

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ
ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ (hTERT) ΣΕ
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΜΕ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β ΚΑΙ C**

ΚΑΤΣΙΦΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:
ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ
Επ. Καθ. Ιατρικής Γενετικής
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ
ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2005

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ
ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ (hTERT) ΣΕ
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΜΕ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β ΚΑΙ C**

ΚΑΤΣΙΦΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:
ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ
Επ. Καθ. Ιατρικής Γενετικής
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ
ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4652/1
Ημερ. Εισ.: 7-11-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΚΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087861

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	4
Περίληψη.....	5
Εισαγωγή.....	6
1. Τελομερή.....	6
1.1. Δομή τελομερών.....	6
1.2. Ρόλος τελομερών.....	8
1.3. Πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής (End-replication problem).....	8
2. Τελομεράση.....	10
2.1. Δομή τελομεράσης.....	11
2.2. Λειτουργία τελομεράσης.....	14
2.3. Έκφραση της τελομεράσης.....	15
2.4. Ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης.....	16
2.5. Λεμφοκύτταρα και τελομεράση.....	16
3. Ηπατίτιδες Β, C και Τελομεράση.....	19
4. Σκοπός της εργασίας.....	23
Υλικά και μέθοδοι.....	25
1. Άτομα.....	25
2. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα.....	27
3. Απομόνωση RNA.....	28
4. Ποσοτικοποίηση.....	30
5. Στατιστική ανάλυση.....	35
Αποτελέσματα.....	37
Συζήτηση.....	40
Βιβλιογραφία.....	43
Παράρτημα.....	50

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία διεξήχθη στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα την κ. Τσέζου Ασπασία, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και επιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας, που με δέχθηκε στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, παρέχοντάς μου έτσι τη δυνατότητα να γνωρίσω τον εργαστηριακό χώρο. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την άψογη συνεργασία, την κατανόηση και την πολύτιμη βοήθειά της όσον αφορά στη συγγραφή της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Σάτρα Μαρία για τη βοήθεια που μου παρείχε στο πειραματικό τμήμα της εργασίας, καθώς και για τις επικοινωνιακές διορθώσεις που έκανε στην εργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Μαμούρη Ζήση, Αναπληρωτή Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Κουρέτα Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Περίληψη

Η τελομεράση είναι το ένζυμο που διατηρεί τα άκρα των χρωμοσωμάτων προσθέτοντας εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις (5'-TTAGGG-3'). Η τελομεράση δεν εκφράζεται στα περισσότερα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα. Ωστόσο, παρατηρείται έκφραση σε κύτταρα με μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού, όπως είναι τα λεμφοκύτταρα. Έχει βρεθεί ότι η δραστηριότητα της τελομεράσης σχετίζεται με την έκφραση της hTERT. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της δράσης της τελομεράσης σε καταστάσεις που ενέχονται σε ιογενούς μορφής καρκινογένεση, όπως είναι οι ηπατίτιδες Β και C. Έτσι, πραγματοποιήθηκε ποσοτική έκφραση της hTERT σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με ηπατίτιδα Β και C, καθώς και υγιών ατόμων. Η ποσοτικοποίηση έγινε με την τεχνική της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας τη συσκευή και το λογισμικό του Light Cycler. Παρατηρήθηκαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα hTERT mRNA στους ασθενείς με χρόνια HBV και HCV λοίμωξη σε σχέση με τους υγιείς. Η μειωμένη έκφραση της τελομεράσης που παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη στους ασθενείς με χρόνια HBV και HCV λοίμωξη σε σχέση με τους υγιείς, ενδεχομένως αποτελεί σημείο πρόωρης γήρανσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Επομένως, η εμπλοκή της hTERT πιθανολογείται ότι ενέχεται στην ανοσολογική δυσλειτουργία των ασθενών με χρόνια HBV και HCV λοίμωξη, εφόσον η έκφραση των hTERT mRNA μεταγράφων στα περιφερικά λεμφοκύτταρα των ασθενών ήταν σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τα υγιή άτομα.

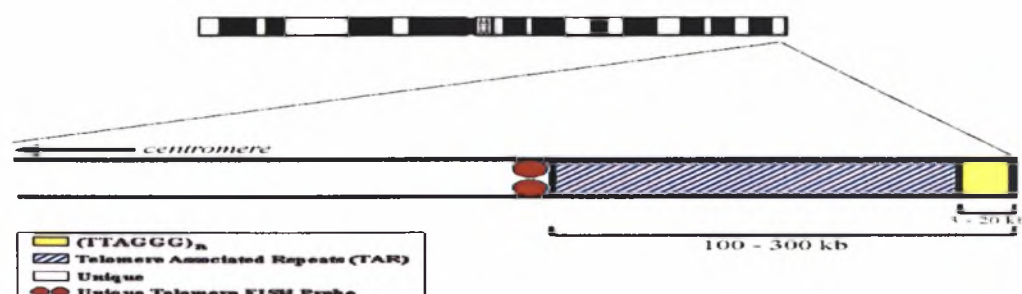
Εισαγωγή

1. Τελομερή

1.1. Δομή τελομερών

Τα τελομερή αποτελούν τα φυσικά άκρα των χρωμοσωμάτων και είναι εξειδικευμένες νουκλεοπρωτεϊνικές δομές, οι οποίες αποτελούνται από μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, καθώς και από πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, στον άνθρωπο τα τελομερή αποτελούνται από εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις με το γενικό τύπο (TTAGGG)_n και έχουν μήκος περίπου 5-10 kb. Στον πυρήνα των κυττάρων του ανθρώπου υπάρχουν 46 χρωμοσώματα με 92 τελομερή, τα οποία εμφανίζουν ποικιλία όσον αφορά στο μήκος τους μεταξύ των διαφόρων χρωμοσωμάτων. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι τα μικρότερα τελομερή βρίσκονται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (De Lange *et al.* 1990, Blackburn 1991, Wright *et al.* 1997, Γεωργάτσος 2001, Bouffler *et al.* 2001).

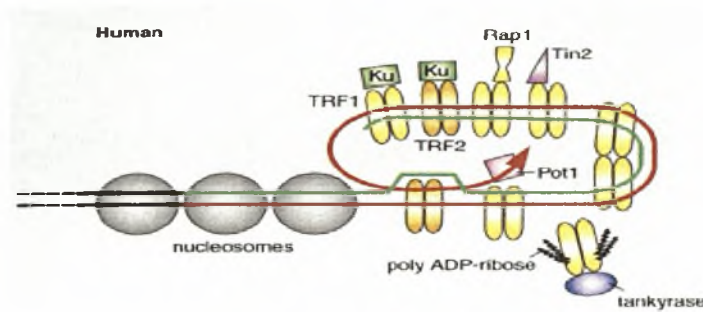
Προχωρώντας από τα τελομερή στο “κυρίως σώμα” του χρωμοσώματος παρατηρείται εκφυλισμός της αλληλουχίας του DNA (εικόνα 1). Πρόκειται για μια περιοχή του DNA που δεν περιέχει πολλά γονίδια και παρουσιάζει ποικιλομορφία μεταξύ των ατόμων. Συγκεκριμένα, στις υποτελομερικές περιοχές ανιχνεύεται μια σειρά 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 (De Lange *et al.* 1990, Blackburn 1991, Wellinger *et al.* 1997, Blackburn 2001).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλουχιών που υπάρχουν στα τελομερή.

Το κύριο χαρακτηριστικό της δομής των τελομερών είναι ο τελομερικός βρόχος (*t-loop*) που σχηματίζεται στο 5' άκρο κάθε χρωμοσωμικού κλώνου. Ο ένας κλώνος των τελομερών παρουσιάζει μία μονόκλωνη προεξοχή στο 3' άκρο του. Η προεξοχή αυτή, η οποία έχει μήκος 150-250 περίπου βάσεων και είναι πλούσια σε γουανίνη, αναδιπλώνεται συναντώντας το δίκλωνο τμήμα του τελομερούς, σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο μία δομή που θυμίζει βρόχο. Έχει προταθεί ότι η αναδίπλωση αυτή λειτουργεί σαν κάλυμμα, προστατεύοντας *in vivo* το άκρο του τελομερούς από τη χρωμοσωμική αστάθεια και τη σύντηξη (Blackburn 2001, Wright *et al.* 1997, De Lange 2002, Griffith *et al.* 1999).

Στη δημιουργία και διατήρηση του σχηματισμού αυτού σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν διάφορες πρωτεΐνες, οι οποίες δεσμεύονται τόσο στο μονόκλωνο άκρο του τελομερούς όσο και στο εσωτερικό δίκλωνο τμήμα (εικόνα 2). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί διάφορες δομικές πρωτεΐνες, συντηρημένες εξελικτικά. Η δέσμευσή τους προστατεύει το DNA των τελομερών από χημική τροποποίηση και από τη δράση νουκλεασών (Blackburn 1991, Blackburn 2001). Αναλυτικότερα, η TRF2 (telomeric repeat-binding factor 2) προσδένεται στο βρόχο εμποδίζοντας τη χρωμοσωμική σύντηξη και σταθεροποιώντας το άκρο του τελομερούς, ενώ συνολικά στην αναδίπλωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και η TRF1 (Blackburn 2001, Wellinger *et al.* 1997, De Lange 2002, Meyerson 2000, Cong *et al.* 2002). Επίσης, η πρωτεΐνη Pot1 προσδένεται στη μονόκλωνη 3' πλούσια σε G προεξοχή έχοντας πιθανώς προστατευτικό ρόλο. Στις πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA των τελομερών προσδένονται 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 (Smith *et al.* 1998, Blackburn 2001, Cong *et al.* 2002).



Εικόνα 2: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των στοιχείων του δομικού συμπλόκου DNA-πρωτεϊνών που απαρτίζουν τα τελομερή. Κόκκινη γραμμή: ο πλούσιος σε G κλώνος των τελομερών που συντίθεται από την τελομεράση, πράσινη γραμμή: ο συμπληρωματικός πλούσιος σε C κλώνος, μαύρες γραμμές: υποτελομερικές περιοχές (Blackburn 2001).

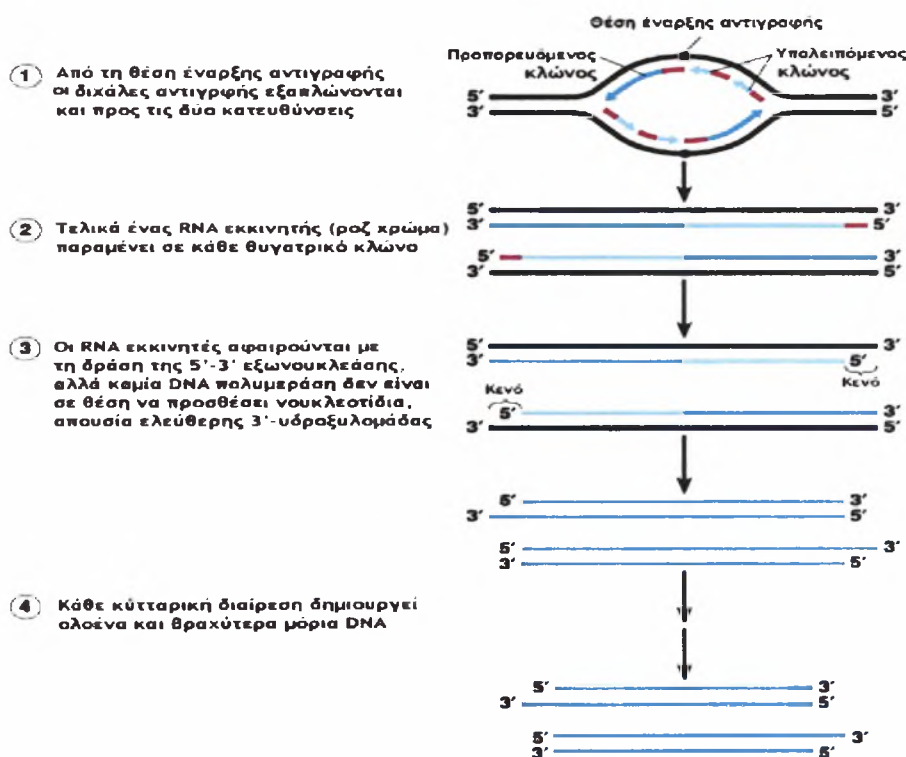
1.2. Ρόλος τελομερών

Τα τελομερή επιτελούν ιδιαίτερα σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Προστατεύουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων από τα ένζυμα επιδιόρθωσης και λειτουργούν σαν ένα μοριακό “κάλυμμα” το οποίο προστατεύει τα χρωμοσώματα από τον ανασυνδυασμό και τη μεταξύ τους σύντηξη παρεμποδίζοντας τη δημιουργία ασταθών 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 των χρωμοσωμάτων μέσα στον πυρήνα. Αποτελούν σημαντική θέση σύνδεσης για πολλά επιδιορθωτικά ένζυμα, όπως BRCA1, RAD50, MRE11, NBS1 και ταυτόχρονα επηρεάζουν τη μεταγραφή των γονιδίων που βρίσκονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Τέλος, λειτουργούν σαν ένας μοριακός μηχανισμός-ρολόι που ρυθμίζει την ικανότητα διαίρεσης των κυττάρων. Όταν τα τελομερή αποκτούν ένα μικρό μήκος, το κύτταρο χάνει την ικανότητά του να διαιρείται και οδηγείται σταδιακά στο θάνατο (De Lange *et al.* 1990, Blackburn 1991, Buys 2000, Cong *et al.* 2002, Erlitzki *et al.* 1999, Wellinger *et al.* 1997, Hodes 2001).

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 είναι η DNA πολυμεράση. 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 3). Αυτό σημαίνει ότι 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*) (Blackburn 1991, Vaziri *et al.* 1993, Allsopp *et al.* 1992, Meyerson 2000, Erlitzki *et al.* 1999).



Εικόνα 3: Ο μοριακός μηχανισμός του προβλήματος της ολοκλήρωσης της αντιγραφής (Addison Wesley Longman 1999).

Συνέπεια 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 τη διαίρεση, με

αποτέλεσμα να εισέρχονται σε διαδικασία απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου. Κάθε τύπος κυττάρου έχει, λοιπόν, έναν περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων τις οποίες μπορεί να υποστεί, γνωστό ως όριο Hayflick (Shay & Wright 2000). 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 γήρανση (Harley 1991). 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, ανεξάρτητα από το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει κάθε κύτταρο στο σημείο αυτό (Granger *et al.* 2002). Στο στάδιο M1 η πλειοψηφία των κυττάρων διαθέτουν τελομερή μήκους 5-10kb (Allsopp & Harley 1995). 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 ιϊκά ογκογονίδια, ο κυτταρικός πληθυσμός είναι δυνατόν να ξεπεράσει το φραγμό που δημιουργεί το στάδιο M1 και να συνεχίσει τη διαίρεση (Shay *et al.* 1991) οδηγώντας τα κύτταρα σε ένα στάδιο έντονης κρίσης που ονομάζεται M2 (*mortality stage 2*). Από το στάδιο αυτό, που χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, πολύ κοντά και δυσλειτουργικά τελομερή και τελικά κυτταρικό θάνατο (Klapper *et al.* 2001), ελάχιστα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να ξεφύγουν μέσω της ενεργοποίησης του ενζύμου της τελομεράσης (Harley 1991, Halvorsen *et al.* 1999). Πιστεύεται, λοιπόν, ότι τα τελομερή λειτουργούν σαν το ρολόι της ζωής του κυττάρου, μιας και επιτρέπουν στα κύτταρα συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων, οπότε αποτρέπουν τη δημιουργία "αθάνατων" κυττάρων (Klapper *et al.* 2001).

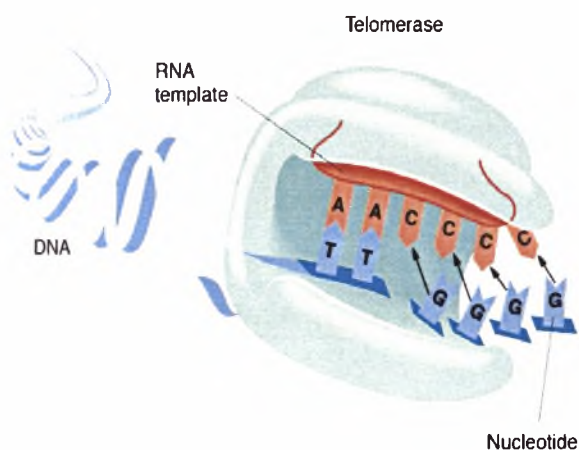
2. Τελομεράση

Για να αποφύγουν τη μείωση του μήκους των τελομερών, πολλά ευκαρυωτικά κύτταρα χρησιμοποιούν μια ειδική αντίστροφη μεταγραφάση, την τελομεράση. Η ονομασία τελομεράση δόθηκε από τους Elizabeth Blackburn και Carol Greider (Γεωργάτσος 2001). Η τελομεράση είναι μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση που διατηρεί το μήκος των τελομερών παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα στα κύτταρα 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 τελομεράσης είναι η διατήρηση της σταθερότητας των τελομερών και επομένως της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Cong *et al.* 2002, Feng *et al.* 1995, Blackburn 1991, Meyerson 2000, Holt *et al.* 1999, Blackburn 2001, Shay & Wright 2001, Γεωργάτσος 2001).

2.1. Δομή τελομεράσης

Η τελομεράση (εικόνα 4) αποτελείται από δύο υπομονάδες, την καταλυτική υπομονάδα hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) που έχει δράση αντίστροφης μεταγραφάσης και το RNA συστατικό που ονομάζεται hTR (human Telomerase RNA), ενώ βιοχημικές και γενετικές μελέτες προτείνουν την ύπαρξη πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση συμβάλλοντας στη δημιουργία ενεργού ολοενζύμου (Blackburn 1991, Feng *et al.* 1995, Shay & Wright 2004, Harrington *et al.* 1997).



Εικόνα 4: Απεικόνιση της δομής της τελομεράσης.

α) RNA υπομονάδα τελομεράσης

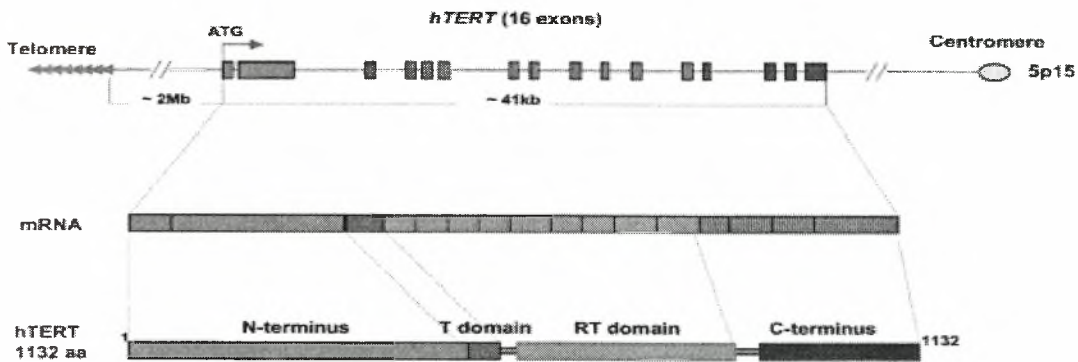
Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση της RNA υπομονάδας της τελομεράσης (hTR) βρίσκεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 3 (3q26) (Soder *et al.* 1997). Στους ανθρώπους, το hTR συστατικό μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση II και το ώριμο mRNA αποτελείται από 451 νουκλεοτίδια. Το τμήμα του hTR που 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'-CUAACCCUAA-3'), ενώ ιδιαίτερη σημασία έχει και η περιοχή που φέρει το όνομα H/ACA και βρίσκεται στο 3' άκρο (Feng *et al.* 1995, Meyerson 2000). Η hTR διαθέτει μία αρκετά σταθερή

δευτεροταγή δομή που εμφανίζεται κατά μεγάλο ποσοστό διατηρημένη μεταξύ εξελικτικά απομακρυσμένων οργανισμών (Chen *et al.* 2000). Επιπλέον, οι συντηρημένες περιοχές στο hTR μόριο αποτελούν θέσεις αναγνώρισης για πρωτεΐνες που προσδένονται στο hTR (hTR binding proteins) (Feng *et al.* 1995, Cong *et al.* 2002). 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 της τελομεράσης (Kyo *et al.* 1999, Takakura *et al.* 1998, Feng *et al.* 1995, Yi *et al.* 1999, Yi *et al.* 2001).

β) Καταλυτική υπομονάδα τελομεράσης (hTERT)

Το γονίδιο hTERT αποτελείται από 16 εξόνια και 15 ιντρόνια και εδράζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (5p15.33), περίπου 2Mb από το τελομερές (εικόνα 5) (Bryce *et al.* 2000, Shay & Wright 2000). Η μεταγραφή γίνεται προς το κεντρομέρος. Το hTERT κωδικοποιεί τη σύνθεση της πρωτεϊνικής υπομονάδας της τελομεράσης. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 127 kD 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 της (Kilian *et al.* 1997, Lingner *et al.* 1997, Nakamura & Cech 1998). Πιθανότατα, η κεντρική μαζί με την καρβοξυτελική περιοχή σχηματίζουν χαρακτηριστική δομή στις πολυμεράσες και τις ανάστροφες μεταγραφάσες που περιβάλλει την έλικα του DNA (Huard *et al.* 2003, Hossain *et al.* 2002). Στο μεγάλο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης πρόσφατα αναγνωρίσθηκε μία περιοχή, η N-GQ, η οποία διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο κατά την πρόσδεση του ενζύμου στο 5' άκρο του DNA (Lue 2005). Η περιοχή N-GQ θεωρείται απαραίτητη για τη δράση της hTERT. Η έκφραση του mRNA που κωδικοποιεί για την hTERT σχετίζεται με τη δραστηριότητα της τελομεράσης (Harrington *et al.* 1997, Meyerson *et al.* 1997, Stanta *et al.* 1999, Holt *et al.* 1999, Yi *et al.* 1999, Yi *et al.* 2001, Cong *et al.* 2002), ενώ το γονίδιο hTERT δεν εκφράζεται πάντοτε και σταθερά, σε αντίθεση με την hTR. Ο κύριος ρόλος της hTERT είναι η αύξηση και διατήρηση του μήκους των τελομερών (Blackburn 2001, Chan & Blackburn 2004), αλλά έχει προταθεί ότι η hTERT έχει αντι-αποπτωτική δράση στο κύτταρο (Cao *et al.* 2002, Forsythe *et al.* 2002, Smith *et al.* 2003). Χαρακτηριστική είναι η αύξηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (*Epidermal Growth*

Factor Receptor, EGFR) σε κύτταρα στα οποία έγινε εξωγενής επαγωγή της έκφρασης της hTERT (Smith *et al.* 2003). Επιπλέον, η ίδια η hTERT αυξάνει τη σταθερότητα του γενετικού υλικού υποβοηθώντας, αν όχι συμμετέχοντας, στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς (Sharma *et al.* 2003).

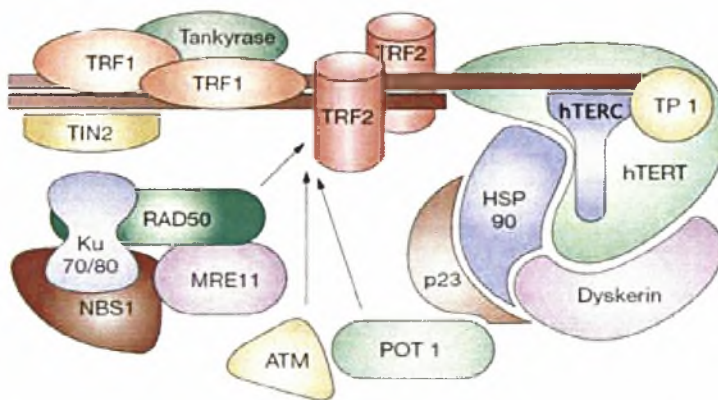


Εικόνα 5: Οργάνωση του hTERT γονιδίου (Cong 2002).

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 στη ρύθμιση του μήκους τους καθώς και στην προστασία και επιδιόρθωση του DNA (Greider & Blackburn 2004). Επιπλέον, υπάρχουν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση και οι οποίες ενδεχομένως εμπλέκονται στη δημιουργία δραστικής τελομεράσης ή στην αποτελεσματική πρόσβασή της στο τελομερές (Blackburn 2001, Cong *et al.* 2002). 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 που αλληλεπιδρά με την τελομεράση άμεσα ή έμμεσα μέσω άλλων πρωτεϊνών και σχετίζεται με τη δραστηριότητα της τελομεράσης (Harrington *et al.* 1997, Holt *et al.* 1999, Bryce *et al.* 2000, Cong *et al.* 2002). Ένα άλλο σύμπλεγμα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση είναι οι 14-3-3 πρωτεΐνες. Η αλληλεπίδραση γίνεται μέσω των καρβοξυτελικών τους άκρων, ενώ ρόλος τους είναι η προώθηση της hTERT στον πυρήνα (Cong *et al.* 2002, Aisner *et al.* 2002).

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. Η λίστα κάποιων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση φαίνονται στην εικόνα 6 (Aisner *et al.* 2002, Cong *et al.* 2002).

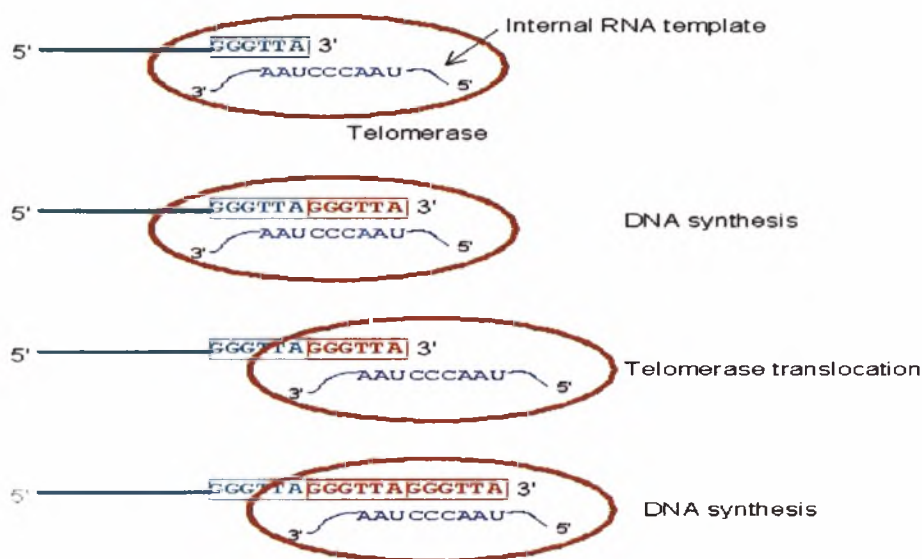


Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στα τελομερή και στην τελομεράση (Keith et al. 2002).

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 (Greider 1996). Αναλυτικότερα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 7, δημιουργούνται ζεύγη βάσεων μεταξύ των συμπληρωματικών περιοχών της RNA υπομονάδας και των τελομερών (binding). Στη συνέχεια επιμηκύνεται το χρωμοσωμικό τμήμα χρησιμοποιώντας το “καλούπι” του RNA (polymerization) και τελικά το ένζυμο προχωρά (translocation) προς την 3' κατεύθυνση για να πραγματοποιήσει ξανά τη σύνδεση και τον πολυμερισμό. Μετά την επιμήκυνση της τελομερικής ακολουθίας στο μητρικό μόριο DNA, μπορεί να συνεχιστεί η αντιγραφή του DNA στο 3' άκρο της ασυνεχούς αλυσίδας του θυγατρικού μορίου, με τη δράση της DNA

πολυμεράσης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για να προστεθούν περισσότερες επαναλήψεις τελομερών. Συμπερασματικά, η τελομεράση συνθέτει τον πλούσιο σε G κλώνο των τελομερών κατά την κατεύθυνση 5' προς 3' (Γεωργάτσος 2001, Blackburn 1991, Meyerson 2000, Buys 2000).



Εικόνα 7: Σύνθεση των τελομερών από την τελομεράση.

2.3. Έκφραση της τελομεράσης

Στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα η δραστικότητα της τελομεράσης ρυθμίζεται αυστηρά κατά την ανάπτυξη, ενώ η δραστικότητα της τελομεράσης καταστέλλεται κατά την εμβρυονική διαφοροποίηση στα περισσότερα σωματικά κύτταρα (Wright *et al.* 1996). 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 (Blackburn 1991, Harle-Bachor *et al.* 1996, Counter *et al.* 1995, Meyerson *et al.* 1997, Meyerson 2000, Buys 2000, Bryce *et al.* 2000, Shay & Wright 2001, Cong *et al.* 2002).

2.4. Ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης

Η hTR υπομονάδα της τελομεράσης εκφράζεται σε όλους τους ιστούς ανεξάρτητα από τη δραστικότητα της τελομεράσης (Feng *et al.* 1995, Yi *et al.* 1999, Yi *et al.* 2001). Στα καρκινικά κύτταρα η έκφραση του hTR είναι 5 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των φυσιολογικών (Yi *et al.* 1999). Ενώ η RNA υπομονάδα της τελομεράσης εκφράζεται τόσο σε κύτταρα που έχουν δραστικότητα του ενζύμου, όσο και σε κύτταρα που δεν έχουν, η καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης σχετίζεται με τη δραστικότητα του ενζύμου (Stanta *et al.* 1999). Η ενεργοποίηση της τελομεράσης γίνεται με επαγωγή της έκφρασης του hTERT. Έτσι, η έκφραση του hTERT είναι σημείο κλειδί στη ρύθμιση της δραστικότητας της τελομεράσης (Meyerson *et al.* 1997, Holt *et al.* 1999, Meyerson 2000, Yi *et al.* 1999, Yi *et al.* 2001, Cong *et al.* 2002).

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 (Cong *et al.* 1999). Αναλυτικότερα, η περιοχή του υποκινητή στερείται TATA-box και, όπως συμβαίνει συχνά σε αυτές τις περιπτώσεις, διαθέτει πυκνές CpG νησίδες, θέσεις Sp1 και δύο συγκεκριμένες αλληλουχίες (CACGTG) που ονομάζονται E-boxes και αποτελούν θέσεις πρόσδεσης για τους παράγοντες Myc/Max/Mad (Cong *et al.* 1999, Horikawa *et al.* 1999). Εκτός των ανωτέρω θέσεων πρόσδεσης, έχουν εντοπιστεί και άλλες θέσεις που αντιστοιχούν στα οιστρογόνα, την προγεστερόνη, την MZF-2, την WT1 κ.ά. Άλλες από αυτές ασκούν θετική και άλλες αρνητική επίδραση στη ρύθμιση της μεταγραφής της hTERT. Επιπλέον, στο χρωμόσωμα 3 έχει εντοπιστεί ένα γονίδιο, το προϊόν του οποίου δρα ανασταλτικά, αλλά ακόμη δεν έχει καταστεί δυνατή η ταυτοποίησή του (Horikawa *et al.* 2002). Η πληθώρα των μεταγραφικών παραγόντων που επηρεάζουν -θετικά ή αρνητικά- την έκφραση της hTERT και επομένως τη δράση της τελομεράσης αντικατοπτρίζει την πολυπλοκότητα των μηχανισμών ρύθμισης του συγκεκριμένου γονιδίου (Cong *et al.* 2002).

2.5. Λεμφοκύτταρα και τελομεράση

Ένας από τους ουσιαστικούς ρόλους των λεμφοκυττάρων είναι και η συμμετοχή τους στους ειδικούς αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Είναι ικανά να αναγνωρίζουν το ειδικό ξένο σώμα, το αντιγόνο, εναντίον του οποίου θα επιτεθούν. Η ικανότητα των λεμφοκυττάρων να διακρίνουν το ένα αντιγόνο από το άλλο προσφέρει την ειδικότητα όσον αφορά στις ανοσολογικές αποκρίσεις. Μια τυπική ειδική

ανοσολογική απόκριση μπορεί να διαιρεθεί σε τρία στάδια: 1) συνάντηση και αναγνώριση του αντιγόνου από τα λεμφοκύτταρα, η οποία επιτυγχάνεται με τη σύνθεση από το κάθε λεμφοκύτταρο ενός τύπου υποδοχέα ο οποίος έχει την ικανότητα να συνδέεται με ένα ειδικό αντιγόνο. 2) λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση, κατά την οποία συμβαίνουν συνεχείς διαιρέσεις του αρχικού συνδεδεμένου με το αντιγόνο λεμφοκυττάρου. Αποτέλεσμα των διαιρέσεων είναι η κλωνική επέκταση, δηλαδή ο σχηματισμός πολλών λεμφοκυττάρων, πανομοιότυπων με αυτό από το οποίο άρχισαν οι κύκλοι της κυτταρικής διαίρεσης, τα οποία μπορούν να αναγνωρίζουν το αντιγόνο. Μετά την ενεργοποίηση, τα Β λεμφοκύτταρα και τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα λειτουργούν ως τελεστικά λεμφοκύτταρα, ενώ τα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες που ενισχύουν την ενεργοποίηση και τη λειτουργία των Β κυττάρων και των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων. 3) επίθεση, η οποία εξαπολύεται από τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα. Όταν ολοκληρωθεί επιτυχώς η ανοσολογική επίθεση, η μεγάλη πλειονότητα των λεμφοκυττάρων θανατώνονται, εκτός από ορισμένα από αυτά που παραμένουν ως κύτταρα μνήμης και τα οποία είναι έτοιμα να απαντήσουν στην επανεμφάνιση του ίδιου αντιγόνου στο μέλλον (Vander 2001, Roitt 2000).

Όλα τα λεμφοκύτταρα προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών. Τα Τ λεμφοκύτταρα εξελίσσονται στο θύμο, ενώ τα Β των θηλαστικών διαφοροποιούνται στο ήπαρ των εμβρύων, ενώ μετά τη γέννηση στο μυελό των οστών (Roitt 2000). Τα λεμφοκύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα, όμως, σε οποιαδήποτε στιγμή η πλειονότητά τους δεν είναι στο αίμα, αλλά στα λεμφοειδή όργανα (πρωτογενή λεμφοειδή όργανα: μυελός των οστών, θύμος, δευτερογενή λεμφοειδή όργανα: λεμφαδένες, σπλήνας, αμυγδαλές, συσσωρεύσεις λεμφοκυττάρων στους βλεννογόνους του εντερικού, αναπνευστικού, γεννητικού και ουροποιητικού σωλήνα). Μερικά από τα λεμφοκύτταρα του αίματος είναι κύτταρα που βρίσκονται καθ' οδόν από το μυελό των οστών ή το θύμο προς τα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα, αλλά η μεγάλη πλειοψηφία αυτών των λεμφοκυττάρων είναι κύτταρα που συμμετέχουν στην κυκλοφορία μεταξύ των δευτερογενών λεμφοειδών οργάνων, του αίματος, της λέμφου και όλων των ιστών του σώματος (Vander 2001).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η τελομεράση εκφράζεται σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους φυσιολογικών ιστών. Ένας από αυτούς είναι και τα λεμφοκύτταρα. 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* (Weng *et al.* 1996, Counter 1995, Yamada *et al.* 1996). Ενώ επομένως

παρατηρείται δραστικότητα της τελομεράσης, παραδόξως, μπορεί να παρατηρηθεί και μείωση του μήκους των τελομερών. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η τελομεράση δρα προστατεύοντας τα τελομερή κατά ένα μέρος, με αποτέλεσμα ο ρυθμός μείωσης των τελομερών να είναι μικρότερος από ότι θα ήταν απουσία του ενζύμου (Weng *et al.* 1996). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι το μήκος των τελομερών των λεμφοκυττάρων σχετίζεται με τον αριθμό των μέχρι τώρα διαιρέσεών τους, αλλά και με τον ικανό αριθμό μελλοντικών διαιρέσεών τους. Το μήκος των τελομερών στα περιφερικά T λεμφοκύτταρα μειώνεται κατά τη διαφοροποίησή τους σε T κύτταρα μνήμης (Weng *et al.* 1995, Weng *et al.* 1997, Hodes *et al.* 2002). Αντίθετα, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στο μήκος των τελομερών μεταξύ αρχικών B λεμφοκυττάρων και B κυττάρων μνήμης, ενώ και οι δύο υποπληθυσμοί κυττάρων μπορούν να επάγουν δραστικότητα τελομεράσης σε περίπου ίδια επίπεδα μετά από *in vitro* ενεργοποίηση (Weng *et al.* 1997, Son *et al.* 2003).

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 (Weng *et al.* 1996, Weng *et al.* 1997). Παρόλα αυτά, τα περιφερικά λεμφοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα να επάγουν παροδικά την έκφραση της τελομεράσης τους με έναν ελεγχόμενο τρόπο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της ενεργοποίησής τους. Κατά συνέπεια, η έκφραση της τελομεράσης στα φυσιολογικά ανθρώπινα λεμφοκύτταρα είναι αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη και επάγεται μετά από ενεργοποίηση. Η λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση προκαλεί αύξηση της RNA υπομονάδας της τελομεράσης, η οποία τελικά οδηγεί σε αύξηση της ολικής δραστικότητας του ενζύμου (Weng *et al.* 1996, Weng *et al.* 1997, Yamada *et al.* 1996, Holt *et al.* 1999, Weng 1999, Hodes *et al.* 2002).

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 ανάπτυξη επαρκούς ανοσολογικής απόκρισης στην έκθεση του αντιγόνου απαιτεί υψηλό βαθμό κυτταρικής διαίρεσης και κλωνικής επέκτασης των λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τους ειδικούς για το αντιγόνο υποδοχείς. Έτσι, 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

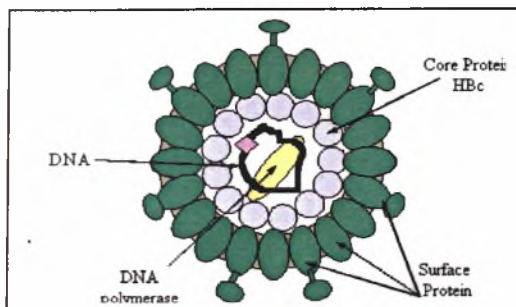
λεμφοκυττάρων και επομένως στην ανοσολογική απόκριση. Το αν το ανοσοποιητικό σύστημα επηρεάζεται από το μήκος των τελομερών και, κατ' επέκταση από την τελομεράση, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη, καθ' ότι οι παρατηρήσεις που οδηγούν σε αυτό το συμπέρασμα προέκυψαν από γενετικά τροποποιημένα συστήματα και επομένως δεν μπορούν να δώσουν απάντηση για το τί συμβαίνει σε φυσιολογικούς ανθρώπους ή σε ζωικά μοντέλα (Weng *et al.* 1996, Yamada *et al.* 1996, Weng *et al.* 1997, Hodes *et al.* 2002).

Αντιθέτως, αν η έκφραση της τελομεράσης είναι μη ανιχνεύσιμη, παρατηρείται εκτεταμένη μείωση των τελομερών. Κατά συνέπεια, η ρύθμιση του μήκους των τελομερών στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη δραστικότητα της τελομεράσης (Weng *et al.* 1997). 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 με τον ιό της ηπατίτιδας B (Weng 1999, Fan *et al.* 2000).

3. Ηπατίτιδες B, C και Τελομεράση

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC: hepatocellular carcinoma) αποτελεί έναν από τους πιο συχνούς τύπους καρκίνου. Περίπου το 90% των περιπτώσεων HCC σχετίζεται με μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας B (HBV: hepatitis B virus). Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο η HBV λοίμωξη οδηγεί στην ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (Zhang *et al.* 2004).

Ο ιός της ηπατίτιδας B 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 φάκελο. Το πλήρες σωματίδιο του ιού της ηπατίτιδας B, το βίριο, είναι σχεδόν σφαιρικό με διάμετρο 42nm και είναι γνωστό ως σωματίδιο του Dane (Waris *et al.* 2003, Seeger *et al.* 2000, Αντωνιάδης 1999, Σπαντίδος 1998, Zakim 1996). Στην εικόνα 8 παρουσιάζεται το σωματίδιο του ιού της ηπατίτιδας B.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση του ιού της ηπατίτιδας Β. Το εξωτερικό περίβλημα (ή φάκελος) αποτελείται από πολλές πρωτεΐνες γνωστές ως HBs ή επιφανειακές πρωτεΐνες. Ο φάκελος περιβάλλει ένα εσωτερικό πρωτεϊνικό στρώμα που αποτελείται από την HBc πρωτεΐνη. Το στρώμα αυτό είναι γνωστό ως *core particle* ή

νουκλεοκαψίδιο. Το νουκλεοκαψίδιο περιβάλλει το ιικό DNA καθώς και την ιική DNA πολυμεράση.

Το HBV γονιδίωμα διαθέτει τέσσερα αλληλεπικαλυπτόμενα πλαίσια ανάγνωσης που κωδικοποιούν για δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Το γονιδίωμα του ιού προκύπτει με αντίστροφη μεταγραφή από ένα RNA προγονιδίωμα και προσβάλλει κυρίως ανθρώπινα ηπατοκύτταρα. Η μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος ελέγχεται από τέσσερις προαγωγείς και δύο ενισχυτές. Η ρύθμιση της ιικής έκφρασης πραγματοποιείται και στο επίπεδο της μετάφρασης. Το προγονιδίωμα λειτουργεί ως το mRNA όχι μόνο της ιικής πρωτεΐνης, αλλά και της ιικής πολυμεράσης (Zhang *et al.* 2004, Waris *et al.* 2003).

Συγκεκριμένα, το HBV γονιδίωμα κωδικοποιεί για τέσσερα γονίδια, τα C, S, P και X. Το C γονίδιο κωδικοποιεί για την κυρίως πρωτεΐνη (HBc) και το αντιγόνο e του ορού (HBeAg). Η HBc αποτελεί πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου και σχετίζεται με τη μολυσματικότητα του ιού. Το αντιγόνο HBeAg ταυτίζεται με τον ενεργό πολλαπλασιασμό του ιού. Το S γονίδιο κωδικοποιεί για τρεις πρωτεΐνες της επιφάνειας του φακέλου, τις S, M και L. Το επιφανειακό αντιγόνο του ιού s (HbsAg) που είναι γνωστό και ως αυστραλιανό αντιγόνο αποτελεί το εξωτερικό περίβλημα του ιού. Το P γονίδιο κωδικοποιεί για την ιική DNA πολυμεράση. Το αμινοτελικό της άκρο συμβάλλει στο πακετάρισμα του προγονιδιωμικού RNA (pgRNA) και δρα ως εκκινητής για την έναρξη της αντιγραφής, ενώ το καρβοξυτελικό της άκρο δρα ως αντίστροφη μεταγραφάση και ως RNase H (Waris *et al.* 2003, Seeger *et al.* 2000).

Το X γονίδιο κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 16,5kD. Η πρωτεΐνη X διαδραματίζει κύριο ρόλο στην ηπατική ογκογένεση. Συμβάλλει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του ιού καθώς αλληλεπιδρά με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, δρώντας ως μεταγραφικός ενεργοποιητής. Έχει δείχθει ότι η HBX trans-ενεργοποιεί ιικούς και κυτταρικούς προαγωγείς, όπως για παράδειγμα τους προαγωγείς της RNA πολυμεράσης II και της RNA πολυμεράσης III. Έτσι, η HBX όχι μόνο επάγει την HBV γονιδιακή έκφραση με trans-ενεργοποίηση του HBV ενισχυτή, αλλά επιπλέον trans-

ενεργοποιεί κυτταρικά γονίδια στα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα επάγοντας τον πολλαπλασιασμό του ιού. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την άποψη ότι η πρωτεΐνη X συμβάλλει στην παθογένεση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Zhang *et al.* 2004, Waris *et al.* 2003, Seeger *et al.* 2000).

Η πρωτεΐνη X δεν προσδένεται απευθείας στο DNA, αλλά δρα μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Κατ' επέκταση, οι πρωτεϊνικές αυτές αλληλεπιδράσεις είναι ιδιαίτερα σημαντικές στην HBX trans-ενεργοποίηση. Στις πρωτεΐνες που δεσμεύουν την HBX περιλαμβάνονται μεταγραφικοί παράγοντες όπως η TATA-binding protein (TBP), η RNA πολυμεράση II (RPB5), το cAMP response element binding (CREB/ATF2), το Oct-1, η πρωτεΐνη επιδιόρθωσης DNA, η ultraviolet damaged DNA binding protein (UV-DDB) και η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Η HBX επάγει τη μεταγραφή τροποποιώντας κυτταροπλασματικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος όπως αυτά της AP-1/PKC και των Ras-Raf-MAP κινασών. Η HBX βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, γεγονός που υποδεικνύει το διπλό ρόλο της στη μεταγραφική ρύθμιση. Η πυρηνική HBX πιθανώς δρα σε επίπεδο προαγωγέα, ενώ η κυτταροπλασματική επηρεάζει τη ρύθμιση των δεύτερων μηνυμάτων. Παρόλα αυτά, η δράση της πρωτεΐνης X στην αθανатоποίηση των ηπατοκυττάρων δεν είναι ακόμη γνωστή (Zhang *et al.* 2004).

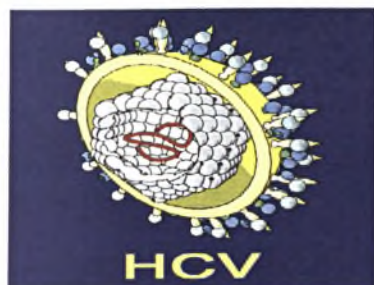
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης hTERT είναι αυτή που σχετίζεται με τη δραστικότητα του ενζύμου. Έχει βρεθεί ότι η δραστικότητα της τελομεράσης και η απόπτωση σε κύτταρα ηπατώματος επηρεάζονται από το HBx γονίδιο. Πιο συγκεκριμένα, η HBX επάγει την έκφραση και τη δραστικότητα της hTERT σε κύτταρα ηπατώματος μέσω της c-Myc. Η c-Myc πρωτεΐνη προσδένεται σε δύο θέσεις πρόσδεσης c-Myc στον προαγωγέα του γονιδίου της hTERT, με αποτέλεσμα να επάγει την έκφραση του hTERT γονιδίου και επομένως να αυξάνει τη δραστικότητα της τελομεράσης. Έχει παρατηρηθεί ότι η HBX αυξάνει την έκφραση του c-myc σε κύτταρα ηπατώματος, με αποτέλεσμα να αυξάνεται και η έκφραση της τελομεράσης (Zhang *et al.* 2004, Ferber *et al.* 2003).

Το γονίδιο hTERT εκτός από την trans-ενεργοποίηση που υφίσταται από πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ιούς (HBV), μπορεί να αποτελέσει και στόχο ενός μηχανισμού cis-ενεργοποίησης. Το γονιδίωμα του HBV ενσωματώνεται στον προαγωγέα του hTERT γονιδίου στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Το hTERT mRNA μεταγράφεται από τον κυτταρικό προαγωγέα αλλά και από τον προαγωγέα του ιού. Ο ενισχυτής του HBV, ο οποίος βρίσκεται περίπου 1,6kb της θέσης έναρξης της

μεταγραφής του hTERT, είναι υπεύθυνος για τη cis-ενεργοποίηση της hTERT μεταγραφής στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Horikawa *et al.* 2003).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ενεργοποίηση της τελομεράσης συμβαίνει στις περισσότερες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένων των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%. Το γεγονός αυτό καθιστά την επανενεργοποίηση της τελομεράσης ένα ρυθμο-περιοριστικό βήμα στην καρκινογένεση. Στους μη καρκινικούς ηπατικούς ιστούς που περιβάλλουν τον καρκινικό ιστό δεν παρατηρείται δραστικότητα της τελομεράσης. Επομένως, η ενεργοποίηση της τελομεράσης συμβαίνει στο καρκινικό στάδιο. Η δραστικότητα της τελομεράσης έχει ταυτοποιηθεί ως ένας προγνωστικός δείκτης για το HCC. Η ύπαρξη δραστικού ενζύμου σε διπλανούς μη καρκινικούς ιστούς σε ασθενείς με HCC που είχαν υποστεί μερική ηπατεκτομή υποδηλώνει επανεμφάνιση του καρκίνου. Αυτό πιθανώς οφείλεται σε μικρομετάσταση HCC κυττάρων με δραστικότητα τελομεράσης. Στο μοριακό επίπεδο, η ενεργοποίηση του c-myc και η ενσωμάτωση του HBV στον προαγωγέα του hTERT γονιδίου έχουν συνδεθεί με την επανενεργοποίηση της τελομεράσης στο HCC. Ορισμένες μελέτες που έρχονται σε αντίθεση με την επανενεργοποίηση της τελομεράσης, έδειξαν μικρότερα τελομερή στο HCC σε σχέση με τους περιβάλλοντες μη καρκινικούς ηπατικούς ιστούς χωρίς κίρρωση. Επιπλέον, έδειξαν ότι η ελάττωση των τελομερών στο HCC επηρεάζει τα ηπατοκύτταρα και ότι οφείλεται σε ανευπλοειδίες, ένα συνηθισμένο δείκτη χρωμοσωμικής αστάθειας. Στους ανθρώπινους κακοήθεις όγκους, συμπεριλαμβανομένου του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, παρατηρούνται υψηλά επίπεδα δραστικότητας της τελομεράσης, αλλά ταυτόχρονα σημαντικά μειωμένα τελομερή. Πειράματα σε ποντικούς έδειξαν διαφορετικά αποτελέσματα της ελάττωσης των τελομερών στην έναρξη και την πρόοδο των όγκων (Satyanarayana *et al.* 2004).

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 γονιδίωμά του αποτελείται από ένα 9,6 kb ευθύγραμμο μονόκλωνο μόριο RNA 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. Στην εικόνα 11 παρουσιάζεται το σωματίδιο του ιού της ηπατίτιδας C.



***Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση του ιού της ηπατίτιδας C. Το σωματίδιο του ιού είναι σφαιρικό με διάμετρο 30-60nm. Το μονόκλωνο RNA περιβάλλεται από νουκλεοκαψίδιο και αυτό από φάκελο.*

Το ιικό RNA αποτελείται από μία 5' μη κωδικοποιούσα περιοχή (NCR: non-coding region), ένα μονάχα πλαίσιο ανάγνωσης το οποίο κωδικοποιεί για την πολυπρωτεΐνη του ιού και από μία 3' NCR. Η 5' NCR, η οποία είναι ιδιαίτερα συντηρημένη, ρυθμίζει τη μετάφραση της ιικής πολυπρωτεΐνης μέσω της περιοχής IRES (internal ribosome entry site) στην οποία συνδέονται το ριβόσωμα και οι πρωτεΐνες του ξενιστή για την έναρξη της μεταγραφής. Η HCV πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται σε τρεις τουλάχιστον δομικές και έξι μη δομικές πρωτεΐνες (Αντωνιάδης 1999, Waris *et al.* 2003, Σπαντίδος 1998, Zakim 1996).

4. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης της τελομεράσης και ειδικότερα της καταλυτικής της υπομονάδας σε καταστάσεις που ενέχονται σε ιογενή καρκινογένεση.

Πιο ειδικά, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε (α) η μελέτη της έκφρασης των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης σε ασθενείς με HBV ή HCV λοίμωξη και η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της hTERT με φυσιολογικά άτομα καθώς και

(β) η σύγκριση των επιπέδων των hTERT mRNA μεταγράφων μεταξύ των ανωτέρω ομάδων και των κλινικών στοιχείων κάθε ατόμου.

Για το σκοπό αυτό έγινε ποσοτικοποίηση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β και C με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη εργασία αποτελεί αρχικό μέρος μιας ευρύτερης μελέτης που περιλαμβάνει ποσοτικοποίηση της έκφρασης της

hTERT σε βιοψίες ήπατος ασθενών με ηπατίτιδα Β και C αλλά και ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Άτομα

I. Γενικά

Στη μελέτη αυτή έλαβαν μέρος 41 ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες Β και C, οι οποίοι ήταν υπό παρακολούθηση στην Ηπατολογική Μονάδα της Παθολογικής Κλινικής του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Από το σύνολο των ασθενών, 17 άτομα είχαν μολυνθεί με τον ιό HBV και 24 άτομα με τον ιό HCV. Η ομάδα με HBV λοίμωξη περιελάμβανε 9 άνδρες και 8 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας 53.2 έτη, ενώ η ομάδα με HCV λοίμωξη περιελάμβανε 8 άνδρες και 16 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας 47.5 έτη. Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε λάβει αντιϊκή θεραπεία για τουλάχιστον 12 μήνες πριν την είσοδό του στη μελέτη.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και μια ομάδα ελέγχου την οποία αποτελούσαν 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 (26.5 ± 5.3 U/l), χωρίς ιστορικό HBV, HCV ή HIV λοίμωξης, αλκοολικής, αυτοάνοσης ή προκαλούμενης από φάρμακα ηπατοπάθειας, όπως αποδείχθηκε με τη χρήση των αντίστοιχων kit (anti-HCV, Murex Diagnostics, Temple Hill, Dartford, UK και anti-HIV, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Γερμανία).

II. Κατάταξη

Οι ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες διαχωρίστηκαν σε τρεις κλινικές ομάδες:

I) Ομάδα ανενεργών φορέων. Η κατηγορία αυτή περιελάμβανε 18 άτομα, από τα οποία 8 είχαν μολυνθεί με HBV και 10 με HCV. Όλοι οι ασθενείς διέθεταν φυσιολογικά επίπεδα αμινοτρανσφερασών, τα οποία προσδιορίζοντο ανά τρίμηνο και τουλάχιστον 12 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη.

II) Ομάδα χρόνιας ηπατίτιδας. Η κατηγορία αυτή περιελάμβανε 15 άτομα, από τα οποία 7 είχαν μολυνθεί με HBV και 8 με HCV. Όλοι οι ασθενείς είχαν χρόνια ηπατίτιδα Β και C με βάση ιστολογικά, ιολογικά και βιοχημικά ευρήματα.

III) Ομάδα κίρρωσης. Η κατηγορία αυτή περιελάμβανε 8 άτομα, από τα οποία 2 είχαν μολυνθεί με HBV και 6 με HCV. Όλοι οι ασθενείς εμφάνιζαν κίρρωση.

III. Διάγνωση για HBV

Η διάγνωση της χρόνιας HBV λοίμωξης βασίστηκε σε κλινική, εργαστηριακή και ιστολογική εκτίμηση σύμφωνα με διεθνή κριτήρια (J Hepatol 2003;38:533-540). Οι ασθενείς που χαρακτηρίστηκαν ως χρόνιοι ανενεργοί φορείς HBV (n=8) παρουσίαζαν:

- α) αντίδραση στο αντιγόνο επιφανείας του ιού της ηπατίτιδας Β (HbsAg, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Γερμανία)
- β) φυσιολογικά επίπεδα αμινοτρανσφερασών και
- γ) χαμηλά επίπεδα HBV-DNA στον ορό ($<10^5$ αντίγραφα/ml), γεγονός που αποδεικνύει έλλειψη ιϊκού πολλαπλασιασμού. Ο προσδιορισμός του επιπέδου του HBV-DNA πραγματοποιήθηκε με την τεχνική PCR και με εμπορικά διαθέσιμο kit (Cobas Amplicor HBV Monitor, Roche, cut off: 200 αντίγραφα/ml).

Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (n=7) παρουσίαζαν:

- α) ορολογικά ευρήματα χρόνιας μόλυνσης με HBV για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη. Ο προσδιορισμός των ευρημάτων πραγματοποιήθηκε με μικροσωματιδιακή ELISA (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Γερμανία)
- β) ενεργό ιϊκό πολλαπλασιασμό, καθώς ανιχνεύτηκαν HBV-DNA ($>10^5$ αντίγραφα/ml)
- γ) αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT, τουλάχιστον 2 φορές πάνω από το κανονικό) για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη και
- δ) χρόνια ηπατίτιδα Β χωρίς ένδειξη κίρρωσης όπως προέκυψε από ιστολογικά ευρήματα.

Οι ασθενείς με κίρρωση εξαιτίας HBV λοίμωξης (n=2) παρουσίαζαν:

- α) ορολογικά ευρήματα χρόνιας μόλυνσης με HBV για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη. Ο προσδιορισμός των ευρημάτων πραγματοποιήθηκε με μικροσωματιδιακή ELISA (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Γερμανία)
- β) ενεργό ιϊκό πολλαπλασιασμό, καθώς ανιχνεύτηκαν HBV-DNA ($>10^5$ αντίγραφα/ml)
- γ) αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT, τουλάχιστον 2 φορές πάνω από το κανονικό) για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη και
- δ) ιστολογικά ευρήματα που αποδείκνυαν την κίρρωση του ήπατος.

Η μέση διάρκεια της ασθένειας στους HBV ασθενείς ήταν $93 \pm 74,9$ μήνες, ενώ κανένας από τους ασθενείς δεν είχε παρουσιάσει κλινικά, εργαστηριακά ή ακτινολογικά ευρήματα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

IV. Διάγνωση για HCV

Η διάγνωση της χρόνιας HCV λοίμωξης βασίστηκε σε κλινική, εργαστηριακή και ιστολογική εκτίμηση. Όλοι οι ασθενείς ($n=24$) με HCV που μελετήθηκαν παρουσίαζαν:

- α) ορολογικά ευρήματα χρόνιας λοίμωξης με HCV όπως προέκυψε από την ανίχνευση αντισωμάτων anti-HCV χρησιμοποιώντας μικροσωματιδιακή ELISA. Η εξέταση πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον δύο φορές μέσα σε έξι μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη,
- β) ενεργή αντιγραφή του ιού καθώς ανιχνεύτηκαν HCV RNA, με χρήση ενός εμπορικά διαθέσιμου PCR kit (HCV Monitoring Cobas Amplicor, Roche, cut off 50 U/ml).

Η μέση διάρκεια της ασθένειας στους HCV ασθενείς ήταν $41.5 \pm 32,5$ μήνες, ενώ κανένας από τους HCV ασθενείς δεν ήταν θετικός για HbsAg ή anti-HIV, ούτε είχε παρουσιάσει κλινικά, εργαστηριακά ή ακτινολογικά ευρήματα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

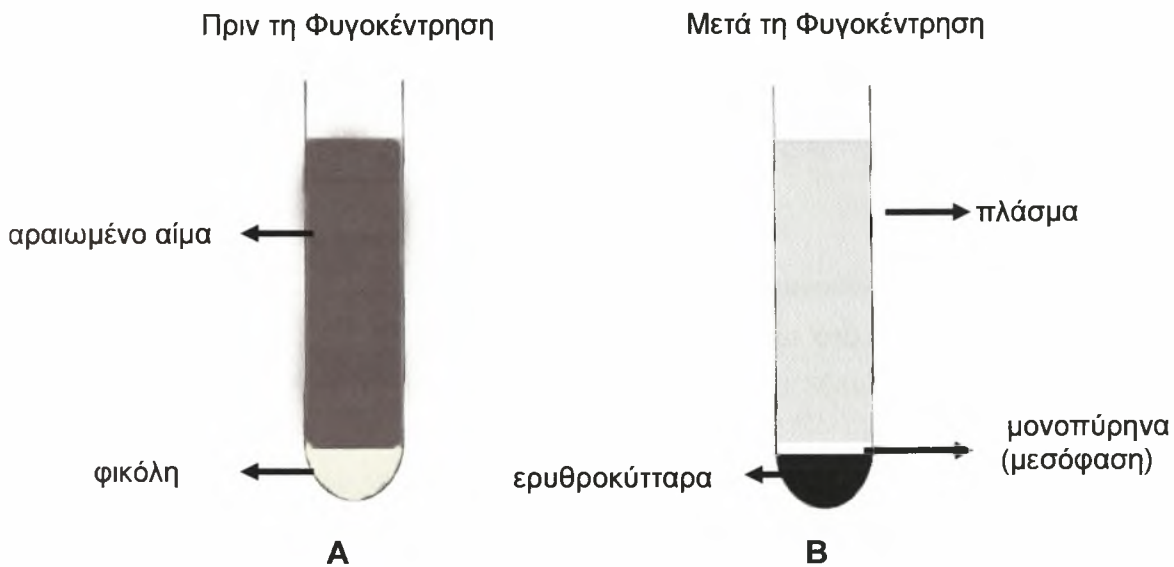
2. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα

Από το κάθε άτομο έγινε λήψη 6 ml 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 τη 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 (εικόνα 10, Α) και φυγοκέντρηση για 15min στις 1900rpm στους 4°C . Μετά τη φυγοκέντρηση, στο σωληνάριο δημιουργήθηκαν τρεις φάσεις: η ανώτερη φάση περιελάμβανε το πλάσμα, η μεσαία φάση περιελάμβανε τα μονοπύρηννα κύτταρα (μεσόφαση) και η

κατώτερη φάση περιελάμβανε τα ερυθρά αιμοσφαίρια, όπως φαίνεται στην εικόνα 10 (B).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του σωληναρίου 15 ml πριν και μετά τη φυγοκέντρηση με φικώλη.

Στη συνέχεια, ακολούθησε 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 μονοπύρρηνα κύτταρα, ενώ ακολούθησε μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με τη χρήση της πλάκας Neubauer και της χρωστικής Trypan blue.

3. Απομόνωση RNA

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε με τη μέθοδο του θειοκυανικού γουανιδίου ως εξής:

I. Ομογενοποίηση

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

II. Διαχωρισμός φάσεων

Μετά την ομογενοποίηση, της οποίας η διάρκεια ήταν τουλάχιστον 15 λεπτά, κάθε δείγμα μεταγγίστηκε σε σωληνάριο των 2 ml και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση

για 15min στις 12000rpm στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση, σε κάθε σωληνάριο υπήρχαν τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση που περιείχε 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 μεταφέρθηκε 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

Τελικά, έγινε πολύ καλή αφαίρεση του υπερκείμενου και το ίζημα, αφού αφέθηκε να στεγνώσει πολύ καλά, διαλυτοποιήθηκε. Η διαλυτοποίηση του ιζήματος έγινε με προσθήκη 80-100μl ddH₂O και κάθε δείγμα αποθηκεύτηκε στους -80°C.

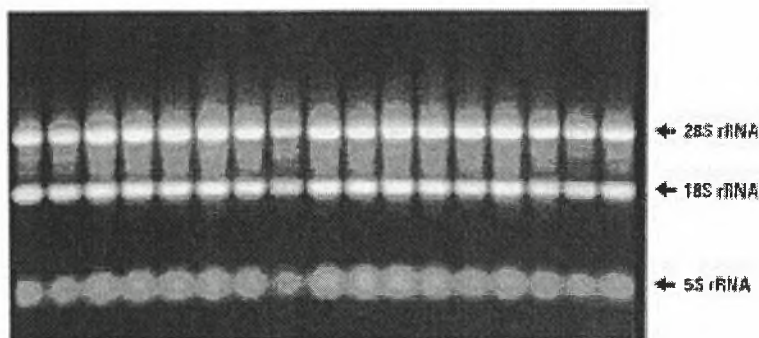
VI. Φωτομέτρηση-Έλεγχος ποσότητας

Για να ελεγχθεί η ποσότητα του RNA πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε κάθε δείγμα. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρήθηκαν στα 260 και 280 nm. Υπολογίστηκε ο λόγος 260/280 καθώς και η συγκέντρωση του RNA ως εξής:

συγκέντρωση RNA = αραιώση x OD₂₆₀ x 40 (mgr/ml)

VII. Ηλεκτροφόρηση-Έλεγχος ποιότητας

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



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

4. 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 θερμοσταθερή πολυμεράση η οποία εξάγεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές (primers) είναι μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες, οι οποίες 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-στόχο, σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών
- επέκταση, η οποία γίνεται με 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. Με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται η συλλογή ενός εκατομμυρίου περίπου αντιγράφων της επιθυμητής ακολουθίας, μιας και κάθε θερμοκρασιακός κύκλος διπλασιάζει το προϊόν του προηγούμενου κύκλου.

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

Με την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιείται αξιόπιστη ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου PCR, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της PCR. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να μετρηθεί η ποσότητα του προϊόντος PCR, ενώ η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση. Για να επιτευχθεί αυτό, απαιτείται μια μέθοδος για την ανίχνευση του προϊόντος της PCR και

ένα μηχάνημα στο οποίο να καταγράφονται τα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου PCR, το οποίο στην παρούσα μελέτη ήταν η συσκευή Light Cycler.

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

IV. Πρωτόκολλα PCR πραγματικού χρόνου

Οι εφαρμογές της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RQ-PCR, **real-time quantitative polymerase chain reaction**) περιλαμβάνουν μελέτες για την έκφραση του mRNA, μετρήσεις αριθμού αντιγράφων σε γενωμικό ή ιϊκό DNA, διάκριση αλληλομόρφων, ποσοτικοποίηση χιμαιρικών μεταγράφων κ.λπ. Απαραίτητη

προϋπόθεση για την ποσοτικοποίηση είναι η ανάλυση γονιδίων αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς δεν πρέπει να διαφέρει ως προς τον αριθμό των αντιγράφων ή το επίπεδο έκφρασης σε σχέση με το γονίδιο που βρίσκεται υπό μελέτη (*Clinical Chemistry* 48:81178–1185 (2002)). Σήμερα είναι διαθέσιμες 3 κύριες τεχνικές RQ-PCR:

- ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I
- ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης
- ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού.

Στη συγκεκριμένη μελέτη εφαρμόστηκε η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού. Η ανάλυση αυτή χρησιμοποιεί δύο αλληλοεπικαλυπτόμενους ανιχνευτές συγκεκριμένης αλληλουχίας. Ο ένας ανιχνευτής είναι σημειωμένος στο 5' άκρο με φθορισμόχρωμα-δέκτη LC Red 640. Ο άλλος ανιχνευτής είναι σημειωμένος στο 3' άκρο με φθορισμόχρωμα-δότη φλουορεσκίνη. 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 τη διέγερση του φθορισμοχρώματος-δότη, εκπέμπεται ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Όταν τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται κοντά, το φως που εκπέμπεται από το δότη θα διεγείρει το φθορισμόχρωμα του δέκτη, διαδικασία που αναφέρεται ως μεταφορά συντονισμένης ενέργειας φθορισμού (*fluorescence resonance energy travel*, FRET). Η προηγούμενη διαδικασία οδηγεί σε εκπομπή φθορισμού, ο οποίος ανιχνεύεται κατά το στάδιο υβριδοποίησης και στο πρώτο μέρος του σταδίου επιμήκυνσης της PCR (*Trends Mol Med.* 2002 Jun; 8 (6): 257-60, *Experimental Hematology* 30 (2002) 503–512). Η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης υπάρχει η ένταση φθορισμού χωρίς ειδικότητα (*background*) και ο ειδικός φθορισμός. Το όριο στο οποίο ο ειδικός φθορισμός υπερβαίνει το *background* αποτελεί το διαχωριστικό σημείο (*cut-off level*). Ο κύκλος της PCR στον οποίο για πρώτη φορά ο φθορισμός υπερβαίνει το *cut-off level* ονομάζεται κύκλος μετάπτωσης, ενώ η τιμή των προϊόντων στον κύκλο αυτό είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα.

V. Σχετική ποσοτικοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (*hTERT*)

Για τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (*hTERT*) χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit *LightCycler TeloTAGGG_{hTERT} Quantification Kit* (Roche Molecular Diagnostics). Στη σχετική ποσοτικοποίηση γίνεται σύγκριση ανάμεσα στο δείγμα που αφορά στο γονίδιο που μας ενδιαφέρει και

στο αντίστοιχο δείγμα που χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς. Συγκεκριμένα, ο υπολογισμός της σχετικής έκφρασης του hTERT πραγματοποιήθηκε 2 φορές για το ίδιο δείγμα, ενώ από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 200 ngr RNA, στο οποίο πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή και PCR τόσο για το γονίδιο hTERT όσο και για το γονίδιο αναφοράς PBGD. Αναλυτικότερα:

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

➤	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: porphobilinogen deaminase) μεταγράφηκε αντίστροφα και ένα τμήμα 150 ζευγών βάσεων ενισχύθηκε με ειδικούς εκκινητές. Το προϊόν της αντίδρασης ανιχνεύθηκε μέσω φθορισμού, όπως και στην περίπτωση του γονιδίου του hTERT. Το γονίδιο PBGD εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (11q24.1-q24.2). Το PBGD κωδικοποιεί τη σύνθεση δύο ειδών mRNA, τα οποία εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς από το ίδιο γονίδιο. Ένα μετάγραφο mRNA εκφράζεται μόνο στα ερυθροποιητικά κύτταρα και κωδικοποιεί τη σύνθεση ενός ενζύμου που συμμετέχει στο βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης της αίμης. Το μετάγραφο του γονιδίου αναφοράς, που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη, εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Η επιλογή του γονιδίου PBGD πραγματοποιήθηκε με βάση το γεγονός ότι δεν έχει ψευδογονίδια και παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης, όπως και το

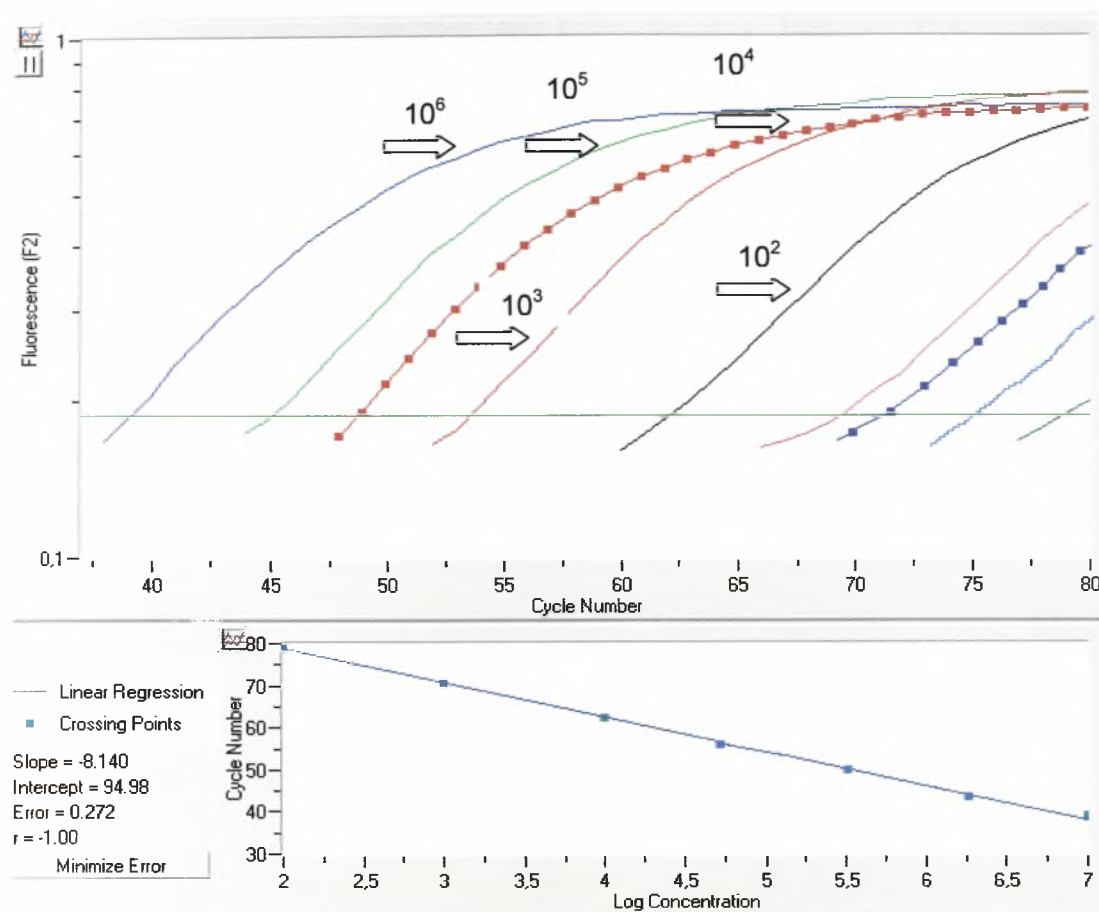
γονίδιο hTERT (Finke *et al.* 1993). Το προϊόν της ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς χρησιμεύει για τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης του γονιδίου hTERT και για τον έλεγχο της ποιότητας του RNA, αφού στη μελέτη έχουν συμπεριληφθεί μόνο τα δείγματα στα οποία ενισχύθηκε επιτυχώς το γονίδιο PBGD. Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για το γονίδιο PBGD περιείχε:

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

▪ Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

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

Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη 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 RNA (εικόνα 12).

**Εικόνα 12:**

A. Διαγραμματική απεικόνιση του σήματος φθορισμού του δείγματος σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης PCR.

B. Διαγραμματική απεικόνιση των κύκλων της αντίδρασης PCR σε συνάρτηση με το λογάριθμο της συγκέντρωσης των δειγμάτων που περιείχαν 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 και 10^2 αντίγραφα του mRNA του hTERT και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

Με την παραπάνω τεχνική πραγματοποιείται προσδιορισμός του προϊόντος τη στιγμή της σύνθεσής του και όχι αφού ολοκληρωθεί το πρόγραμμα της PCR (Heid *et al.* 1996). Τελικά, η τιμή που προκύπτει από το λόγο των αντιγράφων των mRNA του γονιδίου hTERT προς τα αντίγραφα των mRNA του γονιδίου PBGD, αποτελεί την «κανονικοποιημένη» τιμή του hTERT (NhTERT) και είναι ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου hTERT ως προς την έκφραση του PBGD.

5. Στατιστική ανάλυση

Όλοι οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS (έκδοση 10.0). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με t-test, Mann-Whitney U (MWU), Kruskal-Wallis, ANOVA (analysis of variance) και το Fisher PLSD. Οι συντελεστές συσχέτισης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο regression analysis (r) και μη-

παραμετρική συσχέτιση (Spearman rank correlation (r_s)). Τιμή $p < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

Αποτελέσματα

Οι τιμές των επιπέδων hTERT (πίνακας 1) παρουσίασαν αξιοσημείωτες διαφορές ανάμεσα στις τρεις κατηγορίες ατόμων που μελετήθηκαν (ασθενείς HBV, ασθενείς HCV και υγιείς, ANOVA, $p < 0.05$)

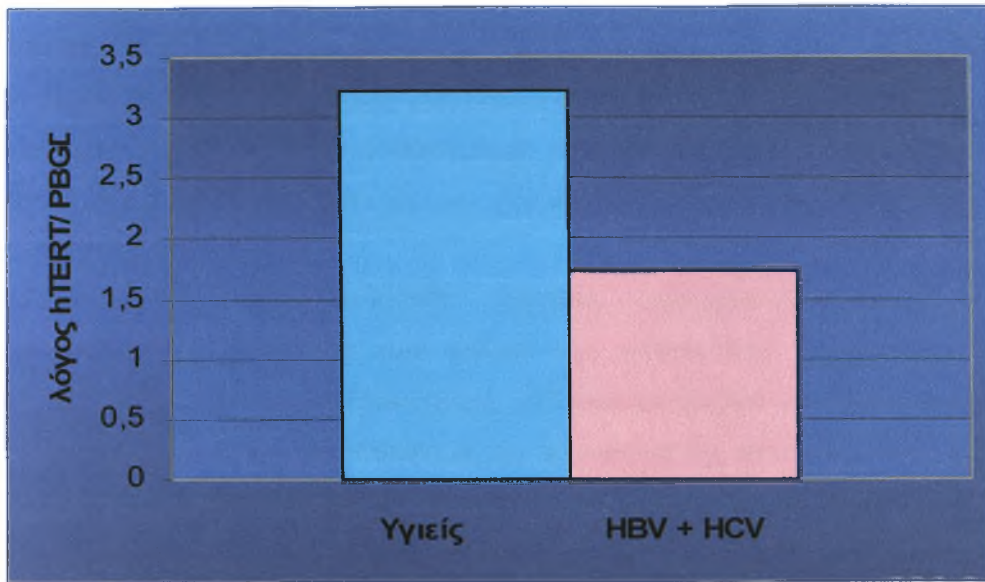
Πιο συγκεκριμένα, μετά από post-hoc ανάλυση με το Fisher PLSD τεστ παρατηρήθηκαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα hTERT mRNA στους ασθενείς με χρόνια HBV ($1.86 \pm 2,1 \times 10^{-2}$) και HCV ($1,91 \pm 1,7 \times 10^{-2}$) λοίμωξη σε σχέση με τους υγιείς ($3,22 \pm 2,2 \times 10^{-2}$), ($p < 0.05$ και για τις δύο συγκρίσεις), (διάγραμμα 1). Οι παρατηρούμενες τιμές δε διέφεραν μεταξύ των ασθενών με HBV και HCV λοίμωξη. Οι μέσες τιμές των hTERT mRNA στα περιφερικά λεμφοκύτταρα ήταν ανεξάρτητες από την κλινική κατάσταση των ασθενών (ανενεργή κατάσταση, χρόνια ηπατίτιδα Β και C και κίρρωση σχετιζόμενη με HBV και HCV) (ANOVA, $p > 0.05$) (διάγραμμα 2). 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, $p=NS$).

Λαμβάνοντας υπόψη τη συσχέτιση των τιμών hTERT με την ηλικία, το φύλο, τη διάρκεια της ασθένειας και τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών σύμφωνα με την κλινική κατάσταση των χρόνιων ιογενών λοιμώξεων δε βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις στην κατηγορία της κίρρωσης ($n=8$) και της ηπατίτιδας ($n=15$). Όμως, στην κατηγορία της ανενεργούς κατάστασης ($n=18$) παρατηρήθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές hTERT και στη διάρκεια της ασθένειας ($r_s = -0.52$, $p < 0.03$).

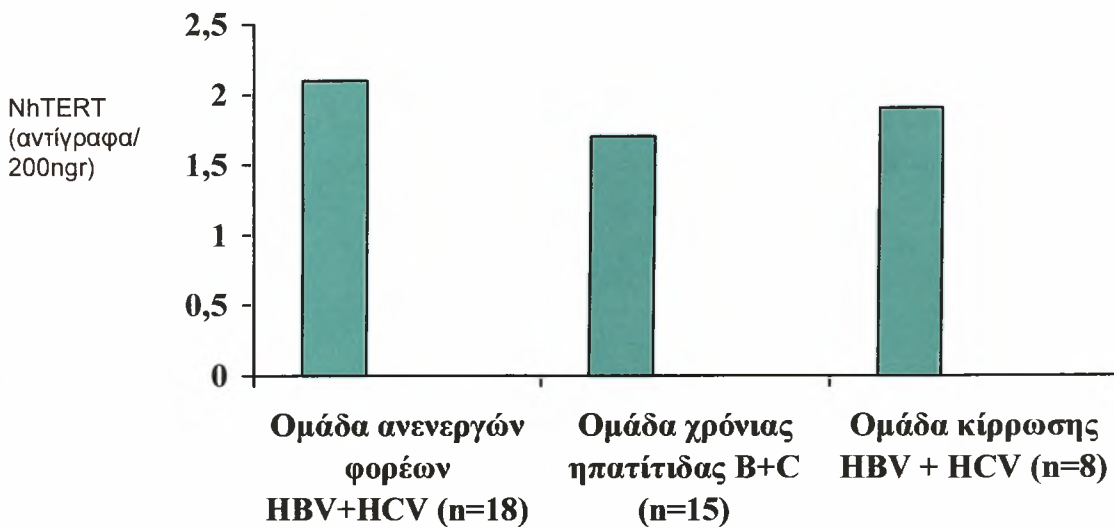
Επίσης, δε βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στα ιικά φορτία HBV και HCV, όπως αποδείχθηκε από τα επίπεδα HBV-DNA και HCV-RNA αντίστοιχα, και την έκφραση του hTERT mRNA.

Πίνακας 1: Μέσες τιμές hTERT ($\times 10^{-2}$) (αντίγραφα /200 ngr) σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με ηπατίτιδα Β και C αλλά και σε υγιείς.

Υγιή άτομα (n=22) NhTERT (αντίγραφα/200ngr)	Ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη (n=17) NhTERT (αντίγραφα/200ngr)	Ασθενείς με χρόνια HCV λοίμωξη (n=24) NhTERT (αντίγραφα/200ngr)
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	0.920 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
		3.320 X 10-2
		0.210 X 10-2



Διάγραμμα 1: Ο λόγος των mRNA αντιγράφων του γονιδίου hTERT και του γονιδίου PBGD στους υγιείς και στα άτομα που πάσχουν από ηπατίτιδα B και C.



Ασθενείς ανάλογα με την κλινική τους κατάσταση

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

Συζήτηση

Η μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας Β ή C είναι ένας από τους παράγοντες που ενέχονται στη δημιουργία του ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Έκφραση της τελομεράσης έχει ανιχνευθεί σε 85-90% των περιπτώσεων ανθρώπινων καρκίνων και συγκεκριμένα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. (Harle-Bachor *et al.* 1996, Counter *et al.* 1995, Meyerson *et al.* 1997, Buys 2000, Granger *et al.* 2002, Shay & Wright 2001, Satyanarayana *et al.* 2004). Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της έκφρασης της τελομεράσης στα περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με ιογενείς ηπατίτιδες και σύγκριση της έκφρασης με υγιή άτομα.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ακριβής ποσοτικοποίηση της έκφρασης των mRNA της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β και C αλλά και υγιών ατόμων, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της ποσοτικής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR). Μελετήθηκε η έκφραση των επιπέδων hTERT mRNA διότι είναι γνωστό ότι η δραστικότητα του συμπλόκου της τελομεράσης ρυθμίζεται από την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας του ενζύμου. (Erlitzki *et al.* 1999, Meyerson *et al.* 1997).

Παρατηρήθηκαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα hTERT μεταγράφων στους ασθενείς με χρόνια HBV και HCV λοίμωξη σε σχέση με τους υγιείς. 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.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα Β και Τ λεμφοκύτταρα απαιτούν εκτενή κυτταρική διαίρεση και κλωνική επέκταση προκειμένου να επιτελέσουν τη λειτουργία τους. Η τελομεράση και η επικείμενη ρύθμιση του μήκους των τελομερών διαδραματίζουν ουσιώδη ρόλο στον έλεγχο της ικανότητας κυτταρικού πολλαπλασιασμού. 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 (Weng *et al.* 1997, Liu *et al.* 1999). Το μήκος των τελομερών έχει δείχθει ότι μικραίνει με τη γήρανση και επομένως η ελάττωση του μήκους των τελομερών των λεμφοκυττάρων θεωρείται σημείο γήρανσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Επειδή η τελομεράση συμβάλλει στην προστασία του μήκους των τελομερών των λεμφοκυττάρων, ενδεχομένως διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Fan *et al.* 2000, Pawelec *et al.* 1997).

Η ανοσολογική δυσλειτουργία αποτελεί τον κύριο παθογόνο μηχανισμό στους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (Fan *et al.* 1994). Ωστόσο, οι ακριβείς παράγοντες που οδηγούν στην παθογένεση της ασθένειας δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Έχει αποδειχθεί ότι οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β αποτελούν άτομα ανοσοκατεσταλμένα (Fan *et al.* 2000). Η μόλυνση των κυττάρων του περιφερικού αίματος με ιούς HBV και HCV έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και αυξημένη απόπτωση των Τ λεμφοκυττάρων, γεγονός που συνεπάγεται μειωμένη ανοσολογική απόκριση (Nakamura *et al.* 1996).

Η μειωμένη έκφραση της τελομεράσης που παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη στους ασθενείς με χρόνια HBV και HCV λοίμωξη σε σχέση με τους υγιείς, ενδεχομένως αποτελεί σημείο πρόωρης γήρανσης του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς η μειωμένη έκφραση της hTERT έχει ως αποτέλεσμα και ελαττωμένη δραστηριότητα του ενζύμου. Η πιθανή πρόωρη γήρανση του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να είναι, τουλάχιστον εν μέρει, υπεύθυνη για την ανοσοκαταστολή που παρατηρείται στους ασθενείς με χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις (Fan *et al.* 2000). Επομένως, η εμπλοκή της hTERT πιθανολογείται ότι ενέχεται στην ανοσολογική δυσλειτουργία των ασθενών με χρόνια HBV και HCV λοίμωξη, εφόσον η έκφραση των hTERT mRNA μεταγράφων στα περιφερικά λεμφοκύτταρα των ασθενών ήταν σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τα υγιή άτομα.

Τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τη μελέτη του Fan και συνεργατών (Fan *et al.* 2000), οι οποίοι παρατήρησαν σημαντική μείωση της δραστηριότητας της τελομεράσης σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β. Αντίθετα, σε μία άλλη μελέτη (Tatsuma *et al.* 2000) δε βρέθηκε αξιοσημείωτη διαφορά στη δραστηριότητα της τελομεράσης σε λεμφοκύτταρα ασθενών με ηπατίτιδα Β σε σχέση με υγιείς χρησιμοποιώντας την τεχνική Telomerase PCR ELISA. Στις παραπάνω μελέτες ανιχνεύτηκε η δραστηριότητα της τελομεράσης χωρίς, όμως, καμία αναφορά ποσοτικοποίησης των hTERT μεταγράφων, τα οποία συσχετίζονται με τη δραστηριότητα του ενζύμου.

Στην κατηγορία της ανενεργούς κατάστασης παρατηρήθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές hTERT και στη διάρκεια της ασθένειας. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να υποδεικνύει ότι οι ιοί της ηπατίτιδας επηρεάζουν άμεσα τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος ακόμη και στα αρχικά στάδια αυτών των χρόνιων ιογενών ηπατοπαθειών. Επιπλέον, θα μπορούσε να υποστηρίξει την υπόθεση των τελομερών για την κυτταρική γήρανση και την καρκινογένεση (Erlitzki *et al.* 1999, El-Refaie *et al.* 1996).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, δε βρέθηκε 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 κατηγορίας, αλλά και στο γεγονός ότι η παθογένεση της ανάπτυξης του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος μάλλον δεν προκαλείται αποκλειστικά από ιούς. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η παρούσα μελέτη είναι μία αρχική εργασία που ερευνά την εμπλοκή της έκφρασης του hTERT mRNA στην ιογενούς μορφής ηπατοκυτταρική καρκινογένεση, θα πρέπει να επανεκτιμηθεί η σχέση ανάμεσα στα ιικά φορτία HBV και HCV και την έκφραση του hTERT mRNA στις μελλοντικές μελέτες.

Συμπερασματικά, η συγκεκριμένη μελέτη δείχνει την ύπαρξη χαμηλών επιπέδων mRNA της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης στα περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με ηπατίτιδες B και C, γεγονός που προτείνει τη συμμετοχή της hTERT στην ανοσολογική δυσλειτουργία των ασθενών με χρόνια HBV και HCV λοίμωξη, καθώς τα μειωμένα επίπεδα της έκφρασης του hTERT mRNA αποτελούν σημείο πρώιμης γήρανσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, τα υψηλά ποσοστά ηπατοκαρκινογένεσης που παρατηρούνται στη φυσική ιστορία αυτών των χρόνιων ηπατίτιδων, θα μπορούσαν να αποδοθούν τουλάχιστον κατά ένα μέρος στα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας. Επιπρόσθετες μελέτες σε διαφορετικά στάδια των HBV και HCV λοιμώξεων κρίνονται απαραίτητες προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα συγκεκριμένα ευρήματα και να διευκρινιστεί αν η ελάττωση της έκφρασης της hTERT έχει παθοφυσιολογική και/ή κλινική σημασία. Η μελλοντική κατανόηση της βιολογίας των τελομερών και της δράσης της τελομεράσης στην ανθρώπινη γήρανση, ασθένεια και καρκινογένεση ίσως τελικά οδηγήσει σε βελτιωμένες θεραπευτικές λύσεις έναντι των χρόνιων ασθενειών και του καρκίνου (Satyanarayana *et al.* 2004).

Βιβλιογραφία

- Aisner D, Wright W, Shay J. Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2002; 12: 80-85
- Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E.V., Fletcher A.B., Greider C.W., Harley C.B. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992; 89 (21): 10114-10118
- Allsopp R.C., Harley C.B. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 1995; 219 (1): 130-136
- Blackburn H.E. Structure and function of telomeres. *Nature*, 1991; 350: 569-573
- Blackburn E. Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 2001; 106: 661-673
- Bouffler S.D., Blasco M.A., Cox R., Smith P.J. Telomeric sequences, radiation sensitivity and genomic instability. *International Journal of Radiation Biology*, 2001; 77 (10): 995-1005
- 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
- Buys Ch. Telomeres, telomerase and cancer. *Clinical Implications of Basic Research*, 2000; 342 (17): 1282-1283
- Cao Y., Li H., Deb S., Liu J.P. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene*, 2002; 21 (20): 3130-3138
- Chan S.R., Blackburn E.H. Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004; 359 (1441): 109-121
- Chen X.Q., Bonnefoi H., Pelte M.F., Lyautey J., Lederrey C., Movarekhi S., Schaeffer P. et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 2000; 6 (10): 3823-3826
- Cong Y.S., Wen J., Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Human Molecular Genetics*, 1999; 8 (1): 137-142
- Cong Y-Sh, Wright E.W, Shay W.J. Human telomerase and its regulation. *American Society for Microbiology*, 2002; 66 (3): 407-425

- Counter M.C., Gupta J., Harley B.C., Leber B., Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood*, 1995; 85 (9): 2315-2320
- De Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, 2002; 21: 532-540
- De Lange T, Shiue L, Myers M.R., Cox R.D., Naylor L.S. et al. Structure and variability of human chromosome ends. *Molecular and Cellular Biology*, 1990; 10 (2): 518-527
- El-Refaie A., Savage K., Bhattacharya S. et al. HCV-associated hepatocellular carcinoma without cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 1996; 24: 277-285
- Erlitzki R, Minuk G. Telomeres, telomerase and HCC: the long and the short of it. *Journal of Hepatology*, 1999; 31: 939-945
- Fan X.G., Huang Y., Tang F.Q., Yi H. Telomerase activity of peripheral blood lymphocytes in patients with chronic hepatitis B. *Immunology Letters*, 2000; 73: 7-11
- Fan X.G., Zhang Z. Increased tumour necrosis factor alpha production by neutrophils in patients with hepatitis B. *Journal of Clinical Pathology*, 1994; 47 (7): 616-618
- Feng J., Funk D.W., Wang S.S., Weinrich L.S., Avilion A.A., Chiu C.P., Adams R.R. et al. The RNA component of human telomerase. *Science*, 1995; 269: 1236-1241
- Ferber M.J., Montoya D.P., Yu C., Aderca I., McGee A., Thorland E.C. et al. Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers. *Oncogene*, 2003; 22: 3813-3820
- Forsythe H.L., Elmore L.W., Jensen K.O., Landon M.R., Holt S.E. Retroviral-mediated expression of telomerase in normal human cells provides a selective growth advantage. *International Journal of Oncology*, 2002; 20 (6): 1137-1143
- Granger M., Wright W., Shay J. Telomerase in cancer and aging. *Oncology-Hematology*, 2002; 41: 29-40
- Greider C.W., Blackburn E.H. Telomeres, telomerase and cancer. *Scientific American*, 1996; 274 (2): 92-97
- Greider C.W., Blackburn E.H. Tracking telomerase. *Cell*, 2004; 116 (2): 83-86

- Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H., De Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 1999; 97 (4): 503-514
- Halvorsen T.L., Leibowitz G., Levine F. Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. *Molecular and Cellular Biology*, 1999; 19 (3): 1864-1870
- 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
- Harley C.B. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation Research*, 1991; 256 (2-6): 271-282
- Harrington L., McPhail T., Mar V., Zhou W., Oulton R., Program A., Bass B.M. et al. A mammalian telomerase-associated protein. *Science*, 1997; 275: 973-976
- 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
- Hodes R. Molecular targeting of cancer: Telomeres as targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2001; 98 (14): 7649-7651
- Hodes J.R., Hathcock S.K., Weng N.P. Telomeres in T and B cells. *Nature Reviews Immunology*, 2002; 2 (9): 699-706
- Holt S.E., Shay W.J. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 1999; 180: 10-1
- Holt S.E., Aisner D.L., Baur J., Tesmer V.M., Dy M., Ouellette M., Trager J.B. et al. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Development*, 1999; 13: 817-826
- Horikawa I., Devereux T.R., Anna C.H., Annab L.A., Afshari C.A., Barrett J.C. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Research*, 1999; 59 (24): 6087-6090
- Horikawa I., Cable P.L., Mazur S.J., Appella E., Afshari C.A., Barrett J.C. Downstream E-box-mediated regulation of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene transcription: evidence for an endogenous mechanism of transcriptional repression. *Molecular Biology of the Cell*, 2002; 13 (8): 2585-2597

- Horikawa I., Barrett J.C. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis*, 2003; 24 (7): 1167-1176
- Hossain S., Singh S., Lue N.F. Functional analysis of the C-terminal extension of telomerase reverse transcriptase. A putative "thumb" domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277 (39): 36174- 36180
- Huard S., Moriarty T.J., Autexier C. The C terminus of the human telomerase reverse transcriptase is a determinant of enzyme processivity. *Nucleic Acids Research*, 2003; 31 (14): 4059-4070
- Keith W.N., Bilsland A., Evans T.R., Glasspool R.M. Telomerase-directed molecular therapeutics. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2002; 2002: 1-25
- Kilian A., Bowtell D.D., Abud H.E., Hime G.R., Venter D.J., Keese P.K., Duncan E.L., Reddel R.R., Jefferson R.A. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Human Molecular Genetics*, 1997; 6: 2011-2019
- Klapper W., Parwaresch R., Krupp G. Telomere biology in human aging and aging syndromes. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2001; 122 (7): 695-712
- Kyo S., Takakura M., Kanaya T., Zhuo W., Fujimoto K., Nishio Y., Orimo A., Inoue M. Estrogen activates telomerase. *Cancer Research*, 1999; 59 (23): 5917-5921
- Lingner J., Hughes T.R., Shevchenko A., Mann M., Lundblad V., Cech T.R. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, 1997; 276 (5312): 561-567
- Liu K., Schoonmaker M.M., Levine B.L., June C.H., Hodes R.J., Weng N.P. 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
- Lue N.F. A physical and functional constituent of telomerase anchor site. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280 (28): 26586- 26591
- Meyerson M., Counter M.C., Eaton N.E., Ellisen W.L., 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
- Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *Biology of Neoplasia*, 2000; 18 (13): 2626-2634

- 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
- Nakamura T.M., Cech T.R. Reversing time: origin of telomerase. *Cell*, 1998; 92 (5): 587-590
- Pawelwec G., Solana R. Immunosenescence. *Trends of Immunology*, 1997; 18: 514-516
- Satyanarayana A., Manns M., Rudolph L. Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 2004; 40 (2): 276-283
- Seeger C., Mason W. Hepatitis B virus biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000; 64 (1): 51-68
- Sharma G.G., Gupta A., Wang H., Scherthan H., Dhar S., Gandhi V., Iliakis G. et al. hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene*, 2003; 22 (1): 131-146
- Shay J.W., Wright W.E., Werbin H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochimica Biophysica Acta*, 1991; 1072 (1): 1-7
- Shay J., Wright W. Implications of mapping the human telomerase gene (hTERT) as the most distal gene on chromosome 5p. *Neoplasia*, 2000; 2 (3): 195-196
- Shay J., Wright W. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2000; 1 (1): 72-76
- Shay J., Wright W. Telomeres and telomerase: Implications for cancer and aging. *Radiation Research*, 2001; 155: 188-193
- Shay J., Wright W. Senescence and Immortalization: Role of Telomeres and Telomerase. *Carcinogenesis*, 2004; 26 (5): 867-874
- Smith S., Gariat I., Schmitt A. et al. Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science*, 1998; 282: 1484-1487
- Smith L.L., Collier H.A., Roberts J.M. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nature Cell Biology*, 2003; 5 (5): 474-479
- Soder A.I., Hoare S.F., Muir S., Going J.J., Parkinson E.K., Keith W. Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene*, 1997; 14: 1013-1021
- Son N.H., Joyce B., Hieatt A., Chrest F.J., Yanovski J. Weng N-P. Stable telomere length and telomerase expression from naive to memory B-lymphocyte differentiation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2003; 124 (4): 427-432

- 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
- Takakura M., Kyo S., Kanaya T., Tanaka M., Inoue M. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Research*, 1998; 58 (7): 1558-1561
- Tatsuma T., Goto S., Kitano S., Lin Y.C., Lee C.M., Chen C.L. Telomerase activity in peripheral blood for diagnosis of hepatoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2000; 15: 1064-1070
- The EASL jury: EASL International Consensus Conference on Hepatitis B, 13-14 September 2002, Geneva, Switzerland. Consensus statement (Short version). *Journal of Hepatology*, 2003; 38: 533-540
- Vaziri H., Schachter F., Uchida I., Wei L., Zhu X., Effros R., Cohen D., Harley C.B. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *American Journal of Human Genetics*, 1993; 52 (4): 661-667
- Waris G., Siddiqui A. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *Journal of Biosciences*, 2003; 28 (3): 311-321
- Wellinger R.J., Sen D. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *European Journal of Cancer*, 1997; 33 (5): 735-749
- Weng N-P. Telomeres, telomerase and lymphocyte replicative life span. *Clinical Immunology*, 1999; 92 (1): 1-2
- Weng N-P., 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
- Weng N-P., Levine B.L., June C.H., Hodes R.J. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 1996; 183: 2471-2479
- Weng N-P., Levine B.L., June C.H., Hodes R.J. Human naïve 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
- Wright W.E., Piatyszek M.A., Rainey W.E., Byrd W., Shay J.W. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental Genetics*, 1996; 18:173-179

- Wright W.E., Tesmer V.M., Huffman K.E., Levene S.D, Shay W.J. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes and Development*, 1997; 11: 2801-2809
- Yamada O., Motoji T., Mizoguchi H. Up-regulation of telomerase activity in human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996; 1314: 260-266
- 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
- Yi X., Tesmer M.V., Savre-Train I., Shay W.J., Wright E.W. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Molecular and Cellular Biology*, 1999; 19 (6): 3989-3997
- Zhang X., Dong N., Zhang H., You J., Wang H., Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on human telomerase reverse transcriptase expression and activity in hepatoma cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2004; 145 (2): 98-104
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2000
- Roitt I., Brostoff J., Male D. Ανοσολογία, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε., Αθήνα 2000
- Vander A., Sherman J., Luciano D., Τσακόπουλος Μ. Φυσιολογία του ανθρώπου, Μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού II, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα 2001
- Zakim D., Boyer D.T. *Hepatology a textbook of liver disease*. Part 7: 215-243, 1996
- Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γρ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι. Ιατρική Μικροβιολογία, Τόμος II, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα 1999
- Γεωργάτσος Ι.Γ., Γιουψάνης Τ.Α., Κυριακίδης Δ.Α. Ενζυμολογία, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη 2001
- Σπαντίδος Δ.Α. Κλινική Ιολογία: Αρχές-κλινικά και μοριακά στοιχεία. Κεφ.5. Ιοί της ηπατίτιδας, 1998

Παράρτημα

Χημικά αναλώσιμα

Αντιδραστήρια	Εταιρεία
DEPC 0.002%	Biochrom
Φικόλη	Biochrom
PBS	Biochrom
RNAsoI	Invitrogen
Χλωροφόρμιο	Diachel
Ισοπροπυλική αλκοόλη	Diachel
Αιθανόλη 70%	Invitrogen
Αραιή χρωστική 2%	Biochrom
TBE	Biochrom
Αγαρόζη	Invitrogen
hTERT TeloTAGGG kit ποσοτικοποίησης	Bioanalytica (Roche)