

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

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

«ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΕΣ
ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΙΟΥΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β ΚΑΙ C»

ΣΑΤΡΑ ΜΑΡΙΑ

Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2006

.362 3

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

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

Αριθ. Εισ.: 5352/1
Ημερ. Εισ.: 09-10-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
616.362 3
ΣΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083726

✓

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

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

«ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΕΣ
ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΙΟΥΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β ΚΑΙ C»

ΣΑΤΡΑ ΜΑΡΙΑ

Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2006

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καθηγητής	κ. Βαμβακόπουλος Νικόλαος
Επικουρη Καθηγήτρια	κα. Κόλλια Παναγούλα
Επικουρη Καθηγήτρια	κα. Τσέζου Ασπασία (επιβλέπουσα)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής	κ. Βαμβακόπουλος Νικόλαος
Καθηγητής	κ. Γουργουλιάνης Κων/νος
Καθηγητής	κ. Μολυβδός Πασχάλης-Αδάμ
Καθηγητής	κ. Σταθάκης Νικόλαος
Αναπληρωτής Καθηγητής	κ. Νταλέκος Γεώργιος
Επικουρη Καθηγήτρια	κα. Κόλλια Παναγούλα
Επικουρη Καθηγήτρια	κα. Τσέζου Ασπασία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- Πρόλογος σελ.7

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **σελ.11**

A.1 Τελομερή σελ. 13

A.1.1. Δομή τελομερών σελ. 13

A.1.2. Ρόλος τελομερών σελ. 15

A.1.3. Πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής σελ. 15

A.1.4. Συνέπειες του προβλήματος ολοκλήρωσης της αντιγραφής σελ. 16

A.2 Τελομεράση σελ. 19

A.2.1. Δομή τελομεράσης σελ. 19

A.2.2. Λειτουργία τελομεράσης σελ.22

A.2.3. Έκφραση της τελομεράσης σελ.24

A.2.4. Ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης σελ.24

A.2.4.1 Μεταγραφικοί παράγοντες σελ.25

A.2.4.2 Επιγενετικοί μηχανισμοί σελ.27

A.2.5 Τελομεράση και μεθυλίωση σελ.31

A.3 Περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα και τελομεράση σελ. 33

A.4 Ηπατοπάθειες και τελομεράση σελ.35

A.5 Σκοπός της διατριβής σελ. 39

B.1 Υλικά και μέθοδοι σελ. 43

B.1.1 Ομάδα μελέτης σελ. 43

B.1.2. Απομόνωση κυττάρων σελ. 47

B.1.3. Απομόνωση RNA σελ. 48

B.1.4. Απομόνωση DNA σελ. 49

B.1.5. Πρωτόκολλο πολλαπλασιασμού των τελομερικών επαναλήψεων (TRAP) σελ. 50

B.1.6. Ποσοτικοποίηση σελ. 51

B.2. Αποτελέσματα σελ. 63

B.2.1. Ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα. σελ. 63

B.2.2. Μέτρηση της δραστικότητας της τελομεράσης και ποσοτικοποίηση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) σε βιοψίες ήπατος. σελ. 67

B.2.3. Μέτρηση του ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT, συσχέτιση αυτής με την έκφραση του hTERT mRNA καθώς και με την επιβίωση των ασθενών με ΗΚΚ. σελ. 73

B.3. Συζήτηση σελ. 77

B.3.1 Ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα. σελ. 77

B.3.2. Μέτρηση της δραστικότητας της τελομεράσης και ποσοτικοποίηση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) σε βιοψίες ήπατος. σελ. 79

B.3.3 Επιγενετική ρύθμιση της hTERT μέσω μεθυλίωσης σελ. 85

• Περίληψη σελ. 89

• Summary σελ. 93

**Στους γονείς μου,
Νίκο και Άννα**

Πρόλογος

Τα τελομερή αποτελούν τα φυσικά άκρα των γραμμικών χρωμοσωμάτων και είναι εξειδικευμένες νουκλεοπρωτεϊνικές δομές. Αποτελούνται από μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, καθώς και από πρωτεΐνες. Οι DNA πολυμεράσες δεν έχουν την ικανότητα αντιγραφής στην άκρη του γραμμικού χρωμοσωμικού DNA, οπότε στα άκρα των χρωμοσωμάτων δημιουργείται το λεγόμενο «πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής». Για να αποφύγουν την μείωση του μήκους των τελομερών, πολλά ευκαρυωτικά κύτταρα χρησιμοποιούν μια ειδική αντίστροφη μεταγραφάση, την τελομεράση. Η τελομεράση είναι μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία διατηρεί το μήκος των τελομερών παρέχοντας στα κύτταρα τη δυνατότητα για απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων. Τα κύτταρα με δραστική τελομεράση διατηρούν το μήκος των τελομερών τους, ενώ απουσία τελομεράσης τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού. Η τελομεράση αποτελείται από δύο υπομονάδες, την RNA υπομονάδα που ονομάζεται hTR και την καταλυτική υπομονάδα hTERT που έχει δράση αντίστροφης μεταγραφάσης, ενώ βιοχημικές και γενετικές μελέτες προτείνουν την ύπαρξη πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση συμβάλλοντας στη δημιουργία ενός ενεργού ολοενζύμου. Η τελομεράση δεν εκφράζεται στα περισσότερα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα, ωστόσο, παρατηρείται έκφραση σε κύτταρα με μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Πρόσφατες μελέτες συνηγορούν υπέρ του ότι το σημαντικότερο σημείο ελέγχου της έκφρασης της τελομεράσης εντοπίζεται κατά τη μεταγραφή του γονιδίου hTERT. Κεντρικό ρόλο στη μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου hTERT κατέχει η ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή. Η ρύθμιση της έκφρασης στο επίπεδο της μεταγραφής επιτυγχάνεται τόσο μέσω μεταγραφικών παραγόντων όσο και μέσω επιγενετικών μηχανισμών. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η τελομεράση εκφράζεται σε 85-90% των περιπτώσεων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (ΗΚΚ).

Το ΗΚΚ αποτελεί έναν από τους πιο συνήθεις κακοήθεις όγκους παγκοσμίως. Οι βλάβες που προκαλούνται στο ήπαρ από τους ιούς της ηπατίτιδας Β και C οδηγούν σημαντικό ποσοστό ασθενών που έρχονται σε επαφή με τους ιούς αυτούς σε χρόνια ηπατίτιδα και κατ' επέκταση σε αυξημένο ρυθμό αναγέννησης, φλεγμονή και καταστροφή του ήπατος, με τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη κίρρωσης και ΗΚΚ. Πράγματι, είναι γνωστό ότι ο

κυριότερος παράγοντας πρόκλησης του ΗΚΚ είναι οι χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες, αφού το 70-90% των ατόμων που θα αναπτύξουν κίρρωση θα αναπτύξουν τελικά και ΗΚΚ. Θεωρείται ότι οι χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες προσφέρουν δυνητικά τόσο το μιτογόνο όσο και το μεταλλαξογόνο περιβάλλον το οποίο είναι σε θέση να προκαλέσει την τροποποίηση του γενετικού υλικού των ηπατοκυττάρων. Μεταξύ των μηχανισμών που ενέχονται στην τροποποίηση του γενετικού υλικού των ηπατοκυττάρων συγκαταλέγονται η ενεργοποίηση καθώς και η απενεργοποίηση διάφορων γονιδίων.

Αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης αποτελεί η συσχέτιση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης σε ιστούς ασθενών με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες τόσο με την αντίστοιχη έκφραση σε υγιείς και καρκινικούς ηπατικούς ιστούς ιστούς όσο και με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους καθώς και η διερεύνηση του μηχανισμού που ρυθμίζει την έκφραση της τελομεράσης. Οι υπάρχουσες μελέτες διερευνούν την έκφραση της τελομεράσης κυρίως σε περιπτώσεις ΗΚΚ. Επιπλέον, οι μελέτες που έχουν γίνει σε ιστούς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα αλλά απουσία ΗΚΚ και με την χρήση ποσοτικών μεθόδων είναι περιορισμένες. Τέλος, είναι η πρώτη φορά που μελετήθηκε το πώς συγκεκριμένοι επιγενετικοί μηχανισμοί ελέγχουν την έκφραση της τελομεράσης στα ηπατοκύτταρα.

Η μελέτη μας χωρίζεται σε δύο κυρίως μέρη: το γενικό και το ειδικό. Στο γενικό μέρος αναφέρεται ότι είναι ήδη γνωστό για την τελομεράση και τις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες και γίνεται μια εκτενής ανασκόπηση και αναφορά στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Στο ειδικό μέρος περιγράφεται με λεπτομέρεια η μελέτη μας η οποία αποτελείται από τρεις επιμέρους έρευνες:

- Ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες καθώς και συσχέτιση τόσο με τις αντίστοιχες τιμές υγιών ατόμων όσο και με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους.
- Μέτρηση της δραστικότητας της τελομεράσης και ποσοτικοποίηση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) σε βιοψίες ήπατος ασθενών με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες και ΗΚΚ καθώς και συσχέτιση τόσο με τις αντίστοιχες τιμές υγιών ατόμων όσο και με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους.

- Μέτρηση του ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT, συσχέτιση αυτής με την έκφραση του hTERT mRNA καθώς και με την επιβίωση των ασθενών με ΗΚΚ.

Το υλικό μας αποτελείται από 73 ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες Β και C που ήταν υπό παρακολούθηση στην ηπατολογική μονάδα της Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από 27 ασθενείς που έπασχαν από ΗΚΚ και προσήλθαν στο Comprehensive Cancer Center, στο Πανεπιστήμιο Ohio State, στις ΗΠΑ και από 39 ασθενείς που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου γιατί δεν εμφάνιζαν ηπατοπάθεια, ενώ η βιοψία ήπατος πραγματοποιήθηκε κατά την διενέργεια απλών χειρουργικών επεμβάσεων, όπως π.χ. χολοκυστεκτομή κ.λπ.

Η επεξεργασία όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής και Κυτταρογενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας 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. Τσέζου Ασπασία για την άρτια επιστημονική καθοδήγηση, αλλά και για την κατανόηση και υποστήριξη καθόλη την διάρκεια της διατριβής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Βιολογίας κ. Βαμβακόπουλο Νικόλαο και την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας κα. Κόλλια Παναγούλα τόσο για την επίβλεψη της διατριβής όσο και για τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας κ. Νταλέκο Γεώργιο τόσο για τις συμβουλές του όσο και για την άψογη συνεργασία μας, τον Βιολόγο Δημήτρη Ηλιόπουλο από το Comprehensive Cancer Center του Πανεπιστημίου Ohio State της Αμερικής, με τον οποίο συνεργάστηκα σε ένα τμήμα της συγκεκριμένης διατριβής καθώς και τον Λέκτορα χειρουργικής κ. Δημήτρη Ζαχαρούλη για την συλλογή των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου.

Ευχαριστώ πάρα πολύ όλους τους συναδέλφους Βιολόγους του εργαστηρίου Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά όλα αυτά τα χρόνια και ιδιαίτερα την Ελένη Καρλιγκιώτου, Μαρία Σαμαρά, Παγώνα Οικονόμου, Βασίλη Παπανικολάου, Νίκο Στεφάνου, Χρήστο Χασανίδη, Ιωάννα

Χιώτογλου, Ανδομάχη Βαγενά, Ρούλα Σαμαρά. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον Γιάννη Τσούγκο για τις πολύτιμες συμβουλές και την συμπαράστασή του.

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

Τέλος ευχαριστώ τους συναδέλφους και φίλους του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής και Κυτταρογενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Μαρία Σάτρα

Βιολόγος

Λάρισα, 2006.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Τελομερή

A.1.1. Δομή τελομερών

Τα τελομερή αποτελούν τα φυσικά άκρα των γραμμικών χρωμοσωμάτων και είναι εξειδικευμένες νουκλεοπρωτεϊνικές δομές. Αποτελούνται από μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, καθώς και από πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, τα τελομερή στον άνθρωπο αποτελούνται από τις εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις με το γενικό τύπο (TTAGGG)_n, το μήκος των οποίων κυμαίνεται από 5-10 kb, με τα μακρύτερα τελομερή να εντοπίζονται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17¹.

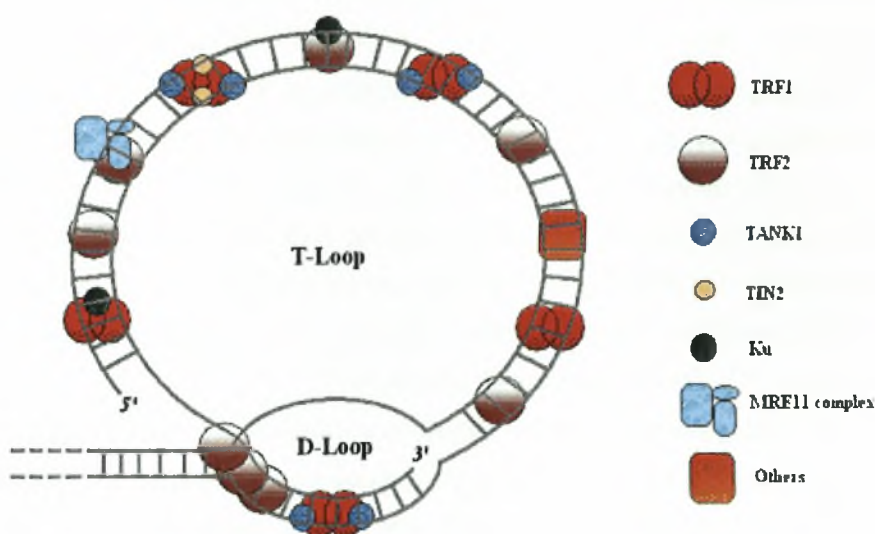
Προχωρώντας από τα τελομερή στο "κυρίως σώμα" του χρωμοσώματος παρατηρείται εκφυλισμός της αλληλουχίας του DNA. Πρόκειται για μια περιοχή του DNA που δεν περιέχει πολλά γονίδια και παρουσιάζει ποικιλομορφία μεταξύ των ατόμων. Συγκεκριμένα, στις υποτελομερικές περιοχές ανιχνεύεται μια σειρά από επαναλαμβανόμενες 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 πολυπλοκότητα. Ο αριθμός των TAS διαφέρει 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^{2,3,4,5}.

Το κύριο χαρακτηριστικό της δομής των τελομερών είναι ο τελομερικός βρόχος (*t-loop*) που σχηματίζεται στο 5' άκρο κάθε χρωμοσωμικού κλώνου. Η προεξοχή αυτή έχει μήκος 150-250 περίπου βάσεων, είναι πλούσια σε γουανίνη (G) και αναδιπλώνεται συναντώντας το δίκλωνο τμήμα του τελομερούς, σχηματίζοντας μία δομή που θυμίζει βρόχο⁶. Έχει προταθεί ότι η αναδίπλωση αυτή λειτουργεί σαν κάλυμμα, προστατεύοντας *in vivo* τα άκρα των τελομερών από τη χρωμοσωμική αστάθεια και τη σύντηξη⁶.

Στην δημιουργία και διατήρηση του τελομερικού βρόγχου σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν διάφορες πρωτεΐνες (εικόνα 1). Υπάρχουν πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο μονόκλωνο άκρο του τελομερούς και άλλες που δεσμεύονται στο εσωτερικό δίκλωνο τμήμα. Η δέσμευσή τους προστατεύει το DNA των τελομερών από χημική τροποποίηση και από τη δράση νουκλεασών^{3,5}. Αναλυτικότερα, μεταξύ των πρωτεϊνών συγκαταλέγονται η TRF2 (*telomeric repeat-binding factor 2*) η οποία προσδένεται στον βρόχο εμποδίζοντας τη χρωμοσωμική σύντηξη και σταθεροποιώντας το άκρο του

τελομερούς, ενώ συνολικά στην αναδίπλωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και η TRF1^{2,4,57,8}. Επίσης, η πρωτεΐνη Pot1 προσδένεται στη μονόκλωνη 3' πλούσια σε G προεξοχή έχοντας πιθανώς προστατευτικό ρόλο.

Οι πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA των τελομερών προσδένουν κι άλλες πρωτεΐνες σχηματίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο ένα ανώτερης διάταξης νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Η πρωτεΐνη Rap1 συμμετέχει στο σύμπλοκο μέσω της αλληλεπίδρασής της με την TRF2, ενώ οι TIN2 και Ku (πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA) αλληλεπιδρούν με τα τελομερή μέσω της πρόσδεσής τους στην TRF1. Τέλος, η τανκυράση, η οποία έχει δράση πολυμεράσης, επάγει την επιμήκυνση των τελομερών εμποδίζοντας την πρόσδεση των TRF1 στο DNA του τελομερούς^{5,7,9}.



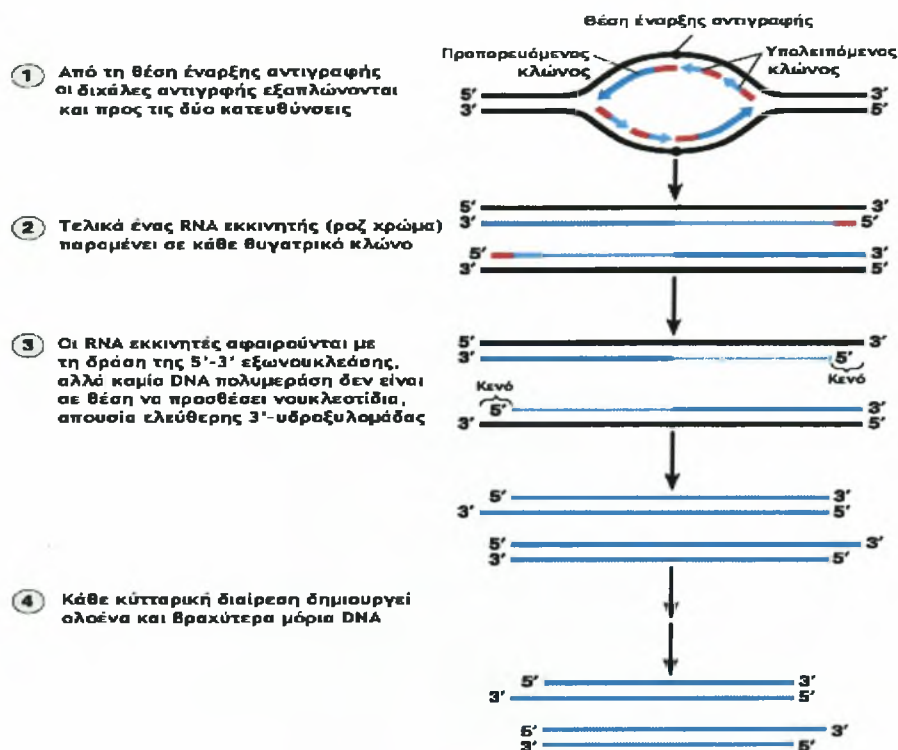
Εικόνα 1: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των στοιχείων του δομικού συμπλόκου DNA-πρωτεϊνών που απαρτίζουν τα τελομερή⁵⁵.

A.1.2 Ρόλος τελομερών

Τα τελομερή επιτελούν ιδιαίτερα σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Προστατεύουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων από τα ένζυμα επιδιόρθωσης. Χωρίς τα τελομερή, τα άκρα των χρωμοσωμάτων θα αναγνωρίζονταν ως κατεστραμμένο DNA και θα επιδιορθώνονταν, γεγονός που θα οδηγούσε σε γενωμική αστάθεια. Επιπλέον, τα τελομερή λειτουργούν σαν ένα μοριακό “κάλυμμα” το οποίο προστατεύει τα χρωμοσώματα από τον ανασυνδυασμό και τη μεταξύ τους σύντηξη, γεγονός που θα οδηγούσε σε ασταθείς μορφές χρωμοσωμάτων. Κύτταρα με ασταθή χρωμοσώματα χάνουν όχι μόνο την ικανότητα διαίρεσής τους, αλλά μπορεί και να οδηγηθούν στο θάνατο με την επαγωγή της απόπτωσης. Επιπρόσθετα, 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 την 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^{2,34,8,10,11,12}.

A.1.3. Πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής (*End-replication problem*)

Η αντιγραφή του DNA ξεκινά από συγκεκριμένες θέσεις του μορίου του και προχωρά ταυτόχρονα και προς τις δυο κατευθύνσεις του. Πραγματοποιείται με μεγάλη ταχύτητα και εξαιρετική ακρίβεια οπότε και απαιτείται σημαντικός αριθμός ενζύμων, μεταξύ των οποίων σημαντικότερη θέση κατέχουν οι DNA πολυμεράσες. Οι DNA πολυμεράσες 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 σε κομμάτια που ονομάζονται κλάσματα Okazaki. Ο RNA εκκινητής του τελευταίου κλάσματος Okazaki στο 5' άκρο του νεοσυντιθέμενου κλώνου δεν μπορεί να συντεθεί (εικόνα 2) και οι DNA πολυμεράσες δεν έχουν την ικανότητα αντιγραφής στην άκρη του γραμμικού χρωμοσωμικού DNA οπότε και δημιουργείται το λεγόμενο «πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής» (*end replication problem*)^{7,13,14}.

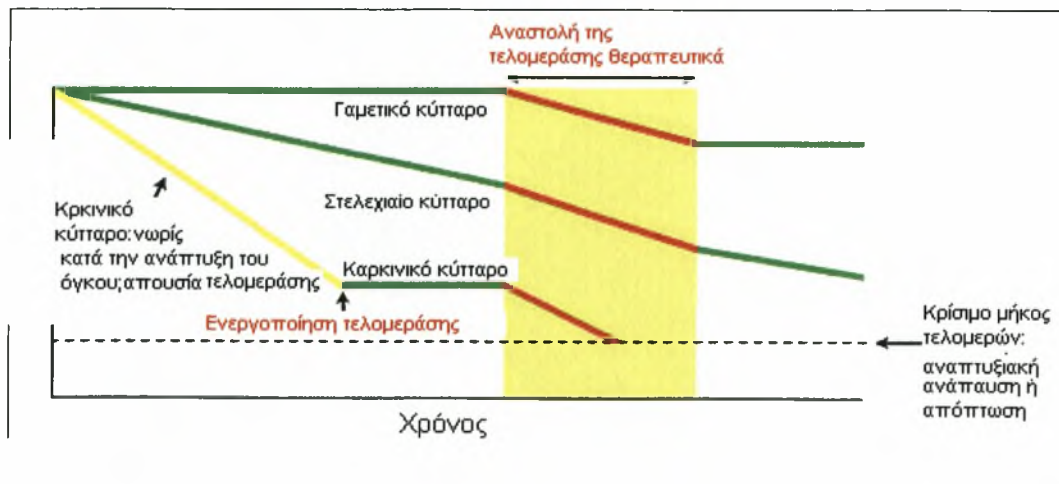


Εικόνα 2: Ο μοριακός μηχανισμός του προβλήματος της ολοκλήρωσης της αντιγραφής¹⁴

A.1.4. Συνέπειες του πρόβληματος ολοκλήρωσης της αντιγραφής

Αποτέλεσμα του προβλήματος ολοκλήρωσης της αντιγραφής είναι, σε κάθε διαίρεση, τα χρωμοσώματα να χάνουν περίπου 20- 200 ζεύγη βάσεων από τα τελομερή τους. Κατ' επέκταση, καθώς το κύτταρο διαιρείται με επιτυχία χάνονται συνεχώς αλληλουχίες τελομερών μέχρι ένα συγκεκριμένο όριο πέραν του οποίου τα χρωμοσώματα αποκτούν κολλώδη άκρα, αναδιατάσσονται και μεταλλάσσονται. Οι αλλαγές που συμβαίνουν στα χρωμοσώματα δεν επιτρέπουν στα κύτταρα να συνεχίσουν με επιτυχία την διαίρεση, με αποτέλεσμα να εισέρχονται σε διαδικασία απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου. Κάθε τύπος κυττάρου έχει, λοιπόν, ένα περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων τις οποίες μπορεί να υποστεί, γνωστό ως όριο Hayflick¹⁵. 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, αλλά παραμένει

μεταβολικά ενεργό. Η κατάσταση αυτή περιγράφει την κυτταρική γήρανση¹⁶. 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 αυτό¹⁷. Στο στάδιο M1 η πλειοψηφία των κυττάρων διαθέτει τελομερή μήκους 5-10kb¹⁸. Η είσοδος των κυττάρων στο στάδιο M1 είναι μία μη αντιστρεπτή διεργασία. Σε ορισμένες 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 διαίρεση¹⁹ 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 σε κυτταρικό θάνατο²⁰. Ελάχιστα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να ξεφύγουν από το στάδιο αυτό μέσω 2 μονοπατιών (διάγραμμα 1). Ένα από αυτά εξαρτάται από τη δράση της τελομεράσης και χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της hTERT^{16,21}. 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 και κάτι ανάλογο συμβαίνει και σε ανθρώπινα κύτταρα²². Τα τελομερή, επομένως, λειτουργούν σαν το ρολόι της ζωής του κυττάρου, εφ' όσον επιτρέπουν στα κύτταρα συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων αποτρέποντας την δημιουργία "αθάνατων" κυττάρων²⁰.



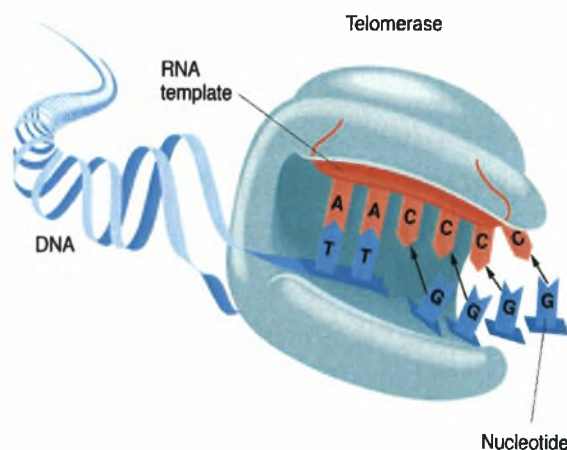
Διάγραμμα 1: Το μήκος των τελομερών σε συνάρτηση με τον χρόνο
(expert reviews in medicine, 2002, cambridge university press)

A.2. Τελομεράση

Για να αποφύγουν την μείωση του μήκους των τελομερών, πολλά ευκαρυωτικά κύτταρα χρησιμοποιούν μια ειδική αντίστροφη μεταγραφάση, την τελομεράση. Η τελομεράση είναι μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία διατηρεί το μήκος των τελομερών παρέχοντας στα κύτταρα τη δυνατότητα για απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων. Τα κύτταρα με δραστική τελομεράση διατηρούν το μήκος των τελομερών τους, ενώ απουσία τελομεράσης τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και οδηγούνται στην κυτταρική γήρανση. Η τελομεράση αντισταθμίζει τη δράση μηχανισμών που μειώνουν το μήκος των τελομερών (end replication problem). Ο κύριος ρόλος της είναι η διατήρηση της σταθερότητας των τελομερών και επομένως της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων^{3,57,8,23,24,25}.

A.2.1. Δομή τελομεράσης

Η τελομεράση (εικόνα 3) αποτελείται από δύο υπομονάδες, την RNA υπομονάδα που ονομάζεται hTR (human Telomerase RNA) και την καταλυτική υπομονάδα hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) που έχει δράση αντίστροφης μεταγραφάσης, ενώ βιοχημικές και γενετικές μελέτες προτείνουν την ύπαρξη πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση συμβάλλοντας στη δημιουργία ενός ενεργού ολοενζύμου.



Εικόνα 3: Απεικόνιση της δομής της τελομεράσης²⁶

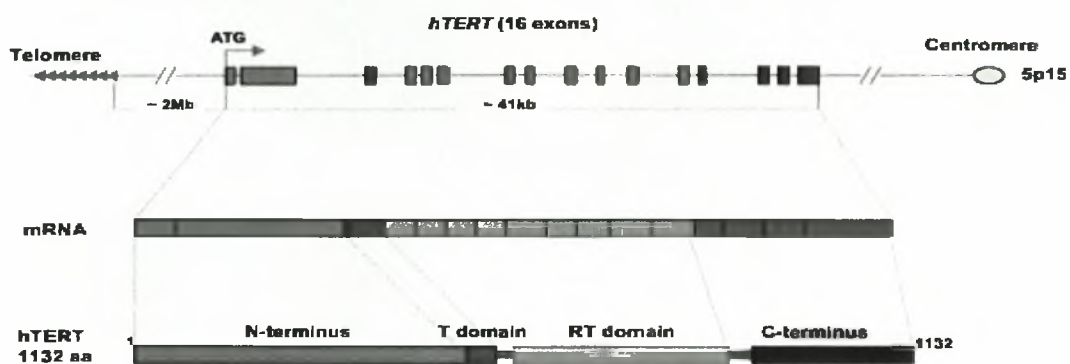
α) RNA υπομονάδα τελομεράσης

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την σύνθεση της RNA υπομονάδας της τελομεράσης (hTR) βρίσκεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 3 (3q26)²⁶. Το hTR συστατικό μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση II και το ώριμο mRNA αποτελείται από 451 νουκλεοτίδια. Το τμήμα του hTR που λειτουργεί ως εκμαγείο για τη 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^{7,24}. Η hTR διαθέτει μία αρκετά σταθερή δευτεροταγή δομή που εμφανίζεται κατά μεγάλο ποσοστό διατηρημένη μεταξύ εξελικτικά απομακρυσμένων οργανισμών²⁷. Επιπλέον, οι συντηρημένες περιοχές στο hTR μόριο αποτελούν θέσεις αναγνώρισης για πρωτεΐνες που προσδένονται στο hTR (hTR binding proteins)⁸²⁵. Αντίθετα με την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης (hTERT), η υπομονάδα hTR παρουσιάζει σταθερή έκφραση σε όλους τους ιστούς, 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^{28,29}.

β) Καταλυτική υπομονάδα τελομεράσης (hTERT)

Το γονίδιο hTERT αποτελείται από 16 εξόνια και 15 ιντρόνια και εδράζεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (5p15.33), περίπου 2Mb από το τελομερές (εικόνα 4). Το γονίδιο hTERT κωδικοποιεί την σύνθεση της πρωτεϊνικής υπομονάδας της τελομεράσης. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 127 kDa που είναι αρκετά συντηρημένη και παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με άλλες ανάστροφες μεταγραφάσες. Αποτελείται από ένα σχετικά μικρό καρβοξυτελικό τμήμα, μία κεντρική, ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή και ένα αρκετά μεγάλο αμινοτελικό άκρο^{30,31}. Πιθανότατα, η κεντρική μαζί με την καρβοξυτελική περιοχή σχηματίζουν χαρακτηριστική δομή στις πολυμεράσες και στις ανάστροφες μεταγραφάσες που περιβάλλει την έλικα του DNA^{32,33}. Στο μεγάλο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης πρόσφατα αναγνωρίσθηκε μία περιοχή, η N-GQ, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο κατά την πρόσδεση του ενζύμου στο 5' άκρο του DNA³⁴. Η περιοχή N-GQ θεωρείται απαραίτητη για τη δράση της hTERT. Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του mRNA που κωδικοποιεί για την hTERT σχετίζεται άμεσα με τη δραστηριότητα της τελομεράσης^{35,36,37}, 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^{5,38}, ενώ επίσης έχει προταθεί ότι η hTERT έχει αντι-αποπτωτική δράση στο κύτταρο^{39,40,41}. 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 hTERT⁴¹. Επιπλέον, η ίδια η hTERT αυξάνει τη σταθερότητα του γενετικού υλικού υποβοηθώντας, αν όχι συμμετέχοντας, στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς⁴². Τέλος, πιθανολογείται ότι σε περιπτώσεις βραχέων τελομερών, ενδεχομένως προκαλείται «απελευθέρωση» του γονιδίου από την επίδραση του τελομερούς, που οδηγεί σε επαγωγή της δράσης της τελομεράσης⁴³.

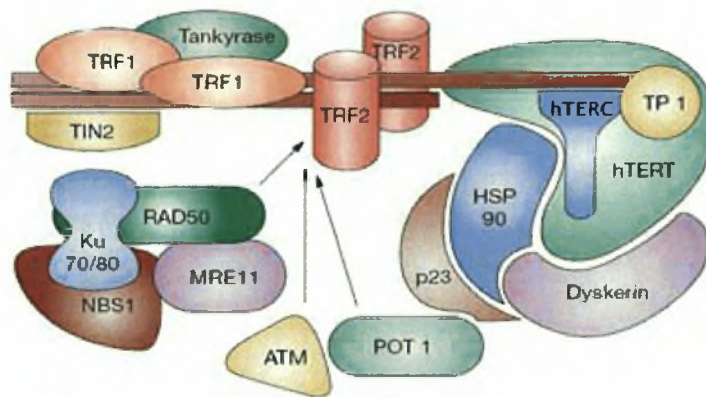


Εικόνα 4: Οργάνωση του hTERT γονιδίου⁸.

γ) Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση

Έχει ήδη αναφερθεί πως για το σχηματισμό και τη διατήρηση του τελομερικού βρόχου, απαιτείται η παρουσία κάποιων πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στην ρύθμιση του μήκους τους καθώς και στην προστασία και επιδιόρθωση του DNA⁴⁴. Επιπλέον, υπάρχουν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση και οι οποίες ενδεχομένως ενέχονται στη δημιουργία δραστικής τελομεράσης ή στην αποτελεσματική πρόσβασή της στο τελομερές^{5,8}. Έχει παρατηρηθεί ότι το σύμπλοκο πρωτεϊνών hsp90 αλληλεπιδρά με την τελομεράση συμβάλλοντας στη δημιουργία ενεργού ολοενζύμου. Οι hsp90 εμπλέκονται στη ρύθμιση της διαμόρφωσης του ολοενζύμου κατά τη μετατόπιση του RNA εκμαγείου της τελομεράσης κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των τελομερών. Επίσης, έχει βρεθεί η πρωτεΐνη TEP1, η οποία αλληλεπιδρά με την τελομεράση άμεσα ή έμμεσα μέσω άλλων πρωτεϊνών και σχετίζεται με τη δραστηριότητα της^{8,23,35,45}.

Εκτός από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την hTERT, έχουν βρεθεί και πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης στο hTR. Οι hGAR, δυσκερίνη, hNOP10, hNHP2, hStau, L22, hnRNP C1/C1, A1, UP1 και La αλληλεπιδρούν με το hTR και εμπλέκονται στη σταθερότητά του, στην ωρίμανση και στη λειτουργικότητα του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου της τελομεράσης. Μερικές από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση φαίνονται στην εικόνα 5^{8,46}.

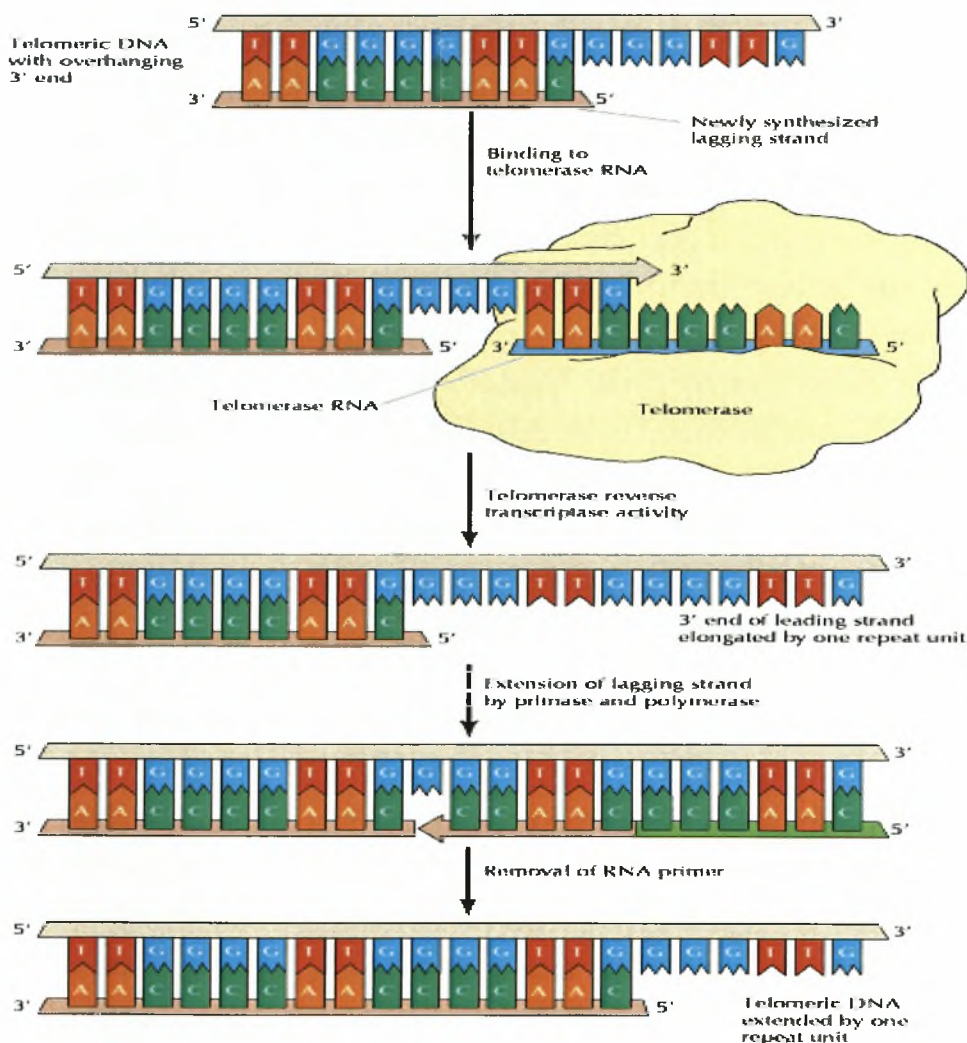


Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στα τελομερή και στην τελομεράση⁴⁷.

A.2.2. Λειτουργία 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^{48,49}. Αναλυτικότερα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 6, 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 την 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 την 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'^{3,710}.



Εικόνα 6: Σύνθεση των τελομερών από την τελομεράση¹⁰

A.2.3. Έκφραση της τελομεράσης

Στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα η δραστικότητα της τελομεράσης ρυθμίζεται αυστηρώς κατά την ανάπτυξη. Η δραστικότητα της τελομεράσης καταστέλλεται κατά την εμβρυϊκή διαφοροποίηση στα περισσότερα σωματικά κύτταρα⁵⁰. Κατ' επέκταση, η τελομεράση δεν εκφράζεται στα περισσότερα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα. Ωστόσο, παρατηρείται έκφραση σε κύτταρα με μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Συγκεκριμένα, εκφράζεται σε ορισμένους τύπους αρχέγονων κυττάρων, όπως για παράδειγμα σε αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα, σε αναπαραγωγικά κύτταρα, σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα (που ήταν τα πρώτα ανθρώπινα φυσιολογικά κύτταρα στα οποία βρέθηκε δραστικότητα τελομεράσης), σε κύτταρα του μυελού των οστών, του ενδομητρίου κ.ά. Επιπλέον, η τελομεράση εκφράζεται στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα. Έχει βρεθεί έκφραση του ενζύμου σε 85-90% των περιπτώσεων καρκίνου^{8,2436,4561,62}. Αναλυτικότερα, όσον αφορά τη δράση της τελομεράσης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την κυτταρική γήρανση, πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η εκδήλωση της ενεργότητας της τελομεράσης δεν είναι ίδια στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές, ενώ επίσης συσχετίζουν την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων με τη δράση της τελομεράσης.

A.2.4. Ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης

Η hTR υπομονάδα της τελομεράσης εκφράζεται σε όλους τους ιστούς ανεξάρτητα από τη δραστικότητα της τελομεράσης^{25,53,54}. Στα καρκινικά κύτταρα η έκφραση του hTR είναι 5 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των φυσιολογικών κυττάρων⁵³, ενώ η RNA υπομονάδα της τελομεράσης εκφράζεται τόσο σε κύτταρα που έχουν δραστικότητα του ενζύμου όσο και σε κύτταρα που δεν έχουν³⁷. Η ενεργοποίηση της τελομεράσης γίνεται με επαγωγή της έκφρασης του hTERT. Έτσι, η έκφραση του hTERT θεωρείται σημείο κλειδί στη ρύθμιση της δραστικότητας της τελομεράσης^{78,23,36,53,54}.

Πρόσφατες μελέτες συνηγορούν υπέρ του ότι το σημαντικότερο σημείο ελέγχου της έκφρασης της τελομεράσης εντοπίζεται κατά τη μεταγραφή του γονιδίου hTERT. Κεντρικό ρόλο στη μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου hTERT κατέχει η ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή⁵⁵.

A.2.4.1 Μεταγραφικοί παράγοντες

A.2.4.1.1 Ενεργοποιητές της τελομεράσης

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που λειτουργούν ως ενεργοποιητές του γονιδίου της τελομεράσης. Μεταξύ αυτών κυριαρχεί η πρωτεΐνη Myc καθώς και ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1. Συγκεκριμένα, υπερέκφραση του γονιδίου c-Myc έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται γρήγορα, καθώς και σε νεοπλασματικά κύτταρα⁵⁶, ενώ υπερέκφραση τόσο του Sp1 όσο και του c-Myc επάγουν από κοινού την έκφραση της hTERT⁴³.

Επιπρόσθετα, οι πυρηνικές ορμόνες στην πλειοψηφία τους είναι θετικοί ρυθμιστές της έκφρασης του γονιδίου της hTERT. Τα οιστρογόνα, συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη και έχουν εντοπιστεί σε διάφορες νεοπλασίες, όπως στον καρκίνο του μαστού⁵⁷. Αντίστοιχα με τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη, τα ανδρογόνα αλλά και οι στερεοειδείς ορμόνες είναι σε θέση να επάγουν τη μεταγραφή της hTERT, αν και ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί^{57,58,59}.

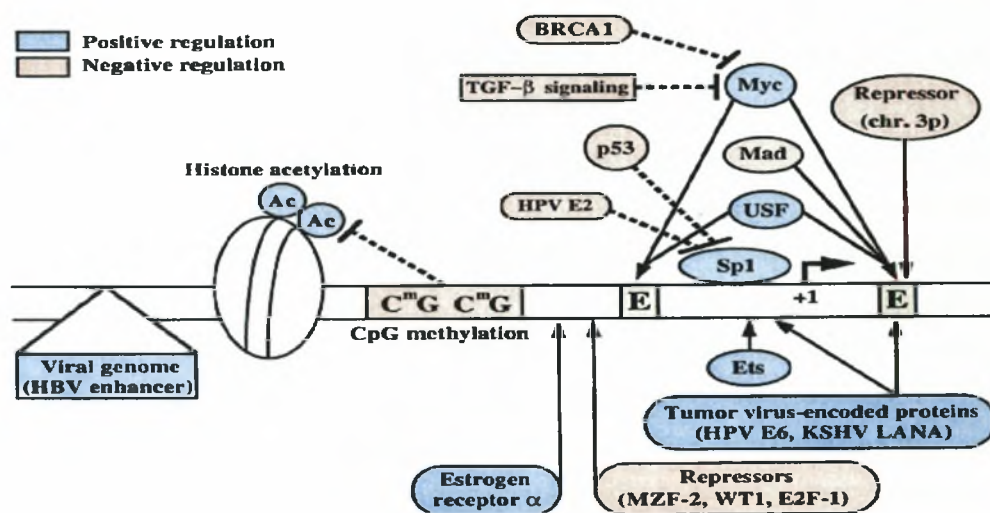
Τέλος, είναι δυνατό να προκληθεί μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της hTERT, μετά από ιϊκή μόλυνση και επακόλουθη ενσωμάτωση του ιϊκού γενετικού υλικού στο DNA του κυττάρου ξενιστή. Τότε η ενσωματωμένη αλληλουχία μπορεί να δράσει ως ενισχυτής για κάποιο γειτονικό γονίδιο. Με αυτόν τον τρόπο έχει παρατηρηθεί ότι δρα ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV) και ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (*Human Papillomavirus*, HPV), προκαλώντας ενεργοποίηση της hTERT σε ηπατοκύτταρα και σε κύτταρα του τραχήλου της μήτρας, αντίστοιχα. Για το λόγο αυτό, οι παραπάνω ιοί αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ΗΚΚ και καρκίνου τραχήλου της μήτρας^{43,60}.

A.2.4.1.2 Αναστολείς της τελομεράσης

Μεταξύ των καταστολέων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης κυριαρχεί η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη BRCA1, η οποία σχετίζεται με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών⁶⁰. Επιπλέον, εκτός των ορμονών που ήδη προαναφέρθηκαν, οι οποίες οδηγούν σε αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων της hTERT, υπάρχουν και ορισμένες που η δράση τους καταλήγει σε αντίθετο αποτέλεσμα. Η βιταμίνη D και το ρετινοϊκό οξύ –καθώς και οι αντίστοιχοι υποδοχείς τους- θεωρούνται ότι ανήκουν στην

κατηγορία αυτή^{62,63}. Ειδικά για την περίπτωση της βιταμίνης D, υπάρχει ειδικό στοιχείο απόκρισης που εντοπίζεται στον υποκινητή του γονιδίου της hTERT.

Επιπρόσθετα, ένας γενικότερος καταστολέας είναι η πρωτεΐνη p53⁶⁴. Παρά το γεγονός, ότι η p53 μπορεί να ελαττώσει τα επίπεδα της hTERT, δεν έχει αποδειχθεί ότι μπορεί άμεσα να προσδεθεί στην περιοχή του υποκινητή⁶⁵. Τέλος, τόσο ο καταστολέας του όγκου του ρετινοβλαστώματος⁶⁶ όσο και κάποιες ιϊκές πρωτεΐνες⁶⁷ έχει βρεθεί πως προκαλούν μείωση της μεταγραφής του hTERT.



Εικόνα 7: Απεικόνιση των σημαντικότερων μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τον υποκινητή της hTERT. Με γαλάζιο χρώμα διακρίνονται οι παράγοντες που προκαλούν αύξηση της έκφρασής της, ενώ με ροζ χρώμα αυτοί που προκαλούν ελάττωση⁴³.

A.2.4.2 Επιγενετικοί μηχανισμοί

Επιγενετικές ονομάζονται οι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων οι οποίες δεν οφείλονται σε αλλαγή της αλληλουχίας των βάσεων των γονιδίων^{68,69}. Οι μηχανισμοί που προκαλούν τις επιγενετικές αλλαγές τροποποιούν την δυνατότητα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA και περιλαμβάνουν:

- α) την μεθυλίωση των κυτοσινών σε CpG περιοχές του DNA^{68,69,70,71}
- β) τροποποιήσεις στο αμινοτελικό άκρο των ιστονών στα νουκλεοσώματα που συνήθως είναι γνωστές ως 'κώδικας ιστόνης'^{72,73}
- γ) την αναδιαμόρφωση του συμπλόκου με SW1/ SNF με ATP εξαρτώμενο τρόπο⁷⁴
- δ) μεταγραφική ή μεταμεταγραφική απενεργοποίηση των γονιδίων μέσω ρυθμιστικών μη κωδικοποιουσών μορίων microRNA⁷⁵

Διαταραχές και τροποποιήσεις ενός ή συνδυασμού των ανωτέρω επιγενετικών μηχανισμών έχουν καταγραφεί σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου^{76,77} και αφορούν σε αλλαγές στην μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την απόπτωση. Αυτές οι διαταραχές μπορεί να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων, απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και αστάθεια χρωμοσωμάτων.

A.2.4.2.α Μεθυλίωση:

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί τον καλύτερα μελετημένο επιγενετικό μηχανισμό. Είναι ένας μηχανισμός που προέκυψε σχετικά αργά κατά την εξελικτική διαδικασία και ενέχεται στην σταθερή και μακράς διάρκειας απενεργοποίηση γονιδίων⁷⁸. Η μεθυλίωση συμβαίνει 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 γονδίωμα και έχουν μήκος που κυμαίνεται από 0.5-5 Kbp⁷⁹. Υπολογίζεται ότι το 60% των ανθρώπινων γονιδίων περιέχουν ένα CpG νησίδιο⁸⁰.

Η μεθυλίωση του DNA περιλαμβάνει μια βιοχημική τροποποίηση κατά την οποία μετά από αλληλεπίδραση τριών τουλάχιστον DNMTs, DNMT1, DNMT3A και DNMT3B ενζύμων της οικογένειας των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B)

προσθίθεται μια μεθυλομάδα (s-αδενοσυλ-μεθειονίνη) στο 5' άνθρακα της κυτοσίνης που βρίσκεται σε αλληλουχίες CpG^{82,83}. Η απαλοιφή αυτών των ενζύμων σε διαγονιδιακά (knock-out) ποντίκια, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική ανάπτυξη του οργανισμού^{84,85}.

Μοτίβα 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 την γονιμοποίηση, όπου κάθε γαμέτης έχει διαφορετικό μοτίβο μεθυλίωσης και καταλήγει να μεταβιβάζεται στο ζυγώτη 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 διαφοροποίηση⁸¹.

Η μεθυλίωση του DNA έχει σχετισθεί στενά με την καρκινογένεση, εφόσον τα καρκινικά κύτταρα γενικά χαρακτηρίζονται από ελάττωση της μεθυλίωσης αλλά και επιλεκτική υπερμεθυλίωση σε νησίδες CpG των υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων^{68,69,70,71}. Σε ανθρώπινους όγκους έχουν ανιχνευθεί και οι τρεις μεθυλοτρανσφεράσες σε μέτρια επίπεδα^{87,88,89,90}. Ουσιαστικά η μεθυλίωση οδηγεί σε μεταγραφική απενεργοποίηση καταστέλλοντας την έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων οδηγώντας στην καρκινογένεση, ενώ η υπομεθυλίωση των CpG νησίδων των υποκινητών ενός γονιδίου ενισχύει την έκφραση ογκογονιδίων^{86,91}.

A.2.4.2.β Επιγενετική απορρύθμιση της έκφρασης μέσω μετατροπών στο οκταμερές των πυρηνικών ιστονών στα νουκλεοσώματα⁷²⁷³

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 τη μεταβολή της δομής των νουλεοσωμάτων μέσω της επίδρασης συμπλόκων που έχουν δράση ΑΤΡάσης και ενεργοποιούν τα νουκλεοσώματα προκαλώντας μικρή μετακίνηση αυτών πάνω στο DNA. Ο δεύτερος αφορά τη ομοιοπολική μετατροπή των πυρηνικών ιστονών, ενώ ο τρίτος αναφέρετε στην αντικατάσταση των πυρηνικών ιστονών με άλλες ιστόνες που έχουν παρόμοια δομή με τις πυρηνικές (variant histones) π.χ H2AZ, H2AX και H3.3.

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 ακετυλίωση/αποακετυλίωση των λυσίνων και θρεονίνων, ουβικουϊτιλίωση των λυσίνων και ADP-ριβοζυλίωση των γλουταμικών οξέων. 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 την μεταγραφική ενεργότητα, η μεθυλίωση τους, αντίθετα, μπορεί να συσχετιστεί τόσο με την ενεργοποίηση όσο και με την καταστολή της έκφρασης γονιδίων. 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 τη σχέση της ρύθμισης με την ενεργότητα της πολυμεράσης.

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 λυσίνων 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.

A.2.4.2.γ Επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου μέσω αναδιαμόρφωσης του συμπλόκου SWI/SNF74.

Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μέσω ενός ATP εξαρτώμενου μονοπατιού διεξάγεται μέσω των μελών μιας οικογένειας πρωτεϊνών που περιέχουν ένα καταλυτικό κέντρο με δράση ATPάσης. 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 SWI2/SNF2, ISW1-ATPάσες και Mi2/CHD. Το σύμπλοκο SWI2/SNF2 αλληλεπιδρά με άλλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που σχετίζονται με την ογκογένεση. Τα είδη των ιστονών πιθανότατα να παίζουν σημαντικό ρόλο σε επγενετικούς ογκοκατασταλτικούς μηχανισμούς. Ενώ οι κανονικές ιστόνες επανατοποθετούνται μόνο στη φάση S, τα είδη των ιστονών επανατοποθετούνται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η μέλετη του ρόλου των παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και των διαφόρων ειδών των ιστονών στην κυτταρική διαφοροποίηση και κατά συνέπεια στη θεραπεία του καρκίνου.

A.2.4.2.δ Επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου μέσω μικρών ρυθμιστικών συμπληρωματικών μη νοσηματικών μορίων RNA75.

Έχει παρατηρηθεί ότι ο ρόλος των μη νοσηματικών μορίων RNA στη δομική δυναμική της χρωματίνης και στην καταστολή της γονιδικής έκφρασης είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Σχετίζονται με την απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος, με την πρόσδεση της HP1 στην χρωματίνη και πρόσφατα με την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου α-σφαιρίνης. Ένας μεγάλος αριθμός από μικρά ρυθμιστικά RNA (microRNAs) έχουν ταυτοποιηθεί, τα οποία είναι πιθανό να παίζουν ρόλο στην βιολογία ενός μετασχηματισμένου κυττάρου. Συχνά εντοπίζονται σε γνωστές εύθραστες περιοχές και σημεία που σχετίζονται με τον καρκίνο. Η καταστολή των γονιδίων έχει βρεθεί επίσης ότι 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. Πρόσφατες ανακοινώσεις τονίζουν τη χρήση του για θεραπευτικούς σκοπούς.

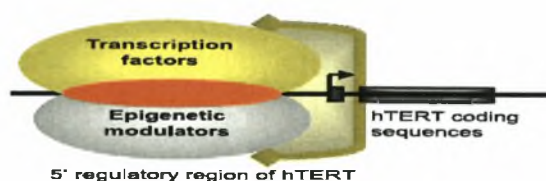
A.2.5 Τελομεράση και μεθυλίωση:

Η παρουσία μεγάλου αριθμού νησίδων CpG εντός του υποκινητή του γονιδίου της hTERT, οδήγησε στην υπόθεση ότι διαδικασίες μεθυλίωσης του DNA είναι πιθανό να μετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης. Γενικά, η μεθυλίωση του υποκινητή δεν επιτρέπει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων και εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου. Ο τρόπος με τον οποίο η μεθυλίωση επηρεάζει την έκφραση του hTERT αποτελεί αντικείμενο έρευνας των τελευταίων ετών και δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί ακόμη.

Αναλυτικότερα, ορισμένες έρευνες έχουν δείξει ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή της hTERT οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης^{92,93}, ενώ κάποιες άλλες μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η έκφραση της hTERT δεν σχετίζεται με τον βαθμό μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου^{94,95}.

Αντίθετα, 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), παρατηρήθηκε ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή της hTERT υπομονάδας αυξάνει και την έκφρασή της^{96,97,98,99,100,101}.

Από τις εργασίες που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί γίνεται φανερό ότι η επίδραση της μεθυλίωσης στην έκφραση του hTERT εξαρτάται τόσο από τον κυτταρικό τύπο όσο και από την παράλληλη παρουσία και δράση μεταγραφικών παραγόντων ή άλλων επιγενετικών μηχανισμών (εικόνα 8)¹⁰², ενώ θα πρέπει να τονιστεί ότι μέχρι σήμερα όσον αφορά σε βιοψίες ήπατος ασθενών με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες όσο και σε ΗΚΚ δεν έχει γίνει μελέτη του ποσοστού της μεθυλίωσης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT).



Εικόνα 8. 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 κύτταρο¹⁰².

A.3 Περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα και τελομεράση

Τα περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα (ΠΜΚ) περιλαμβάνουν κυρίως τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα φυσικά κύτταρα φονιάδες. Αποτελούν τα κύτταρα που διαδραματίζουν τον ουσιαστικότερο ρόλο στους μηχανισμούς άμυνας, εφόσον έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν το αντιγόνο και να προσπαθούν να το αδρανοποιήσουν. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η τελομεράση εκφράζεται σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους φυσιολογικών ιστών μεταξύ των οποίων είναι και τα ΠΜΚ.

Συγκεκριμένα, η τελομεράση εμφανίζει χαμηλή δραστικότητα στα λεμφοκύτταρα, τα οποία, ωστόσο, παρουσιάζουν μείωση του μήκους των τελομερών τους κατά τη γήρανση *in vivo* και με τις κυτταρικές διαιρέσεις *in vitro*^{52,103,104}. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι το μήκος των τελομερών των λεμφοκυττάρων σχετίζεται τόσο με τον αριθμό των μέχρι τώρα διαιρέσεών τους, όσο και με τον ικανό αριθμό των μελλοντικών διαιρέσεών τους. Το μήκος των τελομερών στα περιφερικά Τ λεμφοκύτταρα μειώνεται κατά τη διαφοροποίησή τους από ανώριμα Τ λεμφοκύτταρα σε Τ κύτταρα μνήμης^{105,106,107}. Αντίθετα, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στο μήκος των τελομερών μεταξύ ανώριμων Β λεμφοκυττάρων και Β κυττάρων μνήμης. Μετά από *in vitro* ενεργοποίηση και οι δύο υποπληθυσμοί κυττάρων επάγουν δραστικότητα τελομεράσης στα ίδια περίπου επίπεδα^{106,107,108}.

Μελέτες έδειξαν ότι η τελομεράση εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα λεμφοκύτταρα του θύμου, σε ενδιάμεσα επίπεδα στα λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στις αμυγδαλές και σε πολύ χαμηλά, αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα στα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος^{103,106}. Ωστόσο, τα περιφερικά λεμφοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα να επάγουν παροδικά την έκφραση της τελομεράσης με έναν ιδιαίτερα ρυθμιζόμενο τρόπο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, διαφοροποίησης και ενεργοποίησής τους. Κατά συνέπεια, η έκφραση της τελομεράσης στα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα είναι αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη και επάγεται μετά από ενεργοποίηση^{23,103,104,106,107,109}.

Η επαγωγή της έκφρασης της τελομεράσης συμβαίνει για την προστασία των τελομερών τους και τη διατήρηση του μήκους τους κατά τις κυτταρικές τους διαιρέσεις. Η ρύθμιση της ικανότητας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι ιδιαίτερης σημασίας για το ανοσοποιητικό σύστημα. Η προστασία των τελομερών κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να διατηρηθεί αυτή η ικανότητα διαίρεσης και διαφοροποίησης κατά την κλωνική επέκταση των λεμφοκυττάρων. Γι' αυτό, η τελομεράση ενδεχομένως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λεμφοκυτταρική ανάπτυξη, στην κλωνική επέκταση, στη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων και επομένως στην ανοσολογική απόκριση.

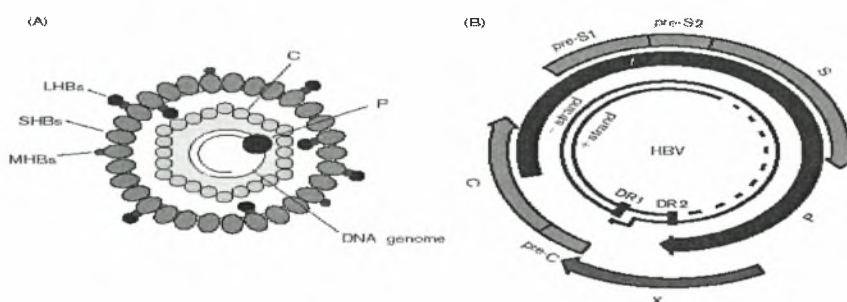
Εάν το ανοσοποιητικό σύστημα επηρεάζεται από το μήκος των τελομερών και, κατ' επέκταση από την τελομεράση, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη¹⁰⁸. Αντιθέτως, αν η έκφραση της τελομεράσης είναι μη ανιχνεύσιμη, παρατηρείται εκτεταμένη μείωση των τελομερών. Η μειωμένη δραστικότητα της τελομεράσης στα λεμφοκύτταρα έχει συσχετιστεί με ανοσοκαταστολή και έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς μολυσμένους με τον ιό που προκαλεί το σύνδρομο της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV), αλλά και σε ασθενείς με ηπατίτιδα Β^{109,110}.

A.4 Ηπατοπάθειες και τελομεράση

Το ΗΚΚ αποτελεί έναν από τους πιο συνήθεις κακοήθεις όγκους παγκοσμίως. Η συχνότητα εμφάνισης του ΗΚΚ είναι λιγότερο από 1 στα 10.000 άτομα στην Β. Αμερική και Δ. Ευρώπη και περίπου 10 στα 10.000 άτομα στην Αφρική και στην Ασία, όπου και ευθύνεται για μεγάλο ποσοστό θανάτων¹¹⁸.

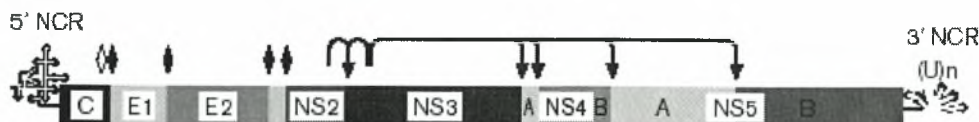
Τα ΗΚΚ είναι μορφολογικά, μικροσκοπικά και γενετικά ετερογενή, γεγονός που πιθανώς αντικατοπτρίζει την ετερογένεια των παραγόντων που ενέχονται στην δημιουργία τους. Ενώ η μοριακή βάση της ηπατοκαρκινογένεσης είναι ελάχιστα κατανοητή, μεταξύ των κυριότερων αιτιών πρόκλησης του ΗΚΚ θεωρείται χρόνια λοίμωξη από τους ιούς ηπατίτιδας Β, C και D, ενώ η αλκοολική ηπατοπάθεια καθώς και μεταβολικές ασθένειες του ήπατος αποτελούν σπανιότερα αίτια^{119,120,121,122,123,124,125,126,127,128}.

Ο HBV ανήκει στην οικογένεια των *Hepadnaviridae*. Αποτελείται από ένα εν μέρει δίκλωνο και εν μέρει μονόκλωνο κυκλικό μόριο DNA μεγέθους 3,2kb, το οποίο περιβάλλεται από έναν φάκελο (εικόνα 9). Το πλήρες σωματίδιο του HBV είναι σχεδόν σφαιρικό με διάμετρο 42nm και είναι γνωστό ως σωματίδιο του Dane¹²⁹.



Εικόνα 9: Δομή και οργάνωση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV)¹²⁹.

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV: hepatitis C virus) ανήκει στην οικογένεια των *Flaviviridae*. Είναι ένας RNA ιός διαμέτρου 30-60nm με περίβλημα πλούσιο σε λιπίδια. Το γονιδιώμά του αποτελείται από ένα 9,6 kb ευθύγραμμο μονόκλωνο μόριο RNA (εικόνα 10) θετικής κατεύθυνσης, το οποίο λειτουργεί και ως αγγελιοφόρο RNA. Ο ιός διαθέτει νουκλεοκαψίδιο, το οποίο περιβάλλεται από φάκελο, που προέρχεται από τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή^{129,130}.



Εικόνα 10: Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας C (HCV)¹³⁰.

Οι βλάβες που προκαλούνται στο ήπαρ από τον HBV και HCV οδηγούν σε χρόνια ηπατίτιδα σε σημαντικό ποσοστό ασθενών που ήλθαν σε επαφή με τους ιούς αυτούς με τελικό αποτέλεσμα τον αυξημένο ρυθμό αναγέννησης, την χρόνια φλεγμονή και την προοδευτική καταστροφή του ηπατικού παρεγχύματος. Κατά συνέπεια, ο κυριότερος παράγοντας πρόκλησης του ΗΚΚ είναι οι χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες, αφού το 70-90% των ατόμων που θα αναπτύξουν κίρρωση λόγω των χρόνιων ιογενών λοιμώξεων από τον HBV ή τον HCV και τελικά πιθανόν να αναπτύξουν τελικά ΗΚΚ^{131,132,133,134,135,136,138,139}. Θεωρείται ότι οι χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες προσφέρουν τόσο το μιτογόνο όσο και το μεταλλαξογόνο περιβάλλον το οποίο είναι σε θέση να προκαλέσει την τροποποίηση του γενετικού υλικού των ηπατοκυττάρων. Μεταξύ των μηχανισμών που ενέχονται στην τροποποίηση του γενετικού υλικού των ηπατοκυττάρων συγκαταλέγονται η ενεργοποίηση καθώς και η απενεργοποίηση διάφορων γονιδίων.

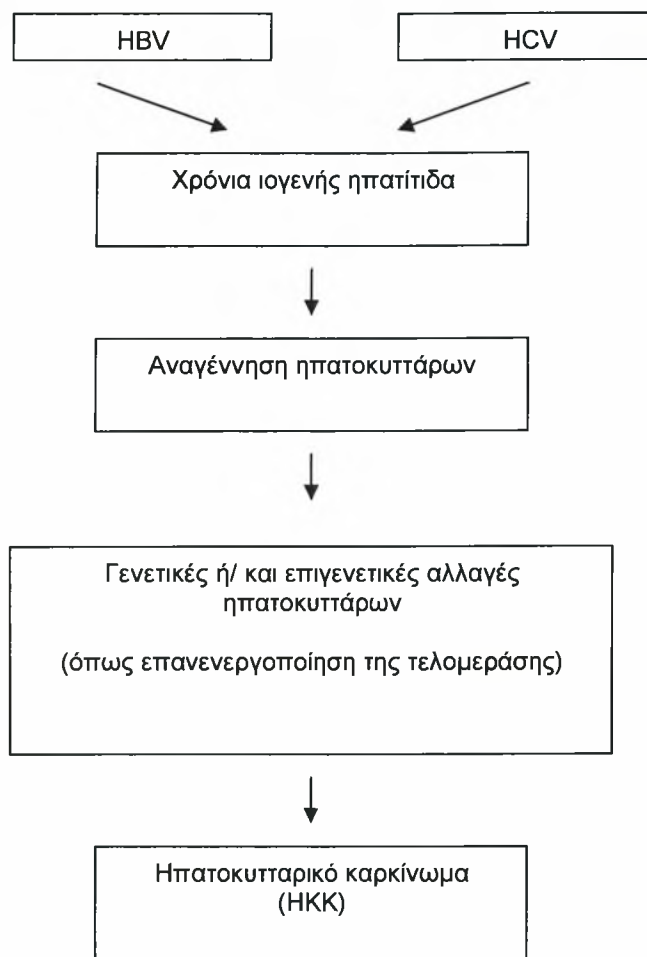
Σε πρόσφατη μελέτη πραγματοποιήθηκε η μοριακή ανάλυση των γονιδίων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη ΗΚΚ¹⁴⁰. Πιο συγκεκριμένα, έγινε προσπάθεια να εντοπιστούν ποιοι μοριακοί δείκτες θα ήταν ικανοποιητικοί για την πληρέστερη πρόβλεψη και διάγνωση του ΗΚΚ και γενικότερα των ηπατοπαθειών. Για το σκοπό αυτό οι Paradis και οι συνεργάτες της πραγματοποίησαν ποσοτικοποίηση της έκφρασης 200 γονιδίων σε υγιείς βιοψίες ήπατος, αλλά και σε βιοψίες ήπατος από ΗΚΚ ή ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα. Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των γονιδίων ήταν η ρύθμιση της έκφρασής τους στο μεταγραφικό επίπεδο και η συμμετοχή τους στις βασικότερες μεταβολικές οδούς της ηπατοκαρκινογένεσης^{141,142,143,144}. Από τα 200 γονίδια που μετρήθηκαν αρχικά, στη συνέχεια επιλέχθηκαν 44 γονίδια στα οποία παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της έκφρασης μεταξύ καρκινικών και μη καρκινικών δειγμάτων ήπατος. Τέλος, εξετάστηκε κατά πόσο το καθένα από τα 44 αυτά γονίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ακρίβεια για την διάγνωση των ηπατοπαθειών, οπότε και τελικά επιλέχθηκαν 13 γονίδια (πίνακας 1) τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή του «μοριακού προφίλ» των ασθενών με ΗΚΚ. Μεταξύ των γονιδίων αυτών είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την σύνθεση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT), το οποίο μάλιστα είναι το μόνο γονίδιο από τα 13 το οποίο δεν εκφράζεται σε υγιές ήπαρ¹⁴⁰.

Πίνακας 1: Τα 13 γονίδια που επιλέχθηκαν για την κατασκευή του μοριακού προφίλ των ασθενών με ηπατοπάθειες¹⁴⁰.

ΓΟΝΙΔΙΑ	ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
TERT	Telomerase reverse transcriptase	Reverse transcriptase
IGF2	Insulin-like growth factor 2	Growth factor
Connexin 26/GJB2	Connexin 26	Gap junction molecule
Tie2/TEK Tie2/TEK	tyrosine kinase	Tyrosine kinase receptor
TIAM1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	GDP-GTP exchange factor
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Chemokine
TOP2A	Topoisomerase (DNA) II	DNA topoisomerase
A2M	2-macroglobulin	Protease inhibitor
PLG	Plasminogen	Proenzyme
p14ARF/CDKN2A	Alternative reading frame p14	Cell cycle control
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor	Tyrosine kinase receptor
MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody ki-67	Cell proliferation
THBS1	Thrombospondin 1	Cell adhesion molecule

Επανενεργοποίηση της τελομεράσης έχει αναφερθεί σε διάφορες περιπτώσεις ηπατοπαθειών. Αναλυτικότερα, δραστικότητα της τελομεράσης και έκφραση του γονιδίου hTERT έχει παρατηρηθεί στο 90% σχεδόν των βιοψιών ασθενών με ΗΚΚ^{145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159}. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι 5-30% των ηπατικών ιστών από ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες εμφανίζουν χαμηλή αλλά σημαντική δραστικότητα τελομεράσης καθώς και έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας hTERT^{145,146,147,148,149,150,161,163,164,165,166,167}. Όσον αφορά στα επίπεδα του hTERT mRNA σε ηπατικό ιστό ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα μέχρι σήμερα η πλειοψηφία των μελετών με χρήση ημιποσοτικών μεθόδων έχει δείξει ότι το 5-31% αυτών εμφάνιζε δραστικότητα τελομεράσης^{147,148,149,151,161,164,168,169}, ενώ θα πρέπει να τονιστεί ότι τα φυσιολογικά ηπατοκύτταρα δεν παρουσιάζουν παρόμοια δραστικότητα. Συνοπτικά, θα μπορούσε να ειπωθεί, όπως απεικονίζεται και στο διάγραμμα 2, ότι η ηπατοκαρκινογένεση είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία που αφορά στη συσσώρευση ποικίλων γενετικών αλλαγών, όπως άλλωστε συμβαίνει και στους περισσότερους τύπους καρκίνου.

Επομένως, ένα πιθανό μοντέλο ηπατοκαρκινογένεσης θα μπορούσε να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:



Διάγραμμα 2: Δυνητική διαδικασία δημιουργίας ηπατοκυτταρικού καρκινώματος

A.5. Σκοπός της διατριβής

Στη συγκεκριμένη διατριβή μελετήθηκε η έκφραση της hTERT και πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της έκφρασης της hTERT σε ηπατοκύτταρα και σε ΠΜΚ τριών ομάδων ασθενών αλλά και διερεύνηση του μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασης της τελομεράσης στα ηπατοκύτταρα. Αναλυτικότερα, στόχος της διατριβής είναι να απαντηθούν τα ακόλουθα ερωτήματα:

- I) είναι η τελομεράση κατάλληλος μοριακός δείκτης τόσο για την πληρέστερη διάγνωση/ πρόγνωση της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας όσο και για τη διάγνωση/ πρόγνωση του ΗΚΚ;
- II) πώς ρυθμίζεται η έκφραση της τελομεράσης στο ήπαρ στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες και στο ΗΚΚ;

Για την διαλεύκανση των παραπάνω υποθέσεων πραγματοποιήθηκε τόσο σε μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος όσο και σε βιοψίες ήπατος:

- 1) η μέτρηση της δραστηριότητας της τελομεράσης,
- 2) η ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας hTERT,
- 3) η συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας της τελομεράσης και της έκφρασης της υπομονάδας hTERT
- 4) η διερεύνηση επιγενετικών μηχανισμών που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου hTERT
- 5) η συσχέτιση όλων των ευρημάτων με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους των ασθενών

Όλα τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν σε 3 ομάδες ασθενών:

- 1) Σε άτομα που δεν εμφάνιζαν καμία ηπατοπάθεια και αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου («υγιείς», στους οποίους η βιοψία ήπατος γινόταν διεγχειρητικά κατά την διενέργεια άλλων απλών επεμβάσεων, π.χ. χολοκυστεκτομή)
- 2) Σε ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες Β και C
- 3) Σε ασθενείς με ΗΚΚ

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1 Υλικό και Μέθοδοι

B.1.1 Ομάδα μελέτης

Η μελέτη της έκφρασης της hTERT υπομονάδας σε περιφερικά λεμφοκύτταρα και σε βιοψίες ήπατος ασθενών με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες B και C και ΗΚΚ πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 139 ασθενείς. Αναλυτικότερα:

Ια. Μελέτη στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (ΠΜΚ)

Η μελέτη της έκφρασης της υπομονάδας hTERT στα ΠΜΚ πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 63 άτομα. Από αυτά:

-41 έπασχαν από χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες B και C και ήταν υπό παρακολούθηση στην ηπατολογική μονάδα της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Από το σύνολο των ασθενών, 17 είχαν μολυνθεί από τον HBV και 24 είχαν μολυνθεί από τον HCV. Η ομάδα ασθενών με HBV λοίμωξη περιελάμβανε 9 άνδρες και 8 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας 53.2 έτη, ενώ η ομάδα ασθενών με HCV λοίμωξη περιελάμβανε 8 άνδρες και 16 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας 47.5 έτη. Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε λάβει αντιιική θεραπεία για τουλάχιστον 12 μήνες πριν την είσοδο στη μελέτη. Η μέση τυπική απόκλιση της διάρκειας της ασθένειας στους HBV ασθενείς ήταν 91 ± 70.8 μήνες, ενώ για στους HCV ασθενείς ήταν 39.5 ± 29.5 μήνες. Κανείς από τους ασθενείς δεν είχε κλινική, εργαστηριακή ή ακτινολογική ένδειξη ΗΚΚ κατά την διάρκεια παρακολούθησης.

-την ομάδα ελέγχου την οποία αποτέλεσαν 22 υγιή άτομα. Αναλυτικότερα, η ομάδα αυτή περιελάμβανε 7 άνδρες και 15 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας 45.9 έτη, με φυσιολογικά επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT, 26.5 ± 5.3 U/l), χωρίς ιστορικό HBV, HCV ή HIV λοίμωξης, αλκοολικής, αυτοάνοσης ή προκαλούμενης από φάρμακα ηπατοπάθειας, όπως αποδείχθηκε με τον κλινικοεργαστηριακό έλεγχο καθώς και μετά από την χρήση των εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών (anti-HCV, Murex Diagnostics, Temple Hill, Dartford, UK και anti-HIV, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Γερμανία).

Ιβ. Μελέτη σε ιστούς ήπατος

Η μελέτη της δραστηριότητας της τελομεράσης και της έκφρασης της υπομονάδας hTERT σε ιστούς ήπατος πραγματοποιήθηκε συνολικά σε βιοψίες ήπατος από 76 ασθενείς. Αναλυτικότερα, η μελέτη περιελάμβανε 3 ομάδες:

-32 ασθενείς (18 άνδρες, 14 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας 51.7 έτη) με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες Β και C εκ των οποίων οι 19 έπασχαν από χρόνια ηπατίτιδα Β και οι 13 από ηπατίτιδα C. Οι ασθενείς αυτοί ήταν υπό παρακολούθηση στην Ηπατολογική μονάδα της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η μέση τυπική απόκλιση της διάρκειας της ασθένειας στους HBV ασθενείς ήταν $93 \pm 74,9$ μήνες, ενώ για τους HCV ασθενείς ήταν $41.5 \pm 32,5$ μήνες. Κανείς από τους ασθενείς δεν είχε κλινική, εργαστηριακή ή ακτινολογική ένδειξη ΗΚΚ κατά την διάρκεια παρακολούθησης.

- την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 17 ασθενείς χωρίς ηπατοπάθεια (8 άνδρες, 9 γυναίκες, μέσος όρος ηλικίας 55.3 έτη) στους οποίους πραγματοποιήθηκε βιοψία ήπατος κατά την διάρκεια απλών χειρουργικών επεμβάσεων (π.χ. χολοκυστεκτομή).

-27 ασθενείς έπασχαν από ΗΚΚ (16 άνδρες, 11 γυναίκες, μέσος όρος ηλικίας 59.8 έτη) που διαγνώστηκε στο Comprehensive Cancer Center, The Ohio State University, στις ΗΠΑ. Η λήψη της βιοψίας ήπατος στους ασθενείς αυτούς πραγματοποιήθηκε στην διάρκεια χειρουργικής επέμβασης για τον ΗΚΚ και ενώ εμφάνιζαν επαρκή λειτουργία του ήπατος.

ΙΙ. Διάγνωση χρόνιας λοίμωξης από HBV

Η διάγνωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HBV βασίστηκε σε κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά ευρήματα σύμφωνα με διεθνή κριτήρια¹⁷⁰. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 ομάδες: χρόνιους ανενεργούς φορείς, ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και ασθενείς με κίρρωση του ήπατος εξαιτίας της χρόνιας λοίμωξης από τον HBV. Αναλυτικότερα:

Οι ασθενείς που χαρακτηρίστηκαν ως χρόνιοι ανενεργοί φορείς (n=11) HBV παρουσίαζαν:

- α) θετικό το αντιγόνο επιφανείας του HBV (HBsAg, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Γερμανία) περισσότερο των 6 μηνών
- β) φυσιολογικά επίπεδα αμινοτρανσφερασών για διάστημα πέραν των 5 ετών και

γ) χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα HBV-DNA στον ορό ($<10^5$ αντίγραφα/ml), γεγονός που αποδεικνύει την έλλειψη ιϊκού πολλαπλασιασμού. Ο προσδιορισμός του επιπέδου του HBV-DNA πραγματοποιήθηκε με την τεχνική PCR και με εμπορικά διαθέσιμη δοκιμασία. (Cobas Amplicor HBV Monitor, Roche, cut off: 200 αντίγραφα/ml).

Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (n=13) παρουσίαζαν:

- α) ορολογικά ευρήματα χρόνιας λοίμωξης από τον HBV για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη (HBsAg θετικό, αντί-HBc θετικό, αντί-HBe θετικό). Ο προσδιορισμός των ορολογικών παραμέτρων του HBV πραγματοποιήθηκε με τυποποιημένη μικροσωματιδιακή ELISA (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Γερμανία)
- β) ενεργό ιϊκό πολλαπλασιασμό, όπως τεκμηριώθηκε με την ανίχνευση υψηλών επιπέδων HBV-DNA στον ορό των ασθενών ($>10^5$ αντίγραφα/ml)
- γ) αυξημένα επίπεδα ALT (τουλάχιστον 2 φορές πάνω από τις ανώτερες φυσιολογικές τιμές) για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη και
- δ) ιστολογικές αλλοιώσεις χρόνιας ηπατίτιδας Β χωρίς ενδείξεις κίρρωσης κατά την εκτίμηση βιοψιών ήπατος.

Οι ασθενείς με κίρρωση εξαιτίας χρόνιας λοίμωξης από τον HBV (n=12) παρουσίαζαν:

- α) ορολογικά ευρήματα χρόνιας λοίμωξης από τον HBV για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη, όπως περιγράφηκε παραπάνω.
- β) ενεργό ιϊκό πολλαπλασιασμό, όπως τεκμηριώθηκε με την ανίχνευση υψηλών επιπέδων HBV-DNA στον ορό των ασθενών (>200 αντίγραφα/ml)
- γ) αυξημένα επίπεδα ALT (τουλάχιστον 2 φορές πάνω από τις ανώτερες φυσιολογικές τιμές) για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη και
- δ) ιστολογικά τεκμηριωμένη παρουσία κίρρωσης του ήπατος

III. Διάγνωση χρόνιας λοίμωξης από τον HCV

Η διάγνωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV βασίστηκε σε κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά ευρήματα, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες¹⁷¹. Όλοι οι ασθενείς με HCV που μελετήθηκαν παρουσίαζαν:

- α) ορολογικά ευρήματα χρόνιας λοίμωξης από τον HCV όπως προέκυψε από την ανίχνευση αντισωμάτων anti-HCV χρησιμοποιώντας μικροσωματιδιακή

ELISA. Η εξέταση ήταν τουλάχιστον δύο φορές θετική μέσα σε έξι μήνες πριν από την είσοδο των ασθενών στη μελέτη,

β) ενεργό ιϊκό πολλαπλασιασμό όπως τεκμηριώθηκε με την ανίχνευση HCV RNA, με χρήση μιας προτυποποιημένης και εμπορικά διαθέσιμης RT-PCR (HCV Monitoring Cobas Amplicor, Roche, cut off: 50 U/ml).

IV. Διάγνωση για ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ):

Τα κριτήρια διάγνωσης για το ΗΚΚ βασίστηκαν στις θέσεις ομοφωνίας του EASL συνεδρίου¹⁷². Η ιστολογική διάγνωση έγινε με βάση το σύστημα κατάταξης AJCC (American Joint Committee of Cancer)¹⁷³. Από τα 13 δείγματα των ασθενών που εμφάνισαν ΗΚΚ, τα 9 χαρακτηρίστηκαν ως πλήρως διαφοροποιημένα (στάδιο 1), εκ των οποίων τα 8 η ανάπτυξη ΗΚΚ οφειλόταν σε HCV σχετιζόμενη κίρρωση ενώ στο 1 η ανάπτυξη ΗΚΚ οφειλόταν σε HBV σχετιζόμενη κίρρωση. Τα υπόλοιπα 4 δείγματα των ασθενών που εμφάνισαν ΗΚΚ, χαρακτηρίστηκαν ως μετρίως διαφοροποιημένα (στάδιο 2) και η ανάπτυξη ΗΚΚ οφειλόταν σε HCV σχετιζόμενη κίρρωση

B.1.2. Απομόνωση κυττάρων

B.1.2.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα (ΠΜΚ)

Από το κάθε άτομο έγινε λήψη 6 ml περιφερικού αίματος το οποίο τοποθετήθηκε σε σωληνάριο που περιείχε EDTA ως αντιπηκτικό. Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα σωληνάρια και ρύγχη, τα οποία είχαν επεξεργαστεί με διάλυμα DEPC, το οποίο καταστρέφει τις RNAσες, ενώ όλη η επεξεργασία του δείγματος πραγματοποιήθηκε στους 4°C.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα έγινε μετά από διαχωρισμό με φυγοκέντρηση με βαθμίδωση φικόλης. Αναλυτικότερα μετά την λήψη του αίματος ακολούθησε αραίωση του αίματος με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος PBS. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επιστοίβαξη του αραιωμένου αίματος σε σωληνάριο των 15ml στο οποίο είχαν προστεθεί 3ml φικόλης και ακλούθησε φυγοκέντρηση για 15min στις 1900rpm στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση στο σωληνάριο δημιουργούνται τρεις φάσεις: η ανώτερη φάση περιλαμβάνει το πλάσμα, η μεσαία φάση περιλαμβάνει τα μονοπύρηννα κύτταρα (μεσόφαση) και η κατώτερη φάση περιλαμβάνει ερυθρά αιμοσφαίρια.

Στη συνέχεια έγινε μεταφορά της μεσόφασης σε νέο σωληνάριο των 15 ml, προσθήκη 10 ml PBS και φυγοκέντρηση για 15min στις 1900rpm στους 4°C. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 10ml PBS και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15min στις 1900rpm στους 4°C. Το ίζημα που σχηματίστηκε περιείχε τα μονοπύρηννα κύτταρα, ενώ ακολουθούσε μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με την χρήση της πλάκας Neubauer και της χρωστικής Trypan blue.

B.1.2.2 Βιοψίες ήπατος

Οι ιστοί ήπατος των ασθενών με χρόνιες ηπατίτιδες B και C ελήφθησαν κατά την διάρκεια βιοψίας ήπατος με την χρήση λεπτής βελόνας και αμέσως γινόταν η μεταφορά τους στους -80°C μέχρι την χρησιμοποίησή τους.

Οι ιστοί ήπατος των ασθενών με ΗΚΚ ελήφθησαν κατά την διάρκεια χειρουργικής επέμβασης, αμέσως τεμαχίστηκαν σε μικρότερα κομμάτια και μεταφέρθηκαν στους -80°C μέχρι την χρησιμοποίησή τους.

B.1.3 Απομόνωση 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 ddH₂O και κάθε δείγμα αποθηκεύεται στους -80°C.

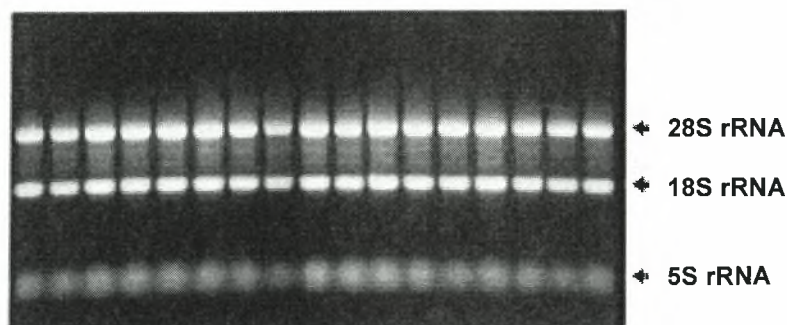
VI. Φωτομέτρηση-Έλεγχος ποσότητας

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 = αραίωση x OD₂₆₀ x 40 (mgr/ml)

VII. Ηλεκτροφόρηση-Έλεγχος ποιότητας

Για να ελεγχθεί η ποιότητα του RNA πραγματοποιήθηκε σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Δείγματα RNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%

B.1.4 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε με 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 πηκτή σιλικόνης η οποία δεσμεύει εκλεκτικά νουκλεϊκά οξέα, ενώ είναι διαπερατή από πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα που μπορεί να αναστείλουν την πολυμεράση κατά την αντίδραση PCR. Έτσι δεν είναι αναγκαία η οργανική εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων με την κλασική μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου.

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 5×10^6 λεμφοκύτταρα 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 errendorff 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 errendorff (1,5 ml) και προσθήκη στην στήλη 100μl AE buffer. Φυγοκέντρηση (6000g, 1min).
9. Η στήλη απομακρύνεται. Το σωληνάριο errendorff περιέχει το DNA και φυλάσσεται για ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση με ηλεκτροφόρηση.

B.1.5 Πρωτόκολλο πολλαπλασιασμού των τελομερικών επαναλήψεων (TRAP)

Το πρωτόκολλο TRAP θεωρείται ευαίσθητη και ειδική PCR που βασίζεται στην ενζυμική δραστηριότητα. Πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την δοκιμασία TeloTAGGG telomerase PCR ELISA^{PLUS} (Roche, Indianapolis, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρωτόκολλο TRAP δείχνει πολύ μεγάλη ευαισθησία ανιχνεύοντας ένα κύτταρο θετικό για την τελομεράση ανάμεσα σε 10000 κύτταρα αρνητικά για την τελομεράση. 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 το χαρακτηριστικό τελομερικό δείκτη-κλίμακα (ladder) 6 bp.

B.1.6 Ποσοτικοποίηση

I. 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 $MgCl_2$ 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 μηχανήμα 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 Cycler

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 στην 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 μέσον μεταφοράς θερμότητας, για την 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 την 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 την 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.

IV. Πρωτόκολλα PCR πραγματικού χρόνου

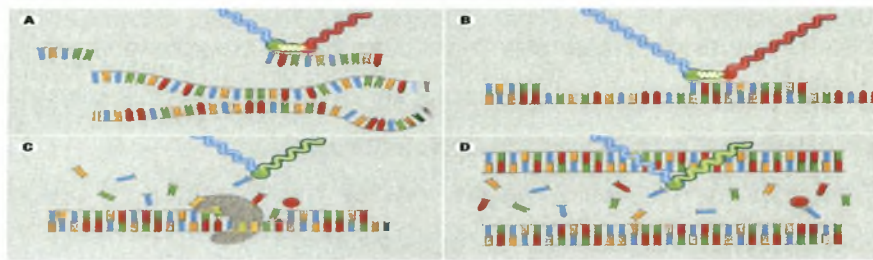
Οι εφαρμογές της RQ-PCR πραγματικού χρόνου είναι πολυάριθμες. Περιλαμβάνουν μελέτες για την έκφραση του mRNA, μετρήσεις αριθμού αντιγράφων σε γενωμικό ή ιϊκό DNA, μετρήσεις αριθμού διαγονιδιακών αντιγράφων, ποσοτικοποίηση χιμαιρικών μεταγράφων για την ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου σε ασθενείς με κακοήθειες, ανάλυση της έκφρασης των κυτταροκινών και πολλών άλλων παραγόντων¹⁷⁴. 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 ν' 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 μ' 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 12). 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^{175,176,177}.

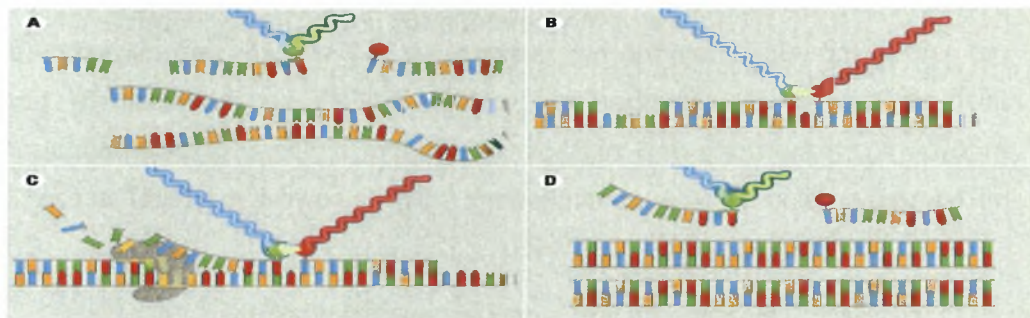


Εικόνα 12: Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υδρόλυσης.

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 13). 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 την συσκευή κατά το στάδιο υβριδοποίησης και στο πρώτο μέρος του σταδίου επιμήκυνσης της PCR^{175,177}. Η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Κατά την 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» ποσοτικοποίηση¹⁷⁸.



Εικόνα 13: Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υβριδισμού

V. 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 την 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 (εικόνα 14). 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 αναφοράς¹⁷⁹. 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 την 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 την 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 την σύνθεση δύο ειδών mRNA, τα οποία εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς από το ίδιο γονίδιο. Ένα μετάγραφο mRNA εκφράζεται μόνο στην ερυθροποιητικά κύτταρα και κωδικοποιεί την σύνθεση ενός ενζύμου που συμμετέχει στο βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης της αίμης. Το μετάγραφο του γονιδίου αναφοράς, που χρησιμοποιήθηκε στην 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 hTERT¹⁸⁰. 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 στην μελέτη έχουν συμπεριληφθεί μόνο τα δείγματα στα οποία ενισχύθηκε επιτυχώς το γονίδιο PBGD.

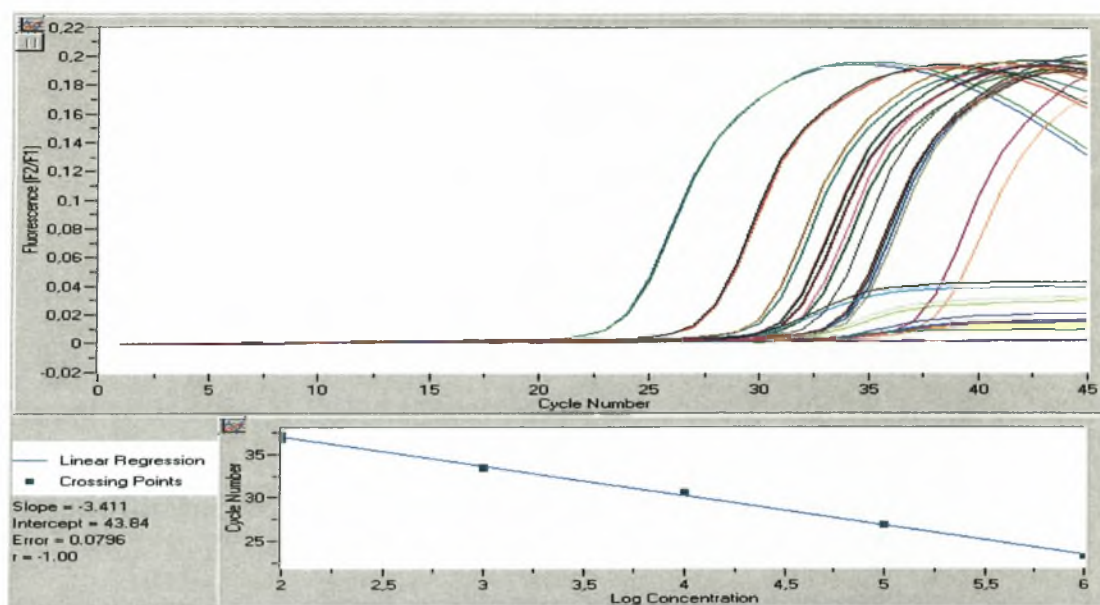
Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για το γονίδιο PBGD περιέχει:

- 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 κύκλους 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 PCR¹⁸¹. Τελικά η τιμή που προκύπτει από τον 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.



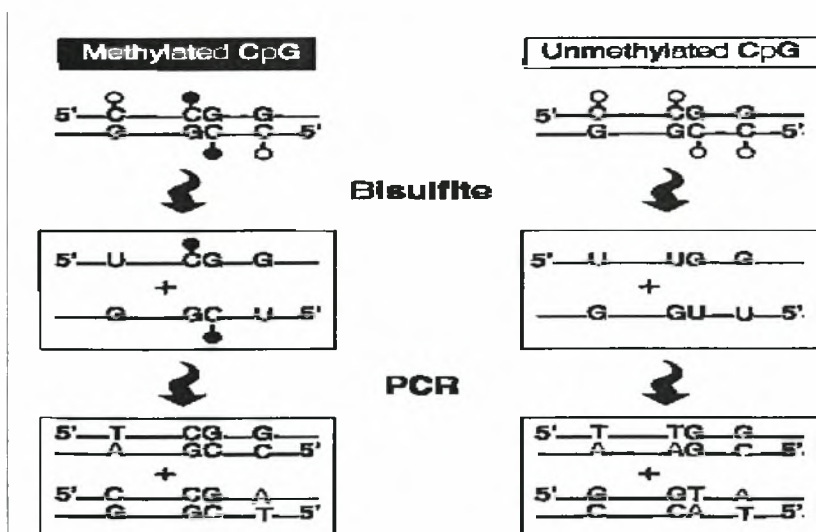
Εικόνα 14: Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού στο μηχανήμα LightCycler (Roche). Πάνω μέρος της εικόνας: η κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε διαφορετικό δείγμα και η θέση της αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση των mRNA μεταγράφων στο συγκεκριμένο δείγμα. Κάτω μέρος της εικόνας: η πρότυπη καμπύλη (standard curve).

VI. Εύρεση του ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου *hTERT*.

Έγινε επεξεργασία του DNA με άλατα θειικού νατρίου σε αλκαλικό περιβάλλον¹⁸². 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 υδροκουνίνης 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).
- Έκλουση 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 με στόχο την βελτίωση της κατακρήμνισης.
- Τοποθέτηση στους -20°C για 12-16 ώρες
- Φυγοκέντρηση στους 4°C για μισή ώρα και αφαίρεση υπερκλειμένου
- Επαναδιάλυση του ιζήματος με προσθήκη 20 µl δις απεσταγμένου H₂O

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 15 η παραπάνω διαδικασία έχει το εξής αποτέλεσμα: όπου υπάρχει μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη αυτή να 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).



Εικόνα 15: Επεξεργασία του γονιδιώματος με άλατα θειώδους νατρίου¹⁸².

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. Στην 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:

5'-GCGTCGGAGGTTAAGGTTGTT-3' (forward primer),
5'-CTCTCCAAAATTACCGTACGCG-3' (reverse primer),
5'-6FAM-AACTCGCTCGCCCGCCGAA-BHQ-1-3' (probe)

β) Ακτίνη:

TGGTGATGGAGGAGTTTAGTAAGT (forward),
AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA (reverse),

6FAM-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-TAMRA (probe)

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 την 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 B.1.6-ενότητα IV). Κατά την 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^{183,184}.

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 μεγαλύτερο 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 ποιες 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 περιβάλλον¹⁸².

B.2. Αποτελέσματα

B.2.1. Ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα.

Υπολογίστηκαν τα επίπεδα του hTERT mRNA σε ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες και έγινε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα ομάδας υγιών απόμων. Οι τιμές των επιπέδων hTERT παρατίθενται στον πίνακα 2 και παρουσίασαν αξιοσημείωτες διαφορές ανάμεσα στις τρεις κατηγορίες απόμων που μελετήθηκαν (ασθενείς HBV, ασθενείς HCV και υγείς, ANOVA, $p < 0.05$).

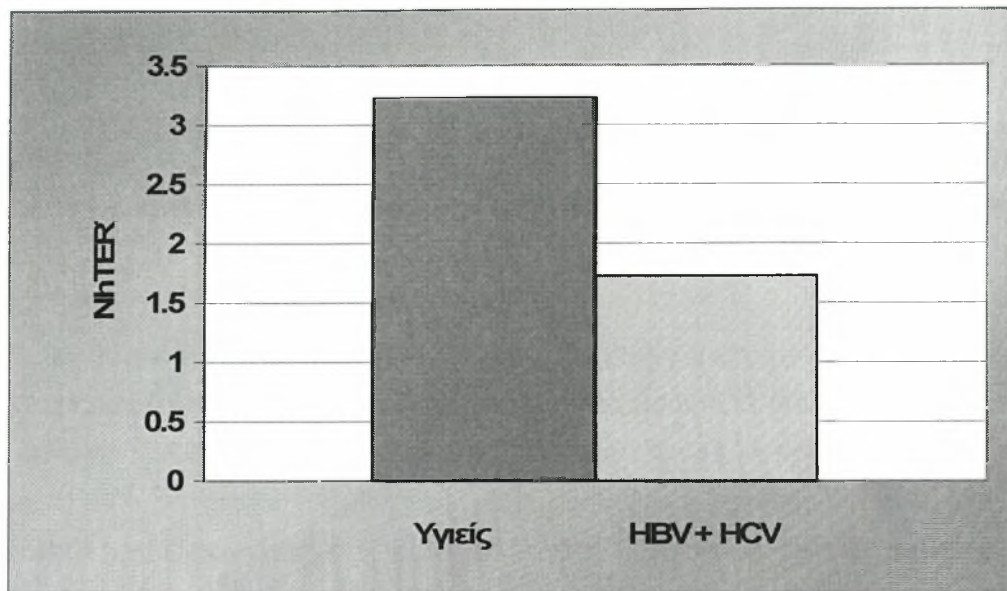
Πιο συγκεκριμένα, μετά από post-hoc ανάλυση με το Fisher PLSD τεστ παρατηρήθηκαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα hTERT mRNA στους ασθενείς με χρόνια HBV ($1.86 \pm 2,1 \times 10^{-2}$) και HCV ($1,91 \pm 1,7 \times 10^{-2}$) λοίμωξη σε σχέση με τους υγείς ($3,22 \pm 2,2 \times 10^{-2}$), ($p < 0.05$ και για τις δύο συγκρίσεις, διάγραμμα 2). Οι τιμές δε διέφεραν μεταξύ του hTERT mRNA των ασθενών με χρόνια HBV και χρόνια HCV λοίμωξη. Οι μέσες τιμές των hTERT mRNA στα περιφερικά λεμφοκύτταρα ήταν ανεξάρτητες από την κλινική κατάσταση των ασθενών (ανενεργής φορεία, χρόνια ηπατίτιδα B και C και κίρρωση σχετιζόμενη με HBV ή HCV λοίμωξη) (ANOVA, $p > 0.05$) (διάγραμμα 3). Επιπρόσθετα, η έκφραση των hTERT mRNA ήταν ανεξάρτητη από την ηλικία, το φύλο, τη διάρκεια της ασθένειας και τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών όταν οι ασθενείς εξετάστηκαν ως σύνολο ($n=41$, Spearman rank correlation, $p=NS$). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και όταν έγινε συσχέτιση των τιμών hTERT με την ηλικία, το φύλο, τη διάρκεια της ασθένειας και τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών όταν οι υπολογισμοί έγιναν διαχωρίζοντας τους ασθενείς σύμφωνα με τον τύπο της ιογενούς λοίμωξης (Spearman rank correlation, $p=NS$).

Όταν οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με την κλινική κατάσταση σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα ($n=15$) και κίρρωση του ήπατος ($n=8$) δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των τιμών hTERT με την ηλικία, το φύλο, τη διάρκεια της νόσου και τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών. Όμως, στην κατηγορία της ανενεργούς φορείας ($n=18$) παρατηρήθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές hTERT και στη διάρκεια της ασθένειας ($r_s = -0.52$, $p < 0.03$).

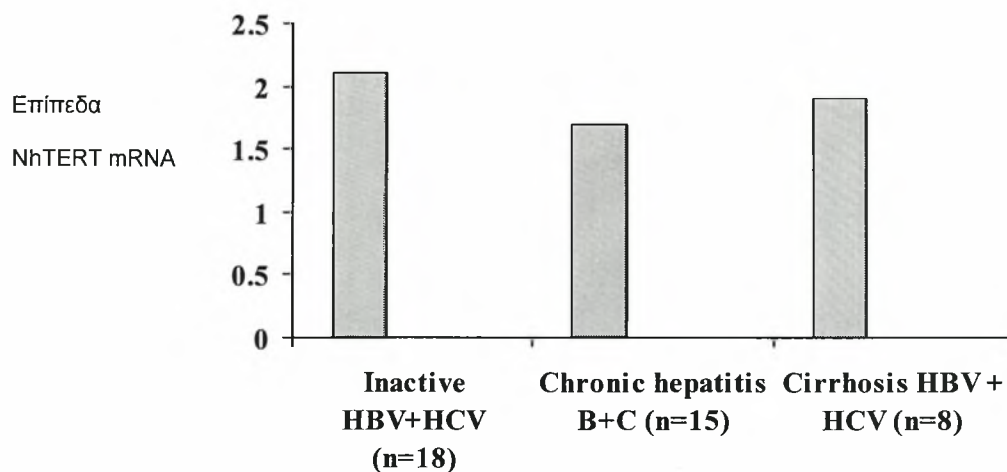
Επίσης, δε βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στα ήκκα φορτία από τον HBV και τον HCV, όπως αποδείχθηκε από τα επίπεδα HBV-DNA και HCV-RNA αντίστοιχα, και την έκφραση του hTERT mRNA.

Ομάδα ελέγχου (υγιείς) (n=22) NhTERT (copies/200 ngr)	Χρόνια HBV λοίμωξη (n=17) NhTERT (copies/200 ngr)	Χρόνια HCV λοίμωξη (n=24) NhTERT (copies/200 ngr)
2.978 X 10 ⁻²	0.272 X 10 ⁻²	1.147 X 10 ⁻²
2.453 X 10 ⁻²	1.219 X 10 ⁻²	0.986 X 10 ⁻²
1.555 X 10 ⁻²	0.846 X 10 ⁻²	2.344 X 10 ⁻²
3.815 X 10 ⁻²	1.354 X 10 ⁻²	1.084 X 10 ⁻²
1.897 X 10 ⁻²	6.120 X 10 ⁻²	2.330 X 10 ⁻²
4.635 X 10 ⁻²	1.540 X 10 ⁻²	0.541 X 10 ⁻²
0.224 X 10 ⁻²	3.548 X 10 ⁻²	0.909 X 10 ⁻²
0.767 X 10 ⁻²	1.501 X 10 ⁻²	6.995 X 10 ⁻²
4.835 X 10 ⁻²	0.465 X 10 ⁻²	1.226 X 10 ⁻²
5.097 X 10 ⁻²	1.149 X 10 ⁻²	1.128 X 10 ⁻²
1.609 X 10 ⁻²	1.189 X 10 ⁻²	1.938 X 10 ⁻²
4.966 X 10 ⁻²	0.424 X 10 ⁻²	3.402 X 10 ⁻²
4.768 X 10 ⁻²	1.520 X 10 ⁻²	1.022 X 10 ⁻²
3.997 X 10 ⁻²	1.989 X 10 ⁻²	2.041 X 10 ⁻²
1.178 X 10 ⁻²	0.92 X10 ⁻²	0.981 X 10 ⁻²
9.735 X 10 ⁻²	0.657 X10 ⁻²	0.931 X 10 ⁻²
5.755 X 10 ⁻²	0.062 X10 ⁻²	1.389 X 10 ⁻²
3.340 X 10 ⁻²		3.563 X 10 ⁻²
1.020 X 10 ⁻²		2.136 X 10 ⁻²
2.622 X 10 ⁻²		0.340 X 10 ⁻²
2.486 X 10 ⁻²		0.301 X 10 ⁻²
1.097 X 10 ⁻²		5.667 X 10 ⁻²
		3.32 X 10 ⁻²
		0.210 X 10 ⁻²

Πίνακας 2: Μέσες τιμές hTERT ($\times 10^{-2}$) (αντίγραφα /200 ngr) σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με λοίμωξη από τον HBV και HCV αλλά και σε υγιείς.



Διάγραμμα 2: Ο λόγος των mRNA αντιγράφων του γονιδίου hTERT και του γονιδίου PBGD στους υγιείς και στα άτομα που πάσχουν από χρόνια λοίμωξη από τον HBV και HCV.



Ασθενείς ανάλογα με την κλινική τους κατάσταση

Διάγραμμα 3: Μέσες τιμές hTERT ($\times 10^{-2}$) (αντίγραφα /200 ngr) σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών σύμφωνα με την κλινική τους κατάσταση

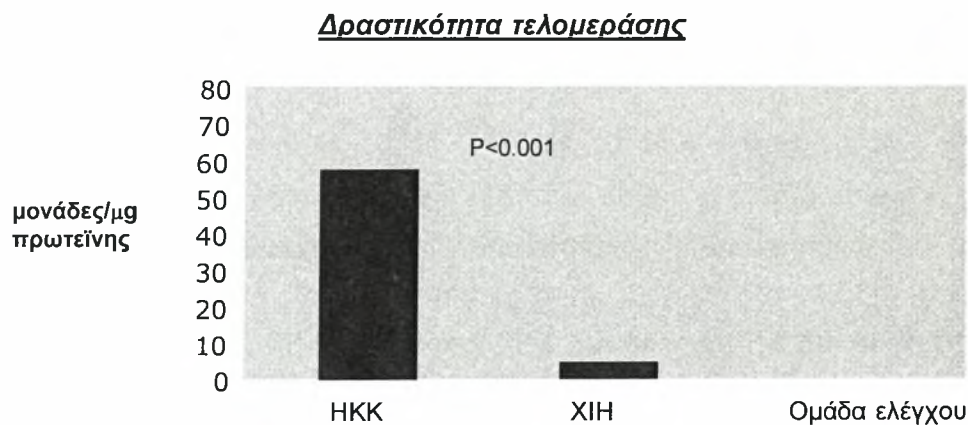
Β.2.2. Μέτρηση της δραστικότητας της τελομεράσης και ποσοτικοποίηση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) σε βιοψίες ήπατος.

Σε όλα τα δείγματα (27/27 ή 100%) με ΗΚΚ βρέθηκε υψηλή δραστικότητα της τελομεράσης, ενώ αντίστοιχα χαμηλή δραστικότητα τελομεράσης εμφάνισαν μόνο 5 από τα 32 δείγματα (15.6%; $p<0.001$) με χρόνια ηπατίτιδα Β ή C. Αντίθετα, σε όλα τα δείγματα (17/17 ή 100%) των ατόμων που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου η δραστικότητα της τελομεράσης ήταν μηδενική ($p<0.001$). Αναλυτικότερα, ο μέσος όρος της δραστικότητας της τελομεράσης στα δείγματα με ΗΚΚ ήταν σημαντικά υψηλότερος (57.01 ± 13.61 μονάδες/ μg πρωτεΐνης) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων με χρόνια ηπατίτιδα (4.12 ± 2.12 μονάδες/ μg πρωτεΐνης, $p<0.001$) αλλά και με τις τιμές της ομάδας ελέγχου ($p<0.001$) (διάγραμμα 4). Οι τιμές της δραστικότητας της τελομεράσης για κάθε θετικό δείγμα αναπαριστώνται στον πίνακα 3.

δείγμα	Δραστικότητα τελομεράσης (μονάδες/ μg πρωτεΐνης)	Επίπεδα NhTERT mRNA	δείγμα	Δραστικότητα τελομεράσης (μονάδες/ μg πρωτεΐνης)	Επίπεδα NhTERT mRNA
ΗΚΚ 1	19.9	3.50897289	ΗΚΚ 17	110.2	19.32356113
ΗΚΚ 2	18.2	3.025803311	ΗΚΚ 18	22.5	4.52343534
ΗΚΚ 3	20.5	3.51598859	ΗΚΚ 19	47.2	8.22342434
ΗΚΚ 4	12.1	1.936433196	ΗΚΚ 20	19.5	3.12342352
ΗΚΚ 5	21.1	2.729047371	ΗΚΚ 21	10.2	1.65234233
ΗΚΚ 6	57.7	9.314516129	ΗΚΚ 22	37.9	6.32342532
ΗΚΚ 7	38.3	6.342592593	ΗΚΚ 23	94.1	15.6234234
ΗΚΚ 8	64.1	9.977777778	ΗΚΚ 24	76.2	12.9234533
ΗΚΚ 9	137.1	23.28556263	ΗΚΚ 25	106.5	18.2234244
ΗΚΚ 10	64.2	9.970287224	ΗΚΚ 26	25.1	5.22344421
ΗΚΚ 11	94.8	15.53962264	ΗΚΚ 27	23.1	4.91234324
ΗΚΚ 12	76.2	12.65079365	ΧΙΗ 1	17.9	2.537732462
ΗΚΚ 13	86.1	14.08633697	ΧΙΗ 2	9.3	1.483049991
ΗΚΚ 14	65.3	10.34125467	ΧΙΗ 3	3.8	0.609111605
ΗΚΚ 15	45.2	8.12345235	ΧΙΗ 4	7.9	1.364202696
ΗΚΚ 16	54.2	9.52341345	ΧΙΗ 5	4.1	0.650081714

Πίνακας 3:

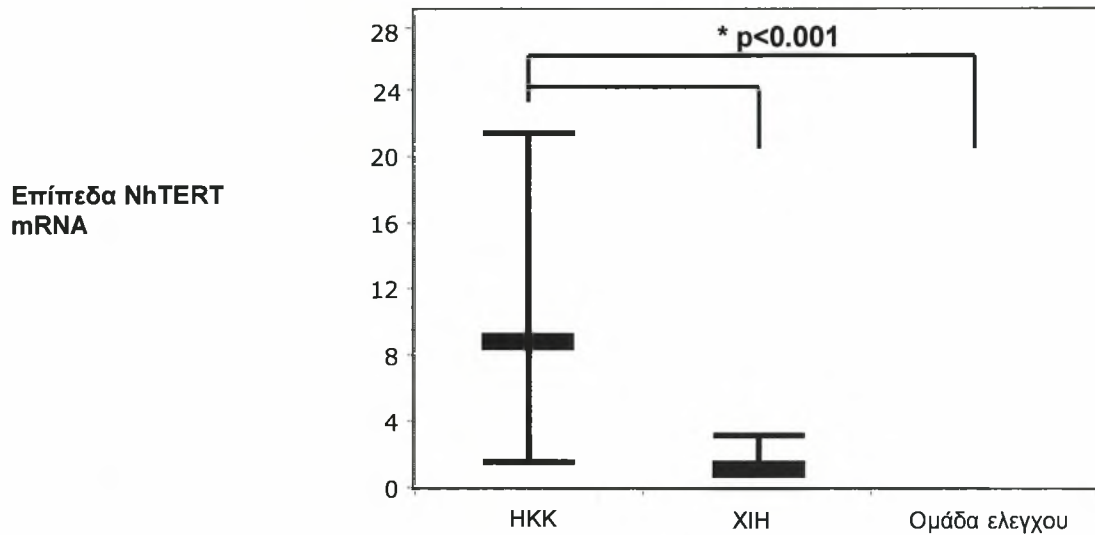
Τιμές της δραστικότητας της τελομεράσης και των επιπέδων του hTERT mRNA σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) και χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (ΧΙΗ).



Διάγραμμα 4: Μέσος όρος της δραστικότητας της τελομεράσης σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ), με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (ΧΙΗ) και στην ομάδα ελέγχου.

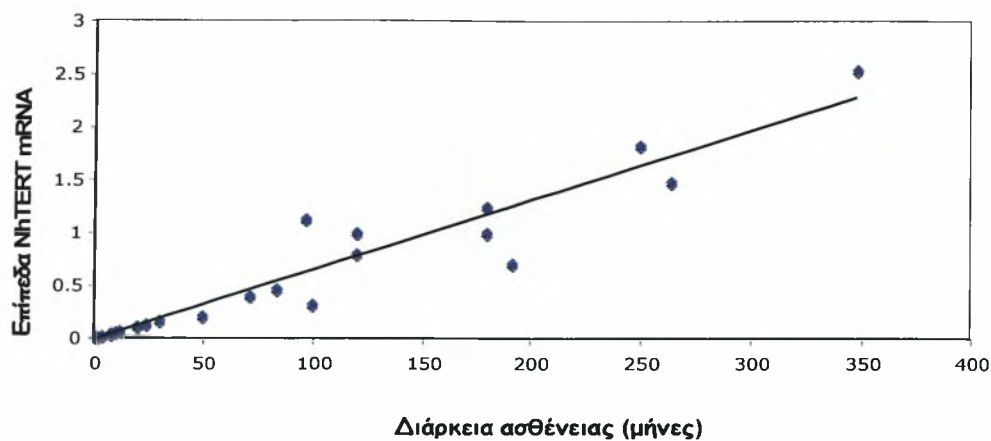
Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του hTERT mRNA με την μέθοδο της ποσοτικής PCR έδειξε ότι όσα δείγματα παρουσίασαν δραστικότητα τελομεράσης είχαν και έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας. Αναλυτικότερα, κανένα από τα δείγματα της ομάδας ελέγχου δεν παρουσίασαν έκφραση hTERT. Αντίθετα, έκφραση hTERT παρουσίασαν όλα τα δείγματα με ΗΚΚ (8.914 ± 6.325 , εύρος 1.936-23.285) η οποία ήταν σημαντικά υψηλότερη ($p < 0.001$) σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση στα άτομα με ΧΙΗ. Αυτό ίσχυε είτε εξετάζοντας την ομάδα με ΧΙΗ συνολικά (όταν $n=32$, η διάμεση τιμή της έκφρασης ήταν 0.207 ± 0.565 , εύρος 0-2.537) είτε λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα 5 άτομα που ήταν θετικά για hTERT (όταν $n=5$, ο μέσος όρος της έκφρασης ήταν 0.609-2.537, εύρος 0.609-2.537). Οι διαφοροποιήσεις των τιμών του hTERT mRNA φαίνονται στο διάγραμμα 5 και είναι στατιστικά σημαντικές μεταξύ των τριών ομάδων, ενώ οι τιμές του hTERT mRNA παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Έκφραση hTERT mRNA



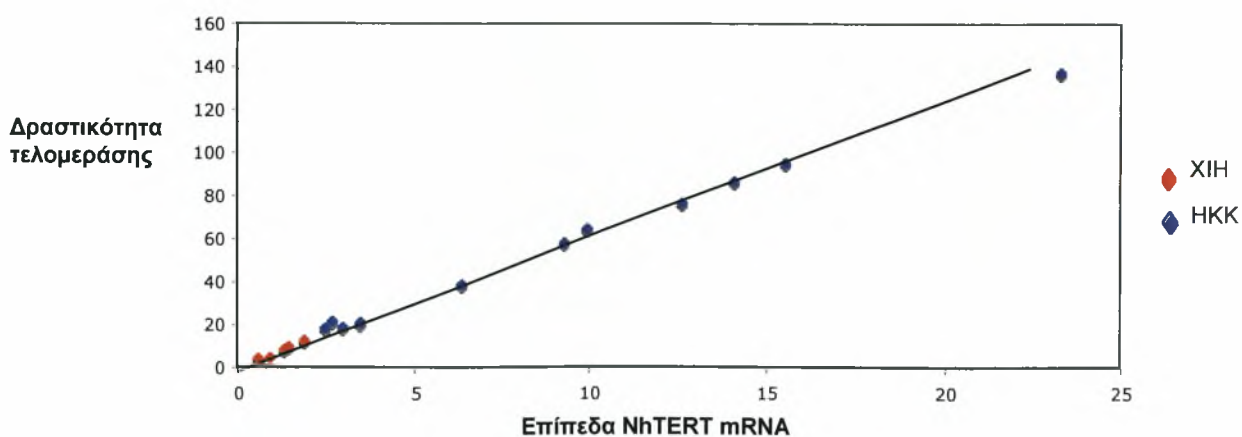
Διάγραμμα 5: επίπεδα NhTERT mRNA σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ), με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (ΧΙΗ) και στην ομάδα ελέγχου.

Στην ομάδα των ατόμων που πάσχουν από χρόνια ιογενή ηπατίτιδα παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση (διάγραμμα 6) μεταξύ της διάρκειας της ασθένειας και της έκφρασης του hTERT mRNA ($r=0.459$, $p<0.02$). Πιο αναλυτικά, οι ασθενείς που δεν είχαν δραστικότητα τελομεράσης και έκφραση hTERT mRNA στους ιστούς ήπατος ($n=27$) είχαν μικρότερη διάρκεια ασθένειας (μέσος όρος 64.6 μήνες) σε σχέση με τους ασθενείς ($n=5$) που εμφάνισαν δραστικότητα τελομεράσης και έκφραση hTERT (μέσος όρος 144 μήνες, $p<0.05$).



Διάγραμμα 6: Συσχέτιση των ελκιδων του hTERT mRNA με την διάρκεια της ασθένειας

Σε όλες τις ομάδες υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του hTERT mRNA και της δραστηριότητας της τελομεράσης ($r=0.96$, $p<0.05$, διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της τελομεράσης και των επιπέδων του hTERT mRNA σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (ΧΙΗ) και ηπατοκυτταρικό καρκίνο (ΗΚΚ).

Τέλος, σε κάθε ομάδα η έκφραση του hTERT mRNA και η δραστικότητα της τελομεράσης δεν συσχετίστηκε με την ηλικία, το φύλο, τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών και το ιϊκό φορτίο του HBV ή/και HCV (Spearman rank correlation, $p=NS$). Τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών των ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Δείγμα (ΧΙΗ)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Δείγμα (ΧΙΗ)	AST (U/L)	ALT (U/L)
1	40	88	17	33	117
2	56	119	18	77	145
3	40	68	19	82	150
4	42	69	20	115	310
5	46	89	21	46	106
6	552	1269	22	48	84
7	37	36	23	72	305
8	88	76	24	363	867
9	140	206	25	39	44
10	44	36	26	18	28
11	42	78	27	225	284
12	47	78	28	30	43
13	139	289	29	29	33
14	57	95	30	31	30
15	40	45	31	78	124
16	70	173	32	23	43

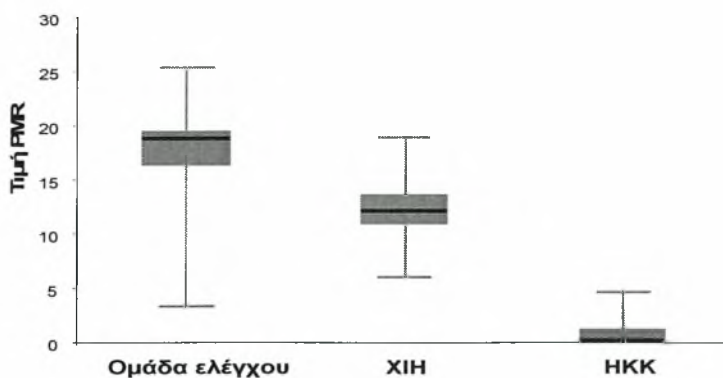
Πίνακας 4: Τιμές AST (ασπαρτική αμινοτρανσφεράση) και ALT (αμινοτρανσφεράση της αλανίνης) στα άτομα που έπασχαν από χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (ΧΙΗ).

Β.2.3. Μέτρηση του ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT, συσχέτιση αυτής με την έκφραση του hTERT mRNA καθώς και με την επιβίωση των ασθενών με ΗΚΚ.

Για την μέτρηση του ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT εφαρμόστηκε ποσοτική PCR με ειδικούς εκκινητές και ανιχνευτές υδρόλυσης. Η τιμή PMR κάθε δείγματος φαίνεται στον πίνακα 4, ενώ το διάγραμμα 8 αναπαριστά τον μέσο όρο του ποσοστού μεθυλίωσης στις 3 ομάδες που μελετήθηκαν.

Όπως αναφέρθηκε, κανένας από τους ιστούς ήπατος της ομάδας ελέγχου (n=14) δεν εμφάνισε έκφραση της υπομονάδας hTERT. Στο 78% αυτών, δηλαδή 11 στα 14 δείγματα, βρέθηκε να είναι πλήρως μεθυλιωμένος ο υποκινητής (πίνακας 5-διάγραμμα 8), ενώ 3 δείγματα αν και δεν εμφάνισαν έκφραση hTERT βρέθηκε να έχουν μη μεθυλιωμένο τον αντίστοιχο υποκινητή.

Από τους ιστούς των ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (ΧΙΗ), βρέθηκε ότι στο 80% των δειγμάτων (δηλαδή 4 στα 5 δείγματα) που είχαν έκφραση της hTERT ο υποκινητής ήταν πλήρως μη μεθυλιωμένος. Σε ένα δείγμα που είχε έκφραση τελομεράσης βρέθηκε πολύ μικρό ποσοστό μεθυλίωσης. Επιπλέον, όσα δείγματα της ομάδας αυτής δεν εμφάνισαν έκφραση της hTERT, βρέθηκε πλήρως μεθυλιωμένος ο υποκινητής του αντίστοιχου γονιδίου (πίνακας 5-διάγραμμα 8).



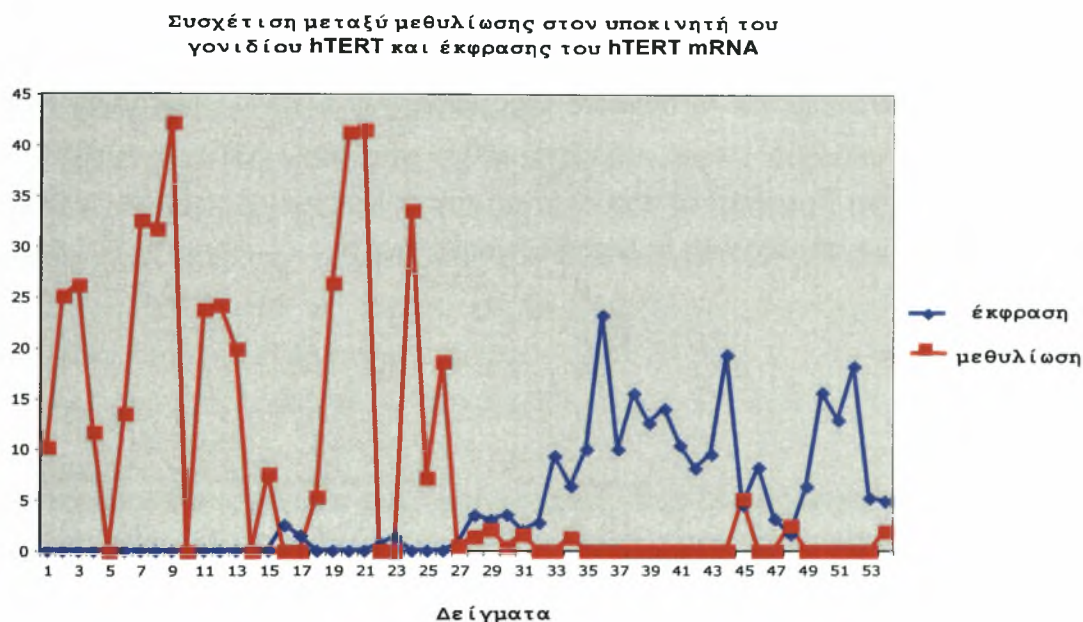
Διάγραμμα 8: Ο μέσος όρος του ποσοστού μεθυλίωσης σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ), με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (ΧΙΗ) αλλά και στην ομάδα ελέγχου.

Στα δείγματα των ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) που παρουσίασαν υψηλή έκφραση της hTERT, βρέθηκε ότι στο 70.4% των δειγμάτων (δηλαδή 19 στα 27 δείγματα) ο υποκινητής ήταν πλήρως μη μεθυλιωμένος, ενώ στο 29.6% των δειγμάτων (δηλαδή 8 στα 27 δείγματα) ο υποκινητής του γονιδίου hTERT εμφάνισε πολύ μικρό ποσοστό μεθυλίωσης (πίνακας 5-διάγραμμα 8).

Δείγματα	NhTERT mRNA	Τιμή PMR	Δείγματα	NhTERT mRNA	Τιμή PMR	Δείγματα	NhTERT mRNA	Τιμή PMR
O.E (n=14)			XIH (n=13)			ΗΚΚ (n=27)		
1	0	10.2	1	0	7.6	1	3.5	1.4
2	0	5.1	2	2.537732462	0	2	3	2.1
3	0	6.2	3	1.483049991	0	3	3.51	0.4
4	0	11.7	4	0	5.3	4	1.93	1.6
5	0	0	5	0	26.4	5	2.73	0
6	0	13.5	6	0	41.3	6	9.31	0
7	0	12.6	7	0	41.5	7	6.34	1.3
8	0	31.7	8	0.609111605	0	8	9.97	0
9	0	12.2	9	1.364202696	0	9	23.2	0
10	0	0	10	0	33.6	10	9.97	0
11	0	13.8	11	0	7.2	11	15.5	0
12	0	24.2	12	0	18.7	12	12.6	0
13	0	19.9	13	0.650081714	0.5	13	14	0
14	0	0				14	10.34	0
						15	8.1	0
						16	9.5	0
						17	19.3	0
						18	4.5	5.1
						19	8.2	0
						20	3.1	0
						21	1.6	2.5
						22	6.3	0
						23	15.6	0
						24	12.9	0
						25	18.2	0
						26	5.2	0
						27	4.9	1.9

Πίνακας 5: Οι τιμές του σχετικού ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT (οι οποίες αποδίδονται με τον όρο PMR-percent of methylated reference) σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ), με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (XIH) αλλά και στην ομάδα ελέγχου (O.E.).

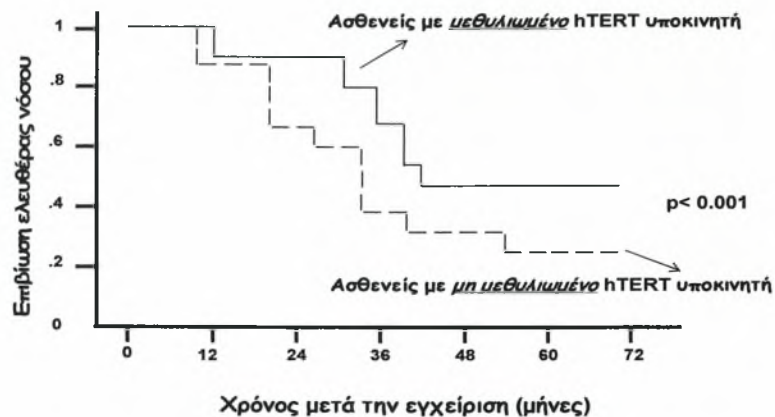
Συγκρίνοντας την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) όλων των δειγμάτων (n=54) με το ποσοστό μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT στα ίδια δείγματα βρέθηκε πως υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ($r=0.912$, $p<0.05$), όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 9.



Διάγραμμα 9: Συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT και της έκφρασης του hTERT mRNA.

Τέλος, στην ομάδα των ατόμων με ΗΚΚ εξετάστηκε η προγνωστική αξία του ποσοστού της μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης του hTERT με την κλινική έκβαση των ασθενών που έπασχαν από ΗΚΚ. Βρέθηκε ότι οι ασθενείς των οποίων ο υποκινητής του γονιδίου hTERT είχε μερική μεθυλίωση, και άρα είχαν μικρότερη έκφραση του hTERT mRNA, παρουσίαζαν σημαντικά μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου και συνολικά καλύτερη επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς των οποίων ο υποκινητής ήταν πλήρως μη μεθυλιωμένος και επομένως είχαν μεγαλύτερη έκφραση του hTERT (διάγραμμα 10).

Αναλυτικότερα, ο μέσος όρος επιβίωσης των ασθενών με ΗΚΚ που είχαν πλήρως μη μεθυλιωμένο τον υποκινητή του hTERT ήταν 29.3 μήνες, ενώ ο μέσος όρος επιβίωσης των ασθενών με ΗΚΚ που εμφάνισαν μερική μεθυλίωση στον υποκινητή του hTERT ήταν 42.1 μήνες. Για να διαπιστωθεί λοιπόν εάν το ποσοστό μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT διαθέτει ανεξάρτητη προγνωστική αξία στα άτομα με ΗΚΚ πραγματοποιήθηκε ανάλυση με καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier, όπου ελήφθησαν υπόψη: το στάδιο του όγκου (AJCC/UICC¹⁷³), η ιστολογική ανάλυση, ο βαθμός διαφοροποίησης και το ποσοστό μεθυλίωσης του hTERT. Βρέθηκε ότι το στάδιο του όγκου ($p < 0.002$) και το ποσοστό μεθυλίωσης ($p < 0.0001$) του hTERT διαθέτουν ανεξάρτητη προγνωστική αξία τόσο για τον καθορισμό της περιόδου ελευθέρας νόσου όσο και για την συνολική επιβίωση των ασθενών.



Διάγραμμα 10: Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier σε σχέση με το ποσοστό μεθυλίωσης στον υποκινητή του hTERT στα άτομα με ΗΚΚ.

B.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αν και η έκφραση της τελομεράσης είναι απαραίτητη για την ενδομήτρια ζωή, στους ενήλικες δραστικότητα τελομεράσης υπάρχει σε ορισμένους τύπους κυττάρων, όπως είναι τα γαμετικά κύτταρα, τα βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών κ.α.⁵¹. Η δραστικότητα της τελομεράσης εξαρτάται από την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας του ενζύμου (hTERT), η οποία ρυθμίζεται τόσο μέσω μεταγραφικών παραγόντων όσο και μέσω επιγενετικών μηχανισμών.

Αντίθετα με ό,τι συμβαίνει στους φυσιολογικούς ιστούς, η έκφραση της τελομεράσης έχει ανιχνευθεί σε 85-90% των περιπτώσεων ανθρώπινων καρκίνων. Συγκεκριμένα, στον ΗΚΚ έχει ανιχνευθεί έκφραση τελομεράσης σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%^{10,17,2436,51,52,136}, ενώ θα πρέπει να τονιστεί ότι το 70-90% των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων είναι αποτέλεσμα μόλυνσης από τους ιούς HBV ή HCV.

B.3.1 Ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα.

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα (στα οποία ανήκουν κυρίως τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα φυσικά κύτταρα φονιάδες) αφορούσε στην ποσοτικοποίηση του mRNA της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης τόσο σε ασθενείς με χρόνια ιογενή HBV ή HCV λοίμωξη όσο και σε υγιή άτομα. Με την χρήση της ποσοτικής PCR διαπιστώθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα των hTERT mRNA μεταγράφων στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα των ασθενών με χρόνια HBV και HCV λοίμωξη σε σχέση με τους υγιείς, ενώ τα επίπεδα της hTERT ήταν ανεξάρτητα από την κλινική κατάσταση των ασθενών, την ηλικία, το φύλο, τη διάρκεια της ασθένειας και τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τη μελέτη του Fan και των συνεργατών του¹¹⁰, οι οποίοι παρατήρησαν σημαντική μείωση της δραστικότητας της τελομεράσης σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β. Αντίθετα, ο Tatsuma και οι συνεργάτες του¹⁸⁵ δεν παρατήρησαν αξιοσημείωτη διαφορά στην δραστικότητα της τελομεράσης σε μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β σε σχέση με την αντίστοιχη των υγιών ατόμων. Οι παραπάνω ερευνητικές ομάδες χρησιμοποίησαν μόνο την τεχνική TRAP, οπότε και

ανιχνεύτηκε η δραστικότητα της τελομεράσης με ημιποσοτική μέθοδο χωρίς αναφορά ποσοτικοποίησης των hTERT μεταγράφων, τα οποία συσχετίζονται με τη δραστικότητα του ενζύμου.

Τα λεμφοκύτταρα απαιτούν εκτενή κυτταρική διαίρεση και κλωνική επέκταση προκειμένου να επιτελέσουν τη λειτουργία τους. Η δραστικότητα της τελομεράσης και η έκφραση της hTERT ρυθμίζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, διαφοροποίησης κι ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων, γεγονός που υποδεικνύει τον πιθανό ρόλο της τελομεράσης στον έλεγχο της ικανότητας πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων^{106,186}. Επειδή η τελομεράση συμβάλλει στην προστασία του μήκους των τελομερών των λεμφοκυττάρων, ενδεχομένως διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος^{110,187,189}. Η ανοσολογική δυσλειτουργία αποτελεί τον κύριο παθογενετικό μηχανισμό της χρόνιας ηπατίτιδας Β. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β είναι ανοσοκατεσταλμένοι¹¹⁰, αν και οι ακριβείς παράγοντες που οδηγούν στην ανοσοπαθολογικότητα της ασθένειας δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί¹¹⁰. Η μόλυνση από τον HBV και τον HCV έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος, και επομένως στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί αυξημένη απόπτωση των Τ λεμφοκυττάρων μετά από μόλυνση από τον HBV ή τον HCV, γεγονός που συνεπάγεται και μειωμένη ανοσολογική απόκριση¹⁸⁸.

Όπως αναφέρθηκε, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση ανάμεσα στα ιικά φορτία HBV και HCV όπως αποδείχτηκε από τα επίπεδα HBV-DNA και HCV-RNA αντίστοιχα, και την έκφραση του hTERT mRNA. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί κατά ένα μέρος στο μικρό αριθμό ασθενών της κάθε υποκατηγορίας, όσο και στο γεγονός ότι για την παθογένεια του ΗΚΚ δεν ευθύνεται αποκλειστικά η ιογενής λοίμωξη.

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η μειωμένη έκφραση της τελομεράσης που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με χρόνια HBV και HCV λοίμωξη ενδεχομένως να αποτελεί σημείο πρόωρης γήρανσης του ανοσολογικού συστήματος των ασθενών αυτών. Η πιθανή πρόωρη γήρανση του ανοσολογικού συστήματος μπορεί να είναι, τουλάχιστον εν μέρει, υπεύθυνη για την ανοσοκαταστολή που παρατηρείται στους ασθενείς με χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις¹¹⁰. Όλα τα ανωτέρω συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η καταλυτική υπμονάδα της τελομεράσης εμπλέκεται στην ανοσολογική δυσλειτουργία των ασθενών με χρόνια HBV και HCV λοίμωξη¹¹¹, εφόσον η έκφραση του hTERT mRNA στα περιφερικά λεμφοκύτταρα των ασθενών βρέθηκε σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τα υγιή άτομα.

B.3.2. Μέτρηση της δραστηριότητας της τελομεράσης και ποσοτικοποίηση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) σε βιοψίες ήπατος.

Το ΗΚΚ αποτελεί μία από τους πιο συχνές κακοήθειες παγκοσμίως και η διάγνυσή του καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη στα πρώτα στάδια ανάπτυξης¹¹². Η δημιουργία του ΗΚΚ είναι αποτέλεσμα μιας πολυπαραγοντικής διαδικασίας που περιλαμβάνει γενετικές και επιγενετικές αλλαγές οι οποίες συμβαίνουν στα ηπατοκύτταρα^{113,114}. Σε ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες το ΗΚΚ μπορεί να αναπτυχθεί από μεγάλες αναγεννώμενες περιοχές που ονομάζονται όζοι, η βιολογική συμπεριφορά των οποίων δεν μπορεί να προβλεφθεί μόνο με ιστολογική ανάλυση^{115,116,117}. Καθοριστικό ρόλο στην έγκαιρη και ακριβή διάγνωση των ηπατοπαθειών θα αποτελούσε η συνολική ανάλυση του γονιδιώματος (global genomic analysis), γεγονός που προϋποθέτει την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που απορρυθμίζονται κατά την ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Κατά συνέπεια επιβάλλεται να εντοπιστούν τα γονίδια η έκφραση των οποίων διαφοροποιείται ανάλογα με την κλινική εικόνα των ασθενών, δηλαδή τόσο σε άτομα χωρίς ηπατοπάθεια, όσο και σε άτομα με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια ή με ΗΚΚ. Σε πρόσφατες μελέτες με την χρήση της ποσοτικής PCR εξετάστηκε η έκφραση διαφόρων γονιδίων στις παραπάνω κατηγορίες ασθενών¹⁴⁰. Με την ποσοτική PCR υπάρχει η δυνατότητα εντοπισμού μικρών αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων γεγονός που μπορεί να αποτελέσει καθοριστικό εργαλείο στον εντοπισμό γονιδίων των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται κατά την ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Μεταξύ των παραπάνω γονιδίων είναι και το γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT), το οποίο μάλιστα είναι το μόνο στην συγκεκριμένη κατηγορία γονιδίων το οποίο παρουσιάζει μηδενική έκφραση στα φυσιολογικά ηπατοκύτταρα.

Όπως αναφέρθηκε, η τελομεράση εκφράζεται σε 80%^{10,17,24,36,51,52,136,137} περίπου των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων. Στο δεύτερο τμήμα της συγκεκριμένης διατριβής πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της έκφρασης τόσο του ολοενζύμου της τελομεράσης όσο και της καταλυτικής υπομονάδας του (hTERT), σε άτομα ΗΚΚ, χρόνια ιογενή ηπατίτιδα (ΧΙΗ) και σε υγιή άτομα, καθώς και η συσχέτιση των ευρημάτων με παθοφυσιολογικές παραμέτρους των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη.

Τα φυσιολογικά ηπατοκύτταρα δεν εκφράζουν τελομεράση γεγονός που επιβεβαιώθηκε στη μελέτη μας, εφόσον σε όλες τις βιοψίες ήπατος των υγιών ατόμων δεν παρατηρήθηκε έκφραση ούτε του ολοενζύμου ούτε της καταλυτικής υπομονάδας hTERT. Αντιθέτως, σε όλα τα δείγματα με ΗΚΚ παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση της τελομεράσης, γεγονός που βρίσκεται σε πλήρη συμφωνία με πρόσφατες μελέτες^{145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159}. Η ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης με ποσοτική PCR έδειξε πως στα άτομα με ΗΚΚ τα επίπεδα του hTERT mRNA ήταν ιδιαίτερα υψηλά. Τα ευρήματα σε σχέση με την έκφραση του hTERT mRNA συμφωνούν με τις άλλες 4 ερευνητικές ομάδες που εφαρμόσαν ποσοτική PCR^{147,148,149,160}, ενώ οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες μέχρι σήμερα είχαν εφαρμόσει ημιποσοτικές μεθόδους μέτρησης των επιπέδων του hTERT mRNA^{151,153,155,161}. Αξίζει να τονιστεί ότι η ημιποσοτική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ολοενζύμου της τελομεράσης παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία. Κατά συνέπεια, κρίνεται απαραίτητη η παράλληλη ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας hTERT με την μέθοδο της ποσοτικής PCR.

Επιπλέον, σε όλα τα άτομα με ΗΚΚ βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του hTERT mRNA με την δραστηριότητα της τελομεράσης. Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι η καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης (hTERT) αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα ρύθμισης της δραστηριότητας του ολοενζύμου, αντίθετα από την RNA υπομονάδα της τελομεράσης (hTR) η οποία εκφράζεται ανεξάρτητα από την δραστηριότητα του ολοενζύμου.

Συμπερασματικά, η υπερέκφραση του hTERT mRNA και η αυξημένη δραστηριότητα της τελομεράσης στο ήπαρ των ατόμων που πάσχουν από ΗΚΚ συμπεριλαμβάνονται στις γενετικές αλλαγές που συμβαίνουν στα ηπατοκύτταρα κατά την διαδικασία της ηπατοκαρκινογένεσης. Η επανενεργοποίηση της τελομεράσης επιτρέπει στο ηπατοκύτταρο απεριόριστο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και φαίνεται να είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που οδηγούν στην ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Συνεπώς, η μέτρηση της έκφρασης του ολοενζύμου της τελομεράσης σε συνδυασμό με τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων του hTERT mRNA θα μπορούσε να αποτελέσει έναν επιπλέον μοριακό δείκτη για την διάγνωση του ΗΚΚ.

Με βάση το γεγονός ότι η «συμβατική» θεραπεία του ΗΚΚ δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική κρίνεται καθοριστική η έγκαιρη διάγνωση της νόσου στα πρώτα στάδια

δημιουργίας της¹⁹¹. Το 70-90% των περιπτώσεων με ΗΚΚ εντοπίζονται σε άτομα με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες^{134,135,136}. Συχνά η ιστολογική ανάλυση που πραγματοποιείται στα αρχικά στάδια της ηπατοκαρκινογένεσης δεν είναι ικανή από μόνη της να δώσει σαφή συμπεράσματα. Αυτό οφείλεται στο ότι η κυτταρολογική ατυπία που παρουσιάζεται στο ΗΚΚ είναι σταδιακή οπότε είναι πολύ πιθανό τα συγκεκριμένα παθολογικά κύτταρα να μην μπορεί να εντοπιστούν ιστολογικά λόγω του μειωμένου αριθμού τους¹⁶². Η επανενεργοποίηση της τελομεράσης στα πρώτα στάδια της πολυπαραγοντικής διαδικασίας της ηπατοκαρκινογένεσης κατατάσει την τελομεράση σε σημαντικό μοριακό δείκτη και πιθανότατα επιβάλλει την εύρεση τόσο της δραστικότητας του ενζύμου όσο και των επιπέδων του hTERT mRNA στις προκαρκινικές καταστάσεις, όπως είναι οι χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, στο 15.6% των δειγμάτων με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα εντοπίστηκε χαμηλή αλλά ανιχνεύσιμη δραστικότητα του ολοενζύμου της τελομεράσης. Τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με τους Harada και συν¹⁶¹, Park και συν¹⁵⁸ and Kojima και συν¹⁶³, οι οποίοι ανίχνευαν δραστικότητα τελομεράσης σε 31%, 16.9% και 5% των δειγμάτων με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια, αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, σε 2 πρόσφατες μελέτες από τους Shimojima και συν¹⁴⁷ και Komine και συν¹⁵⁰ δεν βρέθηκε δραστικότητα τελομεράσης σε ιστούς ήπατος ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια.

Όσον αφορά στα επίπεδα του hTERT mRNA τα οποία μετρήθηκαν με ποσοτική PCR, βρέθηκε ότι όλα τα δείγματα από ασθενείς με ΧΙΗ που εμφάνισαν δραστικότητα τελομεράσης είχαν και σημαντικά επίπεδα του hTERT mRNA τα οποία ήταν ανάλογα με την έκφραση του ολοενζύμου. Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων του hTERT mRNA απαιτείται πολύ μικρή ποσότητα δείγματος, αντίθετα με την ιστολογική ανάλυση, για την οποία απαιτείται σημαντική ποσότητα δείγματος. Παράλληλα, ο εντοπισμός των επιπέδων του hTERT mRNA γίνεται μέσω ποσοτικής PCR, οπότε παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία σε σχέση με την ιστολογική ανάλυση. Συνεπώς, είναι δυνατό μεταξύ δειγμάτων που δεν διαφέρουν ιστολογικά να δημιουργηθούν υποκατηγορίες ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης του hTERT mRNA. Μέχρι σήμερα, η ποσοτικοποίηση του hTERT mRNA σε ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια αλλά και απουσία ηπατοκυτταρικού καρκινώματος έχει πραγματοποιηθεί μόνο από τους Shimojima και συν¹⁴⁷ οι οποίοι δεν ανίχνευαν hTERT mRNA, μελετώντας όμως μόνο 2 δείγματα.

Συνοψίζοντας, όλα τα υγιή ηπατοκύτταρα δεν παρουσιάζουν έκφραση τελομεράσης και hTERT mRNA σε αντίθεση με όλα τα κύτταρα που προέρχονται από ηπατοκυτταρικό

καρκίνωμα τα οποία εμφανίζουν μέγιστες τιμές έκφρασης τελομεράσης και hTERT mRNA. Στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες, οι οποίες είναι μη καρκινικές καταστάσεις, δεν θα αναμενόταν έκφραση τελομεράσης. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό ότι το 15.6% των ηπατικών ιστών από ασθενείς με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα Β ή C, βρέθηκε να παρουσιάζει χαμηλή αλλά σημαντική δραστικότητα τελομεράσης καθώς και έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας hTERT. Το ποσοστό αυτό δεν αποκλίνει από το αντίστοιχο που προκύπτει από άλλες ερευνητικές ομάδες το οποίο κυμαίνεται από 5-30%^{145,146,147,148,149,150,161,163,164,165,166,167,192}. Η παρούσα μελέτη σε ηπατικούς ιστούς ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια διαφοροποιείται από την πλειοψηφία των άλλων μελετών που έχει γίνει ως σήμερα, γιατί πραγματοποιήθηκε εφαρμογή ποσοτικών μεθόδων, ενώ οι ιστοί προήλθαν από άτομα με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια αλλά χωρίς να υπάρχει ανάπτυξη ΗΚΚ. Επομένως, στα άτομα με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα χωρίς ηπατοκυτταρικό καρκίνο που εμφάνισαν χαμηλά αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα hTERT είναι ιδιαίτερα σημαντικό να εντοπιστεί η προέλευση της έκφρασης του hTERT mRNA.

Η έκφραση του hTERT mRNA σε ιστούς ήπατος μπορεί να προέρχεται από λεμφοκύτταρα, αναγεννώμενα ηπατοκύτταρα ή ακόμη και μικρομεταστάσεις με ΗΚΚ¹⁶¹. Όταν το ήπαρ μολύνεται από τον ιό HBV και HCV τα ηπατοκύτταρα υφίστανται φλεγμονή και έντονη τάση αναγέννησης. Για την αναγέννηση των κυττάρων επάγεται η δραστικότητα της τελομεράσης και η έκφραση του hTERT mRNA, με στόχο τα αναγεννώμενα ηπατοκύτταρα να διαθέτουν χρωμοσωμική σταθερότητα¹⁹³. Επιπλέον, υπάρχει πιθανότητα αυτά τα μη νεοπλασματικά δείγματα ήπατος να διαθέτουν σε κυτταρικό ή μοριακό επίπεδο μια μικρή κακοήγη περιοχή.

Για να διαπιστωθεί η φλεγμονώδης δραστηριότητα του ήπατος και επομένως η βιοχημική δραστηριότητα της νόσου πραγματοποιήθηκε σε όλα τα άτομα μέτρηση των επιπέδων της ALT. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των επιπέδων ALT και των επιπέδων της τελομεράσης ή του hTERT mRNA. Συνεπώς, υπάρχουν ενδείξεις πως η έκφραση του hTERT mRNA στους ηπατικούς ιστούς ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα δεν μπορεί να αποδοθεί σε μετανάστευση λεμφοκυττάρων αλλά, είτε στην αναγεννητική δραστηριότητα του ήπατος μετά από μόλυνση από τους ιούς HBV ή HCV ή σε μικρές εστίες του ήπατος που έχουν τροποποιηθεί και εκφράζουν τόσο το ολοένζυμο της τελομεράσης όσο και την καταλυτική υπομονάδα hTERT. Αξίζει βεβαίως να τονιστεί πως απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή όσον αφορά στην διεξαγωγή συμπερασμάτων εφόσον ο

αριθμός των δειγμάτων ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα που εξέφραζαν τελομεράση δεν ήταν πολύ μεγάλος.

Επιπρόσθετα, στους ασθενείς με ΧΙΗ βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην διάρκεια της ασθένειας και στην έκφραση του hTERT mRNA, το οποίο σημαίνει ότι τα επίπεδα του hTERT mRNA βρέθηκαν υψηλότερα στα άτομα που είχαν μεγαλύτερη διάρκεια της νόσου. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό και με τα παραπάνω συμπεράσματα επιβάλλει την προσεκτικότερη παρακολούθηση της πορείας της νόσου στα άτομα που εμφανίζουν χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια αλλά και που παρουσιάζουν έκφραση τελομεράσης και hTERT mRNA σε βιοψίες ήπατος, θεωρώντας ότι αυτή η υποκατηγορία ασθενών ίσως να έχει μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος¹⁹⁴.

Όπως αναφέρθηκε, πρόσφατα δεδομένα από την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων σε ιογενείς ηπατοπάθειες εντάσσουν την hTERT στην ομάδα των γονιδίων που απαιτούνται για τον καθορισμό του μοριακού προφίλ του κάθε ασθενούς με ηπατοπάθεια¹⁴⁰. Ωστόσο, για την πιστοποίηση των παραπάνω συμπερασμάτων απαιτούνται αντίστοιχες μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και σε διαφορετικά στάδια των HBV και HCV λοιμώξεων καθώς και να διευκρινιστεί αν η αύξηση της έκφρασης της hTERT έχει παθοφυσιολογική ή/ και κλινική σημασία. Ο απώτερος στόχος όλων των αντίστοιχων μελετών αποτελεί η ανάπτυξη τεχνικών που θα οδηγήσουν στην εξατομικευμένη διάγνωση αλλά και πρόβλεψη του ΗΚΚ^{190,195,196}. Οι μελλοντικές πρακτικές εφαρμογές αυτών των μοριακών τεχνικών αλλά και η κατανόηση τόσο της βιολογίας των τελομερών όσο και της δράσης της τελομεράσης στην διάρκεια της νόσου και στην καρκινογένεση ίσως τελικά να οδηγήσουν σε βελτιωμένες θεραπευτικές λύσεις έναντι των χρόνιων ασθενειών και του καρκίνου.

B.3.3 Επιγενετική ρύθμιση της hTERT μέσω μεθυλίωσης

Η διαλεύκανση του μηχανισμού που ελέγχει την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης θα αποτελέσει καθοριστικό βήμα στην κατανόηση της πολυπαραγοντικής διαδικασίας της ηπατοκαρκινογένεσης. 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.

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 εξώνιο¹⁹⁷. 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 κυττάρων¹⁹⁸.

Σε αντίθεση με το γενικότερο μοτίβο που επικρατεί σχετικά με το ρόλο της μεθυλίωσης στην έκφραση γονιδίων, στην περίπτωση της ρύθμισης της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης, τα δεδομένα είναι αμφιλεγόμενα. Η επίδραση της μεθυλίωσης του DNA στη ρύθμιση της μεταγραφής της hTERT υπομονάδας έχει εξεταστεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες^{92,95,100,101,199}. Τα αποτελέσματα αυτών έδειξαν ότι ο υποκινητής του γονιδίου ήταν υπομεθυλιωμένος σε αδιαφοροποίητα και μη μετασχηματισμένα κύτταρα τα οποία δεν εξέφραζαν hTERT^{92,95,100}. Αντιθέτως, σε διαφοροποιημένα κύτταρα καθώς και σε κύτταρα σε ηρεμία, ο υποκινητής βρέθηκε μεθυλιωμένος και δεν παρατηρήθηκε έκφραση της hTERT^{92,100}. Επιπλέον, σε μετασχηματισμένα και καρκινικά κύτταρα εκφράζεται η hTERT παρόλο που ο υποκινητής της είναι υπερμεθυλιωμένος¹⁰¹. Τέλος, σε άλλες μελέτες που έχουν γίνει πρόσφατα συγκρίνοντας την μεθυλίωση του υποκινητή και την έκφραση του γονιδίου hTERT σε καρκινικές σειρές τραχήλου μήτρας, μαστού, πνεύμονα, παχέος εντέρου τραχήλου και εντέρου^{94,99,200} 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, λοιπόν, το γονίδιο hTERT εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων αλλά καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει και ο τύπος του κυττάρου²⁰¹.

Στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα η υπερμεθυλίωση διαφόρων γονιδίων (ZHX2, p16 and NORE1A) αποτελεί συχνό επιγενετικό φαινόμενο, ενώ αξίζει να τονιστεί πως οι επιγενετικές μεταβολές χρησιμοποιούνται επιτυχώς και ως δείκτες του ποσοστού επιβίωσης των ασθενών^{202,203,204}. Μέχρι σήμερα δεν έχει πραγματοποιηθεί καμία μελέτη με στόχο την διερεύνηση της σχέσης ανάμεσα στην μεθυλίωση του υποκινητή και της έκφρασης της hTERT, τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε παθολογικά ηπατοκύτταρα.

Τα ευρήματά μας σε σχέση με το ποσοστό μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT έδειξαν ότι στο 78% (11/14) των υγιών ιστών που δεν εκφράζουν hTERT ο υποκινητής ήταν πλήρως μεθυλιωμένος. Βρέθηκαν όμως και 3 δείγματα που αν και δεν εξέφραζαν hTERT ο υποκινητής του αντίστοιχου γονιδίου ήταν μη μεθυλιωμένος. Στα συγκεκριμένα δείγματα πιθανόν η έκφραση του hTERT να καταστέλλεται από διαφορετικά φαινόμενα, όπως είναι η αποακετυλίωση των ιστονών, ή η σύνδεση μεταγραφικών παραγόντων που αναστέλλουν την μεταγραφή του γονιδίου. Όσον αφορά στις βιοψίες ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια βρέθηκε ότι όσα δείγματα δεν εξέφραζαν hTERT είχαν πλήρως μεθυλιωμένο τον αντίστοιχο υποκινητή. Επιπλέον, το 80% των δειγμάτων που εξέφραζαν hTERT είχαν πλήρως μη μεθυλιωμένο υποκινητή. Σε ένα δείγμα που εξέφραζε hTERT βρέθηκε να είναι μεθυλιωμένος ο υποκινητής αλλά σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Όταν όλες οι θέσεις CpG είναι μεθυλιωμένες τότε δεν μπορεί να σχηματιστεί το σύμπλοκο της μεταγραφής με την RNA πολυμεράση και όλους τους μεταγραφικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα αναστολή της μεταγραφής. Οπότε, για να επιτραπεί ένα ποσοστό μεταγραφής πρέπει κάποια περιοχή του υποκινητή να είναι υπομεθυλιωμένη. Αναλύοντας τα αντίστοιχα αποτελέσματα σε άτομα με ΗΚΚ βρέθηκαν ότι στο 26% των δειγμάτων που εκφράζουν την καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης ο υποκινητής ήταν μεθυλιωμένος. Στις περιπτώσεις αυτές τα επίπεδα μεθυλίωσης ήταν πολύ χαμηλά και έτσι δεν ήταν ικανά να αναστείλλουν την έκφραση του hTERT.

Η εύρεση του ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή ενός γονιδίου χωρίς την συσχέτισή του με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου θα ήταν μειωμένης αξίας. Το γεγονός, λοιπόν, ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης συσχετίστηκαν με τα επίπεδα έκφρασης φανερώνει ότι η περιοχή του υποκινητή που μελετήθηκε διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην μεταγραφή

του γονιδίου. Στην περιοχή αυτή του υποκινητή προσδένονται σημαντικοί μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι αδυνατούν να συνδεθούν όταν αυτή είναι μεθυλιωμένη. Κατα συνέπεια πιθανολογείται ότι η μεθυλίωση του DNA εμποδίζει την σύνδεση μεταγραφικών παραγόντων (όπως π.χ. πρωτεΐνη c-myc) στο «Ε κουτί» του υποκινητή. Το γεγονός αυτό είναι καθοριστικής σημασίας δεδομένου ότι ο υποκινητής του γονιδίου διαθέτει περισσότερα από 70 CpG νησίδια και η έκφραση του hTERT συσχετίστηκε με τα επίπεδα μεθυλίωσης σε 1-2 CpG νησίδια.

Στα ηπατοκύτταρα, επομένως, φαίνεται ότι η μεθυλίωση του hTERT αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου. Άλλη μία περίπτωση στην οποία η μεθυλίωση του υποκινητή της hTERT ανέστειλε την μεταγραφή του γονιδίου αναφέρεται από τον Bechter και τους συνεργάτες του⁹³. Η ερευνητική αυτή ομάδα μελέτησε το ποσοστό μεθυλίωσης στον υποκινητή του hTERT σε καρκινικά κύτταρα ασθενών με χρόνια Β λεμφοκυτταρική λευχαιμία και κατέληξε ότι χαμηλό ποσοστό μεθυλίωσης αντιστοιχεί σε αυξημένη δραστηριότητα τελομεράσης, ενώ υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης αντιστοιχεί σε χαμηλή δραστηριότητα τελομεράσης.

Επιπλέον, ένα από τα σημαντικά ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης αποτελεί το γεγονός ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης στο γονίδιο hTERT μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικός δείκτης σε ασθενείς με ΗΚΚ. Αναλυτικότερα, ασθενείς με χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης, και άρα μεγαλύτερη έκφραση της hTERT, έχουν χειρότερη πρόγνωση από τους ασθενείς με υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης, και επομένως μικρότερη έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας. Αυτό σημαίνει ότι οι ασθενείς με ΗΚΚ και χαμηλά ποσοστά μεθυλίωσης θα έχουν μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης μετά την επέμβαση, ενώ οι ασθενείς με ΗΚΚ και υψηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης θα έχουν μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης μετά την επέμβαση.

Συνοψίζοντας, καταλήγουμε ότι η πλήρης μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου hTERT στα κύτταρα του ήπατος αναστέλλει την έκφρασή του, γεγονός που παρατηρείται σε υγιείς ηπατικούς ιστούς και στην πλεινότητα των ηπατικών ιστών με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια. Αντιθέτως, σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια, που εκφράζουν hTERT στον ηπατικό ιστό, και σε όλους τους ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα εμφανίζεται μη μεθυλιωμένος ή με μικρά ποσοστά μεθυλίωσης ο υποκινητής του γονιδίου hTERT. Για πρώτη φορά αποδείχθηκε ότι το ποσοστό της μεθυλίωσης σχετίζεται με την έκφραση του γονιδίου hTERT στα ηπατοκύτταρα αλλά και ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης αποτελούν δείκτη επιβίωσης στα άτομα με ΗΚΚ. Για την χρήση του ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου

της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης ως προγνωστικό δείκτη πιθανής ανάπτυξης ΗΚΚ και σε άτομα με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια επιβάλλεται η μεγαλύτερη διάρκεια παρακολούθησης των ασθενών (follow up) και η συλλογή και επεξεργασία των κλινικών δεδομένων των ασθενών που παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης και επομένως σημαντική έκφραση της τελομεράσης.

Περίληψη

Τα τελομερή αποτελούν τα φυσικά άκρα των γραμμικών χρωμοσωμάτων στα οποία παρουσιάζεται το λεγόμενο «πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής». Αποτέλεσμα του συγκεκριμένου προβλήματος είναι, σε κάθε διαίρεση, τα χρωμοσώματα να χάνουν περίπου 20-200 ζεύγη βάσεων από τα τελομερή τους. Η τελομεράση είναι μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία διατηρεί το μήκος των τελομερών παρέχοντας στα κύτταρα τη δυνατότητα για απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, την RNA (hTR) και την καταλυτική υπομονάδα (hTERT), η οποία έχει δράση αντίστροφης μεταγραφάσης, ενώ υπάρχουν και πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση συμβάλλοντας στη δημιουργία ενός ενεργού ολοενζύμου. Η δραστηριότητα της τελομεράσης καταστέλλεται κατά την εμβρυϊκή διαφοροποίηση στα περισσότερα σωματικά κύτταρα. Ωστόσο, παρατηρείται έκφραση σε ορισμένους τύπους κυττάρων, όπως για παράδειγμα σε αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα, σε αναπαραγωγικά κύτταρα, σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, σε κύτταρα του μυελού των οστών κ.ά. Επιπλέον, έχει βρεθεί έκφραση του ενζύμου σε 85-90% των περιπτώσεων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (ΗΚΚ). Η μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου hTERT, από την οποία εξαρτάται η δράση της τελομεράσης, και στην οποία κατέχει κεντρικό ρόλο η ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή, πραγματοποιείται τόσο μέσω μεταγραφικών παραγόντων όσο και μέσω επιγενετικών μηχανισμών. Μεταξύ των επιγενετικών μηχανισμών που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου hTERT κυριαρχεί η μεθυλίωση του DNA, λόγω της παρουσίας μεγάλου αριθμού νησίδων CpG εντός του υποκινητή. Ο τρόπος με τον οποίο η μεθυλίωση επηρεάζει την έκφραση του hTERT αποτελεί αντικείμενο έρευνας των τελευταίων ετών και δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί ακόμη.

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) αποτελεί έναν από τους πιο συνήθεις κακοήθεις όγκους παγκοσμίως. Ο κυριότερος παράγοντας πρόκλησης του ΗΚΚ είναι οι χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες και έχει βρεθεί ότι το 70-90% των ατόμων που θα αναπτύξουν κίρρωση θα αναπτύξουν τελικά και ΗΚΚ. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η χρόνια ηπατίτιδα Β και C προσφέρει τόσο το μιτογόνο όσο και το μεταλλαξογόνο περιβάλλον το οποίο είναι σε θέση να προκαλέσει την τροποποίηση του γενετικού υλικού των ηπατοκυττάρων. Μεταξύ των μηχανισμών που ενέχονται στην τροποποίηση του γενετικού υλικού των ηπατοκυττάρων συγκαταλέγονται η ενεργοποίηση καθώς και η απενεργοποίηση διάφορων γονιδίων. Το γονίδιο hTERT συγκαταλέγεται μεταξύ των γονιδίων τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή του «μοριακού προφίλ» των ασθενών με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες.

Με βάση τα παραπάνω, το πεδίο έρευνας της συγκεκριμένης διατριβής αποτελεί η συσχέτιση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης σε ιστούς με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες τόσο με την αντίστοιχη σε υγιείς και καρκινικούς ιστούς όσο και με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους, καθώς και η διερεύνηση του μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 3 ομάδες ασθενών: άτομα που δεν εμφάνιζαν καμία ηπατοπάθεια και αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου, άτομα με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα και άτομα με ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Από τα άτομα αυτά απομονώθηκε DNA και RNA τόσο από περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα όσο και από ιστούς ήπατος. Με το ημιποσοτικό πρωτόκολλο πολλαπλασιασμού των τελομερικών επαναλήψεων υπολογίστηκε η δραστικότητα της τελομεράσης, ενώ με την χρήση ποσοτικής PCR εντοπίστηκαν τα επίπεδα του hTERT mRNA. Επιπλέον, με την χρήση ποσοτικής PCR αλλά και με την εύρεση της αλληλουχίας των βάσεων διερευνήθηκε αν και με ποιον τρόπο ο επιγενετικός μηχανισμός της μεθυλίωσης ρυθμίζει την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης στα ηπατοκύτταρα.

Όσον αφορά στην ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) στα περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα, διαπιστώθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα των hTERT mRNA μεταγράφων στα συγκεκριμένα κύτταρα των ασθενών με χρόνια HBV και HCV λοίμωξη σε σχέση με τους υγιείς, ενώ τα επίπεδα της hTERT ήταν ανεξάρτητα από την κλινική κατάσταση των ασθενών, την ηλικία, το φύλο, τη διάρκεια της νόσου και τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών. Τα μειωμένα επίπεδα της έκφρασης του hTERT mRNA αποτελούν σημείο πρώιμης γήρανσης του ανοσοποιητικού συστήματος και προτείνεται ότι η hTERT συμμετέχει στην ανοσολογική δυσλειτουργία των ασθενών με χρόνια HBV και HCV λοίμωξη. Τα ευρήματα που προέκυψαν από την μέτρηση της δραστικότητας της τελομεράσης και την ποσοτικοποίηση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης φανέρωσαν ότι όλα τα υγιή ηπατοκύτταρα δεν παρουσιάζουν έκφραση τελομεράσης και hTERT mRNA, σε αντίθεση με όλα τα κύτταρα που προέρχονται από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα τα οποία εμφανίζουν μέγιστες τιμές έκφρασης τελομεράσης και hTERT mRNA. Στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες, οι οποίες είναι μη καρκινικές καταστάσεις, δεν θα αναμενόταν έκφραση τελομεράσης. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό ότι το 15.6% των ιστών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα βρέθηκε να παρουσιάζει χαμηλή αλλά σημαντική δραστικότητα τελομεράσης καθώς και έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας hTERT. Η υπερέκφραση του hTERT mRNA και η αυξημένη δραστικότητα της τελομεράσης στο ήπαρ των ατόμων που πάσχουν από ΗΚΚ επιτρέπει στο ηπατοκύτταρο ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και καταλήγει να είναι ένας από τους παράγοντες που οδηγούν στην ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Επιπρόσθετα, στους ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες τα επίπεδα του hTERT

mRNA βρέθηκαν υψηλότερα στα άτομα που εμφάνισαν μεγαλύτερη διάρκεια της νόσου. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό και με τα παραπάνω συμπεράσματα επιβάλλει την προσεκτικότερη παρακολούθηση της πορείας της νόσου στα άτομα που εμφανίζουν χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια και ταυτόχρονα παρουσιάζουν έκφραση τελομεράσης και hTERT mRNA σε βιοψίες ήπατος, θεωρώντας ότι αυτή η υποκατηγορία ασθενών ίσως να έχει μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

Η διερεύνηση του μηχανισμού που ελέγχει την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας, επικεντρώθηκε στην επιγενετική ρύθμιση της hTERT μέσω της μεθυλίωσης του DNA. Τα αποτελέσματα της διατριβής φανέρωσαν ότι η πλήρης μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου hTERT στα κύτταρα του ήπατος, εμποδίζει την σύνδεση μεταγραφικών παραγόντων και αναστέλλει την έκφρασή του, γεγονός που παρατηρείται σε υγιείς ιστούς και σε ένα ποσοστό ιστών με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια. Αντιθέτως, σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια και σε όλους τους ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα εμφανίζεται μη μεθυλιωμένος ή με μικρά ποσοστά μεθυλίωσης ο υποκινητής του γονιδίου hTERT. Για πρώτη φορά αποδείχθηκε ότι το ποσοστό της μεθυλίωσης σχετίζεται με την έκφραση του γονιδίου hTERT στα ηπατοκύτταρα, αλλά και ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης αποτελούν δείκτη επιβίωσης στα άτομα με ΗΚΚ. Για την χρήση του ποσοστού μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hTERT ως προγνωστικό δείκτη και σε άτομα με χρόνια ιογενή ηπατοπάθεια επιβάλλεται επιβάλλεται η μεγαλύτερη διάρκεια παρακολούθησης των ασθενών (follow up) που παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης και επομένως σημαντική έκφραση της τελομεράσης.

Summary

Telomeres are the natural ends of chromosomes, where the “end replication problem” takes place. This problem leads to the loss of 20-200bp from each chromosome after each cell division. The role of telomerase, an RNA-dependent DNA polymerase is to maintain the ends of chromosomes, so telomere lengths are extended or maintained and replicative senescence is avoided. Telomerase consists of two essential components: one is the functional RNA component (hTR) which serves as a template for telomeric DNA synthesis and the other is a catalytic protein (hTERT) with reverse transcriptase activity. While most normal human somatic cells exhibit no detectable telomerase activity, highly proliferative cells such as germline cells, trophoblasts, hematopoietic cells, endometrial cells, and up to 85-90% of cancer cells, including hepatocellular carcinoma. The transcriptional regulation of hTERT expression depends on transcriptional factors that bind to the hTERT promoter and also on epigenetic mechanisms. DNA promoter methylation is one of the main epigenetic mechanisms that controls hTERT expression, due to the large number of CpG sites that are found in the promoter, though the role of DNA methylation in hTERT regulation has not been elucidated yet.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignant tumours worldwide. The major clinical risk factor for HCC development is chronic viral hepatitis, since 70–90% of HCCs develop in a HBV or HCV-related cirrhotic liver. It has been thought that chronic viral hepatitis provides the mitogenic and mutagenic environment that can cause the malignant transformation of hepatocytes. This may result in genetic alterations, such as activation or inactivation of several genes. hTERT is one of the genes that could be used for the construction of the “molecular profile” of patients suffering from chronic viral hepatitis.

The main research of this thesis was the correlation of hTERT expression in chronic viral hepatitis tissues with the expression in normal and HCC liver tissues and the investigation of a mechanism that regulates hTERT expression. Three groups of patients were used: patients with chronic HBV and HCV infections, patients without liver disease which consisted the control group of the study and patients with histologically proven HCC. DNA and RNA were isolated from peripheral blood mononuclear cells and liver tissue biopsies. TRAP assay was performed to measure telomerase activity and real time PCR was used to quantify hTERT expression. Moreover, real time PCR and sequencing was used to determine the methylation status of hTERT promoter, in order to address the main factor that regulates hTERT expression in hepatocytes.

The expression of hTERT transcripts in peripheral blood mononuclear cells was found to be significantly lower in the HBV and HCV patients compared to healthy controls and was not

associated with the type of viral infection, the clinical status of the patients, age, sex, or aminotransferase levels. The presence of low levels of hTERT mRNA suggest the involvement of the catalytic subunit of telomerase in the immunopathogenesis of chronic hepatitis B and C since the decreased levels of hTERT mRNA expression represent a sign of premature aging of the immune system.

Telomerase activity and hTERT expression was found high in all liver tissues of patients with HCC, while all normal liver tissues showed no telomerase activity and hTERT expression. This shows that hTERT mRNA overexpression in human liver tissues might be one of the processes involved in the multistep carcinogenesis of the liver. Additionally, we determined telomerase activity in liver tissues from patients with chronic viral hepatitis and observed that 15.6% of the specimens had detectable, although significantly lower than that observed in HCC cases- telomerase activity. Moreover, liver tissues from patients with chronic hepatitis B and C exhibit hTERT mRNA expression, associated with longer disease duration. Taking into account the above mentioned it can be suggested that patients with chronic viral hepatitis that demonstrated significant telomerase activity and increased hTERT mRNA levels on their tissues would require a careful and close follow-up for the potential development of HCC.

We found that hTERT promoter region was highly methylated in normal liver tissues while in chronic viral hepatitis and HCC tissues was not methylated and highly expressed. Methylation of CpG sites in hTERT promoter inhibits transcription factors (such as c-myc protein) to bind to the promoter and enhance transcription. Furthermore we have shown that hTERT methylation status is a prognostic marker of hepatocellular carcinomas progression and survival rate. Patients with very low PMR (percent of methylated reference) values had worse prognosis than patients with high PMR values. The use of methylation status of hTERT promoter as a prognostic marker in patients with chronic viral hepatitis requires longer follow-up and the assessment of more clinical data.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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. De Lange T, Shiue L, Myers M.R., Cox R.D., Naylor L.S. et al. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 1990 10(2): 518-527.
3. Blackburn H.E. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991 350: 569-573
4. Wellinger RJ, Sen D.. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer* 1997 33(5): 735-749.
5. Blackburn E. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001 106: 661-673
6. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T.. Mammalian telomerases end in a large duplex loop. *Cell* 1999 97: 503-514.
7. Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *Biol of Neoplasia* 2000 18(13): 2626-2634.
8. Cong Y-Sh, Wright EW, Shay WJ.. Human telomerase and its regulation. *American Society for Microbiology* 2002 66(3): 407-425
9. Smith S, Gariat I, Schmitt A, et al. Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 1998 282: 1484-1487.
10. Buys Ch. Telomeres, telomerase and cancer. *Clinical Implications of Basic Research*, 2000 342(17): 1282-1283.
11. Erlitzki R, Minuk G. Telomeres, telomerase and HCC: the long and the short of it. *J Hepatol* 1999 31: 939-945.
12. Hodes R. Molecular targeting of cancer: Telomeres as targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2001 98(14): 7649-7651.
13. Vaziri H, Schachter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, Cohen D, Harley CB. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 1993 52: 661-667.
14. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB.. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 1992 89: 10114-10118.
15. Shay JW, Wright WE.. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2000 1: 72-76.
16. Harley CB, Futcher AB, Greider CW.. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990 345: 458-460.

17. Granger M, Wright W, Shay J.. Telomerase in cancer and aging. *Oncology-Hematology* 2002 41: 29-40.
18. Allsopp RC, Harley CB Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Experimental Cell Research* 1995 219: 130-136.
19. 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.
20. Klapper W, Parwaresch R, Krupp G.. Telomere biology in human aging and aging syndromes. *Mechanisms of Ageing and Development* 2001 122: 695-712.
21. 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.
22. Lundblad V and Blackburn EH.. *Cell* 1993 73: 347–360.
23. Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB. et al.. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Development* 1999 13: 817-826.
24. Shay J, Wright W.. Telomeres and telomerase: Implications for cancer and aging. *Radiation Research* 2001 155: 188-193.
25. Feng J, Funk DW, Wang SS, Weinrich LS, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995 269: 1236-1241
26. 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.
27. Chen JL, Blasco MA, Greider CW.. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell.* 2000 100: 503-514.
28. 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.
29. Takakura 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.
30. 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.
31. Nakamura TM, Cech TR.. Reversing time: origin of telomerase. *Cell* 1998 92: 587-590.
32. 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.

33. 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.
34. Lue NF. A physical and functional constituent of telomerase anchor site. *Biol Chem* 2005 280(28): 26586-91.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Chan SR, Blackburn EH.. Telomeres and telomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 2004 359: 109-121.
39. Cao Y, Li H, Deb S, Liu JP.. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 2002 21: 3130-3138.
40. 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.
41. Smith LL, Collier HA, Roberts JM.. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nature Cell Biology* 2003 5: 474-479.
42. Sharma GG, Gupta A, Wang H, Scherthan H, Dhar S, Gandhi V, Iliakis G, Shay JW, Young CS, Pandita TK.. hTERT associates with human telomeres and enhances genome stability and DNA repair. *Oncogene* 2003 22: 131-146.
43. Horikawa I, Barrett JC.. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* 2003 24: 1167-1176.
44. Greider CW, Blackburn EH.. Tracking telomerase. *Cell* 2004 116: 83-86.
45. 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.
46. Aisner D, Wright W, Shay J.. Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Current Opinion in Genetics and Development* 2002 12: 80-85.
47. Keith WN, Bilsland A, Evans TRJ, Glasspool RM.. Telomerase-directed molecular therapeutics. *Expert Rev Mol Med*. 2002 22:1-25.

48. Moyziz RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Rattliff RL, Wu J.. A highly conserved repetitive DNA sequence (TTaGGG)_n present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 85: 6622-6626.
49. Greider CW.. Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 1996 65: 337-365.
50. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental Genetics* 1996 18:173-179.
51. 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.
52. 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.
53. Yi X, Tesmer MV, Savre-Train I, Shay WJ, Wright EW.. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Molecular and Cellular Biology* 1999 19(6): 3989-3997.
54. Yi X, Shay J, Wright W.. Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. *Nucleic Acids Research* 2001 29 (23): 4818-4825.
55. 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: 137-142.
56. Lüscher B.. Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene* 2001 277: 1-14.
57. Janknecht P.. On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Letters* 2004 564: 9-13.
58. Wang Z, Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Maida Y, Fujiwara M, Hayakawa J, Ohmichi M, Koike K, Inoue M.. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Cancer Res* 2000 60: 5376-5381.
59. Guo C, Armbruster BN, Price DT, Counter CM.. In vivo regulation of hTERT expression and telomerase activity by androgen. *J Urol* 2003 170: 615-618.
60. Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik G, Mugnier C, Lagorce D, Brechot C.. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* 2003 22: 3911-3916.

61. Li H, Lee TH, Avraham H.. A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer. *J Biol Chem* 2002 277: 20965-20973.
62. Ikeda N, Uemura H, Ishiguro H, Hori M, Hosaka M, Kyo S, Miyamoto K, Takeda E, Kubota Y.. Combination treatment with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 9-cis-retinoic acid directly inhibits human telomerase reverse transcriptase transcription in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2003 2: 739-746.
63. Pendino F, Dudognon C, Delhommeau F, Sahraoui T, Flexor M, Bennaceur-Griscelli A, Lanotte M, Segal-Bendirdjian E.. Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death. *Oncogene* 2003 22: 9142-9150.
64. Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H, Inoue M.. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res* 2000 6: 1239-47.
65. Xu D, Wang Q, Gruber A, Bjorkholm M, Chen Z, Zaid A, Selivanova G, Peterson C, Wiman, KG, Pisa P.. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 2000 19: 5123-33.
66. Crowe DL, Nguyen DC.. Rb and E2F-1 regulate telomerase activity in human cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2001 1518: 1-6.
67. Gabet AS, Mortreux F, Charneau P, Riou P, Duc-Dodon M, Wu Y, Jeang KT, Wattel E.. Inactivation of hTERT transcription by Tax. *Oncogene* 2003 22: 3734-3741.
68. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002 16: 6-21.
69. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002 3:415-428.
70. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000 16: 168-174.
71. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004 4:143-153.
72. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000 403: 41-45.
73. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001 293: 1074-1080.
74. Roberts CW, Orkin SH. The SWI/ SNF complex-chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer* 2004 4:133-142.
75. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004 116: 281-287.
76. Vogelstein B, Kinzper KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004 10: 789-799.
77. Lund AH, van Lohuizen M.. Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 2004 18: 2315-2335.

78. Yoder JA, Walsh CP and Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997 13: 335–340.
79. Huck-Hui Ng and Adrian Bird. DNA methylation and chromatin modification. *Current Opinion in Genetics & Development* 1999, 9:158-163.
80. 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: 503–14.
81. Santos F. and Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in Mammals. *Reproduction* 2004 127: 643–651.
82. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003 349: 2042-2054.
83. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004 4: 988-993.
84. Li E, Bestor TH and Jaenisch R.. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992 69: 915–926.
85. 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.
86. Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTaGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 85: 6622–6626.
87. 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.
88. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA and Jones PA.. 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.
89. 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.
90. Nagai ., Nakamura A, Makino R and Mitamura K. Expression of DNA (5-cytosin)-methyltransferases (DNMTs) in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 2003 26: 186–191.
91. Kapil BN. Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 2005 23: 3971-3993.
92. 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.
93. 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.

94. Widschwendter A, Muller HM, Hubalek MM, Wiedemair A, Fiegl H, Goebel G, Mueller-Holzner E, Marth C and Widschwendter M. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase in ovarian and cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2004 93: 407–416.
95. 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.
96. Quante M, Heeg S, Werder A, Goessel G, Fulda C, Doebele M, Nakagawa H, Beijersbergen R, Blum HE and Opitz OG. Differential transcriptional regulation of human telomerase in a cellular model representing important genetic alterations in esophageal squamous carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005 26(11): 1879–1889.
97. 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.
98. Widschwendter A, Muller M, Fiegl H, Ivarsson L, Wiedemair A, Muller E, Goebel G, Marth C and Widschwendter M. DNA Methylation in Serum and Tumors of Cervical Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 2004 10: 565–571.
99. 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.
100. Lopatina LG, Pool JC, Saldanha SN, Hansen NJ, Key JS, Pita LG, Andrews LG, Tollefsbol TO. Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 306: 650-659.
101. 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.
102. Liu L, Lai S, Andrews LG, Tollefsbol TO. Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease. *Gene* 2004 340: 1-10.
103. Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *The Journal of Experimental Medicine* 1996 183: 2471-2479.
104. Yamada O, Motoji T, Mizoguchi H. Up-regulation of telomerase activity in human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996 1314: 260-266.
105. Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995 92: 11091-11094.

106. Weng NP, Granger L, Hodes R. Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997 94: 10827-10832.
107. Hodes JR, Hathcock SK, Weng NP. Telomeres in T and B cells. *Nature Reviews Immunology* 2002 2(9): 699-706.
108. Son NH, Joyce B, Hieatt A, Chrest FJ, Yanovski J, Weng NP. Stable telomere length and telomerase expression from naive to memory B-lymphocyte differentiation. *Mech. of Ageing and Development* 2003 124(4): 427-432.
109. Weng NP. Telomeres, telomerase and lymphocyte replicative life span. *Clinical Immunology* 1999 92(1): 1-2.
110. Fan XG, Huang Y, Tang FQ, Yi H. Telomerase activity of peripheral blood lymphocytes in patients with chronic hepatitis B. *Immunology Letters* 2000 73: 7-11.
111. Satra M, Dalekos GN, Kollia P, Vamvakopoulos N and Tsezou A. Telomerase reverse transcriptase mRNA expression in peripheral lymphocytes of patients with chronic HBV and HCV infections. *Journal of Viral Hepatitis* 2005 12: 488-493.
112. Tsuda H, Zhang W, Shimosato Y, Yokota J, Terada M, Sugimura T, Miyumara T, Hirohashi S. Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1990 87:6791-6794.
113. Fujimoto Y, Hampton LL, Wirth PJ, Wang NJ, Xie JP, Thorgeirsson SS. Alterations of tumor suppressor genes and allelic losses in human hepatocellular carcinomas in China. *Cancer Res* 1994 54:281-285.
114. Boige V, Laurent-Puig P, Fouchet P, Flejou JF, Monges G, Bedossa P, Bioulac-Sage P, Capron F, Schmitz A, Olschwang S, Thomas G. Concerted nonsyntenic allelic losses in hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotype *Cancer Res* 1997 57(10):1986-90.
115. Terasaki S, Kaneko S, Kobayashi K, Nonomura A, Nakanuma Y. Histological features predicting malignant transformation of nonmalignant hepatocellular nodules: a prospective study. *Gastroenterology* 1998 115:1216-1222.
116. Aihara T, Noguchi S, Sasaki Y, Nakano H, Imaoka S. Clonal analysis of regenerative nodules in hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1994 107:1805-1811.
117. Paradis V, Laurendeau I, Vidaud M, Bedossa P. Clonal analysis of macronodules in cirrhosis. *Hepatology* 1998 28:953-958.
118. Blum HE. Hepatocellular carcinoma: Therapy and prevention *World J Gastroenterol* 2005 11(47): 7391-7400.
119. Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000 32: 225-237.
120. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodes J. Clinical management of hepatocellular carcinoma.

- Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001 35: 421-430.
121. Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002 35: 519-524.
 122. Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 2002 122: 1609-1619.
 123. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003 362: 1907-1917.
 124. Llovet JM, Fuster J, Bruix J. The Barcelona approach: diagnosis, staging and treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2004 10: S115-120.
 125. Bruix J, Sala M, Llovet JM. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004 127: S179-188.
 126. Kiyosawa K, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Gad A, Tanaka E. Hepatocellular carcinoma: recent trends in Japan. *Gastroenterology* 2004 127: S17-26.
 127. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology* 2004 127: S27-34.
 128. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004 127: S35-50.
 129. Waris G, Siddiqui A. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *Journal of Biosciences* 2003 28 (3): 311-321.
 130. Zakim D, Boyer DT. *Hepatology a textbook of liver disease*. 1996 Part 7: 215-243.
 131. Ozturk M. Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. *Semin Liver Dis* 1999 19: 235-242.
 132. Bergsland EK. Molecular mechanisms underlying the development of hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 2001 28: 521-531.
 133. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002 31: 339-346.
 134. Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ, Jordan R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003 22: 5093-5107.
 135. Suriawinata A, Xu R. An update on the molecular genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2004 24: 77-88.
 136. Satyanarayana A, Manns MP, Rudolph KL. Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2004 40: 276-283.
 137. Moradpour D, Blum HE. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005 17:477-483.
 138. Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology* 2004 127: S56-61.

139. Yu MC, Yuan JM. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004 127: S72-78.
140. Paradis V, Bieche I, Dargere D, Laurendeau I, Laurent C, Sage PB, Degott C, Belghiti J, Vidaud M and Bedossa P. Molecular Profiling of Hepatocellular Carcinomas (HCC) Using a Large-Scale Real-Time RT-PCR Approach. Determination of a Molecular Diagnostic Index. *American Journal of Pathology* 2003 163 (2): 733-741.
141. Schena M, Schalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a cDNA microarray. *Science* 1995 270:467–470.
142. DeRisi JL, Iyer V, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997 278: 680–686.
143. Chen JJ, Wu R, Yang PC, Huang JY, Sher YP, Han MH, Kao WC, Lee PJ, Chiu TF, Chang F, Chu YW, Wu CW, Peck K. Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics* 1998 51:313– 324.
144. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Resenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000 403:503–511.
145. Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, et al. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1995 55:2734-2736..
146. Nakashio R, Kitamoto M, Tahara H, Nakanishi T, Ide T, Kajiyama G. Significance of telomerase activity in the diagnosis of small differentiated hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1997 74:141-147.
147. Shimojima M, Komine F, Hisatomi H, Shimizu T, Moriyama M, Arakawa Y. Detection of telomerase activity, telomerase RNA component, and telomerase reverse transcriptase in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2004 29:31-38.
148. Takahashi S, Kitamoto M, Takaishi H, et al. Expression of telomerase component genes in hepatocellular carcinomas. *Eur J Cancer* 2000 36:496-502.
149. Nagao K, Tomimatsu M, Endo H, Hisatomi H, Hikiji K. Telomerase reverse transcriptase mRNA expression and telomerase activity in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 1999 34:83-87.
150. Komine F, Shimojima M, Moriyama M, Amaki S, Uchida T, Arakawa Y. Telomerase activity in needle biopsy liver samples: its usefulness for diagnosis and judgment of efficacy of treatment of small hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000 32:235-241.

151. Toshikuni N, Nouse K, Higashi T, et al. Expression of telomerase-associated protein 1 and telomerase reverse transcriptase in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2000 82:833-837.
152. Liu CY, Chen CJ, Wu HS, et al. Telomerase and c-myc expression in hepatocellular carcinomas. *EJSO* 2004 30:384-390.
153. Lee CM, Hsu CY, Eng HL, et al. Telomerase activity and telomerase catalytic subunit in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2004 51:796-800.
154. Kobayashi T, Kubota K, Takayama T, Makuuchi M. Telomerase activity as a predictive marker for recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Am J Surgery* 2001 181:284-288.
155. Kobayashi T, Sugawara Y, Shi YZ, Makuuchi M. Telomerase expression and p53 status in hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2002 97:3166-3171.
156. Kawakami Y, Kitamoto M, Nakanishi T, et al. Immuno-histochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in human liver tissues. *Oncogene* 2000 19:3888-3893.
157. Huang GT, Lee HS, Chen CH, et al. Telomerase activity and telomere length in human hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 1998 34: 1946-1949.
158. Park YM, Choi JY, Byun BH, Cho CH, Kim HS, Kim BS. Telomerase is strongly activated in hepatocellular carcinoma but not in chronic hepatitis and cirrhosis. *Exp Mol Med* 1998 30:35-40.
159. Kishimoto K, Fujimoto J, Takeuchi M, Yamamoto H, Ueki T, Okamoto E. Telomerase activity in hepatocellular carcinoma and adjacent liver tissue. *J Surg Oncol* 1998 69:119-124.
160. Oh BK, Kim YJ, Park YN, Choi J, Kim KS and Chanil Park. Quantitative Assessment of hTERT mRNA Expression in Dysplastic Nodules of HBV-Related Hepatocarcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2006 101:831–838.
161. Harada K, Yasoshima M, Ozaki S, Sanzen T, Nakanuma Y. PCR and in situ hybridization studies of telomerase subunits in human non-neoplastic livers. *J Pathol* 2001 193:210-217.
162. Kojiro M. Focus on dysplastic nodules and early hepatocellular carcinoma: An eastern point of view. *Liver Transpl* 2004 10:S3–8.
163. Kojima H, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H, Omata M. Telomerase activity and telomere length in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Gastroenterology* 1997 112:493-500.
164. Kotoula V, Hytioglou P, Pyrpassopoulou A, Saxena R, Thung SN, Papadimitriou CS. Expression of human telomerase reverse transcriptase in regenerative and precancerous lesions of cirrhotic livers. *Liver* 2002 22:57-69.

165. Takaishi H, Kitamoto M, Takahashi S, et al. Precancerous hepatic nodules had significant levels of telomerase activity determined by sensitive quantitation using a hybridization protection assay. *Cancer* 2000 88:312-317.
166. Kanamaru T, Yamamoto M, Morita Y, Itoh T, Kuroda Y, Hisatomi H. Clinical implications of telomerase activity in resected hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 1999 4:267-271.
167. Nakayama J, Tahara H, Tahara E, et al. Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 1998 18:65-68.
168. Wada E, Hisatomi H, Moritoyo T, Kanamaru T, Hikiji K. Genetic diagnostic test of hepatocellular carcinoma by telomerase catalytic subunit mRNA. *Oncol Rep* 1998 5:1407-1412.
169. Hisatomi H, Nagao K, Kanamaru T, Endo H, Tomimatsu M, Hikiji K. Levels of telomerase catalytic subunit mRNA as a predictor of potential malignancy. *Int J Oncol* 1999 14:727-732.
170. The EASL jury: EASL International Consensus Conference on Hepatitis B, 13-14 September 2002, Geneva, Switzerland, Consensus statement (Short version). *J Hepatol* 2003 38:533-540.
171. Dalekos GN, Achenbach K, Christodoulou D, Liapi GK, Zervou EK, Sideris DA, Tsianos EV. Idiopathic dilated cardiomyopathy: lack of association with hepatitis C virus infection. *Heart* 1998 80 (3): 270-5.
172. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. *J Hepatol* 2001 35:421-430.
173. Green FL, Page DL, Fleming ID, et al. Liver: AJCC cancer staging handbook. American Joint Committee on Cancer (including intrahepatic bile ducts). 6th ed. NY Springer 2002 121-144.
174. Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem*. 2002 48:1178-1185.
175. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002 30:503-512.
176. Cross, N. Quantitative PCR techniques and applications. *British Journal of Haematology*, 1995 89 693-697.
177. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 2002 8:257-260.
178. Lossos IS et al. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia* 2003 17:789-795.
179. 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.
180. Finke J, Fritzen R, Ternes P, Lange W, Dolken G. An improved strategy and a useful housekeeping gene for RNA analysis from formalin-fixed, paraffin- embedded tissues by PCR. *Biotechniques* 1993 14: 448- 453.
 181. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, Real time quantitative PCR. *Genome Research* 1996 6: 986–994.
 182. Trinh BN, Long TI, and Laird PW. DNA Methylation Analysis by MethyLight Technology. *Methods* 2001 25: 456–462.
 183. Ong YL, Irvine A. Quantitative real-time PCR: a critique of method and practical considerations. *Hematology* 2002 7:59-67.
 184. Gabert J, Beillard E, 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.
 185. Tatsuma T, Goto S, Kitano S, Lin YC, Lee CM, Chen CL. Telomerase activity in peripheral blood for diagnosis of hepatoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2000 15: 1064-1070.
 186. Liu K, Schoonmaker MM, Levine BL, June CH, Hodes RJ, Weng NP. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999 96: 5147-5152.
 187. Pawelwec G, Solana R. Immunosenescence. *Trends of Immunology* 1997 18: 514-516.
 188. Nakamura K, Yuh K, Sugyo S, Shijo H, Kimura N, Okumura M. Apoptosis observed in peripheral T-lymphocytes from patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1996 111: 156-164.
 189. El-Refaie A, Savage K, Bhattacharya S et al. HCV-associated hepatocellular carcinoma without cirrhosis. *J Hepatol* 1996 24: 277-285.
 190. Miura N, Horikawa I, Nishimoto A, et al. Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997 93:56–62.
 191. Oh BK, Chae KJ, Park C, et al. Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2003 39:786–92.
 192. Hytioglou P, Kotoula V, Thung SN, et al. Telomerase activity in precancerous hepatic nodules. *Cancer* 1998 82:1831–8.
 193. Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 2000 287:1253-1258.

194. Satra M, Gatselis N, Iliopoulos D, Zacharoulis D, Dalekos GN, Tsezou A. Real time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in liver tissues from patients with hepatocellular cancer and chronic viral hepatitis. *Journal of Viral Hepatitis* 2006 *In press*.
195. Wu KJ, Grandori C, Amacker M, et al. Direct activation of TERT transcription by c-myc. *Nat Genet* 1999 21:220–4.
196. Wang J, Xie LY, Allan S, et al. Myc activates telomerase. *Genes Dev* 1998 12:1769–74.
197. 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.
198. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002 21: 5427– 5440.
199. 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.
200. Nomoto K, Maekawa M, Sugano K, Ushiyama M, Fukayama N, Fujita S, Kakizoe T. 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.
201. 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* 2003b 316: 57– 65.
202. Lv Z, Zhang M, Bi J, Xu F, Hu S, Wen J. Promoter Hypermethylation of a Novel Gene, ZHX2, in Hepatocellular Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2006 125(5):740-6.
203. Jicai Z, Zongtao Y, Jun L, Haiping L, Jianmin W, Lihua H. Persistent infection of hepatitis B virus is involved in high rate of p16 methylation in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2006 45(7):530-6.
204. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, Factor VM, Thorgeirsson SS. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006 130(4):1117-28.