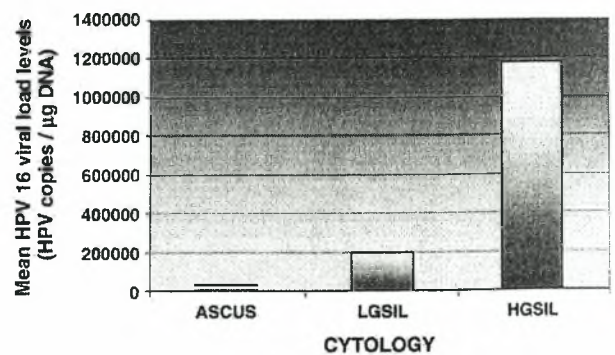


**Fig. 2** Mean hTERT mRNA expression values (hTERT mRNA copies/PBGD copies) according to HPV infection status.

specimens: 49 (96%) of 51 HGSIL, 62 (39.7%) of 156 LGSIL, and 15 (20.5%) of 73 ASCUS, as well as in 9 (20%) of 45 normal samples. The mean normalized hTERT mRNA expression differed significantly in the 4 cytological groups, being 0.11 (SEM, 0.03; range, 0-0.8) in normal tissue, 0.23 (SEM, 0.04; range, 0-1.6) in ASCUS, 0.75 (SEM, 0.1; range, 0-4.5) in LGSIL, and 2.5 (SEM, 0.17; range, 0-5.2) in HGSILs. A significant difference in hTERT mRNA expression was observed between normal and LGSILs (*P* < .001), normal and HGSILs (*P* < .001), ASCUS and LGSILs (*P* < .05), ASCUS and HGSILs (*P* < .001), and LGSILs and HGSILs (*P* < .001) (Fig. 1). No difference was observed between the normal and ASCUS samples.

**3.2. Correlation of quantitative hTERT mRNA expression and HPV infection**

The levels of hTERT mRNA were compared with the type and extent of HPV infection. The mean hTERT mRNA expression levels were 0.62 (SEM, 0.13; range, 0-4.4) in specimens infected with low-risk HPV types, 2.35 (SEM, 0.17; range, 0-5.2) in high-risk HPV-infected specimens,



**Fig. 3** Mean HPV-16 load in infected HGSIL and LGSIL specimens.

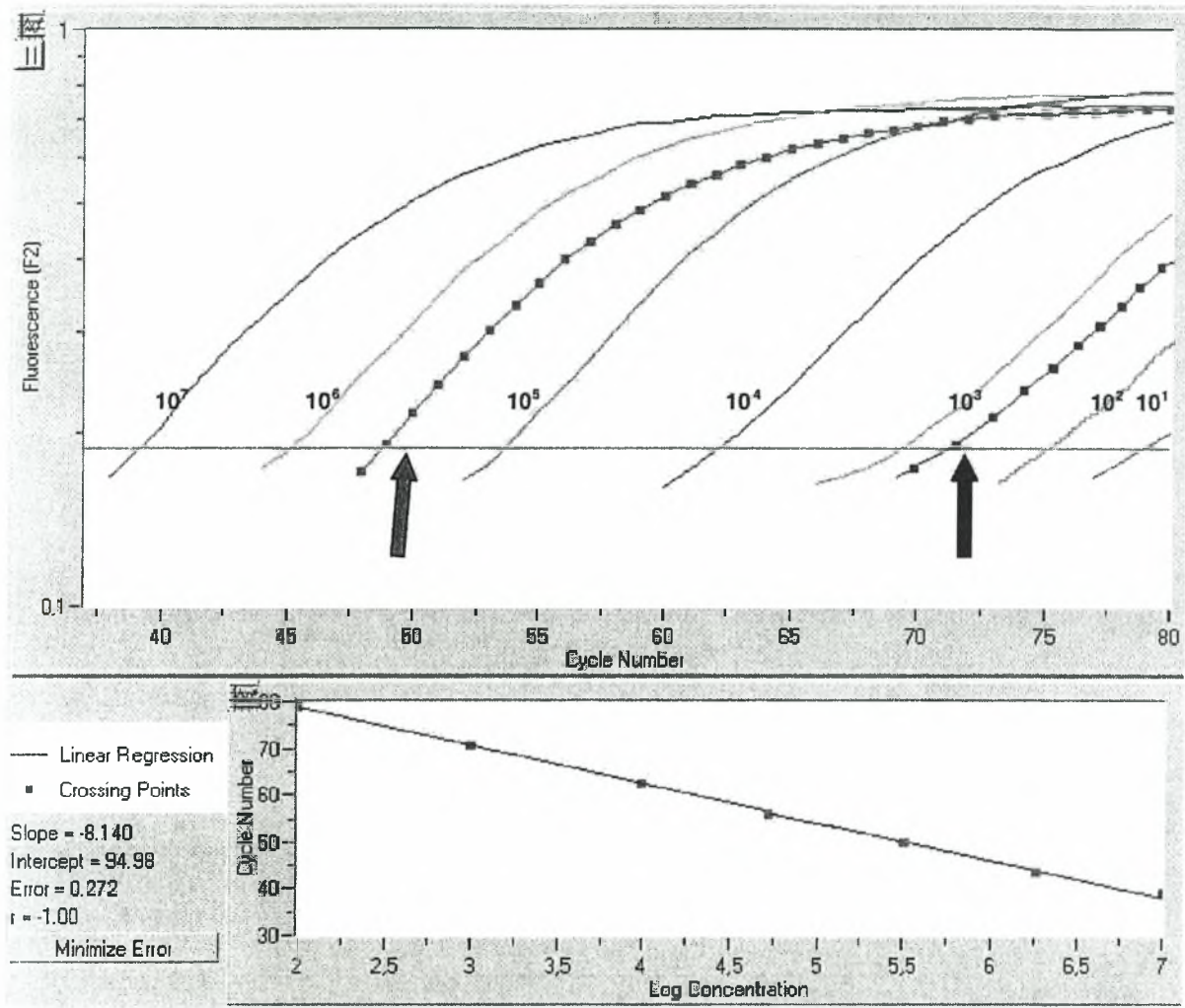


Fig. 4 Representative LightCycler run for quantification of HPV-16 load. Quantification was done on standard curve constructed from 7 standards with known HPV-16 copy numbers ( $10^7$  to  $10^1$ ). Sample indicated by first arrow is HGSIL, whereas second arrow indicates LGSIL.

0.16 (SEM, 0.04; range, 0-1.3) in specimens infected with unclassified HPV types, and 0.04 (SEM, 0.01; range, 0-0.6) in HPV-negative specimens (Fig. 2). The mean hTERT mRNA expression levels in high-risk HPV-infected specimens were, on average, 4 times those in low-risk infected samples, 17 times those in specimens infected with unclassified HPV types, and 72 times those in HPV-negative specimens. A significant difference was observed in hTERT mRNA expression between the different types of HPV infection ( $P < .001$ ). No difference in hTERT mRNA expression values was observed between uninfected tissues and those infected with unclassified HPV or between those infected with unclassified and low-risk types (Fig. 2).

### 3.3. Correlation between HPV load and cytological diagnosis

Viral load was measurable in 52 (89.6%) of the 58 samples infected with HPV-16: 30 specimens were HGSIL,

20 were LGSIL, and 2 were ASCUS. The other 6 samples were excluded from the viral load quantification because of the low yield of DNA. The quantity of HPV-16 DNA in each sample covered a range of 4 logs ( $10^3$  to  $10^7$  copies).

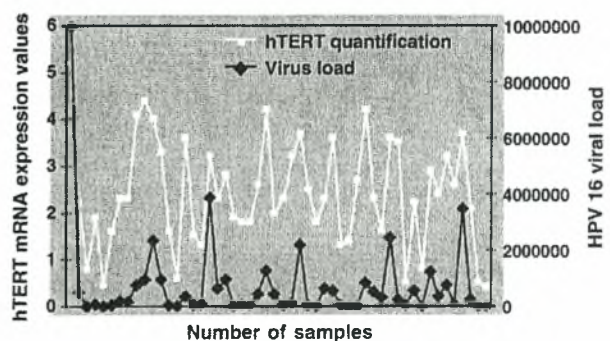


Fig. 5 Correlation of hTERT mRNA expression and HPV-16 load.

The mean HPV-16 load per microgram was  $0.76 \times 10^6$  (SEM,  $0.37 \times 10^6$ ; range,  $0.0016 \times 10^6$  to  $9.98 \times 10^6$ ). The mean copy number of HPV DNA in ASCUS was  $0.03 \times 10^6$  (SEM,  $0.0004 \times 10^6$ ; range,  $0.0016 \times 10^6$  to  $0.0034 \times 10^6$ ); that in LGSIL,  $0.2 \times 10^6$  (SEM,  $0.075 \times 10^6$ ; range,  $0.0028 \times 10^6$  to  $1.24 \times 10^6$ ); and that in HGSIL,  $1.18 \times 10^6$  (SEM,  $0.4 \times 10^6$ ; range,  $0.04 \times 10^6$  to  $9.98 \times 10^6$ ). The HPV-16 median copy values in the HGSIL samples were, on average, 6 times those in LGSIL and 60 times those in ASCUS. There was a significant increase in HPV-16 load as the cervical status changed from low-grade to high-grade dysplasia ( $P < .001$  Kruskal-Wallis test) (Fig. 3).

### 3.4. Correlation between HPV load and quantitative hTERT mRNA expression

Expression of hTERT mRNA was observed in all 52 HPV-16-positive samples, with a mean level of 2.2 (SEM, 0.15; range, 0.45-5.2). A significant correlation was observed between viral load and hTERT mRNA expression in samples infected with HPV-16 (Pearson correlation,  $r = 0.52$ ,  $P < .001$ ) (Figs. 4 and 5).

### 3.5. Assessment of quantitative hTERT mRNA expression and high-risk HPV infection for detection of HGSIL

Quantitative hTERT mRNA assessment showed a high sensitivity (96%) and high NPV (99%) for HGSIL. The specificity and PPV were 72% and 36.2%, respectively. High-risk HPV assessment showed 100% sensitivity and NPV for HGSIL, with the specificity and PPV being 79% and 52%, respectively.

## 4. Discussion

The malignant transformation of cervical epithelial cells resulting from high-risk HPV infection may be accomplished to a great extent through telomerase activation by the interaction of E6 viral oncoproteins with the hTERT promoter [16,18]. In addition, it has been suggested that the regions of the human DNA into which the virus integrates may contain important genes that are altered by the integration event and that participate in carcinogenesis [19].

In the present study, for the first time to our knowledge, we quantified hTERT mRNA expression in cervical specimens with normal and abnormal cytology using RT-PCR, and we investigated the relation between quantitative hTERT mRNA expression, HPV infection status, and cytological findings. Furthermore, we quantified the load of HPV-16 in infected samples and, for the first time, addressed the question whether viral load is correlated with quantitative hTERT mRNA expression and the development of cervical dysplasia. We observed hTERT mRNA expression in 96% of HGSIL, 39.7% of LGSIL, 20.5% of ASCUS, as well as 20% of normal samples. Expression of hTERT

mRNA increased significantly with increasing degrees of dysplasia, suggesting that hTERT mRNA expression represents an early event in the multistep process of cervical carcinogenesis. Most previous studies of hTERT mRNA used semiquantitative RT-PCR and revealed that 0% to 33% of normal cervixes and 80% to 100% of cervical cancers exhibit hTERT mRNA expression [4,6,7,14,20-22]. Expression of hTERT mRNA has been observed by conventional RT-PCR in premalignant as well as in malignant lesions of cervical epithelium, whereas several studies report small or no differences in hTERT expression between normal, LGSIL, and HGSIL samples [8,14,17,20,23-27].

We also observed a significant correlation between quantitative hTERT mRNA levels and high-risk HPV types ( $P < .001$ ), suggesting that HPV infection triggers genomic instability by either its integration into host genome or abrogation of checkpoints in pathways leading to telomerase activation. High levels of hTERT mRNA by conventional RT-PCR and high telomerase activity have been observed in samples infected mostly with high-risk HPV types 16 and 18 [11,14,21,25,26,28]. It has been suggested that high-risk HPV types may be more potent as carcinogens not because of the greater oncogenicity of their transforming proteins but because they are able to proliferate more efficiently, overwhelming the host's immune response [29].

We also quantified, by RT-PCR, the load of HPV-16 and observed significant correlations between viral load and grade of dysplasia in accordance with previous studies, suggesting that the presence of cervical neoplasia might be related to the presence of a high HPV-16 load [11,12,29,30]. The average HPV DNA copy number has been shown to increase with the grade of CIN only for HPV-16, indicating a genotype-specific association between HPV load and neoplastic progression [11].

Our report is the first in the literature indicating a significant positive linear correlation between HPV-16 load and the degree of hTERT mRNA expression, indicating that viral load is strongly involved in hTERT activation and the presence of cervical neoplasia. However, it cannot be concluded that all women with high numbers of HPV-16 DNA copies will eventually develop cervical carcinoma because malignant transformation might depend on other exogenous factors, perhaps in combination with impaired immune function with increasing age [29]. When analyzing viral load, it is also important to consider that values are an average summed over many cells, a large proportion of which may not be infected, and also that the viral DNA may have become integrated, disrupting or deleting the probe target site [30].

The issue of the clinical utility of hTERT mRNA expression in cervical samples with low- and high-grade abnormalities has been addressed in a few recent reports with conflicting results and with sensitivity values ranging from 3.7% to 100% [8,31-33]. Based on our previous results on telomerase activity measured by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay and hTERT mRNA expression measured by conventional RT-PCR, sensitivity



values were 62.5% and 87.5%, respectively [14], whereas the sensitivity of quantitative hTERT was considerably higher (96%), indicating that quantitative hTERT mRNA expression represents a more sensitive marker for HGSIL. Although the moderate specificity of quantitative hTERT mRNA expression is a disadvantage for use in widespread cervical cancer screening, the improvement in sensitivity and NPV assessment indicates that quantitative hTERT mRNA expression could be an adjunctive marker for HGSIL.

Regarding the clinical utility of quantitative hTERT mRNA expression for the management of patients with ASCUS or LGSIL, the low observed sensitivity (33.6%), the detection of hTERT in 20% of normal specimens, as well as the low proportion of ASCUS and LGSIL cases with positive hTERT values that had an underlying high-grade dysplasia (CIN 2-3) on cervical biopsy point toward its limited practical utility for the management of women with low-grade abnormalities.

In conclusion, the direct association observed, for the first time to our knowledge, between quantitative hTERT mRNA expression and HPV load as well as increasing degrees of dysplasia suggests that hTERT activation might be a central mechanism by which HPV infection leads to malignant transformation. Based on our assessment, quantitative hTERT mRNA showed higher sensitivity than hTERT studied by conventional RT-PCR, indicating that quantitative hTERT could be used as an adjunct to cervical cytology for HGSIL. However, because of the only moderate observed specificity and the lack of clinical utility for low-grade lesions, quantitative hTERT is not a diagnostic marker, and the final diagnosis must rely on the inclusion of clinical features along with all available assessment data.

## References

- [1] Poole CJ, Andrews GL, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 2001; 269:1-12.
- [2] Liu L, Lai S, Andrews GL, Tollefsbol TO. Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease. *Gene* 2004;340:1-10.
- [3] Horikawa I, Barrett JC. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis Adv Access* 2003;1-12.
- [4] Wisman GB, Knol JA, Helder NM, et al. Telomerase in relation to clinicopathologic prognostic factors and survival in cervical cancer. *Int J Cancer* 2001;91:658-64.
- [5] Yi X, Tesmer VM, Savre-Train I, et al. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human template RNA levels. *Mol Cell Biol* 1999;19:3989-97.
- [6] Snijders PJF, Van Duin M, Walboomers MMJ, et al. Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. *Cancer Res* 1998;58:3812-8.
- [7] Takamura M, Kyo S, Kanaya T, et al. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res* 1998;58:1558-61.
- [8] Reesink-Peters N, Helder MN, Wisman GB, et al. Detection of telomerase, its components, and human papillomavirus in cervical scrapings as a tool for triage in women with cervical dysplasia. *J Clin Pathol* 2003;56:31-5.
- [9] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
- [10] Wang SZ, Sun JH, Zhang W, et al. Telomerase activity in cervical intraepithelial neoplasia. *Chin Med J* 2004;117:202-6.
- [11] Zhang A, Maner S, Betz R, et al. Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 2002; 101:427-33.
- [12] Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol* 1999;37:1030-4.
- [13] Hernández-Hernández MD, Ornelas-Bernal L, Guido-Jiménez M, et al. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecol Oncol* 2003;90:310-7.
- [14] Tsezou A, Oikonomou P, Kollia P, et al. The role of human telomerase catalytic subunit mRNA expression in cervical dysplasias. *Exp Med Biol* 2005;230:263-70.
- [15] Ulaner GA, Hu JF, Giudice CL, et al. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 1998;58:4168-72.
- [16] Jarboe EA, Liaw KL, Thompson LC, et al. Analysis of telomerase as a diagnostic biomarker of cervical dysplasia and carcinoma. *Oncogene* 2002;21:664-73.
- [17] Yang HJ, Liu VWS, Tsang PCK, et al. Comparison of human papillomavirus DNA levels in gynecological cancers: implication for cancer development. *Tumor Biol* 2003;24:310-6.
- [18] Klingelhutz AJ, Foster AJ, McDougall LK. Telomerase activation by E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996;380:79-82.
- [19] Ferber MJ, Montoya DP, Yu C. Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancer. *Oncogene* 2003;22:3813-20.
- [20] Nakano K, Watney E, McDougall JK. Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer. *Am J Pathol* 1998;153:857-64.
- [21] Kanaya T, Kyo S, Takakura M, et al. hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 78:539-43.
- [22] Frost M, Bobak JB, Gianani R, et al. Localization of telomerase hTERT protein and hTR in benign mucosa, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the cervix. *Am J Clin Pathol* 2000;114:726-34.
- [23] Takamura M, Kyo S, Kanaya T. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res* 1997;57:1863-7.
- [24] Cheah PL, Looi LM, Ng MH, Sivanesaratnam V. Telomerase activation and human papillomavirus infection in invasive uterine cervical carcinoma in a set of Malaysian patients. *J Clin Pathol* 2002;55:22-6.
- [25] Zhang DK, Ngan HYS, Cheng RYS, et al. Clinical significance of telomerase activation and telomere restriction fragment (TRF) in cervical cancer. *Eur J Cancer* 1999;35:154-60.
- [26] Kawai K, Yaginuma Y, Tsuruoka H, et al. Telomerase activity and human papillomavirus (HPV) infection in human uterine cervical cancers and cervical smears. *Eur J Cancer* 1998;34:2082-6.
- [27] Riethdorf S, Riethdorf L, Shulz G, et al. Relationship between telomerase activation and HPV16/18 oncogene expression in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2001;20:177-85.
- [28] Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 1999;8:137-42.

- [29] Hart KW, Williams OM, Thelwell N, et al. Novel method for detection, typing and quantification of human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Pathol* 2001;39:3204-12.
- [30] Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson MA, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000;355:2194-8.
- [31] Howard M, Sellors WJ, Lytwyn A, et al. Combining human papillomavirus testing or cervicography with cytology to detect cervical neoplasia. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:1257-62.
- [32] ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous epithelial cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:1383-92.
- [33] Jarboe EA, Kai-Li LL, Chesney T, et al. Analysis of telomerase as a diagnostic biomarker of cervical dysplasia and carcinoma. *Oncogene* 2002;21:664-73.