ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΤΗΣ 5ΗΣ ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΥ 1996

ΠΡΟΕΔΡΙΑ ΙΩΑΝΝΟΥ ΠΕΣΜΑΖΟΓΛΟΥ

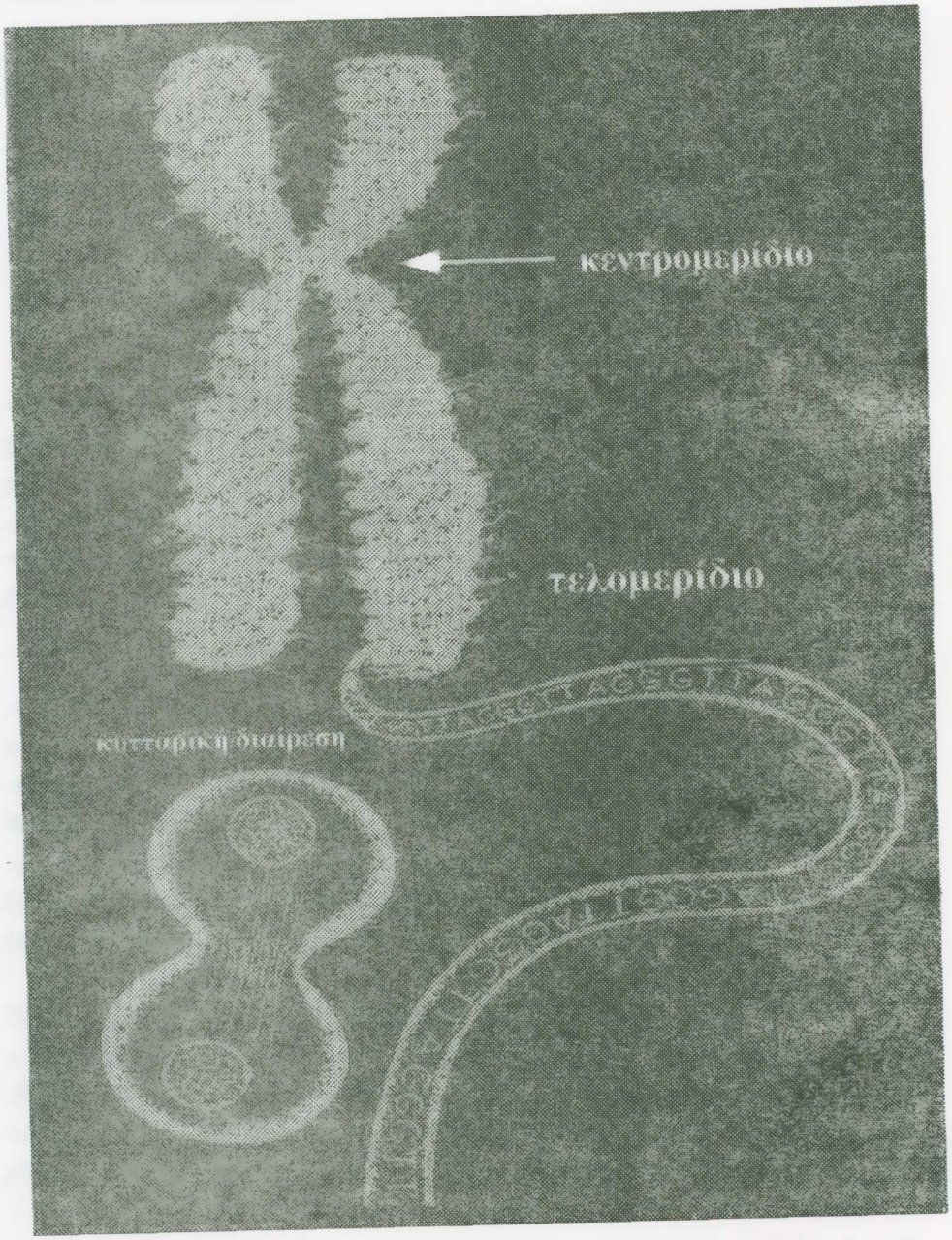
ΙΑΤΡΙΚΗ.— **Μηχανισμὸς ἐπιμηκύνσεως τῶν τελομεριδίων τῶν χρωμοσωμάτων τῶν καρκινικῶν κυττάρων ὁ ὁποῖος εἶναι ἀνεξάρτητος ἀπὸ τὴ δράση τῆς τελομεράσης καὶ σχετίζεται μὲ ἀνευπλοειδία, ἀπώλεια τῆς ἑτεροζυγωτίας καὶ ἑτερογένεια τοῦ ὄγκου**, ὑπὸ Σ. Γκάγκου, Δ. Ἠλιόπουλου, Σ. Τσελένη-Μπαλαφούτα, Μ. Ἀγαπητοῦ, Χ. Ἀνταχόπουλου, Α. Κωστάκη, Π. Καραγιαννάκου, καὶ Γρ. Δ. Σκαλκέα*, διὰ τοῦ Ἀκαδημαϊκοῦ κ. Γρ. Δ. Σκαλκέα.

Κάθε ἕνα ἀπὸ τὰ 23 χρωμοσώματα τὰ ὁποῖα συνιστοῦν τὸν καρυότυπο 46 χρωμοσωμάτων τοῦ ἀνθρώπου, ἀποτελεῖται ἀπὸ δύο πανομοιότυπα δίκλωνα μόρια DNA, τὰ ὁποῖα συνδέονται μεταξύ τους σὲ μικροσκοπικὰ ὁρατὴ περίσφιξη ποὺ ὀνομάζεται κεντρομερίδιο. Τὰ ἄκρα τῶν μορίων αὐτῶν δὲν εἶναι ὁρατὰ στὸ συμβατικὸ μικροσκόπιο. Εἶναι μονόκλωνα καὶ ἀποτελοῦνται ἀπὸ ἐπαναλαμβανόμενη ἀλληλουχία 5600 ἕως 8500 βάσεων τοῦ ἐξανουκλεοτιδίου TTAGGG, ἡ ὁποία συνδέεται μὲ εἰδικὲς τελομεριδιακὲς πρωτεΐνες καὶ παρουσιάζει ἰδιόμορφη τεταρτοταγὴ δομὴ (Allsopp et al., 1992).

Τελομερίδια ὀνομάζονται τὰ φυσικὰ ἄκρα τῶν χρωμοσωμάτων (Σχ. 1). Ἡ ὀνομασία του προέρχεται ἀπὸ τὶς ἑλληνικὲς λέξεις **τέλος** καὶ **μέρος** καὶ ἐμφανίζεται γιὰ πρώτη φορὰ στὴ βιβλιογραφία τοῦ 1938 ἀπὸ τὸν πρωτοπόρο τῆς γενετικῆς H. J. Muller. Σύμφωνα μὲ τὴν B. McClintock (1941), τὰ τελομερίδια παίζουν σημαντικὸ ρόλο στὴν προστασία τῶν χρωμοσωμάτων ἀπὸ ἀνεπιθύμητους ἀνασυνδυασμοὺς καὶ μεταλλάξεις (Counter et al., 1992).

---

* S. GAGOS, D. ILLIOPOULOS, S. TSELENI-BALAFOUTA, M. AGAPITOS, CH. ANTAHOPOULOS, A. KOSTAKIS, P. KARAYANNAKOS and GR. SKALKEAΣ, **A telomerase independent chromosomal mechanism of telomere elongation related to aneuploidy, loss of heterozygosity, and tumor heterogeneity.**



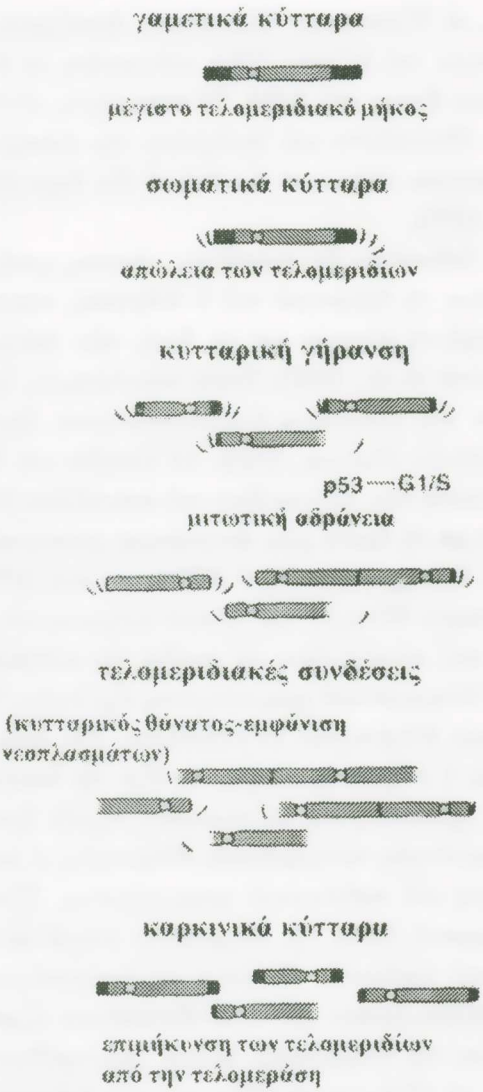
Σχῆμα 1: Τὰ τελομερίδια εἶναι μονόκλωνες ἐπαναλαμβανόμενες ἀλληλουχίες τοῦ ἑξανουκλεοτιδίου TTAGGG. Συνδεδεμένα μὲ εἰδικὲς πρωτεΐνες βρίσκονται στὰ ἄκρα τῶν χρωμοσωμάτων καὶ προστατεύουν τὸ γραμμικὸ μόριο τοῦ DNA ἀπὸ ἀνεπιθύμητους ἀνασυνδυασμοὺς καὶ μεταλλάξεις. Σὲ κάθε κυτταρικὴ διαίρεση τὰ σωματικὰ κύτταρα χάνουν ἕνα μικρὸ τμῆμα τῆς τελομεριδιακῆς ἀλληλουχίας. (τροποποιημένο ἀπὸ New York Times).

Ἀπὸ τὸ 1973, οἱ Watson καὶ Olovnikov, ἐργαζόμενοι ἀνεξαρτήτως, διαπίστωσαν τὴν ἀδυναμία τοῦ ἐνζύμου DNA πολυμεράση νὰ ἀντιγράψει πλήρως τὸ 3′ ἄκρο τῆς δίκλωνης ἕλικας τοῦ DNA. Ὁ περιορισμὸς αὐτός, ἔκτοτε εἶναι γνωστὸς ὡς «ἀρχὴ τοῦ Olovnikov» καὶ ὑποδηλώνει τὴν ἀνεπάρκεια τοῦ μηχανισμοῦ ἀντιγραφῆς νὰ πολυμερίσει πλήρως τὸ ἕνα ἀπὸ τὰ δύο ἄκρα τοῦ γραμμικοῦ χρωμοσώματος (Greider, 1990).

Εἶναι ἰδιαίτερα ἐνδιαφέρον ὅτι πρωτόζωα, μύκητες, φυτά, βακτήρια καὶ ἀνώτεροι ὀργανισμοὶ ὅπως τὰ θηλαστικὰ καὶ ὁ ἄνθρωπος, παρουσιάζουν σημαντικὲς ὁμοιότητες ὅσον ἀφορᾶ τὴ σύσταση καὶ τὴ δομὴ τῶν τελομεριδίων τῶν χρωμοσωμάτων τους (Meyene et al., 1990). Στοὺς περισσότερους ὀργανισμούς, τὰ τελομερίδια ἀποτελοῦνται ἀπὸ μονόκλωνα ἐπαναλαμβανόμενα ὀλιγονουκλεοτίδια πλούσια σὲ γουανίνη (πολύ-G) (Zakian. 1995). Οἱ Greider καὶ Blackburn τὸ 1987, ἔδειξαν ὅτι ἡ ἐπιμήκυνση τῶν τελομεριδίων τοῦ πρωτοζώου *Tetrahymena* ἐπιτυγχάνεται ἐνζυματικῶς μὲ τὴ δράση μίας ἀντίστροφης μεταγραφάσης τὴν ὁποία ὀνόμασαν **τελομεράση**. Τρία χρόνια μετά, οἱ Wilkie καὶ συν. (1990) παρατήρησαν σὲ ἀσθενὴ μὲ α-θαλασσαιμία ἔλλειμμα τοῦ τελικοῦ τμήματος τοῦ μικροῦ βραχίονα τοῦ χρωμοσώματος 16 ποὺ περιελάμβανε τὰ γονίδια τῆς α-σφαιρίνης. Ἀξιοσημείωτο ἦταν ὅτι τὸ ἄκρο τοῦ ἐλλειμματικοῦ χρωμοσώματος εἶχε ἐπιδιορθωθεῖ μὲ τὴν προσθήκη τῶν τελομεριδιακῶν ἀλληλουχιῶν (TTAGGG)n. Τὸν ἑπόμενο χρόνο, ὁ Morin (1991) ἀπέδειξε πὼς ἡ ἀνθρώπινη τελομεράση εἶχε τὴν ἱκανότητα νὰ ἀναγνωρίσει τὶς ἀλληλουχίες ποὺ βρίσκονται στὸ συγκεκριμένο σημεῖο θραύσεως τοῦ 16p, καὶ νὰ προσθέσει τὶς ἀπαραίτητες τελομεριδιακὲς ἀλληλουχίες οἱ ὁποῖες ἦταν ἀναγκαῖες γιὰ τὴ σταθεροποίηση τοῦ παθολογικοῦ χρωμοσώματος. Εἶναι πολὺ πιθανὸν ὅτι παρόμοια σταθεροποιητικὴ δράση τῆς τελομεράσης μπορεῖ νὰ λαμβάνει χώρα καὶ σὲ ἄλλα σύνδρομα ποὺ ὀφείλονται σὲ τελικὰ χρωμοσωμικὰ μικροελλείμματα ὅπως εἶναι τὰ σύνδρομα Miller-Dieker καὶ Wolf-Hirschhorn (Lamp et al., 1993).

Ἡ ζωτικὴ δράση τῆς τελομεράσης, ἔκτοτε παρατηρήθηκε σὲ πολλοὺς ἄλλους ὀργανισμοὺς καὶ ἀπὸ τὸ 1994 πιστοποιήθηκε καὶ στὸν ἄνθρωπο (Kim et al., 1994). Ἡ ἀνθρώπινη τελομεράση εἶναι ἕνα λειτουργικὸ σύμπλοκο πρωτεϊνῶν καὶ RNA, τὴ δράση τοῦ ὁποίου μποροῦμε νὰ ἀνιχνεύσουμε ἄμεσα καὶ ἔμμεσα σὲ γαμετικὰ κύτταρα καὶ κακοήθεις ὄγκους (Morin, 1989, Zakian, 1995). Ὁ πλήρης συνδυασμὸς τῶν ὑπευθύνων γονιδίων δὲν ἔχει ἀκόμη ἀποκαλυφθεῖ (Jazwinski, 1996).

Πρόσφατα, ἀπομονώθηκε καὶ κλωνίσθηκε ἕνα ἀπὸ τὰ γονίδια ποὺ κωδικοποιεῖ πρωτεΐνη ἡ ὁποία συνδέεται μὲ τὸ ριβονουκλεϊκο-πρωτεϊνικὸ σύμπλοκο τῆς τελομεράσης τῶν θηλαστικῶν (Harrigton et al., 1997). Ἡ πρωτεΐνη αὐτὴ ὀνομάσθηκε TP1 (telomerase-associated protein 1), καὶ παρουσιάζει μεγάλη ὁμοιότητα μὲ



Σχῆμα 2: Ἡ τελομεριδιακὴ θεωρία τοῦ καρκίνου. Στὸν ἄνθρωπο τὰ γαμετικὰ κύτταρα θεωροῦνται ὅτι διαθέτουν τὸ μέγιστο τελομεριδιακὸ μῆκος. Κατὰ τὴν ἀνάπτυξη τοῦ ὀργανισμοῦ, μὲ τὶς ἀλλεπάλληλες κυτταρικὲς διαιρέσεις, σταδιακὰ χάνεται σημαντικὸ μέρος ἀπὸ τὰ τελομερίδια καὶ τὰ χρωμοσώματα τῶν σωματικῶν κυττάρων παραμένουν "ἀκάλυπτα". Σ' αὐτὸ τὸ στάδιο τὰ περισσότερα σωματικὰ κύτταρα παύουν νὰ διαιροῦνται. Ἂν τὰ κύτταρα ξεφύγουν ἀπὸ τοὺς μηχανισμοὺς ἐλέγχου (p53), τότε παρουσιάζουν παθολογικὴ κυτταρικὴ διαίρεση καὶ συχνὰ ἐμφανίζουν τελομεριδιακὲς συνδέσεις καὶ δικεντρικὰ χρωμοσώματα. Στὰ καρκινικὰ κύτταρα τὰ ὁποῖα παρουσιάζουν ἱκανότητες συνεχοῦς πολλαπλασιασμοῦ, ὑφίστανται μηχανισμοὶ ποὺ διατηροῦν τὸ τελομεριδιακὸ μῆκος σταθερὸ καὶ συντηροῦν τὶς δυνατότητες κυτταρικῆς διαίρεσης. (τροποποιημένο ἀπὸ Titia de Lange, 1994).

τὴν πρωτεΐνη p80 ἡ ὁποία εἶναι βασικὸ συστατικὸ τῆς τελομεράσης τῆς *Tetrahymena*. Τὸ πρωτόζωο αὐτὸ εἶναι ὁ μοναδικὸς ὀργανισμὸς στὸν ὁποῖο ἔχει ἀπομονωθεῖ καὶ χαρακτηρισθεῖ πλήρως ἡ βιοχημικὴ δομὴ τοῦ ριβονουκλεϊνο-πρωτεϊνικοῦ συμπλόκου τῆς τελομεράσης. Ἡ τελομεράση τῆς *Tetrahymena* εἶναι σύμπλοκο ποὺ περιλαμβάνει ἕνα μόριο RNA καὶ δύο πρωτεΐνες τὶς p80 καὶ p95. Ἡ p80 συνδέεται εἰδικὰ μὲ τὸ μόριο τοῦ RNA, ἐνῶ ἡ p95 ἀλληλεπιδρᾶ μὲ τὸ μονόκλωνο τελομεριδιακὸ DNA (Collins et al., 1995).

Τὸ 1991 ὁ Hurley διατύπωσε τὴν τελομεριδιακὴ θεωρία τῆς γηράνσεως. Κατὰ τὴ θεωρία αὐτή, ἐκτὸς ἀπὸ τὰ γαμετικὰ κύτταρα, τὰ περισσότερα σωματικὰ κύτταρα, σὲ κάθε νέα κυτταρικὴ διαίρεση, χάνουν μέρος γενετικοῦ ὑλικοῦ ἀπὸ τὰ ἄκρα τῶν χρωμοσωμάτων τους. Στὸν ἄνθρωπο, ἔχει ὑπολογισθεῖ ὅτι περίπου 30 βάσεις τελομεριδιακοῦ μήκους χάνονται κάθε ἔτος. Τὰ σωματικὰ κύτταρα γερνοῦν. Ὕστερα ἀπὸ ἕναν ὁρισμένο καὶ πεπερασμένο ἀριθμὸ κυτταρικῶν διαιρέσεων, τὸ κύτταρο ἔχει πλέον χάσει μεγάλο μέρος τῆς τελομεριδιακῆς του ἀλληλουχίας καὶ τὰ ἄκρα τῶν χρωμοσωμάτων παραμένουν «ἀκάλυπτα». Τὰ κύτταρα τότε εἰσέρχονται σὲ μία παρατεταμένη κατάσταση ἠρεμίας, δὲν διαιροῦνται καὶ σταδιακὰ πεθαίνουν (Hurley et al., 1990).

Ὁ ἀριθμὸς τῶν κυτταρικῶν διαιρέσεων ποὺ μποροῦν φυσιολογικὰ κύτταρα νὰ πραγματοποιήσουν *in vitro*, δὲν εἶναι ἀπεριόριστος. Γιὰ παράδειγμα, ἰνοβλάστες ποὺ ἀπομονώνονται ἀπὸ βιοψίες φυσιολογικοῦ δέρματος, ἐμφανίζουν διαφορετικὲς δυνατότητες πολλαπλασιασμοῦ σὲ κυτταρικὴ καλλιέργεια, οἱ ὁποῖες μάλιστα εἶναι ἀνάλογες μὲ τὴν ἡλικία τοῦ δότη. Ἀπὸ τὸ 1959, τὰ πειράματα τῶν Moorehead καὶ Hayflick, ἔδειξαν ὅτι κύτταρα τὰ ὁποῖα προέρχονται ἀπὸ βιοψίες δέρματος παιδιῶν, ἂν τεθοῦν σὲ κυτταρικὲς καλλιέργειες, μποροῦν νὰ διπλασιάσουν τὸν ἀριθμό τους περίπου 100 ἢ περισσότερες φορὲς ἐνῶ τὰ ἀντίστοιχα κύτταρα ἀπὸ ἕναν ἄνθρωπο 60 χρονῶν δὲν πολλαπλασιάζονται παρὰ μόνον 20 φορὲς (Hayflick, 1965). Φαίνεται λοιπὸν ὅτι τὰ σωματικὰ κύτταρα διαθέτουν ἕνα ἐγγενὲς βιολογικὸ ρολόϊ ποὺ ἔχει τὴ δυνατότητα νὰ μετρᾶ τὸν ἀριθμὸ τῶν κυτταρικῶν διπλασιασμῶν (Hurley, 1991).

Τί συμβαίνει ὅταν τὰ κύτταρα παύουν νὰ διαιροῦνται; Τὰ κύτταρα αὐτὰ δὲν πεθαίνουν, περνοῦν ὅμως σὲ μιὰ φάση ἠρεμίας κατὰ τὴν ὁποία συνεχίζουν νὰ ἐπιτελοῦν τὶς φυσιολογικές τους λειτουργίες μέχρις ὅτου πεθάνουν. Ἡ κατάσταση αὐτὴ ὀνομάζεται κυτταρικὸς μαρασμὸς (senescence). Τὰ κύτταρα ποὺ γερνοῦν παρουσιάζουν παθολογικὴ κυτταρικὴ διαίρεση (Shay et al., 1992). Συχνὰ παρατηροῦνται τυχαῖες συνδέσεις μεταξὺ τῶν ἄκρων διαφορετικῶν χρωμοσωμάτων (τελομεριδιακὲς συνδέσεις). Οἱ διαταραχὲς αὐτὲς προκαλοῦν ἐκτεταμένη γενετικὴ ἀστάθεια ἡ ὁποία τὶς περισσότερες φορὲς μπορεῖ νὰ ὁδηγήσει σὲ κυτταρικὸ θάνατο καὶ

σὲ ὁρισμένες περιπτώσεις σὲ νεοπλασία (Hastie et al., 1990, Shay et al., 1993, de Lange, 1994).

Στὴ δεκαετία ποὺ διανύουμε, ἡ διεθνὴς ἔρευνα κατὰ τοῦ καρκίνου ἔχει στρέψει τὴν προσοχή της στὰ τελομερίδια τῶν χρωμοσωμάτων. Στὰ καρκινικὰ κύτταρα, ἐκτὸς ἀπὸ τὴν ἐνεργοποίηση τῶν εἰδικῶν γονιδίων ποὺ συνδέονται μὲ τὸν ἀνεξέλεγκτο πολλαπλασιασμὸ (ὀγκογονίδια), ἢ τὴν ἀπενεργοποίηση τῶν ὀγκοκατασταλτικῶν γονιδίων, ὑφίστανται μηχανισμοὶ διατηρήσεως τοῦ μήκους τῶν τελομεριδίων οἱ ὁποῖοι συντηροῦν τὴν ἱκανότητα συνεχοῦς πολλαπλασιασμοῦ (Zakian, 1995) (Σχ. 2). Ἡ μελέτη τῶν μηχανισμῶν αὐτῶν μπορεῖ νὰ προσφέρει οὐσιαστικὲς λύσεις στὴν καταπολέμηση τοῦ καρκίνου, ἀλλὰ καὶ δυνατότητες διαρκοῦς ἀνανεώσεως τῶν φυσιολογικῶν ἱστῶν.

Ἕνας μεγάλος ἀριθμὸς προσφάτων δημοσιεύσεων παρέχει πολὺ σημαντικὰ στοιχεῖα. Οἱ περισσότερες μελέτες βασίζονται σὲ ἔμμεση διαπίστωση τῆς δράσης τῆς τελομεράσης ποὺ πραγματοποιεῖται κυρίως μὲ δύο τρόπους. Ἡ πρώτη μέθοδος ποὺ ὀνομάζεται TRF (Terminal Restriction Fragment), ἐπιτρέπει τὴ μέτρηση τοῦ συνολικοῦ τελομεριδικοῦ μήκους σὲ ἕνα δεῖγμα κυτταρικοῦ ὑλικοῦ. Ἡ μέθοδος TRF βασίζεται στὴ χρήση εἰδικῶν περιοριστικῶν ἐνζύμων ποὺ ἀναγνωρίζουν καὶ κόβουν τὸ DNA στὶς τελομεριδικὲς ἀλληλουχίες. Ἀκολουθεῖ μεταφορὰ κατὰ Southern, γιὰ τὴν ἀξιολόγηση τοῦ τελομεριδικοῦ μήκους ἑνὸς ἱστοῦ ἢ ἑνὸς κυτταρικοῦ πληθυσμοῦ (Rogalla et al., 1996). Ἡ δεύτερη μέθοδος βασίζεται στὴν ἁλυσιδωτὴ ἀντίδραση τῆς DNA πολυμεράσης (PCR), ὀνομάζεται TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) καὶ ἐπιτρέπει τὴν ἀνίχνευση τῆς δράσεως τοῦ ἐνζύμου μὲ ἐξαιρετικὴ εὐαισθησία (Kim et al., 1994).

Αὐξημένη ἔκφραση τῆς τελομεράσης ἔχει περιγραφεῖ σὲ πολλοὺς τύπους μετασχηματισμένων κυτταρικῶν σειρῶν (Kim et al., 1994, Small et al., 1996), καὶ κακοήθων νεοπλασμάτων συμπεριλαμβανομένων λευχαιμιῶν (Shay et al., 1996a, Shay καὶ Wright, 1996b), λεμφωμάτων (Norrback et al., 1996), ἡπατοκυτταρικῶν καρκίνων (Nouso et al., 1996), ὄγκων τοῦ μαστοῦ (Sugino et al., 1996), τοῦ παχέος ἐντέρου (Li et al., 1996) καὶ τῶν νεφρῶν (Mehle et al., 1996).

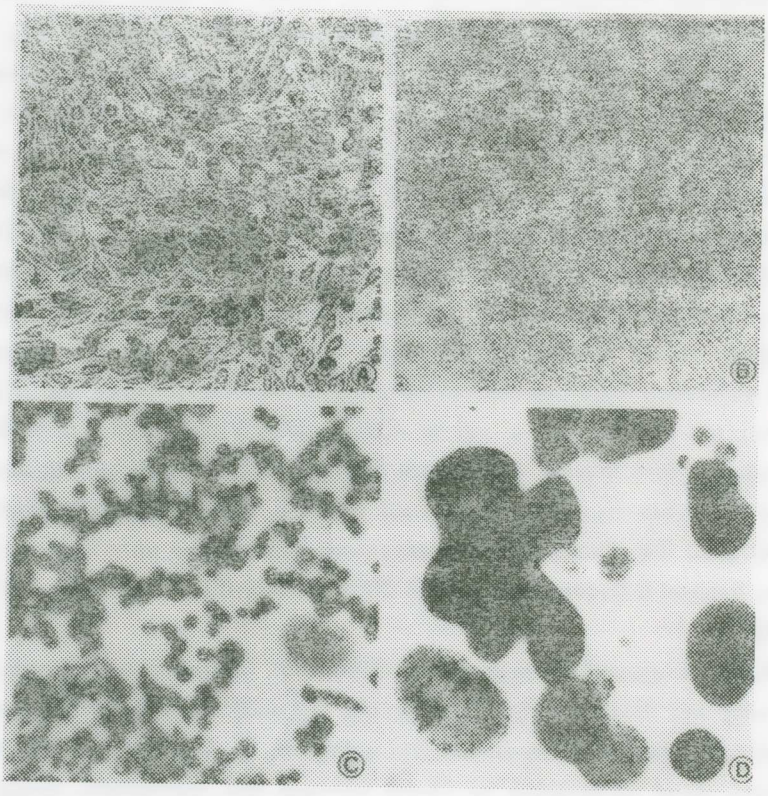
Παρὰ τὴ γενικευμένη διαπίστωση ὅτι ἕνα ἀπὸ τὰ πιὸ κοινὰ χαρακτηριστικὰ ὅλων τῶν κακοήθων νεοπλασμάτων εἶναι ἡ ἔκφραση τῆς τελομεράσης (Axelrod, 1996), ἀξίζει νὰ σημειωθεῖ ὅτι ἔχουν περιγραφεῖ ἀρκετὲς ἀθάνατες καρκινικὲς κυτταρικὲς σειρὲς οἱ ὁποῖες ἂν καὶ διατηροῦν τὴ δυνατότητα συνεχοῦς πολλαπλασιασμοῦ, δὲν παρουσιάζουν ἀνιχνεύσιμα ἐπίπεδα τοῦ ἐνζύμου (Bryan et al., 1995). Οἱ Gupta καὶ συν. (1996), ἀναφέρουν ὅτι τὸ 50% τῶν ρετινοβλαστωμάτων ποὺ ἐξετάσθηκαν μὲ τὴν ὑπερευαίσθητη μέθοδο TRAP δὲν ἐκφράζει τελομεράση.

Δραστηριότητα τῆς τελομεράσης σὲ φυσιολογικὰ σωματικὰ κύτταρα ἔχει περιγραφεῖ ἀπὸ τοὺς Morrison καὶ συν. (1996). Ἡ δράση τοῦ ἐνζύμου σχετίσθηκε ἄμεσα μὲ τὴν ἀναγεννητικὴ ἱκανότητα ἀνθρωπίνων κυττάρων τοῦ αἱμοποιητικοῦ καὶ τοῦ ἀνοσοποιητικοῦ συστήματος (Weng et al., 1996). Ἡ ὁμάδα τοῦ Morrison, διαπίστωσε χαμηλὴ μέν, ἀλλὰ ἀνιχνεύσιμη δράση τῆς τελομεράσης στὸ 70% τῶν βλαστικῶν κυττάρων τοῦ μυελοῦ τῶν ὀστῶν. Ἀνάλογα ἀποτελέσματα προέκυψαν ὅταν μελετήθηκαν καὶ ἄλλοι ἱστοὶ ποὺ εἶναι γνωστὸ ὅτι ἔχουν αὐξημένες ἀναγεννητικὲς δυνατότητες ὅπως εἶναι π.χ. τὰ κύτταρα τῆς ἐπιδερμίδας (Yasumoto et al., 1996).

Σὲ ἀντίθεση πρὸς τὰ φυσιολογικά, τὰ καρκινικὰ κύτταρα ἔχουν θεωρητικά, ἀπεριόριστες ἱκανότητες πολλαπλασιασμοῦ. Ἂν μάλιστα ἐγκλιματισθοῦν σὲ πειραματικὲς συνθῆκες κυτταρικῆς καλλιεργείας, τὰ κύτταρα αὐτὰ καθίστανται «ἀθάνατα», δηλαδὴ πολλαπλασιάζονται διαρκῶς καὶ ἀποτελοῦν τὶς λεγόμενες συνεχεῖς κυτταρικὲς σειρές. Κύτταρα τῶν συνεχῶν κυτταρικῶν σειρῶν ἂν τροφοδοτοῦνται μὲ τὰ κατάλληλα θρεπτικὰ συστατικὰ μποροῦν νὰ ἀναπτύσσονται ἐπ' ἀόριστον, νὰ ψύχονται καὶ νὰ ἀποψύχονται καὶ νὰ «ζοῦν» πολλὰ χρόνια μετὰ ἀπὸ τὸ θάνατο τοῦ φυσικοῦ τους δότη (Smith καὶ Pereira Smith, 1996). Ἕνα τέτοιο παράδειγμα ἀποτελοῦν οἱ κυτταρικὲς σειρὲς SW480 καὶ SW620, τὶς ὁποῖες χρησιμοποιήσαμε στὶς μελέτες μας. Τὰ κύτταρα αὐτὰ προέρχονται ἀπὸ ἀσθενῆ μὲ ἀδενοκαρκίνωμα τοῦ παχέος ἐντέρου ὁ ὁποῖος ἀπεβίωσε τὸ 1973 (Leibovitz et al., 1976, Leibovitz et al., 1979).

Κατὰ τὸ χρονικὸ διάστημα 1991-1993, στὸ Ἐργαστήριο Πειραματικῆς Χειρουργικῆς καὶ Χειρουργικῆς Ἐρεύνης τῆς Ἰατρικῆς Σχολῆς τοῦ Πανεπιστημίου Ἀθηνῶν, τὸ ὁποῖο διευθύνεται ἀπὸ τὸν καθηγητὴ Π. Γ. Καραγιαννάκο, πραγματοποιήσαμε σειρὰ πειραμάτων σὲ ζῶντα κύτταρα τῆς κυτταρικῆς σειρᾶς SW480. Σκοπὸς τῆς ἐρευνητικῆς μας προσπάθειας ὑπῆρξε ἡ μελέτη τῆς ἐπιδράσεως τοῦ ἀνοσοκατασταλτικοῦ φαρμάκου Κυκλοσπορίνη-Α, στὴν πειραματικὴ ἀνάπτυξη καρκίνου τοῦ παχέος ἐντέρου *in vitro* σὲ ἀθυμικοὺς ποντικοὺς καὶ *in vitro* σὲ κυτταρικὲς καλλιέργειες. Σὲ κάθε στάδιο τῆς μελέτης μας, ἡ ἐπίδραση τῆς κυκλοσπορίνης ἐπὶ τοῦ γενετικοῦ ὑλικοῦ τῶν καρκινικῶν κυττάρων ἐλέγχθηκε μὲ τὴ μέθοδο τῆς ἀνάλυσης τοῦ καρυοτύπου (Σκαλκέας καὶ συν., 1993).

Ἡ ἐξέταση τῶν χρωμοσωμάτων ἐπέτρεψε τὴ συνολικὴ ἐκτίμηση τῶν μεταβολῶν τοῦ γενετικοῦ ὑλικοῦ τῶν καρκινικῶν κυττάρων ἀλλὰ καὶ τῆς ἐκτεταμένης ἑτερογένειας τοῦ ὄγκου. Σὲ κάθε χρονικὴ στιγμὴ τῆς ἀναπτύξεως τῆς SW480, οἱ διαφορετικοὶ κυτταρικοὶ ὑποπληθυσμοὶ ἦταν δυνατὸ νὰ ταυτοποιηθοῦν μὲ κριτήριο ἰδιότυπες χρωμοσωμικὲς διαταραχὲς οἱ ὁποῖες ἦταν χαρακτηριστικὲς γιὰ κάθε ὑποκλῶνο (Φωτ. 5). Ὑπὸ τὶς συνθῆκες τῶν πειραμάτων μας, ὁρισμένοι κυτταρικοὶ πλη-



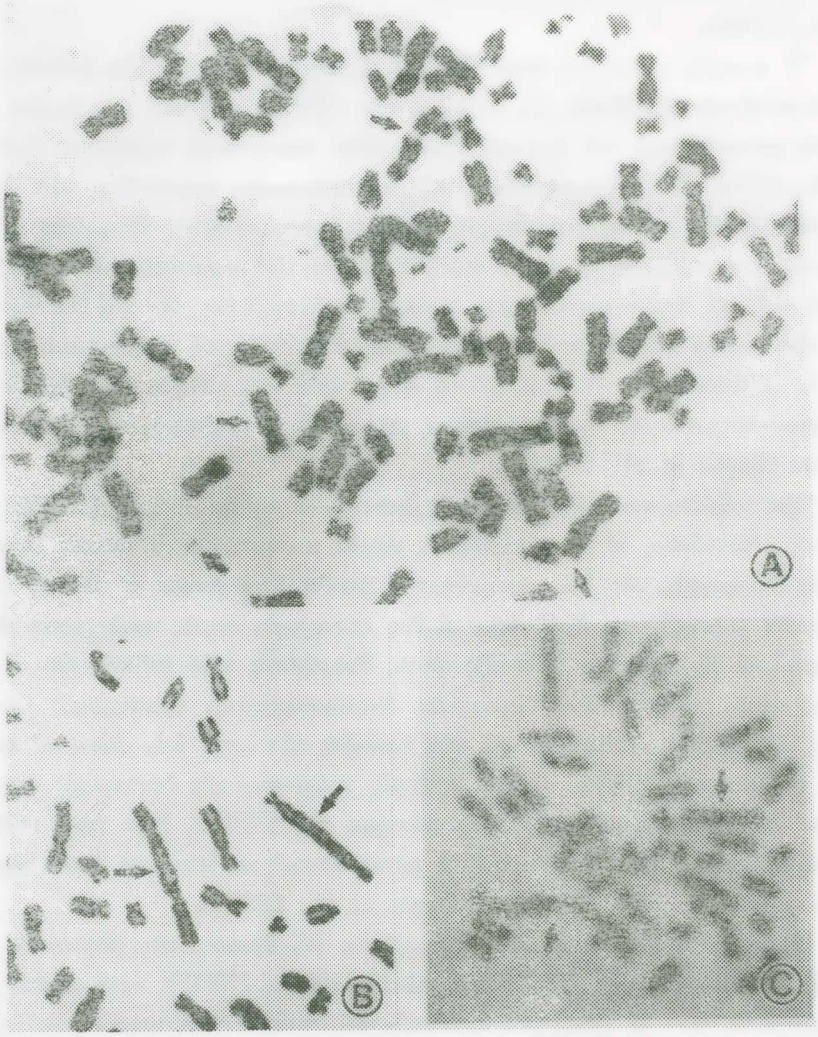
Φωτογραφία 1: Ἡ Μορφολογικὴ ἑτερογένεια σὲ μικροφωτογραφίες καρκινικῶν κυττάρων τῶν κυτταρικῶν σειρῶν SW480 καὶ SW620, σὲ κυτταρικὲς καλλιέργειες.
A: κύτταρα τῆς SW480 ὅπως ἀναπτύσσονται σὲ μονόστιβη κυτταροκαλλιέργεια. B: κύτταρα τῆς SW620 ποὺ παρουσιάζουν σφαιρικὴ μορφολογία. C: στοιχεῖα κυτταρικοῦ θανάτου σὲ καλλιέργεια τῆς SW480 (τὰ κύτταρα αὐτὰ ἐμφάνισαν πολὺ ὑψηλὰ ποσοστὰ τελομεριδιακῶν συνδέσεων καὶ δικεντρικῶν χρωμοσωμάτων) (A, B, C: X 100).
D: Στοιχεῖα κυτταρικοῦ θανάτου σὲ μεγαλύτερη μεγέθυνση (X 1.000). Ἀλλαγὲς στὴ μορφολογία καὶ τὴ δομὴ τῆς χρωματίνης καθὼς καὶ δημιουργία μικροπυρήνων (Χρώση Giemsa) (ἀπὸ: Gagos et. al., 1996).

θυσμοὶ φάνηκε ὅτι ἦταν ἐπιλεκτικὰ πλεονεκτικότεροι. Οἱ ἰδιόμορφες χρωμοσωμικὲς διαταραχὲς ποὺ παρουσίαζαν αὐτοὶ οἱ ὑποπληθυσμοί, συσχετίσθηκαν μὲ γονιδιακὲς περιοχὲς ὑπεύθυνες γιὰ τὴν ἐπιθετικὴ συμπεριφορὰ τοῦ νεοπλάσματος (Gagos et al., 1995b).

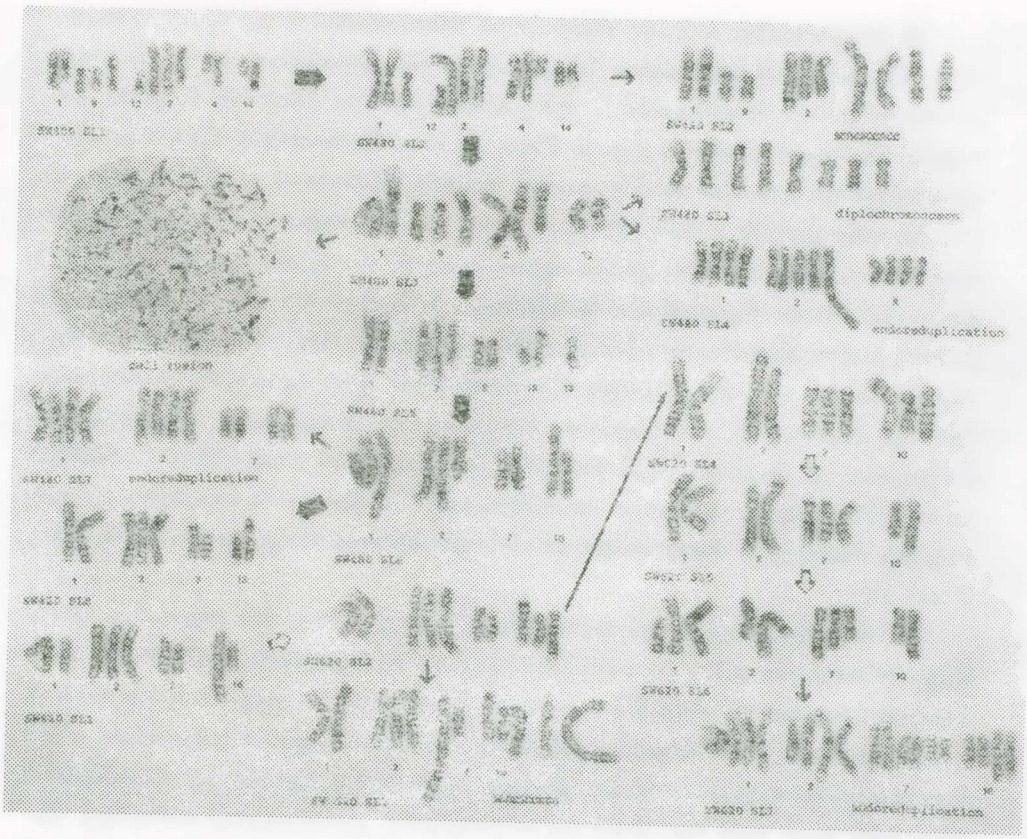
Ἡ συνεχὴς κυτταρικὴ σειρὰ SW620, προέρχεται ἀπὸ τὸν ἴδιο ἀσθενῆ ἀπὸ τὸν ὁποῖο προέκυψε ἡ SW480. Τὰ κύτταρα τῆς SW620 προῆλθαν ἀπὸ βιοψία λεμφογενοῦς μεταστάσεως τοῦ ἀρχικοῦ ὄγκου στὴν περιτοναϊκὴ κοιλότητα (Leibovitz et al., 1976). Γιὰ νὰ συγκρίνουμε τοὺς καρυοτυπικοὺς χαρακτῆρες τῶν δύο κυτταρικῶν σειρῶν καὶ νὰ ἐντοπίσουμε σταθερὲς χρωμοσωμικὲς ἀνωμαλίες οἱ ὁποῖες πιθανὸν νὰ σχετίζονται μὲ μεταστατικὴ ἱκανότητα τῶν καρκινικῶν κυττάρων (Gagos et al. 1995a), πραγματοποιήσαμε σειρὰ ἀνακαλλιεργειῶν τῶν δύο ἀνωτέρω κυτταρικῶν σειρῶν στὸ Ἐργαστήριο Κυτταρικῆς Γενετικῆς τοῦ ἀντικαρκινικοῦ κέντρου M. D. Anderson τῶν Η.Π.Α., μὲ τὴ συνεργασία τοῦ καθηγητῆ κ. Sen Pathak. Τὰ ἀποτελέσματά μας ἐπιβεβαίωσαν τὴ μονοκλωνικὴ προέλευση τῶν δύο κυταρικῶν σειρῶν (Gagos et al., 1995b).

Ἐπὶ τρία ἔτη συνεχοῦς κυτταρικῆς ἀναπτύξεως καὶ παρὰ τὴν ἐκτεταμένη καρυοτυπικὴ ἑτερογένεια, οἱ δύο κυτταρικὲς σειρὲς παρουσίασαν ὁρισμένες χαρακτηριστικὲς διαταραχὲς τῶν χρωμοσωμάτων οἱ ὁποῖες ἦταν κοινὲς σὲ ὅλα τὰ κύτταρα τὰ ὁποῖα μελετήθηκαν. Καθ' ὅσον οἱ δύο κυτταρικὲς σειρὲς προέρχονται ἀπὸ δύο διαφορετικὰ ἐξελικτικὰ στάδια τῆς νόσου, θεωρήσαμε πολὺ πιθανὸν ὅτι οἱ ταυτόσημες αὐτὲς χρωμοσωμικὲς ἀνωμαλίες ἀντιπροσωπεύουν πρωτογενεῖς χρωμοσωμικὲς ἀναδιατάξεις ὑπεύθυνες γιὰ τὴν κακοήθη ἐξαλλαγὴ ἑνὸς ἀδενικοῦ κυττάρου ἀπὸ τὸ ἐντερικὸ ἐπιθήλιο. Ὅσες σταθερὲς χρωμοσωμικὲς διαταραχὲς παρατηρήθηκαν ἀποκλειστικὰ καὶ σὲ ὅλα τὰ κύτταρα τῆς SW620, ἦταν πολὺ πιθανὸ ὅτι ἀντιπροσωπεύουν τὸν καρυότυπο ἑνὸς μεταστατικοῦ κυττάρου τὸ ὁποῖο ἀπετέλεσε τὴ δευτεροπαθῆ ἑστία τοῦ ὄγκου (Gagos et al., 1995b).

Ἡ γενετικὴ ἀστάθεια καὶ ἡ ἑτερογένεια τοῦ ὄγκου διατηρήθηκαν σὲ ὅλα τὰ στάδια τῆς μελέτης μας. Τὰ κύτταρα τῶν SW480 καὶ SW620, κατὰ τὴ συνεχῆ τους ἀνάπτυξη *in vitro* σὲ ἀθυμικοὺς ποντικοὺς καὶ *in vitro* σὲ κυτταρικὲς καλλιέργειες, ἔδειξαν ὅτι ἀκολουθοῦν πανομοιότυπους μηχανισμοὺς κλωνικῆς ἐξελίξεως. Οἱ παρατηρήσεις μας αὐτές, δημοσιεύθηκαν πρόσφατα μὲ τὸν τίτλο «Στοιχεῖα κυτταρικοῦ μαρασμοῦ καὶ ἑνὸς μηχανισμοῦ ἐξελίξεως τῶν καρκινικῶν κυττάρων ὁ ὁποῖος ὁδηγεῖ σὲ συνεχῆ κυτταρικὸ πολλαπλασιασμό, ἀπώλεια τῆς ἑτεροζυγωτίας, καὶ ἑτερογένεια τοῦ ὄγκου-μελέτες σὲ δύο «ἀθάνατες» κυτταρικὲς σειρὲς καρκίνου τοῦ παχέος ἐντέρου» (Gagos et al., 1996).



Φωτογραφία 2: Χρωμοσωμικὰ στοιχεῖα κυτταρικοῦ μαρασμοῦ σὲ κύτταρα τῆς SW480. A: Τελομεριδιακὲς συνδέσεις (Giemsa, X 1.000). B: Δικεντρικὰ χρωμοσώματα (Giemsa, X 1.000). C: Ἀσταθὲς τρικεντρικὸ χρωμόσωμα (βέλος) σὲ κύτταρο τοῦ ἐξελικτικῶς ἀρχαιότερου ὑποπληθυσμοῦ τῆς μελέτης μας ποὺ χαρακτηρίζεται ἀπὸ τὴ μετατόπιση t(1;9)(q11;q12) (βέλος) (C-Banding, X 1.000). (ἀπὸ: Gagos et. al., 1996)



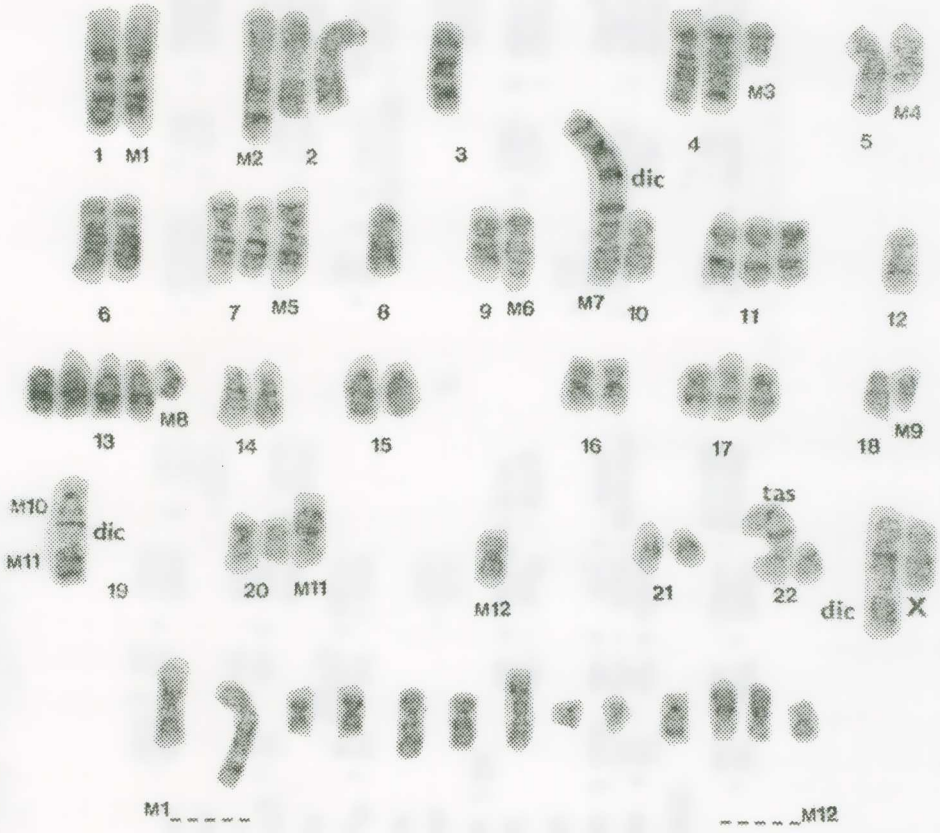
Φωτογραφία 3: Τμήματα καρυοτύπων ἀπὸ τὶς δύο κυτταρικὲς σειρὲς τῆς μελέτης μας (G-Banding, X 1.000). Οἱ διάφοροι ὑποπληθυσμοὶ χαρακτηρίζονται ἀπὸ τὰ γράμματα SL (sidelines). Ἡ κλωνικὴ ἐξέλιξη τῆς SW480 ὑποδεικνύεται ἀπὸ τὰ μεγάλα μαῦρα βέλη. Ἡ ἐξέλιξη τῆς SW620 εἰκονίζεται ἀπὸ τὰ λευκὰ βέλη καὶ τὸ μακρὺ βέλος. Ἡ πανομοιότυπη παράπλευρη ἐξελικτικὴ πορεία τῶν δύο κυτταρικῶν σειρῶν, ἀπὸ τὰ μικρὰ βέλη. Σὲ κάθε ἐξελικτικὸ βῆμα, ὁ βασικὸς περὶ-διπλοειδικὸς ὑποκλῶνος συχνὰ διπλασίαζε τὴ συνολικὴ ποσότητα τοῦ γενετικοῦ τοῦ ὑλικοῦ, πρὸς δημιουργία περιτετραπλοειδικῶν πυρήνων. Τὸ φαινόμενο αὐτὸ ποὺ ἀφορᾶ μὴ-ἀποχωρισμὸ ὅλων τῶν χρωμοσωμάτων, εἰκονίζεται ὡς ἐμφάνιση διπλοχρωμοσωμάτων στὴν SL3 τῆς SW480. Οἱ ὑπερπολυπλοειδικοὶ πυρῆνες, πιθανὸν ἦταν ἀποτέλεσμα κυτταρικῆς σύντηξης (SW480, SL2). Ἡ ἐξαφάνιση χαρακτηριστικῶν χρωμοσωμικῶν διαταραχῶν στὸ ἑπόμενο ἐξελικτικὸ βῆμα τὶς περισσότερες φορὲς συνοδευόταν ἀπὸ διπλασιασμὸ τῶν κυτταρολογικῶς φυσιολογικῶν ὁμολόγων χρωμοσωμάτων. Στοιχεῖα κυτταρικοῦ μαρασμοῦ (τελομερικὲς συνδέσεις) παρατηρήθηκαν σὲ ὅλα τὰ στάδια τῆς μελέτης μας (SW480: SL2 καὶ SW620: SL3). (ἀπὸ Gagos et. al., 1996).

Ἡ χρωμοσωμικὴ ἀνάλυση ἐπέτρεψε νὰ προσδιορισθεῖ ἡ χρονολογικὴ ἀρχαιότητα τῶν διαφόρων ὑποκλώνων. Ἡ κατάταξη τῶν ὑποπληθυσμῶν σὲ ἐξελικτικὰ μεταγενέστερους ἢ προγενέστερους, πραγματοποιήθηκε μὲ βάση τὴν ἀρχὴ ὅτι κυτταρικοὶ πληθυσμοὶ οἱ ὁποῖοι παρουσιάζουν τὶς ἴδιες ἀναδιατάξεις, εἶναι πιθανότερο ὅτι προέρχονται ἀπὸ ἕναν κοινὸ κυτταρικὸ πρόγονο (Muleris et al., 1990) (Φωτ. 5).

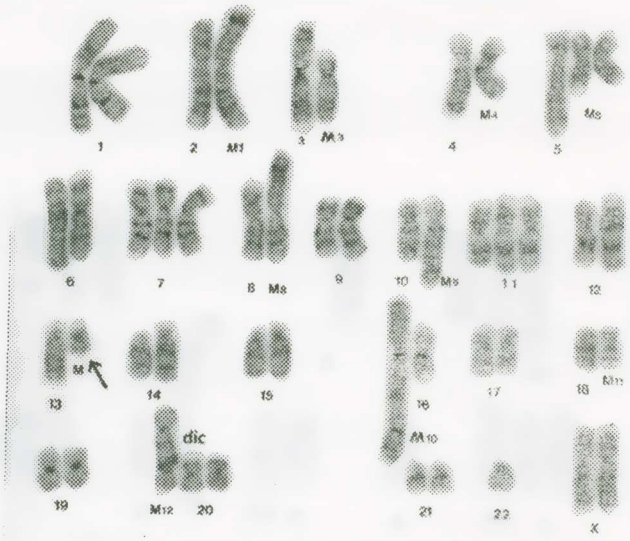
Σὲ κάθε χρονικὴ στιγμὴ τῆς ἀναπτύξεως τῶν δύο καρκινικῶν σειρῶν, τὰ κύτταρα τὰ ὁποῖα παρουσίαζαν χρωμοσωμικὰ στοιχεῖα κυτταρικῆς γηράνσεως, ἀνῆκαν στοὺς ἐξελικτικῶς ἀρχαιοτέρους ὑποκλώνους. Δεδομένου ὅτι ὅλα τὰ κύτταρα τῆς μελέτης μας προέρχονται ἀπὸ ἕνα μοναδικὸ κύτταρο πρόγονο, κοινὸ γιὰ τὶς δύο κυτταρικὲς σειρές, κάθε ἕνα ἐπιτυχὲς ἐξελικτικὸ βῆμα ἦταν δυνατὸ νὰ προσδιορισθεῖ ἀπὸ τὴν ἐμφάνιση ἢ τὴν ἐξαφάνιση ὁρισμένων χαρακτηριστικῶν χρωμοσωμικῶν ἀνωμαλιῶν. Ἡ ἐμφάνιση νέων σταθερῶν χρωμοσωμικῶν ἀναδιατάξεων συνδέθηκε μὲ τὴ γένεση νέων κυτταρικῶν ὑποπληθυσμῶν. Ἡ ἐξαφάνιση ὁρισμένων χρωμοσωμικῶν διαταραχῶν συσχετίσθηκε μὲ μιτωτικὴ ἀδράνεια (Gagos et al., 1996) (Φωτ. 2 καὶ 3).

Οἱ παρατηρήσεις μας ἐπὶ τῆς ἐξελίξεως τῶν καρκινικῶν κυττάρων, ἐπιτρέπουν νὰ προτείνουμε γιὰ πρώτη φορὰ στὴ διεθνῆ βιβλιογραφία, **μηχανισμὸ διαρκοῦς ἀνακυκλώσεως τῶν τελομεριδίων**, ὁ ὁποῖος ὑποθέτουμε ὅτι λαμβάνει χώρα κατὰ τὴ συνεχῆ ἀνάπτυξη «ἀθανάτων» καρκινικῶν κυτταρικῶν σειρῶν. Ὁ μηχανισμὸς αὐτὸς πιστεύουμε ὅτι σχετίζεται ἄμεσα μὲ τοὺς μηχανισμοὺς δημιουργίας ἀνευπλοειδίας γιατὶ κάθε φορὰ κατὰ τὴν ὁποία μιὰ συγκεκριμένη χρωμοσωμικὴ διαταραχὴ ἐξέλειπε ἀπὸ τὸν καρυότυπο τοῦ καρκινικοῦ κυττάρου, τὰ κυτταρολογικῶς φυσιολογικὰ ὁμόλογα τῶν χρωμοσωμάτων τὰ ὁποῖα ἐλάμβαναν μέρος στὴν ἀναδιάταξη τοῦ γενετικοῦ ὑλικοῦ, στὸ ἑπόμενο ἐπιτυχὲς ἐξελικτικὸ βῆμα συχνὰ διπλασίαζαν τὸν ἑαυτό τους (Φωτ. 3 καὶ 5). Τὸ φαινόμενο αὐτὸ ὀνομάζεται **ἐπιλεκτικὸς μὴ-ἀποχωρισμὸς τῶν χρωμοσωμάτων** (selective non-disjuction) καὶ ἔχει ὡς ἀποτέλεσμα ἀπώλεια τοῦ γενετικοῦ ὑλικοῦ ἑνὸς ἀπὸ τὰ δύο ὁμόλογα χρωμοσώματα καὶ διπλασιασμὸ τοῦ γενετικοῦ ὑλικοῦ τοῦ ἄλλου (Σχ. 3). Ὁ χρωμοσωματικὸς μὴ-ἀποχωρισμὸς ὁδηγεῖ σὲ ἀπώλεια τῆς ἑτεροζυγωτίας πολλῶν γονιδίων (LOH, loss of heterozygosity), κατάσταση ποὺ παρατηρεῖται πολὺ συχνὰ σὲ νεοπλασματικοὺς ἱστοὺς (Jones et al., 1989).

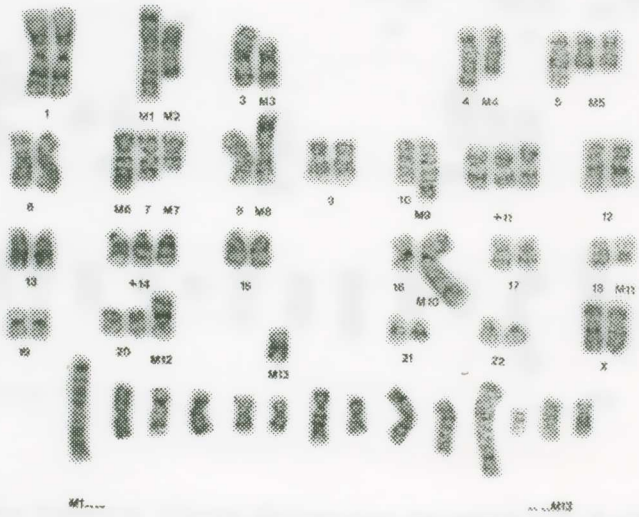
Παρὰ τὸ συνεχῆ πολλαπλασιασμό, οἱ κυτταρικὲς σειρὲς τῆς μελέτης μας ἐμφάνιζαν συχνὲς τελομεριδιακὲς συνδέσεις μεταξὺ τῶν ἄκρων τυχαίων χρωμοσωμάτων, καθὼς καὶ μὴ-κλωνικὰ δικεντρικὰ ἢ πολυκεντρικὰ χρωμοσώματα. Οἱ διαταραχὲς αὐτὲς θεωροῦνται κυτταρολογικὰ εὑρήματα κυτταρικοῦ μαρασμοῦ καὶ ἀπωλείας



Φωτογραφία 4: Καρυότυπος καὶ χρωμοσωμικὰ στοιχεῖα κυτταρικοῦ μαρασμοῦ σὲ ἕναν ἀπὸ τοὺς ἀρχαιότερους ὑποπληθυσμοὺς τῆς μελέτης μας (SW480, SL2). Οἱ χρωμοσωμικὲς διαταραχὲς ποὺ χαρακτηρίζουν τὸ συγκεκριμένο ὑποκλῶνο, συμβολίζονται M1-M12. Στὸ κάτω μέρος τῆς φωτογραφίας εἰκονίζονται πανομοιότυπες ἀναδιατάξεις (M1-M12), προερχόμενες ἀπὸ διαφορετικὸ κύτταρο τοῦ ἰδίου ὑποπληθυσμοῦ οἱ ὁποῖες ὑποδεικνύουν τὴν κλωνικότητα τῶν εὑρημάτων (dic: δικεντρικὰ χρωμοσώματα, tas: τελομεριδιακὲς συνδέσεις) (G-Banding, X 1.000).



5α



5β

Φωτογραφία 5: Σύγκριση τῶν καρυοτύπων δύο κυτταρογενετικὰ διακριτῶν ὑποπληθυσμῶν τῆς κυτταρικῆς σειρᾶς SW620. Ὁ καρυότυπος 5α ἀντιπροσωπεύει ὑποπληθυσμὸ (SL5) ὁ ὁποῖος εἶναι προγενέστερος τοῦ ὑποπληθυσμοῦ ποὺ χαρακτηρίζεται ἀπὸ τὸν καρυότυπο 5β (SL6). Τὸ συμπέρασμα αὐτὸ μπορεῖ νὰ ἐξαχθεῖ ἀπὸ τὴν ἀπουσία φυσιολογικοῦ ἀντιτύπου τοῦ χρωμοσώματος 2 στὰ κύτταρα τῆς SL6. Οἱ δύο καρυότυποι παρουσιάζουν σημαντικὲς ὁμοιότητες (M1, M3, M4, M5, M8, M9, M10, M11), ἀλλὰ καὶ διαφορὲς (M, M2, M6, M7, M13). Ὁ δείκτης M, τῆς SL5 (5α, βέλος), εἶναι ἕνα ἔλλειμμα τοῦ χρωμοσώματος 13, del(13)(q13), στὸ ἑπόμενο ἐξελικτικὸ βῆμα (5β), ἔχει ἐξαφανισθεῖ, ἐνῶ τὸ κυτταρολογικῶς φυσιολογικὸ χρωμόσωμα 13, ἔχει διπλασιάσει τὸν ἑαυτό του καὶ βρίσκεται σὲ δύο ἀντίτυπα.

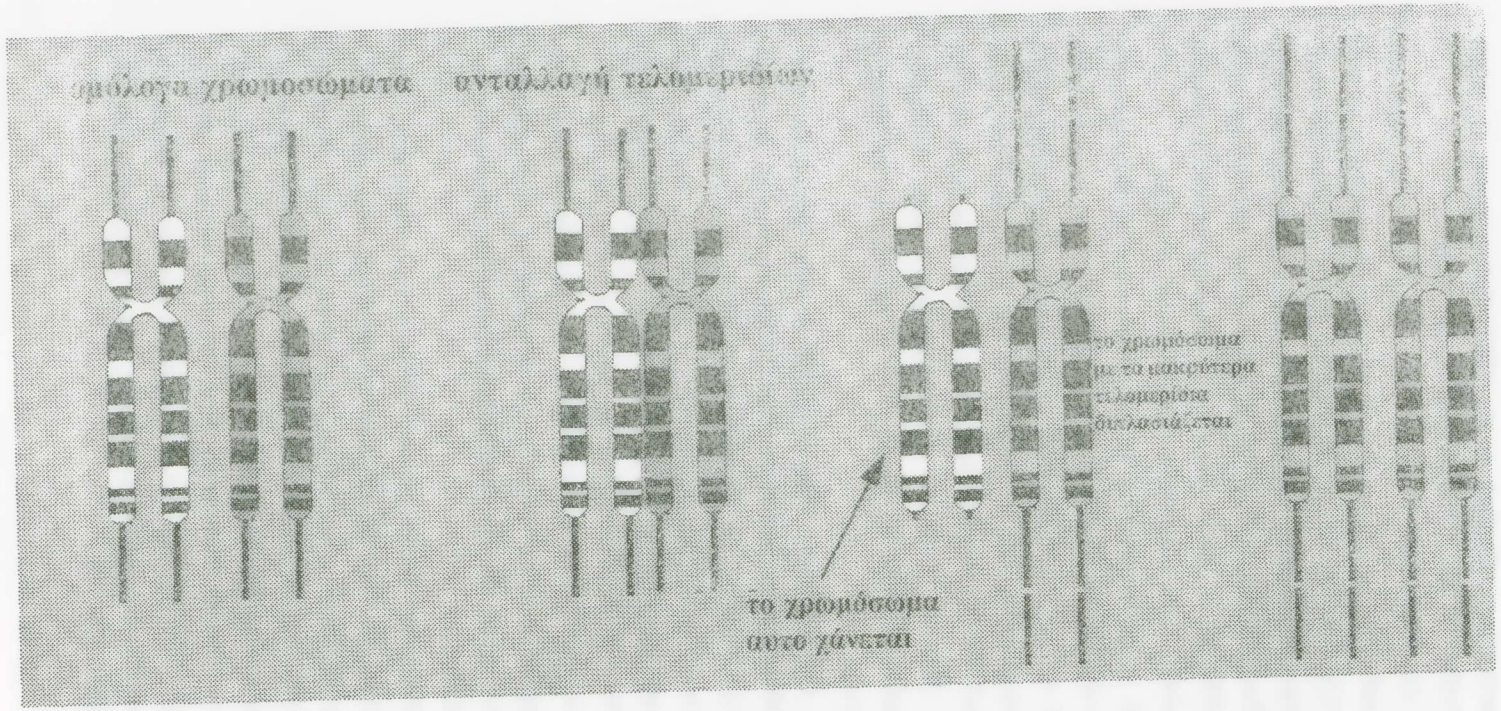
σημαντικοῦ τελομεριδιακοῦ μήκους (Pathak et al., 1988, Holzmann et al., 1993, Howell et al., 1993, Pathak et al., 1994 Pathak et al., 1994b).

Κατὰ τὴν ἐξέλιξη τῶν καρκινικῶν κυττάρων παρατηρήσαμε πολὺ συχνὰ τὴν ἐξαφάνιση χαρακτηριστικῶν χρωμοσωμάτων ἀπὸ τὸν καρυότυπο. Σύμφωνα μὲ τοὺς Sandel καὶ Zakian (1993), ἡ ἀπώλεια τῶν τελομεριδίων ἀπὸ χρωμοσώματα μυκήτων, ὁδηγεῖ στὴν ἐξαφάνιση αὐτῶν τῶν χρωμοσωμάτων κατὰ τὶς ἑπόμενες κυτταρικὲς διαιρέσεις (ἐπίσης Runge et al., 1991). Ἐνῶ λοιπὸν οἱ δύο κυτταρικὲς σειρὲς τῆς μελέτης μας εἶναι ἀθάνατες, οἱ ὑποπληθυσμοὶ οἱ ὁποῖοι τὶς συνιστοῦν φαίνεται ὅτι γηράσκουν καὶ πεθαίνουν, ἐνῶ παράλληλα μεταβάλλονται συνεχῶς.

Οἱ κυτταρογενετικές μας παρατηρήσεις θὰ μποροῦσαν νὰ ἐξηγηθοῦν ἀπὸ τὴν ὑπόθεση ὅτι στὰ καρκινικὰ κύτταρα τῶν SW480 καὶ SW620, μὲ τὶς ἀλλεπάλληλες κυτταρικὲς διαιρέσεις καὶ παρὰ τὴν **ἀποδεδειγμένη δράση τῆς τελομεράσης** (Kim et al., 1994), ἕνα σημαντικὸ μῆκος ἀπὸ τὰ τελομερίδια τῶν χρωμοσωμάτων, εἶναι πολὺ πιθανὸν ὅτι ἐξακολουθεῖ νὰ χάνεται ἀπὸ ὁρισμένα χρωμοσώματα χωρὶς νὰ εἶναι δυνατὸ νὰ ἀναπληρωθεῖ. Μάλιστα, ἡ δράση τῆς τελομεράσης φάνηκε ἀνεπαρκὴς γιὰ τὰ χρωμοσώματα ἐκεῖνα τὰ ὁποῖα συμμετεῖχαν σὲ τελομεριδιακὲς συνδέσεις ἢ χάθηκαν ἀπὸ τὸν καρυότυπο.

Ὁ μηχανισμὸς τῆς ἀνακυκλώσεως τῶν τελομεριδίων τῶν καρκινικῶν κυττάρων πιθανὸν νὰ εἶναι ἀνάλογος ἑνὸς φαινομένου τὸ ὁποῖο ἔχει περιγραφεῖ σὲ μεταλλάγματα μυκήτων ἀπὸ τὶς Lundblad καὶ Blackburn τὸ 1993. Τὰ μεταλλάγματα αὐτὰ (tel) ἐμφανίζουν ἐλλατωματικὴ δραστηριότητα τῆς τελομεράσης, δὲν ἐπιμηκύνουν τὰ τελομερίδιά τους καὶ ἔχουν χάσει τὴν ἱκανότητα συνεχοῦς πολλαπλασιασμοῦ. Μετὰ ἀπὸ ἕνα πεπερασμένο ἀριθμὸ κυτταρικῶν διαιρέσεων τὰ μεταλλαγμένα κύτταρα πεθαίνουν. Ὁρισμένα κύτταρα ὅμως, συνεχίζουν νὰ πολλαπλασιάζονται καὶ διατηροῦν σταθερὸ τελομεριδιακὸ μῆκος ἀπουσία τῆς τελομεράσης. Στὰ κύτταρα αὐτὰ φαίνεται ὅτι λαμβάνει χώρα **ἄνιση ἀνταλλαγὴ τελομεριδιακῶν** ἀλληλουχιῶν μεταξὺ τῶν χρωμοσωμάτων.

Σύμφωνα μὲ τὴν ὑπόθεσή μας, στὰ καρκινικὰ κύτταρα τῆς μελέτης μας, ἕνας παρόμοιος ἄνισος διασκελισμὸς θὰ εἶχε ὡς ἀποτέλεσμα τὴν ἐπιμήκυνση τῶν τελομεριδίων στὰ χρωμοσώματα «δέκτες τελομεριδιακῶν ἀλληλουχιῶν» καὶ τὴ συνακόλουθη ἐλάττωση αὐτοῦ τοῦ ζωτικοῦ μήκους στὰ χρωμοσώματα «δότες». Τὰ χρωμοσώματα μὲ τὸ μειωμένο τελομεριδιακὸ μῆκος θὰ ἔχουν τὴν τάση νὰ χάνονται ἀπὸ τὸν καρυότυπο στὸ ἑπόμενο ἐπιτυχὲς ἐξελικτικὸ βῆμα. Τὰ χρωμοσώματα «δέκτες τελομεριδιακῶν ἀλληλουχιῶν» εἶναι δυνατὸν νὰ διατηροῦν τὸ ἀπαραίτητο τελομεριδιακὸ μῆκος γιὰ ἕναν ἀριθμὸ κυτταρικῶν διαιρέσεων, μέσω **μὴ-ἀποχωρισμοῦ τῶν ἀδελφῶν χρωματίδων** (Σχ. 3).



Σχῆμα 3: Ὁ μηχανισμὸς τῆς ἀνακυκλώσεως τῶν τελομεριδίων μπορεῖ νὰ ἐξηγήσει τὸ φαινόμενο τῆς ἐκτεταμένης ἀνευπλοειδίας ποὺ παρουσιάζουν τὰ καρκινικὰ κύτταρα. Σύμφωνα μὲ τὴν ὑπόθεσή μας, ἐπιμήκυνση τῶν τελομεριδίων μπορεῖ νὰ συμβεῖ καὶ χωρὶς τὴ δραστηριότητα τῆς τελομεράσης. Αὔξηση τοῦ τελομεριδιακοῦ μήκους ἑνὸς χρωμοσώματος, μπορεῖ νὰ συμβεῖ μὲ ἄνιση ἀνταλλαγὴ τελομεριδιακῶν ἀλληλουχιῶν μεταξὺ χρωμοσωμάτων. Οἱ ὑψηλὰ ἐπαναλαμβανόμενες ὑποτελομεριδιακὲς ἢ τελομεριδιακὲς ἀλληλουχίες, ἀποτελοῦν ἰδανικὸ ὑπόστρωμα γιὰ ἄνισο ἀνασυνδυασμό. Μὴ-ἀποχωρισμὸς τῶν ἀδελφῶν χρωματίδων κατὰ τὴν ἑπόμενη κυτταρικὴ διαίρεση, θὰ εἶχε ὡς ἀποτέλεσμα τὸ διπλασιασμὸ τοῦ χρωμοσώματος ποὺ δέχεται τελομερίδια, ἐνῶ τὰ χρωμοσώματα δότες τελομεριδίων θὰ ἔχουν τὴν τάση νὰ χάνονται ἀπὸ τὸν καρυότυπο ἢ νὰ λαμβάνουν μέρος σὲ τελομεριδιακὲς συνδέσεις καὶ ἀσταθῆ δικεντρικὰ ἢ πολυκεντρικὰ χρωμοσώματα. Ὁ μηχανισμὸς ποὺ προτείνουμε χρησιμοποιεῖ τὴν ἀνευπλοειδία ὡς κινητήρια δύναμη γιὰ τὴν ἀνάπτυξη τῆς νεοπλασίας, καθὼς τὸ ἀπαραίτητο γιὰ τὸν πολλαπλασιασμὸ τελομεριδιακὸ μῆκος συντηρεῖται ἀπὸ τὴ διαρκῆ μεταβολὴ τοῦ ἀριθμοῦ τῶν χρωμοσωμάτων.

Ἡ ὑπόθεσή μας ἐνισχύεται ἀπὸ τὶς παρατηρήσεις τῶν Henderson καὶ συν. (1996), σὲ διπλοειδεῖς ἀνθρώπινους ἰνοβλάστες καὶ καρκινικὰ κύτταρα. Οἱ ἐν λόγω ἐρευνητές, χρησιμοποίησαν συνεστιακὸ μικροσκόπιο LASER καὶ τὴ μέθοδο μεσοφασικοῦ FISH (interphase fluorescence in situ hybridization) γιὰ νὰ ἀποδείξουν ὅτι σὲ κάθε πυρήνα ὑφίσταται διαχρωμοσωμικὴ ἑτερογένεια ὅσον ἀφορᾶ τὸ μῆκος τῶν τελομεριδίων τῶν χρωμοσωμάτων (ἀντίστοιχα στοιχεῖα δίδουν οἱ Lansdorp καὶ συν., 1996). Τὸ σημαντικὸ στοιχεῖο ποὺ προκύπτει ἀπὸ τὴν ἐργασία τοῦ Henderson, εἶναι ὅτι οἱ ἀθάνατες καρκινικὲς σειρὲς οἱ ὁποῖες δὲν ἐκφράζουν τελομεράση παρουσιάζουν ἐκτεταμένη ἑτερογένεια στὴν κατανομὴ τοῦ μήκους τῶν τελομεριδίων μεταξὺ τῶν χρωμοσωμάτων καὶ ἰσχυρότερο σῆμα τελομεριδιακοῦ ἀνοσοφθορισμοῦ, σὲ σύγκριση μὲ αὐτὸ ποὺ παρατηρεῖται σὲ νεαρὰ φυσιολογικὰ κύτταρα τὰ ὁποῖα προέρχονται ἀπὸ ἀντίστοιχο ἱστό. Τὰ εὑρήματα αὐτὰ σύμφωνα μὲ τοὺς ἀνωτέρω ἐρευνητές, εἶναι ἐνδεικτικὰ γιὰ τὴν ὕπαρξη ἐναλλακτικοῦ μηχανισμοῦ ἐπιμηκύνσεως τῶν τελομεριδίων ὁ ὁποῖος εἶναι ἀνεξάρτητος ἀπὸ τὴ δράση τῆς τελομεράσης.

Κατὰ τοὺς McEachern καὶ Blackburn (1996), ἐλλείμματα τοῦ γονιδίου ποὺ εἶναι ὑπεύθυνο γιὰ τὴν παραγωγὴ τοῦ RNA τῆς τελομεράσης τοῦ μύκητα *Kluyveromyces lactis* (TER1), ἔχουν ὡς ἀποτέλεσμα τὴ σταδιακὴ ἐλάττωση τοῦ τελομεριδιακοῦ μήκους καὶ ἐμφάνιση συμπτωμάτων κυτταρικοῦ μαρασμοῦ. Σύμφωνα μὲ τοὺς δύο ἐρευνητὲς τὰ ἀρχικὰ φαινόμενα κυτταρικῆς γηράνσεως χαρακτηρίζονται ἀπὸ κύτταρα ὑπερφυσικοῦ μεγέθους τὰ ὁποῖα πραγματοποιοῦν ἀνώμαλες κυτταρικὲς διαιρέσεις. Τὰ μεταλλαγμένα ζυμοκύτταρα ποὺ ἐπιβιώνουν ἀπὸ τὶς καταστροφικὲς συνέπειες τῆς τελομερικῆς ἐνδείας, παρουσιάζουν αὐξημένο τελομεριδιακὸ μῆκος τὸ ὁποῖο πολλὲς φορὲς εἶναι πολὺ μεγαλύτερο ἀπὸ ἐκεῖνο τῶν φυσιολογικῶν μυκήτων. Τὸ γεγονὸς αὐτὸ ἐξαρτᾶται ἄμεσα ἀπὸ τὴν ἔκφραση τοῦ γονιδίου RAD52, τὸ προϊὸν τοῦ ὁποίου συνδέεται μὲ τοὺς μηχανισμοὺς ἐπιδιορθώσεως τοῦ γενετικοῦ ὑλικοῦ. Οἱ McEachern καὶ Blackburn προτείνουν ὅτι τὸ σμικρυσμένο τελομεριδιακὸ DNA, σταδιακὰ ἀπογυμνώνεται ἀπὸ τὶς εἰδικὲς καλυπτικὲς τελομερικὲς πρωτεΐνες ποὺ ἀποτρέπουν τὸν ἀνασυνδυασμό, ἐπιτρέποντας τὴν ἐπαγωγὴ μηχανισμῶν ἐπιδιορθώσεως οἱ ὁποῖοι δημιουργοῦν ἐπιμηκυσμένα τελομερίδια στὰ κύτταρα ποὺ καταφέρνουν νὰ ἐπιβιώσουν ἀπὸ τὴν κρίση. Ὁ ἀνασυνδυασμὸς ποὺ ἐξαρτᾶται ἀπὸ τὴν παρουσία καλυπτικῶν πρωτεϊνῶν (cap-prevented recombination -CPR), μπορεῖ νὰ ἀποτελεῖ ἐναλλακτικὸ μηχανισμὸ ἐπιμηκύνσεως τῶν τελομεριδίων ἀνεξάρτητο τῆς δράσεως τοῦ ριβονουκλεϊνο-πρωτεϊνικοῦ συμπλόκου τῆς τελομεράσης (McEachern καὶ Blackburn, 1996). Πρόσφατα οἱ Marcand καὶ συν. (1997) παρουσίασαν ἕνα μηχανισμὸ ἐλέγχου τοῦ τελομεριδιακοῦ μήκους, ὁ ὁποῖος σχετίζεται ἄμεσα μὲ τὴν παρουσία πολλαπλῶν ἀντιτύπων τῆς καλυπτικῆς πρωτεΐνης Rap 1p, ἡ ὁποία συνδέεται ἐκλεκτικὰ μὲ τὰ τελομερίδια.

Ὁ χρωμοσωμικὸς μηχανισμὸς τῆς ἀνακυκλώσεως τῶν τελομεριδίων τῶν καρκινικῶν κυττάρων ποὺ προτείνουμε, ἀπαιτεῖ τὴν ἐνορχηστρωμένη δράση ἑλικασῶν, τοποϊσομερασῶν καὶ ἀρκετῶν ἄλλων πρωτεϊνῶν ποὺ σχετίζονται μὲ τοὺς μηχανισμοὺς σωματικοῦ ἀνασυνδυασμοῦ καὶ ἐπιδιορθώσεως τοῦ DNA. Μεταλλαγμένες μορφὲς αὐτῶν τῶν πρωτεϊνῶν ἔχουν σαφῆ ἐπίδραση στὴ συμπεριφορὰ καὶ τὸ μῆκος τῶν τελομεριδίων τῶν χρωμοσωμάτων. Προδιαθέτουν σὲ καρκίνο ἢ πρόωρη γήρανση καὶ προκαλοῦν παρόμοιες χρωμοσωμικὲς διαταραχὲς μὲ αὐτὲς ποὺ παρατηρήσαμε νὰ ἐμφανίζονται συχνὰ στὶς δύο καρκινικὲς σειρὲς τῆς μελέτης μας.

Ὁ Greenwell καὶ οἱ συνεργάτες του (1995) ἔδειξαν ὅτι τὸ ἀνθρώπινο γονίδιο ποὺ θεωρεῖται ὑπεύθυνο γιὰ τὴν σπάνια ὑποτελῆ αὐτοσωματικὴ νόσο τελαγκιεκτασικὴ ἀταξία καὶ ὀνομάζεται ATM, παρουσιάζει μεγάλη ὁμολογία ὅσον ἀφορᾶ στὴ σύσταση καὶ τὴν ἀλληλουχία τῶν κωδικοποιῶν του βάσεων, μὲ δύο γονίδια ζυμομυκήτων τὸ ESR1/MEC1 τοῦ *Saccharomyces cerevisiae* καὶ τὸ rad3 τοῦ *Schizosaccharomyces pombe* καθὼς ἐπίσης καὶ μὲ ἕνα ἀνοικτὸ πλαίσιο ἀναγνώσεως (open reading frame) τῆς ζύμης ποὺ ὀνομάζεται YBL088. Οἱ ἴδιοι ἐρευνητὲς ἔδειξαν ὅτι τὸ YBL088, ἀποτελεῖ μέρος τοῦ γονιδίου TEL1, τὸ ὁποῖο εἶναι ἀπαραίτητο γιὰ τὴν διατήρηση τοῦ τελομεριδιακοῦ μήκους σ' αὐτοὺς τοὺς ὀργανισμοὺς (Greenwell et al., 1995). Μεταλλάξεις τοῦ TEL1 ἔχουν ὡς ἀποτέλεσμα βαθμιαία ἐλάττωση τοῦ τελομεριδιακοῦ μήκους τῶν χρωμοσωμάτων τῆς ζύμης. Οἱ Morrow καὶ συν. (1995) παρουσίασαν στοιχεῖα ποὺ συνηγοροῦν ὑπὲρ τῆς λειτουργικῆς ὁμοιότητας τοῦ γονιδίου TEL1 μὲ τὸ ἀνθρώπινο γονίδιο ATM. Οἱ παρατηρήσεις τῶν Xia καὶ συν. (1996), σὲ ἰνοβλάστες ἀσθενῶν μὲ τελαγκιεκτασικὴ ἀταξία, ἐπιβεβαίωσαν τὴ σχέση τῶν δύο γονιδίων καθὼς τὸ τελομεριδιακὸ μῆκος τῶν κυττάρων αὐτῶν ἐμφανίσθηκε σημαντικὰ μειωμένο.

Ἡ τελαγκιεκτασικὴ ἀταξία χαρακτηρίζεται ἀπὸ πρόωρη γήρανση καὶ ἀνήκει σὲ μία ὁμάδα σπάνιων κληρονομικῶν νόσων ποὺ προδιαθέτουν στὴν ἀνάπτυξη ποικίλων μορφῶν καρκίνου. Στὴν ἴδια κατηγορία ἀνήκουν ἀσθένειες ὅπως ἡ ἀναιμία τοῦ Fanconi, τὸ σύνδρομο Bloom καὶ ἡ πηγματώδης ξηροδερμία. Ἀξιοσημείωτο εἶναι ὅτι τὸ κοινὸ χαρακτηριστικὸ ὅλων αὐτῶν τῶν νοσημάτων εἶναι ἡ εὐθραυστότητα τῶν χρωμοσωμάτων, συχνὴ ἐμφάνιση χρωμοσωμικῶν ἀναδιατάξεων, αὔξηση τοῦ ποσοστοῦ ἀνταλλαγῆς γενετικοῦ ὑλικοῦ μεταξὺ ἀδελφῶν χρωματίδων καὶ ἐνίοτε ἡ παρουσία συχνῶν δικεντρικῶν χρωμοσωμάτων καὶ τελομεριδιακῶν συνδέσεων.

Οἱ Mohamed καὶ συν. (1987) βρῆκαν μειωμένη παραγωγὴ τῆς τοποϊσομεράσης II σὲ ὁρισμένες ἀπὸ τὶς κυτταρικὲς σειρὲς ποὺ προέρχονται ἀπὸ ἀσθενεῖς μὲ τελαγκιεκτασικὴ ἀταξία. Οἱ DNA τοποϊσομεράσες I καὶ II, εἶναι ἔνζυμα ποὺ προκαλοῦν προσωρινὲς θραύσεις στὸν ἕνα ἢ καὶ στοὺς δύο κλώνους τῆς ἁλυσίδας τοῦ

DNA, ἔχουν τὴ δυνατότητα νὰ μετατρέπουν τὴν τεταρτοταγὴ δομὴ τῆς διπλῆς ἕλικας καὶ συνδέονται μὲ τὴ δημιουργία δομικῶν χρωμοσωμικῶν ἀναδιατάξεων. Ἡ ἀπομόνωση καὶ μελέτη μεταλλαγμάτων αὐτῶν τῶν δύο ἐνζύμων στὴ ζύμη, καθὼς καὶ ἡ ἀνεύρεση αὐξημένων ἐπιπέδων τῆς DNA τοποϊσομεράσης κατὰ τὴν συνθετικὴ φάση τοῦ κυτταρικοῦ κύκλου, προσφέρουν σημαντικὲς ἐνδείξεις γιὰ τὴ σχέση ποὺ ἔχουν οἱ τοποϊσομεράσες μὲ τοὺς μηχανισμοὺς ἀντιγραφῆς καὶ μεταγραφῆς τοῦ DNA, καθὼς καὶ τοῦ ἀποχωρισμοῦ τῶν χρωμοσωμάτων κατὰ τὴν κυτταρικὴ διαίρεση. Ἡ ὁμάδα τοῦ Kojis (1989) προτείνει ὅτι ἡ παρατηρούμενη ὑψηλὴ συχνότητα τῶν «λεμφοκυτταρικῶν χρωμοσωμικῶν διαταραχῶν» (lymphocyte-associated rearrangements-LARs) εἶναι διαγνωστικὸ κριτήριο τῆς τελαγκιεκτασικῆς ἀταξίας. Οἱ Peterson καὶ Funkhouser (1990) ἔδειξαν ὅτι οἱ διαταραχὲς ποὺ παρατηροῦνται στὸ ἰσοζύγιο τοῦ πληθυσμοῦ τῶν Τ-λεμφοκυττάρων στοὺς ἀσθενεῖς μὲ τὴν ἐν λόγῳ νόσο, ὀφείλονται σὲ ἐλαττωματικὸ σωματικὸ ἀνασυνδυασμὸ τῶν γονιδίων τῶν Τ-λεμφοκυττάρων (ἀνασυνδυασμὸς V(D)J).

Πρόσφατα ἀνακαλύφθηκαν τὰ γονίδια ποὺ εἶναι ὑπεύθυνα γιὰ τὶς ἄλλες τρεῖς σπάνιες γενετικὲς ἀσθένειες ποὺ παρουσιάζουν αὐξημένη προδιάθεση γιὰ ἐμφάνιση καρκίνου. Τὰ γονίδια αὐτὰ κωδικοποιοῦν πρωτεΐνες ποὺ συνδέονται μὲ τὴν ἐπιδιόρθωση τοῦ DNA, τὴ μεταγραφὴ καὶ τὸν ἀνασυνδυασμὸ τοῦ γενετικοῦ ὑλικοῦ (Bankmann et al., 1992).

Σὲ ἀντίθεση μὲ ὅ,τι ἦταν μέχρι τώρα ἀποδεκτό, φαίνεται ὅτι ἐκτὸς ἀπὸ τὸν ἀνασυνδυασμὸ τοῦ γενετικοῦ ὑλικοῦ ποὺ συμβαίνει κατὰ τὸν ἐπιχιασμὸ τῶν παχυταινικῶν χρωμοσωμάτων στὴ μείωση, καὶ τὸν ἀξιοθαύμαστο, ἀλλὰ ἤδη γνωστὸ σωματικὸ ἀνασυνδυασμὸ ποὺ λαμβάνει χώρα κατὰ τὴν ὡρίμανση καὶ διαφοροποίηση τῶν κυττάρων τοῦ ἀνοσοποιητικοῦ συστήματος (Schwartz, 1995), ὑπάρχουν σοβαρὲς ἐνδείξεις ὅτι ἀνασυνδυασμὸς τοῦ γενετικοῦ ὑλικοῦ συμβαίνει καὶ σὲ ἄλλους σωματικοὺς ἱστοὺς κατὰ τὰ διάφορα στάδια τῆς ἀναπτύξεως τοῦ ὀργανισμοῦ (LaSalle καὶ Lalande, 1996). Τὸ φαινόμενο αὐτὸ πιθανῶς συνδέεται μὲ μηχανισμοὺς ἐκλεκτικῆς ἔκφρασης γονιδίων τὰ ὁποῖα παρουσιάζουν τὸ φαινόμενο ποὺ ὀνομάζεται imprinting (Barlow, 1995). Τὰ γονίδια αὐτὰ παρουσιάζουν ἰδιόμορφη συμπεριφορά, καὶ φυσιολογικὰ ἐκφράζονται μόνον ὅταν προέρχονται ἀπὸ ἕναν ἀπὸ τοὺς δύο γονεῖς, τὴ μητέρα ἢ τὸν πατέρα. Οἱ πατροκλινεῖς ἢ μητροκλινεῖς φορεῖς γενετικῆς πληροφορίας βρίσκονται φυσιολογικὰ σὲ δύο ἀντίτυπα — ἕνα γονίδιο σὲ κάθε ἕνα χρωμόσωμα. Τὰ γονίδια αὐτὰ θεωροῦνται ὅτι εἶναι σεσημασμένα, φέρουν δηλαδὴ μιὰ «σφραγίδα» χημικῶν τροποποιήσεων ἡ ὁποία καθορίζει ποιὸ θὰ ἐνεργοποιηθεῖ καὶ ποιὸ θὰ παραμείνει ἀδρανές. Τὸ σύνδρομο Beckwith-Wiedemann, τὸ ὁποῖο ἔχει ὡς συμπτώματα σωματικὴ ἡμι-ὑπερτροφία καὶ συχνὴ ἐμφάνιση νεφρικῶν ὄγκων

σὲ νεαρὴ ἡλικία, κατὰ κύριο λόγο ὀφείλεται σὲ ἐλαττωματικὸ σωματικὸ ἀνασυνδυασμὸ ποὺ συμβαίνει στὴν περιοχὴ ἑνὸς γονικὰ σεσημασμένου γονιδίου ποὺ κωδικοποιεῖ τὸν ὑποδοχέα τοῦ αὐξητικοῦ παράγοντα IGF2 (Bischoff et al., 1995).

Πολλαπλὲς μὴ εἰδικὲς χρωμοσωμικὲς διαταραχὲς ἔχουν παρατηρηθεῖ στὸ σύνδρομο Bloom καὶ στὴν ἀναιμία τοῦ Fanconi (German, 1992). Κατὰ τοὺς Ellis καὶ συν. (1995), ἡ ὑπέρμετρη τάση ποὺ παρουσιάζουν τὰ κύτταρα τῶν ἀσθενῶν μὲ τὸ σύνδρομο Bloom νὰ ἐμφανίζουν χρωμοσωμικὲς μεταλλάξεις, εἶναι ἀποτέλεσμα ὑπερβολικῆς αὐξήσεως τῆς συχνότητας ἀνασυνδυασμοῦ τῶν ἀδελφῶν χρωματίδων. Οἱ ἴδιοι ἐρευνητὲς χρησιμοποίησαν γιὰ πρώτη φορὰ τὴ μέθοδο χαρτογραφήσεως ποὺ βασίζεται στὸν σωματικὸ ἀνασυνδυασμὸ (somatic crossover point mapping-SCP) καὶ προσδιόρισαν τὴ θέση τοῦ ὑπεύθυνου γονιδίου (BLM) στὸ χρωμόσωμα 15 στὴ ζώνη q26.6. Τὸ γονίδιο BLM παρουσιάζει μεγάλη ὁμοιότητα μὲ τὶς ἑλικάσες τῆς οἰκογενείας RecQ τοῦ βακτηριδίου E.coli. Ἡ πρωτεΐνη ποὺ κωδικοποιεῖ τὸ γονίδιο ποὺ εἶναι ὑπεύθυνο γιὰ τὴ νόσο πηγματώδη ξηροδερμία, εἶναι ἐπίσης μιὰ ἑλικάση ποὺ συμμετέχει στοὺς μηχανισμοὺς μεταγραφῆς καὶ ἐπιδιορθώσεως τοῦ DNA (Li et al., 1994, Li et al., 1995).

Τὸ γονίδιο RecQ εἶναι μέλος τοῦ μεταβολικοῦ μηχανισμοῦ ἀνασυνδυασμοῦ τοῦ γενετικοῦ ὑλικοῦ τῶν βακτηριδίων ποὺ ὀνομάζεται RecF. Ἕνα ἀντίστοιχο ἀνθρώπινο γονίδιο ποὺ ὀνομάσθηκε RecQL, ἀπομονώθηκε ἀπὸ τὰ κύτταρα τῆς συνεχοῦς κυτταρικῆς σειρᾶς HeLa. Τὸ προϊὸν αὐτοῦ τοῦ γονιδίου ἔχει δράση DNA ἐξαρτώμενης ATPάσης, DNA ἑλικάσης, καὶ ἱκανότητες νὰ ἐπάγει μετατοπίσεις μονόκλωνου DNA ἀπὸ τὸ 3′ ἄκρο τῆς ἕλικας τοῦ DNA, στὸ 5′. Τὸ ἔνζυμο RecQL, θὰ μποροῦσε νὰ συμμετέχει στὸ μηχανισμὸ τῆς ἀνακυκλώσεως τῶν τελομεριδίων ποὺ προτείνουμε. Τὰ καρκινικὰ κύτταρα HeLa ἐκφράζουν τελομεράση (Counter et al., 1994) ἀλλὰ παρουσιάζουν ἐπίσης μεγάλη καρυοτυπικὴ ἑτερογένεια μὲ πληθώρα χρωμοσωμικῶν ἀναδιατάξεων ποὺ μεταβάλλονται διαρκῶς (Pathak et al., 1992). Σύμφωνα μὲ τοὺς Ellis καὶ German (1996), ἡ πρωτεΐνη BLM ἔχει ἐπίσης σημαντικὲς ὁμοιότητες μὲ δύο ἄλλες ἑλικάσες ποὺ ἀνήκουν κι αὐτὲς στὴν οἰκογένεια RecQ. Ἡ μία ἀπὸ αὐτὲς (WRN), ὅταν εἶναι μεταλλαγμένη στὸν ἄνθρωπο, εἶναι ὑπεύθυνη γιὰ τὸ σύνδρομο πρόωρης γηράνσεως τοῦ Werner. Ἡ δεύτερη πρωτεΐνη ποὺ ὀνομάζεται SGS1 ἀλληλοεπιδρᾶ μὲ τὶς τοποϊσομεράσες τῶν ζυμομυκήτων.

Ἡ ὑπόθεσή μας γιὰ τὴ χρωμοσωμικὴ βάση ἑνὸς μηχανισμοῦ ἐπιμηκύνσεως τῶν τελομεριδίων τῶν καρκινικῶν κυττάρων, ποὺ ἐξαρτᾶται ἀπὸ τὸν σωματικὸ ἀνασυνδυασμὸ καὶ ἐκμεταλλεύεται τὴν ἀνευπλοειδία, ἐπιβεβαιώνεται ἀπὸ πρόσφατες ἀνακοινώσεις ποὺ ἀποκαλύπτουν σαφῆ συσχέτιση τῶν τελομεριδίων μὲ τὶς διαδικασίες ἀποχωρισμοῦ τῶν χρωμοσωμάτων κατὰ τὴ μείωση ἢ τὴ μίτωση (Hawley,

1997). Οἱ Kirk καὶ συν. (1997) ἀναφέρουν ὅτι διαταραχὲς τῶν τελομεριδίων προκαλοῦν ἐλαττωματικὸ ἀποχωρισμὸ τῶν χρωμοσωμάτων κατὰ τὴ διαίρεση σωματικῶν κυττάρων. Οἱ συγγραφεῖς συμπεραίνουν ὅτι στὴ διάρκεια τῆς ἀνάφασης τὰ φυσιολογικὰ τελομερίδια τῶν χρωματίδων κάθε χρωμοσώματος συνδέονται μεταξύ τους καὶ ἀποχωρίζονται κατὰ τὴν κυτταρικὴ διαίρεση. Μεταλλαγμένα τελομερίδια προκαλοῦν μὴ-ἀποχωρισμὸ τῶν χρωμοσωμάτων. Ἕνας τέτοιος μὴ-ἀποχωρισμὸς ὁ ὁποῖος προκαλεῖ ἐνδοαναδιπλασιασμὸ τοῦ χρωμοσώματος 2 σὲ κύτταρο τῆς SW480 εἰκονίζεται στὴ φωτογραφία 2 (SL4).

Τὰ στοιχεῖα ποὺ προκύπτουν ἀπὸ τὴ μελέτη τῆς συμπεριφορᾶς τῶν τελομεριδίων σὲ διάφορους ὀργανισμούς, ἐπιτρέπουν νὰ ὑποθέσουμε ὅτι στὴ διαδικασία διατηρήσεως τοῦ τελομεριδιακοῦ μήκους, λαμβάνουν μέρος ἀρκετοὶ παράγοντες ὅπως εἶναι οἱ πρωτεΐνες ποὺ συνδέονται μὲ τὰ τελομερίδια, οἱ καλυπτικὲς πρωτεΐνες, ἡ τελομεράση καὶ ἔνζυμα ποὺ συμμετέχουν στὴν ἀντιγραφὴ καὶ ἐπιδιόρθωση τοῦ DNA (Broccoli et al., 1997). Ἡ ἀποσαφήνιση τῶν μηχανισμῶν αὐτῶν καὶ τῶν ἀλληλεπιδράσεών τους ἀποτελεῖ κλειδὶ γιὰ ἐνδεχόμενες θεραπευτικὲς ἐπεμβάσεις στὸ τελομεριδιακὸ μῆκος (Axelrod, 1996).

Οἱ σχέσεις τοῦ συστήματος διατηρήσεως τῶν τελομεριδίων μὲ τοὺς μηχανισμοὺς ἐλέγχου τοῦ κυτταρικοῦ κύκλου ἀπὸ ὀγκο-κατασταλτικὰ γονίδια καὶ τοὺς μηχανισμοὺς ἐπαγόμενου κυτταρικοῦ θανάτου (ἀποπτώσεως) ἀρχίζουν νὰ ἀποκαλύπτονται. Ὁ Kipling (1992), προτείνει ὅτι ἡ συχνὰ μεταλλαγμένη στοὺς καρκίνους p53, ἀλλὰ καὶ ἄλλες πρωτεΐνες ποὺ ἐλέγχουν τὶς διαδικασίες ἐπιδιόρθωσης τοῦ DNA καὶ κινητοποιοῦν μηχανισμοὺς κυτταρικοῦ θανάτου, πιθανὸν νὰ ἀποτελοῦν μέρος ἑνὸς μηχανισμοῦ ὁ ὁποῖος ἐλέγχει μὲν τὴ γενικότερη βλάβη τοῦ γενετικοῦ ὑλικοῦ ἀλλὰ καὶ τὸ μῆκος τῶν τελομεριδίων (ἐπίσης Greider, 1995). Ἡ ἀπουσία φυσιολογικῆς p53 μάλιστα, ἔχει συνδεθεῖ μὲ ἀνωμαλίες τῶν κεντροσωματίων κατὰ τὴ μίτωση καὶ τὴ δημιουργία ἀνευπλοειδίας (Fukasawa et al., 1996).

Συμπερασματικά, ἡ πρωτοτυπία τῆς ἀνακοινώσεώς μας καταφαίνεται ἀπὸ τὸ γεγονὸς ὅτι ἡ μελέτη μας παρέχει, γιὰ πρώτη φορὰ στὴ διεθνῆ βιβλιογραφία, κυτταρολογικὲς ἐνδείξεις ὑπὲρ τῆς ὑπάρξεως χρωμοσωμικοῦ μηχανισμοῦ ἀνακυκλώσεως τῶν τελομεριδίων τῶν καρκινικῶν κυττάρων, ὁ ὁποῖος ὑποθέτουμε ὅτι ἐξαρτᾶται ἀπὸ διαδικασίες μιτωτικοῦ ἀνασυνδυασμοῦ, συνδέεται μὲ μὴ-ἀποχωρισμὸ τῶν χρωμοσωμάτων καὶ μπορεῖ νὰ ἐξηγήσει φαινόμενα τὰ ὁποῖα παρατηροῦνται πολὺ συχνὰ στὴ νεοπλασία, ὅπως ἡ ἀνευπλοειδία, ἡ διαρκὴς ἐξαλλαγὴ καὶ ἡ ἀπώλεια τῆς ἑτεροζυγωτίας (Heim καὶ Mitelman, 1995). Τέλος, εἶναι πολὺ πιθανὸν ὅτι ὁ μηχανισμὸς αὐτὸς ἀποτελεῖ ἀποκλειστικὸ τρόπο ἐπιμηκύνσεως τῶν τελομεριδίων στὶς συνεχεῖς κυτταρικὲς σειρὲς οἱ ὁποῖες δὲν ἐκφράζουν τελομεράση (Bryan et al., 1995, Gupta et al., 1996).

SUMMARY

A telomerase independent chromosomal mechanism of telomere elongation related to aneuploidy, loss of heterozygosity, and tumor heterogeneity.

Recent evidence indicates the existence of an alternative mechanism for the maintenance of telomeric repeats that is independent of the action of telomerase. Herein we suggest a chromosomal mechanism which presumably takes place during the continuous growth of two colon cancer cell lines derived from the same patient. Our hypothesis is based on data obtained from extensive karyotypic analysis that was performed on early and late passages of the colon adenocarcinoma cell lines SW480 and SW620. These cells have been continuously cultivated for a period of 24 months and passaged through nude mice. Despite some karyotypic diversity, the two cell lines exhibited common chromosomal anomalies and followed similar patterns of evolution. Genomic instability seemed to play an important role in the emergence, growth, and subsequent elimination of the heterogeneous sidelines by selection, clonal expansion and proliferative cell death. Cell senescence was evident by the presence of telomeric associations and random dicentric or multicentric formations. These chromosomal lesions were related to the disappearance of the most ancestral sidelines through evolution. Successful evolutionary steps were characterized by elimination of pre-existing marker chromosomes that were subsequently replaced by their cytologically intact homologous chromosomes possibly after selective endoreduplication. We propose a telomere recycling mechanism which presumably relies on somatic recombination and is related to aneuploidy, loss of heterozygosity and tumor heterogeneity.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Allsopp RC., Vaziri H., Patterson C. Goldstein S,. Younglai EV., Futcher AB., Greider CW., Harley C.B., (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc. Natl Acad. Sci USA **89**: 10114-10118.

Axelrod N., (1996): Of telomeres and tumors. Nat. Med. **2**: 158-159.

Bankmann M., Prakash L., Prakash S., (1992): Yeast RAD14 and human xeroderma pigmentosum group A DNA-repair genes encode homologous proteins. Nature **355**: 555-558.

Barlow D. R., (1995): Gametic imprinting in mammals. Science **270**: 1610-1613.

Bischoff F., Feldman G., McCaskill C., Subramanian S., Hughes M., Shaffer L. (1995): Single cell analysis demonstrating omatic mosaicim involving 11p in a patient with paternal isodisomy and Beckwith-Wiedemann syndrome. Hum. Mol. Genet. **4**: 395-399.

Broccoli D., Chong L., Oelmann S., Fernald A. A., Marziliano N., van Steensel B., Kipling D., Le Beau M. M., de Lange T., (1997): Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression and conserved protein domains. Hum Molec Genet. **6**: 69-76.

Bryan T. M., Englezou A., Gupta J., Bacchetti S., Reddel R. R., (1995): Telomere elon gation in immortal human cells without detectable telomerase activity. EMBO **14** (**17**): 4240-4248.

Collins K., (1996): Structure and function of telomerase. Curr. Opin. Cell. Biol. **8**: 374-380.

Counter C. M., Avillion A. A., LeFeuvre C. E., Stewart N. G., Greider C. W, Baccheti S., (1992): Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO J **11**: 1921-1929.

Counter C. M., Hirte H. W., Bacchetti S., Harley C. B., (1994): Telomerase activity inhuman ovarian carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 2900-2904.

de Lange T., (1994): Activation of telomerase in human tumor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 2882-2885.

Ellis N. A., German J., (1996): Molecular genetics of Bloom's syndrome. Hum. Molec. Genet. **5**: 1457-1463.

Ellis N. A., Groden J., Ye T. Z., Straughen J., Lennon D. J., Ciocci S., Proytcheva M., German J., (1995): The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. Cell. **83**: 655-666.

Fukasawa K., Choi T., Kuroyama R., Rulong S., Vande Woude G., (1966): Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. Science **271**: 1744-1747.

Gagos S., Iatridou-Kyrkou K., Liosi A., Karakitsos P., Papageorgaki P., Kyroudi A. and S. Pathak, (1995a): Clonal evolution of an immunoblastic type non Hodgkin's Lymphoma with der(6)t(1:6)(q11; p11) as it's primary cytogenetic abnormality. Cancer Genet. Cytogenet. **79**: 59-63.

Gagos S., Hopwood V., Iliopoulos D., Kostakis A., Karayannakos P., Yatzides H., Skalkeas G. and Pathak S., (1995b): Chromosomal markers associated with metastasis in two colon cancer cell lines established from the same patient. Anticancer Res.: **15**: 36-3978.

Gagos S., Pathak S., Tseleni S., Iliopoulos D., Agapitos E., Kostakis A., Karayannakos P., Skalkeas G., (1996): Cell senescence and a mechanism of clonal evolution leading to continuous cell proliferation, LOH, and tumor heterogeneity: Studies on two immortal colon cancer cell lines. Cancer Genet. Cytogenet. **90**: 157-165.

German J., (1992): Bloom's syndrome: incidence, age of onset, and types of leukemia in the Bloom's Syndrome Registry. In: Bartsocas, C. S., Loukopoulos, D.: Genetics of Hematoloical Disorders. Washington, D. C.: Hemisphere Publishers (pub.) 1992. pp. 241-258.

Greenwell P. W., Kronmal S. L., Porter S. E., Gassbenhuber J., Obermaier B., Petes T. D. (1995): TEL1, a gene involved in controlling telomere length in S. cerevisiae, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. Cell. **82**: 823-829.

Greider C. W., (1990): Telomeres, telomerase and senescence. BioEssays **12**: 363-369.

Greider C. W., (1996): Telomere length regulation. Annu. Rev. Biochem. **65**: 337-365.

Gupta J., Han L. P., Wang P., Gallie B. L., Bacchetti S. (1996): Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity J. Nat. Cancer Inst. **88**: 1152-2157.

Harley C. B., Futcher A. B., Greider C. W. (1990): Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. Nature **345**: 458-460.

Harley C. B. (1991): Telomere loss: Mitotic clock or genetic time bomb? Mutat Res. **256**: 271-282.

Harrigton L., McPhail T., Mat V., Zhou W., Oulton R., Amgen EST Program, Bass. M., Arruda I. Robinson O. M. (1997): A mamalian telomerase-associeted protein. Science **275**: 973-977.

Hastie N. D., Dempster M., Dunlop M. G., Thompson A. M., Green D. K., Alshire R. C. (1990): Telomere reduction in human colorectal carcinoma and in association with aging. Nature **350**: 569-573.

Hayflick L., (1965): The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell. Res. **37**: 614-636.

Hawley R. S., (1997): Unresovable endings: Defective telomeres and failed separation. Science **275**: 1441-1443.

Henderson S., Allsopp R., Spector D., Wang S. S., Harley C., (1996): In situ analysis of changes in telomere size during replicative aging and cell tranformation.J. Cell. Biol. **134**: 1-12.

Heim S., Mitelman F., (1995): Cancer Cytogenetics. New York: Alan R. Liss Inc. p.p. 19-31.

Holzmann K., Blin N., Welter C., Zang K. D., Seitz G., Henn W., (1993): Telomeric association and loss of telomeric DNA repeats in renal tumors. Genes. Chromosome Cancer **6**: 178-181.

Howell R. T., Kitchen C., Standen G. R. (1993): Telomeric association in a patient with B-cell prolymphocytic leukemia. Genes Chromosom. Cancer **7**: 116-118.

Jazwinski S.M., (1996): Longevity genes and Aging, Science **273**: 54-59.

Jones P. A., Chandler L. A., Ghazi H., Ahlering T., Dubeau L., (1989): DNA methylayion patterns and tumor heterogeneity. In Nicolson G. L., Fidler I. J. (eds.): Tumor Progression and Metastasis. New York: Alan R. Liss, Inc., pp. 173-177.

Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., L. C. Ho P., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., Shay J. W., (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science **266**: 2011-2014.

Kirk K. E., Harmon B. P., Reichardt I. K., Sedat J. W., Blackburn E., (1997): Block in anaphase chromosome separation caused by telomerase template mutation. Science **275**: 1478-1481.

Kipling D, Cooke H. J., (1992): Beginning or end? Telomere structure, genetics and biology, Hum. Mol. Genet. **1**: 3-6.

Kojis T. L., Schreck R. R., Gatti R. A., Sparkes R. S., (1989): Tissue specificity of chromosomal rearrangements in ataxia-telangiectasia. Hum. Genet. **83**: 347-352.

Lamb J., Harris P., Wilkie A., Dauwerse J., Higgs (1993): De novo truncation of chromosome 16p and healing with (TTAGGG)n in the α-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR 16). Am. J. Hum. Genet. **52**: 668-676.

Lansdorp P. M., Verwoerd N. P., van de Rijke F. M., Dragowska V., Little M.T., Dirks R.W., Raap A. K., Tanke H. J., (1996): Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. Hum. Mol. Genet **5**: 685-691.

LaSalle J., Lalande M., (1996): Homologous association of oppositely imprinted chromosomal domains. Science 272: **272**-728.

Leibovitz A., Stinson J., McCombs W., McCoy C., Mazur K., Mabry N., (1976): Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. Cancer Res. **36**: 456-4560.

Leibovitz A., Wright W., Pathak S., Siciliano M., Daniels W., Fogh H., Fogh J. (1979): Detection and analysis of a glucose 6-phosphate dehydrogenase phenotype B cell line contamination. J. Nath. Cancer Ins. **63**: 635-644.

Li L., Elledge S. J., Peterson C. A., Bales E. S., Legerski R. J., (1994). Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1. Proc. Nat. Acad. Sci. **91**: 5ù12-5ù16.

Li L., Peterson C. A., Lu X., Legerski R. J., (1995): Mutations in XPA that prevent association with ERCC1 are defective in nucleotide — excision repair. Molec. Cell. Biol. **15**: 1993-1998.

Li Z. H., Salovaara R., Aaltonen L. A., Shibata D.,(1996): Telomerase activity is commonly detected in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. Am. J. Pathom. **148**: 1075-1079.

Lundblad V., Blackburn E. H., (1993): An alternative pathway for yeast telomere maintainance rescues est 1- senescence. Cell. **73**: 347-360.

Marcand S., Gilson E., Shore D., (1997): A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. Science **275**: 986-990.

McEachern M. J., Blackburn E. H., (1996): Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in Kluyveromyces lactis lacking telomerase. Genes Dev. **10**: 1822-1824.

Mehle C., Piatyszek M. A., Ljungberg B., Shay J. W., Roos G., (1996): Telomerase activity in human renal cell carcinoma. Oncogene **13**: 161-166.

Meyene J., Baker R. J., Hobart H. H., Hsu T. C., Ryder O. A., Ward O. G., Wiley J. E., Wurster-Hill D. H., Yates T. L., Moyzis R. K., (1990): Distribution of the (TTAGGG)n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. Chromosoma **99**: 3-10.

Mohamed R., Singh S. P., Kumar S., Lavin M. F., (1987): A defect in DNA topoisomerase II activity in ataxia-telangiectasia cells. Biochem. Biophys. Res. Communt. **149**: 233-238.

Morin, G. B., (1989): The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonuleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. Cell. **59**: 521-529.

Morin G. B., (1991): Recognition of a chromosome truncation site associated with alpha-thalassaemia by human telomerase. Nature **353**: 454-456.

Morrison S. J., Prowse K. R., Ho P., Weissman I. L., (1996): Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. Immunity **5**. 207-216.

Morrow D. M., Tagle D. A., Shiloh Y., Collins F. S., Hieter P., (1995): TEL1, an S. cerevisiae homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. Cell. **82**: 831-840.

Muleris M., Delattre O., Olschwang S., Dutrillaux A. M., Remvikos Y., Salmon R. J., Thomas G., Dutrillaux B., (1990): Cytogenetic and molecular approaches of polyploidization in colorectal adenocarcinomas. Cancer Genet. Cytogenet. **44**: 107-118.

Norrback K. F., Dahlenborg K., Carlsson R., Roos G., (1996): Telomerase activation in normal B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphomas. Blood **88**: 222-229.

Nouso K., Urabe Y., Higashi T., Nakatsukasa H., Himo N., Ashida K., Kinugasa N., Yoshida K., Uematsu S., Tsuji T., (1996): Telomerase as a tool for the differential diagnosis of human hepatocellular carcinoma. Cabcer, **78**: 232-236.

Pathak S., Wang Z., Dhaliwal M. K., Sacks P. D., (1988): Telomeric association: Another characteristic of cancer chromosomes? Cytogenet. Cell. Genet. **47**: 227-229.

Pathak S., De Lucca E. J., Polyzos A., (1992): Chromosomal evolution in a human breast tumor: A comparison of results 12 years apart. Chromatin **1**: 7-17.

Pathak S., Dave B., Gagos S., (1994a): Chromosome alterations in cancer development and apoptosis. In vivo, **8**: 843-850.

Pathak S., Risin S., Brown N., Berry K., (1994b): Telomeric association of chromosomes is an early manifestation of programmed cell death. International J. Oncology **4**:323-328.

Peterson R. D., Funkhouser J., (1990): Ataxia-telangiectasia: an important clue. (Editorial) New Eng. J. Med. **322**: 124-125.

Rogalla P., Rohen C., Bonk U., Bullerdiek J., (1996). Telomeric repeat fragment lengths are correlated to histological grading in 85 breast cancers. Cancer Lett. **103**: 155-161.

Runge K. W., Wellinger R. J., Zakian V. A., (1991): Effects of excess centromeres and excess telomeres on chromosome loss rates. Mol. Cel. Biol. **11**: 2919-2928.

Sandel A. A., Zakian V. A., (1993): Loss of a yeast telomere: arrest recovery, and chromosome loss. Cell. **75**: 729-739.

Schwartz R. D. (1995): Jumping genes and the immunoglobulin V gene system. New Engl. J. Med. **333**: 42-44.

Shay J. W., West M. D., Wright W. B., (1992): Re-expression of senescent markers in induced reversibly immortalized cell. Exp. Gerontol. **27**: 477-492.

Shay J. W., Wright W. E., (1996b): Telomerase activity in human cancer. Curr. Opin. Oncol. 8: 66-67.

Σκαλκέας Γ. Δ., Κωστάκης Α., Τσελένη-Μπαλαφούτα Σ., Γκάγκος Σ, 'Ηλιόπουλος Δ. Κουντούρης Χ. Χαλιάσος Α. Καραγιαννάκος Π. Καρατζᾶς Γ., (1993): 'Επίδραση τῆς κυκλοσπορίνης-Α, ἐπὶ τοῦ Καρκίνου παχέος ἐντέρου ἀνθρώπου, ἐμφυτευθέντος εἰς πειραματόζωα. Πρακτικὰ 'Ακαδημίας 'Αθηνῶν, **68**, Τεῦχος Α', 1993, σελ. 193-215.

Small M. B., Hubbard K., Pardinas J. R., Marcus A. M., Dhanaraj S. N., Sethi-Ka (1996): Maintenance of telomeres in SV40-transformed pre-immortal and immortal human fibroblasts. J. Cell. Physiol. **168**: 727 736.

Smith J. R., Pereira-Smith O. M. (1996): Replicative senescence: implications of in vivo aging and tumor suppression. Science **273**: 63-67.

Sugino T., Yoshida K., Bolodeoku J., Tahara H., Buley I., Manek S., Wells C., Goodison S., Ide T., Suzuki T., Tahara E., Tarin D., (1996): Telomerase activity in breast cancer and benign breast lesions: diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle asp.rates. Int. J. Cancer **69**: 301-308.

Weng N. P., Levine B. L., June C. H., Hodes R. J., (1996): Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. J. Exp. Med. **183**: 2471-2479.

Wilkie A. O. M., Lamb J., Harris P. C., Finney R. D., Higgs D. R., (1990): A truncated human chromosome 16 associated with alpha thalassaemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)n. Nature **346**: 868-871.

Xia S. J., Shammas M. A., Shmookler-Reis R. J., (1996): Reduced telomere length in ataxia-telangiectasia fibroblasts. Mutat. Res. **364**: 1-11.

Yasumoto S., Kunimura C., Kikuchi K., Tahara H., Ohji H., Yamamoto H., Ide T., Utakoji T., (1996): Telomerase activity in normal human epithelial cells. Ongogene **13**: 433-439.

Zakian V. A., (1995): Telomeres: begining to understand the End. Science **270**: 1601-1607

'Η ἐργασία αὐτὴ ἐπιχορηγήθηκε ἐν μέρει ἀπὸ τὴν 'Επιτροπὴ 'Ερευνῶν τῆς 'Ακαδημίας 'Αθηνῶν, τὴν 'Επιτροπὴ 'Ερευνῶν τοῦ Πανεπιστημίου 'Αθηνῶν, καὶ τὸ 'Ίδρυμα Κρατικῶν 'Υποτροφιῶν.