

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθ. Ν. Βαμβακόπουλος

---

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΈΚΦΡΑΣΗ  
ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ»**

**ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ Α. ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ**

*Βιολόγος*

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

κ. Κάππας Κωνσταντίνος	Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής
κα. Κόλλια Παναγούλα	Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου
κα. Τσέζου Ασπασία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής (επιβλέπουσα)

### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

κ. Αθανασίου Ευάγγελος	Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής
κ. Κάππας Κωνσταντίνος	Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής
κα. Κόλλια Παναγούλα	Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου
κ. Κουκούλης Γεώργιος	Καθηγητής Παθολογικής-Ανατομικής
κ. Μαλίζος Κωνσταντίνος	Καθηγητής Ορθοπαιδικής
κ. Τρυποσκιάδης Φίλιππος	Καθηγητής Καρδιολογίας
κα. Τσέζου Ασπασία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

•	<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	<b>05</b>
•	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>06</b>
•	<b>ABSTRACT</b>	<b>09</b>
<b><u>1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>		<b>12</b>
<b>1.1 Τελομερή, Τελομεράση και αθανатоποίηση των κυττάρων</b>		<b>13</b>
<b>1.1.1. Δομή και ρόλος τελομερών</b>		<b>13</b>
<b>1.1.2. Πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής</b>		<b>15</b>
<b>1.1.3. Τελομεράση</b>		<b>17</b>
1.1.3.1 Δομή της τελομεράσης		17
1.1.3.1.1 RNA υπομονάδα τελομεράσης		18
1.1.3.1.2 Καταλυτική υπομονάδα τελομεράσης (hTERT)		19
1.1.3.2 Λειτουργία τελομεράσης		20
1.1.3.3 Έκφραση της τελομεράσης		20
1.1.3.4 Ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης		21
1.1.3.4.1 Μεταγραφικοί παράγοντες		21
1.1.3.4.2 Επιγενετικοί μηχανισμοί ρύθμισης της hTERT		24
<b>1.2 Καρκίνος του μαστού και τελομεράση</b>		<b>29</b>
<b>1.2.1. Επιδημιολογία και πρόγνωση καρκίνου του μαστού</b>		<b>29</b>
<b>1.2.2. Τελομεράση και καρκίνος του μαστού</b>		<b>32</b>
1.2.2.1 Η τελομεράση ως διαγνωστικός στόχος στον καρκίνο του μαστού		32
1.2.2.2 Δραστικότητα τελομεράσης και πρόγνωση καρκίνου του μαστού		33
<b>1.3 Ρόλος της ακτινοβόλησης και της τελομεράσης στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού</b>		<b>34</b>
<b>1.3.1. Σταδιοποίηση και θεραπεία του καρκίνου του μαστού</b>		<b>34</b>
<b>1.3.2. Ρόλος της ακτινοθεραπείας στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού</b>		<b>35</b>
<b>1.3.3. Τελομεράση και ακτινοθεραπεία</b>		<b>36</b>
<b>1.3.4. Θεραπεία – Στόχευση της τελομεράσης</b>		<b>38</b>
<b>1.4 Σκοπός της διατριβής</b>		<b>41</b>

<b><u>2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>	<b>42</b>
<b>2.1 Υλικά και μέθοδοι</b>	<b>43</b>
2.1.1 Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια	43
2.1.2 Απομόνωση κυττάρων από δείγματα πρωτογενών καρκίνων του μαστού και επεξεργασία	45
2.1.3 Ακτινοβόληση κυττάρων	46
2.1.4 Μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας	47
2.1.5 Μελέτη του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής	50
2.1.6 Απομόνωση ολικού κυτταρικού RNA	51
2.1.7 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	52
2.1.8 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) και του υποδοχέα HER2 με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR)	53
2.1.9 Απομόνωση πρωτεϊνών	56
2.1.10 Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP	56
2.1.11 Ανοσοαποτύπωση κατά Western	57
2.1.12 Γενετική αλληλούχιση του mRNA του p53	59
2.1.13 Ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης	61
2.1.14 Αποσιώπηση των mRNA των γονιδίων hTERT και HER2/neu	67
2.1.15 Στατιστική ανάλυση	71
<b>2.2 Αποτελέσματα</b>	<b>73</b>
2.2.1 Ιστολογική ανάλυση των δειγμάτων καρκινικού ιστού από καρκίνο μαστού (βιοψίες) και ανάλυση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και της δραστηριότητας της τελομεράσης	73
2.2.2 Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου p53 των δειγμάτων από καρκινικό ιστό	78
2.2.3 Μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας στις κυτταρικές σειρές και στα κύτταρα από δείγματα καρκίνου του μαστού	79
2.2.4 Μελέτη κυτταρικού κύκλου μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας	81
2.2.5 Μελέτη της έκφρασης της καταλυτικής μονάδας της τελομεράσης και της δραστηριότητας της τελομεράσης, στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές και	

στους καρκινικούς ιστούς, μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας	85
2.2.6 Διερεύνηση του ρόλου του υποδοχέα HER2/neu στη ρύθμιση της καταλυτικής μονάδας hTERT της τελομεράσης και στη ρύθμιση της δραστηριότητας της τελομεράσης	90
2.2.7 Μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων c-myc, p53 και p21 μετά από ακτινοβόληση των κυτταρικών σειρών και των δειγμάτων καρκίνου του μαστού	92
2.2.8 Μελέτη της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και ακετυλίωσης της ιστόνης H3 στον υποκινητή του γονιδίου της τελομεράσης	94
2.2.9 Μελέτη της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στον υποκινητή του γονιδίου του c-myc	96
2.2.10 Μελέτη της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων του μαστού μετά από αποσιώπηση του υποδοχέα HER2 και της τελομεράσης	97
2.3. Συζήτηση	100
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>110</b>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η επεξεργασία όλων των δειγμάτων και η διενέργεια όλων των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας υπό την καθοδήγηση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Ασπασίας Τσέζου.

Για την περάτωση της διδακτορικής μου διατριβής οφείλω να ευχαριστήσω ολόψυχα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κα. Τσέζου Ασπασία για την άρτια επιστημονική καθοδήγηση, αλλά και για την κατανόηση και υποστήριξη καθόλη τη διάρκεια της διατριβής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας του Ανθρώπου κα. Κόλλια Παναγούλα και τον Καθηγητή Ιατρικής Φυσικής κ. Κάππα Κωνσταντίνο για την επίβλεψη της διατριβής, καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής κ. Αθανασίου Ευάγγελο για την παροχή των δειγμάτων καρκίνου του μαστού. Τέλος, ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής κ. Αθανασίου Ευάγγελο, τον Καθηγητή Ιατρικής Φυσικής κ. Κάππα Κωνσταντίνο, την Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου κα. Κόλλια Παναγούλα, τον Καθηγητή Παθολογικής-Ανατομικής κ. Κουκούλη Γεώργιο, τον Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Μαλίζο Κωνσταντίνο, τον Καθηγητή Καρδιολογίας κ. Τρυποσκιάδη Φίλιππο και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κα. Τσέζου Ασπασία.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους συναδέλφους Βιολόγους του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά όλα αυτά τα χρόνια και ιδιαίτερα τους Νικόλαο Στεφάνου, Παγώνα Οικονόμου, Stéphanie Dubos, Μαρία Σάτρα, Θεοδώρα Σιμοπούλου, Τιμόκλεια Ορφανίδου, Ιωάννα Παπαθανασίου, Μαρία Σαμαρά, Ιωάννα Χιώτογλου, Χρήστο Χασανίδη, Ανδρομάχη Βαγενά, Φωτεινή Κωστοπούλου, Χριστίνα Γκουσγκούνη. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δημήτρη Ηλιόπουλο, Ιωάννη Τσούγκο και Ιωάννη Δήμου με τους οποίους συνεργάστηκα σε ένα τμήμα της συγκεκριμένης διατριβής.

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

Παπανικολάου Βασίλης  
Βιολόγος

Λάρισα, 2010.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο κοινή μορφή κακοήθειας που εμφανίζεται μεταξύ των γυναικών των δυτικών χωρών, οι οποίες έχουν πιθανότητα 10% να εμφανίσουν επιθετικό καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Την τελευταία δεκαετία, ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου στον κόσμο με την εμφάνιση άνω του ενός εκατομμυρίου νέων περιστατικών κάθε χρόνο. Παρά τις προόδους που έχουν σημειωθεί στην έγκαιρη ανίχνευση, καθώς και στην κατανόηση των μοριακών βάσεων της βιολογίας του καρκίνου του μαστού, το 30% περίπου των ασθενών με καρκίνο του μαστού σε αρχικό στάδιο, τελικά θα υποτροπιάσουν. Η επιλογή πιο αποτελεσματικών και λιγότερο τοξικών θεραπευτικών σχημάτων απαιτεί να λαμβάνονται υπόψη τόσο η κατάσταση της ασθενούς όσο και τα κλινικά και μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου.

Ο καρκίνος του μαστού παρουσιάζει μεγάλη βιολογική ετερογένεια σε ό,τι αφορά στην κλινική εικόνα και στην απόκριση στη θεραπεία. Μοριακοί δείκτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται συχνά προκειμένου να προβλεφθεί η απόκριση σε χορηγούμενες θεραπείες, είναι οι υποδοχείς HER2/neu, οι οιστρογονικοί υποδοχείς (ER) και ο υποδοχέας της προγεστερόνης (PR). Η παρουσία ή η απουσία τους στα καρκινικά κύτταρα, σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, δημιουργούν το χαρακτηριστικό φαινότυπο του κάθε καρκινικού τύπου, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τον επιθετικό ή μη χαρακτήρα, την ανθεκτικότητα και την τελική απόκριση του όγκου στη θεραπεία. Η ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία αποτελεί ένα εκτεταμένο αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Μία πληθώρα μοριακών δεικτών και μεταβολικών μονοπατιών, καθώς και συνδυασμοί αυτών θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνοι για τον ανθεκτικό ή ευαίσθητο φαινότυπο που παρουσιάζουν τα καρκινικά κύτταρα στην ακτινοθεραπεία. Η εις βάθος κατανόηση αυτών των μηχανισμών θα αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για τον καθορισμό της βέλτιστης θεραπευτικής αγωγής.

Στα φυσικά άκρα των γραμμικών χρωμοσωμάτων παρατηρούνται εξειδικευμένες νουκλεοπρωτεϊνικές δομές, οι οποίες ονομάζονται τελομερή και αποτελούνται από μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA και από πρωτεΐνες. Κατά τη διαδικασία αντιγραφής του DNA δημιουργείται το λεγόμενο «πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής» καθ'όσον οι DNA πολυμεράσες δεν έχουν την ικανότητα αντιγραφής στην άκρη των χρωμοσωμάτων, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση του μήκους των τελομερών. Τη λύση στο πρόβλημα δίνει μια ειδική αντίστροφη μεταγραφάση, μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η τελομεράση. Η τελομεράση αποτελείται από δύο υπομονάδες, την RNA υπομονάδα, που ονομάζεται hTR, και την καταλυτική υπομονάδα hTERT που έχει δράση αντίστροφης μεταγραφάσης και αποτελεί και τη βασική και απαραίτητη υπομονάδα για την έκφραση του

ολοενζύμου. Επιπλέον, στη δημιουργία ενός ενεργού ολοενζύμου φαίνεται να συμμετέχουν πλήθος άλλων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την τελομεράση. Αποτέλεσμα της δράσης και της αλληλεπίδρασής τους είναι να διατηρείται το μήκος των τελομερών, παρέχοντας στα κύτταρα τη δυνατότητα για απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων, ενώ η απουσία της τελομεράσης έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού. Η τελομεράση δεν εκφράζεται στα περισσότερα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα, ωστόσο, παρατηρείται έκφρασή της σε κύτταρα με μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού, σε ορισμένους τύπους αρχέγονων κυττάρων, όπως για παράδειγμα σε αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα, σε αναπαραγωγικά κύτταρα, σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, σε κύτταρα του μυελού των οστών, του ενδομητρίου κ.ά. Η τελομεράση ανιχνεύεται στο 85-95% των κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού. Η μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας επιτυγχάνεται τόσο μέσω μεταγραφικών παραγόντων όσο και μέσω επιγενετικών μηχανισμών.

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση της έκφρασης της τελομεράσης, καθώς και των μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφρασή της σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου του μαστού, μετά από επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Χρησιμοποιήθηκαν τόσο καρκινικές κυτταρικές σειρές όσο και δείγματα από ασθενείς με καρκίνο μαστού, τα οποία διέφεραν στα βασικά χαρακτηριστικά τους, όπως στην παρουσία των υποδοχέων οιστρογόνου, προγεστερόνης και HER2 και στην παρουσία φυσιολογικής ή μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53. Η μελέτη χωρίζεται σε δύο κυρίως μέρη: το γενικό και το ειδικό. Στο γενικό μέρος γίνεται μια εκτενής ανασκόπηση και αναφορά σε ό,τι είναι ήδη γνωστό για τον καρκίνο του μαστού, τα χαρακτηριστικά και τη θεραπεία του, όπως επίσης και για την τελομεράση και το ρόλο της στην αθανατοποίηση των κυττάρων.

Στο ειδικό μέρος αναλύονται τα ακόλουθα :

- ο φαινοτυπικός χαρακτήρας των δειγμάτων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού και η πιθανή συσχέτιση των χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων με την έκφραση της καταλυτικής μονάδας της τελομεράσης και με την ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης
- η βιωσιμότητα των διαφορετικών κυτταρικών σειρών και καρκινικών δειγμάτων μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας
- η ενεργότητα του ολοενζύμου της τελομεράσης και ο ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης, καθώς και η συσχέτισή τους με τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας



- οι μεταγραφικοί παράγοντες που ενέχονται, καθώς και οι επιγενετικοί μηχανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για τη ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης μετά από επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας
- η εκτίμηση της αποσιώπησης της έκφρασης της τελομεράσης στη βιωσιμότητα ανθεκτικών στην ακτινοβολία καρκινικών κυττάρων του μαστού.

Στην παρούσα διατριβή παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα έκφρασης της τελομεράσης στα δείγματα καρκίνου του μαστού, καθώς και υψηλή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της hTERT και της δραστικότητας της τελομεράσης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης και ενεργότητας της τελομεράσης και της παρουσίας του υποδοχέα HER2/neu.

Μετά από ακτινοβολία καρκινικών κυττάρων από καρκινικές σειρές μαστού και δείγματα βιοψιών όγκων ασθενών με καρκίνο μαστού, διαπιστώθηκε αύξηση της έκφρασης της hTERT και αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου, αλλά και αυξημένη ανθεκτικότητα των ακτινοβολημένων κυττάρων που είχαν ως κοινό χαρακτηριστικό την υπερέκφραση του υποδοχέα HER2/neu. Η αποσιώπηση της έκφρασης της hTERT, οδήγησε σε αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων στην ακτινοβολία, ενώ η αποσιώπηση της έκφρασης του υποδοχέα HER2/neu, προκάλεσε μείωση της έκφρασης της hTERT και αύξηση σημαντικά την ευαισθησία των κυττάρων στην ακτινοβολία. Ενώ παράγοντες όπως οι υποδοχείς οιστρογόνων, προγεστερόνης και η παρουσία φυσιολογικής ή μη πρωτεΐνης p53, δε φάνηκαν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της hTERT και στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων του μαστού στην ακτινοβολία, ο υποδοχέας HER2/neu βρέθηκε να ρυθμίζει την έκφραση της hTERT, μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt και των μεταγραφικών παραγόντων NF-kB και c-myc. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας, τα θετικά ως προς τον υποδοχέα HER2/neu καρκινικά κύτταρα, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού HER2/neu, NF-kB, c-myc, hTERT, υπερεκφράζουν την τελομεράση και εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στην ακτινοβολία.

Συμπερασματικά, προτείνεται ότι η παρουσία του υποδοχέα HER2/neu, θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτη αυξημένης ανθεκτικότητας των όγκων στην ακτινοθεραπεία, μέσω της ενεργοποίησης ογκογονιδίων όπως η τελομεράση και ότι η χρήση τεχνολογιών καταστολής της έκφρασης της τελομεράσης ή του υποδοχέα HER2/neu θα μπορούσαν να συντελέσουν στην αύξηση της αποτελεσματικότητας θεραπευτικών σχημάτων.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignancy observed among women in western countries, who present an overall risk of 10% of developing aggressive breast cancer during lifetime. In the past decade, breast cancer is the second most frequent form of cancer worldwide, with the occurrence of more than a million new cases per year. Despite the progress in rapid detection, as well as the better understanding of the molecular basis of breast cancer biology, 30% of breast cancer patients will relapse. The choice of more efficient and less toxic therapies implies to take into consideration the patient's general condition, as well as the clinical and molecular characteristics of the tumor.

Breast cancer presents great heterogeneity in clinical terms and in response to therapy. Molecular biomarkers often used to predict tumor response to therapy are HER2/neu receptor, Estrogen receptors (ER) and progesterone receptor (PR). Their presence or absence on tumor cells in combination with oncogenes' activation or tumor suppressors inactivation create the characteristic phenotype of each type of cancer, which is responsible for the level of aggressiveness, the resistance and the final response of the tumor to a given therapy. Breast cancer cells' resistance to therapy is a large field of research during the last years. A great number of molecular biomarkers and signalling pathways, as well as their different combinations could be responsible for the radio-resistant or radio-sensitive cancer cells' phenotype. Understanding of these mechanisms will be a useful tool for the determination of the optimal therapeutic regimen.

On the natural ends of eukaryotic chromosomes there are specific nucleoprotein structures, called telomeres consisting of small repeated DNA sequences and proteins. During DNA replication, DNA polymerases don't have the capacity to replicate the chromosomes' ends, which is called the «end replication problem», resulting in constant reduction of telomere length. The solution to this problem is provided by a specific reverse transcriptase, an RNA-dependent DNA polymerase, called telomerase. Telomerase consists of two principal subunits, an RNA subunit called hTR and the catalytic hTERT subunit, which possesses reverse transcriptase activity and is responsible for the enzyme expression. Moreover, many other proteins, interacting with telomerase seem to participate to the formation of an active enzyme. As a result of their interaction and their action, telomere length is preserved, offering to these cells the possibility of an unlimited proliferative capacity. Telomerase is not expressed in the majority of normal somatic cells, while it is expressed in cells with great proliferative capacity, such as stem cells, germinal cells, activated lymphocytes, bone marrow cells, endometrial cells etc. Telomerase is detected in 85-95% of

malignancies, including breast cancer. The transcriptional regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT) is achieved by both transcription factors and epigenetic mechanisms.

In the present study, we investigated telomerase expression as well as the regulatory mechanism of its expression in different types of breast cancer, after treatment with ionizing radiation. We used breast cancer cell lines differing in their basic features, such as the presence of Estrogen, Progesterone and HER2 receptors and the presence of wild type or mutated p53 protein, as well as tissue samples derived from breast cancer patients. Our study consists of two principal parts. In the first part, a global review of what is already known about breast cancer, its characteristics and the therapies used, as well as about telomerase and its role in cells' immortalization is described.

In the second part we analyzed:

- the phenotypic features of tissue samples from breast cancer patients and the possible correlation between breast cancer cells' features and hTERT expression/ telomerase activity
- cell viability of different breast cancer cell lines and tissue samples after treatment with ionizing radiation
- telomerase enzyme activity as well as the quantitative measurement of hTERT expression and their association with breast cancer cells' characteristics after irradiation
- transcription factors and epigenetic mechanisms that could be responsible for the regulation of hTERT after irradiation
- the effect of hTERT knockdown in the cell viability of radio-resistant breast cancer cells.

We observed high incidence of telomerase expression in breast cancer tissue samples, as well as highly significant correlation between hTERT expression levels and telomerase activity. Moreover, we observed high correlation between hTERT/telomerase expression and the presence of HER2/neu receptor.

After irradiation of breast cancer cell lines and tissue samples from breast cancer patients, we observed high hTERT expression and telomerase activity, as well as high radio-resistance in HER2/neu overexpressing breast cancer cells. hTERT gene knockdown resulted in reduced radio-resistance of breast cancer cells, while HER2/neu knockdown in reduced hTERT expression and significant decrease in radio-resistance of breast cancer cells.

Estrogen and progesterone receptors, as well as the presence of wild-type or mutated p53 protein did not play a significant role in hTERT expression regulation and in the response of breast cancer cells to irradiation, while HER2/neu was found to regulate hTERT expression, through activation of the PI3K/Akt signalling pathway by the transcription factors

NF- $\kappa$ B and c-myc. More specifically, it was found that after ionizing radiation, HER2/neu positive breast cancer cells, through NF- $\kappa$ B, c-myc overexpressed telomerase and presented increased radio-resistance.

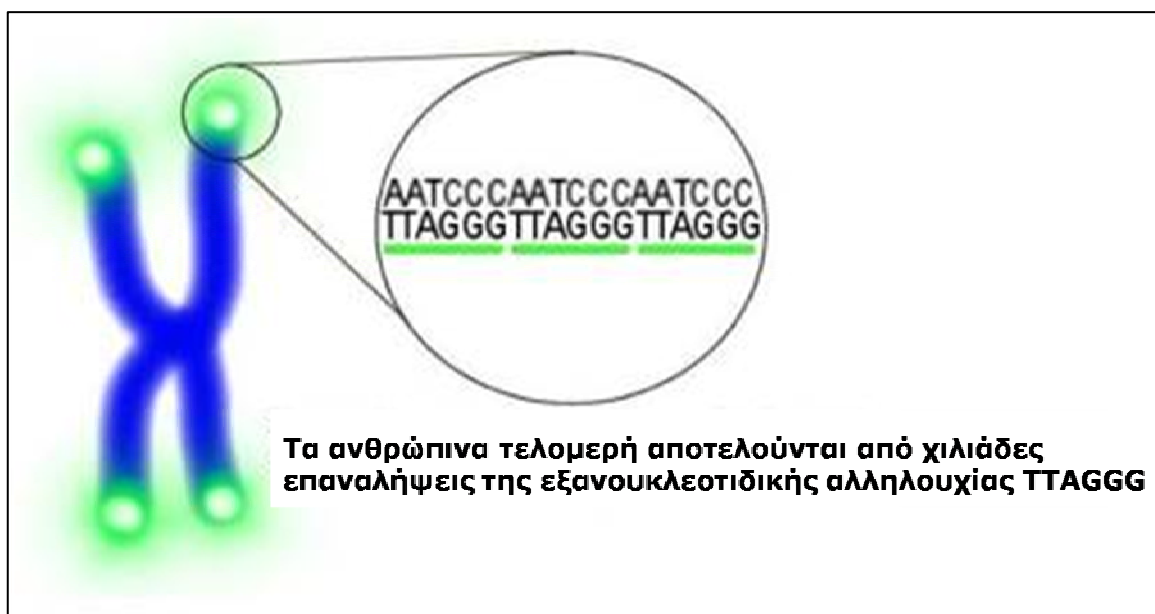
In conclusion, we propose that HER2/neu presence could be an indicator of increased tumor radio-resistance, through activation of oncogenes, such as telomerase. The use of knockdown technologies against hTERT or HER2/neu could contribute to the increase of therapeutic regimens' effectiveness.

## 1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1 Τελομερή, Τελομεράση και αθανатоποίηση των κυτάρων

### 1.1.1. Δομή και ρόλος τελομερών

Στα άκρα των χρωμοσωμάτων εδράζουν δομές που αποτελούνται από σύμπλοκα επαναλήψεων DNA και πρωτεϊνών και ονομάζονται τελομερή. Πρόκειται για τα φυσικά άκρα των χρωμοσωμάτων που 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 17<sup>1,2</sup> (Εικόνα 1).

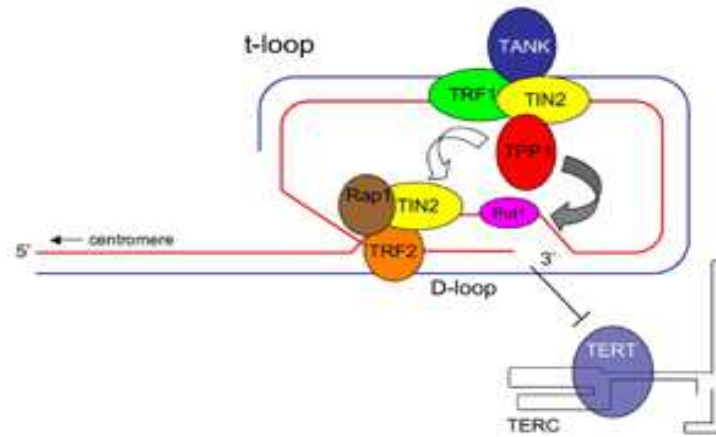


Εικόνα 1: Τελομερή και τελομερική αλληλουχία στον άνθρωπο<sup>3</sup>.

Το κύριο χαρακτηριστικό της δομής των τελομερών είναι ο τελομερικός βρόχος (*t-loop*) που σχηματίζεται στο 5' άκρο κάθε χρωμοσωμικού κλώνου. Αυτή η προεξοχή που έχει μήκος 150-250 περίπου βάσεων και είναι πλούσια σε γουανίνη (G), αναδιπλώνεται συναντώντας το δίκλωνο τμήμα του τελομερούς και σχηματίζοντας μία δομή που θυμίζει βρόχο<sup>4-9</sup> (Εικόνα 2).

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

γουανίνη προεξοχή έχοντας πιθανώς προστατευτικό ρόλο, η πρωτεΐνη Rap1 που συμμετέχει στο σύμπλοκο μέσω της αλληλεπίδρασής της με την TRF2, οι TIN2 και Ku (πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA) που αλληλεπιδρούν με τα τελομερή μέσω της πρόσδεσής τους στην TRF1 και η τανκυράση, η οποία έχει δράση πολυμεράσης και επάγει την επιμήκυνση των τελομερών εμποδίζοντας την πρόσδεση των TRF1 στο DNA του τελομερούς<sup>5,8,10</sup>.



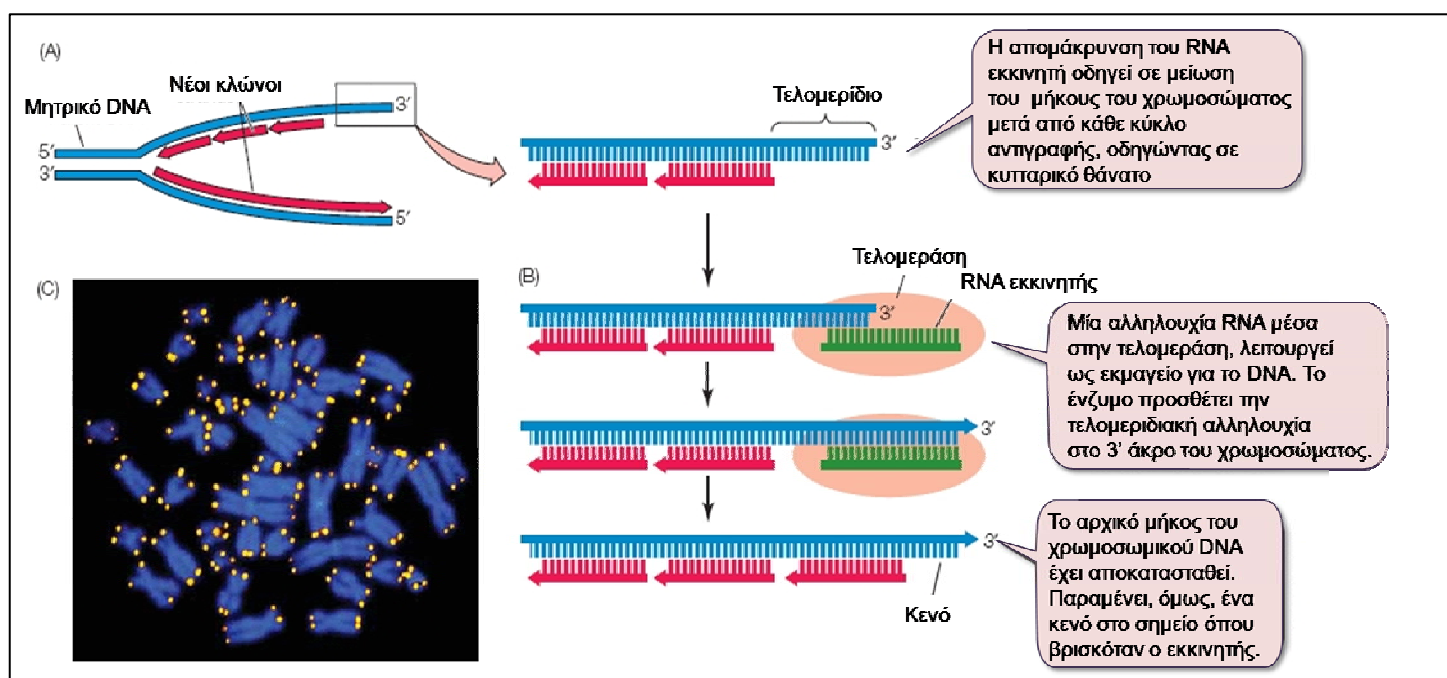
**Εικόνα 2:** Δομή τελομερικού βρόχου<sup>11</sup>

Προχωρώντας από τα τελομερή στο "κυρίως σώμα" του χρωμοσώματος εντοπίζονται οι υποτελομερικές περιοχές. Σε αυτές τις περιοχές παρατηρείται εκφυλισμός της αλληλουχίας του DNA, ενώ δεν περιέχονται πολλά γονίδια. Συγκεκριμένα, 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 τους, ακόμη και μεταξύ χρωμοσωμάτων του ίδιου είδους. Μεταξύ των αλληλουχιών αυτών συγκαταλέγονται και οι μικροδορυφορικοί δείκτες, στους οποίους και οφείλεται ο υψηλός βαθμός πολυμορφισμού των υποτελομερικών περιοχών<sup>5,7,9,12</sup>.

Τα τελομερή συμβάλλουν στην προστασία των χρωμοσωμικών άκρων με τη διατήρηση της χρωμοσωμικής ακεραιότητας, με την αποτροπή της αποικοδόμησης των κλώνων του DNA, καθώς και της σύντηξης ή αναδιάταξης των χρωμοσωμάτων. Επιπρόσθετα, διαμεσολαβούν στην πρόσδεση των χρωμοσωμάτων στο πυρηνικό στρώμα (*nuclear matrix*) και συμμετέχουν στη στοίχιση και στο διαχωρισμό τους κατά τη μείωση. Τα τελομερή συμβάλλουν στην ολοκληρωμένη αντιγραφή των χρωμοσωμάτων και στη λειτουργική οργάνωση τους μέσα στον πυρήνα. Αποτελούν δε σημαντική θέση σύνδεσης για πολλά επιδιορθωτικά ένζυμα, όπως τα BRCA1, RAD50, MRE11, NBS1 και ταυτόχρονα επηρεάζουν τη μεταγραφή των γονιδίων που βρίσκονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων<sup>13-15</sup>.

### 1.1.2. Πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής

Η αντιγραφή του DNA είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία που πραγματοποιείται με μεγάλη ταχύτητα και εξαιρετική ακρίβεια. Ξεκινά από καθορισμένα σημεία του μορίου DNA που πρόκειται να αντιγραφεί τα οποία ονομάζονται θέσεις έναρξης της αντιγραφής και προχωρά ταυτόχρονα και προς τις δυο κατευθύνσεις του. Για την έναρξη και ολοκλήρωση της αντιγραφής απαιτείται σημαντικός αριθμός ενζύμων, με κυριότερες τις DNA πολυμεράσες. Βασικός ρόλος τους είναι η προσθήκη συμπληρωματικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων απέναντι από τις μητρικές αλυσίδες του αντιγραφόμενου μορίου DNA. Ωστόσο, για να ξεκινήσουν τη διαδικασία της αντιγραφής, 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 και οι DNA πολυμεράσες δεν έχουν την ικανότητα αντιγραφής στην άκρη του γραμμικού χρωμοσωμικού DNA με αποτέλεσμα η καινούρια αλυσίδα DNA να είναι ελαφρώς κοντύτερη σε σχέση με την μητρική αλυσίδα<sup>16</sup>. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως «πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής» (*end replication problem*)<sup>8,17,18</sup> (Εικόνα 3).



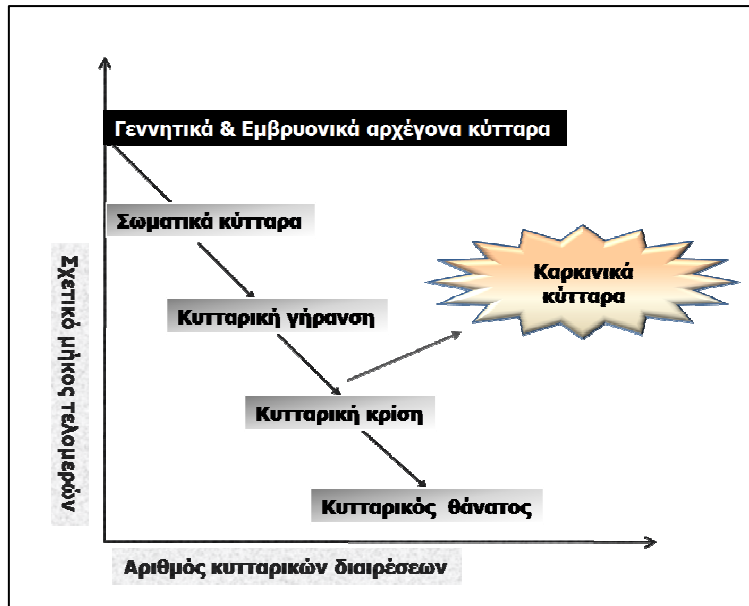
Εικόνα 3: Το πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής του DNA<sup>19</sup>.



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, σε κάθε διαίρεση 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 κυτταρική 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 Hayflick<sup>20</sup>. Το όριο Hayflick ταυτίζεται πρακτικά με το σημείο M1 (*mortality stage 1*), κατά το οποίο το κύτταρο χάνει τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού, εμφανίζει μείωση του μήκους των τελομερών, με την πλειοψηφία των κυττάρων να διαθέτει τελομερή μήκους 5-10kb<sup>17</sup>. αλλά παραμένει μεταβολικά ενεργό. Η κατάσταση αυτή περιγράφει την κυτταρική γήρανση<sup>21</sup>.

Το όριο Hayflick για ινοβλάστες από εμβρυϊκό ιστό είναι 60-80 διαιρέσεις, από νεαρό ενήλικο 20-40, ενώ σε ενήλικα άτομα φτάνει μόλις τις 10-20 διαιρέσεις, ανεξάρτητα από το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει κάθε κύτταρο στο σημείο αυτό<sup>22</sup>. Γενικά, η είσοδος των κυττάρων στο στάδιο M1 είναι μία μη αντιστρεπτή διεργασία. Σε ορισμένες, όμως περιπτώσεις, όπως κατά την απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και του ρετινοβλαστώματος (Rb) από ιικά ογκογονίδια, ο κυτταρικός πληθυσμός είναι δυνατόν να ξεπεράσει το φραγμό που δημιουργεί το στάδιο M1 και να συνεχίσει τη διαίρεση<sup>23</sup> οδηγώντας τα κύτταρα σε ένα στάδιο έντονης κρίσης που ονομάζεται M2 (*mortality stage 2*). Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες και πολύ κοντά και δυσλειτουργικά τελομερή που τελικά οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Η χρονική στιγμή εισόδου του κυττάρου στο στάδιο της κρίσης εξαρτάται από το αρχικό μήκος των τελομερών, δεδομένης της παρατήρησης ότι τα κύτταρα με τελομερή μεγάλου μήκους μεταπίπτουν στην απόπτωση αργότερα σε σχέση με εκείνα με μικρό μήκος τελομερών<sup>16</sup> (Εικόνα 4).

Τα τελομερή, επομένως, λειτουργούν σαν το ρολόι της ζωής του κυττάρου, εφ' όσον επιτρέπουν στα κύτταρα συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων αποτρέποντας τη δημιουργία "αθάνατων" κυττάρων<sup>16</sup>.



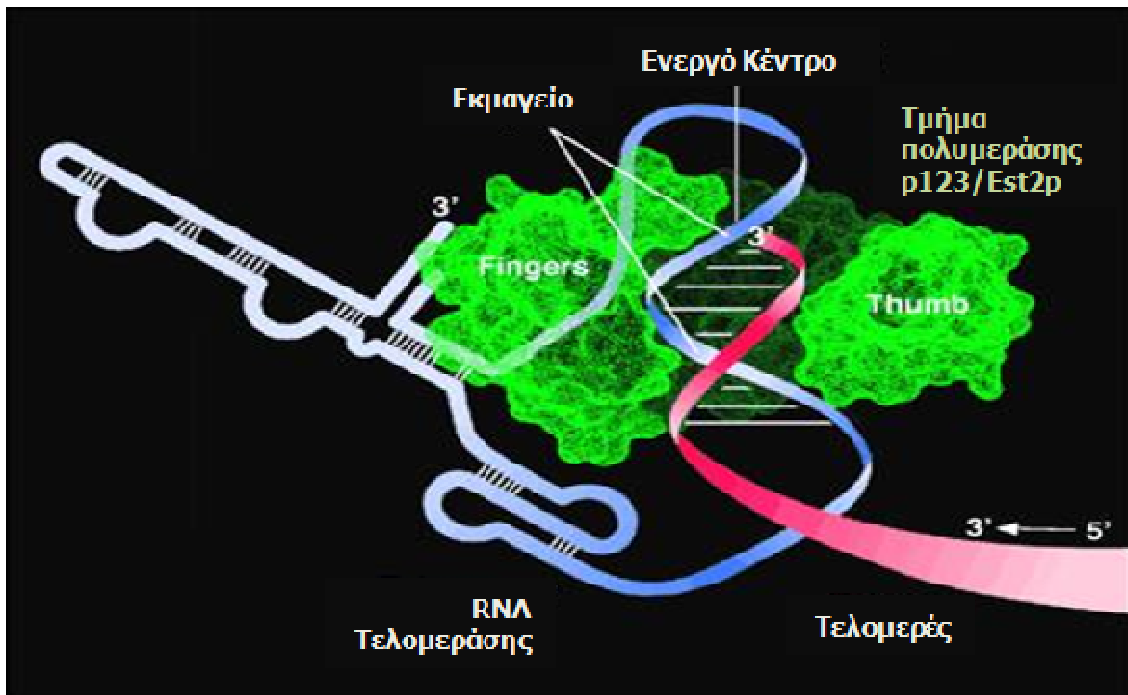
**Εικόνα 4:** Απεικόνιση της σχέσης του μήκους των τελομερών με τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων. Αναλυτικότερα παρατηρείται η βράχυνση του μήκους των τελομερών σχετικά με τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων. Φαίνονται επίσης τα στάδια της κυτταρικής (αντιγραφικής) γήρανσης (replicative senescence) και τις κρίσης (cellular crisis)<sup>24</sup>.

### 1.1.3. Τελομεράση

Το «πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής» επιλύει μια ειδική αντίστροφη μεταγραφάση, η τελομεράση, η οποία για πρώτη φορά αναγνωρίστηκε στο ακραιόφιλο *Tetrahymena thermophila*. Η τελομεράση είναι μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, που συμμετέχει στη διεργασία της αντιγραφής του DNA και έχει την ικανότητα να προσθέτει επαναλήψεις νουκλεοτιδίων στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Η προσθήκη αυτών των επαναλήψεων έχει σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση και σταθεροποίηση του μήκους των τελομερών παρέχοντας στα κύτταρα τη δυνατότητα για απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων. Τα κύτταρα με δραστική τελομεράση διατηρούν το μήκος των τελομερών τους και επομένως την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους, ενώ με την απουσία της τελομεράσης τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και οδηγούνται στην κυτταρική γήρανση<sup>5,6,8,12,24,25</sup>.

#### 1.1.3.1 Δομή της τελομεράσης

Η τελομεράση είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο μεγέθους περίπου 1000kDa. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, μία RNA υπομονάδα που λειτουργεί σαν εκμαγείο για την σύνθεση συμπληρωματικού DNA (*human Telomerase RNA*, hTR ή *human Telomerase RNA Component*, hTERC)<sup>26-28</sup> και μία υπομονάδα με δράση αντίστροφης μεταγραφάσης (*human Telomerase Reverse Transcriptase*, hTERT)<sup>29,30</sup> (Εικόνα 5). Διαφορετικά γονίδια κωδικοποιούν για τις υπομονάδες hTR και hTERT. Η hTR με την hTERT αποτελούν τις κεντρικές υπομονάδες της τελομεράσης ενώ και άλλες πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση της δραστικότητας του ενζύμου<sup>31</sup>.



Εικόνα 5: Δομή της τελομεράσης<sup>28</sup>.

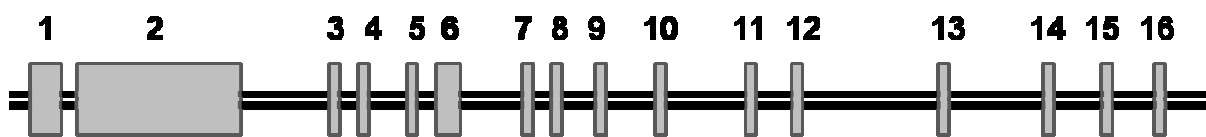
#### 1.1.3.1.1 RNA υπομονάδα τελομεράσης

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την σύνθεση της RNA υπομονάδας της τελομεράσης (hTR) εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 3 (3q26)<sup>32</sup>. Το hTR συστατικό μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση II και το ώριμο mRNA αποτελείται από 451 νουκλεοτίδια. Η hTR υπομονάδα που λειτουργεί ως εκμαγείο για την σύνθεση του DNA του τελομερούς βρίσκεται κοντά στο 5' άκρο του μορίου (45-55nt) και αποτελείται από 11 νουκλεοτίδια (5'-CUAACCCUAAC-3'), ενώ ιδιαίτερη σημασία έχει και η περιοχή που φέρει το όνομα H/ACA και βρίσκεται στο 3' άκρο<sup>8,33</sup>. Η hTR διαθέτει μία αρκετά σταθερή δευτεροταγή δομή που εμφανίζεται κατά μεγάλο ποσοστό διατηρημένη μεταξύ εξελικτικά απομακρυσμένων οργανισμών<sup>34</sup>. Επιπλέον, οι συντηρημένες περιοχές στο hTR μόριο αποτελούν θέσεις αναγνώρισης για πρωτεΐνες που προσδένονται σε αυτό (hTR binding proteins)<sup>6,26</sup>. Η υπομονάδα hTR παρουσιάζει σταθερή έκφραση σε όλους τους ιστούς, φυσιολογικούς και παθολογικούς, γεγονός που οδήγησε πολλούς επιστήμονες στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος της περιορίζεται στη λειτουργία της ως εκμαγείο για τη δράση της hTERT, και επομένως δεν μπορεί να αποτελέσει δείκτη της δράσης του ολοενζύμου της τελομεράσης<sup>35,36</sup>.

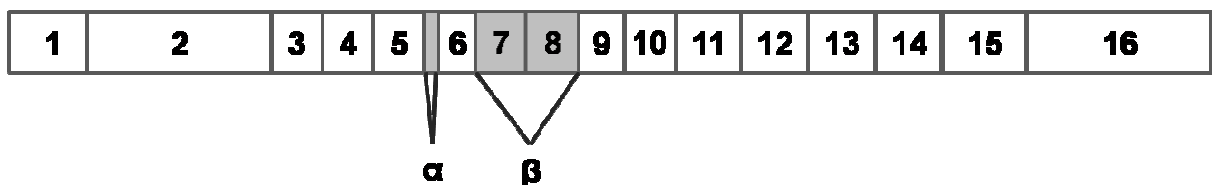
### 1.1.3.1.2 Καταλυτική υπομονάδα τελομεράσης (hTERT)

Το γονίδιο hTERT, που κωδικοποιεί τη σύνθεση της πρωτεϊνικής υπομονάδας της τελομεράσης εδράζεται στον βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (5p15.33), περίπου 2Mb από το τελομερές και αποτελείται από 16 εξόνια και 15 ιντρόνια (Εικόνα 6). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 127 kDa που περιλαμβάνει 1132 αμινοξέα, αρκετά συντηρημένη και η οποία παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με άλλες ανάστροφες μεταγραφάσες<sup>29,37</sup>. Αποτελείται από ένα σχετικά μικρό καρβοξυτελικό τμήμα, μία κεντρική, ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή και ένα αρκετά μεγάλο αμινοτελικό άκρο<sup>38</sup>. Πιθανότατα, η κεντρική μαζί με την καρβοξυτελική περιοχή σχηματίζουν χαρακτηριστική δομή στις πολυμεράσες και στις ανάστροφες μεταγραφάσες που περιβάλλει το άκρο του χρωμοσώματος για να προσθέσει τις μονόκλωνες επαναλήψεις στα τελομερή<sup>39,40</sup>. Στο μεγάλο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης πρόσφατα αναγνωρίστηκε μία περιοχή, η N-GQ, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο κατά την πρόσδεση του ενζύμου στο 5' άκρο του DNA<sup>41</sup>. Έχει διαπιστωθεί τόσο σε *in vivo* όσο σε *in vitro* μελέτες ότι η περιοχή N-GQ θεωρείται απαραίτητη για τη δράση της hTERT<sup>42</sup>. Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του mRNA που κωδικοποιεί για την hTERT σχετίζεται άμεσα με τη δραστηριότητα της τελομεράσης<sup>43-45</sup>, ενώ το γονίδιο hTERT δεν εκφράζεται πάντοτε και σταθερά, σε αντίθεση με την hTR. Ο κύριος ρόλος της hTERT είναι η αύξηση και η διατήρηση του μήκους των τελομερών<sup>5,46</sup>, ενώ επίσης έχει προταθεί και η αντι-αποπτωτική της δράση στο κύτταρο<sup>47-49</sup>. Επιπλέον, η hTERT αυξάνει τη σταθερότητα του γενετικού υλικού υποβοηθώντας, αν όχι συμμετέχοντας, στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς<sup>50</sup>.

#### Κατασκευή γονιδίου hTERT



#### Εναλλακτικό μάτισμα hTERT



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

### 1.1.3.2 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<sup>2,52</sup>. Αναλυτικότερα, 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'<sup>5,8,53</sup>.

### 1.1.3.3 Έκφραση της τελομεράσης

Η τελομεράση εκφράζεται στα γαμετικά κύτταρα, καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης καθώς και σε φυσιολογικά κύτταρα που διαιρούνται συνεχώς<sup>48</sup>. Συγκεκριμένα, εκφράζεται σε ορισμένους τύπους αρχέγονων κυττάρων, όπως για παράδειγμα σε αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα, σε αναπαραγωγικά κύτταρα, σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, σε κύτταρα του μυελού των οστών, του ενδομητρίου κ.ά<sup>54</sup>. Στα υπόλοιπα σωματικά κύτταρα που δεν έχουν μεγάλη ικανότητα πολλαπλασιασμού η τελομεράση εκφράζεται πολύ λίγο ή και καθόλου με αποτέλεσμα τη συνεχή βράχυνση των τελομερών, την κυτταρική γήρανση και την απώλεια ικανότητας πολλαπλασιασμού<sup>55,56</sup>. Η τελομεράση έχει ανιχνευθεί στο 85-90% των περιπτώσεων καρκίνου, γεγονός που αποδεικνύει ότι η αύξηση της έκφρασης της τελομεράσης είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση των κυτταρικών διαιρέσεων συνδέοντας την αναπόσπαστα με την αθανατοποίηση των κυττάρων και την καρκινογένεση<sup>6,33,44,57-59</sup>.

Αναλυτικότερα, η hTERT παρουσιάζει σταθερή έκφραση σε όλους τους ιστούς, εμβρυονικούς και σωματικούς, φυσιολογικούς και παθολογικούς<sup>35,60</sup>, γεγονός που οδήγησε 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 ενεργότητας της τελομεράσης<sup>36</sup>. Αντίθετα, η έκφραση της hTERT είναι στενά ελεγχόμενη και δεν παρατηρείται στα περισσότερα σωματικά κύτταρα<sup>38,44</sup>. Η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της

τελομεράσης παραλληλίζεται στενά με τις αλλαγές της έκφρασης της τελομεράσης, τόσο κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής διαφοροποίησης των κυτταρών<sup>61</sup> όσο και κατά το μετασχηματισμό των αντίστοιχων νεοπλαστικών. Επιπλέον, ο θεμελιώδης ρόλος της hTERT στην έκφραση της τελομεράσης αποδεικνύεται και από μελέτες που τονίζουν ότι η έκτοπη έκφραση της hTERT είναι αποτελεσματική για την ενεργοποίηση της τελομεράσης σε κυτταρικές σειρές αρνητικές στην έκφραση της τελομεράσης<sup>62</sup>.

#### 1.1.3.4 Ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης

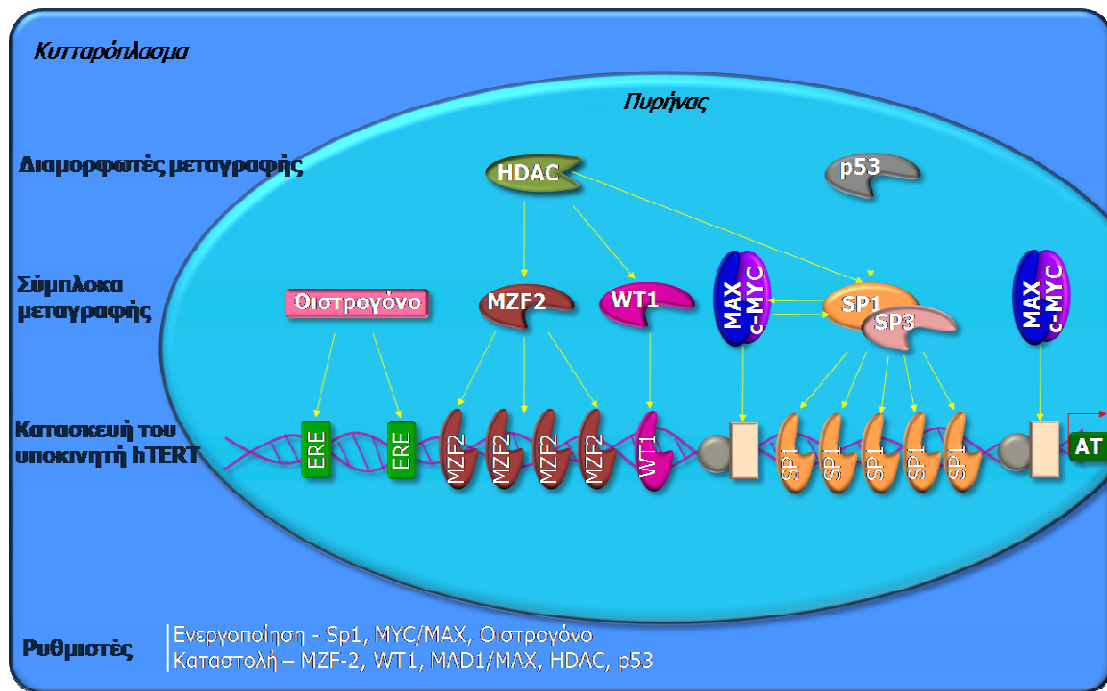
Μελέτες που σχετίζονται με τη διερεύνηση των μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης της τελομεράσης έχουν επικεντρωθεί στην μελέτη της καταλυτικής υπομονάδας της (hTERT) και ειδικότερα στον υποκινητή της, στον οποίο πραγματοποιείται μεταγραφικός έλεγχος σε πολλαπλά επίπεδα. Η ανάλυση της αλληλουχίας και ο χαρακτηρισμός της ρυθμιστικής περιοχής του υποκινητή του γονιδίου της hTERT έχει διευκολύνει την προσπάθεια για την κατανόηση του τρόπου ρύθμισης της έκφρασης της hTERT και κατ'επέκταση της τελομεράσης, τονίζοντας την ύπαρξη ενός πολύπλοκου και πολυπαραγοντικού συστήματος ρύθμισής της<sup>33</sup>. Στον υποκινητή της hTERT εντοπίζονται πολυάριθμες περιοχές πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκφραση της τελομεράσης, ενώ η παρουσία υψηλού ποσοστού CpG νησίδιων αποκαλύπτει την πιθανότητα ρύθμισής της μέσω επιγενετικών μηχανισμών. Αναλυτικότερα στην περιοχή του υποκινητή έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει ένα CpG νησίδιο μήκους 4kb που εκτείνεται από τη θέση -1800 ζεύγη βάσεων πριν το σημείο έναρξης της μετάφρασης έως τη θέση +2200 ζεύγη βάσεων μετά το σημείο έναρξης της μετάφρασης. Σε αυτήν την περιοχή, το DNA έχει περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη (GC) περίπου 70% και αναλογία CG:GC 0,87<sup>63</sup>.

##### 1.1.3.4.1 Μεταγραφικοί παράγοντες

Στο σύνολο των μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν τη ρύθμιση, περιλαμβάνονται οι καταστολείς της hTERT, όπως η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, η Mad1, η πρωτεΐνη MZF-2 (myeloid-specific zinc finger protein 2), οι πρωτεΐνες WT1 (προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου WT1 στον όγκο Wilms), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού TGF-β, η Menin και οι ενεργοποιητές της μεταγραφής της hTERT όπως οι στεροειδείς ορμόνες (οιστρογόνα και προγεστερόνη), οι πρωτεΐνες c-Myc και ο Sp1<sup>64</sup>.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 7) απεικονίζονται οι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούν και καταστέλλουν μέσω διαφόρων μονοπατιών την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT).

Αναλυτικότερα, σχετικά με το ρόλο της p53 στον μεταγραφικό έλεγχο της hTERT έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της p53 και της τελομεράσης. Μελέτες σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου (SiHa) έδειξαν ότι η υπερέκφραση του p53 καταστέλλει άμεσα τη μεταγραφή της hTERT<sup>65</sup> ενώ η αναστολή του p53 με μεθόδους siRNA ή με απαλοιφή του γονιδίου, δεν επαναφέρει την έκφραση της hTERT<sup>66</sup>, γεγονός που αναδεικνύει το p53 ως ένα μη αναστρέψιμο αναστολέα της hTERT.



**Εικόνα 7:** Απεικόνιση μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT)<sup>67</sup>.

Η Menin δεσμεύεται απευθείας στον υποκινητή της hTERT ενώ ο TGF-β καταστέλλει τη μεταγραφή της μέσω του μονοπατιού TGF-β/Smad. Επιπλέον, η παρουσία της πρωτεΐνης MZF-2 καταστέλλει τη μεταγραφή της hTERT, αλλά φαίνεται ότι η επίδραση της στη ρύθμιση της hTERT είναι αμελητέα<sup>68</sup>. Σε κύτταρα με όγκο Wilms βρέθηκε ότι η πρόσδεση της πρωτεΐνης WT1 στον υποκινητή της hTERT καταστέλλει τη μεταγραφή της hTERT<sup>69</sup>.

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

Στον υποκινητή της hTERT έχουν ανιχνευθεί δύο περιοχές πλούσιες σε CpG, γνωστές ως E-boxes που περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες Myc/Max/Mad. Ο Max μπορεί να ομοδιμεριστεί και να ετεροδιμεριστεί με τον Myc ή Max. Ανάλογα με το ποιο διμερές σχηματίζεται, ασκείται και θετική ή αρνητική ρύθμιση. Όταν διμερίζεται με το Myc προκαλεί θετική ρύθμιση, ενώ όταν διμερίζεται με το Mad προκαλεί αρνητική ρύθμιση. Οι Myc και Mad ανταγωνίζονται για τη δημιουργία συμπλόκου με το Max. Το πρωτο-ογκογονίδιο c-Myc εκφράζεται σε υπό πολλαπλασιασμό κύτταρα και σε πολλά νεοπλαστικά κύτταρα, ενώ το Mad σε κύτταρα που διαφοροποιούνται και σε κύτταρα σε ηρεμία. Έχει ανιχνευθεί η παρουσία του ετεροδιμερούς Mad/Max στον υποκινητή της hTERT κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης προμυελοκυτταρικών λευχαιμικών κυττάρων HL60 που συνοδεύεται από αναστολή της hTERT. Αντίθετα το ετεροδιμερές Myc/Max έχει ανιχνευθεί κατά τον σχηματισμό εμβρυϊκών πνευμονικών ινοβλαστών, όπου απαιτείται η δράση της τελομεράσης<sup>70</sup>.

Επιπρόσθετα, οι στεροειδείς ορμόνες ενεργοποιούν την έκφραση του γονιδίου της hTERT. Στον υποκινητή της hTERT έχουν βρεθεί δύο θέσεις που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα των οιστρογόνων (ER) και οδηγούν στην ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της hTERT<sup>35,71</sup>. Σε πειράματα που έγιναν *in vitro*, βρέθηκε ότι ο ER δεσμεύεται ειδικά στον υποκινητή της hTERT και η απαλοιφή αυτού οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης της<sup>35,71</sup>. Η άλλη θέση πρόσδεσης του ER εδράζει δίπλα στη θέση αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και αυτή η γειτονική τοποθέτηση επιτρέπει στον ER και τον Sp1 να δεσμεύονται συνεργατικά στο DNA<sup>72</sup>. Επιπλέον, σε πειράματα που αφορούσαν καρκίνο του μαστού, βρέθηκε ότι η προγεστερόνη ενεργοποιεί τη μεταγραφή της hTERT. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο αν ο υποδοχέας της προγεστερόνης είναι αυτός που ενεργοποιεί άμεσα τον υποκινητή της hTERT<sup>73</sup>. Τα ανδρογόνα επίσης φαίνεται να προκαλούν θετική ρύθμιση στον υποκινητή και να ενισχύουν τη δράση της τελομεράσης σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, χωρίς όμως άμεση πρόσδεση στον υποκινητή<sup>74</sup>. Επομένως οι στεροειδείς ορμόνες φαίνεται πως επάγουν την έκφραση της hTERT σε διάφορους ορμονοεξαρτώμενους όγκους, ενώ αντίθετα, ο πυρηνικός υποδοχέας της βιταμίνης D, έχει βρεθεί να ρυθμίζει αρνητικά τον υποκινητή της hTERT<sup>75,76</sup>.

Οι πρωτεΐνες ETS είναι μία οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων με χαρακτηριστικές διατηρημένες περιοχές πρόσδεσης στο DNA. Οι κυριότερες της οικογένειας είναι οι Ets1 και Ets2, οι οποίες ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση μέσω του μονοπατιού των MAP κινασών μετά την πρόσδεση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF) στον υποδοχέα του<sup>77,78</sup>. Συνεπώς η πρόσδεση του EGF ενισχύει τη μεταγραφή της hTERT και θεωρείται ότι οι Ets1 και Ets2 διαμεσολαβούν στον έλεγχο της hTERT από τον EGF με το να προσδένονται στα E-boxes<sup>79</sup>.



Μελέτες έχουν δείξει ότι πολλές ιϊκές πρωτεΐνες είναι δυνατό να προκαλέσουν αναστολή ή ενεργοποίηση της έκφρασης της τελομεράσης. Το ιϊκό DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή σε διάφορες θέσεις και στη συνέχεια, προαγωγείς του ιού μεταγράφουν το γεινιάζον γονίδιο του ξενιστή. Αυτού του είδους η ενεργοποίηση της hTERT έχει περιγραφεί στην περίπτωση του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV), ο οποίος είναι σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος και στην περίπτωση του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) που αποτελεί την κυριότερη αιτία καρκίνου τραχήλου της μήτρας<sup>80-83</sup>.

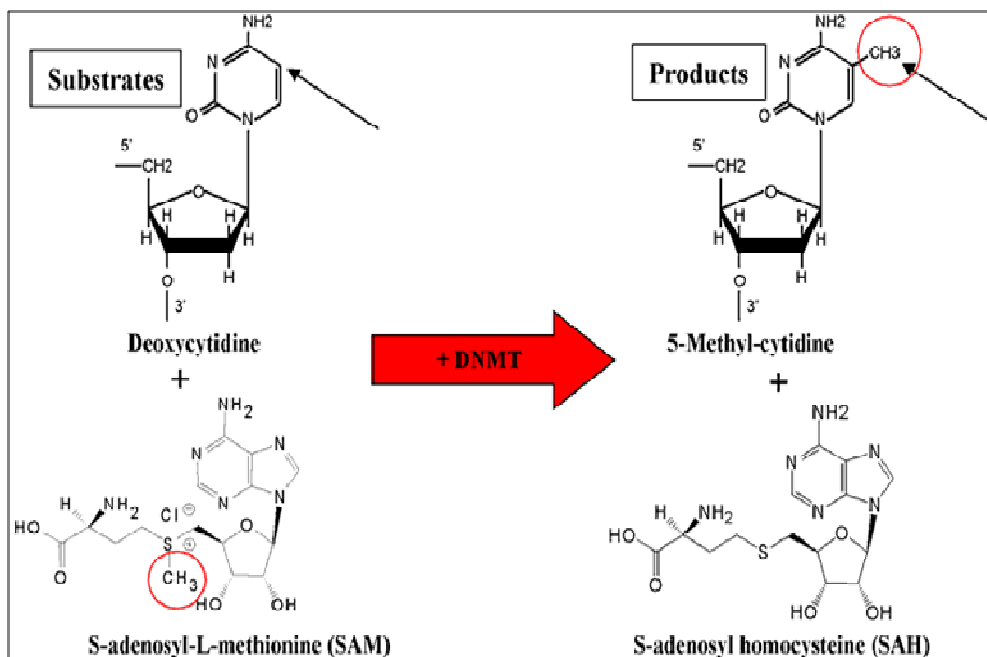
#### 1.1.3.4.2 Επιγενετικοί μηχανισμοί ρύθμισης της hTERT

Επιγενετικές ονομάζονται οι αλλαγές στο μοτίβο έκφρασης των γονιδίων οι οποίες επιτυγχάνονται με μηχανισμούς που δεν αλλάζουν την αρχική αλληλουχία του DNA. Αυτοί οι μηχανισμοί αλλάζουν την δεκτικότητα του DNA στους μεταγραφικούς παράγοντες μέσα από διαδικασίες που περιλαμβάνουν α) τη μεθυλίωση των κυτοσινών σε CpG περιοχές του DNA<sup>84-87</sup>, β) τις αλλαγές στο αμινοτελικό άκρο των ιστονών στα νουκλεοσώματα που συνήθως είναι γνωστές ως "κώδικας ιστόνης"<sup>88,89</sup>, γ) την αναδιαμόρφωση του συμπλόκου SW1/SNF μέσω ενός αδενοτριφωσφορικά εξαρτώμενου τρόπου<sup>90</sup> και δ) τη μεταγραφική ή μετα-μεταγραφική "σιωπηλή" ρύθμιση των γονιδίων μέσω μικρών ρυθμιστικών μη νοσηματικών μορίων RNA (micro RNAs)<sup>91</sup>.

#### *Μεθυλίωση του DNA*

Η μεθυλίωση του DNA προέκυψε σχετικά αργά κατά την εξελικτική διαδικασία και ενέχεται στη σταθερή και μακράς διάρκειας απενεργοποίηση της έκφρασης των περισσότερων γονιδίων<sup>92</sup>. Η μεθυλίωση πραγματοποιείται σε περιοχές του DNA πλούσιες σε βάσεις κυτοσίνης και γουανίνης που αποκαλούνται CpG νησίδια. Τα CpG νησίδια εντοπίζονται κυρίως σε περιοχές υποκινητών αλλά παρατηρούνται και διάσπαρτα στο γονιδίωμα και έχουν μήκος που κυμαίνεται από 0.5-5 Kbp<sup>93</sup>. Υπολογίζεται ότι το 60% των ανθρώπινων γονιδίων περιέχουν τουλάχιστον ένα CpG νησίδιο<sup>94</sup>.

Κατά τη διάρκεια της μεθυλίωσης πραγματοποιείται μια βιοχημική μετατροπή κατά την οποία προστίθεται μια μεθυλομάδα (s-αδενοσυλ-μεθειονίνη) στον 5' άνθρακα της κυτοσίνης που βρίσκεται σε αλληλουχίες CpG<sup>95,96</sup>. (Εικόνα 8). Οι CpG περιοχές του DNA μεθυλιώνονται από τα ένζυμα της οικογένειας των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMT1, DNMT3A και DNMT3B). Η απαλοιφή αυτών των ενζύμων σε διαγονιδιακά (knock-out) ποντίκια, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική ανάπτυξη του οργανισμού<sup>97,98</sup>.



**Εικόνα 8:** Βιοχημική μετατροπή του DNA κατά τη μεθυλίωσή του από τις μεθυλοτρανσφεράσες<sup>99</sup>.

Υπάρχουν πιθανότατα πολλοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην απορρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων μέσω της μεθυλίωσης. Παρόλο που η μεθυλίωση του DNA αλληλεπιδρά άμεσα με την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων, οι μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs) έχει παρατηρηθεί ότι μεταβάλλουν την αναδίπλωση της μεταγραφικά ανενεργής χρωματίνης με άλλους μηχανισμούς εκτός της μεθυλίωσης. Ειδικότερα, αλληλεπιδρούν άμεσα με τις απακετυλάσες των ιστονών κυρίως στους υποκινητές των γονιδίων, ενώ επιπρόσθετα μπορούν να προσδεθούν με άλλες πρωτεΐνες και να προκαλέσουν την καταστολή της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου. Πρέπει να διευκρινιστεί ότι μόνο η μεθυλίωση μέσα ή γύρω από τον υποκινητή ενός γονιδίου και όχι μέσα στο ίδιο το γονίδιο ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου. Επίσης, είναι δυνατό η μεθυλίωση του DNA από μόνη της να μην είναι ικανή να προκαλέσει την καταστολή της έκφρασης ενός γονιδίου και η απορρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων να πραγματοποιείται μόνο με την επίδραση πρωτεϊνών που διαμορφώνουν τη χρωματίνη γύρω από τις μεθυλιωμένες περιοχές. Τα μέλη της οικογένειας των μεθυλ-CpG προσδενόμενων πρωτεϊνών, τα οποία προσδένονται στο μεθυλιωμένο DNA μπορούν να προσδεθούν και με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, αναστέλλοντας πάλι την έκφραση των γονιδίων<sup>85,87</sup>.

Στον υποκινητή του γονιδίου της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης έχει παρατηρηθεί ένα νησίδιο CpG, με περιεκτικότητα σε GC πάνω από 70%, τονίζοντας ένα πιθανό ρόλο της μεθυλίωσης στην ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης. Σε αντίθεση με το γενικότερο μοτίβο στο οποίο η μεθυλίωση του DNA σε περιοχές πλούσιες σε GC

αποτελεί τον πιο γνωστό μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης και οδηγεί σε απενεργοποίηση γονιδίων, στην περίπτωση της ρύθμισης της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης, ο τρόπος με τον οποίο η μεθυλίωση επηρεάζει την έκφραση του hTERT δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί<sup>63</sup>.

Ορισμένες έρευνες έχουν δείξει ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή της hTERT οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης<sup>100,101</sup>, ενώ άλλες σε μετασχηματισμένα και νεοπλαστικά κύτταρα δείχνουν ότι η hTERT εκφράζεται παρόλο που ο υποκινητής της είναι υπερμεθυλιωμένος<sup>102</sup>. Ακόμη, υπάρχουν μελέτες που έδειξαν ότι σε καρκινικά κύτταρα, τόσο από βιοψίες καρκινικών ιστών (οισοφάγου, τραχήλου της μήτρας) όσο και από καρκινικές κυτταρικές σειρές (μαστού, πνεύμονα, παχέος εντέρου, τραχήλου μήτρας), παρατηρήθηκε ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή της hTERT υπομονάδας αυξάνει και την έκφρασή της<sup>102-107</sup>. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι σε hTERT-αρνητικά κύτταρα, δηλαδή αδιαφοροποίητα και μη μετασχηματισμένα κύτταρα, ο υποκινητής της hTERT είναι υπομεθυλιωμένος. Αντιθέτως, σε διαφοροποιημένα και σε κύτταρα σε ηρεμία, ο υποκινητής βρέθηκε μεθυλιωμένος και δεν παρατηρήθηκε έκφραση της hTERT. Από όλα τα παραπάνω πιθανολογείται ότι η έκφραση της hTERT δε σχετίζεται με τον βαθμό μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου και ότι ίσως αυτά τα κύτταρα αναπτύσσουν ένα μηχανισμό καταστολής της hTERT ανεξάρτητα από την κατάσταση του υποκινητή<sup>107,108</sup>. Γνωρίζοντας λοιπόν ότι γενικά η μεθυλίωση του DNA καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων, φαίνεται να υπάρχει μία αντιφατική σχέση μεταξύ της έκφρασης της hTERT και της μεθυλίωσης του υποκινητή της. Η αντίφαση αυτή μπορεί να οφείλεται στο μεγάλο πλήθος μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου και ρυθμίζουν τη μεταγραφή του, δεδομένου του ότι η ισορροπία μεταξύ της ποικιλίας των μεταγραφικών παραγόντων θα καθορίσει την έκφραση της hTERT. Φαίνεται λοιπόν, ότι η μεθυλίωση σε μία συγκεκριμένη θέση εξαρτάται από το αν κάποιος μεταγραφικός παράγοντας προσελκύει ή απωθεί τις μεθυλοτρανσφεράσες στον υποκινητή της hTERT, ενώ η επίδραση της μεθυλίωσης στην έκφραση της hTERT εξαρτάται τόσο από τον κυτταρικό τύπο όσο και από την παράλληλη παρουσία και δράση μεταγραφικών παραγόντων ή άλλων επιγενετικών μηχανισμών<sup>102</sup>.

#### *Επιγενετική απορρύθμιση της έκφρασης της hTERT μέσω μετατροπών στο οκταμερές των πυρηνικών ιστονών στα νουκλεοσώματα*

Στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων, τα νουκλεοσώματα είναι οι ρυθμιστικές επαναλαμβανόμενες μονάδες χρωματίνης στις οποίες 146 ζεύγη βάσεων είναι τυλιγμένα γύρω από ένα οκταμερές ιστονών. Κάθε οκταμερές αποτελείται από 2 μόρια από κάθε

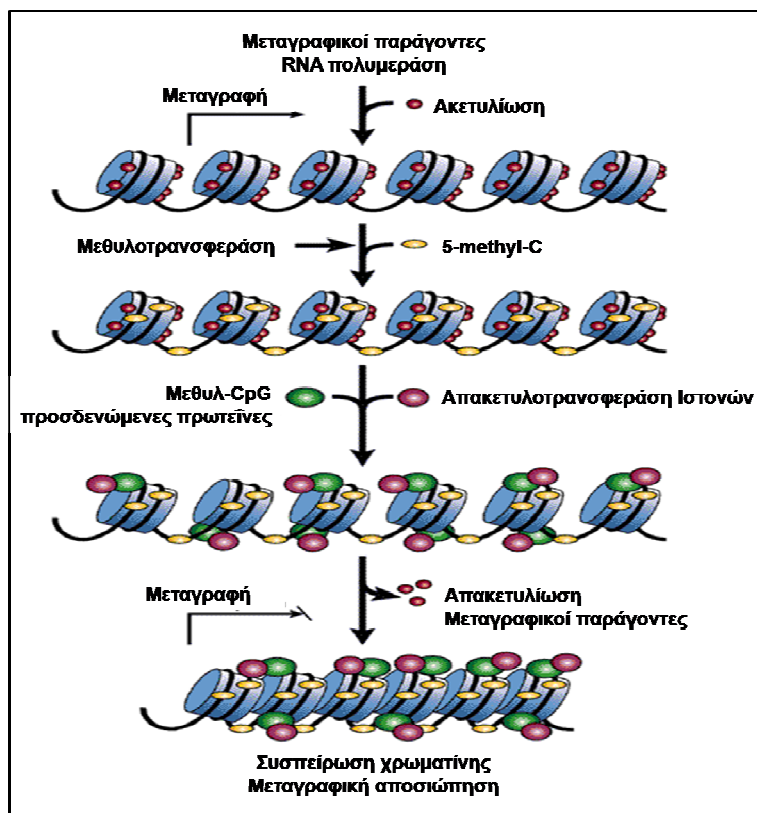
πυρηνική ιστόνη H2A, H2B, H3 και H4. Τα νουκλεοσώματα συνδέονται μεταξύ τους με μια μικρή αλληλουχία DNA 80-100 ζεύγη βάσεων, η οποία σταθεροποιείται με την πρόσδεση μιας άλλης ιστόνης, της H1. Η ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων απαιτεί μετατροπές στη δομή της χρωματίνης, μετατρέποντας το DNA από τη συσπειρωμένη και ανενεργή μορφή σε «καλούπι» για πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων. Υπάρχουν τρεις μηχανισμοί με τους οποίους η δομή της χρωματίνης μεταβάλλεται και γίνεται δεκτική σε ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων. Ο πρώτος αφορά στη μεταβολή της δομής των νουκλεοσωμάτων μέσω της επίδρασης συμπλόκων που έχουν δράση ATPάσης και ενεργοποιούν τα νουκλεοσώματα προκαλώντας μικρή μετακίνηση αυτών πάνω στο DNA. Ο δεύτερος αφορά στην ομοιοπολική μετατροπή των πυρηνικών ιστονών, ενώ ο τρίτος αναφέρεται στην αντικατάσταση των πυρηνικών ιστονών με άλλες ιστόνες που έχουν παρόμοια δομή με τις πυρηνικές (variant histones) π.χ H2AZ, H2AX και H3.<sup>88</sup>

Οι πυρηνικές ιστόνες έχουν αμινοτελικά άκρα πλούσια σε λυσίνη τα οποία λόγω του ότι είναι θετικά φορτισμένα προεξέχουν από το νουκλεόσωμα. Μετα-μεταγραφικές ομοιοπολικές μετατροπές σε συγκεκριμένα αμινοξέα στα αμινοτελικά άκρα πραγματοποιούνται από ποικιλία ενζυμικών οικογενειών που αποτελούν τους βασικούς καθοριστές της δομής της χρωματίνης και της έκφρασης των γονιδίων. Οι παραπάνω μετατροπές περιλαμβάνουν την ακετυλίωση/απακετυλίωση των λυσίνων και θρεονινών, την ουμπικουιλίωση των λυσίνων και την ADP-ριβοζυλίωση των γλουταμινικών οξέων. Οι περισσότερες μετατροπές στις ιστόνες είναι αναστρέψιμες και ο βαθμός της μετατροπής συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης. Οι μετατροπές πραγματοποιούνται αυστηρά σε περιοχές που μεταγράφονται, υποδεικνύοντας τη σχέση της ρύθμισης με την ενεργότητα της πολυμεράσης. Τα συνδυαστικά μοτίβα των μετατροπών των ιστονών τονίζουν την κατάσταση της χρωματίνης και είναι γνωστά ως "κώδικας ιστονών" ("histone code"). Αυτός ρυθμίζει την πρόσδεση στο DNA των μεταγραφικών-ρυθμιστικών συμπλόκων και ελέγχει επιγενετικά τη γονιδιακή έκφραση και την κληρονομικότητα των γονιδίων. Παρόλο που η ακετυλίωση των ιστονών σχετίζεται γενικά με την μεταγραφική ενεργότητα, η μεθυλίωση τους, αντίθετα, μπορεί να συσχετιστεί τόσο με την ενεργοποίηση όσο και με την καταστολή της έκφρασης γονιδίων<sup>89</sup> (Εικόνα 9).

Οι ακετυλοτρανσφεράσες (Histone acetyl transferases-HATs) και απακετυλοτρανσφεράσες (HDACs) των ιστονών αποτελούν δύο ομάδες ενζύμων που καταλύουν την ακετυλίωση και την απακετυλίωση αντίστοιχα, στις λυσίνες των συντηρημένων αμινοτελικών άκρων των πυρηνικών ιστονών. Η κατάσταση της ακετυλίωσης της χρωματίνης καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ των ακετυλασών και απακετυλασών. Γενικά, ενώ η αύξηση της ακετυλίωσης σχετίζεται με αποσυσπειρωμένη και ενεργή χρωματίνη καθώς και αυξημένη μεταγραφικότητα, η απακετυλίωση των ιστονών συνδέεται με συσπειρωμένη μορφή χρωματίνης και με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Οι

ακετυλοτρανσφεράσες διαιρούνται σε τρεις υποοικογένειες, ανάλογα με την παρουσία των συντηρημένων μοτίβων, όπως οι GNAT, MYST και p300/CBP. Παρομοίως, οι απακετυλάσες διακρίνονται σε τρεις τάξεις: τάξη I, τάξη II και τάξη III. Επιπρόσθετα, οι ακετυλάσες και απακετυλάσες επηρεάζουν την κατάσταση ακετυλίωσης των λυσίνων που βρίσκονται και στους μεταγραφικούς παράγοντες p53, E2F1, GATA1, RelA, YY1, Mad/Max, TFIIIE και TFIIIF, υποδοχείς ορμονών με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την πρόσδεση με το DNA<sup>89</sup>.

Σε ότι αφορά στην έκφραση της hTERT, έχει βρεθεί ότι η εκτοπική έκφραση ακετυλοτρανσφερασών ή απακετυλοτρανσφερασών επηρεάζει την έκφραση του μορίου, ενώ έχει βρεθεί ότι η φυσιολογική ενεργοποίηση της hTERT σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα συνδέεται με τοπική υπερακετυλίωση των ιστονών στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου<sup>109</sup>. Επιπρόσθετα, μετά από διαφοροποίηση των λευκαιμικών κυττάρων HL60, βρέθηκε πως η ποσότητα των ακετυλιωμένων ιστονών στον υποκινητή της hTERT μειώθηκε σημαντικά, ενώ παρατηρήθηκε ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης της hTERT<sup>110</sup>. Η αναστολή της απακετυλίωσης των ιστονών από τη χημική ουσία TSA (Τριχοστατίνη Α) απενεργοποίησε την καταστολή της hTERT στα διαφοροποιημένα κύτταρα<sup>110</sup>. Επομένως, η υπερακετυλίωση ή η υποακετυλίωση των ιστονών μπορεί να διαραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ή καταστολή της hTERT αντίστοιχα.



**Εικόνα 9:** Συνεργασία ακετυλίωσης και μεθυλίωσης στον έλεγχο της έκφρασης ενός γονιδίου. Η ακετυλίωση και η υπομεθυλίωση της χρωματίνης ενεργοποιούν τη μεταγραφή του γονιδίου, ενώ αντίθετα, η απακετυλίωση και μεθυλίωσή της προάγουν την καταστολή της έκφρασής του<sup>111</sup>.

## *Επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης της hTERT μέσω μικρών ρυθμιστικών συμπληρωματικών μη νοηματικών μορίων RNA*

Έχει παρατηρηθεί ότι ο ρόλος των μη νοηματικών μορίων RNA (microRNAs) στη δομική δυναμική της χρωματίνης και στην καταστολή της γονιδικής έκφρασης είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Σχετίζονται με την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X, με την πρόσδεση της HP1 στην χρωματίνη και πρόσφατα με την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της α-σφαιρίνης. Ένας μεγάλος αριθμός από μικρά ρυθμιστικά microRNAs έχουν ταυτοποιηθεί, τα οποία είναι πιθανό να παίζουν ρόλο στη βιολογία ενός μετασχηματισμένου κυττάρου. Συχνά εντοπίζονται σε γνωστές εύθραστες περιοχές και σημεία που σχετίζονται με τον καρκίνο. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η καταστολή των γονιδίων εξαρτάται από τα microRNAs, με μια διαδικασία κατά την οποία το δίκλωνο RNA τεμαχίζεται σε μικρά τμήματα 23 νουκλεοτιδίων (small interfering RNA). Τα τελευταία μπορούν να προκαλέσουν την αποικοδόμηση των συμπληρωματικών RNA, καθώς και την έναρξη της καταστολής των γονιδίων, μεταξύ των οποίων και της hTERT, μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τις ιστόνες<sup>91</sup>.

### **1.2 Καρκίνος του μαστού και τελομεράση**

#### **1.2.1. Επιδημιολογία και πρόγνωση καρκίνου του μαστού**

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο κοινή μορφή κακοήθειας που εμφανίζεται μεταξύ των γυναικών των περισσότερων δυτικών χωρών, καθώς έχουν πιθανότητα 10% να εμφανίσουν επιθετικό καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής τους<sup>112</sup>. Το 2002, ο καρκίνος του μαστού ήταν η δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου στον κόσμο, με πάνω από ένα εκατομμύριο νέα περιστατικά. Στη χώρα μας, σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία της Γ' Χειρουργικής Κλινικής-Χειρουργικής Μαστού του Θεαγενείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης, ο καρκίνος του μαστού είναι πρώτος σε συχνότητα εμφάνισης, αποτελώντας το 25% όλων των καρκίνων στις γυναίκες. Κάθε χρόνο 1.200 Ελληνίδες πεθαίνουν χτυπημένες από τη νόσο, η οποία στη χώρα μας αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τα τροχαία. Κάθε χρόνο 3.000 Ελληνίδες προσβάλλονται από καρκίνο του μαστού, ενώ κάθε χρόνο παρατηρείται αύξηση των κρουσμάτων κατά 3-4%. Παρά τις προόδους που έχουν σημειωθεί στην έγκαιρη διάγνωση, καθώς και στην κατανόηση των μοριακών βάσεων της βιολογίας του καρκίνου του μαστού, το 30% περίπου των ασθενών με καρκίνο του μαστού σε αρχικό στάδιο, θα υποτροπιάσουν. Η επιλογή πιο αποτελεσματικών και λιγότερο τοξικών θεραπευτικών σχημάτων απαιτεί να λαμβάνονται υπόψη τόσο η κατάσταση της ασθενούς και τα κλινικά δεδομένα όσο και τα μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου<sup>113</sup>.

Ο καρκίνος του μαστού έχει μεγάλη βιολογική ετερογένεια στην κλινική του εικόνα και στην απόκριση στη θεραπεία<sup>114</sup>, η οποία προκύπτει από τη γονιδιακή ποικιλότητα τόσο των ασθενών όσο και των όγκων. Παρόλα αυτά, η απόφαση για το είδος της θεραπείας που θα χρησιμοποιηθεί σε γυναίκες με διαγνωσμένο καρκίνο του μαστού, εξακολουθεί να βασίζεται στην κλασική ιστοπαθολογική εικόνα και σε ανοσοϊστοχημικούς δείκτες που δίνουν λίγες πληροφορίες για τη βιολογία του όγκου και την εν δυνάμει απόκριση στη θεραπεία<sup>114,115</sup>.

Η πρόγνωση του καρκίνου του μαστού επηρεάζεται από διάφορους βιοχημικούς δείκτες. Από το 1896 ήταν ήδη γνωστό από τον Beatson ότι η αμφοτερόπλευρη χειρουργική οωθηκτομή μπορεί να οδηγήσει σε υποχώρηση προχωρημένου καρκίνου του μαστού. Το 1967 ο Jensen ανακαλύπτει τους υποδοχείς οιστρογόνων και το 1971 η παρουσία τους χρησιμοποιείται ως προγνωστικός παράγοντας. Το 1978 ο McGuire επιτυγχάνει τη μέτρηση των επιπέδων των υποδοχέων των οιστρογόνων, τα οποία το 1979 θα αρχίσουν να χρησιμοποιούνται ως δείκτες για τη θεραπεία. Τέλος, το 1980 προσδιορίζονται τα επίπεδα των υποδοχέων της προγεστερόνης και χρησιμοποιούνται επικουρικά. Αν και ο ρόλος των στεροειδών ορμονών είχε απασχολήσει τους ερευνητές από το 1950, ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων δεν είχε προσδιοριστεί μέχρι το 1980. Το πρωτο-ογκογονίδιο HER2/neu (c-erb2) ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του '80 από τρεις ανεξάρτητες και διαφορετικές μεταξύ τους ερευνητικές προσεγγίσεις. Το 1990 ανακαλύφθηκαν τα γονίδια που προκαλούν οικογενείς τύπους καρκίνου του μαστού, όπως το BRCA1 στο χρωμόσωμα 17q21, το BRCA2 στο χρωμόσωμα 13, το p53 στο χρωμόσωμα 17p13 και ο υποδοχέας των ανδρογόνων του Y χρωμοσώματος, η μετάλλαξη του οποίου έχει συσχετισθεί με καρκίνο του μαστού στον άνδρα. Όταν μία γυναίκα έχει μετάλλαξη στα BRCA1 και BRCA2 διατρέχει αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Η πιθανότητα να υπάρχει μετάλλαξη σε κάποιο από τα δύο γονίδια είναι μεγάλη όταν ο καρκίνος μαστού εμφανίζεται σε μικρή ηλικία, όταν πολλοί συγγενείς έχουν προσβληθεί από τη νόσο και όταν υπάρχει ιστορικό άλλων τύπων καρκίνου στην οικογένεια, και ιδίως οωθηκών. Ο καρκίνος του μαστού που αναπτύσσεται σε αυτές τις γυναίκες είναι συνήθως αμφοτερόπλευρος<sup>116</sup>.

Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται ευρέως και έχουν προγνωστική σημασία είναι οι εξής :

- Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των υποδοχέων οιστρογόνου και προγεστερόνης : παρέχει τη δυνατότητα συσχέτισης της θετικότητας στους υποδοχείς οιστρογόνων / προγεστερόνης με την ανταπόκριση στην ορμονική θεραπεία

- Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των υποδοχέων EGFR (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας) : HER-2/neu (c-erb2), HER-1/neu (c-erb1), HER-3/neu (c-erb3), HER-4/neu (c-erb4).

Στο καρκίνωμα του μαστού η ενίσχυση του πρωτο-ογκογονιδίου HER-2/neu θεωρείται σημαντικής προγνωστικής σημασίας βιολογικός δείκτης με εξέχοντα επιπλέον προγνωστικό ρόλο, αφού μπορεί να καθορίζει το βαθμό ανταπόκρισης στην επικουρική θεραπεία. Επίσης, η ανίχνευσή του φαίνεται να αποτελεί μονόδρομο, γιατί η χορήγηση του όλο και περισσότερο χρησιμοποιούμενου φαρμάκου trastusumab (Herceptin), που συνίσταται σε μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον του εξωκυττάριου τμήματος του πρωτεϊνικού προϊόντος του HER-2/neu, είναι αποτελεσματική μόνο σε ασθενείς με υπερέκφραση του υποδοχέα (Hercep-test). Η υπερέκφραση του HER-2/neu αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα, σχετιζόμενο με την ανθεκτικότητα ή ευαισθησία σε ορισμένες μορφές επικουρικής θεραπείας, με βραχύ χρονικό διάστημα χωρίς νόσο και με βραχύ χρόνο επιβίωσης σε ασθενείς με θετικούς ή αρνητικούς λεμφαδένες. Επιπλέον, θεωρείται αντικειμενικός δείκτης για την έντονη πυρηνική ατυπία, το υψηλό αντικειμενικό βαθμό, την αυξημένη μεταστατική ικανότητα και γενικά την επιθετική βιολογική συμπεριφορά του καρκινώματος του μαστού. Κατά προσέγγιση, 10-34% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού παρουσιάζουν υπερέκφραση ή ενίσχυση του HER-2/neu<sup>116</sup>.

Σχεδόν στο 1/3 των καρκινωμάτων του μαστού υπάρχουν μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, οι οποίες σχετίζονται με υψηλό ιστολογικό βαθμό και επιθετική βιολογική συμπεριφορά. Η χρησιμοποίηση του γονιδίου p53 ως προγνωστικού δείκτη μπορεί να φανεί χρήσιμη, ιδιαίτερα στις ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες. Από την άλλη πλευρά, αναφέρεται ότι η υπερέκφρασή του μπορεί να έχει προγνωστική σημασία όσον αφορά στην ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία και στην ακτινοθεραπεία. Όμως, δεν υπάρχει πλήρης αποδοχή σχετικά με τη χρησιμότητά του και, ως εκ τούτου, η ανοσοϊστοχημική του ανίχνευση δε θεωρείται αναγκαία στην καθημερινή πράξη.

Από τους καρκινικούς δείκτες, τα CEA, CA 27.29 και CA 15-3 χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία σε προχωρημένη νόσο<sup>115</sup>.



## 1.2.2. Τελομεράση και καρκίνος του μαστού

### 1.2.2.1 Η τελομεράση ως διαγνωστικός στόχος στον καρκίνο του μαστού

Η ανάπτυξη του πρωτοκόλλου TRAP (Telomeric repeat Amplification Protocol) ανίχνευσης της δραστηριότητας της τελομεράσης, οδήγησε στην καλύτερη ανίχνευση της δραστηριότητας της τελομεράσης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα<sup>117</sup>. Αυτή η ευαίσθητη τεχνική που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, μπορεί να ανιχνεύσει έως και 1 με 10 θετικά κύτταρα ή 0,01 % σε έναν ανάμικτο πληθυσμό θετικών και αρνητικών κυττάρων. Παρότι κάποιες πρώτες μελέτες έδειξαν θετικό TRAP σε περίπου 88% όλων των σταδίων καρκινώματος του μαστού<sup>117</sup>, ένας πιο προσεκτικός χειρισμός των δειγμάτων αποκάλυψε ότι αυτό το ποσοστό μπορεί να αγγίζει το 95%<sup>118</sup>. Σύμφωνα με τους Shay και Bacchetti, το 75% των καρκινωμάτων μαστού *in situ*, το 88% των πορογενών και λοβιακών καρκινωμάτων, και το 5% των παρακείμενων ιστών, βρέθηκαν θετικοί ως προς τη δραστηριότητα της τελομεράσης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο TRAP, ενώ δεν παρατηρήθηκε δραστηριότητα τελομεράσης σε φυσιολογικούς ιστούς<sup>117</sup>. Οι Yashima *et al* ανίχνευσαν μία προοδευτική αύξηση των μέσων επιπέδων τελομεράσης σε σχέση με τη σοβαρότητα της ιστοπαθολογικής αλλαγής: το 14% των καλοήθων βλαβών του μαστού, το 92% των καρκινωμάτων *in situ*, και το 94% των διηθητικών καρκίνων του μαστού βρέθηκαν θετικοί ως προς τη δραστηριότητα του ενζύμου<sup>119</sup>. Η έκφραση του mRNA της καταλυτικής υπομονάδας hTERT της τελομεράσης μπορεί επίσης να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time quantitative reverse transcriptase-PCR), η οποία αποκάλυψε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των επιπέδων mRNA της hTERT και της επιθετικότητας των καρκίνων του μαστού<sup>120</sup>. Τόσο ο ποσοτικός προσδιορισμός της hTERT όσο και η δοκιμασία TRAP αποτελούν ικανοποιητικές μεθόδους για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού, αλλά θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες διαγνωστικές μεθόδους ώστε να αποκλειστούν τα ψευδή αποτελέσματα. Η ανίχνευση δραστηριότητας της τελομεράσης σε προεγχειρητικά παρασκευάσματα, όπως σε δείγματα από αναρρόφηση με λεπτή βελόνα (fine-needle aspirates FNAs), θα μπορούσε να βελτιώσει τη διαγνωστική ακρίβεια<sup>121,122</sup>. Η FNA είναι γνωστή για την ακρίβειά της, την αποτελεσματικότητά της σε σχέση με το κόστος και την ελάχιστη επικινδυνότητα<sup>121</sup>, ωστόσο, εξακολουθούν να προκύπτουν δυσκολίες από την αποκλειστική της χρήση. Δύο επιστημονικές ομάδες σύγκριναν χωριστά τη διαγνωστική χρησιμότητα δοκιμασιών που αφορούν την τελομεράση σε δείγματα από FNA<sup>121,122</sup>. Οι Poremba *et al* έδειξαν ότι το 92% των FNA από ασθενείς καρκίνου του μαστού ήταν θετικά ως προς την τελομεράση, το 94% των FNA από ασθενείς με καλοήθεις βλάβες στο μαστό ήταν αρνητικά ως προς την τελομεράση (τα θετικά περιστατικά ήταν όλα ιναδενώματα), και

υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας TRAP και της ιστολογικής διάγνωσης κάποιας ατυπίας<sup>122</sup>. Οι *Hiyama et al* παρατήρησαν ότι όλα τα άτυπα ή ενδιάμεσα περιστατικά από FNA στα οποία ανιχνευόταν δραστικότητα τελομεράσης, βρέθηκαν να είναι καρκινώματα μετά από χειρουργική αφαίρεση<sup>121</sup>. Επιπλέον, έξι από τους επτά όγκους χωρίς δραστικότητα τελομεράσης διαγνώστηκαν τελικά ως καλοήθεις, ενώ τα μισά περιστατικά με ανιχνεύσιμη δραστικότητα τελομεράσης, τα οποία είχαν χαρακτηριστεί αρχικά ως καλοήθη, διαγνώστηκαν συνακόλουθα ως καρκίνοι. Η ανίχνευση της δραστικότητας της τελομεράσης σε δείγματα FNAs είναι επομένως ισάξια, εάν όχι καλύτερη, από την κυτταρολογική ανίχνευση<sup>121</sup>, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες διαγνωστικές μεθόδους. Τέλος, η ανίχνευση RNA της τελομεράσης που προέρχεται από τους όγκους, στον ορό των ασθενών με καρκίνο του μαστού, θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση καθώς και στην παρακολούθηση των ασθενών<sup>123</sup>.

#### 1.2.2.2 Δραστικότητα τελομεράσης και πρόγνωση καρκίνου του μαστού

Καθώς αυξάνεται ο αριθμός των καρκίνων του μαστού που ανιχνεύονται με απεικονιστικές μεθόδους, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός δείκτη για την αξιολόγηση του κινδύνου επακόλουθου μεταστατικού καρκίνου. Οι *Hoos et al* βρήκαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της δραστικότητας της τελομεράσης και του μεγέθους του όγκου, της κατάστασης των λεμφαδένων και της σταδιοποίησης<sup>124</sup>. Βρέθηκε επίσης μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ θετικών ως προς την τελομεράση διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού και διήθησης του λεμφαγγειακού συστήματος, ένα πρωταρχικής σημασίας και ενδεικτικό της επιβίωσης στάδιο στη μετάσταση του καρκίνου του μαστού, που καθιστά την τελομεράση ένα χρήσιμο προγνωστικό δείκτη<sup>125</sup>. Οι *Clark et al* ανέφεραν, σε μία προγνωστική μελέτη που αφορούσε 398 ασθενείς με καρκίνο του μαστού με διήθηση στους λεμφαδένες, ότι η αυξημένη δραστικότητα της τελομεράσης συσχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση ελευθέρως νόσου<sup>126</sup>. Η υψηλή δραστικότητα της τελομεράσης στον καρκίνο του μαστού συσχετίζεται περισσότερο με γενετικές αλλοιώσεις στις χρωμοσωμικές περιοχές 3q (προσθήκη), 8q (προσθήκη), και 17p (έλλειψη). Αυτές οι αλλοιώσεις είναι κοινές στους καρκίνους του μαστού και αφορούν τα γονίδια *hTR* (στο 3q), *c-myc* (στο 8q), και *p53* (στο 17p), τα οποία έχουν συνδεθεί όλα με τη ρύθμιση της τελομεράσης<sup>127</sup>. Η κατανόηση της σχέσης μεταξύ της δραστικότητας της τελομεράσης και των γενετικών αλλαγών που συνδέονται με τον καρκίνο του μαστού παραμένει ένα σημαντικό πεδίο έρευνας σήμερα<sup>128</sup>.

### 1.3 Ρόλος της ακτινοβόλησης και της τελομεράσης στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού

#### 1.3.1. Σταδιοποίηση και θεραπεία του καρκίνου του μαστού

Η θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι πολυδιάστατη και οι θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν τη χειρουργική επέμβαση, την ακτινοθεραπεία, τη χημειοθεραπεία καθώς και την ορμονοθεραπεία<sup>129</sup>. Την τελευταία εικοσαετία έχουν σημειωθεί επαναστατικές μεταβολές σε ό,τι αφορά στην τοπική περιοχική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, οι οποίες προήλθαν κυρίως από τυχαίοποιημένες δοκιμές, οδήγησαν σε επαναθεώρηση της βιολογίας της νόσου και συνηγόρησαν υπέρ της διατήρησης του μαστού για τοπικό-περιοχικό έλεγχο και της χημειοθεραπείας για συστηματικό έλεγχο.

Σε καρκίνωμα *in situ*, το οποίο αποτελεί σήμερα το 30% των περιπτώσεων, αν είναι πορογενές (75%) γίνεται αφαίρεση του όγκου σε υγιή όρια και ακολουθεί ακτινοβολία, εφόσον ο όγκος είναι μικρός και επιθυμείται η διατήρηση του μαστού. Μαστεκτομή εφαρμόζεται σε όγκο αρκετά μεγάλου μεγέθους με διηθημένα χειρουργικά όρια, ώστε να μην είναι εφικτή η εξαίρεσή του σε υγιή όρια, με ποσοστά θεραπείας μεγαλύτερα από 90%<sup>130</sup>.

Σε περιορισμένη τοπική νόσο σταδίου I-II δεν υπάρχει διαφορά στα ποσοστά επιβίωσης μεταξύ τροποποιημένης ριζικής μαστεκτομής και περιορισμένης χειρουργικής εκτομής του όγκου ή τεταρτεκτομής, ακολουθούμενης από ακτινοβολία για την τοπική θεραπεία.

Στο στάδιο IIIA, που θεωρείται εγχειρίσιμο, ακολουθείται η χειρουργική θεραπεία για έλεγχο της τοπικής υποτροπής<sup>131</sup>. Σε μερικές ασθενείς ίσως θα αρκούσε και η τοπική θεραπεία με ακτινοβολία, αλλά τα ποσοστά τοπικής υποτροπής και θανάτου από μεταστατική νόσο είναι υψηλά. Γι'αυτό σε ασθενείς με καρκίνο μαστού και συρρέοντες ομόπλευρους λεμφαδένες, χορηγείται χημειοθεραπεία που ακολουθείται από ολική μαστεκτομή με αφαίρεση των μασχαλιαίων λεμφαδένων<sup>132</sup>.

Από το στάδιο IIIB, ο όγκος κρίνεται ανεγχείρητος, αν και σε μερικές περιπτώσεις χορηγείται χημειοθεραπεία για τέσσερις μήνες με CMF (cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil) ή CA (cyclophosphamide, adriamycin), ή FAC (5-fluorouracil, adriamycin, cyclophosphamide) μετά από ακτινοθεραπεία που ακολουθείται από μαστεκτομή και μετά από συστηματική χημειοθεραπεία και ορμονοθεραπεία σε όγκο με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς<sup>132</sup>.

Σε μεταστατική νόσο (στάδιο IV), για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας αξιολογείται η εμμηνοπαυσιακή κατάσταση της ασθενούς, η ύπαρξη ή όχι ορμονικών υποδοχέων και οι θέσεις των μεταστάσεων. Ο αρνητικός για υποδοχείς οιστρογόνου καρκίνος του μαστού, η πνευμονική καρκινωμάτωσης λεμφαγγείτιδα και οι ηπατικές

μεταστάσεις, σπάνια ανταποκρίνονται στην ορμονική αγωγή και αντιμετωπίζονται με χημειοθεραπεία<sup>133</sup>. Οι μεταστάσεις με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων αντιμετωπίζονται με ορμονική αγωγή. Στις γυναίκες προεμμηνόπαυσιακής ηλικίας εφαρμόζεται αμφοτερόπλευρη οωθηεκτομή ή ορμονοθεραπεία, ενώ στις ασθενείς μετεμμηνόπαυσιακής ηλικίας, ορμονοθεραπεία. Το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-HER-2 με ή χωρίς άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες είναι χρήσιμο σε ασθενείς με υπερέκφραση του HER2/neu. Η μεταστατική νόσος συνήθως αντιμετωπίζεται με συστηματική θεραπεία, αν και μερικά τοπικά προβλήματα μπορούν να βελτιωθούν με την τοπική ακτινοβολία. Οι γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο μαστού έχουν μέση επιβίωση περίπου 2 χρόνια<sup>132</sup>.

Γενικά, η επικουρική ορμονοθεραπεία με ταμοξιφένη χορηγείται για 5 χρόνια σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και μειώνει σαφώς τα ποσοστά υποτροπής της νόσου (50-60%), ενώ βελτιώνει τα ποσοστά δεκαετούς επιβίωσης ανεξάρτητα από την ηλικία, την εμμηνόπαυσιακή κατάσταση και τη συνοδό χημειοθεραπεία<sup>134</sup>.

### **1.3.2. Ρόλος της ακτινοθεραπείας στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού**

Η ριζική μαστεκτομή που εφαρμόστηκε από τον Halsted στηριζόταν στη θεωρία της "φυγόκεντρου διασποράς". Ο Halsted πίστευε ότι η επέκταση του καρκίνου του μαστού γίνεται κατά συνέχεια ιστού και με φυγόκεντρο λεμφογενή διασπορά. Η θεωρία αυτή όμως μετά το 1950 παραχώρησε τη θέση της στην άποψη που επικρατεί και σήμερα και πιο συγκεκριμένα ότι οι αιματογενείς μεταστάσεις είναι ανεξάρτητες της διήθησης των λεμφαγγείων. Έτσι, σταδιακά οι επεμβάσεις έγιναν λιγότερο ριζικές για να φτάσουμε τα τελευταία χρόνια σε ελάχιστα ακρωτηριαστικές επεμβάσεις όπως η τμηματεκτομή και η ογκεκτομή. Δεδομένου όμως ότι οι επεμβάσεις αυτές συνοδεύονται από μεγάλο ποσοστό τοπικής υποτροπής, που μπορεί να φτάνει και το 35-40%, είναι απαραίτητος ο συνδυασμός τους με ακτινοθεραπεία. Οι κυριότερες κλινικές μελέτες που συγκρίνουν τη μαστεκτομή με την συντηρητική αντιμετώπιση είναι του Veronezi και του Fisher. Και οι δύο απέδειξαν την σπουδαιότητα της συμπληρωματικής ακτινοθεραπείας μειώνοντας το ποσοστό της τοπικής υποτροπής σε 2-7%. Έτσι λοιπόν τα τελευταία χρόνια στα αρχικά στάδια I και II η τμηματεκτομή και η ογκεκτομή ακολουθούμενη από ακτινοθεραπεία έγινε η θεραπεία επιλογής<sup>129,135</sup>.

Στο τοπικά προχωρημένο στάδιο χωρίς όμως εμφανείς απομακρυσμένες μεταστάσεις, η σύγχρονη θεραπευτική αντιμετώπιση περιλαμβάνει πρώτα χημειοθεραπεία (neo-adjuvant) ακολουθούμενη από χειρουργική επέμβαση - αν είναι εφικτό - και ακτινοθεραπεία, ή μόνο ακτινοθεραπεία<sup>136</sup>.

Ενώ όμως η ακτινοθεραπεία είναι αναπόσπαστο μέρος της αντιμετώπισης όταν πρόκειται για ογκεκτομή ή τμηματεκτομή, στις περιπτώσεις μαστεκτομής γίνεται μόνο υπό

ορισμένες προϋποθέσεις και πιο συγκεκριμένα σε όγκο  $\geq 5$  cm, αν τα χειρουργικά όρια δεν είναι ελεύθερα, αν υπάρχει διήθηση του θωρακικού μυός και αν υπάρχουν περισσότεροι από 4 διηθημένοι μασχαλιαίοι λεμφαδένες. Όλες οι συνθήκες που αναφέρθηκαν αποτελούν παράγοντες υψηλού κινδύνου για τοπική υποτροπή.

Στις περιπτώσεις μεταστάσεων η συμβολή της ακτινοθεραπείας σαν παρηγορική θεραπεία είναι ιδιαίτερα μεγάλη. Σημαντική ανακούφιση επιτυγχάνεται στο μεγαλύτερο μέρος των ασθενών με μεταστάσεις στα οστά, με συμπίεση του νωτιαίου σωλήνα όπως και στις περιπτώσεις εγκεφαλικών μεταστάσεων. Αν εμφανιστεί τοπική υποτροπή σε μαστό που είχε υποβληθεί σε συντηρητική επέμβαση και ακτινοθεραπεία, θεραπεία εκλογής είναι η μαστεκτομή. Σε περιπτώσεις τοπικών υποτροπών μετά την μαστεκτομή, αν η περιοχή δεν έχει ακτινοβοληθεί στο παρελθόν, η ακτινοθεραπεία κατέχει ένα σημαντικό ρόλο ενώ σε υποτροπές εντός του ακτινοθεραπευτικού πεδίου οι δυνατότητές της είναι ιδιαίτερα περιορισμένες<sup>137,138</sup>.

Οι επιπλοκές της ακτινοθεραπείας είναι σε γενικές γραμμές περιορισμένες και εξαρτώνται από την τεχνική της ακτινοθεραπείας, την Ημερήσια Δόση Όγκου και την Συνολική Δόση Όγκου και τον συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Οι πιο συχνές επιπλοκές είναι το ερύθημα του μαστού, το οίδημα του μαστού, το οίδημα του βραχίονα, κυρίως στις περιπτώσεις ακτινοβόλησης της μασχάλης μετά από λεμφαδενικό καθαρισμό, ενώ σπανιότερες είναι οι πνευμονίτις, η ασυμπτωματική ίνωση στην κορυφή του πνεύμονα και η καρδιακή τοξικότητα. Οι περισσότερες από τις επιπλοκές είναι δυνατόν να αποφευχθούν ή να ελαχιστοποιηθούν με καλά σχεδιασμένη ακτινοθεραπευτική τεχνική και προσεκτική εφαρμογή της<sup>139,140</sup>.

Η ακτινοθεραπεία αποτελεί ένα σημαντικότατο όπλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού και οι θεραπευτικές επιλογές και οι συνδυασμοί τους θα πρέπει να καθορίζονται αμέσως μετά την διάγνωση με τη συνεργασία του χειρουργού, του παθολόγου ογκολόγου και του ακτινοθεραπευτή ογκολόγου στα πλαίσια ογκολογικού συμβουλίου<sup>140</sup>.

### 1.3.3. Τελομεράση και ακτινοθεραπεία

Η έκθεση στην ιοντίζουσα ακτινοβολία, προκαλεί βλάβες στο DNA οι οποίες έχουν συνδεθεί τόσο με τον κυτταρικό θάνατο, όσο και με τη νεοπλαστική μεταμόρφωση των κυττάρων<sup>141</sup>. Σε διάφορες περιπτώσεις, η ευαισθησία των κυττάρων στην επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας έχει συσχετισθεί με τη μειωμένη ικανότητά τους να επιδιορθώσουν τις δίκλωνες θραύσεις (double strand breaks) στο DNA. Πολλά γονίδια ενέχονται στην επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων στο DNA συμπεριλαμβανομένων των XRCC5, Ku80, XRCC6, Ku70 και XRCC7<sup>142</sup>. Επιπρόσθετα, υπάρχουν διάφορες γονιδιακές ασθένειες, τα υπεύθυνα γονίδια των οποίων έχουν συνδεθεί με τη διατήρηση της σταθερότητας του

γονιδιώματος και με την ευαισθησία στην ακτινοβολία<sup>143</sup>. Παραδείγματα κληρονομικών συνδρόμων τα οποία συνδέονται με αυξημένη ευαισθησία στην επίδραση ακτινοβολίας είναι η αταξία τηλεγγειεκτασία, το σύνδρομο Coayne, το σύνδρομο Down, η αναιμία Fanconi, το σύνδρομο Gardner, το σύνδρομο Nijmegen και το σύνδρομο Usher<sup>143</sup>. Υπάρχουν ενδείξεις ότι πρωτεΐνες γνωστές για το ρόλο τους στα τελομερή των χρωμοσωμάτων, μπορεί να ενέχονται και στην επιδιόρθωση των δίκλωνων θραύσεων στο DNA<sup>144,145</sup>. Το γονίδιο ATM της αταξίας τηλεγγειεκτασίας, κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη κινάση, η οποία ενέχεται στο μεταβολισμό των τελομερών<sup>146,147</sup>. Στα τελομερή των ζυμών εντοπίζονται οι πρωτεΐνες γKu80 και Sir3p, οι οποίες μετά από την πρόκληση δίκλωνων θραύσεων μετατοπίζονται από τα τελομερή στις περιοχές όπου υπάρχουν βλάβες στο DNA<sup>148,149</sup>. Στα θηλαστικά, η πρωτεΐνη Ku προσδένεται στα τελομερή παρεμποδίζοντας τη σύντηξή τους<sup>150,151</sup>. Μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες που ενέχονται στην επιδιόρθωση του DNA, όπως στις πρωτεΐνες γKu80, γKu70, Mre11, rad50, Xrs2, Sir2, Sir3 οδηγούν σε αλλοιωμένη κατασκευή των τελομερών και αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων στην επίδραση ακτινοβολίας<sup>152</sup>. Τέλος σε mTR<sup>-/-</sup> επίμυες έχει αναφερθεί συσχέτιση μεταξύ μικρού μήκους τελομερών και υπερευαισθησίας του οργανισμού στην επίδραση ακτινοβολίας<sup>153</sup>.

*Χρήση της δραστικότητας της τελομεράσης ως μέτρο για την αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας στον καρκίνο.*

Καθώς η ακτινοθεραπεία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου, ο προσδιορισμός του ποσοστού των εναπομεινάντων καρκινικών κυττάρων μετά από την επίδραση ακτινοβολίας, είναι μεγάλης σημασίας σε ό,τι αφορά στην αξιολόγηση της επιτυχίας της ακτινοθεραπείας. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν διάφορες φαινοτυπικές ανωμαλίες, όπως την απώλεια διαφοροποίησης, την αυξημένη θνησιμότητα και την αυξημένη ανθεκτικότητα σε φάρμακα. Παρότι διάφοροι μοριακοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τον προσδιορισμό της υπολειπόμενης νόσου, δεν υπάρχει κάποιος μοριακός δείκτης που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλους τους τύπους καρκίνου. Καθώς η δραστικότητα της τελομεράσης ανευρίσκεται σε σχεδόν όλα τα καρκινώματα<sup>117,154</sup>, και το επίπεδο δραστικότητάς της συσχετίζεται με το στάδιο της καρκινογένεσης<sup>155-157</sup>, ο προσδιορισμός της δραστικότητας της τελομεράσης έχει μεγάλο δυναμικό χρησιμοποίησης στην κλινική διάγνωση αλλά και στην παρακολούθηση υποτροπής διαφόρων κακοηθειών μετά από ακτινοθεραπεία<sup>157</sup>.

Σε υψηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας, έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ αύξησης του κυτταρικού θανάτου και μείωσης της δραστικότητας της τελομεράσης<sup>158,159</sup>. Αυτή η συσχέτιση βασίζεται σε μελέτες όπου η επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας στη δραστικότητα της τελομεράσης και στην κυτταρική βιωσιμότητα, προσδιορίστηκαν σε κύτταρα θετικά ως

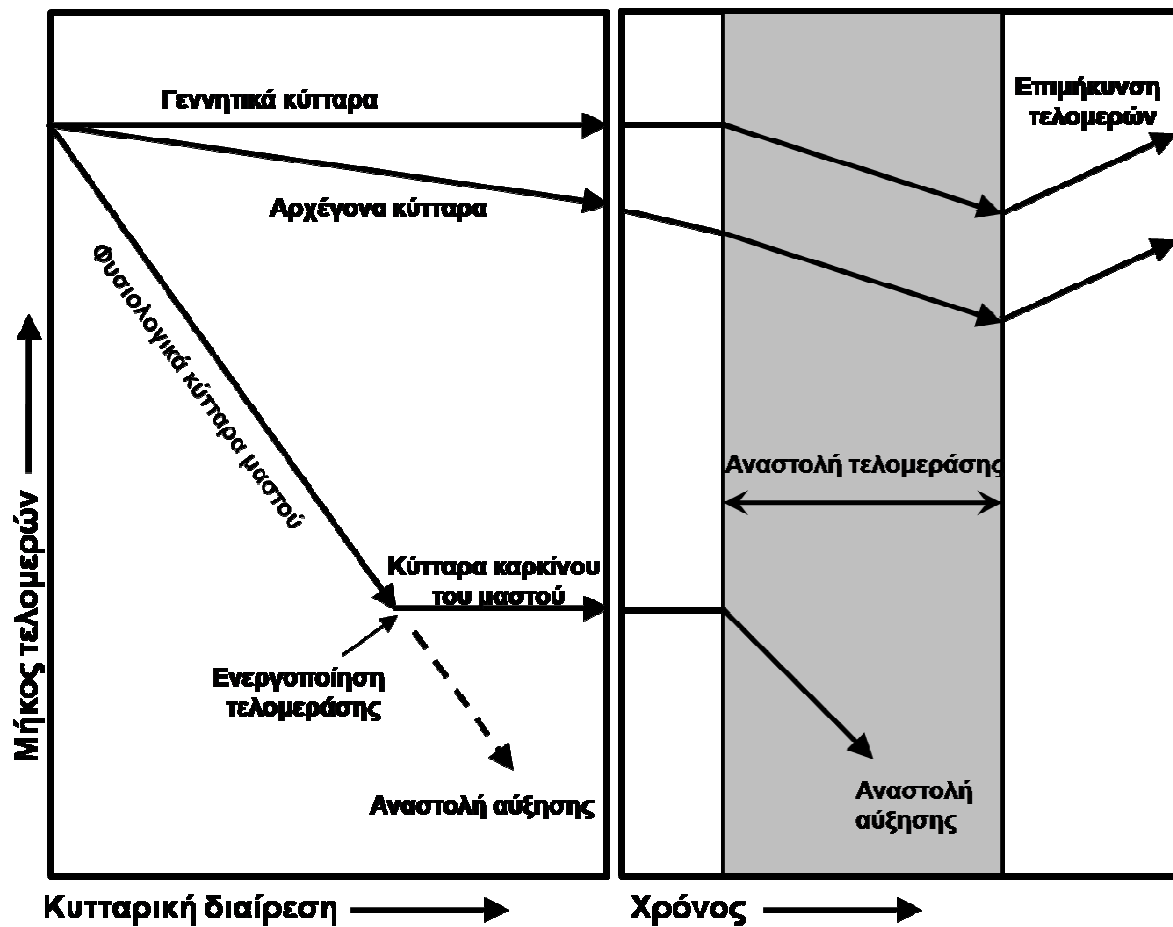
προς την τελομεράση. Κύτταρα HeLa και RKO, τα οποία ακτινοβολήθηκαν με δόσεις από 0 έως 40 Gy και μελετήθηκαν έως και 168 ώρες μετά από την ακτινοβόληση, παρουσίασαν μείωση της κυτταρικής τους βιωσιμότητας, η οποία συσχετίστηκε με τη δόση της ακτινοβολίας και με το χρόνο μετά από την ακτινοβόληση. Σημαντική μείωση στη δραστικότητα της τελομεράσης και την κυτταρική βιωσιμότητα βρέθηκε από τις 120 ώρες και έπειτα και σε δόσεις μεγαλύτερες των 10 Gy, ενώ δεν ανιχνεύθηκε δραστικότητα τελομεράσης 168 ώρες μετά από την ακτινοβόληση σε δείγματα που δέχθηκαν δόσεις μεγαλύτερες των 20 Gy. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε επίμυες όπου τα επίπεδα δραστικότητας της τελομεράσης μελετήθηκαν πριν και μετά από ακτινοβόληση όγκων<sup>158</sup>. Οι μη ακτινοβολημένοι όγκοι δεν παρουσίασαν αλλαγές στη δραστικότητα της τελομεράσης, ενώ οι ακτινοβολημένοι παρουσίασαν μείωση στα επίπεδα δραστικότητας του ενζύμου. Σε όγκους οι οποίοι δεν υποτροπίασαν, δεν ανιχνεύθηκε δραστικότητα τελομεράσης, ενώ σε όγκους που επρόκειτο και τελικά υποτροπίασαν, η δραστικότητα της τελομεράσης δε μηδενίστηκε ποτέ<sup>158</sup>. Όλα αυτά τα αποτελέσματα εδραίωσαν μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ του κυτταρικού θανάτου μετά από την επίδραση ακτινοβολίας και μείωσης στη δραστικότητα της τελομεράσης<sup>157</sup>.

Μελέτες *in vitro* και *in vivo* έδειξαν ότι μπορούμε να συλλέξουμε σημαντικές πληροφορίες από τα εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα όγκων μετά από ακτινοβόληση, συγκρίνοντας τα επίπεδα δραστικότητας της τελομεράσης<sup>158</sup>. Παρότι υπάρχουν δεδομένα που προτείνουν ότι η δραστικότητα της τελομεράσης μπορεί να διαφέρει ανάμεσα σε θετικές ως προς την τελομεράση κυτταρικές σειρές, η μείωση της δραστικότητας του ενζύμου σε πειράματα *in vitro* και *in vivo* μετά από ακτινοβόληση, φαίνεται να παραλληλίζει τον κυτταρικό θάνατο. Συμπερασματικά, το ένζυμο της τελομεράσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της αποτελεσματικότητας ενός σχήματος ακτινοθεραπείας<sup>157</sup>.

#### 1.3.4. Θεραπεία – Στόχευση της τελομεράσης

Το μέσο μήκος των τελομερών στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού είναι συνήθως αρκετά μικρότερο από αυτό των φυσιολογικών κυττάρων. Αυτή η διαφορά στο μήκος των τελομερών αν συνδυαστεί με το γεγονός ότι ο ρυθμός κυτταρικής διαίρεσης των καρκινικών κυττάρων είναι πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με εκείνο των φυσιολογικών, καθιστούν την καταστολή της τελομεράσης έναν ελκυστικό εν δυνάμει θεραπευτικό στόχο του καρκίνου του μαστού. Η θεραπεία με αναστολείς της τελομεράσης θα μπορούσε να μην εμφανίζει την τοξικότητα που εμφανίζουν άλλοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, από τη στιγμή που η τελομεράση δεν ανιχνεύεται στα περισσότερα σωματικά κύτταρα (Εικόνα 10). Ενώ υπάρχουν στον οργανισμό φυσιολογικά κύτταρα θετικά ως προς την τελομεράση που πολλαπλασιάζονται διαρκώς, όπως τα αρχέγονα κύτταρα (stem cells) τα οποία θα

μπορούσαν αρχικά να επηρεαστούν, το μήκος των τελομερών τους είναι πολύ υψηλότερο από το κρίσιμο μικρό μήκος που ενεργοποιεί το μηχανισμό αναστολής της κυτταρικής αύξησης λόγω βλάβης στο DNA. Επιπλέον, τα περισσότερα αρχέγονα κύτταρα είναι σε στάδιο ηρεμίας, ενώ η μείωση του μήκους των τελομερών προκύπτει κατά την κυτταρική διαίρεση. Από τη στιγμή που τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα του μαστού έχουν πολύ μικρά τελομερή, η θεραπεία με αναστολείς της τελομεράσης θα μπορούσε να οδηγήσει στην αναστολή της κυτταρικής αύξησης και σε κυτταρικό θάνατο<sup>128</sup>.



Εικόνα 10: Επίδραση των αναστολέων της τελομεράσης στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού σύμφωνα με τις ανασκοπήσεις των Krupp *et al*<sup>160</sup> και White *et al*<sup>161</sup>.

### Πρόοδος στην ανάπτυξη αναστολέων της τελομεράσης

Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο της τελομεράσης περιέχει πολλαπλές περιοχές που επιτρέπουν την αναστολή του. Η σύγχρονη έρευνα περιλαμβάνει τη στόχευση του RNA συστατικού της τελομεράσης (μη πληροφοριακά ολιγονουκλεοτίδια, hammerhead ribozymes), αναστολή της καταλυτικής υπομονάδας (μεταλλαγμένη επικρατή αρνητική



hTERT, αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης), την ανοσοθεραπεία, και τους μικρούς μοριακούς αναστολείς<sup>161</sup>. Καταρχήν, οι αναστολείς της τελομεράσης θα πρέπει να μην έχουν άμεση τοξικότητα στο κύτταρο, να μειώνουν τη δραστηριότητα της τελομεράσης χωρίς να επηρεάζουν αρχικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επιπλέον, χωρίς ενεργή τελομεράση, τα τελομερή θα πρέπει να μικραίνουν σταδιακά μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση. Τα κύτταρα θα πρέπει τελικά να πεθαίνουν ή να σταματούν την αύξησή τους και ο απαιτούμενος χρόνος για να συμβεί αυτό θα πρέπει να σχετίζεται με το αρχικό μήκος των τελομερών.

Τα μη πληροφοριακά ολιγονουκλεοτίδια, η χρήση μεταλλαγμένης επικρατούς αρνητικής hTERT και οι αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης έχουν ήδη μελετηθεί στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού<sup>161-163</sup>. Ο πιο συχνά χρησιμοποιημένος αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης είναι η 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)<sup>161</sup>. Οι Melana *et al* παρατήρησαν ότι η AZT ανέστειλε την αύξηση καρκινικών κυττάρων μαστού καθώς και τη δραστηριότητα της τελομεράσης σε πολύ μικρότερες δόσεις σε σχέση με φυσιολογικά κύτταρα του μαστού<sup>162</sup>. Οι Multani *et al*, ωστόσο, έδειξαν ότι η AZT μείωσε το τελομεριδιακό σήμα, όπως αυτό ανιχνεύεται με φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό, στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 μέσα σε 72 h<sup>163</sup>, χρόνος πολύ μικρός για να εξηγήσει την αναστολή της τελομεράσης και την προοδευτική μείωση του μήκους των τελομερών. Η επίδραση της AZT, ενώ είναι αποτελεσματική στην αναστολή της αύξησης των κυττάρων καρκίνου του μαστού σε αυτές τις μελέτες, δε μπορεί να οφείλεται σε ειδικό μηχανισμό εξαρτώμενο από τα τελομερή, και η αναστολή της τελομεράσης μπορεί να είναι απλώς μία παρενέργεια<sup>161</sup>. Καθώς επιπλέον έρευνες είναι απαραίτητες για να αποδειχθεί η ειδικότητα της AZT, μελέτες που χρησιμοποιούν μη πληροφοριακά ολιγονουκλεοτίδια, όπως το 2'-O-methyl RNA που κατευθύνεται κατά του τμήματος hTR, αλλά και τη μεταλλαγμένη επικρατή αρνητική hTERT έχουν βρεθεί να είναι αποτελεσματικοί και ειδικοί αναστολείς της τελομεράσης σε αθανατοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού και σε κύτταρα καρκινώματος του μαστού *in vitro*<sup>161</sup>.

Επίσης, άλλοι παράγοντες έχουν βρεθεί να διαδραματίζουν ρόλο στην αναστολή της τελομεράσης και στον έλεγχο του καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα το ρετινοϊκό οξύ και η ταμοξιφένη έχουν ήδη βρεθεί να αναστέλλουν τη δραστηριότητα της τελομεράσης σε κύτταρα καρκίνου του μαστού<sup>164,165</sup>, πιθανώς ως δευτερεύουσα συνέπεια της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ενώ αυτοί οι παράγοντες είναι γνωστοί για τις αντιπολλαπλασιαστικές τους ικανότητες, λίγα είναι γνωστά σε σχέση με την επίδρασή τους στην αθανατοποίηση των κυττάρων, η οποία αποτελεί ένα σημαντικό βήμα της εξέλιξης του καρκίνου του μαστού<sup>166</sup>.

## 1.4 Σκοπός της διατριβής

Στη συγκεκριμένη διατριβή μελετήθηκε η επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στην έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας (hTERT) της τελομεράσης, καθώς και στη δραστικότητα του ολοενζύμου της τελομεράσης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και σε δείγματα όγκων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού που διέφεραν μεταξύ τους ως προς τον φαινότυπό τους (παρουσία ή απουσία υποδοχέων HER2/neu, ERα και παρουσία λειτουργικής ή μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53), με στόχο να ταυτοποιηθούν τα πιθανά μόρια ή/και τα πιθανά σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία ενέχονται στη ρύθμιση του συστήματος hTERT/τελομεράσης και στην ανταπόκριση των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία.

Τόσο οι κυτταρικές σειρές όσο και οι καρκινικοί ιστοί, ακτινοβολήθηκαν με 10 και 20 Gy ιοντίζουσας ακτινοβολίας και στη συνέχεια διερευνήθηκαν τα ακόλουθα:

- η κυτταρική βιωσιμότητα και η ανθεκτικότητα ή ευαισθησία των κυτταρικών σειρών και καρκινικών δειγμάτων στην ακτινοβολία
- η μεταβολή της κατανομής των καρκινικών κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο
- η μεταβολή της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης και της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT)
- ο ρόλος του κυτταρικού φαινότυπου του καρκίνου του μαστού, όπως η παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων (ER), η παρουσία HER2 και η ύπαρξη φυσιολογικής ή μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53 στην έκφραση της τελομεράσης και στην απόκριση των κυττάρων στην ακτινοβολία
- η επίδραση της αποσιώπησης των γονιδίων hTERT και HER2 στην ανθεκτικότητα των κυττάρων μετά την ακτινοβολία
- ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων myc, mad, max, NF-κB και της ακετυλίωσης της ιστόνης H3 στη ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης και στην ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων μετά από ακτινοβολία.

## **2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 2.1 Υλικά και μέθοδοι

### 2.1.1 Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 6 κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού με διαφορές σε ό,τι αφορά στην έκφραση του ενδοκυττάριου υποδοχέα των οιστρογόνων α (ERα), του επιφανειακού υποδοχέα HER2/neu και στην παρουσία φυσιολογικού ή μεταλλαγμένου γονιδίου p53. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι MCF-7, MCF-7/HER2, MDA-MB-231, HBL100, SK-BR-3 και BT-474. Οι 6 κυτταρικές σειρές επιλέχθηκαν λόγω του ότι παρουσιάζουν διαφορετικούς συνδυασμούς των βασικών αυτών φαινοτυπικών χαρακτηριστικών ενώ χρησιμοποιήθηκε κι ένα ζευγάρι κυτταρικών σειρών (MCF-7 και MCF-7/HER2, όπου η δεύτερη αποτελεί θυγατρική σειρά της πρώτης και διαφέρει από αυτήν μόνο στην παρουσία του υποδοχέα HER2). Τα χαρακτηριστικά των άνωθι κυτταρικών σειρών απεικονίζονται στον πίνακα 1.

Κυτταρική σειρά	HER2/neu	ERα	p53
MCF-7	+	+++	φυσιολογικό
MCF-7/HER2	+++	+++	φυσιολογικό
MDA-MB-231	+	-	μετάλλαξη R280K
HBL100	+	-	φυσιολογικό
SK-BR-3	+++	-	μετάλλαξη R175H
BT-474	+++	+++	μετάλλαξη E285K

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των έξι κυτταρικών σειρών της μελέτης

Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν με καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Scotland, UK) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύων βοός (Gibco, Paisley, Scotland, UK), L-Γλουταμίνη σε συγκέντρωση 2mM (Gibco, Paisley, Scotland, UK), και με αντιβιοτικά πενικιλίνη σε συγκέντρωση 100 IU/ml και στρεπτομυκίνη σε συγκέντρωση 100 µg/ml (Gibco, Paisley, Scotland, UK).

Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες των 25 ml, σε κλίβανο με 5% CO<sub>2</sub>, υγρασία 100%, στους 37°C. Όταν η περιεκτικότητα της φλάσκας σε κύτταρα φτάσει το 80 με 90% τότε ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. το θρεπτικό υλικό της φλάσκας απομακρύνεται
2. τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με 5 ml PBS (Biochrom)

3. προστίθεται στη φλάσκα 1 ml θρυψίνης (Biocrom) προθερμασμένης στους 37°C. Σε αυτό το στάδιο το πώμα της φλάσκας σφραγίζεται και η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο για 3-5 λεπτά περίπου.
4. η αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα ελέγχεται στο μικροσκόπιο
5. στα κύτταρα προστίθενται 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης.
6. ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάριο των 15 ml και φυγοκέντρηση στις 800 στροφές για 5 λεπτά
7. μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται με 10 ml PBS. Σε αυτό το στάδιο γίνεται μέτρηση των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο: 20 μl από το κυτταρικό εναιώρημα αναμειγνύονται με 20 μl Trypan Blue και τοποθετούνται σε αιμοκυτταρόμετρο και προσμετρώνται στο μικροσκόπιο. Το Trypan Blue βάφει μπλε τα κύτταρα των οποίων η κυτταρική μεμβράνη έχει υποστεί αλλοιώσεις, όπως τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα. Τα υγιή κύτταρα δε βάφονται από το Trypan Blue και μόνο αυτά μετρώνται στο αιμοκυτταρόμετρο. Με τον τρόπο αυτό, υπολογίζεται η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος.
8. κατά τη διάρκεια της μέτρησης των κυττάρων και του υπολογισμού της συγκέντρωσής τους, το σωληνάριο με τα κύτταρα φυγοκεντρείται στις 800 στροφές για 5 λεπτά.
9. μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού
10. με βάση τη συγκέντρωση που υπολογίστηκε σε ζωντανά κύτταρα έπειτα από τη μέτρηση στο αιμοκυτταρόμετρο, μία ποσότητα από το εναιώρημα των κυττάρων που να περιέχει  $10^5$  κύτταρα τοποθετείται σε μία νέα φλάσκα των 25 ml και η ποσότητα αυτή συμπληρώνεται μέχρι τα 10 ml με φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό.
11. η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο με ελαφρώς ανοιγμένο το πώμα και ελέγχεται τις επόμενες ημέρες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν μετά από ψύξη στους -150°C. Η διαδικασία της ψύξης των κυττάρων γίνεται ως εξής: όταν μία φλάσκα των 25 ml γεμίσει κατά 90 με 100%, τα κύτταρα αποκολλώνται με θρυψίνη, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η δράση της θρυψίνης σταματά με την προσθήκη 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα φυγοκεντρούνται. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης ετοιμάζεται το θρεπτικό της ψύξης των κυττάρων που αποτελείται από 60% θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά, 30% ορό εμβρύου και 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich). Το DMSO συντελεί στην αργή

ψύξη των κυττάρων και του θρεπτικού υλικού, αποφεύγοντας τη δημιουργία κρυστάλλων που θα κατέστρεφαν την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων. Μετά από τη φυγοκέντρηση, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 2 ml από το θρεπτικό υλικό της ψύξης των κυττάρων και στη συνέχεια τοποθετούνται σε ειδικά κρυοφιαλίδια. Η κατάψυξη των κυττάρων γίνεται διαδοχικά. Τα κρυοφιαλίδια τοποθετούνται αρχικά στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 4 ώρες περίπου, κατόπιν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες και στη συνέχεια στους  $-150^{\circ}\text{C}$ .

Σε αντίθεση με τη διαδοχική ψύξη των κυττάρων, η απόψυξή τους γίνεται γρήγορα με την τοποθέτηση του κρυοφιαλιδίου σε υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$  και άμεση μεταφορά του περιεχομένου του φιαλιδίου σε σωληνάριο των 15 ml που περιέχει 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Το σωληνάριο φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 800 στροφές, το υπερκείμενο απομακρύνεται, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τοποθετούνται σε φλάσκα των 25 ml.

### **2.1.2 Απομόνωση κυττάρων από δείγματα πρωτογενών καρκίνων του μαστού και επεξεργασία**

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν έξι δείγματα από καρκινικό ιστό ασθενών με καρκίνο του μαστού. Οι καρκινικοί ιστοί συλλέγησαν κατά τη διάρκεια χειρουργικής αφαίρεσης καρκινωμάτων του μαστού. Από τα δείγματα αυτά, με τη βοήθεια χειρουργικών λεπίδων, απομακρύνθηκαν οι υγιείς, φυσιολογικοί ιστοί, ώστε να παραμείνουν οι παθολογικοί ιστοί προς καλλιέργεια.

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια των χειρουργικών λεπίδων, πραγματοποιήθηκε κατάτμηση των χειρουργικών παρασκευασμάτων και ανάδευσή τους με φυσιολογικό ορό και τη βοήθεια πιπέτας Pasteur, με στόχο τη μέγιστη δυνατή απελευθέρωση κυττάρων. Μία μικρή ποσότητα από το εναιώρημα των κυττάρων μεταγγίστηκε σε καλλιεργητική φλάσκα των 25 ml και προστέθηκαν σε αυτή 8 ml πλήρους θρεπτικού καλλιεργητικού υλικού RPMI 1640 και 2 ml θρεπτικού υλικού Chang προς ενίσχυση της καλλιέργειας. Οι φλάσκες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους  $37^{\circ}\text{C}$  και μελετήθηκαν ως προς την προσκόλληση και την αύξηση των κυττάρων. Μόνο δείγματα με κύτταρα που είχαν ρυθμούς ανάπτυξης αντίστοιχους των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν συμμετείχαν στη μελέτη.

Τα υπόλοιπα κύτταρα του εναιωρήματος χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση mRNA και πρωτεϊνών, προς αξιολόγηση του φαινοτύπου των κυττάρων. Οι μέθοδοι αυτές θα αναλυθούν στη συνέχεια.

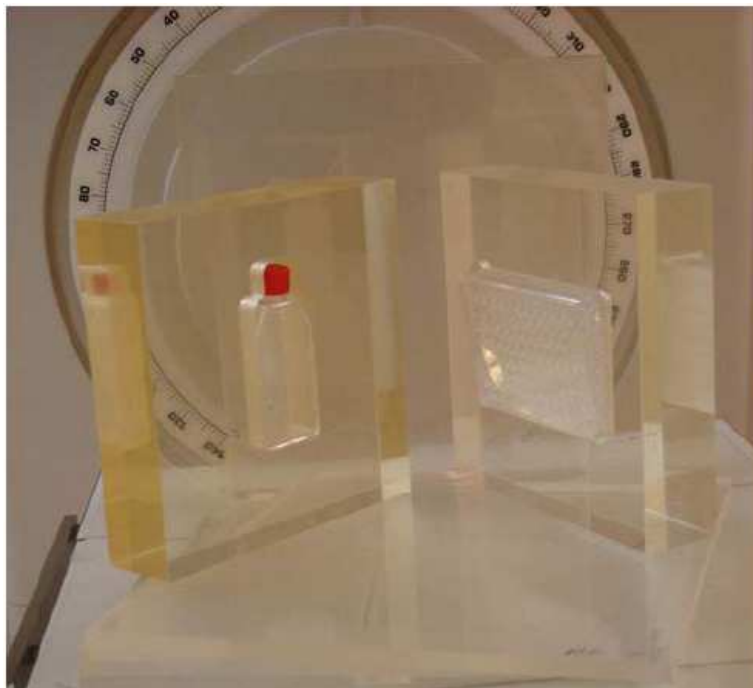
### 2.1.3 Ακτινοβόληση κυττάρων

Η ακτινοβόληση των κυττάρων που βρίσκονταν σε εκθετική φάση ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε με αυξανόμενη δόση 0, 10 και 20 Gy, με τη χρήση γραμμικού επιταχυντή φωτονίων ενέργειας 6MV και ρυθμό δόσης 4,76 Gy/min σε θερμοκρασία δωματίου. Επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρία διαφορετικά πειράματα.

Για να διασφαλιστεί ομοιόμορφη ακτινοβόληση, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στο ισόκεντρο δύο εφαπτόμενων αντίθετων πεδίων φωτονίων, με διαστάσεις 20x20 cm<sup>2</sup>.

Για τη σωστή τοποθέτηση και ακινητοποίηση των πλακών καλλιέργειας και των φιαλίδων, κατασκευάστηκε ένα πρότυπο ομοιογενές ομοίωμα από πλέξιγκλας (polymethyl methacrylate C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> ή PPMA). Το ομοίωμα αυτό αποτελείται από δύο ίδια τμήματα μεγέθους 20x20x5 cm<sup>3</sup>, στα οποία έχει γίνει κατάλληλη επεξεργασία του εσωτερικού τους με εφαρμογή ακτίνας λέιζερ, ώστε να μπορούν να τοποθετούνται με ακρίβεια και απόλυτη επαναληψιμότητα οι πλάκες καλλιέργειας και οι φιάσκες.

Το ομοίωμα αυτό συνοδεύεται επίσης από PPMA πλάκες 30x30 cm, του μισού εκατοστού, οι οποίες τοποθετούνται πρόσθια και οπίσθια του κυρίως μέρους διαμορφώνοντας το πάχος του υλικού αλλά και αντίστοιχα του υλικού οπισθοσκέδασης, διασφαλίζοντας δευτερεύουσα ηλεκτρονική ισορροπία.



Εικόνα 11. Το πρωτότυπο ομοίωμα πολυστυρενίου (PMMA-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) που κατασκευάστηκε για να διασφαλίσει κατάλληλες συνθήκες ακτινοβόλησης και επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Η τοποθέτηση του ομοιώματος πραγματοποιήθηκε σε απόσταση SSD 95 εκ. (Source to Skin Distance) από το ικρίωμα του επιταχυντή, οπότε τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν σε 5 εκ. ισοδύναμο βάθος νερού, αφού θεωρήθηκε ότι κείονταν στην κάτω επιφάνεια των πλακών.

Η επαλήθευση της απόλυτης δοσιμετρίας εξασφαλίστηκε με Δοσίμετρα θερμοφωταύγειας (Thermo Luminescence Dosimetry-TLD), κυβικού τύπου ( $1 \times 1 \times 1 \text{mm}^3$ ) LiF:Mg,Ti, της εταιρείας Harshaw/Bicron. Πριν από κάθε πείραμα τα TLDs πυρακτώνονταν στους  $400^\circ\text{C}$  για μία ώρα, και στη συνέχεια διατηρούντο σε παύση για περίπου 2 ώρες στους  $100^\circ\text{C}$ , σε προγραμματισμένο PTW TLDO κλίβανο. Ακριβώς πριν τη μέτρηση επαναπυρακτώνονταν στους  $100^\circ\text{C}$  για 10 min. Το σήμα φωταύγειας υπολογίστηκε στους μετρητές Harshaw 2000A και 2080B.

#### 2.1.4 Μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας

Η μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από την ακτινοβολήση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του kit MTT της TACS (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Η δοκιμασία MTT κυτταρικού πολλαπλασιασμού και βιωσιμότητας είναι μία ασφαλής, ευαίσθητη in vitro τεχνική για τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή όταν μεταβολικά γεγονότα οδηγούν σε απόπτωση ή νέκρωση, για τη μέτρηση της μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες με 96 υποδοχές με επίπεδο πάτο. Το πρώτο στάδιο στη μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας με το MTT είναι ο προσδιορισμός των χρόνων επώασης με τα αντιδραστήρια του kit για τον κάθε κυτταρικό τύπο και το κάθε σύστημα. Η μέθοδος στηρίζεται στο συστατικό tetrazolium του MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) το οποίο προστίθεται στις ειδικές υποδοχές και τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο στους  $37^\circ\text{C}$ . Κατά τη διάρκεια της επώασης, το MTT αναγάγεται από τα κύτταρα με ενεργό μεταβολισμό σε αδιάλυτους μωβ κρυστάλλους formazan. Στη συνέχεια, στις υποδοχές προστίθεται ουσία με απορρυπαντική δράση, η οποία διαλυτοποιεί τους κρυστάλλους ώστε η απορρόφηση να μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλο φασματοφωτόμετρο. Η απορρόφηση των δειγμάτων μπορεί να μετρηθεί απευθείας μέσα στις ειδικές υποδοχές. Το ιδανικό μήκος κύματος απορρόφησης είναι τα 570 nm, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε φίλτρο που απορροφά μεταξύ 550 και 600 nm. Τα δεδομένα αναλύονται σε διάγραμμα που παρουσιάζει τον κυτταρικό αριθμό σε σχέση με την απορρόφηση. Ο ρυθμός της αναγωγής του tetrazolium είναι ανάλογος του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Πιο αναλυτικά, η διαδικασία προσδιορισμού του κυτταρικού αριθμού και της χρησιμοποίησης του MTT για δείγματα είναι οι εξής :



## **Δοκιμασία MTT για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν.**

1. Τα κύτταρα αποκολλώνται από τις φλάσκες στις οποίες καλλιεργούνται με τη χρησιμοποίηση θρυψίνης. Μετά την αποκόλλησή τους, τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με PBS και μετρώνται σε αιμοκυτταρόμετρο.
2.  $5 \times 10^6$  κύτταρα /ml επαναδιαλύονται σε πλήρες θρεπτικό καλλιεργητικό υλικό. Προετοιμάζουμε 10 φιαλίδια για σειριακή διάλυση των κυττάρων.
3. Οι συγκεντρώσεις που προτείνονται για τη σειριακή διάλυση των κυττάρων κυμαίνονται από  $5 \times 10^6$  έως  $5 \times 10^3$  κύτταρα/ml. 100 μl από την κάθε συγκέντρωση τοποθετούνται σε διαφορετικές υποδοχές. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα, προτείνεται να προετοιμαστούν 3 τουλάχιστον υποδοχές για την κάθε συγκέντρωση, ώστε να πραγματοποιηθούν 3 τουλάχιστον μετρήσεις και να υπολογιστεί ο μέσος όρος της απορρόφησης. Σε άλλες 3 τουλάχιστον υποδοχές της πλάκας, τοποθετείται σκέτο θρεπτικό υλικό. Οι υποδοχές αυτές θα αποτελέσουν τα αρνητικά δείγματα ελέγχου.
4. Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο στους 37°C για 6-48 ώρες. Τα κύτταρα χρειάζονται χρόνο για να προσκολληθούν (εφόσον είναι προσκολλώμενα). Ο χρόνος αυτός είναι διαφορετικός για τον κάθε κυτταρικό τύπο. 12-18 ώρες είναι αρκετές για τους περισσότερους τύπους κυττάρων.
5. Στην κάθε υποδοχή προστίθενται 10 μl από το αντιδραστήριο MTT.
6. Η πλάκα επωάζεται στους 37°C για 2-4 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης, ελέγχουμε τα κύτταρα περιοδικά στο ανάστροφο μικροσκόπιο, για να παρακολουθήσουμε την εμφάνιση στικτού ενδοκυτταρικού ιζήματος. Κάποιοι κυτταρικοί τύποι μπορεί να απαιτήσουν μεγαλύτερο χρόνο επώασης, που μπορεί να φτάσει και τις 24 ώρες.
7. Όταν τα μωβ στίγματα διακρίνονται ευκρινώς στο μικροσκόπιο, προστίθενται στα κύτταρα 100 μl του αντιδραστηρίου με την απορρυπαντική δράση, χωρίς ανάδευση, ακόμη και στις υποδοχές που περιέχουν σκέτο θρεπτικό υλικό.
8. Η πλάκα επωάζεται κλειστή, στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 18-24°C για τουλάχιστον 2 ώρες έως ολονύκτια. Η απορρόφηση των δειγμάτων μπορεί να μετρηθεί μετά από 2 ώρες, αλλά εάν οι μετρήσεις είναι πολύ χαμηλές και παραμένουν κρύσταλλοι στο θρεπτικό, τότε η πλάκα θα πρέπει να επωαστεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η επώαση της πλάκας στους 37°C μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία διαλυτοποίησης των κρυστάλλων.
9. Το κάλυμμα της πλάκας αφαιρείται και μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων και των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου στα 570 nm καθώς και στα 650 nm, το δεύτερο

μήκος κύματος χρησιμοποιείται ως μήκος κύματος αναφοράς. Τα αρνητικά δείγματα θα πρέπει να δίνουν τιμές απορρόφησης μεταξύ  $0\pm 0.1$  μονάδες οπτικής πυκνότητας.

10. Προσδιορίζεται ο μέσος όρος για την κάθε συγκέντρωση και αφαιρείται από τον κάθε ένα, η μέση τιμή που θα έχει προκύψει από τα αρνητικά δείγματα ελέγχου. Σχεδιάζεται διάγραμμα, στον κατακόρυφο άξονα του οποίου τοποθετούνται οι τιμές της απορρόφησης και στον οριζόντιο ο αριθμός των κυττάρων ανά ml. Επιλέγεται ένας αριθμός κυττάρων που δίνει απορρόφηση μεταξύ των τιμών 0.75 και 1.25. Ο κυτταρικός αριθμός που θα επιλεγεί θα πρέπει να βρίσκεται στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

### **Δοκιμασία MTT για δείγματα**

1. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε πλάκες στη συγκέντρωση που θα έχει προκύψει από την ανωτέρω διαδικασία. Για την κάθε συνθήκη, πραγματοποιούνται τρεις τουλάχιστον μετρήσεις και στην κάθε υποδοχή τοποθετούνται 100μl κυτταρικού εναιωρήματος. Πάντα συμπεριλαμβάνουμε υποδοχές με σκέτο θρεπτικό υλικό χωρίς κύτταρα.
2. Τα κύτταρα επωάζονται ώστε να προσκολληθούν.
3. 24 ώρες μετά από τον εμβολιασμό των κυττάρων, οι πλάκες ακτινοβολούνται. Για τη διαδικασία της ακτινοβόλησης, οι υποδοχές γεμίζονται με θρεπτικό υλικό, προσπαθώντας να μην υπάρχουν καθόλου φυσαλίδες όταν το καπάκι της πλάκας επανατοποθετηθεί. Μετά την ακτινοβόληση, το ακτινοβολημένο θρεπτικό υλικό απομακρύνεται από τις υποδοχές και αντικαθίσταται από 100 μl θρεπτικού υλικού.
4. Στις χρονικές στιγμές που έχουν επιλεγεί για τη μελέτη, προστίθενται σε κάθε υποδοχή 10 μl MTT στα 100 μl του θρεπτικού υλικού.
5. Η πλάκα επωάζεται στους 37°C για 2-4 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης, ελέγχουμε τα κύτταρα περιοδικά στο ανάστροφο μικροσκόπιο, για να παρακολουθήσουμε την εμφάνιση στικτού ενδοκυτταρικού ιζήματος.
6. Όταν τα μωβ στίγματα διακρίνονται ευκρινώς στο μικροσκόπιο, προστίθενται στα κύτταρα 100 μl του αντιδραστηρίου με την απορρυπαντική δράση, χωρίς ανάδευση, ακόμη και στις υποδοχές που περιέχουν σκέτο θρεπτικό υλικό.
7. Η πλάκα επωάζεται κλειστή, στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 18-24°C για τουλάχιστον 2 ώρες έως όλο το βράδυ. Η απορρόφηση των δειγμάτων μπορεί να μετρηθεί μετά από 2 ώρες, αλλά εάν οι μετρήσεις είναι πολύ χαμηλές και παραμένουν κρύσταλλοι στο θρεπτικό, τότε η πλάκα θα πρέπει να επωαστεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η επώαση της πλάκας στους 37°C μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία διαλυτοποίησης των κρυστάλλων.

8. Το κάλυμμα της πλάκας αφαιρείται και μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων και των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου στα 570 nm καθώς και στα 650 nm. Το δεύτερο μήκος κύματος χρησιμοποιείται ως μήκος κύματος αναφοράς. Τα αρνητικά δείγματα θα πρέπει να δίνουν τιμές απορρόφησης μεταξύ 0+/-0.1 μονάδες οπτικής πυκνότητας.

### **Ανάλυση αποτελεσμάτων**

Το διάγραμμα απορρόφησης-συγκέντρωσης των κυττάρων που σχεδιάζεται μετά από σειριακή διάλυση των κυττάρων δίνει μία καμπύλη που περιέχει ένα ευθύγραμμο τμήμα. Η επιλογή μίας κυτταρικής συγκέντρωσης μέσα στο ευθύγραμμο τμήμα επιτρέπει τη μέτρηση τόσο της διέγερσης όσο και της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Εάν οι τιμές απορρόφησης ενός δείγματος μετά από επίδραση ακτινοβολίας είναι μεγαλύτερες από αυτές των δειγμάτων χωρίς επίδραση, αυτό υποδεικνύει αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, εάν οι τιμές απορρόφησης των δειγμάτων μετά από ακτινοβολία είναι μικρότερες από αυτές των δειγμάτων χωρίς επίδραση, αυτό υποδεικνύει μείωση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή μείωση της συνολικής κυτταρικής βιωσιμότητας.

#### **2.1.5 Μελέτη του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής**

Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου των κυτταρικών σειρών και των δειγμάτων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του κυτταρομέτρου ροής FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Μετά την αποκόλλησή τους από τις καλλιεργητικές φλάσκες, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 5ml PBS και φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 800 rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το πλεονάζον PBS απομακρύνθηκε και τα κύτταρα παρέμειναν σε 100μl PBS. Στο κυτταρικό εναιώρημα προστέθηκαν 100 μl DNA PREP LPR (Beckman Coulter, Inc. Fulerton, CA, USA) το οποίο επιτρέπει την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και 2ml DNA PREP Stain (Propidium Iodide) (Beckman Coulter, Inc. Fulerton, CA, USA). Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 15 min, ώσπου το Propidium Iodide να εισχωρήσει στα κύτταρα και να επισημάνει το γενετικό τους υλικό και στη συνέχεια η φάση του κυτταρικού κύκλου του κάθε κυττάρου προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του κυτταρομέτρου ροής. Η φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται το κάθε κύτταρο προσδιορίζεται από την ποσότητα γενετικού υλικού του κάθε κυττάρου, καθώς τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση μίτωσης (G2/M) περιέχουν διπλάσιο γενετικό υλικό σε σχέση με τα κύτταρα που βρίσκονται στη μεσόφαση (G1) ή σε φάση ηρεμίας (G0). Τα κύτταρα σε φάση διπλασιασμού του DNA (S) περιέχουν ενδιάμεση ποσότητα γενετικού υλικού, σχηματίζοντας μία «κοιλιάδα» κυττάρων ανάμεσα στις δύο

κορυφές G0/G1 και G2/M, που σχηματίζονται στο ιστογράμμα που προκύπτει μετά από ανάλυση του κυτταρικού κύκλου ενός κυτταρικού εναιωρήματος. Εφόσον στην καλλιέργεια υπάρχουν και αποπτωτικά κύτταρα, τα οποία έχουν μπει σε διαδικασία απώλειας γενετικού υλικού, τότε στην ανάλυση απεικονίζονται ως subG0 κύτταρα, στην αρχή του ιστογράμματος. Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου του κάθε δείγματος, συγκεντρώθηκαν τουλάχιστον 10000 κύτταρα, ώστε να γίνεται αποδεκτό το στατιστικό αποτέλεσμα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού WinMDI (Salt Institute, La Jolla, CA, USA).

### **2.1.6 Απομόνωση ολικού κυτταρικού RNA**

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

#### *I. Ομογενοποίηση*

Προσθήκη 1-3 ml Trizol (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) και επώαση για 5 λεπτά στους 15-30°C ή φύλαξη στους -80°C. Για κάθε ml Trizol προστίθενται 200 μl χλωροφόρμιο στα κύτταρα και πραγματοποιούνται διαδοχικές αναρροφήσεις με πιπέτα και χρήση του Vortex με στόχο την λύση των κυττάρων.

#### *II. Διαχωρισμός φάσεων*

Μετά την ομογενοποίηση, κάθε δείγμα επωάζεται για 2-3 λεπτά στους 15-30°C, μεταγγίζεται σε σωληνάριο των 2 ml και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 15min στις 3500rpm στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση σε κάθε σωληνάριο υπάρχουν 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 περιέχει το RNA, μεταφερεται σε νέο σωληνάριο των 2 ml. Πραγματοποιείται κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης, καλή ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά στους 15-30°C.

#### *IV. Έκπλυση του RNA*

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000rpm στους 4°C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 1ml κρύας αιθανόλης 70%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 10000rpm στους 4°C.

#### *V. Επαναδιάλυση του RNA*

Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αφού στεγνώσει πολύ καλά διαλυτοποιείται. Η διαλυτοποίηση του ιζήματος γίνεται με προσθήκη 80-100μl ddH<sub>2</sub>O και επώαση για 10 λεπτά στους 55-60 °C. Στη συνέχεια, το κάθε δείγμα αποθηκεύεται στους -80°C.

#### VI. Φωτομέτρηση-Έλεγχος ποσότητας

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

συγκέντρωση RNA = αραιώση x OD<sub>260</sub> x 40(mgr/ml)

#### VII. Ηλεκτροφόρηση-Έλεγχος ποιότητας

Για να ελεγχθεί η ποιότητα του RNA πραγματοποιείται σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%.

### 2.1.7 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

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

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για τη σύνθεση cDNA για όγκο RNA που αντιστοιχεί σε 1μgr περιέχει:

- |                                    |   |                           |
|------------------------------------|---|---------------------------|
| ➤ RNA                              | → | 1 μgr                     |
| ➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 5x            | → | 4 μl                      |
| ➤ Τυχαία εξανουκλεοτίδια(500μg/ml) | → | 3 μl                      |
| ➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια            | → | 2 μl                      |
| ➤ MMLV RT (200U/μl)                | → | 1 μl                      |
| ➤ δις απεσταγμένο νερό             | → | μέχρι τελικού όγκου 20 μl |
- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόζονται είναι οι εξής:
    - Αρχικά το RNA διαλύεται σε ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα RNA με τα τυχαία εξανουκλεοτίδια θερμάνθηκε στους 65°C επί 5 min για την αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA.
    - Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά για τη σταθεροποίηση της αποδιάταξης δευτεροταγών δομών του RNA
    - Μετά την προσθήκη και των υπολοίπων αντιδραστηρίων ακολουθούν οι παρακάτω συνθήκες
      - 37°C , 60 λεπτά
      - 65°C , 10 λεπτά
      - τελική θερμοκρασία: 4°C

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

**RAR6:** 5' GGTGCCTCCCTACGCCTTCT 3'

**RAR8:** 5' GGCGCTGACCCCATAGTGGT 3'

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

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

### **2.1.8 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) και του υποδοχέα HER2 με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR)**

Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων συμβάλλει ουσιαστικά στη μελέτη των βιολογικών διεργασιών και στην κατανόηση της παθογένειας των ασθενειών. Για το σκοπό αυτό, πρόσφατα αναπτύχθηκαν μέθοδοι ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real-

time PCR, RQ-PCR) που αντικατέστησαν την πολύπλοκη και χρονοβόρα ημιποσοτική, συναγωνιστική ανάλυση PCR (competitive PCR).

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

Η ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) και του υποδοχέα HER2 πραγματοποιήθηκε στις συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA (cDNA). Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) στηρίζεται στην ενζυματική ενίσχυση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA in vitro, με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης και των εκκινητών. Η Taq πολυμεράση είναι μια θερμοανθεκτική πολυμεράση η οποία εξάγεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές (primers) είναι μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες, ολιγονουκλεοτίδια, οι οποίοι υβριδίζονται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του τμήματος του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Έτσι, λοιπόν, για να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός του συγκεκριμένου τμήματος του DNA, το μείγμα αντίδρασης θα πρέπει να περιέχει: τη δίκλωνη ακολουθία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, Taq πολυμεράση με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα, το ζεύγος των εκκινητών, διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) τα οποία χρησιμοποιεί η πολυμεράση και διάλυμα MgCl<sub>2</sub> που διευκολύνει τη δράση της πολυμεράσης.

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

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94°C
- σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης πια ακολουθίας-στόχου, σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών
- θέρμανση του μείγματος στους 72 °C, έτσι ώστε η πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA-στόχου με τη βοήθεια των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

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

Για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων ενδιαφέροντος χρησιμοποιήθηκε το kit FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) της Roche (Roche, Mannheim, Germany) στη συσκευή iCycler Optical Module (Bio-Rad, Hercules, CA). Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων περιέχει:

➤ cDNA	→	2	μl
➤ SYBR Green	→	12	μl
➤ Εκκινητής Forward (50p/mol)	→	1	μl
➤ Εκκινητής Reverse (50p/mol)	→	1	μl
➤ δις απεσταγμένο νερό	→	4	μl

Οι εκκινητές και οι συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

❖ Για την hTERT :

Forward: 5'- CCG TCT GCG TGA GGA GAT -3' και

Reverse: 5'- TGG GGA TGA AGC GGA GTC -3'

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
  - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά
  - 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
    - αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
    - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 56°C για 30 δευτερόλεπτα
    - επιμήκυνση στους 72°C για 15 δευτερόλεπτα
  - τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

❖ Για τον υποδοχέα HER2 :

Forward: 5'-CTC GTT GGA AGA GGA ACA GC -3' και

Reverse: 5'-CTG AAT GGG TCG CTT TTG TT -3'

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



- ❖ Για το PBGD που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς:  
Forward: 5'- AGA GTG ATT CGC GTG GGT ACC -3' και  
Reverse: 5'- GGC TCC GAT GGT GAA GCC -3'

### 2.1.9 Απομόνωση πρωτεϊνών

1. Η απομόνωση ολικής πρωτεΐνης από τα κύτταρα πραγματοποιείται με την προσθήκη 100-200 μl διαλύματος λύσης σε ίζημα  $10^5$  κυττάρων, ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος.
2. Τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο για 30 λεπτά περίπου, ώστε να πραγματοποιηθεί λύση αυτών, η οποία υποβοηθάται από τη χρήση vortex κατά διαστήματα.
3. Μετά από την επώαση, τα σωληνάρια φυγοκεντρώνονται για 20 λεπτά στις 13000 στροφές.
4. Τα υπερκείμενα συλλέγονται σε καινούρια φιαλίδια και η πρωτεϊνική συγκέντρωσή τους προσδιορίζεται με τη μέθοδο Lowry.
5. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρούνται στα 595 nm.
6. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του κάθε δείγματος υπολογίζεται με βάση πρότυπη καμπύλη που σχεδιάζεται χρησιμοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις με γνωστή συγκέντρωση της πρωτεΐνης BSA.
7. Τα δείγματα τοποθετούνται προς φύλαξη σε θερμοκρασία  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 2.1.10 Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP

Το πρωτόκολλο TRAP θεωρείται ευαίσθητη και ειδική PCR που βασίζεται στην ενζυμική δραστηριότητα. Πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την δοκιμασία TeloTAGGG telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche, Indianapolis, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρωτόκολλο TRAP δείχνει πολύ μεγάλη ευαισθησία ανιχνεύοντας ένα θετικό κύτταρο για την τελομεράση ανάμεσα σε 10000 αρνητικά για την τελομεράση κύτταρα. 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 ετοιμάζονται από κάθε κυτταρικό εκχύλισμα απενεργοποιώντας την ενεργότητα της τελομεράσης των δειγμάτων με υψηλή θερμοκρασία (10 λεπτά στους  $85^{\circ}\text{C}$ ). Η ανάλυση πραγματοποιείται με ένα μίγμα αντίδρασης 30 μl που περιέχει 3μg πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος. Το δείγμα που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αντίδρασης (internal

standard) πολλαπλασιάζεται 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 μετράται χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο και θεωρείται θετική όταν η διαφορά μεταξύ της απορρόφησης του δείγματος και της απορρόφησης του αρνητικού δείγματος ελέγχου είναι 2 φορές μεγαλύτερη από τη μη ειδική ενεργότητα (background). Τα δείγματα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παράγοντας τη χαρακτηριστική τελομερική κλίμακα-δείκτη (ladder) 6 bp.

### 2.1.11 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά western περιλαμβάνει τα εξής στάδια :

#### 1. Αποδιάταξη των πρωτεϊνών

Σε μικρά σωληνάρια ετοιμάζεται το μίγμα που περιείχε την πρωτεΐνη στην κατάλληλη συγκέντρωση (10-50 gr), 5 ml χρωστικής (sample buffer), 2 ml από το διάλυμα αποδιάταξης (reducing buffer) και νερό μέχρι τα 20 ml. Τα δείγματα τοποθετούνται σε συσκευή PCR για αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 95°C για 5 λεπτά.

#### 2. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών

- Μετά από την αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση.
- Προετοιμάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (950 ml ddH<sub>2</sub>O και 50ml running buffer) και τοποθετούνται από αυτό 600 ml στο μπροστινό και το πίσω τμήμα της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στο μεσαίο τμήμα τοποθετούνται 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος και 500 ml αντιοξειδωτικού διαλύματος.
- Αφαιρούνται τα χτενάκια και τα πηγαδάκια ξεπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιογενής ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.
- Τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια του πηκτώματος, μαζί με μάρτυρα στην άκρη
- Τέλος, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών στα 200V και στα 120 mA για 40 λεπτά.

#### 3. Ανοσοαποτύπωση

- Προετοιμασία
  - Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς transfer buffer : 50ml Transfer buffer +850ml μεθανόλη + 1ml αντιοξειδωτικό διάλυμα
  - Το φύλλο της μεμβράνης αρχικά επωάζεται σε μεθανόλη για 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς

- 6 σφουγγαράκια εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς
  - 2 κομμάτια χαρτί Whatman κομμένα στις διαστάσεις της μεμβράνης και της πηκτής, εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς
  - Η πηκτή επίσης εμβαπτίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς
  - Τοποθετούνται στη σειρά 3 σφουγγαράκια, 1 Whatman, η πηκτή, η μεμβράνη, 2 χαρτιά Whatman και 3 σφουγγαράκια, προσέχοντας να μη μείνουν καθόλου φυσαλίδες.
  - Με αυτή τη σειρά, τοποθετούνται στο κουτί Xcell Blot Module και στη συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς στη μέση και νερό στη μπροστινή και την πίσω θέση.
  - Η μεταφορά πραγματοποιείται για 90 λεπτά στα 30 V και 220 mA.
  - Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη βάφεται με διάλυμα Ponceau για να διαπιστωθεί ότι η μεταφορά έχει πραγματοποιηθεί σωστά και ομοιόμορφα. Το διάλυμα Ponceau βάφει όλες τις πρωτεΐνες, που σε αυτό το στάδιο απεικονίζονται με τη μορφή παράλληλων ζωνών.
  - Η μεμβράνη ξεπλένεται με PBST (PBS + 500μl Tween 10%) για 15 λεπτά και μετά 3 φορές για 5 λεπτά με ανάδευση.
  - Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα δέσμησης των πρωτεϊνών 5% (2,5gr blocker σε 5ml PBST) για 1 ½ με 2 ώρες.
  - Η μεμβράνη ξεπλένεται με PBST (PBS + 500μl Tween 10%) για 15 λεπτά και μετά 3 φορές για 5 λεπτά με ανάδευση.
  - Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το κατάλληλο αντίσωμα, στη συγκέντρωση που προτείνεται από τον κατασκευαστή του αντισώματος (1:250-1:1000) για 16 ώρες στους 4°C.
  - Μετά την επώαση, το αντίσωμα απομακρύνεται και η μεμβράνη ξεπλένεται με PBST (PBS + 500μl Tween 10%) για 15 λεπτά και μετά 3 φορές για 5 λεπτά με ανάδευση.
  - Η μεμβράνη επωάζεται για 1 με 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με το κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση (1:2000-1:10000). Το δευτερεύον αντίσωμα είναι σημασμένο με GAx-HRP.
  - Η μεμβράνη ξεπλένεται με PBST (PBS + 500μl Tween 10%) για 15 λεπτά και μετά 3 φορές για 5 λεπτά με ανάδευση.
4. Ανίχνευση

Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το kit opti-4CN Goat-anti-Rabbit (BioRad), το οποίο περιέχει:

- Opti-4CN υπόστρωμα (substrate)
- Opti-4CN διαλυμένο συμπύκνωμα (diluent concentrate)

Αναλυτικά:

- Αναμιγνύεται ένα μέρος διαλυμένου opti-4CN με 9 μέρη ddH<sub>2</sub>O. Σε κάθε cm<sup>2</sup> της μεμβράνης αναλογεί 0,25 ml διαλύματος.
- Προστίθεται 0,2ml opti-4CN ανά 10ml του διαλύματος (π.χ. ανάμιξη 1ml opti-4CN διαλυμένο με 9 ml ddH<sub>2</sub>O και 0,2ml opti-4CN υπόστρωμα). Αναδεύεται καλά και προστίθεται στη μεμβράνη.
- Η μεμβράνη επωάζεται στο υπόστρωμα με ταυτόχρονη ήπια ανάδευση για 30min ή όσο χρειάζεται ανάλογα με το επιθυμητό επίπεδο ευαισθησίας.
- Η μεμβράνη ξεπλένεται με ddH<sub>2</sub>O για 15min.
- Στη μεμβράνη έχουν σχηματιστεί ζώνες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος.

### 2.1.12 Γενετική αλληλούχιση του mRNA του p53

1. PCR της αλληλουχίας του cDNA του γονιδίου του p53.

Η αλληλουχία του γονιδίου p53 των δειγμάτων των ασθενών της μελέτης διευκρινίστηκε μετά από αλληλούχιση του cDNA της κάθε ασθενούς. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα ζεύγη εκκινητών ώστε να καλυφθεί ολόκληρη η κωδικοποιούσα περιοχή του cDNA του p53.

Τμήμα 1:

Εκκινητής forward: 5'-GAC ACG CTT CCC TGG ATT GGC-3' και

Εκκινητής reverse: 5'-GCA AAA CAT CTT GTT GAG GGC A-3' (καλύπτει ολόκληρη την αλληλουχία των εξονίων 2, 3, και 4 και τμήματα των εξονίων 1 και 5).

Τμήμα 2:

Εκκινητής forward: 5'-GTT TCC GTC TGG GCT TCT TGC A-3' και

Εκκινητής reverse: 5'-GGT ACA GTC AGA GCC AAC CTC-3' (καλύπτει ολόκληρη την αλληλουχία των εξονίων 5 και 6 και τμήματα των εξονίων 4 και 7).

Τμήμα 3:

Εκκινητής forward: 5'-TGG CCC CTC CTC AGC ATC TTA-3' και

Εκκινητής reverse: 5'-CAA GGC CTC ATT CAG CTC TC-3' (καλύπτει ολόκληρη την αλληλουχία των εξονίων 6, 7, 8, και 9 και τμήματα των εξονίων 5 και 10).

Τμήμα 4:

Εκκινητής forward: 5'-CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT C-3' και

Εκκινητής reverse: 5'-CGC ACA CCT ATT GCA AGC AAG GG-3' (καλύπτει ολόκληρη την αλληλουχία των εξονίων 9, 10, και 11 και τμήμα του εξονίου 8).

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
  - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά

- 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
  - αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό
  - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 57°C για 1 λεπτό
  - επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό
- τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

## 2. Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Τα προϊόντα PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το kit καθαρισμού QIAquick PCR purification (Qiagen, Inc., Valencia, Calif) με την ακόλουθη διαδικασία:

- Προστίθενται 5 όγκοι από το ρυθμιστικό διάλυμα PB που παρέχεται με το kit σε 1 όγκο του δείγματος της PCR και επακολουθεί καλή ανάδευση.
- Εφόσον το χρώμα του μείγματος είναι κίτρινο, η διαδικασία μπορεί να συνεχιστεί στο επόμενο βήμα. Σε περίπτωση που το μείγμα έχει πορτοκαλί ή μωβ χρώμα, τότε προστίθενται 10 μl διαλύματος Οξικού Νατρίου συγκέντρωσης 3M και pH 5.0 και ακολουθεί καλή ανάδευση.
- Σε σωληνάριο των 2 ml, τοποθετείται στήλη QIAquick spin.
- Για την πρόσδεση του DNA, το δείγμα τοποθετείται στη στήλη και φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές για 30–60 δευτερόλεπτα.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και η στήλη επανατοποθετείται στο ίδιο σωληνάριο.
- Προστίθενται 0.75 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα PE στη στήλη και επακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 30–60 δευτερόλεπτα.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και η στήλη επανατοποθετείται στο ίδιο σωληνάριο.
- Επακολουθεί φυγοκέντρηση για άλλο 1 λεπτό.
- Η στήλη τοποθετείται σε καινούριο σωληνάριο του 1.5 ml.
- Προστίθενται 50 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) ή νερό (pH 7.0–8.5) στο μέσον της μεμβράνης της στήλης και επακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 13000 στροφές. Εναλλακτικά,
- Για μεγαλύτερη συγκέντρωση του DNA, προστίθενται 30 μl διαλύματος EB στο μέσον της μεμβράνης της στήλης, η στήλη παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και επακολουθεί φυγοκέντρηση

## 3. Αντίδραση αλληλούχισης

Όλες οι αντιδράσεις αλληλούχισης του DNA πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA)

➤ Διενέργεια PCR.

Το μείγμα PCR περιείχε τα εξής:

- Προϊόν PCR : 5 μl
- Big Dye v3.1 : 2 μl
- Buffer 5x : 3 μl
- Primer F : 1 μl
- ddH<sub>2</sub>O : 9 μl
- Τελικός όγκος : 20 μl

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής.

- αρχική αποδιάταξη στους 96°C για 1 λεπτό
- 25 κύκλοι {
  - αποδιάταξη στους 96°C για 10 δευτερόλεπτα
  - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 50°C για 5 δευτερόλεπτα
  - επιμήκυνση στους 60°C για 4 λεπτά

- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και από την ένταση του σήματος εξαρτάται η ποσότητα του προϊόντος PCR που θα χρησιμοποιηθεί για την αλληλούχιση.
- Ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων PCR με τη βοήθεια του kit BigDye XTerminator Purification (Applied Biosystems, Foster City, CA).
- Σε κάθε δείγμα προστίθενται 20 μl BigDye Xterminator solution και 95 μl SAM solution.
- Καλή ανάδευση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μακριά από το φως.
- Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 1000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου
- 10 μl από το υπερκείμενο φορτώνονται στην πλάκα και ρυθμίζεται το μηχάνημα για την αλληλούχιση.

### 2.1.13 Ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης

Ο προσδιορισμός των μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τον υποκινητή του γονιδίου της hTERT καθώς και ο έλεγχος της παρουσίας ακετυλιωμένης ή μη ακετυλιωμένης ιστόνης H3 στον ανωτέρω υποκινητή, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του kit ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay kit) (Upstate USA, Inc., Charlottesville, VA, USA).

Με τη συγκεκριμένη δοκιμασία, τα κύτταρα μονιμοποιούνται έτσι ώστε οι μεταγραφικοί παράγοντες να παραμείνουν προσκολλημένοι στον υποκινητή. Τα κύτταρα υφίστανται λύση, το DNA τους κόβεται σε τμήματα των 200-1000 βάσεων, στη συνέχεια πραγματοποιείται κατακρήμνιση των μεταγραφικών παραγόντων με τα αντίστοιχα αντισώματα, απομόνωση

DNA στα δείγματα και έλεγχος της παρουσίας ή μη του τμήματος του υποκινητή με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και τη χρήση κατάλληλων υποκινητών.

Πιο αναλυτικά, η διαδικασία είναι η εξής:

1. Τα κύτταρα (περίπου  $10^6$ ) αποκολλώνται από τη φλάσκα με τη βοήθεια θρυψίνης. Όπως περιγράφηκε πιο πάνω, η δράση της θρυψίνης σταματά με την προσθήκη δεκαπλάσιας ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάριο των 15 ml και φυγοκεντρώνται στις 800 στροφές για 5 λεπτά.
2. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10 ml προθερμασμένου στους  $37^\circ\text{C}$  πλήρους θρεπτικού υλικού, στο οποίο προστίθενται 270μl φορμαλδεΐδης 37%. Τα σωληνάρια τοποθετούνται στους  $37^\circ\text{C}$  για 10 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η μονιμοποίηση των κυττάρων και η μονιμοποίηση των ιστονών και των υπόλοιπων μεταγραφικών παραγόντων στο DNA.
3. Τα σωληνάρια φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στις 800 στροφές.
4. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με παγωμένο PBS που περιέχει αναστολείς πρωτεασών. Οι αναστολείς των πρωτεασών προστίθενται στο PBS λίγο πριν από τη χρησιμοποίηση του διαλύματος για το ξέπλυμα των κυττάρων, καθώς η διάρκεια ημίσειας ζωής τους είναι περίπου 30 λεπτά μέσα σε υδατικά διαλύματα. Ως αναστολείς πρωτεασών χρησιμοποιούνται οι : PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) σε συγκέντρωση 1mM, aprotinin σε συγκέντρωση 1μg/ml και pepstatin A σε συγκέντρωση 1μg/ml. Τα πλυσίματα των κυττάρων συνοδεύονται από φυγοκεντρήσεις των 800 στροφών για 5 λεπτά.
5. Μετά από την τελευταία φυγοκέντρηση, τα κύτταρα διαλύονται σε 200μl ζεστού διαλύματος λύσης των κυττάρων που περιέχει SDS και το οποίο εμπεριέχεται στο kit.
6. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Μετά από το στάδιο αυτό, τα δείγματα μπορούν να τοποθετηθούν στους  $-80^\circ\text{C}$  και να αποθηκευτούν εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.
7. Ακολουθεί κατάτμηση του DNA με τη χρήση υπερήχων. Χρησιμοποιείται για το λόγο αυτό συσκευή παραγωγής υπερήχων (UP50H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany). Ανάλογα με τις δυνατότητες της συσκευής, διαφέρει ο αριθμός των επαναλήψεων καθώς και η ένταση των υπερήχων και η διάρκεια της επίδρασης. Αυτό το στάδιο χρήζει ιδιαίτερης προσοχής και πρέπει να επαναπροσδιορίζεται για τον κάθε τύπο κυττάρων. Για το λόγο αυτό, για την κάθε κυτταρική σειρά ή δείγμα, χρειάστηκε να γίνει έλεγχος της αποτελεσματικότητας και επαναληψιμότητας της μεθόδου κατάτμησης του DNA με την εφαρμογή υπερήχων, ώστε μετά από απομόνωση του DNA με τη μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου (η οποία περιγράφεται

πιο κάτω) και μετά από ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 1%, το DNA έχει κοπεί σε τμήματα των 200-1000 βάσεων. Η εφαρμογή των υπερήχων στα δείγματα, προκαλεί θέρμανση αυτών, για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η διατήρηση των δειγμάτων στον πάγο καθόλη τη διάρκεια της επίδρασης των υπερήχων. Για τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, ένα σύνηθες πρωτόκολλο υπερήχων που εφαρμόστηκε ήταν 15 επαναλήψεις διάρκειας 15 δευτερολέπτων.

8. Μετά από την εφαρμογή των υπερήχων και την κατάτμηση του DNA, τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά, στις 13000 στροφές σε θερμοκρασία 4 °C.
9. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο των 2 ml.
10. Για τη μείωση της μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια, στο υπερκείμενο προστίθενται 75 μl Protein A Agarose/ DNA σπέρματος σολωμού (50% Slurry) το οποίο συμπεριλαμβάνεται στο kit, και τα φιαλίδια τοποθετούνται στους 4 °C, με ήπια ανάδευση για 30 λεπτά.
11. Τα φιαλίδια φυγοκεντρώνται στις 1000 στροφές για 1 λεπτό και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο
12. Στο κάθε φιαλίδιο προστίθεται το αντίσωμα που χρησιμοποιείται για την ανοσοκατακρήμνιση. Τα αντισώματα, καθώς και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από το καθένα ήταν τα εξής :
  - Anti-c-myc (N-262X, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA): 2 μl
  - Anti-mad1 (C-19X, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA): 2 μl
  - Anti-max (C-17X, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA): 2 μl
  - Anti-p53 (C-11X, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA): 2 μl
  - Anti-acetylated Histone 3 (06–599) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY): 4 μl
  - Anti-β-galactosidase (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA): 2 μl
13. Τα φιαλίδια επωάζονται ολονύκτια στους 4°C με ήπια ανάδευση. Προκειμένου να υπάρχει αρνητικό δείγμα ελέγχου, σε ένα από τα δείγματα πραγματοποιείται κατακρήμνιση χωρίς προσθήκη αντισώματος. Το υπερκείμενο αυτού του δείγματος επωάζεται μόνο με 60 μl Protein A Agarose/ DNA σπέρματος σολωμού (50% Slurry), για μία ώρα στους 4 °C με ήπια ανάδευση και η διαδικασία για το δείγμα αυτό συνεχίζεται στο σημείο 15.
14. Μετά το πέρας της επώασης, στα δείγματα προστίθενται 60 μl Protein A Agarose/ DNA σπέρματος σολωμού (50% Slurry), και επακολουθεί επώαση για μία ώρα στους 4 °C με ήπια ανάδευση ώστε να δημιουργηθούν σύμπλοκα αντισωμάτων και πρωτεϊνών.
15. Η αγαρόζη κατακρημνίζεται τόσο για τα δείγματα που επωάζονται με αντίσωμα όσο και για το αρνητικό δείγμα ελέγχου, με φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές για 1 λεπτό.



Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει μη συνδεδεμένο, μη ειδικό DNA, απομακρύνεται προσεκτικά. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης A αγαρόζης/αντισώματος/μεταγραφικού παράγοντα ξεπλένεται για 3 λεπτά με ήπια ανάδευση με 1 ml από τα ακόλουθα διαλύματα τα οποία συμπεριλαμβάνονται στο kit:

- Διάλυμα έκπλυσης του συμπλόκου του αντισώματος χαμηλής περιεκτικότητας σε άλατα
- Διάλυμα έκπλυσης του συμπλόκου του αντισώματος υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα
- Διάλυμα έκπλυσης του συμπλόκου του αντισώματος LiCl
- Ρυθμιστικό διάλυμα TE, 2 πλυσίματα

Μετά από αυτό το στάδιο, τα δείγματα βρίσκονται στη μορφή πρωτεΐνης A/αντισώματος/μεταγραφικού παράγοντα ή ιστόνης/DNA.

16. Προετοιμάζεται το διάλυμα αποδέσμευσης (1% SDS, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>).

17. Τα φιαλίδια φυγοκεντρώνονται στις 1000 στροφές για ένα λεπτό, το ρυθμιστικό διάλυμα TE απομακρύνεται προσεκτικά και στα φιαλίδια προστίθενται 250 μl από το διάλυμα αποδέσμευσης. Τα φιαλίδια αναδεύονται για μερικά δευτερόλεπτα σε vortex και επωάζονται για 15 λεπτά με κυκλική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

18. Επακολουθεί κατακρήμιση της αγαρόζης με φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 1000 στροφές και το υπερκείμενο του κάθε φιαλιδίου μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο. Η διαδικασία της αποδέσμευσης επαναλαμβάνεται και τα υπερκείμενα ενώνονται σε κοινό φιαλίδιο σε τελικό όγκο 500 μl.

19. Στο κάθε φιαλίδιο προστίθενται 20 μl 5M NaCl και τα φιαλίδια επωάζονται στους 65°C για 4 ώρες με στόχο την αποδέσμευση του DNA από τις ιστόνες ή τους μεταγραφικούς παράγοντες. Σε αυτό το στάδιο, μετά την επώαση, τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C.

20. Στο κάθε δείγμα προστίθενται 10 μl 0.5M EDTA, 20μl 1M Tris-HCl και 2μl πρωτεϊνάσης K με συγκέντρωση 10 mg/ml, τα οποία συμπεριλαμβάνονται στο Kit, και επακολουθεί επώαση για μία ώρα στους 45°C.

21. Επακολουθεί απομόνωση του κατακρημισμένου DNA με τη μέθοδο φαινόλης χλωροφορμίου, η οποία περιγράφεται στη συνέχεια :

- Στο κάθε φιαλίδιο προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης, ενώ ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση σε vortex.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο.
- Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφορμίου και ακολουθεί καλή ανάδευση σε vortex.

- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο.
- Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και ακολουθεί καλή ανάδευση σε vortex.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο.
- Στο κάθε φιαλίδιο προστίθεται διπλάσιος όγκος παγωμένης αιθανόλης 100% και 1/10 του όγκου CH<sub>3</sub>COONa.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C για τουλάχιστον 24 ώρες.
- Την επόμενη ημέρα, τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές σε θερμοκρασία 4°C.
- Αμέσως μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο των φιαλιδίων απομακρύνεται και στα φιαλίδια απομένει μικρό λευκό ίζημα.
- Στα φιαλίδια προστίθεται 1 ml αιθανόλης 70%, για ξέπλυμα του DNA και τα φιαλίδια φυγοκεντρώνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά, τα φιαλίδια καλύπτονται με τρυπημένο parafilm και τοποθετούνται στους 4°C, μέχρι να εξατμιστεί εντελώς η εναπομείνουσα αιθανόλη.
- Στα δείγματα προστίθεται ddH<sub>2</sub>O για τη διαλυτοποίηση του DNA, σε ποσότητα ανάλογη με την ποσότητα του ιζήματος.
- Για να ελεγχθεί η ποσότητα του DNA πραγματοποιείται φωτομέτρηση σε κάθε δείγμα. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρούνται στα 260 και 280 nm. Υπολογίζεται ο λόγος 260/280 καθώς και η συγκέντρωση του DNA ως εξής:
- συγκέντρωση RNA = αραιώση x OD<sub>260</sub> x 50 (mgr/ml)
- Για να ελεγχθεί η ποιότητα του DNA πραγματοποιείται σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%.

22. Στα δείγματα επακολουθεί αντίδραση PCR για τον υποκινητή του γονιδίου της hTERT. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης επιλέχθηκαν έτσι ώστε να περικλείουν τις περιοχές πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων που μελετήθηκαν.

Για τον υποκινητή του γονιδίου της hTERT, η αλληλουχία είναι αυτή που απεικονίζεται στη συνέχεια. Στην αλληλουχία αυτή, οι περιοχές πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων c-myc, mad1, max, τα λεγόμενα E-boxes (CACGTG), βρίσκονται στις περιοχές -29 και -238 του υποκινητή.

ggagcagctg cgctgtcggg gctaggccgg gctcccagtg gattcgcggg cacagacgcc caggaccgcg ctcccacagt  
ggcggaggga ctggggacc cggcacccgt cctgcccctt caccttccag ctccgectcc tccgcgcgga ccccgccccg  
tcccgacccc tcccgggtcc cgggcccage ccctccggg ccctccage ccctcccctt ccttccgcg gcccgcctt  
ctctcgcgg cgcgagttc aggcagcgt gcgtcctgct gcgcacgtgg gaagccctgg ccccgccac ccccgcatg

E box

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε E-box του υποκινητή ήταν οι εξής :

**F1: TGTCGGGGCTAGGCCGGGCTC**

**R1: AACTCGCGCCGCGAGGAGA**

Δίνουν προϊόν μεγέθους 250 βάσεων

**F2: TGCCCTTCACCTTCCAGCTC**

**R2: GTGGCCGGGGCCAGGGCTT**

Δίνουν προϊόν μεγέθους 208 βάσεων

Για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, χρησιμοποιήθηκε το kit Hotstar Taq της εταιρείας Qiagen. Συγκεκριμένα για το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν :

- 12,5 μl Hotstar Taq Master Mix
  - 7,5 μl δις απεσταγμένο νερό
  - 1 μl Forward primer
  - 1 μl Reverse primer
  - 3 μl από το DNA
- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
  - Για το ζευγάρι εκκινητών 1 :
    - Αρχική αποδιάταξη 95°C για 5 λεπτά
    - 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
      - αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
      - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 65°C για 30 δευτερόλεπτα
      - επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα.
  - Για το ζευγάρι εκκινητών 2 :
    - Αρχική αποδιάταξη 95°C για 5 λεπτά
    - 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
      - αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
      - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 62°C για 30 δευτερόλεπτα
      - επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα.

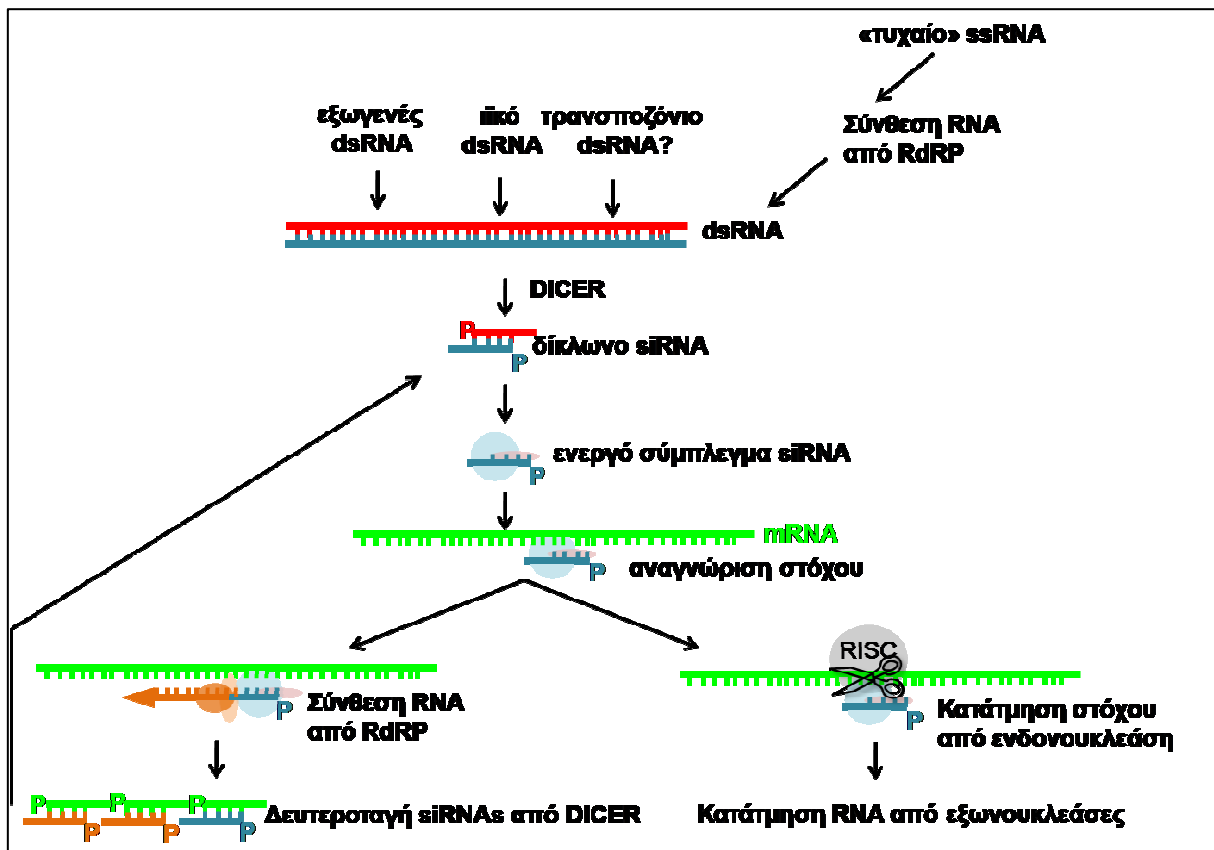
### 2.1.14 Αποσιώπηση των mRNA των γονιδίων hTERT και HER2/neu

Η εξειδικευμένη καταστολή της έκφρασης ενός γονιδίου αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη σύγχρονη έρευνα. Πρόσφατα, αναπτύχθηκαν πειραματικές μεθοδολογίες που στηρίζονται σε βιολογικές διαδικασίες, όπως η μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση (posttranscriptional gene silencing), καθώς και η τεχνολογία παρεμβατικών μορίων RNA (RNA interference), οι οποίες επιτρέπουν την εξειδικευμένη παρεμπόδιση της γονιδιακής έκφρασης. Αν και η φυσιολογική λειτουργία των μηχανισμών αυτών δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, ιδιαίτερα η RNAi χρησιμοποιείται πρόσφατα ευρέως για τη μελέτη της γονιδιακής λειτουργίας<sup>167-171</sup>. Ο μηχανισμός της RNAi είναι συντηρημένος μεταξύ των ειδών (φυτά, μύκητες, ζώα) και πιθανολογείται ότι λειτουργεί ως το “ανοσοποιητικό σύστημα” του γονιδιώματος ενάντια στην εισβολή εξωγενούς γενετικού υλικού, εφόσον παρουσιάζει δύο βασικά χαρακτηριστικά του ανοσοποιητικού, δηλαδή την ικανότητα να διακρίνει το δικό του από το ξένο και την υψηλότερη εξειδίκευση<sup>172</sup>.

Η διαδικασία της RNAi ενέχει την παρουσία δίκλωνου RNA (dsRNA) το οποίο τεμαχίζεται ενζυμικά σε μικρότερα κομμάτια μεγέθους 20-25 νουκλεοτιδίων, τα πρωτογενή siRNAs (short interfering RNAs), τα οποία μεσολαβούν στην εξειδικευμένη αναγνώριση του μονόκλωνου RNA στόχου (mRNA). Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τον τεμαχισμό του αρχικού dsRNA ονομάζεται Dicer και πρόκειται για μια εξειδικευμένη RNAάση III. Τα siRNAs είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές φορές, ενώ στο 3' άκρο τους έχουν προεξέχουσες, μονόκλωνες αλληλουχίες (2-3 ουρακίλες). Στη συνέχεια ο μη πληροφοριακός κλώνος των siRNAs συνεργαζόμενος με κυτταρικές πρωτεΐνες σχηματίζει το ενεργό siRNA σύμπλεγμα το οποίο αναγνωρίζει το mRNA στόχο. Με τη βοήθεια του ενεργού συμπλέγματος και με μόριο-εκκινητή το siRNA συντίθεται ο συμπληρωματικός κλώνος (για μερικές εκατοντάδες bp) από μια RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA dependent RNA polymerase). Στο δίκλωνο αυτό κομμάτι RNA επιδρά και πάλι η Dicer και το τεμαχίζει στα δευτερογενή siRNAs (transitive RNA interference). Εκτός όμως από αυτή τη διαδικασία, η σύνδεση του ενεργού συμπλέγματος στο mRNA στόχο μπορεί να προκαλέσει και τη σύνδεση στην περιοχή του υβριδισμού ενός συμπλέγματος RISC (dsRNA induced silencing complex) το οποίο επάγει την κατάτμηση του mRNA από κάποια ενδονουκλεάση και την περαιτέρω αποικοδόμησή του από εξωνουκλεάσες. Οι παραπάνω διαδικασίες μπορούν να επαναληφθούν για πολλούς συνεχόμενους κύκλους (ξεκινώντας ακόμα και από πολύ μικρή ποσότητα dsRNA) με μεγάλη σταθερότητα και γι'αυτό η RNAi χαρακτηρίστηκε και ως “αποικοδομητικό PCR”<sup>167,168,170,173</sup>. Στην εικόνα 12 παρουσιάζεται το μοντέλο που συνοψίζει τα μοριακά βήματα στο μηχανισμό της RNAi.

Ο μηχανισμός που περιγράφηκε έχει παρατηρηθεί σ'ένα ευρύ φάσμα ειδών, η απόδειξη όμως μιας τέτοιου είδους απόκρισης στα κύτταρα των θηλαστικών παρεμποδίζεται

από την ύπαρξη επαγόμενων από δίκλινα RNA μονοπατιών, τα οποία επιδρούν στη γονιδιακή έκφραση με μη ειδικό τρόπο. Τα πιο καλά καθορισμένα μονοπάτια που ενεργοποιούνται από dsRNA στα θηλαστικά είναι: i) η dsRNA εξαρτώμενη κινάση PKR και το μονοπάτι της ιντερφερόνης το οποίο οδηγεί σε γενικευμένη καταστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και απόπτωση<sup>174</sup>, ii) η dsRNA επαγόμενη σύνθεση 2'-5' πολυαδενυλικού οξέος το οποίο οδηγεί σε ενεργοποίηση της μη εξειδικευμένης RNAάσης L<sup>167,174</sup>.



Εικόνα 12. Μοντέλο μοριακών βημάτων της RNA interference<sup>172</sup>.

Ωστόσο, τα δύο προηγούμενα μονοπάτια δεν ενεργοποιούνται από dsRNA μικρότερο από 30 νουκλεοτίδια και έτσι με βάση αυτό το δεδομένο οι τελευταίες έρευνες στρέφονται στη χρήση μικρών συνθετικών μονόκλωνων ή δίκλωνων RNA (που είναι πιο αποτελεσματικά και σταθερά), είτε ακόμα στη χρήση πλασμιδίων που εκφράζουν μικρά dsRNA ή shRNA (short hairpin RNA), ώστε να αποφεύγονται τα μη ειδικά μονοπάτια<sup>175-179</sup>.

Η διαδικασία διαμόλυνσης των κυττάρων με si RNAs για τα γονίδια των hTERT και HER2/neu έγινε με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Λιποφεκταμίνη (Invitrogen). Η λιποφεκταμίνη είναι μία ουσία που χρησιμοποιείται για τη διαμόλυνση νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) σε ευκαρυωτικά κύτταρα και προσφέρει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα :

- Μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και σε διαφορετικά είδη καλλιέργειας (φλάσκες, πλάκες με ειδικές υποδοχές κ.ο.κ.)
- Τα σύμπλοκα νουκλεϊκών οξέων και λιποφεκταμίνης μπορούν να χορηγηθούν απευθείας στο θρεπτικό υλικό στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα, παρουσία ή απουσία ορού.
- Δεν είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν τα σύμπλοκα ή να αλλαχθεί το θρεπτικό υλικό μετά από τη διαμόλυνση, ωστόσο τα σύμπλοκα μπορούν να απομακρυνθούν μετά από 4-6 ώρες.

Το πρώτο στάδιο στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου διαμόλυνσης είναι ο προσδιορισμός της ιδανικής συγκέντρωσης του siRNA που πρέπει να χορηγηθεί στον κάθε τύπο κυττάρου, προκειμένου να επιτευχθεί ταυτόχρονα η μέγιστη δυνατή αποσιώπηση και η ελάχιστη δυνατή τοξικότητα για τα κύτταρα. Ο έλεγχος του ποσοστού αποσιώπησης των γονιδίων ενδιαφέροντος γίνεται αφενός με ποσοτικοποίηση των RNA μεταγράφων του γονιδίου μετά από τη χορήγηση siRNA, σε σχέση με κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει χορήγηση, καθώς και με ανοσοαποτύπωση κατά Western της πρωτεΐνης που προκύπτει από το συγκεκριμένο μετάγραφο mRNA μετά από τη χορήγηση siRNA, σε σχέση με κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει χορήγηση. Και στις δύο περιπτώσεις, η χορήγηση του siRNA πρέπει να συμπίπτει με μείωση των μεταγράφων mRNA καθώς και της πρωτεΐνης. Σε περιπτώσεις όπου ο κύριος τρόπος ρύθμισης της ποσότητας μίας πρωτεΐνης στο κύτταρο είναι η μετα-μεταγραφική ρύθμιση, τότε η διαμόλυνση των κυττάρων με siRNA δεν καθιστά αποτελεσματικό τρόπο αποσιώπησης και ενδείκνυται να χρησιμοποιηθεί η μετα-μεταγραφική αποσιώπηση PTGS (posttranscriptional gene silencing).

Στις περιπτώσεις των γονιδίων hTERT (HSS144247, Invitrogen) και HER2/neu (HSS103333, Invitrogen) που αποσιωπήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, ο προσδιορισμός της ιδανικής ποσότητας από το κάθε siRNA που θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί στα κύτταρα της μελέτης έγινε μετά από χορήγηση 3 διαφορετικών δόσεων από το κάθε siRNA σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε πλάκες με 6 πηγαδάκια. Η επιλογή αυτών των πλακών έγινε με στόχο να διαμολυνθούν αρκετά σε αριθμό κύτταρα, προκειμένου να μπορέσουν να εκχυλισθούν από αυτά αρκετές ποσότητες mRNA και πρωτεϊνών, προς επιβεβαίωση της επιτυχούς διαμόλυνσης. Σε αυτές τις πλάκες οι δόσεις που χορηγήθηκαν στα κύτταρα από το κάθε siRNA ήταν 100, 300 και 500 pmol με συν-χορήγηση 5, 15 και 25 μl λιποφεκταμίνης αντίστοιχα.

Αναλυτικά, η διαδικασία διαμόλυνσης των κυττάρων με si RNA που πραγματοποιήθηκε είναι η εξής:

1. Μία ημέρα πριν από τη διαμόλυνση, τα κύτταρα εμβολιάζονται σε πλάκες ή φλάσκες, ανάλογα με το πείραμα, σε πλήρες θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά, έτσι ώστε η περιεκτικότητα των πηγαδιών της πλάκας ή των καλλιεργητικών φλασκών να κυμαίνεται μεταξύ 30 και 50% τη στιγμή της διαμόλυνσης. Η χαμηλή συγκέντρωση των κυττάρων κατά τη χρονική στιγμή της διαμόλυνσης επιτρέπει τη μεσολάβηση μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος μεταξύ διαμόλυνσης και συλλογής των κυττάρων. Επιπλέον περιορίζει τη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας από υπεράυξηση των κυττάρων.
2. Για το κάθε δείγμα, τα σύμπλοκα λιποφεκταμίνης-ολιγομερούς προετοιμάζονται ως εξής:
  - Η ποσότητα από το siRNA που πρόκειται να χορηγηθεί στα κύτταρα διαλύεται σε θρεπτικό υλικό Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen) χωρίς προσθήκη ορού εμβρύου βοός. Επακολουθεί ήπια ανάδευση.
  - Η λιποφεκταμίνη αναδεύεται καλά πριν από τη χρήση της και διαλύεται επίσης σε θρεπτικό υλικό Opti-MEM I Reduced Serum Medium. Επακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
  - Τα δύο ανωτέρω διαλύματα ενώνονται σε κοινό φιαλίδιο, αναδεύονται ήπια και επωάζονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα λιποφεκταμίνης-ολιγομερούς.
3. Τα σύμπλοκα προστίθενται στα κύτταρα και ακολουθεί καλή ανάδευση της πλάκας ή της φλάσκας ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιογενής διασπορά τους.
4. Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο στους 37°C. Το θρεπτικό τους αλλάζεται 6 ώρες μετά από τη διαμόλυνση, και αντικαθίσταται από πλήρες θρεπτικό υλικό, χωρίς αντιβιοτικά.

Ως αρνητικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιούνται δείγματα στα οποία χορηγούνται ακριβώς οι ίδιες ποσότητες από τα ίδια αντιδραστήρια και υπό τις ίδιες συνθήκες, με μόνη εξαίρεση την αντικατάσταση του siRNA από Stealth RNAi Negative Control Duplex (Invitrogen). Το RNA αυτό είναι έτσι σχεδιασμένο ώστε να έχει παρόμοιο περιεχόμενο σε βάσεις GC με το siRNA που χρησιμοποιούμε. Η οποιαδήποτε μείωση σε ποσοστά έκφρασης mRNA και πρωτεϊνών, καθώς και οι αλλαγές στη βιωσιμότητα των κυττάρων, στα δείγματα στα οποία έχει χορηγηθεί siRNA, γίνονται σε σύγκριση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου, το οποίο με τη σειρά του, δε θα πρέπει να έχει μεγάλες έως και καθόλου διαφορές στα επίπεδα έκφρασης και βιωσιμότητας σε σχέση με κύτταρα στα οποία δεν έχει χορηγηθεί τίποτα. Υπό αυτές τις συνθήκες και εφόσον τα ποσοστά αποσιώπησης των γονιδίων ενδιαφέροντος είναι υψηλά μετά από τη χορήγηση συγκεκριμένης δόσης siRNA, η μέθοδος θεωρείται επιτυχής.

Οι ποσότητες siRNA, λιποφεκταμίνης και θρεπτικού υλικού που χορηγούνται στα κύτταρα, ανάλογα με το μέγεθος των πηγαδιών της πλάκας ή της φλάσκας, ενδεικτικά για τη συγκέντρωση των 100 pmol (για τη διαμόλυνση 6-well plates) είναι οι εξής:

Καλλιεργητικό μέσο	Επιφάνεια καλλιεργητικού μέσου	Όγκος θρεπτικού υλικού	Όγκος υλικού για αντίδραση	θρεπτικού siRNA	Λιποφεκταμίνη
96-well	0,3 cm <sup>2</sup>	100 μl	2x25 μl	5 pmol	0,25 μl
24-well	2 cm <sup>2</sup>	500 μl	2x50 μl	20 pmol	1,0 μl
12-well	4 cm <sup>2</sup>	1 ml	2x100 μl	40 pmol	2,0 μl
6-well	10 cm <sup>2</sup>	2 ml	2x250 μl	100 pmol	5 μl
60-mm	20 cm <sup>2</sup>	5 ml	2x0,5 ml	200 pmol	10 μl
10-cm	60 cm <sup>2</sup>	15 ml	2x1,5 ml	600 pmol	30 μl

### 2.1.15 Στατιστική ανάλυση

Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της hTERT και της δραστικότητας της τελομεράσης των πενήντα δειγμάτων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του μονοπαραμετρικού μοντέλου ANOVA, με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Για τη συσχέτιση της έκφρασης της hTERT με την παρουσία ή απουσία των υποδοχέων ER, PR και HER2, χρησιμοποιήθηκε το πολυπαραγοντικό μοντέλο ANOVA με εξαρτημένη μεταβλητή την τελομεράση και συνεξαρτώμενες μεταβλητές τα ER score, PR score, HER2/neu

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της έκφρασης mRNA, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Student's t-test με επίπεδο εμπιστοσύνης 95 % ( $P < 0.05$ ) σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές.

Η επίδραση της αποσιώπησης της γονιδιακής έκφρασης του υποδοχέα HER2 στην έκφραση mRNA του HER2 και της hTERT, καθώς και στη δραστικότητα της τελομεράσης, και της αποσιώπησης της hTERT στην έκφραση mRNA της hTERT και στη δραστικότητα της τελομεράσης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας μονοπαραγοντική ανάλυση μεταβλητότητας (single factor analysis of variance). Το μέγεθος που χρησιμοποιήθηκε για να ποσοτικοποιηθούν οι διερευνούμενες επιδράσεις είναι το πηλίκιο μεταβλητότητας (F-statistic), το οποίο περιγράφει την ποσότητα της συνολικής διακύμανσης που οφείλεται στη γονιδιακή αποσιώπηση.



Προκειμένου να εκτιμηθούν στατιστικά οι συνδυασμένες επιδράσεις της αποσιώπησης του HER2 ή της hTERT και της ακτινοβολήσης στην κυτταρική βιωσιμότητα, χρησιμοποιήθηκε η διπαραγοντική ανάλυση μεταβλητότητας (2-factor analysis of variance). Η μετρούμενη ποσότητα είναι η κυτταρική βιωσιμότητα και εκτιμήθηκε σε συνάρτηση με το φαινόμενο της αποσιώπησης με siRNA και της ακτινοβολήσης σε τρεις χρονικές στιγμές (24, 48, 72 ώρες). Ο χρόνος μέτρησης εισήχθη στο μοντέλο ως πρόσθετη μεταβλητή προκειμένου να δικαιολογήσει την επιπρόσθετη συνιστώσα μεταβλητότητας. Επιπλέον έγινε εκτίμηση των διαστημάτων εμπιστοσύνης για όλες τις ομάδες μετρήσεων, προκειμένου να οπτικοποιηθεί η πειραματική διακύμανση, χρησιμοποιώντας τη στατιστική κατανομή Student's t, προκειμένου να αντισταθμιστεί ο περιορισμένος αριθμός δειγμάτων.

## 2.2 Αποτελέσματα

### 2.2.1 Ιστολογική ανάλυση των δειγμάτων καρκινικού ιστού από καρκίνο μαστού (βιοψίες) και ανάλυση της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και της δραστικότητας της τελομεράσης

Η μελέτη συμπεριέλαβε πενήντα δείγματα ( $n=50$ ) από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, τα οποία απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια χειρουργικής αφαίρεσης στη Χειρουργική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Στον πίνακα 2 αναγράφονται τα στοιχεία που αφορούν στην ηλικία και το δείκτη μάζας του σώματος των ασθενών κατά τη διάγνωση του όγκου, την πιθανή κληρονομικότητα, τη σταδιοποίηση και τα στοιχεία που αφορούν στην ιστοπαθολογική ανάλυση του όγκου (Εργαστήριο Παθολογικής-Ανατομικής, Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας). Στον ίδιο πίνακα αναγράφονται και τα χαρακτηριστικά του κάθε όγκου σε ότι αφορά στους υποδοχείς των οιστρογόνων (ERα), της προγεστερόνης (PR) και του υποδοχέα HER2/neu.

Τα πενήντα δείγματα όγκου ελέγχθηκαν ως προς την έκφραση του mRNA της hTERT και ως προς τη δραστικότητα της τελομεράσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 13 σε συνδυασμό με τον φαινότυπο των δειγμάτων ως προς την παρουσία ή απουσία των υποδοχέων ERα, PR και HER2/neu. Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, προέκυψε ότι υπάρχει εξάρτηση μεταξύ της έκφρασης της hTERT και της δραστικότητας της τελομεράσης και επιπλέον ότι αυτή ακολουθεί μια γραμμική σχέση μεταξύ των 2 συνεχών αριθμητικών μεταβλητών (Εικόνα 14 πάνω). Αριθμητικά αυτό φαίνεται από τις παραμέτρους του μονοπαραμετρικού μοντέλου ANOVA, όπου τα ευρήματα  $F \gg 1$  και  $\text{Sig.} < 0,05$  δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% (Εικόνα 14 κάτω).

Στη συνέχεια επακολούθησε πολυπαραγοντική ανάλυση ANOVA με εξαρτημένη μεταβλητή την τελομεράση και συνεξαρτώμενες μεταβλητές την παρουσία ER, PR και HER2/neu από την οποία προέκυψε ότι μόνο η έκφραση του υποδοχέα HER2/neu παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την έκφραση τελομεράσης (Εικόνα 15).

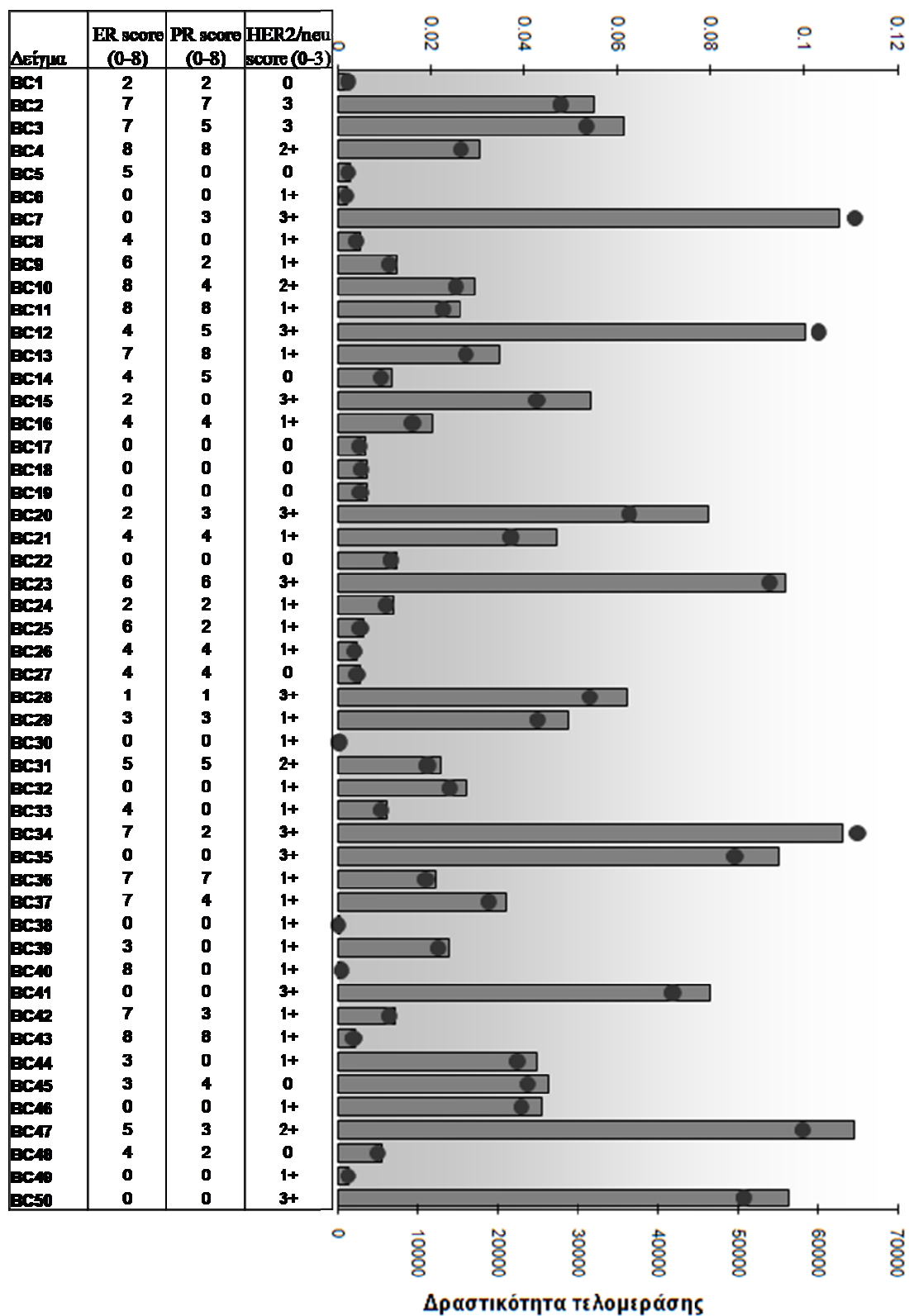
Από τα 50 δείγματα, επιλέχθηκαν έξι προκειμένου να υποστούν ακτινοβολήση, με την ίδια διαδικασία όπως και οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, ώστε να πραγματοποιηθεί παραλληλισμός αποτελεσμάτων μεταξύ δειγμάτων καρκινικού ιστού και καρκινικών κυτταρικών σειρών. Τα δείγματα τα οποία επιλέχθηκαν για τη συνέχεια της μελέτης μας ήταν τα: BC32, BC34, BC35, BC36, BC43 και BC50. Η επιλογή τους έγινε λόγω του γεγονότος ότι διέφεραν ως προς τα βασικά χαρακτηριστικά τους και παρουσίαζαν και διαφορετικούς συνδυασμούς αυτών, όπως και οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, ώστε τα αποτελέσματα να είναι όσο το δυνατόν συγκρίσιμα.

Δείγμα	Ηλικία	BMI	Οικογενειακό ιστορικό	Στάδιο	ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	ER score	PR score	HER2 score
BC1	82	33.28	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό συμπαγές θηλώδες	2	2	0
BC2	76	36.73	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	7	7	3
BC3	75	29.82	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	7	5	3
BC4	56	32.05	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	8	8	2+
BC5	53	24.61	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	5	0	0
BC6	45	27.68	μητέρα με Ca μαστού	III	Διηθητικό καρκίνωμα των πόρων του μαστού	0	0	1+
BC7	52	34.37	μητέρα με Ca μαστού	III	Διηθητικό καρκίνωμα των πόρων του μαστού	0	3	3+
BC8	55	24.72	αδερφή μητέρας με Ca μαστού	II	διηθητικο πορογενές και λοβιακό	4	0	1+
BC9	45	27.51	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα	6	2	1+
BC10	76	26.56	κόρη πέθανε νέα από λευχαιμία	I	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	8	4	2+
BC11	60	36.33	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	8	8	1+
BC12	66	26.87	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	4	5	3+
BC13	79	31.25	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	7	8	1+
BC14	71	27.27	αδερφή μητέρας με Ca μαστού	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	4	5	0
BC15	66	27.28	ΌΧΙ	III	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	2	0	3+
BC16	74	27.77	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	4	4	1+
BC17	72	41.66	ΌΧΙ	III	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	0	0	0
BC18	73	33.33	2ος, αμφοτερόπλευρος Ca	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	0	0	0
BC19	80	27.41	3 1 <sup>εξ</sup> ξαδέλφες με Ca μαστού	III	Διηθητικό καρκίνωμα πορογενές	0	0	0
BC20	73	29.38	ΌΧΙ	II	Διηθητικό καρκίνωμα πορογενές	2	3	3+
BC21	73	24.72	αδερφή μητέρας με Ca μαστού	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	4	4	1+
BC22	48	29.21	μητέρα με Ca μαστού	III	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	0	0	0
BC23	77	26.56	ΌΧΙ	III	Διηθητικό καρκίνωμα των πόρων του μαστού	6	6	3+
BC24	75	30.42	ΌΧΙ	II-III	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	2	2	1+
BC25	72	28.54	αδερφή, 1 <sup>η</sup> ξαδέλφη, κόρη αδερφής με Ca μαστού	I	Διηθητικό καρκίνωμα των πόρων του μαστού	6	2	1+
BC26	63	36.09	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	4	4	1+
BC27	70	40.38	ΌΧΙ	I	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό βλεννώδες	4	4	0
BC28	61	28.35	ΌΧΙ	II-III	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	1	1	3+
BC29	64	29.14	1 <sup>η</sup> ξαδέλφη με Ca μαστού	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	3	3	1+

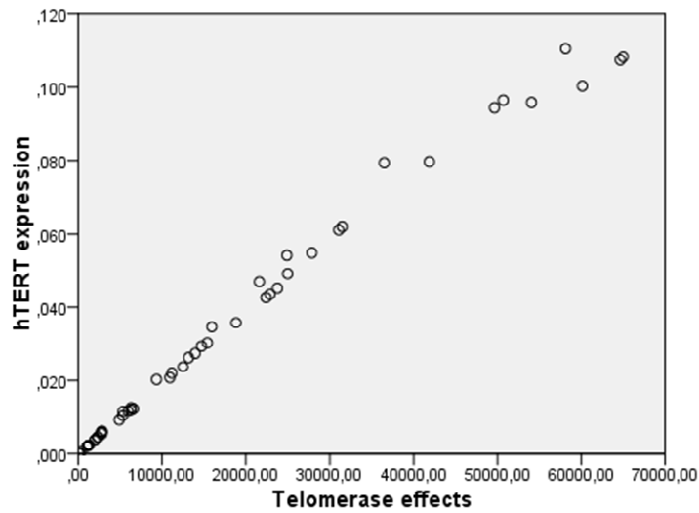
Δείγμα	Ηλικία	BMI	Οικογενειακό ιστορικό	Στάδιο	ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	ER score	PR score	HER2 score
BC30	42	30.85	ΌΧΙ	II	Διηθητικό καρκίνωμα ατρακτοκυτταρικού	0	0	1+
BC31	60	31.24	ΌΧΙ	III	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	5	5	2+
BC32	58	26.56	ΌΧΙ	III	Διηθητικό καρκίνωμα των πόρων του μαστού	0	0	1+
BC33	75	30.38	ΌΧΙ	III	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	4	0	1+
BC34	63	31.22	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	7	2	3+
BC35	73	26.27	ΌΧΙ	II	Διηθητικό καρκίνωμα πορογενές	0	0	3+
BC36	61	31.11	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	7	7	1+
BC37	61	43.86	ΌΧΙ	II-III	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	7	4	1+
BC38	73	26.11	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	0	0	1+
BC39	52	29.02	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	3	0	1+
BC40	62	28.19	ΌΧΙ	II	Διηθητικό καρκίνωμα πορογενές	8	0	1+
BC41	81	32	ΌΧΙ	II	Διηθητικό καρκίνωμα πορογενές	0	0	3+
BC42	75	27.34	ΌΧΙ	III	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	7	3	1+
BC43	68	30.85	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	8	8	1+
BC44	74	25.97	ΌΧΙ	III	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	3	0	1+
BC45	60	25.78	ΌΧΙ	II	Διηθητικό καρκίνωμα των πόρων του μαστού	3	4	0
BC46	52	29.76	μητέρα με Ca μαστού	III	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές με εστίες καρκινώματος με διαυγή κύτταρα	0	0	1+
BC47	76	29.14	ΌΧΙ	III	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	5	3	2+
BC48	67	26.85	ΌΧΙ	II	Διηθητικό καρκίνωμα των πόρων του μαστού	4	2	0
BC49	80	26.14	ΌΧΙ	II	Αδενοκαρκίνωμα διηθητικό πορογενές	0	0	1+
BC50	67	24.46	ΌΧΙ	II	Διηθητικό καρκίνωμα των πόρων του μαστού	0	0	3+

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του μαστού και ιστολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, όπως προέκυψαν από την ιστολογική ανάλυση στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

### Έκφραση hTERT



Εικόνα 13: Έκφραση του mRNA της hTERT και μέτρηση της δραστικότητας της τελομεράσης σε συνδυασμό με τον φαινότυπο των 50 δειγμάτων σε ότι αφορά στους υποδοχείς ERα, PR και HER2/neu.



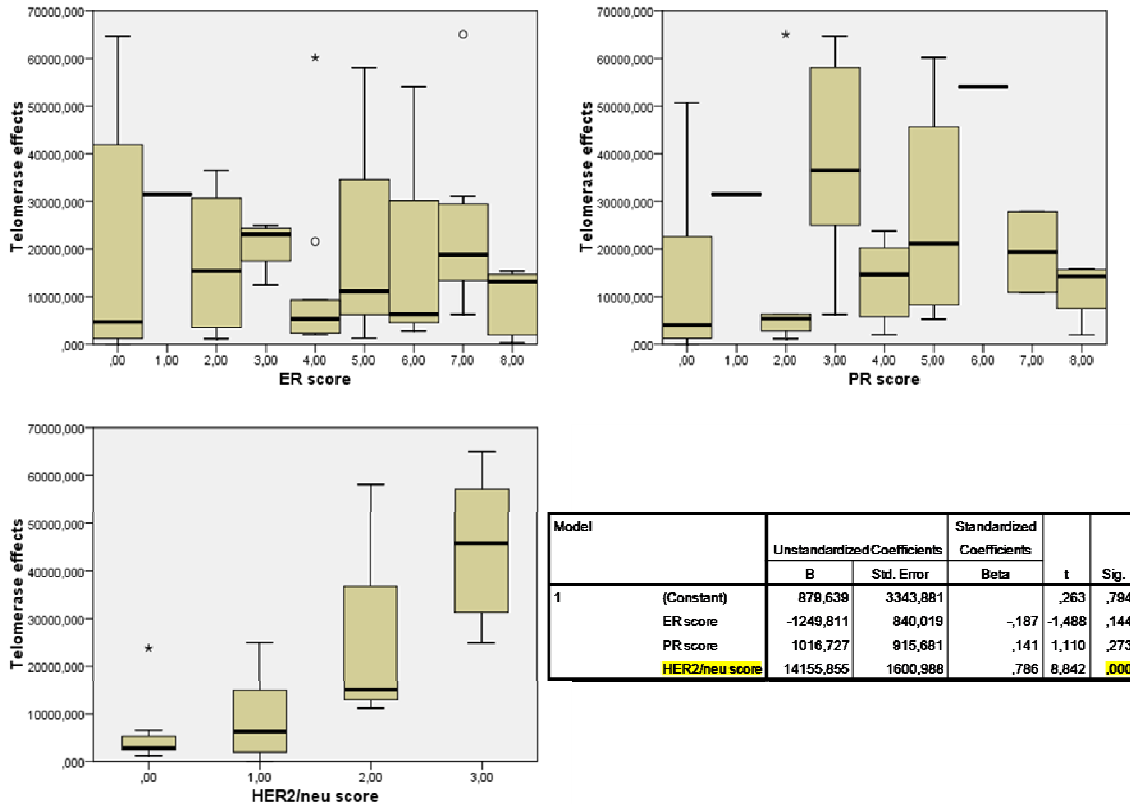
**ANOVA<sup>b</sup>**

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1,779E10	1	1,779E10	3868,538	,000 <sup>a</sup>
	Residual	2,207E8	48	4598730,515		
	Total	1,801E10	49			

a. Predictors: (Constant), hTERT expression

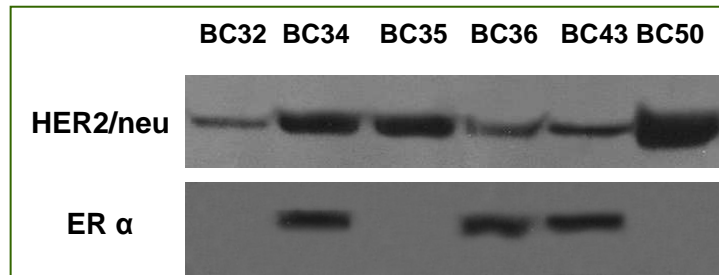
b. Dependent Variable: Telomerase effects

Εικόνα 14: Συσχέτιση της έκφρασης mRNA της hTERT με τη δραστικότητα της τελομεράσης.



Εικόνα 15: Συσχέτιση ER score, PR score, HER2/neu score με τελομεράση.

Ορισμένα δείγματα από τις ασθενείς υπέστησαν επιπλέον έλεγχο και στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής, τόσο πριν όσο και μετά από καλλιέργεια, ώστε να διαπιστωθεί η διατήρηση ή μη του φαινοτύπου που προέκυψε από την ιστολογική ανάλυση, ειδικά μετά από την απομόνωση των κυττάρων και την καλλιέργειά τους σε καλλιεργητικές φλάσκες. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι ο φαινότυπος ERα και HER2/neu διατηρήθηκε στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν, όπως φαίνεται και στην ανάλυση κατά Western που απεικονίζεται στην Εικόνα 16.



Εικόνα 16 : Ανάλυση κατά Western των πρωτεϊνών HER2/neu και ERα των δειγμάτων καρκίνου μαστού των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν για ακτινοβόληση, μετά από καλλιέργεια.

### 2.2.2 Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *p53* των δειγμάτων από καρκινικό ιστό

Από τα έξι δείγματα των ασθενών με καρκίνο του μαστού, απομονώθηκε RNA, έγινε αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA και ανάλυση σε αυτόματο αναλυτή DNA της αλληλουχίας του γονιδίου *p53*. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι κανένα από τα δείγματα των ασθενών που μελετήθηκαν δεν έφερε μεταλλαγή του γονιδίου *p53*. Τα δείγματα διέφεραν μεταξύ τους μόνο στην αλληλουχία του κωδικονίου 72 όπως φαίνεται στον πίνακα 3.

Δείγμα	Πολυμορφισμός
	κωδικονίου 72
<b>BC32</b>	Pro/Pro
<b>BC34</b>	Arg/Pro
<b>BC35</b>	Arg/Arg
<b>BC36</b>	Arg/Arg
<b>BC43</b>	Arg/Arg
<b>BC50</b>	Arg/Pro

Πίνακας 3: Πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για ακτινοβόληση.

Η ύπαρξη μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs), οι οποίοι μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά του όγκου, έχει συσχετισθεί με αυξημένη προδιάθεση για διάφορους τύπους καρκίνων<sup>180-183</sup>. Τουλάχιστον 37 SNPs έχουν εντοπιστεί στην αλληλουχία του γονιδίου *TP53*, τόσο σε ιντρόνια όσο και σε εξόνια<sup>184,185</sup>. Ένας από τους πιο γνωστούς πολυμορφισμούς του γονιδίου *TP53* είναι ο πολυμορφισμός Arg72Pro, στο κωδικόνιο 72 του εξονίου 4, ο οποίος οδηγεί σε αλλαγή μίας αργινίνης (CGC) σε προλίνη (CCC), που αλλοιώνει τη δομή της πρωτεΐνης<sup>186-188</sup>. Το κωδικόνιο 72 κωδικοποιεί μία αργινίνη με μία θετικά φορτισμένη βασική αλυσίδα και μία προλίνη με μία μη πολική-αλειφατική πλάγια αλυσίδα<sup>189</sup>. Ο πολυμορφισμός βρίσκεται σε μία περιοχή πλούσια σε προλίνες, η οποία είναι απαραίτητη για την καταστολή της κυτταρικής αύξησης και την απόπτωση, αλλά όχι και για το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου<sup>190,191</sup>. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει βρεθεί να έχει εθνική και γεωγραφική κατανομή και έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κάποιων τύπων καρκίνου, όπως τραχήλου της μήτρας<sup>192</sup>, μαστού<sup>193-203</sup>, πνεύμονα<sup>204</sup>, κεφαλής και τραχήλου<sup>205</sup> κ.α. Έχει επίσης προταθεί ότι ο πολυμορφισμός αυτός επηρεάζει την ικανότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης TP53 να δημιουργεί σταθερά σύμπλοκα με την πρωτεΐνη TP73 (ένα ομόλογο της TP53), που σχετίζεται με απώλεια πρόσδεσης του συμπλόκου TP53–73 στο DNA<sup>206</sup>. Παρόλα αυτά, οι ανωτέρω μελέτες δε συμφωνούν μεταξύ τους και οι όποιες συσχετίσεις παραμένουν ασαφείς<sup>207,208</sup>. Έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς που φέρουν τους πολυμορφισμούς Arg/Arg<sup>218,219</sup> και Pro/Pro<sup>194,197</sup>, παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε σχέση με ασθενείς που φέρουν τον πολυμορφισμό Arg72Pro<sup>196,209,210</sup>. Τα αποτελέσματα όμως δίστανται σε ό,τι αφορά στην εν δυνάμει προγνωστική αξία του εν λόγω πολυμορφισμού<sup>210-214</sup>.

### **2.2.3 Μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας στις κυτταρικές σειρές και στα κύτταρα από δείγματα καρκίνου του μαστού**

Η δοκιμασία MTT εφαρμόστηκε για τις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού MCF-7, MCF-7/HER2, HBL100, MDA-MB-231, SK-BR-3 και BT-474 και στα κύτταρα των ασθενών μετά από καλλιέργεια και μετά από επίδραση ακτινοβολίας δόσης 10 και 20 Gy. Η κυτταρική βιωσιμότητα μελετήθηκε στις χρονικές στιγμές 24, 48, 72 και 96 ώρες μετά το πέρας της ακτινοβολήσης. Σε όλες τις ακτινοβολημένες κυτταρικές σειρές και τα δείγματα ιστού παρατηρήθηκε μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα, ανάλογη του χρόνου ακτινοβολήσης και της δόσης που χορηγήθηκε.



Οι πλέον ευαίσθητες από τις κυτταρικές σειρές που ακτινοβολήθηκαν ήταν οι κυτταρικές σειρές MDA-MB-231 και HBL100, αρνητικές για όλους τους ορμονικούς υποδοχείς. Και στις δύο αυτές κυτταρικές σειρές, η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την ακτινοβολήση μειώθηκε αισθητά, ήδη μετά από 48 ώρες. Η θετική ως προς τον υποδοχέα των οιστρογόνων ERα κυτταρική σειρά MCF-7 και οι θετικές ως προς τον υποδοχέα HER2 κυτταρικές σειρές SK-BR-3 και BT-474 αποδείχθηκαν πιο ανθεκτικές στην ακτινοβολήση. Πιο ανθεκτική από όλες τις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού που ακτινοβολήθηκαν, αποδείχθηκε η κυτταρική σειρά MCF-7/HER2, θυγατρική της MCF-7, της οποίας τα κύτταρα είναι θετικά και για τους δύο υποδοχείς, ERα και HER2. Σε ό,τι αφορά στα δείγματα των ασθενών που ακτινοβολήθηκαν μετά από καλλιέργεια, τα αποτελέσματα της μελέτης της κυτταρικής βιωσιμότητας ήταν παρεμφερή, δηλαδή πιο ευαίσθητα στην ακτινοβολήση αποδείχθηκαν τα κύτταρα του δείγματος BC32, αρνητικά ως προς όλους τους υποδοχείς και πιο ανθεκτικά τα κύτταρα του δείγματος BC34, θετικά ως προς τους υποδοχείς ERα και HER2. Γενικά η παρουσία του υποδοχέα HER2 φάνηκε να προσδίδει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα κύτταρα σε σχέση με την παρουσία του υποδοχέα των οιστρογόνων, όπως προέκυψε και από τις διαφορές μεταξύ των δειγμάτων BC35, BC50 και BC36, BC43, θετικών ως προς τον υποδοχέα HER2 και ER αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας MTT, παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 4, όπου αναγράφονται τα ποσοστά βιωσιμότητας των 6 καρκινικών σειρών και των 6 καρκινικών ιστών ασθενών (μέσος όρος 8 διαφορετικών μετρήσεων) μετά από την επίδραση της ακτινοβολήσης, σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα από την κάθε κυτταρική σειρά και το κάθε δείγμα, η τυπική απόκλιση, ενώ με αστερίσκο σημειώνονται τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

Συμπερασματικά, από τη συγκεκριμένη μελέτη προέκυψε ότι πιο ευαίσθητα στην επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας είναι τα καρκινικά κύτταρα μαστού, τα οποία είναι αρνητικά ως προς τους ορμονικούς υποδοχείς, ενώ η παρουσία των υποδοχέων HER2 και ERα, φάνηκε να προσδίδει ανθεκτικότητα στην ακτινοβολήση στα θετικά ως προς αυτούς κύτταρα.

Δοκιμασία MTT για τον έλεγχο της κυτταρικής βιωσιμότητας

Χρονική στιγμή Δόση	24 ώρες		48 ώρες		72 ώρες		96 ώρες	
	10 Gy	20 Gy	10 Gy	20 Gy	10 Gy	20 Gy	10 Gy	20 Gy
Κυτταρικές Σειρές								
MCF-7	94.4 ± 0.75	93.2 ± 0.94	91.9 ± 0.98*	90.7 ± 1.0*	84.1 ± 0.86*	79.5 ± 0.90*	67.6 ± 0.74*	53.8 ± 1.07*
MCF-7/HER2	95.8 ± 0.95	94.3 ± 0.85	92.2 ± 0.77*	91.3 ± 0.91*	88.6 ± 0.87*	83.3 ± 0.71*	70.9 ± 0.63*	65.6 ± 0.77*
MDA-MB-231	93.5 ± 0.88	89.9 ± 0.85*	80.8 ± 0.84*	73.2 ± 0.78*	70.1 ± 0.96*	63.5 ± 0.64*	59.6 ± 0.78*	47.8 ± 0.79*
HBL-100	90.9 ± 0.82*	76.9 ± 0.91*	83.8 ± 0.98*	64.9 ± 0.90*	72.3 ± 0.69*	55.1 ± 0.84*	55.5 ± 0.95*	43.7 ± 0.65*
SK-BR-3	94.3 ± 0.69	90.2 ± 0.62*	89.8 ± 0.82*	83.7 ± 0.96*	85.8 ± 0.71*	81.6 ± 0.87*	72.7 ± 1.02*	62.8 ± 0.90*
BT-474	90.4 ± 0.79*	88.3 ± 0.99*	87.9 ± 0.89*	82.1 ± 0.86*	83.4 ± 0.98*	78.6 ± 0.89*	73.7 ± 0.89*	63.7 ± 0.80*
Δείγματα από ασθενείς								
BC32	88.9 ± 0.72*	83.5 ± 0.91*	82.5 ± 0.88*	76.2 ± 0.90*	75.7 ± 0.59*	68.3 ± 0.74*	69.0 ± 0.75*	58.1 ± 0.55*
BC34	89.2 ± 0.78	88.6 ± 0.84	89.0 ± 0.98*	84.2 ± 1.0*	87.6 ± 0.85*	79.3 ± 0.90*	86.1 ± 0.74*	76.5 ± 1.01*
BC35	89.9 ± 0.95	84.1 ± 0.75	87.6 ± 0.67*	82.2 ± 0.91*	83.4 ± 0.87*	76.9 ± 0.70*	79.9 ± 0.63*	70.2 ± 0.77*
BC36	88.4 ± 0.68	83.7 ± 0.85*	85.4 ± 0.84*	78.9 ± 0.76*	77.1 ± 0.76*	70.3 ± 0.64*	77.1 ± 0.73*	65.3 ± 0.74*
BC43	87.5 ± 0.69	83.3 ± 0.72*	83.9 ± 0.62*	76.2 ± 0.96*	75.9 ± 0.72*	69.6 ± 0.87*	75.4 ± 1.06*	64.5 ± 0.94*
BC50	88.1 ± 0.89*	83.6 ± 0.69*	85.5 ± 0.89*	81.8 ± 0.87*	82.7 ± 0.92*	74.2 ± 0.88*	78.4 ± 0.89*	68.7 ± 0.83*

Πίνακας 4: μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού MCF-7, MCF-7/HER2, MDA-MB-231, HBL-100, SK-BR-3 και BT-474 και στα καλλιεργημένα κύτταρα δειγμάτων καρκίνου του μαστού μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας με δόσεις 10 και 20 Gy και στις χρονικές στιγμές των 24, 48, 72 και 96 ωρών μετά την ακτινοβολήση. Τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα ελέγχου για την κάθε κυτταρική σειρά θεωρήθηκαν ότι είχαν βιωσιμότητα στο 100% στην κάθε χρονική στιγμή. Οι τιμές που παρουσιάζονται εδώ είναι τα ποσοστά των εναπομεινάντων ζωντανών ακτινοβολημένων κυττάρων σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα ελέγχου για ην κάθε κυτταρική σειρά και την κάθε χρονική στιγμή.

#### 2.2.4 Μελέτη κυτταρικού κύκλου μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας

Οι ακτινοβολημένες και μη ακτινοβολημένες κυτταρικές σειρές, καθώς και τα κύτταρα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, μελετήθηκαν ως προς την κατανομή τους στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου για τις χρονικές στιγμές των 24, 48, 72 και 96 ωρών. Πραγματοποιήθηκε σήμανση των κυττάρων με την ουσία Propidium Iodide και το ποσό του DNA του κάθε κυτάρου προσδιορίστηκε με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής.

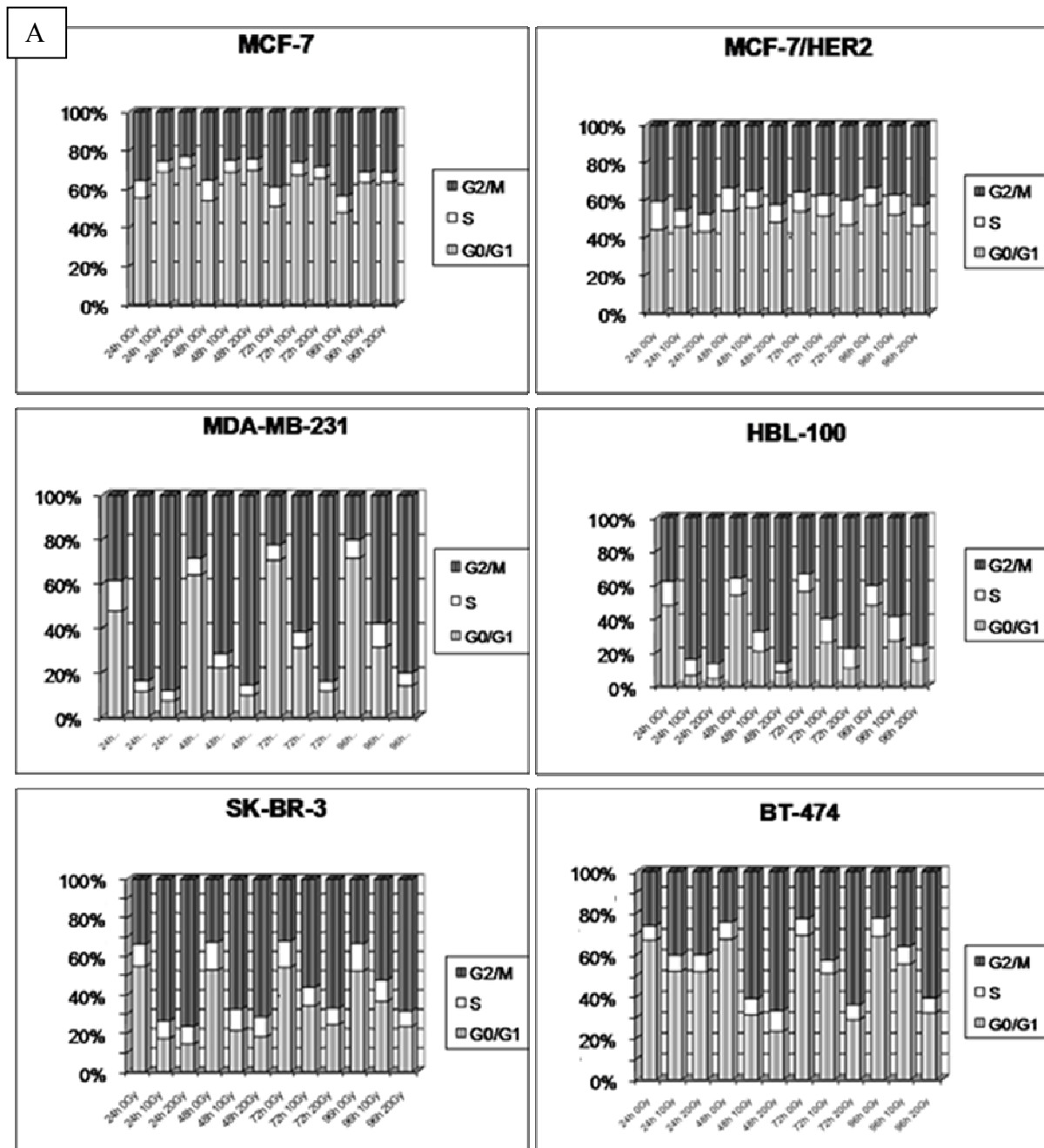
Οι διαφορετικές κυτταρικές σειρές έδειξαν διαφορετικές τάσεις στην κατανομή των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από την επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας, τα κύτταρα υφίστανται βλάβες στο γενετικό τους υλικό, οι οποίες είναι απαραίτητο να διορθωθούν προκειμένου τα κύτταρα να μπορέσουν να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται. Η διαίρεσή τους γι' αυτό το λόγο μπορεί να σταματήσει σε ένα από τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, είτε στη φάση G1 (όπου ελέγχεται εάν το περιβάλλον του κυττάρου είναι ιδανικό ώστε να προχωρήσει στη μίτωση), είτε στη φάση G2 (όπου ελέγχεται εάν έχει γίνει σωστός διπλασιασμός του DNA), είτε στη φάση M (όπου ελέγχεται εάν τα χρωμοσώματα έχουν τοποθετηθεί σωστά στη μιτωτική άτρακτο), ώστε να δοθεί χρόνος στα ακτινοβολημένα κύτταρα να επιδιορθώσουν τις βλάβες στο DNA. Εφόσον τα κύτταρα είναι σε θέση, σε αυτό το διάστημα, να επιδιορθώσουν το μεγαλύτερο μέρος των βλαβών που προκλήθηκαν από την ακτινοβολήση, τότε μπορούν να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται, διαφορετικά θα οδηγηθούν σε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης ή σε θάνατο από απόπτωση.

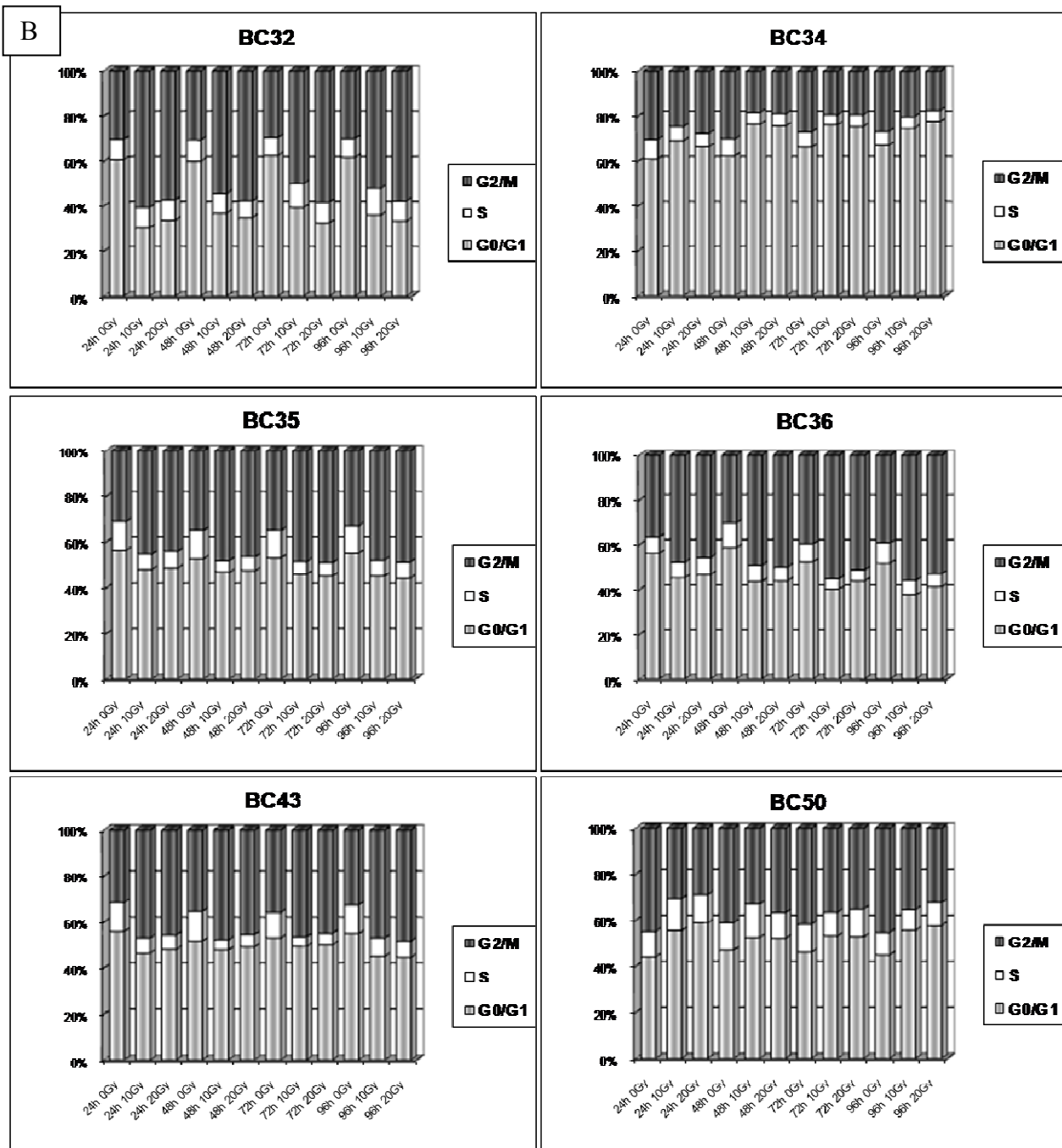
Οι κυτταρικές σειρές MDA-MB-231 (HER2-, ERα-), HBL100 (HER2-, ERα-), SK-BR-3 (HER2+, ERα-) και BT-474 (HER2+, ERα+) παρουσίασαν ένα δόσο-εξαρτώμενο σταμάτημα στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου, με συνακόλουθη μείωση των ποσοστών των κυττάρων στις φάσεις G0/G1 και S του κυτταρικού κύκλου. Το σταμάτημα στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου παρατηρήθηκε ήδη στις 24 ώρες μετά από την επίδραση της ακτινοβολίας και για όλες τις κυτταρικές σειρές με εξαίρεση την BT-474, για τα κύτταρα της οποίας το σταμάτημα στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου προέκυψε 48 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Τα ποσοστά των σταματημένων κυττάρων μετά από την επίδραση των δόσεων των 20 και 10 Gy έφτασαν το 80-90% και το 60-80% αντίστοιχα, ανάλογα με την κυτταρική σειρά. Το σταμάτημα στη φάση G2/M δεν ήταν αναστρέψιμο για τα κύτταρα που απορρόφησαν τη δόση των 20 Gy και ήταν μερικώς αναστρέψιμο για τα κύτταρα που απορρόφησαν τη δόση των 10 Gy, ήδη κατά τη χρονική στιγμή των 48 ωρών μετά από την επίδραση της ακτινοβολήσης.

Αντίθετα, οι συγγενείς κυτταρικές σειρές MCF-7 (HER2-, ERα+) και MCF-7/HER2 (HER2+, ERα+) ήταν οι μόνες που παρουσίασαν ένα μικρό σταμάτημα στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου 24 ώρες μετά από την επίδραση της ακτινοβολήσης, το οποίο διατηρήθηκε μέχρι και τη χρονική στιγμή των 96 ωρών.

Σε ό,τι αφορά στα καλλιεργημένα κύτταρα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, τα δείγματα BC34 (HER2+, ERα-) και BC50 (HER2+, ERα-) παρουσίασαν σταμάτημα στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, ενώ τα δείγματα BC32 (HER2-, ERα-), BC35 (HER2+, ERα-), BC36 (HER2-, ERα+) και BC43 (HER2+, ERα-) μετά από ακτινοβολήση παρουσίασαν ένα δόσοεξαρτώμενο σταμάτημα στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου. Στην περίπτωση των καρκινικών δειγμάτων, τα ποσοστά που αφορούσαν στο σταμάτημα στη φάση G1 και κυρίως

το σταμάτημα στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου δεν ήταν τόσο εντυπωσιακά όσο αυτά που παρατηρήθηκαν στις κυτταρικές σειρές. Τα ποσοστά των ζωντανών κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου για τις κυτταρικές σειρές και για τα δείγματα, απεικονίζονται στην Εικόνα 17Α και 17Β αντίστοιχα. Από τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου, δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση μεταξύ κατανομής στον κυτταρικό κύκλο μετά από ακτινοβολήση και κυτταρικού φαινότυπου.





Εικόνα 17 : Κατανομή των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε ακτινοβολημένα και μη ακτινοβολημένα κύτταρα A : MCF-7 (HER2-, ERα+), MCF-7/HER2, MDA-MB-231 (HER2-, ERα-), HBL100 (HER2-, ERα-), SK-BR-3 (HER2+, ERα-) και BT-474 (HER2+, ERα+) και B : σε ακτινοβολημένα και μη ακτινοβολημένα κύτταρα των καλλιεργημένων δειγμάτων καρκίνου του μαστού BC32 (HER2-, ERα-), BC34 (HER2+, ERα-), BC35 (HER2+, ERα-), BC36 (HER2-, ERα+), BC43 (HER2+, ERα-) και BC50 (HER2+, ERα-), όπως προέκυψε μετά από σήμανση του DNA με Propidium Iodide και κυτταρομετρία ροής. Τα νεκρά κύτταρα αποκλείστηκαν και τα ανωτέρω ποσοστά υπολογίστηκαν μόνο σε ζωντανά κύτταρα.

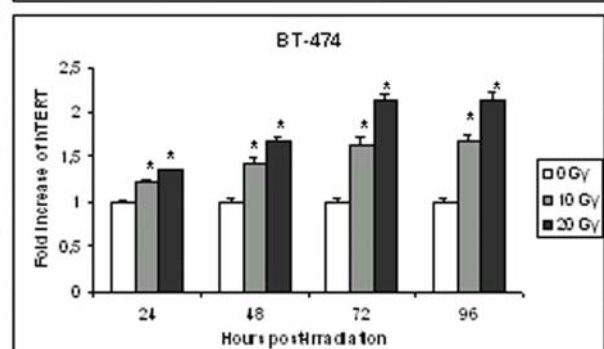
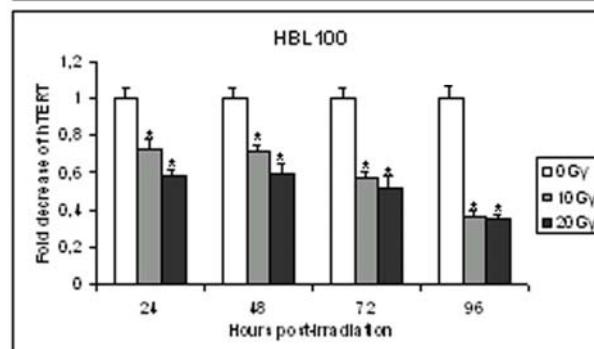
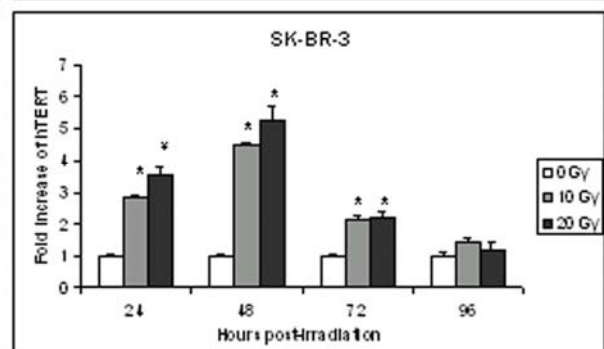
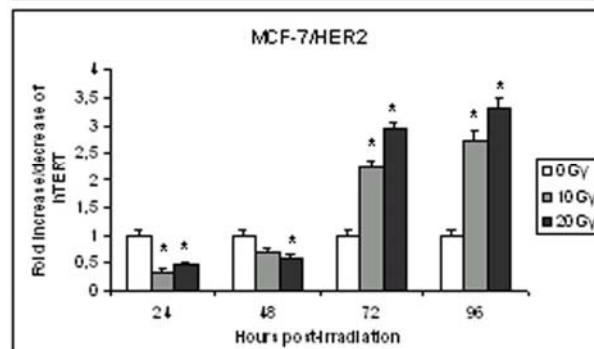
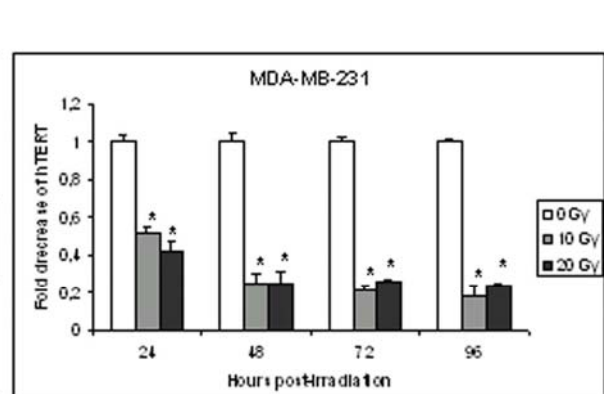
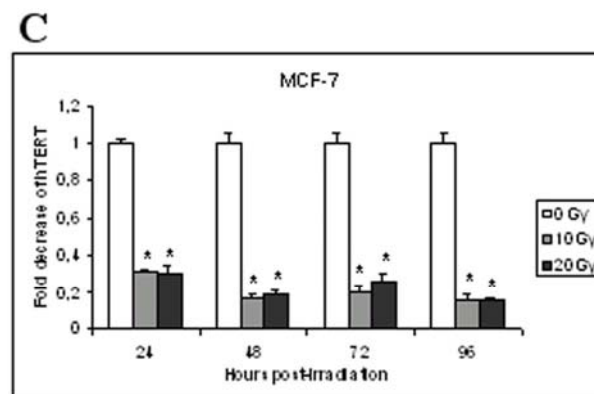
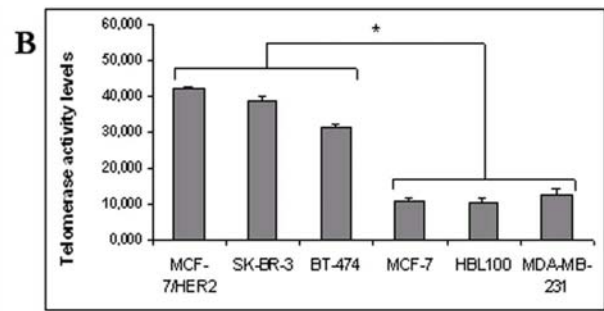
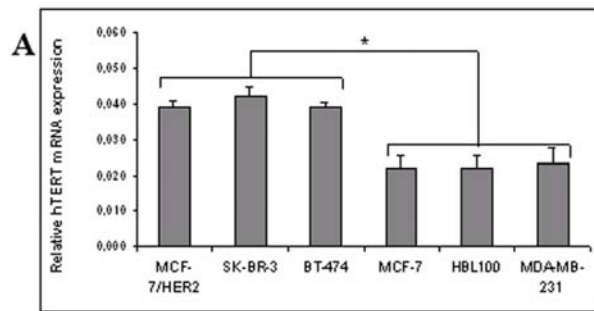
### **2.2.5 Μελέτη της έκφρασης της καταλυτικής μονάδας της τελομεράσης και της δραστικότητας της τελομεράσης, στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές και στους καρκινικούς ιστούς, μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας**

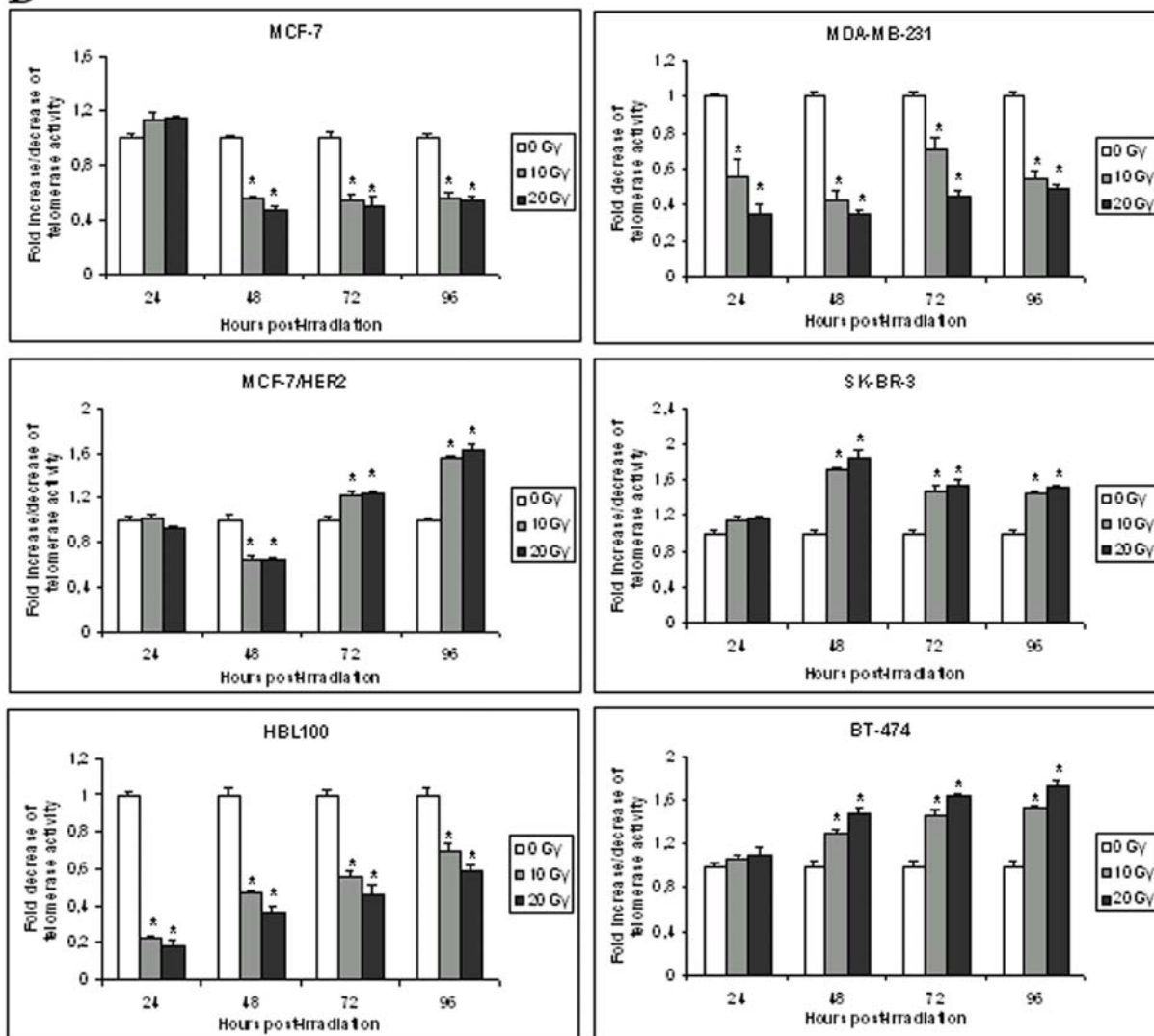
Τα επίπεδα έκφρασης mRNA της καταλυτικής μονάδας hTERT της τελομεράσης, καθώς και η δραστικότητα του ενζύμου της τελομεράσης, μελετήθηκαν σε όλες τις κυτταρικές σειρές και στα δείγματα ασθενών καρκίνου του μαστού. Παρατηρήθηκε ότι οι κυτταρικές σειρές και τα δείγματα, τα οποία είναι θετικά ως προς τον υποδοχέα HER2 (MCF-7/HER2, SK-BR-3, BT-474, BC34, BC35 και BC50) παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στην έκφραση της hTERT και στη δραστικότητα της τελομεράσης, σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές και τα δείγματα τα οποία είναι αρνητικά ως προς τον υποδοχέα HER2 (MCF-7, MDA-MB-231, HBL100, BC32, BC36 και BC43). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 18Α και Β και 19Α και Β για τις κυτταρικές σειρές και τα δείγματα, αντίστοιχα.

Μετά από ακτινοβολήση, διαπιστώθηκε ότι οι κυτταρικές σειρές και τα δείγματα, τα οποία είναι αρνητικά ως προς τον υποδοχέα HER2 (MCF-7, MDA-MB-231, HBL100, BC32, BC36 και BC43) έδειξαν σημαντική ( $P < 0.05$ ) μείωση της έκφρασης των μεταγράφων mRNA της hTERT, η οποία συσχετίστηκε με αντίστοιχη μείωση της δραστικότητας της τελομεράσης, με μοναδική εξαίρεση τη χρονική στιγμή των 24 ωρών για την κυτταρική σειρά MCF-7. Αντιθέτως, οι (HER2+) ακτινοβολημένες κυτταρικές σειρές SK-BR-3 και BT-474 καθώς και τα (HER2+) δείγματα BC34, BC35 και BC50, έδειξαν αύξηση τόσο στην έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας hTERT όσο και στη δραστικότητα της τελομεράσης. Για τα δείγματα, η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε κυρίως από τις χρονικές στιγμές των 48 ή και 72 ωρών μετά από την ακτινοβολήση (Εικόνα 18C και D και 19C και D για τις κυτταρικές σειρές και τα δείγματα, αντίστοιχα).

Επιπρόσθετα, η κυτταρική σειρά MCF-7/HER2 έδειξε διαφορετικά αποτελέσματα σε σχέση με τη μητρική σειρά MCF-7, δείχνοντας αρχικά μία μείωση στην έκφραση της hTERT/τελομεράσης, η οποία συνοδεύτηκε από αύξηση μετά τις 72 ώρες και μετέπειτα ( $P < 0.05$ ). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 19C και D.

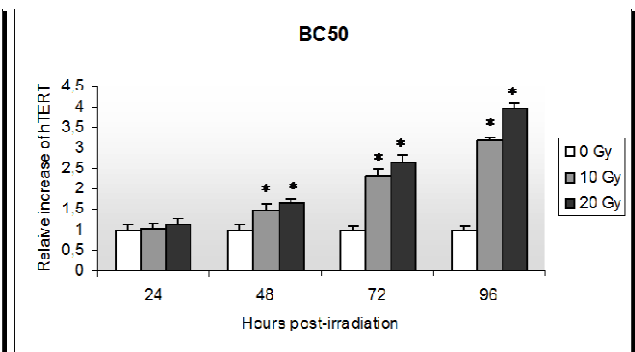
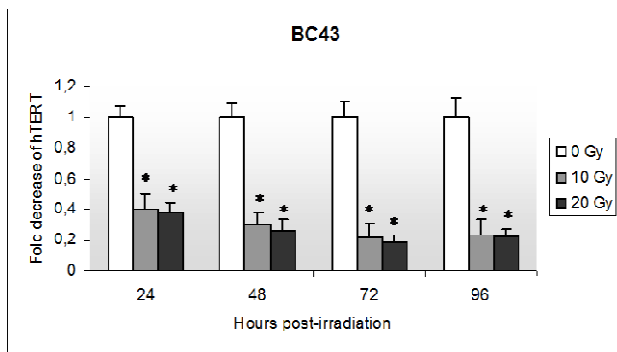
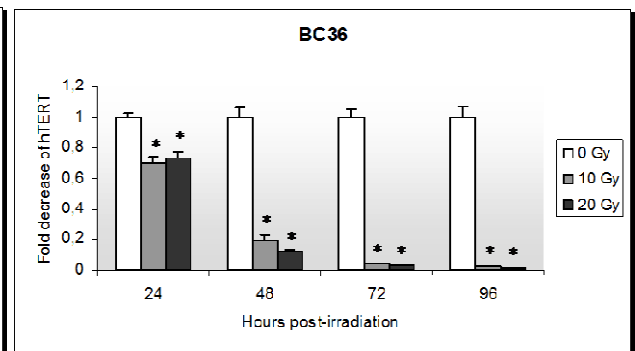
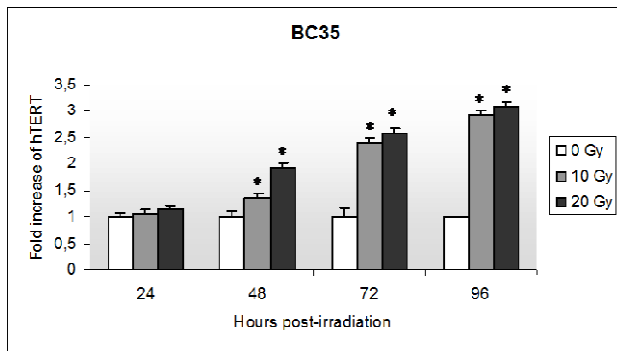
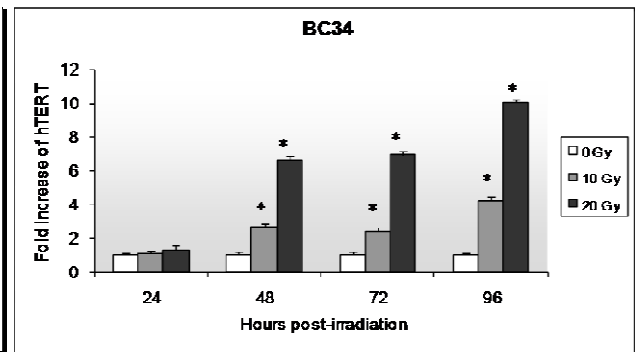
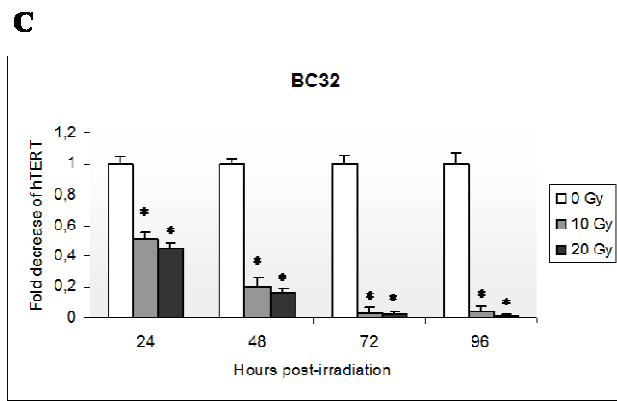
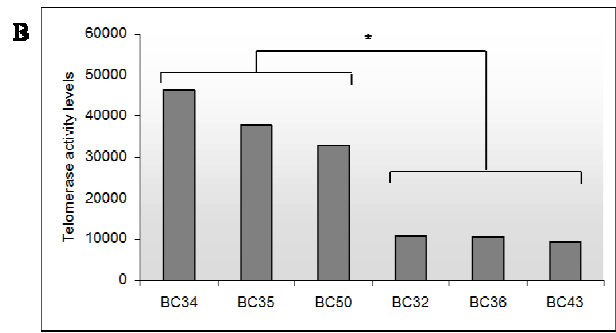
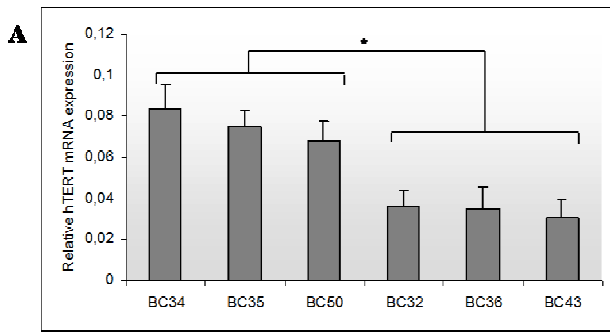
Συμπερασματικά, οι κυτταρικές σειρές και τα δείγματα από ιστούς καρκίνου του μαστού, που είναι θετικά ως προς τον υποδοχέα HER2 παρουσίασαν σημαντική αύξηση της έκφρασης της hTERT και της δραστικότητας της τελομεράσης μετά από ακτινοβολήση, ενώ οι κυτταρικές σειρές και τα δείγματα από ιστούς που ήταν αρνητικά ως προς τον υποδοχέα HER2, παρουσίασαν σημαντική μείωση της έκφρασης της hTERT και της δραστικότητας της τελομεράσης.

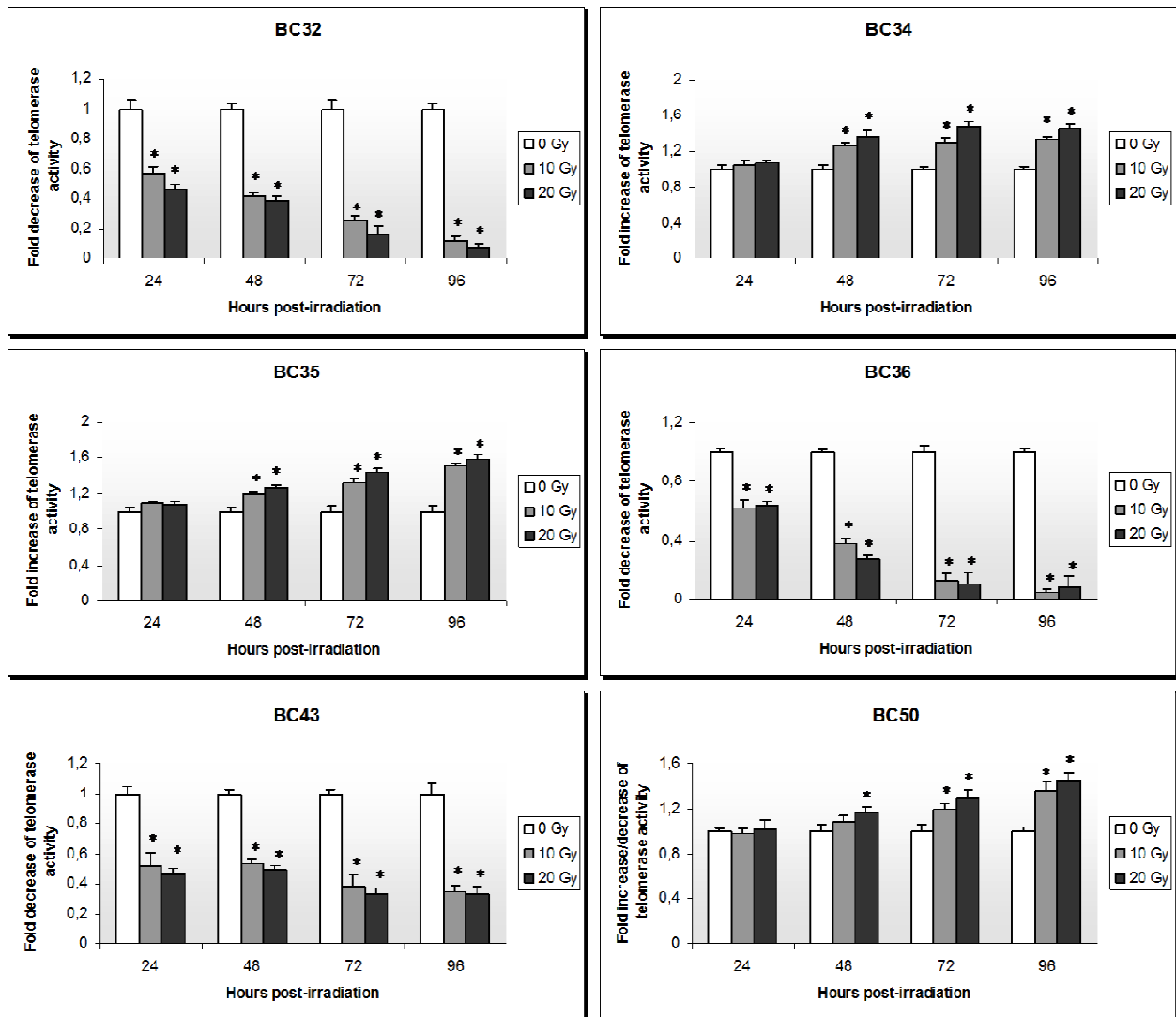


**D**

Εικόνα 18 : Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της hTERT, ομαλοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς PBGD, καθώς και τα επίπεδα δραστηριότητας της τελομεράσης, συγκρίθηκαν μεταξύ μη ακτινοβολημένων και ακτινοβολημένων κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού κατά τις χρονικές στιγμές 24, 48, 72 και 96 ωρών. Α. Σύγκριση των επιπέδων mRNA της hTERT μεταξύ μη ακτινοβολημένων κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού. Β. Σύγκριση των επιπέδων δραστηριότητας της τελομεράσης μεταξύ μη ακτινοβολημένων κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού. Γ. Έκφραση του μεταγράφου mRNA της καταλυτικής υπομονάδας hTERT της τελομεράσης, μετά από ακτινοβόληση των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν την αύξηση ή μείωση της έκφρασης της hTERT στα ακτινοβολημένα κύτταρα, σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα. Η έκφραση της hTERT των μη ακτινοβολημένων κυττάρων θεωρήθηκε ίση με 1. D. Τα ιστογράμματα αναπαριστούν την αύξηση ή μείωση της δραστηριότητας της τελομεράσης στα ακτινοβολημένα κύτταρα, σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα. Η δραστηριότητα της τελομεράσης των μη ακτινοβολημένων κυττάρων θεωρήθηκε ίση με 1. Στα διαγράμματα απεικονίζονται οι τυπικές αποκλίσεις, ενώ οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ( $p < 0.05$ ).





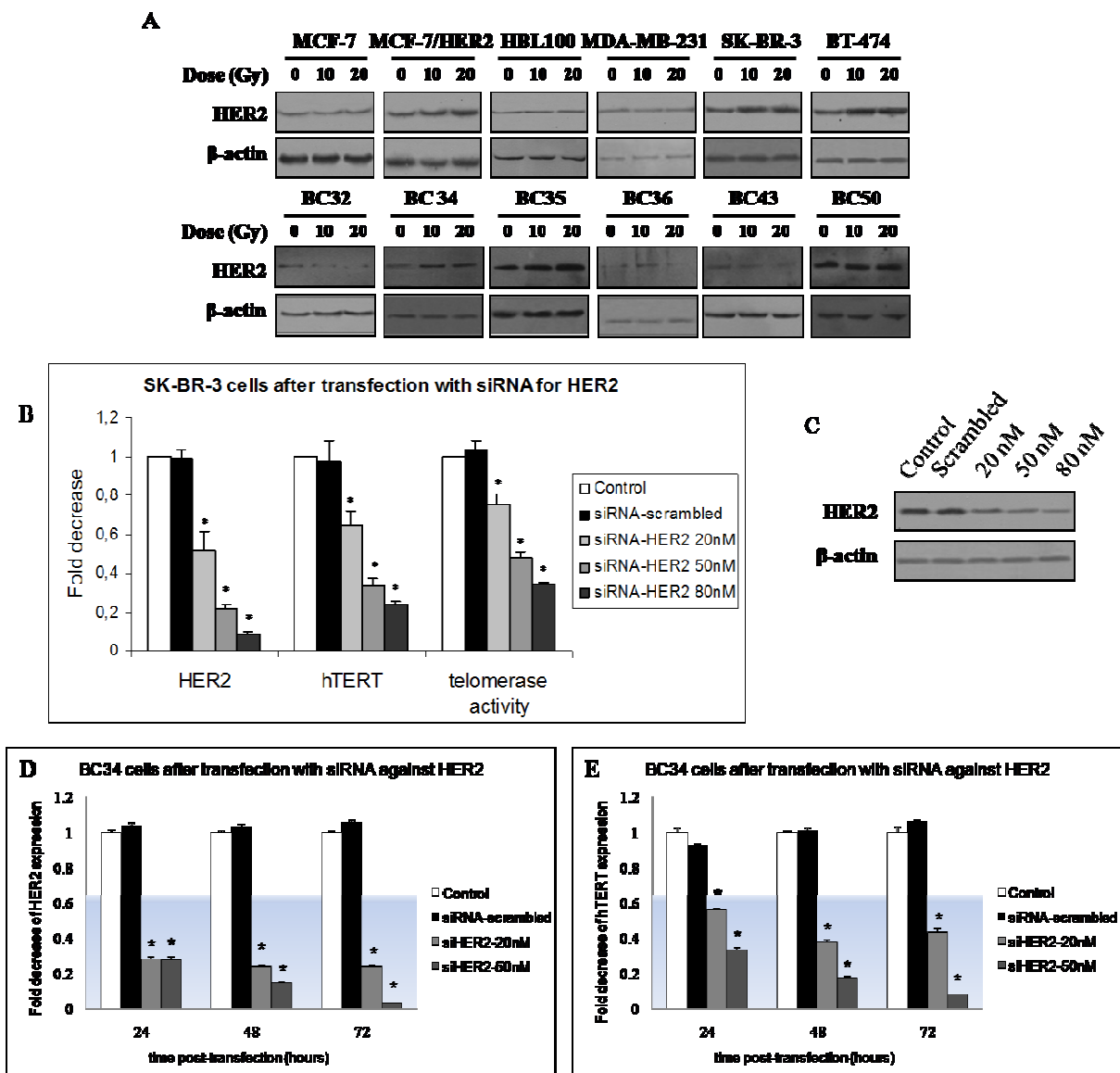
**D**

Εικόνα 19 : Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της hTERT, ομαλοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς PBGD, καθώς και τα επίπεδα δραστηριότητας της τελομεράσης, συγκρίθηκαν μεταξύ μη ακτινοβολημένων και ακτινοβολημένων καλλιεργημένων δειγμάτων καρκίνου του μαστού κατά τις χρονικές στιγμές 24, 48, 72 και 96 ωρών. Α. Σύγκριση των επιπέδων mRNA της hTERT μεταξύ μη ακτινοβολημένων κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού. Β. Σύγκριση των επιπέδων δραστηριότητας της τελομεράσης μεταξύ μη ακτινοβολημένων καλλιεργημένων δειγμάτων καρκίνου του μαστού. Γ. Έκφραση του μεταγράφου mRNA της καταλυτικής υπομονάδας hTERT της τελομεράσης, μετά από ακτινοβολήση των καλλιεργημένων δειγμάτων καρκίνου του μαστού. Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν την αύξηση ή μείωση της έκφρασης της hTERT στα ακτινοβολημένα κύτταρα, σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα ελέγχου. Η έκφραση της hTERT των μη ακτινοβολημένων κυττάρων ελέγχου θεωρήθηκε ίση με 1. D. Τα ιστογράμματα αναπαριστούν την αύξηση ή μείωση της δραστηριότητας της τελομεράσης στα ακτινοβολημένα κύτταρα, σε σύγκριση με τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα ελέγχου. Η δραστηριότητα της τελομεράσης των μη ακτινοβολημένων κυττάρων ελέγχου θεωρήθηκε ίση με 1. Στα διαγράμματα απεικονίζονται οι τυπικές αποκλίσεις, ενώ οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ( $p < 0.05$ ).

## 2.2.6 Διερεύνηση του ρόλου του υποδοχέα HER2/neu στη ρύθμιση της καταλυτικής μονάδας hTERT της τελομεράσης και στη ρύθμιση της δραστηριότητας της τελομεράσης

Η παρατήρηση ότι τόσο οι κυτταρικές σειρές SK-BR-3 και BT-474 όσο και τα δείγματα καρκινικού ιστού από ασθενείς τα οποία είναι θετικά ως προς τον υποδοχέα HER2 (BC34, BC35 και BC50) παρουσίασαν αύξηση στην έκφραση της hTERT και στη δραστηριότητα του ενζύμου της τελομεράσης μετά από ακτινοβολήση, σε σύγκριση με τις κυτταρικές σειρές και τα δείγματα που είναι αρνητικά ως προς τον υποδοχέα HER2 (MCF-7, MDA-MB-231 και HBL100 και BC32, BC36 και BC43), και τα οποία έδειξαν μείωση στην έκφραση της hTERT και στη δραστηριότητα του ενζύμου της τελομεράσης, καθώς και η παρατήρηση ότι οι συγγενείς κυτταρικές σειρές MCF-7 και MCF-7/HER2 έδειξαν διαφορές στη ρύθμιση της τελομεράσης μετά από ακτινοβολήση, οδήγησαν στην περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του υποδοχέα HER2 στη ρύθμιση της έκφρασης της hTERT στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού, μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Μελετήθηκαν, αρχικά, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης HER2 σε όλες τις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και στα δείγματα καρκινικού ιστού (Εικόνα 20Α). Όπως ήταν αναμενόμενο, τα κύτταρα τα οποία εκφράζουν ελάχιστα τον υποδοχέα HER2 (MCF-7, MDA-MB-231, HBL-100 και BC32, BC36 και BC43), παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης, με ελάχιστες αλλαγές έπειτα από ακτινοβολήση, ενώ τα κύτταρα τα οποία είναι θετικά ως προς τον υποδοχέα HER2 (SK-BR-3, BT-474, MCF-7/HER2 και BC34, BC35 και BC50) έδειξαν υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης, με περαιτέρω αύξηση της έκφρασης μετά από ακτινοβολήση.

Για την περαιτέρω μελέτη του ρόλου του υποδοχέα HER2 στη ρύθμιση της hTERT, πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της έκφρασης του υποδοχέα στα θετικά ως προς αυτόν κύτταρα της καρκινικής σειράς SK-BR-3 και του δείγματος BC34, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των μικρών παρεμβατικών μορίων RNA και της επιμόλυνσης με λιποσώματα. Οι μέσες τιμές έκφρασης του mRNA του HER2, και της hTERT και οι μέσες τιμές της δραστηριότητας της τελομεράσης, καθώς και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης και τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα HER2 παρουσιάζονται στην Εικόνα 20B - E. Παρατηρήθηκε δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης του HER2, με ταυτόχρονη δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων έκφρασης της hTERT και της δραστηριότητας της τελομεράσης. Η αντίστοιχη F-στατιστική (48 ώρες μετά από τη διαμόλυνση των κυττάρων) έδειξε σημαντική επίδραση της αποσιώπησης του υποδοχέα HER2 στον ίδιο τον υποδοχέα HER2 ( $F = 205,4$ ,  $p < 0,05$  για τα κύτταρα SK-BR-3,  $F = 30944,44$ ,  $p < 0,05$  για τα κύτταρα BC34) καθώς και στην έκφραση του mRNA της hTERT ( $F = 239,5$ ,  $p < 0,05$  για τα κύτταρα SK-BR-3,  $F = 5757,245$ ,  $p < 0,05$  για τα κύτταρα BC34).

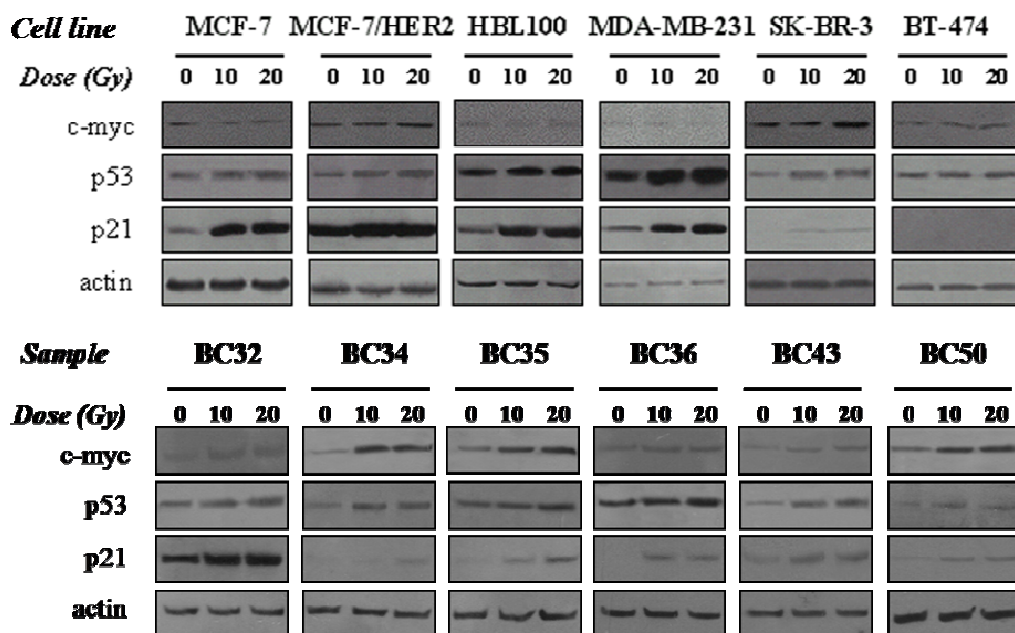


Εικόνα 20 : Επίδραση της έκφρασης του HER2 στη ρύθμιση της hTERT/τελομεράσης. Α. Μη ακτινοβολημένα και ακτινοβολημένα με δόσεις των 10 και 20 Gy κύτταρα SK-BR-3, συγκεντρώθηκαν στις χρονικές στιγμές των 24, 48, 72 και 96 ωρών, υπέστησαν λύση και 40 μg ολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν με τη μέθοδο Western ως προς τα επίπεδα έκφρασης του HER2. Η ανάλυση ως προς την πρωτεΐνη β-ακτίνη πραγματοποιήθηκε με στόχο να αποδείξει το ομοιόμορφο φόρτωμα της ολικής πρωτεΐνης στο πήκτωμα. Για λόγους απλούστευσης, μόνο τα αποτελέσματα της χρονικής στιγμής των 48 ωρών παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη εικόνα. Β και C. Επίδραση της αποσιώπησης του υποδοχέα HER2 στην έκφραση της πρωτεΐνης του ίδιου του HER2, και στην έκφραση mRNA του HER2, της hTERT και στη δραστικότητα της τελομεράσης στα κύτταρα της καρκινικής σειράς SK-BR-3. D. Επίδραση της αποσιώπησης του υποδοχέα HER2 στην έκφραση mRNA του HER2 στα κύτταρα του δείγματος BC34. E. Επίδραση της αποσιώπησης του υποδοχέα HER2 στην έκφραση mRNA της hTERT στα κύτταρα του δείγματος BC34. Στα διαγράμματα απεικονίζονται οι τυπικές αποκλίσεις, ενώ οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ( $p < 0.05$ ).

### **2.2.7 Μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων c-myc, p53 και p21 μετά από ακτινοβόληση των κυτταρικών σειρών και των δειγμάτων καρκίνου του μαστού**

Στη συνέχεια, θέλοντας να διερευνήσουμε τον πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου ο υποδοχέας HER2 προσδίδει ανθεκτικότητα στην ακτινοβόληση και συντελεί στην αύξηση της έκφρασης της hTERT, μελετήθηκαν οι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την έκφραση της hTERT. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα μεταγραφικών παραγόντων όπως c-myc, p53 και p21 μετά από ακτινοβόληση στις έξι κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και σε έξι δείγματα (τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 21). Από την παραπάνω μελέτη, προέκυψε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα c-myc ήταν υψηλά μόνο στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα των HER2+ καρκινικών σειρών SK-BR-3 και BT-474, χωρίς ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων από καρκινικούς ιστούς, ενώ μετά από ακτινοβόληση, βρέθηκαν να αυξάνονται στις HER2+ κυτταρικές σειρές SK-BR-3, BT-474 και MCF-7/HER2 και στα HER2+ δείγματα BC34, BC35 και BC50. Αντιθέτως, στις HER2- κυτταρικές σειρές MCF-7, MDA-MB-231 και HBL100 και στα HER2- δείγματα BC32, BC36 και BC43 παρατηρήθηκαν πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα c-myc μετά από ακτινοβόληση. Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του c-myc, μελετήθηκαν σε όλες τις κυτταρικές σειρές και σε όλα τα δείγματα μετά από ακτινοβόληση και οι μεταβολές έκφρασής του παραλληλίστηκαν με τα επίπεδα έκφρασης της hTERT.

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν στις ακτινοβολημένες κυτταρικές σειρές, τα επίπεδα της πρωτεΐνης p53 τόσο στα κύτταρα που φέρουν το γονίδιο p53 άγριου τύπου (MCF-7, MCF-7/HER2 και HBL100 και κύτταρα των έξι δειγμάτων) όσο και στα κύτταρα που φέρουν μεταλλαγμένο p53 (MDA-MB-231, SK-BR-3 και BT-474), ενώ μελετήθηκε και η ικανότητα του



Εικόνα 21 : Επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στην πρωτεϊνική έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων c-myc, p53 και p21 στις κυτταρικές σειρές MCF-7, MCF-7/HER2, MDA-MB-231, HBL100, SK-BR-3 και BT-474. Για λόγους απλούστευσης, μόνο τα αποτελέσματα της χρονικής στιγμής των 48 ωρών παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη εικόνα (μη ακτινοβολημένα και ακτινοβολημένα με 10 και 20 Gy κύτταρα). Η ανάλυση ως προς την πρωτεΐνη β-ακτίνη πραγματοποιήθηκε με στόχο να δείξει το ομοιόμορφο φόρτωμα της ολικής πρωτεΐνης στο πήκτωμα.

p53 να επάγει την πρωτεΐνη p21 στα ίδια κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι τόσο η άγριου τύπου όσο και η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 βρέθηκε υπεραυξημένη μετά από ακτινοβολήση, σε όλες τις κυτταρικές σειρές και τα δείγματα, με τη μόνη εξαίρεση της σειράς BT-474. Η ικανότητα της p53 να επάγει την πρωτεΐνη p21 παρουσίασε διαφορές μεταξύ των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν. Η άγριου τύπου πρωτεΐνη p53 μπόρεσε να επάγει σε σημαντικό βαθμό την πρωτεΐνη p21 στα κύτταρα MCF-7, MCF-7/HER2 και HBL100, ενώ η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 μπόρεσε να επάγει την πρωτεΐνη p21 στα κύτταρα MDA-MB-231 και SK-BR-3. Η πρωτεΐνη p21 δεν ανιχνεύτηκε στα κύτταρα της κυτταρικής σειράς BT-474. Η άγριου τύπου πρωτεΐνη p53 των δειγμάτων μπόρεσε να επάγει την πρωτεΐνη p21 και στα έξι δείγματα μετά από ακτινοβολήση, περίπου στο ίδιο ποσοστό. Από τα έξι δείγματα των ασθενών, το δείγμα BC32 έδειξε πολύ υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης p21 τόσο στα μη όσο και στα ακτινοβολημένα κύτταρα.

Συμπερασματικά, οι θετικές ως προς τον υποδοχέα HER2 κυτταρικές σειρές, καθώς και τα θετικά ως προς τον υποδοχέα δείγματα, παρουσίασαν περαιτέρω σημαντική αύξηση του μεταγραφικού παράγοντα c-myc μετά από ακτινοβολήση.

### 2.2.8 Μελέτη της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και ακετυλίωσης της ιστόνης H3 στον υποκινητή του γονιδίου της τελομεράσης

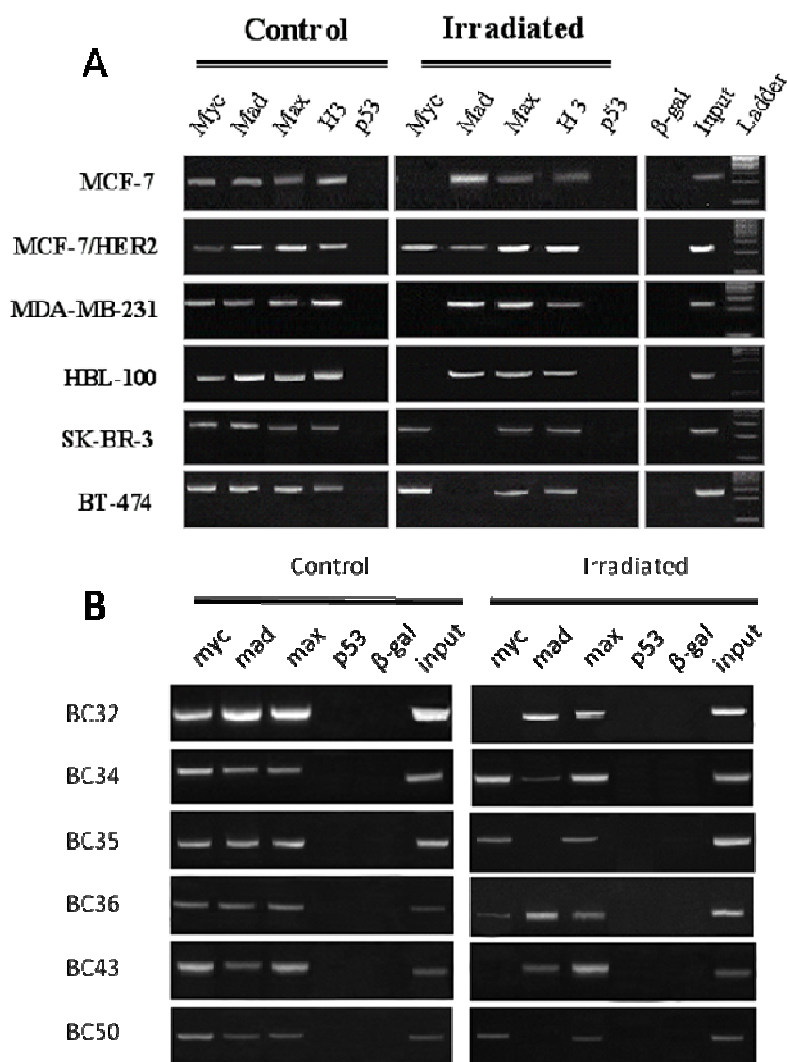
Στη συνέχεια της μελέτης, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση της χρωματίνης με αντισώματα εναντίον των πιο χαρακτηριστικών μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση της τελομεράσης, όπως οι *c-myc*, *mad1*, *max*, *p53* και η ακετυλιωμένη ιστόνη H3. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 22Α σε όλες τις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, παρατηρήθηκε έντονο σήμα παρουσίας του υποκινητή της τελομεράσης, στο κατακερματισμένο DNA που κατακρημνίστηκε με αντίσωμα εναντίον της πρωτεΐνης *max*, ενώ κανένα σήμα του υποκινητή της τελομεράσης δεν ήταν εμφανές όταν χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα εναντίον της πρωτεΐνης *p53* για την κατακρήμιση της χρωματίνης. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα της μεθόδου, το κατακρημνισμένο από το αντίσωμα εναντίον της *p53* DNA, υποβλήθηκε σε PCR για την αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου *p21* και όλες οι κυτταρικές σειρές ήταν θετικές εκτός από την BT-474. Η ακετυλιωμένη ιστόνη H3 βρέθηκε σε όλα τα ακτινοβολημένα και μη ακτινοβολημένα δείγματα, αλλά παρατηρήθηκε πιο έντονο σήμα στα μη ακτινοβολημένα δείγματα των HER2-κυτταρικών σειρών MCF-7, MDA-MB-231 και HBL100 σε σχέση με τα αντίστοιχα ακτινοβολημένα δείγματα. Το αντίθετο παρατηρήθηκε στις HER2+ κυτταρικές σειρές MCF-7/HER2, SK-BR-3 και BT-474, όπου πιο δυνατό σήμα μετά από κατακρήμιση της χρωματίνης με αντίσωμα εναντίον της ακετυλιωμένης ιστόνης H3, βρέθηκε στα ακτινοβολημένα σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα.

Σε ό,τι αφορά στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο *myc/mad/max*, στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα, παρατηρήθηκε έντονο σήμα δηλώνοντας την παρουσία του υποκινητή στα δείγματα που κατακρημνίστηκαν με αντισώματα εναντίον του *c-myc* αλλά και του *mad1*, και υποδεικνύοντας την ύπαρξη ετερογένειας στον κυτταρικό πληθυσμό. Τα κύτταρα MCF-7, MDA-MB-231 και HBL100 (που είχαν δείξει μειορύθμιση της τελομεράσης μετά από ακτινοβολήση) δεν είχαν εμφανή πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα *c-myc* στον υποκινητή, ενώ η πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα *mad1* εξακολούθησε να παρατηρείται. Στα κύτταρα SK-BR-3 και BT-474 (που είχαν δείξει αύξηση στην έκφραση της τελομεράσης), η πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα *mad1* δεν ανιχνευόταν στις χρονικές στιγμές των 48 και 72 ωρών. Τα κύτταρα MCF-7/HER2 έδειξαν σήμα πρόσδεσης για όλους τους μεταγραφικούς παράγοντες του συμπλόκου σε όλα τα δείγματα, ακτινοβολημένα και μη, μέχρι και τη χρονική στιγμή των 96 ωρών, παρότι παρατηρήθηκε πιο αδύναμο σήμα για το *c-myc* στα μη ακτινοβολημένα και για το *mad1* στα ακτινοβολημένα κύτταρα.

Τα ίδια πειράματα ανοσοκατακρήμισης της χρωματίνης επαναλήφθηκαν στα ακτινοβολημένα δείγματα, με παρεμφερή αποτελέσματα, και απεικονίζονται στην εικόνα 22B.

Πρόσδεση της πρωτεΐνης p53 δεν παρατηρήθηκε ούτε στα δείγματα των ασθενών, ακτινοβολημένα και μη. Το κατακρημνισμένο από το αντίσωμα εναντίον της p53 DNA, υποβλήθηκε σε PCR για την αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου *p21* και όλα τα δείγματα ήταν θετικά. Όπως και στις κυτταρικές σειρές, έτσι και στα δείγματα, όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες του συμπλόκου *myc/mad/max* βρέθηκαν να προσδένονται στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα των δειγμάτων, υποδεικνύοντας την ύπαρξη κυτταρικής ετερογένειας. Αντίθετα, στα ακτινοβολημένα κύτταρα, η αυξημένη έκφραση *hTERT* και η αυξημένη δραστικότητα τελομεράσης των HER2+ δειγμάτων BC34, BC35 και BC50, συνδυάστηκε με αυξημένη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα *c-myc* υποκινητή της *hTERT*, ενώ η μειωμένη έκφραση *hTERT* και η συνακόλουθη μειωμένη δραστικότητα τελομεράσης των HER2- δειγμάτων BC32, BC36 και BC43, συνδυάστηκε με αυξημένη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα *mad1* στον υποκινητή της *hTERT*.

Για να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα της μεθόδου ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, η χρωματίνη κατακρημνίστηκε με αντισώματα εναντίον της  $\beta$ -galactosidase. Σε αυτά τα δείγματα, δεν ανιχνεύθηκε η αλληλουχία του υποκινητή της τελομεράσης, αποδεικνύοντας



Εικόνα 22: Ανάλυση της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και της ακετυλίωσης της ιστόνης H3, σε ακτινοβολημένες και μη ακτινοβολημένες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (A), και σε ακτινοβολημένα και μη καλλιεργημένα κύτταρα από δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού (B) με τη βοήθεια της δοκιμασίας ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης. Η κατακερματισμένη μετά από επίδραση υπερήχων χρωματίνη, κατακρημνίστηκε μετά από τη χορήγηση αντισωμάτων ειδικών για τους μεταγραφικούς παράγοντες *myc*, *mad*, *max*, *p53* και την ακετυλιωμένη ιστόνη H3, στη συνέχεια ακολούθησε PCR με εκκινητές ειδικούς για τον υποκινητή της *hTERT*.

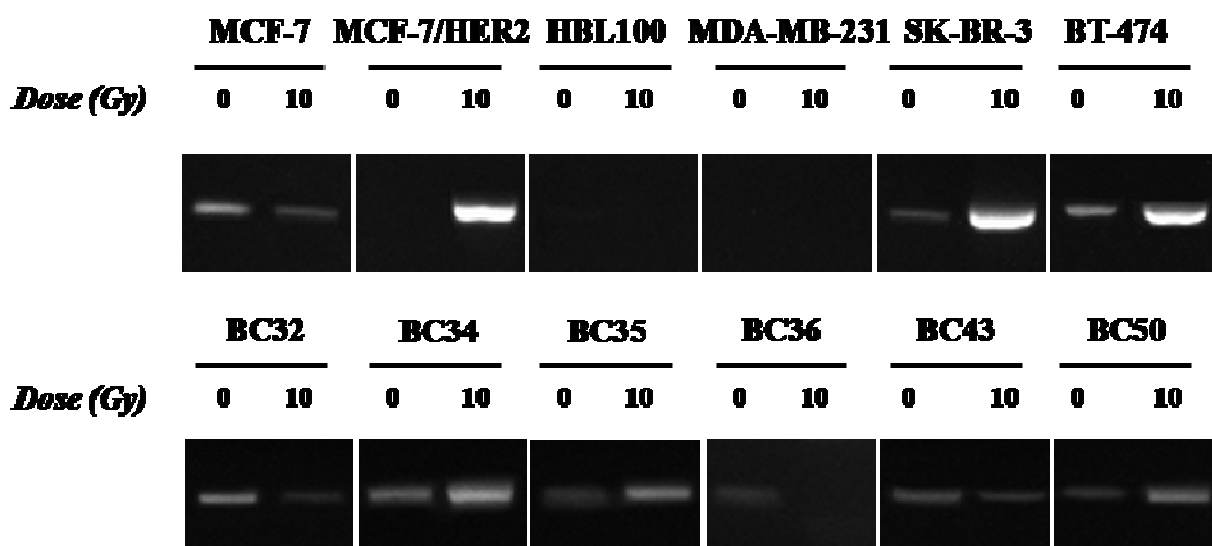


την ειδικότητα της μεθόδου. Η μη δεσμευμένη από αντίσωμα χρωματίνη, συλλέχθηκε από όλα τα δείγματα, υποβλήθηκε σε PCR για τον υποκινητή της hTERT και όλα τα δείγματα ήταν θετικά.

Συμπερασματικά, η αυξημένη έκφραση της hTERT μετά από ακτινοβολήση των HER2+ κυτταρικών σειρών και δειγμάτων, συνδυάστηκε με αυξημένη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα c-myc στην περιοχή του υποκινητή, ενώ, αντίθετα, η μειωμένη έκφραση της hTERT μετά από ακτινοβολήση των HER2- κυτταρικών σειρών και δειγμάτων συνδυάστηκε με αυξημένη πρόσδεση του mad1 στον υποκινητή του γονιδίου.

### **2.2.9 Μελέτη της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στον υποκινητή του γονιδίου του c-myc**

Η αυξημένη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα c-myc στον υποκινητή της hTERT, που οδήγησε σε αυξημένη έκφραση της hTERT και σε αυξημένη δραστηριότητα της τελομεράσης στα ακτινοβολημένα, θετικά ως προς τον υποδοχέα HER2 κύτταρα, τόσο των κυτταρικών σειρών όσο και των δειγμάτων, οδήγησε στη διερεύνηση των πιθανών σηματοδοτικών μονοπατιών που συνδέουν τον υποδοχέα HER2 και την τελομεράση, μέσω του myc. Μελετήθηκαν, πιθανοί ρυθμιστές του υποκινητή του γονιδίου του c-myc, οι οποίοι επιλέχθηκαν ώστε να αποτελούν ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μόρια που να συνδέονται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα HER2. Από τον υποδοχέα HER2 ξεκινούν διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, από τα οποία τα πιο βασικά είναι τα μονοπάτια MAPK (mitogen-activated protein kinase) και PI3K/AKT<sup>215</sup>. Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σημάτων από αυξητικούς παράγοντες και τους υποδοχείς τους<sup>216,217</sup>. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης AKT, μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος θα μπορούσε στη συνέχεια να ενεργοποιήσει την hTERT, μέσω του c-myc, το οποίο έχει βρεθεί να αποτελεί έναν από τους μοριακούς στόχους του NF-κΒ<sup>218</sup>. Η πρόσδεση του NF-κΒ στον υποκινητή του c-myc μελετήθηκε μετά από ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 23. Όταν το κατακρημνισμένο με αντίσωμα εναντίον του NF-κΒ αντίσωμα DNA υποβλήθηκε σε PCR για την ανίχνευση αλληλουχιών του υποκινητή του c-myc, διαπιστώθηκε ότι μόνο τα θετικά ως προς τον υποδοχέα HER2 κύτταρα, έδωσαν έντονα σήματα για τον υποκινητή μετά από ακτινοβολήση, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές για τα αρνητικά ως προς τον υποδοχέα HER2 κύτταρα.



Εικόνα 23 : Πρόσδεση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στον υποκινητή του γονιδίου c-myc.

### 2.2.10 Μελέτη της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων του μαστού μετά από αποσιώπηση του υποδοχέα HER2 και της τελομεράσης

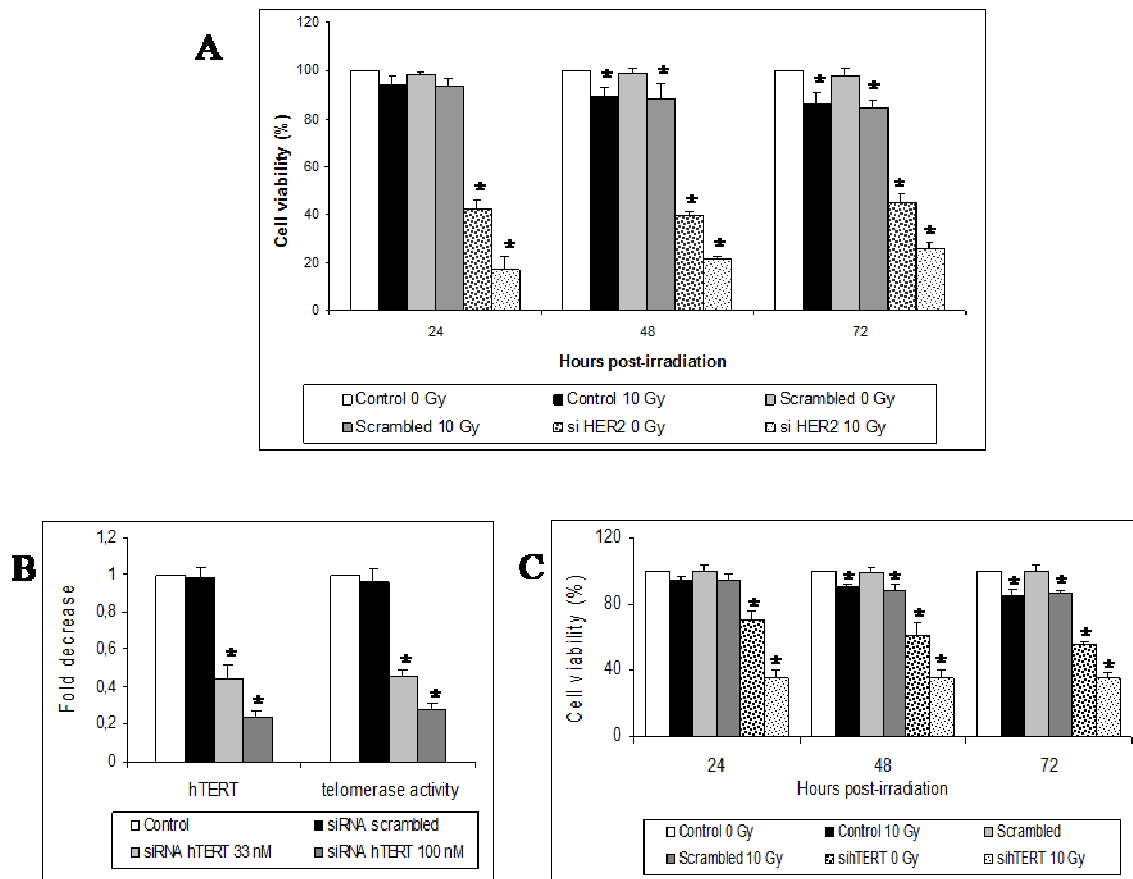
Προκειμένου να διαπιστωθεί η σημασία του υποδοχέα HER2 και της έκφρασης του γονιδίου της τελομεράσης στην κυτταρική βιωσιμότητα και την ανθεκτικότητα στην ακτινοβόληση, επακολούθησε αποσιώπηση του καθενός από τα ανωτέρω γονίδια χωριστά και συνακόλουθη ακτινοβόληση της κυτταρικής σειράς SK-BR-3, η οποία εκφράζει τον υποδοχέα HER2 σε μεγαλύτερο βαθμό από κάθε άλλη κυτταρική σειρά ή δείγμα καρκινικού ιστού από ασθενείς.

Καθώς η δοσολογία των 80 nM siRNA εναντίον του HER2 ήταν η πιο αποτελεσματική σε ό,τι αφορά στην καταστολή της τελομεράσης στα κύτταρα SK-BR-3, χρησιμοποιήθηκε αυτή η δοσολογία προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του HER2 στην αυξημένη ανθεκτικότητα, των θετικών ως προς τον HER2 κυττάρων, στην ακτινοβολία (Εικόνα 24). Όπως φαίνεται στο διάγραμμα A, η αποσιώπηση του HER2 με την τεχνολογία siRNA οδήγησε σε σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας των κυττάρων SK-BR-3 (περίπου 60%, 24 ώρες μετά από την επιμόλυνση), κατά πολύ μεγαλύτερη ( $F=3620,3 \gg 1$ ,  $p < 0,05$ ) από τη μείωση που προκάλεσε η ακτινοβολία ( $F=222,7 \gg 1$ ,  $p < 0,05$ ). Η διπαραγοντική ανάλυση μεταβλητότητας έδειξε ότι όταν παρεμβαίνουν και οι δύο εξεταζόμενοι παράγοντες (siRNA εναντίον του HER2 και ακτινοβόληση) ταυτόχρονα, έχουν ακόμη μεγαλύτερη επίπτωση στην κυτταρική βιωσιμότητα, ελαττώνοντάς την κατά 80%, 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση ( $F = 3869,5 \gg 1$ ,  $p < 0,05$ ).

Επομένως, προέκυψε ότι η αποσιώπηση του HER2 οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης της τελομεράσης και της δραστικότητας του ενζύμου. Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι η αυξημένη ανθεκτικότητα των κυττάρων SK-BR-3 στην ακτινοβολή διατάγεται μέσω της τελομεράσης, επακολούθησε αποσιώπηση του γονιδίου της τελομεράσης, ακτινοβολήση και μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας.

Η επίδραση της αποσιώπησης του γονιδίου της hTERT στην έκφραση της hTERT και στη δραστικότητα της τελομεράσης απεικονίζεται στην Εικόνα 24B όπου και γίνεται προφανής η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αποσιώπησης του γονιδίου με την τεχνική siRNA. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24C, η αποσιώπηση της hTERT στα κύτταρα της καρκινικής σειράς SK-BR-3 προκάλεσε σημαντική μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα τόσο σε μη ακτινοβολημένα όσο και σε ακτινοβολημένα με 10 Gy κύτταρα, ωστόσο, αυτή η μείωση ήταν κατά πολύ μικρότερη από εκείνη που είχε προκαλέσει η αποσιώπηση του HER2. Η ανάλυση της μεταβλητότητας έδωσε υψηλή τιμή F-statistics για την ακτινοβολήση ( $F=87,5$ ) και κυρίως για την αποσιώπηση της hTERT ( $F=567,1$ ). Η συνδυασμένη δράση των δύο παραγόντων ήταν πολύ πιο έντονη ( $F= 669,8$ ). Οι αντίστοιχες τιμές p ήταν χαμηλότερες από 0,05 υποδεικνύοντας στατιστικά σημαντικές σχέσεις.

Συμπερασματικά, η αποσιώπηση της hTERT και κυρίως του HER2, οδήγησε σε μείωση της ανθεκτικότητας των κυττάρων στην ακτινοβολήση. Η αποσιώπηση του HER2 οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης της hTERT και δραστικότητας της τελομεράσης στα HER2+ κύτταρα.



Εικόνα 24: A. Η καρκινική κυτταρική σειρά SK-BR-3 επιμολύνθηκε με siRNA εναντίον του υποδοχέα HER2. 24 ώρες μετά από την επιμόλυνση, τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με μία δόση των 10 Gy και η κυτταρική βιωσιμότητα εκτιμήθηκε με τη βοήθεια της δοκιμασίας MTT 24, 48 και 72 ώρες μετά από την επίδραση της ακτινοβολήσης. Η κυτταρική βιωσιμότητα των μη επιμολυσμένων, μη ακτινοβολημένων κυττάρων θεωρήθηκε ίση με 100%. Στα διαγράμματα απεικονίζονται οι τυπικές αποκλίσεις ενώ οι αστερίσκοι δείχνουν τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ( $p < 0.05$ ). B. Τα κύτταρα της καρκινικής σειράς SK-BR-3 επιμολύνθηκαν με siRNA εναντίον της hTERT. Αυξανόμενες δόσεις του siRNA εναντίον της hTERT (33 και 100 nM) προκάλεσαν αποτελεσματική αποσιώπηση της hTERT και της δραστηριότητας του ενζύμου της τελομεράσης. C. Κύτταρα της καρκινικής σειράς SK-BR-3 επιμολύνθηκαν με 33 nM siRNA εναντίον της hTERT, ακτινοβολήθηκαν με μία και μοναδική δόση των 10 Gy και η κυτταρική τους βιωσιμότητα μετρήθηκε με τη βοήθεια της δοκιμασίας MTT στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών μετά από την ακτινοβολήση. Στα διαγράμματα απεικονίζονται οι τυπικές αποκλίσεις ενώ οι αστερίσκοι δείχνουν τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ( $p < 0.05$ ).

### 2.3. Συζήτηση

Η ακτινοθεραπεία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, αλλά η συχνή εμφάνιση όγκων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αυτού του είδους τη θεραπεία, αποτελεί πλέον κοινό κλινικό πρόβλημα. Η πολυπλοκότητα της νόσου, λόγω της εμπλοκής πολλών γονιδίων με διαφορετικές λειτουργίες, αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την επιτυχία της θεραπευτικής μεθόδου που θα επιλεγεί. Η γνώση των μοριακών μηχανισμών που χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να αποφύγουν τη δραστικότητα της ακτινοθεραπείας, είναι πρωταρχικής σημασίας για το σχεδιασμό νέων θεραπευτικών στρατηγικών που θα έχουν ως στόχο τη βελτίωση της αποτελεσματικότητάς της<sup>219</sup>. Επομένως, η δημιουργία ενός μοντέλου εστιασμένου στον καρκίνο του μαστού, το οποίο θα μελετά την ευαισθησία των κυττάρων στην ακτινοθεραπεία σε σχέση με το φαινότυπό τους και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται ή αναστέλλονται μετά από την επίδραση ακτινοβολήσης θα ήταν ένα πολύ σημαντικό και χρήσιμο εργαλείο για τον τρόπο εφαρμογής ενός θεραπευτικού σχήματος<sup>220</sup>.

Συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων μπορεί να είναι σε σημαντικό βαθμό υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα των κυττάρων στις διαφορετικού τύπου θεραπείες, ελέγχοντας σηματοδοτικά μονοπάτια που ενέχονται στην αθανατοποίηση των κυττάρων και στην αναστολή της απόπτωσης. Στον καρκίνο του μαστού, ορισμένα από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, τα οποία διερευνώνται μετά από χειρουργική αφαίρεση ενός όγκου και τα οποία φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου, είναι η παρουσία των ορμονικών υποδοχέων οιστρογόνου (ER), προγεστερόνης (PR) και HER2. Η παρουσία του καθενός από τους υποδοχείς ξεχωριστά ή σε συνδυασμό μεταξύ τους, έχει ενοχοποιηθεί στο παρελθόν για την αυξημένη επιθετικότητα της νόσου και την αυξημένη ανθεκτικότητα στη θεραπεία σε μελέτες *in vivo* και *in vitro*<sup>221-228</sup>. Εκτός από τους ορμονικούς υποδοχείς και το ρόλο που διαδραματίζουν στην πορεία της νόσου, το γονίδιο p53 θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους δείκτες καλής πρόγνωσης για τον καρκίνο του μαστού αλλά και για πολλούς άλλους τύπους καρκίνου. Η παρουσία φυσιολογικού p53, οδηγεί στο θάνατο ενός κυττάρου από απόπτωση όταν στον πυρήνα αυτού διαπιστώνονται πολλές βλάβες στο DNA, είτε λόγω της έναρξης μίας κακοήθειας, είτε λόγω της πρόκλησης βλαβών στο γενετικό υλικό μετά από την εφαρμογή ενός θεραπευτικού σχήματος<sup>229-231</sup>. Όλα τα ανωτέρω γονίδια, είναι γονίδια-κλειδιά σε ότι αφορά στην ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, με σημαντικό ρόλο τόσο στην εξέλιξη μίας κακοήθειας, όσο και στην απόκρισή της στη θεραπεία.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε ο ρόλος των χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων, όπως οι ορμονικοί οιστρογονικοί υποδοχείς, οι υποδοχείς προγεστερόνης και ο HER2, καθώς και ο ρόλος της παρουσίας λειτουργικής ή μη πρωτεΐνης p53 στη ρύθμιση της

έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας hTERT της τελομεράσης και στη ρύθμιση της δραστηριότητας της τελομεράσης σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και σε δείγματα από καρκινικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο του μαστού, μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Η τελομεράση επιλέχθηκε διότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, καθώς η υπερέκφρασή της έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση του κακόηθους φαινοτύπου. Προσθέτοντας αλληλουχίες εξανουκλεοτιδίων στα άκρα των χρωμοσωμάτων συντελεί στην αθανατοποίηση των κυττάρων, παρακάμπτοντας τον κυτταρικό θάνατο που προκύπτει φυσιολογικά μετά από έναν αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Η τελομεράση θεωρείται ένας από τους βασικότερους μοριακούς δείκτες, ενδεικτικούς της μετάπτωσης ενός κυττάρου από τον φυσιολογικό στον κακοήγη φαινότυπο<sup>19,38</sup>.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής, μελετήθηκε η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης, hTERT, καθώς και η δραστηριότητα της τελομεράσης σε πενήντα δείγματα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, πλήρως χαρακτηρισμένα μετά από ιστολογική ανάλυση, σε μία προσπάθεια συσχέτισης του κυτταρικού φαινοτύπου με την έκφραση και τη δραστηριότητα αυτού του μοριακού δείκτη. Καταρχήν, στα καρκινικά δείγματα παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ έκφρασης hTERT και δραστηριότητας τελομεράσης. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς έχει βρεθεί ότι η δραστηριότητα του ενζύμου εξαρτάται από την έκφραση της καταλυτικής RNA υπομονάδας<sup>44</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και στο παρελθόν σε καρκίνο του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας, αλλά και του μαστού<sup>232,233</sup>.

Στη συνέχεια, στα πενήντα δείγματα καρκίνου του μαστού, η έκφραση της hTERT και η δραστηριότητα της τελομεράσης συγκρίθηκαν με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του κάθε δείγματος, ώστε να βρεθούν τυχόν συσχετίσεις μεταξύ κυτταρικού φαινοτύπου και έκφρασης τελομεράσης. Η όποια συσχέτιση θα μπορούσε να αποτελεί δείκτη της ρύθμισης της τελομεράσης από κάποιο από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του κυττάρου. Από τη μελέτη αυτή δε βρέθηκε κάποια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης και στην έκφραση της hTERT ή τη δραστηριότητα της τελομεράσης. Αντίθετα, παρατηρήθηκε στα καρκινικά κύτταρα μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του επιφανειακού υποδοχέα HER2/neu και της έκφρασης της hTERT αφενός και της δραστηριότητας της τελομεράσης αφετέρου. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας hTERT της τελομεράσης είναι αυξημένη σε θετικούς ως προς τον υποδοχέα HER2/Neu όγκους και καρκινικές κυτταρικές σειρές, σε σχέση με τους αντίστοιχους αρνητικούς ως προς τον υποδοχέα όγκους και καρκινικές σειρές<sup>234-237</sup>. Έχει βρεθεί ότι ο

υποκινητής του γονιδίου της hTERT περιέχει μία αλληλουχία που αποτελεί σημείο πρόσδεσης για την 17β-οιστραδιόλη, επομένως η hTERT θεωρείται ένα από τα σημαντικά γονίδια τα οποία ρυθμίζονται από τα οιστρογόνα, οδηγώντας σε καρκινογένεση στο μαστό<sup>238,239</sup>. Η προγεστερόνη, επίσης έχει βρεθεί να ρυθμίζει την έκφραση της hTERT μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK (mitogen-activated kinase signalling pathway)<sup>73</sup>. Οι μελέτες αυτές, ωστόσο, είχαν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα τα οποία διεγέρθηκαν με οιστρογόνα ή προγεστερόνη, κάτι που δε συνέβη στη συγκεκριμένη μελέτη, καθώς καμία από τις ασθενείς δεν είχε υποστεί ορμονοθεραπεία πριν από την αφαίρεση του όγκου. Επομένως, τα αποτελέσματά μας δεν έρχονται σε αντίθεση με τις μελέτες αυτές.

Στη συνέχεια της μελέτης μας, χρησιμοποιήσαμε έξι κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, πλήρως χαρακτηρισμένες ως προς τα χαρακτηριστικά τους, τις οποίες μελετήσαμε ως προς την έκφραση της hTERT και ως προς τη δραστικότητα της τελομεράσης, όταν τα κύτταρα παραμένουν σε καλλιέργεια, υπό συνθήκες απλής ανακαλλιέργειας ανά τριήμερο. Παρατηρήθηκε ότι οι καρκινικές σειρές MCF-7/HER2, SK-BR-3 και BT-474 οι οποίες εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα τον υποδοχέα HER2 έδειξαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης hTERT και δραστικότητας τελομεράσης σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές MCF-7, MDA-MB-231 και HBL100 οι οποίες εκφράζουν τον υποδοχέα HER2 σε πολύ χαμηλά επίπεδα, σε συμφωνία με τις προαναφερθείσες παρατηρήσεις στα κυτταρικά εκχυλίσματα πρωτογενών όγκων καρκίνου του μαστού. Η παρουσία των υποδοχέων οιστρογόνου και προγεστερόνης ή η παρουσία φυσιολογικής ή μη πρωτεΐνης p53, δε φάνηκε, στη φάση φυσιολογικής ανακαλλιέργειας των κυτταρικών αυτών σειρών, να επηρεάζει το σύστημα hTERT/τελομεράσης. Η ίδια παρατήρηση ισχύει και για τις καλλιέργειες κυτάρων από τα δείγματα των ασθενών. Κατά τη διάρκεια καλλιέργειας και ανακαλλιέργειάς τους τα δείγματα αυτά αφενός διατήρησαν το φαινότυπο που είχε βρεθεί κατά την ιστολογική τους εκτίμηση, αφετέρου η έκφραση και η ενεργότητα του συστήματος hTERT/τελομεράσης δε φάνηκε να επηρεάζεται από την παρουσία των υποδοχέων οιστρογόνου ή προγεστερόνης, ενώ φάνηκε να συνάδει με την παρουσία του υποδοχέα HER2.

Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης μας τα κύτταρα των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού και κύτταρα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, που φέρουν διαφορετικά χαρακτηριστικά σε ότι αφορά στους υποδοχείς οιστρογόνων, προγεστερόνης, HER2 και στην πρωτεΐνη p53, υπέστησαν ακτινοβολήση και η ανταπόκρισή τους στην ακτινοβολήση μελετήθηκε σε σχέση με τη βιωσιμότητα και την ενεργοποίηση του συστήματος hTERT/τελομεράσης.

Σε ότι αφορά στη μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας, τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν και ακτινοβολήθηκαν με τρόπο που να προσομιώνει την in vivo ακτινοβολήση όγκων στο

σώμα και η μείωση της βιωσιμότητάς τους μελετήθηκε έως και 96 ώρες μετά από την επίδραση της ακτινοβολίας. Το γενικό συμπέρασμα το οποίο προέκυψε από τη συγκεκριμένη μελέτη ήταν ότι οι κυτταρικές σειρές, αλλά και τα δείγματα από ασθενείς που είχαν ως κοινό χαρακτηριστικό την υπερέκφραση του υποδοχέα HER2 εμφάνισαν πιο ανθεκτικό χαρακτήρα στην ακτινοβολήση σε σχέση με τις καρκινικές σειρές και τα δείγματα που είχαν ως κοινό χαρακτηριστικό την απουσία του υποδοχέα HER2 στην επιφάνειά τους. Από τη μελέτη αυτή δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση με την παρουσία άλλου ορμονικού υποδοχέα ή την παρουσία φυσιολογικής ή μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, που βρήκαν αυξημένη ανθεκτικότητα των κυττάρων που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα HER2 στη θεραπεία, όχι μόνο στον καρκίνο του μαστού αλλά και σε άλλους τύπους καρκίνου σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες<sup>221,223,240-244</sup>. Τα ακτινοβολημένα κύτταρα μελετήθηκαν και ως προς την κατανομή τους στον κυτταρικό κύκλο. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε σταμάτημα των κυττάρων είτε στη φάση G1 είτε στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου, γεγονός που σημαίνει πως σε όλα τα κύτταρα, η επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας προκάλεσε σημαντικές βλάβες στο γενετικό υλικό, που δεν επέτρεψαν, στις πρώτες ώρες μετά από την ακτινοβολήση τη μετάβαση σε επόμενη φάση της κυτταρικής διαίρεσης. Η μελέτη αυτή δεν οδήγησε σε κάποια συσχέτιση μεταξύ φαινοτυπικών χαρακτηριστικών και μεταβολής της κατανομής των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο. Τα γονίδια τα οποία ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, αλλά και τα σημεία ελέγχου αυτού, είναι διαφορετικά από αυτά της μελέτης μας.

Στη συνέχεια, τα ακτινοβολημένα κύτταρα μελετήθηκαν ως προς την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας hTERT και ως προς τη δραστικότητα της τελομεράσης. Η συγκεκριμένη μελέτη δεν είναι η πρώτη που πραγματοποιείται σε σχέση με τη δραστικότητα της τελομεράσης και την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας hTERT, μετά από ακτινοβολήση κυττάρων. Κύτταρα από διάφορες καρκινικές σειρές που προέρχονται από κακοήθειες διαφορετικών οργάνων έχουν ακτινοβοληθεί στο παρελθόν, συχνά με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε κύτταρα της καρκινικής σειράς τραχήλου της μήτρας HeLa, τα οποία ακτινοβολήθηκαν με διάφορες δόσεις ακτινοβολίας γ, δε βρέθηκαν αλλαγές στη δραστικότητα τελομεράσης μεταξύ μη ακτινοβολημένων κυττάρων και ακτινοβολημένων κυττάρων αμέσως μετά από την επίδραση της ακτινοβολίας, ενώ η δραστικότητα του ενζύμου βρέθηκε 2 έως και 3 φορές πιο αυξημένη στις επόμενες ώρες. Παρόλα αυτά, 120 ώρες μετά από την επίδραση της ακτινοβολίας, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων δραστικότητας της τελομεράσης στα ακτινοβολημένα σε σχέση με τα μη ακτινοβολημένα κύτταρα<sup>158</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε και σε άλλους καρκίνους και καρκινικές σειρές του αιμοποιητικού συστήματος μετά από ακτινοβολήση<sup>245,246</sup>. Σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας προκάλεσαν αύξηση στα



επίπεδα δραστικότητας της τελομεράσης και σταμάτημα των κυττάρων στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, προτείνοντας ότι η αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στο σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου που επάγεται από την ακτινοβόληση<sup>159</sup>. Σε αντίθεση με την αρχική αύξηση της δραστικότητας της τελομεράσης που παρατηρήθηκε στα κύτταρα της καρκινικής σειράς HeLa, η ακτινοβόληση των κυττάρων της καρκινικής σειράς RKO, δεν οδήγησε σε αύξηση αλλά σε μείωση της δραστικότητας του ενζύμου<sup>158</sup>. Στα κύτταρα Raji δε βρέθηκε αλλαγή στα επίπεδα δραστικότητας της τελομεράσης μετά από ακτινοβόληση, ενώ παρατηρήθηκε αναστολή της τελομεράσης σε ακτινοβολημένα κύτταρα Jurkat και CEM-6<sup>247</sup>.

Επομένως, από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα σε ότι αφορά στη μελέτη της έκφρασης και δραστικότητας της τελομεράσης μετά από ακτινοβόληση κυττάρων δεν έχει προκύψει κάποιο σαφές πρότυπο απόκρισης των κυττάρων σε ότι αφορά στην τελομεράση. Έχουν μελετηθεί, ωστόσο, μεμονωμένες κυτταρικές σειρές, διαφορετικές μεταξύ τους και με διαφορετικές μεθόδους ακτινοβόλησης. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και της δραστικότητας της τελομεράσης μετά από ακτινοβόληση κυτταρικών σειρών και δειγμάτων από καρκινικούς ιστούς του μαστού, σε μία προσπάθεια συσχέτισης του κυτταρικού φαινότυπου με την έκφραση και δραστικότητα του σημαντικού αυτού ογκογονιδίου. Παρατηρήθηκε ότι μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας, οι κυτταρικές σειρές και τα κύτταρα των δειγμάτων που υπερεκφράζουν τον HER2 αύξησαν περαιτέρω την έκφραση του υποδοχέα και βρέθηκαν να υπερεκφράζουν την τελομεράση. Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στις κυτταρικές σειρές και τα δείγματα που ήταν αρνητικά ή που εκφράζουν ελάχιστα τον υποδοχέα HER2, όπου διαπιστώθηκε μείωση της έκφρασης της τελομεράσης τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο δραστικότητας του ενζύμου. Όλα τα παραπάνω στοιχεία, τόσο στους πρωτογενείς όγκους, όσο και στις κυτταρικές σειρές και στα καλλιεργημένα κύτταρα από ασθενείς μετά από ακτινοβόληση, υποδεικνύουν αυξημένη συμβολή του υποδοχέα HER2 στη ρύθμιση του γονιδίου της τελομεράσης. Επιπλέον, η παρατήρηση ότι η κυτταρική σειρά MCF-7/HER2, η οποία διαφέρει από τη μητρική κυτταρική σειρά MCF-7 μόνο στην έκφραση του υποδοχέα HER2, έδειξε διαφορετικό προφίλ έκφρασης της hTERT και της δραστικότητας της τελομεράσης μετά από ακτινοβόληση, αποτελεί γεγονός που ενισχύει περαιτέρω την υπόθεση της πιθανής συμβολής του υποδοχέα HER2 στη ρύθμιση της έκφρασης της τελομεράσης.

Ο υποδοχέας HER2 είναι μία καλά χαρακτηρισμένη ογκοπρωτεΐνη, η οποία ενέχεται στον έλεγχο ποικίλων βιολογικών διαδικασιών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετοίκηση (migration) και η απόπτωση<sup>248</sup>. Πρόκειται για έναν υποδοχέα με ιδιότητα φωσφοκινάσης τυροσίνης, ο οποίος συνδέεται με τον επιδερμικό υποδοχέα αυξητικού παράγοντα EGFR, και ο οποίος διάγει το σχηματισμό όγκων στο μαστό, την

ωοθήκη, τον πνεύμονα, το στομάχι, το παχύ έντερο, τον νεφρό, την ουροδόχο κύστη και το σιελογόνο αδέν. Ο υποδοχέας HER2 έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται στο 20 με 30% των ανθρώπινων καρκίνων του μαστού, επηρεάζοντας αρνητικά την πρόγνωση<sup>249,250</sup>. Επιπρόσθετα, επίμυες οι οποίοι εκφράζουν αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα HER2/Neu στον μαζικό αδέν, αναπτύσσουν καρκίνο του μαστού σε υψηλά ποσοστά<sup>251</sup>. Συνακόλουθα, ο υποδοχέας HER2/Neu έχει γίνει ένας από τους βασικότερους στόχους της φαρμακευτικής βιομηχανίας στην προσπάθεια καταπολέμησης του καρκίνου του μαστού<sup>252</sup>.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ρόλος του υποδοχέα HER2 στη ρύθμιση της έκφρασης της hTERT στον καρκίνο του μαστού πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του υποδοχέα HER2 και μελέτη της έκφρασης της hTERT και της δραστηριότητας της τελομεράσης στα θετικά ως προς τον υποδοχέα κύτταρα της καρκινικής σειράς SK-BR-3, καθώς και στα κύτταρα των θετικών ως προς τον υποδοχέα δειγμάτων BC34 και BC35. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης της hTERT και της δραστηριότητας της τελομεράσης μετά από αποσιώπηση του υποδοχέα, γεγονός που υποδεικνύει σημαντική συμβολή του υποδοχέα HER2 στη ρύθμιση του συστήματος hTERT/τελομεράσης. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν βρεθεί και σε πρόσφατες μελέτες, στις οποίες δεν αποσιωπήθηκε η έκφραση του υποδοχέα, αλλά χρησιμοποιήθηκαν μοριακοί ανταγωνιστές εναντίον του μεταγραφικού παράγοντα ER81, ο οποίος έχει βρεθεί να ενεργοποιείται από τον HER2 και να ρυθμίζει την τελομεράση. Η χορήγησή του σε κύτταρα SK-BR-3, οδήγησε σε μείωση της έκφρασης της hTERT<sup>234-236</sup>.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ρόλος του HER2 και της τελομεράσης στην ανθεκτικότητα των κυττάρων που είναι θετικά ως προς τον υποδοχέα HER2, πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του καθενός από τα γονίδια μέσω διαμόλυνσης με λιποσώματα και συνακόλουθη επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας στα θετικά ως προς τον υποδοχέα HER2 κύτταρα SK-BR-3 και στα κύτταρα των δειγμάτων BC34 και BC35. Από την παραπάνω διαδικασία παρατηρήθηκε ότι η αποσιώπηση των HER2 και hTERT προκάλεσε σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με την ίδια την ακτινοβολία, γεγονός που υποδεικνύει τη σημασία της παρουσίας των δύο μορίων για την κυτταρική επιβίωση. Ο συνδυασμός της αποσιώπησης του καθενός από τα δύο γονίδια και της επίδρασης ακτινοβολίας αύξησε σημαντικά τη θνησιμότητα των κυττάρων, ειδικά όταν τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν κατόπιν αποσιώπησης του HER2. Ο φαινότυπος HER2, επομένως είναι σημαντικός για τη βιωσιμότητα των κυττάρων που είναι θετικά ως προς τον υποδοχέα. Η παρατήρηση ότι η αποσιώπηση της τελομεράσης οδηγεί σε μικρότερη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με την αποσιώπηση του υποδοχέα υποδεικνύει αφενός τη μεγάλη σημασία της παρουσίας του υποδοχέα στα κύτταρα και αφετέρου την πιθανή ενεργοποίηση, από τον HER2, πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών, που να

καταλήγουν σε πολλαπλά ογκογονίδια που ενισχύουν τον ανθεκτικό φαινότυπο. Σύμφωνα με τις ως τώρα γνώσεις μας, είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται μελέτη της ανθεκτικότητας στην ακτινοβόληση καρκινικών κυττάρων μαστού μετά από αποσιώπηση του υποδοχέα HER2.

Εκτός από τους ορμονικούς υποδοχείς, και άλλοι παράγοντες, όπως η πρωτεΐνη p53 άγριου τύπου, έχουν αναφερθεί να σχετίζονται με τη ρύθμιση της τελομεράσης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Η κυτταρική απόκριση σε βλάβες στο DNA συμπεριλαμβάνει την επαγωγή της απόπτωσης<sup>253-255</sup>. Παρόλα αυτά, η αδυναμία κάποιων κυττάρων να ανταποκριθούν σωστά σε βλάβες στο DNA μπορεί να οδηγήσει σε γενετικές αλλοιώσεις, οι οποίες στη συνέχεια οδηγούν στην καρκινογένεση. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 διαδραματίζει βασικό ρόλο στη μεθόδευση της αποπτωτικής διαδικασίας μετά από πρόκληση βλαβών στο γονιδίωμα με τρόπο που μπορεί να εξαρτάται ή και να είναι ανεξάρτητος από τη μεταγραφική του δραστηριότητα<sup>256,257</sup>. Απώλεια της λειτουργίας του p53 παρατηρείται σε περισσότερους από τους μισούς ανθρώπινους καρκίνους<sup>258</sup> και σε πολλές περιπτώσεις, η ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων σε αντικαρκινικές ουσίες ή στην επίδραση ακτινοβολίας εξαρτάται από τη λειτουργικότητα ή μη του γονιδίου p53<sup>259,260</sup>. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 άγριου τύπου έχει βρεθεί να μειώνει την ενζυμική δραστηριότητα της τελομεράσης σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών καρκινικών σειρών, ανεξαρτήτως της επίδρασής της στην κυτταρική αύξηση και στην απόπτωση.

Δεδομένου του σημαντικού ρόλου της πρωτεΐνης p53 ως «φύλακα του γονιδιώματος», αλλά και ως πιθανού ρυθμιστή της έκφρασης της τελομεράσης, διερευνήθηκε καταρχήν η επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στην έκφραση της πρωτεΐνης p53 τόσο στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού με p53 άγριου τύπου (MCF-7, MCF-7/HER2 και HBL100) και στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού με διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου και της πρωτεΐνης p53 (MDA-MB-231, SK-BR-3 και BT-474) όσο και στα καλλιεργημένα κύτταρα από δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Στα δείγματα από κύτταρα καρκινικού ιστού ασθενών η αλληλούχιση του γονιδίου p53 έδειξε ότι και τα έξι δείγματα, τα οποία υπέστησαν ακτινοβόληση, έφεραν φυσιολογικά αντίγραφα του γονιδίου, με μόνη εξαίρεση την αλληλουχία του κωδικονίου 72, όπου παρουσιάζεται ένας φυσιολογικός πολυμορφισμός του γονιδίου, ο ρόλος του οποίου στην καρκινογένεση ή τη δράση της πρωτεΐνης p53 που προκύπτει, δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Από τη μελέτη της έκφρασης της p53 βρέθηκε ότι όλα τα κύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη p53 και επιπλέον αυξάνεται η έκφρασή της μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για τη μείωση της έκφρασης της τελομεράσης μετά από ακτινοβόληση στις τρεις από τις έξι κυτταρικές σειρές και στα τρία από τα έξι δείγματα των ασθενών που είχαν κοινό χαρακτηριστικό την υπερέκφραση του

υποδοχέα HER2. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης p53 στον υποκινητή του γονιδίου της hTERT. Μετά από ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης με αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης p53, η πρωτεΐνη p53 δεν ανιχνεύθηκε υπό καμία συνθήκη στον υποκινητή της hTERT. Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη p53 δρα ως καταστολέας για ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων<sup>261,262</sup>. Σε αντίθεση με τη μεταγραφική ενεργοποίηση από την πρωτεΐνη p53, η οποία πραγματοποιείται με απευθείας πρόσδεσή της σε ειδικές αλληλουχίες των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων στόχων<sup>261</sup>, η μεταγραφική καταστολή είναι λιγότερο καλά κατανοητή, καθώς οι υποκινητές των γονιδίων των οποίων η έκφραση καταστέλλεται, δεν περιέχουν κατά κανόνα τέτοιες αλληλουχίες για την πρόσδεση της πρωτεΐνης p53. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η καταστολή της hTERT από την πρωτεΐνη p53 δεν προκύπτει από την άμεση πρόσδεση της p53 στον υποκινητή της hTERT, αλλά από έναν έμμεσο μηχανισμό που ενέχει το μονοπάτι p21/E2F<sup>263</sup>.

Εφόσον η πρωτεΐνη p53 δε βρέθηκε να προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου της hTERT, μελετήθηκε η ικανότητα της μεταλλαγμένης και της άγριου τύπου p53 να επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης p21, τόσο στις κυτταρικές σειρές, όσο και στα δείγματα από ασθενείς με καρκίνο μετά από ακτινοβόληση. Βρέθηκε ότι με τη μοναδική εξαίρεση της κυτταρικής σειράς BT-474 (με μεταλλαγμένη p53), η πρωτεΐνη p53, τόσο η άγριου τύπου όσο και κάποιες μεταλλαγμένες μορφές (μεταλλαγές R280K και R175H των κυτταρικών σειρών MDA-MB-231 και SK-BR-3 αντίστοιχα) είναι σε θέση να επάγουν την έκφραση της πρωτεΐνης p21 μετά από ακτινοβόληση. Τα παραπάνω ευρήματα προτείνουν ότι η εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη p53 επαγωγή της p21 θα μπορούσε να θεωρηθεί υπεύθυνη για την καταστολή της hTERT που παρατηρείται στις κυτταρικές σειρές MCF-7, HBL100 και MDA-MB-231, καθώς επίσης και για τη σχετικά καθυστερημένη αύξηση της έκφρασης της hTERT στην κυτταρική σειρά MCF-7/HER2. Τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p21 στα κύτταρα SK-BR-3 και η πλήρης απουσία έκφρασής της στην κυτταρική σειρά BT-474, θα μπορούσε να θεωρηθεί υπεύθυνη για τη σταθερή αύξηση της έκφρασης της hTERT σε αυτές τις κυτταρικές σειρές μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Παρόλα αυτά, τα ευρήματα από τα δείγματα των ασθενών μετά από ακτινοβόληση δε συνηγορούν υπέρ αυτής της υπόθεσης. Παρότι και τα έξι δείγματα διαθέτουν άγριου τύπου πρωτεΐνη p53 και υπερεκφράζουν τόσο την πρωτεΐνη p53, όσο και την πρωτεΐνη p21, μόνο σε τρία από αυτά παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης της hTERT και της δραστηριότητας της τελομεράσης. Στα δείγματα αυτά, μόνο η παρουσία ή η απουσία του υποδοχέα HER2, φάνηκε σημαντική στη ρύθμιση του γονιδίου της τελομεράσης.

Ο υποκινητής της *hTERT* μελετήθηκε στη συνέχεια ως προς την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων *c-myc*, *mad1* και *max* και ως προς την ακετυλίωση ή μη της

ιστόνης H3 στον υποκινητή της *hTERT*, πριν και μετά από ακτινοβολία των καρκινικών σειρών και των δειγμάτων. Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά, ότι η αύξηση της έκφρασης της *hTERT* σχετίζεται με την πρόσδεση κατά προτίμηση των συμπλόκων *myc/max* στην περιοχή «E-box» στον υποκινητή του γονιδίου της *hTERT* στις ακτινοβολημένες κυτταρικές σειρές και τα ακτινοβολημένα δείγματα που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα HER2, ενώ αντίθετα, η μείωση της έκφρασης της *hTERT* συσχετίστηκε με την πρόσδεση του συμπλόκου *mad1/max* στις κυτταρικές σειρές και τα δείγματα που εκφράζουν ελάχιστα τον υποδοχέα HER2. Ο κρίσιμος ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα *c-myc* και των υπόλοιπων πρωτεϊνών που αποτελούν το δίκτυό του στη ρύθμιση της έκφρασης της *hTERT* έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες και σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου, που συμπεριλαμβάνουν τον καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα και τα λευχαιμικά κύτταρα<sup>110,264-267</sup>. Ωστόσο είναι η πρώτη φορά που ο ρόλος του διερευνήθηκε μετά από ακτινοβολία καρκινικών κυττάρων μαστού. Επίσης, είναι η πρώτη ένδειξη ότι η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα *c-myc* και η μετέπειτα ενεργοποίηση του γονιδίου *hTERT* γίνεται επιλεκτικά σε κάποιους τύπους κυττάρων, συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη σε κύτταρα καρκίνου του μαστού τα οποία υπερεκφράζουν τον υποδοχέα HER2. Η αυξημένη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα *c-myc* στον υποκινητή της *hTERT* μόνο στα κύτταρα τα οποία είναι θετικά ως προς τον υποδοχέα HER2 μετά από ακτινοβολία μας οδήγησε στη μελέτη της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα μετά από ακτινοβολία. Προέκυψε ότι στα HER2+ κύτταρα η ακτινοβολία οδηγεί σε υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος στη συνέχεια ανταγωνίζεται τον *mad1* στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων, όπως και στον υποκινητή της *hTERT*, μεταβάλλοντας τη μεταγραφική τους δραστηριότητα.

Έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση γονιδίων από το μεταγραφικό παράγοντα *myc* μπορεί να εμπλέκει τη συγκέντρωση ακετυλοτρανσφερασών<sup>264</sup>, οι οποίες θα μπορούσαν στη συνέχεια να οδηγήσουν σε αυξημένη ακετυλίωση των ιστονών στην περιοχή του υποκινητή. Στην παρούσα μελέτη, και μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας, δεν παρατηρήθηκε απώλεια, αλλά μείωση του σήματος της ακετυλιωμένης ιστόνης H3 στις κυτταρικές σειρές οι οποίες εκφράζουν ελάχιστα τον υποδοχέα HER2 (MCF-7, MDA-MB-231 και HBL100), στις οποίες είχε παρατηρηθεί μείωση της έκφρασης της *hTERT*, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε για την κυτταρική σειρά MCF-7/HER2, η οποία εκφράζει σταθερά τον υποδοχέα HER2. Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες<sup>264,268</sup>, αλλά η πιθανότητα τα κατασταλτικά σύμπλοκα του *mad* να συγκεντρώνουν τις απακετυλάσεις σε *cis*-ρυθμιστικές περιοχές του υποκινητή της *hTERT* διαφορετικές από τα E-boxes δε μπορεί να αποκλειστεί.

Από τη μέχρι τώρα μελέτη, προέκυψε μία σημαντική αύξηση έκφρασης της *hTERT* μετά από ακτινοβολία των καρκινικών κυττάρων του μαστού που είναι θετικά ως προς τον

υποδοχέα HER2, η οποία συνάδει με υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *myc* και αυξημένη πρόσδεσή του στον υποκινητή του γονιδίου της hTERT. Στη συνέχεια της μελέτης, διερευνήθηκαν τα πιθανά σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέουν τον υποδοχέα HER2 και την τελομεράση, μέσω του *myc*, καθώς δεν έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά άμεση ενεργοποίηση του *c-myc* από τον HER2. Μελετήθηκαν, πιθανοί ρυθμιστές του υποκινητή του γονιδίου του *c-myc*, οι οποίοι επιλέχθηκαν ώστε να αποτελούν ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μόρια που να συνδέονται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα HER2. Τα πιο βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ξεκινούν από τον υποδοχέα HER2 είναι τα μονοπάτια MAPK (mitogen-activated protein kinase) και PI3/AKT<sup>215</sup>. Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3/AKT διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σημάτων από αυξητικούς παράγοντες και τους υποδοχείς τους<sup>216,217</sup>. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης AKT από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα HER2, μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (nuclear factor kappa B). Ο NF-κB είναι μεταγραφικός παράγοντας με πολλά γονίδια στόχους, μεταξύ των οποίων και ο *c-myc*<sup>269</sup>. Επομένως, ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB θα μπορούσε να αποτελεί το μοριακό σύνδεσμο μεταξύ HER2 και *c-myc*, που οδηγεί τελικά στην ενεργοποίηση της τελομεράσης. Η πρόσδεση του NF-κB στον υποκινητή του *c-myc* μελετήθηκε μετά από ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης και μόνο στα θετικά ως προς τον υποδοχέα HER2 κύτταρα παρατηρήθηκε πρόσδεση του NF-κB και επομένως ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3/AKT, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές για τα αρνητικά ως προς τον υποδοχέα HER2 κύτταρα. Σύμφωνα με τις ως τώρα γνώσεις μας, είναι η πρώτη φορά που γίνεται μελέτη του συγκεκριμένου μονοπατιού αυτού, μετά από ακτινοβολήση κυττάρων.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη προτείνει μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης του υποδοχέα HER2 και της έκφρασης του συστήματος hTERT/τελομεράσης στον καρκίνο του μαστού. Προτείνεται για πρώτη φορά, ένα μοντέλο όπου ο υποδοχέας HER2 διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του συστήματος hTERT/τελομεράσης μετά από την επίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε κύτταρα καρκίνου του μαστού, αυξάνοντας παράλληλα την ανθεκτικότητα των κυττάρων στην ακτινοβολήση. Βρέθηκε ότι η υπερέκφραση του υποδοχέα HER2, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3/AKT, ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *c-myc*, που φαίνεται να αποτελεί ένα λειτουργικό μεταγραφικό ρυθμιστή της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας hTERT της τελομεράσης στα ακτινοβολημένα καρκινικά κύτταρα του μαστού, προσδίδοντάς τους ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Πιθανή κλινική εφαρμογή των ευρημάτων της παρούσας μελέτης αποτελεί η χρήση μοριακών ανταγωνιστών έναντι του υποδοχέα HER2, αλλά και του γονιδίου-στόχου του hTERT, ώστε να μειωθεί η ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού κατά την εφαρμογή ενός ακτινοθεραπευτικού σχήματος.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bouffler SD, Blasco MA, Cox R, Smith PJ. Telomeric sequences, radiation sensitivity and genomic instability. *Int J Radiat Biol.* 2001;77:995-1005.
2. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:6622-6626.
3. Greider CW, Blackburn EH. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am.* 1996;274:92-97.
4. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell.* 1999;97:503-514.
5. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell.* 2001;106:661-673.
6. Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66:407-425, table of contents.
7. de Lange T, Shiue L, Myers RM, et al. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol.* 1990;10:518-527.
8. Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol.* 2000;18:2626-2634.
9. Wellinger RJ, Sen D. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer.* 1997;33:735-749.
10. Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science.* 1998;282:1484-1487.
11. Middleman EJ, Choi J, Venteicher AS, Cheung P, Artandi SE. Regulation of cellular immortalization and steady-state levels of the telomerase reverse transcriptase through its carboxy-terminal domain. *Mol Cell Biol.* 2006;26:2146-2159.
12. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature.* 1991;350:569-573.
13. Kirk KE, Harmon BP, Reichardt IK, Sedat JW, Blackburn EH. Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation. *Science.* 1997;275:1478-1481.
14. Smilenov LB, Dhar S, Pandita TK. Altered telomere nuclear matrix interactions and nucleosomal periodicity in ataxia telangiectasia cells before and after ionizing radiation treatment. *Mol Cell Biol.* 1999;19:6963-6971.
15. Smith S, de Lange T. TRF1, a mammalian telomeric protein. *Trends Genet.* 1997;13:21-26.
16. Klapper W, Parwaresch R, Krupp G. Telomere biology in human aging and aging syndromes. *Mech Ageing Dev.* 2001;122:695-712.

17. Allsopp RC, Harley CB. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1995;219:130-136.
18. Vaziri H, Schachter F, Uchida I, et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet.* 1993;52:661-667.
19. O'Connor C. Telomeres of human chromosomes. *Nature Education.* 2008;1.
20. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:72-76.
21. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990;345:458-460.
22. Granger MP, Wright WE, Shay JW. Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002;41:29-40.
23. 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.
24. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: implications for cancer and aging. *Radiat Res.* 2001;155:188-193.
25. Holt SE, Aisner DL, Baur J, et al. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* 1999;13:817-826.
26. Feng J, Funk WD, Wang SS, et al. The RNA component of human telomerase. *Science.* 1995;269:1236-1241.
27. Greider CW. Mammalian telomere dynamics: healing, fragmentation shortening and stabilization. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4:203-211.
28. 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.
29. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell.* 1987;51:887-898.
30. Greider CW, Blackburn EH. Tracking telomerase. *Cell.* 2004;116:S83-86, 81 p following S86.
31. Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L. Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol.* 1998;8:177-180.
32. Soder AI, Hoare SF, Muir S, Going JJ, Parkinson EK, Keith WN. Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene.* 1997;14:1013-1021.
33. Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene.* 2001;269:1-12.
34. Chen JL, Blasco MA, Greider CW. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell.* 2000;100:503-514.



35. 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.
36. 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.
37. Stewart SA, Ben-Porath I, Carey VJ, O'Connor BF, Hahn WC, Weinberg RA. Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nat Genet*. 2003;33:492-496.
38. Nakamura TM, Cech TR. Reversing time: origin of telomerase. *Cell*. 1998;92:587-590.
39. Hossain S, Singh S, Lue NF. Functional analysis of the C-terminal extension of telomerase reverse transcriptase. A putative "thumb" domain. *J Biol Chem*. 2002;277:36174-36180.
40. Huard S, Moriarty TJ, Autexier C. The C terminus of the human telomerase reverse transcriptase is a determinant of enzyme processivity. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:4059-4070.
41. Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell*. 2004;119:355-368.
42. Lue NF. A physical and functional constituent of telomerase anchor site. *J Biol Chem*. 2005;280:26586-26591.
43. Harrington L, Zhou W, McPhail T, et al. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev*. 1997;11:3109-3115.
44. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*. 1997;90:785-795.
45. Stanta G, Bonin S, Niccolini B, Raccanelli A, Baralle F. Catalytic subunit of telomerase expression is related to RNA component expression. *FEBS Lett*. 1999;460:285-288.
46. Chan SR, Blackburn EH. Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004;359:109-121.
47. Cao Y, Li H, Deb S, Liu JP. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene*. 2002;21:3130-3138.
48. Forsythe HL, Elmore LW, Jensen KO, Landon MR, Holt SE. Retroviral-mediated expression of telomerase in normal human cells provides a selective growth advantage. *Int J Oncol*. 2002;20:1137-1143.

49. Smith LL, Collier HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol.* 2003;5:474-479.
50. Sharma GG, Gupta A, Wang H, et al. hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene.* 2003;22:131-146.
51. Anderson CJ, Hoare SF, Ashcroft M, Bilsland AE, Keith WN. Hypoxic regulation of telomerase gene expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncogene.* 2006;25:61-69.
52. Greider CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:337-365.
53. Buys CH. Telomeres, telomerase, and cancer. *N Engl J Med.* 2000;342:1282-1283.
54. Mason PJ. Stem cells, telomerase and dyskeratosis congenita. *Bioessays.* 2003;25:126-133.
55. 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.
56. Wright WE, Shay JW. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol.* 1992;27:383-389.
57. Bryce LA, Morrison N, Hoare SF, Muir S, Keith WN. Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia.* 2000;2:197-201.
58. Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood.* 1995;85:2315-2320.
59. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:6476-6481.
60. Paul-Samojedny M, Witek A, Samojedny A, Witkowska A, Wilczok T. Human telomerase RNA as endogenous control in endometrial tissue. *Int J Gynecol Cancer.* 2005;15:343-348.
61. Xu D, Gruber A, Bjorkholm M, Peterson C, Pisa P. Suppression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in differentiated HL-60 cells: regulatory mechanisms. *Br J Cancer.* 1999;80:1156-1161.
62. Savoysky E, Yoshida K, Ohtomo T, et al. Down-regulation of telomerase activity is an early event in the differentiation of HL60 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226:329-334.
63. Guilleret I, Benhattar J. Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325:1037-1043.
64. Janknecht R. On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Lett.* 2004;564:9-13.

65. Kanaya T, Kyo S, Hamada K, et al. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res.* 2000;6:1239-1247.
66. Lin SY, Elledge SJ. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell.* 2003;113:881-889.
67. Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev.* 1998;12:1073-1085.
68. Fujimoto K, Kyo S, Takakura M, et al. Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:2557-2562.
69. Oh S, Song Y, Yim J, Kim TK. The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J Biol Chem.* 1999;274:37473-37478.
70. Oh S, Song YH, Yim J, Kim TK. Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene.* 2000;19:1485-1490.
71. Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, et al. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol.* 2000;20:3764-3771.
72. Krishnan V, Wang X, Safe S. Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 1994;269:15912-15917.
73. Wang Z, Kyo S, Takakura M, et al. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* 2000;60:5376-5381.
74. 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.
75. Ikeda N, Uemura H, Ishiguro H, et al. Combination treatment with 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 9-cis-retinoic acid directly inhibits human telomerase reverse transcriptase transcription in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2003;2:739-746.
76. Pendino F, Dudognon C, Delhommeau F, et al. Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death. *Oncogene.* 2003;22:9142-9150.
77. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:827-837.

78. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:127-137.
79. Maida Y, Kyo S, Kanaya T, et al. Direct activation of telomerase by EGF through Ets-mediated transactivation of TERT via MAP kinase signaling pathway. *Oncogene.* 2002;21:4071-4079.
80. Ferber MJ, Montoya DP, Yu 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.
81. Gozuacik D, Murakami Y, Saigo K, et al. Identification of human cancer-related genes by naturally occurring Hepatitis B Virus DNA tagging. *Oncogene.* 2001;20:6233-6240.
82. Horikawa I, Barrett JC. cis-Activation of the human telomerase gene (hTERT) by the hepatitis B virus genome. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1171-1173.
83. Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene.* 2003;22:3911-3916.
84. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000;16:168-174.
85. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002;16:6-21.
86. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:143-153.
87. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3:415-428.
88. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000;403:41-45.
89. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001;293:1074-1080.
90. Roberts CW, Orkin SH. The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:133-142.
91. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116:281-297.
92. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 1997;13:335-340.
93. Ng HH, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9:158-163.
94. Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell.* 1990;62:503-514.
95. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349:2042-2054.

96. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:988-993.
97. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992;69:915-926.
98. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99:247-257.
99. Robertson AK, Geiman TM, Sankpal UT, Hager GL, Robertson KD. Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and Dnmt3a in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322:110-118.
100. Bechter OE, Eisterer W, Dlaska M, Kuhr T, Thaler J. CpG island methylation of the hTERT promoter is associated with lower telomerase activity in B-cell lymphocytic leukemia. *Exp Hematol*. 2002;30:26-33.
101. 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.
102. Guilleret I, Yan 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*. 2002;101:335-341.
103. Guilleret I, Benhattar J. Demethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter reduced hTERT expression and telomerase activity and shortened telomeres. *Exp Cell Res*. 2003;289:326-334.
104. Kumakura S, Tsutsui TW, Yagisawa J, Barrett JC, Tsutsui T. Reversible conversion of immortal human cells from telomerase-positive to telomerase-negative cells. *Cancer Res*. 2005;65:2778-2786.
105. Lopatina NG, Poole JC, Saldanha SN, et al. Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306:650-659.
106. Quante M, Heeg S, von Werder A, et al. Differential transcriptional regulation of human telomerase in a cellular model representing important genetic alterations in esophageal squamous carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2005;26:1879-1889.
107. Widschwendter A, Muller HM, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2004;10:565-571.
108. Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beijersbergen RL, Weinberg RA. Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res*. 2000;60:537-541.

109. Hou M, Wang X, Popov N, et al. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A derepresses the telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in human cells. *Exp Cell Res.* 2002;274:25-34.
110. Xu D, Popov N, Hou M, et al. Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:3826-3831.
111. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet.* 2000;1:11-19.
112. Feuer EJ, Wun LM, Boring CC, Flanders WD, Timmel MJ, Tong T. The lifetime risk of developing breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:892-897.
113. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2007;608:1-22.
114. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res.* 2008;10:R65.
115. Μάλλιου Σ AN, Παυλίδης Ν, Καππιάς Α, Κριαράς Ι, Γερουλάνος Σ. Η ιστορία του καρκίνου του μαστού. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής.* 2006;23:260-278.
116. Brody LC, Biesecker BB. Breast cancer susceptibility genes. BRCA1 and BRCA2. *Medicine (Baltimore).* 1998;77:208-226.
117. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 1997;33:787-791.
118. Carey LA, Hedican CA, Henderson GS, et al. Careful histological confirmation and microdissection reveal telomerase activity in otherwise telomerase-negative breast cancers. *Clin Cancer Res.* 1998;4:435-440.
119. Yashima K, Milchgrub S, Gollahon LS, et al. Telomerase enzyme activity and RNA expression during the multistage pathogenesis of breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1998;4:229-234.
120. Bieche I, Nogues C, Paradis V, et al. Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res.* 2000;6:452-459.
121. Hiyama E, Saeki T, Hiyama K, et al. Telomerase activity as a marker of breast carcinoma in fine-needle aspirated samples. *Cancer.* 2000;90:235-238.
122. Poremba C, Shroyer KR, Frost M, et al. Telomerase is a highly sensitive and specific molecular marker in fine-needle aspirates of breast lesions. *J Clin Oncol.* 1999;17:2020-2026.
123. Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3823-3826.

124. Hoos A, Hepp HH, Kaul S, Ahlert T, Bastert G, Wallwiener D. Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int J Cancer*. 1998;79:8-12.
125. Mokbel KM, Parris CN, Ghilchik M, Amerasinghe CN, Newbold RF. Telomerase activity and lymphovascular invasion in breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2000;26:30-33.
126. Clark GM, Osborne CK, Levitt D, Wu F, Kim NW. Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:1874-1881.
127. Loveday RL, Greenman J, Drew PJ, Monson JR, Kerin MJ. Genetic changes associated with telomerase activity in breast cancer. *Int J Cancer*. 1999;84:516-520.
128. Herbert BS, Wright WE, Shay JW. Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2001;3:146-149.
129. Veronesi U, Salvadori B, Luini A, et al. Conservative treatment of early breast cancer. Long-term results of 1232 cases treated with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy. *Ann Surg*. 1990;211:250-259.
130. Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52:65-77.
131. Osteen RT, Steele GD, Jr., Menck HR, Winchester DP. Regional differences in surgical management of breast cancer. *CA Cancer J Clin*. 1992;42:39-43.
132. Σανιδάς Η ΓΒ, Βαλασιάδου Κ. Η θεραπεία του καρκίνου του μαστού με διατήρηση του οργάνου. *Θέματα Γενικής Χειρουργικής*. 1997.
133. Munster PN, Hudis CA. Adjuvant therapy for resectable breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1999;13:391-413, vi.
134. Miller KD, Sledge GW, Jr. The role of chemotherapy for metastatic breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1999;13:415-434.
135. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 1995;333:1456-1461.
136. Vilcoq JR, Calle R, Stacey P, Ghossein NA. The outcome of treatment by tumorectomy and radiotherapy of patients with operable breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1981;7:1327-1332.
137. Solin LJ, Fowble B, Schultz DJ, Goodman RL. Age as a prognostic factor for patients treated with definitive irradiation for early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989;16:373-381.

138. Vicini FA, Eberlein TJ, Connolly JL, et al. The optimal extent of resection for patients with stages I or II breast cancer treated with conservative surgery and radiotherapy. *Ann Surg.* 1991;214:200-204; discussion 204-205.
139. Overgaard M, Hansen PS, Overgaard J, et al. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial. *N Engl J Med.* 1997;337:949-955.
140. Larson D, Weinstein M, Goldberg I, et al. Edema of the arm as a function of the extent of axillary surgery in patients with stage I-II carcinoma of the breast treated with primary radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1986;12:1575-1582.
141. Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2000;21:397-404.
142. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science.* 2001;291:1284-1289.
143. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature.* 2003;421:436-440.
144. Chan SW, Blackburn EH. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene.* 2002;21:553-563.
145. Lewis LK, Resnick MA. Tying up loose ends: nonhomologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* 2000;451:71-89.
146. Pandita TK. ATM function and telomere stability. *Oncogene.* 2002;21:611-618.
147. Rotman G, Shiloh Y. ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene.* 1999;18:6135-6144.
148. Martin SG, Laroche T, Suka N, Grunstein M, Gasser SM. Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell.* 1999;97:621-633.
149. Mills KD, Sinclair DA, Guarente L. MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell.* 1999;97:609-620.
150. Hsu HL, Gilley D, Blackburn EH, Chen DJ. Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:12454-12458.
151. Samper E, Goytisolo FA, Slijepcevic P, van Buul PP, Blasco MA. Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep.* 2000;1:244-252.
152. Haber JE. The many interfaces of Mre11. *Cell.* 1998;95:583-586.
153. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Shay JW. Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia.* 2001;3:17-26.



154. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266:2011-2015.
155. Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, Morin GB, DePinho RA. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*. 1998;16:1723-1730.
156. Pandita TK, Hall EJ, Hei TK, et al. Chromosome end-to-end associations and telomerase activity during cancer progression in human cells after treatment with alpha-particles simulating radon progeny. *Oncogene*. 1996;13:1423-1430.
157. Pandita TK, Roti Roti JL. Role of telomerase in radiocurability (review). *Oncol Rep*. 2003;10:263-270.
158. Sawant SG, Gregoire V, Dhar S, et al. Telomerase activity as a measure for monitoring radiocurability of tumor cells. *Faseb J*. 1999;13:1047-1054.
159. Wang X, Liu Y, Chow LS, et al. Regulation of telomerase activity by gamma-radiation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Anticancer Res*. 2000;20:433-437.
160. Krupp G, Klapper W, Parwaresch R. Cell proliferation, carcinogenesis and diverse mechanisms of telomerase regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57:464-486.
161. White LK, Wright WE, Shay JW. Telomerase inhibitors. *Trends Biotechnol*. 2001;19:114-120.
162. Melana SM, Holland JF, Pogo BG. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Clin Cancer Res*. 1998;4:693-696.
163. Multani AS, Furlong C, Pathak S. Reduction of telomeric signals in murine melanoma and human breast cancer cell lines treated with 3'-azido-2'-3'-dideoxythymidine. *Int J Oncol*. 1998;13:923-925.
164. Aldous WK, Marean AJ, DeHart MJ, Matej LA, Moore KH. Effects of tamoxifen on telomerase activity in breast carcinoma cell lines. *Cancer*. 1999;85:1523-1529.
165. Choi SH, Kang HK, Im EO, et al. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by retinoic acids. *Int J Oncol*. 2000;17:971-976.
166. Bacchetti S. Telomere maintenance in tumour cells. *Cancer Surv*. 1996;28:197-216.
167. Caplen NJ. A new approach to the inhibition of gene expression. *Trends Biotechnol*. 2002;20:49-51.
168. Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002;418:244-251.
169. Hudson DF, Morrison C, Ruchaud S, Earnshaw WC. Reverse genetics of essential genes in tissue-culture cells: 'dead cells talking'. *Trends Cell Biol*. 2002;12:281-287.
170. Sharp PA. RNA interference--2001. *Genes Dev*. 2001;15:485-490.
171. Sullenger BA, Gilboa E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature*. 2002;418:252-258.

172. Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science*. 2002;296:1263-1265.
173. Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*. 2001;107:297-307.
174. Jagus R, Joshi B, Barber GN. PKR, apoptosis and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:123-138.
175. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002;296:550-553.
176. Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci*. 2001;114:4557-4565.
177. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*. 2002;16:948-958.
178. Sui G, Soohoo C, Affar el B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:5515-5520.
179. Yu JY, DeRuijter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:6047-6052.
180. Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, et al. Linkage of angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism to the progression of human prostate cancer. *J Pathol*. 2004;202:330-335.
181. Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, et al. Steroid hormone genotypes ARStu1 and ER325 are linked to the progression of human prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003;141:91-96.
182. Pinto D, Vasconcelos A, Costa S, et al. HER2 polymorphism and breast cancer risk in Portugal. *Eur J Cancer Prev*. 2004;13:177-181.
183. Santos AM, Sousa H, Pinto D, et al. Linking TP53 codon 72 and P21 nt590 genotypes to the development of cervical and ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2006;42:958-963.
184. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*. 2002;19:607-614.
185. Packer BR, Yeager M, Burdett L, et al. SNP500Cancer: a public resource for sequence validation, assay development, and frequency analysis for genetic variation in candidate genes. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:D617-621.

186. Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:4961.
187. Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene.* 2006;25:1602-1611.
188. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol.* 1999;19:1092-1100.
189. Nordgard SH, Alnaes GI, Hihn B, et al. Pathway based analysis of SNPs with relevance to 5-FU therapy: relation to intratumoral mRNA expression and survival. *Int J Cancer.* 2008;123:577-585.
190. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 2003;33:357-365.
191. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res.* 2000;77:81-137.
192. Sifuentes Alvarez A, Reyes Romero M. [Risk factors for cervico-uterine cancer associated to HPV: p53 codon 72 polymorphism in women attending hospital care]. *Ginecol Obstet Mex.* 2003;71:12-15.
193. Buyru N, Tigli H, Dalay N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep.* 2003;10:711-714.
194. Huang XE, Hamajima N, Katsuda N, et al. Association of p53 codon Arg72Pro and p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 genetic polymorphisms with the risk of Japanese breast cancer. *Breast Cancer.* 2003;10:307-311.
195. Keshava C, Frye BL, Wolff MS, McCanlies EC, Weston A. Waf-1 (p21) and p53 polymorphisms in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:127-130.
196. Mabrouk I, Baccouche S, El-Abed R, et al. No evidence of correlation between p53 codon 72 polymorphism and risk of bladder or breast carcinoma in Tunisian patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1010:764-770.
197. Noma C, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Association of p53 genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women. *Cancer Lett.* 2004;210:197-203.
198. Ohayon T, Gershoni-Baruch R, Papa MZ, Distelman Menachem T, Eisenberg Barzilai S, Friedman E. The R72P P53 mutation is associated with familial breast cancer in Jewish women. *Br J Cancer.* 2005;92:1144-1148.

199. Papadakis EN, Dokianakis DN, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Commun*. 2000;3:389-392.
200. Sjalander A, Birgander R, Hallmans G, et al. p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. *Carcinogenesis*. 1996;17:1313-1316.
201. Suspitsin EN, Buslov KG, Grigoriev MY, et al. Evidence against involvement of p53 polymorphism in breast cancer predisposition. *Int J Cancer*. 2003;103:431-433.
202. Wang-Gohrke S, Rebbeck TR, Besenfelder W, Kreienberg R, Runnebaum IB. p53 germline polymorphisms are associated with an increased risk for breast cancer in German women. *Anticancer Res*. 1998;18:2095-2099.
203. Weston A, Pan CF, Ksieski HB, et al. p53 haplotype determination in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997;6:105-112.
204. Papadakis ED, Soultzis N, Spandidos DA. Association of p53 codon 72 polymorphism with advanced lung cancer: the Arg allele is preferentially retained in tumours arising in Arg/Pro germline heterozygotes. *Br J Cancer*. 2002;87:1013-1018.
205. Shen H, Zheng Y, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. P53 codon 72 polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Lett*. 2002;183:123-130.
206. Marin MC, Jost CA, Brooks LA, et al. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet*. 2000;25:47-54.
207. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ*. 2003;10:431-442.
208. Drummond SN, De Marco L, Pordeus Ide A, Barbosa AA, Gomez RS. TP53 codon 72 polymorphism in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2002;22:3379-3381.
209. Helland A, Langerod A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Borresen-Dale AL. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature*. 1998;396:530-531; author reply 532.
210. Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, et al. Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5098-5103.
211. Bonafe M, Ceccarelli C, Farabegoli F, et al. Retention of the p53 codon 72 arginine allele is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2003;9:4860-4864.
212. Goode EL, Dunning AM, Kuschel B, et al. Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. *Cancer Res*. 2002;62:3052-3057.

213. Han W, Kang D, Park IA, et al. Associations between breast cancer susceptibility gene polymorphisms and clinicopathological features. *Clin Cancer Res.* 2004;10:124-130.
214. Langerod A, Bukholm IR, Bregard A, et al. The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:1684-1688.
215. Asanuma H, Torigoe T, Kamiguchi K, et al. Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65:11018-11025.
216. Nakashio A, Fujita N, Rokudai S, Sato S, Tsuruo T. Prevention of phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt survival signaling pathway during topotecan-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2000;60:5303-5309.
217. Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997;91:231-241.
218. Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol.* 2002;64:883-888.
219. Gee JM, Nicholson RI. Expanding the therapeutic repertoire of epidermal growth factor receptor blockade: radiosensitization. *Breast Cancer Res.* 2003;5:126-129.
220. Albert JM, Kim KW, Cao C, Lu B. Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:1183-1189.
221. Tiezzi DG, Andrade JM, Ribeiro-Silva A, Zola FE, Marana HR, Tiezzi MG. HER-2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination. *BMC Cancer.* 2007;7:36.
222. Nishimura R, Arima N. Is triple negative a prognostic factor in breast cancer? *Breast Cancer.* 2008;15:303-308.
223. Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res.* 2001;3:385-389.
224. Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Sherman ME. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:1558-1568.
225. Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 1997;57:3071-3078.
226. Belkacemi Y, Gligorov J, Ozsahin M, et al. Concurrent trastuzumab with adjuvant radiotherapy in HER2-positive breast cancer patients: acute toxicity analyses from the French multicentric study. *Ann Oncol.* 2008;19:1110-1116.

227. Pietras RJ, Poen JC, Gallardo D, Wongvipat PN, Lee HJ, Slamon DJ. Monoclonal antibody to HER-2/neureceptor modulates repair of radiation-induced DNA damage and enhances radiosensitivity of human breast cancer cells overexpressing this oncogene. *Cancer Res.* 1999;59:1347-1355.
228. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:926-935.
229. Zhan Q, Fan S, Bae I, et al. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene.* 1994;9:3743-3751.
230. Sugrue MM, Shin DY, Lee SW, Aaronson SA. Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:9648-9653.
231. Marchetti P, Cannita K, Ricevuto E, et al. Prognostic value of p53 molecular status in high-risk primary breast cancer. *Ann Oncol.* 2003;14:704-708.
232. Saretzki G, Petersen S, Petersen I, Kolble K, von Zglinicki T. hTERT gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2002;176:81-91.
233. Zhang A, Zheng C, Lindvall C, et al. Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Res.* 2000;60:6230-6235.
234. Dwyer J, Li H, Xu D, Liu JP. Transcriptional regulation of telomerase activity: roles of the the Ets transcription factor family. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1114:36-47.
235. Goueli BS, Janknecht R. Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol Cell Biol.* 2004;24:25-35.
236. Vageli D, Ioannou MG, Koukoulis GK. Transcriptional activation of hTERT in breast carcinomas by the Her2-ER81-related pathway. *Oncol Res.* 2009;17:413-423.
237. Xiao Y, Gao X, Gannot G, et al. Quantitation of HER2 and telomerase biomarkers in solid tumors with IgY antibodies and nanocrystal detection. *Int J Cancer.* 2008;122:2178-2186.
238. Kyo S, Takakura M, Kanaya T, et al. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res.* 1999;59:5917-5921.
239. Strati A, Papoutsi Z, Lianidou E, Moutsatsou P. Effect of ellagic acid on the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) alpha+beta+ transcript in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. *Clin Biochem.* 2009;42:1358-1362.

240. Akabani G, Carlin S, Welsh P, Zalutsky MR. In vitro cytotoxicity of <sup>211</sup>At-labeled trastuzumab in human breast cancer cell lines: effect of specific activity and HER2 receptor heterogeneity on survival fraction. *Nucl Med Biol.* 2006;33:333-347.
241. Kim YC, Park KO, Kern JA, et al. The interactive effect of Ras, HER2, P53 and Bcl-2 expression in predicting the survival of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 1998;22:181-190.
242. Salter KH, Acharya CR, Walters KS, et al. An integrated approach to the prediction of chemotherapeutic response in patients with breast cancer. *PLoS One.* 2008;3:e1908.
243. Way TD, Kao MC, Lin JK. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2004;279:4479-4489.
244. Wu K, Wang C, D'Amico M, et al. Flavopiridol and trastuzumab synergistically inhibit proliferation of breast cancer cells: association with selective cooperative inhibition of cyclin D1-dependent kinase and Akt signaling pathways. *Mol Cancer Ther.* 2002;1:695-706.
245. Hyeon Joo O, Hande MP, Lansdorp PM, Natarajan AT. Induction of telomerase activity and chromosome aberrations in human tumour cell lines following X-irradiation. *Mutat Res.* 1998;401:121-131.
246. Leteurtre F, Li X, Gluckman E, Carosella ED. Telomerase activity during the cell cycle and in gamma-irradiated hematopoietic cells. *Leukemia.* 1997;11:1681-1689.
247. Lin Z, Lim S, Viani MA, Sapp M, Lim MS. Down-regulation of telomerase activity in malignant lymphomas by radiation and chemotherapeutic agents. *Am J Pathol.* 2001;159:711-719.
248. Liang K, Lu Y, Jin W, Ang KK, Milas L, Fan Z. Sensitization of breast cancer cells to radiation by trastuzumab. *Mol Cancer Ther.* 2003;2:1113-1120.
249. Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1198:165-184.
250. Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology.* 2001;61 Suppl 2:1-13.
251. Hutchinson JN, Muller WJ. Transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncogene.* 2000;19:6130-6137.
252. Yu D, Hung MC. Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene.* 2000;19:6115-6121.
253. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell.* 1994;78:539-542.

254. Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*. 1997;89:1845-1853.
255. Wang JY. Cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10:240-247.
256. Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. 1996;10:1054-1072.
257. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88:323-331.
258. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253:49-53.
259. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*. 1993;362:849-852.
260. Fan S, el-Deiry WS, Bae I, et al. p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res*. 1994;54:5824-5830.
261. el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*. 1992;1:45-49.
262. Zhao R, Gish K, Murphy M, et al. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev*. 2000;14:981-993.
263. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*. 1983;11:1475-1489.
264. Cole MD, McMahon SB. The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene*. 1999;18:2916-2924.
265. Wu KJ, Grandori C, Amacker M, et al. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet*. 1999;21:220-224.
266. Cosgrave N, Hill AD, Young LS. Growth factor-dependent regulation of survivin by c-myc in human breast cancer. *J Mol Endocrinol*. 2006;37:377-390.
267. Fujiki T, Miura T, Maura M, et al. TAK1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene*. 2007;26:5258-5266.
268. McMahon SB, Wood MA, Cole MD. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol*. 2000;20:556-562.
269. Baud V, Karin M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8:33-40.