

**Telomere und Telomerase –
ihre Bedeutung als prognostischer Tumormarker und
ihr Potential für pharmakologische Interventionen**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

Elke Kleideiter

Tag der mündlichen Prüfung: 15. September 2003

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Klotz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. P. T. Ammon

Meinen Eltern gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. EINLEITUNG	10
1.1. Telomere und Telomerase	10
1.1.1. Telomere	10
1.1.2. Telomerase	16
1.2. Weichteilsarkome	27
1.3. Akute lymphoblastische Leukämie vom T-Zell-Typ	27
1.4. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	27
1.5. Fragestellung	28
1.5.1. Telomere, Telomeraseaktivität und hTERT mRNA-Expression als diagnostische bzw. prognostische Marker	28
1.5.2. Telomere und Telomerase als Angriffspunkte für pharmakologische Interventionen	29
2. MATERIAL UND METHODEN	31
2.1. Material	31
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien	31
2.1.2. Medien, Puffer, Lösungen	33
2.1.2.1. Medien	33
2.1.2.2. Puffer, Lösungen	33
2.1.3. Geräte und Hilfsmittel	35
2.1.4. Biologisches Untersuchungsmaterial	38
2.1.4.1. Zelllinien	38
2.1.4.1.1. Weichteilsarkomzellen	38
2.1.4.1.2. A-549-Zellen	38
2.1.4.2. Patientenmaterial	38
2.1.4.2.1. Blasten von Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie vom T-Zell- Typ	38
2.1.4.2.2. Kontrollproben	39
2.1.4.2.3. Gewebeproben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darm- erkrankungen	39
2.2. Methoden	42
2.2.1. Zellbiologische Methoden	42
2.2.1.1. Kultivierung von Zelllinien (WTS-Zellen, A-549-Zellen)	42
2.2.1.2. Etablierung Cisplatin resistenter A-549-Zellen	42
2.2.1.3. Behandlung der WTS-Zelllinien mit Telomeraseinhibitoren	43
2.2.1.4. Bestimmung der Zellproliferation (BrdU-Assay)	43
2.2.1.5. Bestimmung des Zellzyklus (FACS-Analyse)	44
2.2.1.6. Färbung der Actin-Filamente mittels Rhodamin-Phalloidin	45
2.2.1.7. Nachweis von p53	45
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	46
2.2.2.1. Bestimmung der Telomerlänge (TRF-Analyse)	46
2.2.2.1.1. DNA-Isolierung und Bestimmung der DNA-Konzentration	46
2.2.2.1.2. Gelelektrophorese	47
2.2.2.1.3. Restriktion und Fällung der DNA-Fragmente	47

2.2.2.1.4. Southern Blotting	48
2.2.2.1.5. Markierung der Sonden	49
2.2.2.1.6. Prähybridisierung und Hybridisierung	49
2.2.2.1.7. Detektion der Telomer-Restriktionsfragmente	50
2.2.2.1.8. Auswertung und Berechnung der mittleren Restriktionsfragmentlänge	51
2.2.2.2. Bestimmung der Telomeraseaktivität	52
2.2.2.2.1. Aufarbeitung des Probenmaterials	52
2.2.2.2.2. Bestimmung des Proteingehalts	53
2.2.2.2.3. Bestimmung der alkalischen Phosphatase	53
2.2.2.2.4. Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)	54
2.2.2.2.5. Zelllysatsversuche mit Telomeraseinhibitoren	58
2.2.2.2.6. Auftrennung der Produkte im Polyacrylamidgel (TRAP-Gel)	59
2.2.2.2.7. Auswertung der Telomeraseaktivität (TRAP-Gel)	60
2.2.2.3. Bestimmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT)	61
2.2.2.3.1. RNA-Isolierung und Bestimmung der RNA-Konzentration	61
2.2.2.3.2. cDNA-Synthese	63
2.2.2.3.3. Real-time TaqMan [®] PCR	63
2.2.2.3.4. Auswertung der TaqMan [®] -Daten der hTERT mRNA-Expression	66
2.2.3. Immunhistochemische Methoden	67
2.2.3.1. Hämalun-Eosin-Färbung	67
2.2.4. Statistik	71
3. ERGEBNISSE	72
3.1. Telomere, Telomeraseaktivität und hTERT mRNA-Expression als diagnostische bzw. prognostische Marker	72
3.1.1. Telomerlänge, Telomeraseaktivität und hTERT mRNA-Expression bei kindlichen Weichteilsarkomen	72
3.1.1.1. Telomerlänge von Weichteilsarkomzelllinien	72
3.1.1.2. Telomeraseaktivität von Weichteilsarkomzelllinien	78
3.1.1.3. hTERT mRNA-Expression von Weichteilsarkomzelllinien	82
3.1.2. Telomerlänge, Telomeraseaktivität und hTERT mRNA-Expression bei akuter lymphoblastischer Leukämie vom T-Zell-Typ (T-ALL)	86
3.1.2.1. Telomerlänge und T-ALL	86
3.1.2.2. Telomeraseaktivität und T-ALL	88
3.1.2.3. hTERT mRNA-Expression und T-ALL	91
3.1.3. Telomeraseaktivität bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen	96
3.1.3.1. Telomeraseaktivität in Kolonbiopsien verschiedener Patientengruppen	96
3.1.3.1.1. Immunhistochemische Charakterisierung der Kolonbiopsieproben	96
3.1.3.1.2. Telomeraseaktivität in Kolonbiopsien verschiedener Patientengruppen	97
3.1.3.1.3. Telomeraseaktivität und Patienten- bzw. Krankheitsfaktoren	99
3.2. Telomere und Telomerase als Angriffspunkte für pharmakologische Interventionen	105
3.2.1. Austestung von Telomeraseinhibitoren	105
3.2.1.1. Effekte der Telomeraseinhibitoren im zellfreien TRAP-Assay	105
3.2.1.2. Effekte der Telomeraseinhibitoren in der Zellkultur	106
3.2.2. Modellsysteme zur Untersuchung der Wirkung von Telomeraseinhibitoren	110
3.2.2.1. Etablierung eines Zellmodells zur Testung von Telomeraseinhibitoren- A-549-Zellen als Testmodell	110
3.2.2.1.1. Cisplatin und Proliferationsverhalten von A-549-Zellen	110
3.2.2.1.2. Telomeraseaktivität und Cisplatin	114
3.2.2.1.3. Telomerlänge und Cisplatin	117
3.2.2.1.4. Morphologische Veränderungen der A-549-Zellen	118
3.2.2.1.5. Zellzyklus und Cisplatin	119
3.2.2.2. p53-Status von Weichteilsarkomzellen	121

4. DISKUSSION	123
5. ZUSAMMENFASSUNG	144
6. LITERATURVERZEICHNIS	147
EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	158
DANKSAGUNG	159
LISTE DER AKADEMISCHEN LEHRER	161
LEBENS LAUF	162

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
A/C/G/T/N	Adenin/Cytosin/Guanin/Thymin/Nukleotide
Abb.	Abbildung
A	Ampere
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar(e)
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Copy DNA
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propansulfonat
CSPD	3-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz
CDP	2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat, Dinatriumsalz
C _T	Threshold cycle
Da	Dalton
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
D-Loop	displacement-loop
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-Immunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay)
FA	Formaldehyd
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	fötales Kälberserum
FET	Fluoreszenzenergietransfer
f	femto
h	Stunde
HE	Hämalaun-Eosin
HIV	human immunodeficiency virus
HPV E6	human papillomavirus E6
hTERT	katalytische Untereinheit der Telomerase (human telomerase reverse transcriptase)
hTERT _N	normalisierte hTERT-Expression
hTR	RNA-Komponente der Telomerase (human telomerase RNA)
IC _{50/90}	Konzentration, die zu einer 50/90%-igen Hemmung der Zellproliferation (bzw. Telomeraseaktivität) führt
INK	Inhibitoren von Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6
IR	Infrarot
IS	Interner Standard
k	Kilo-
kb	Kilobase
l	Liter
M	molar
m	Milli-
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

mRNA	Boten (messenger)-RNA
MW	Mittelwert
μ	mikro
μm	Mikrometer
n	Anzahl der untersuchten Proben
nM	Nanomolar
Na-Acetat	Natriumacetat
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PHA	Phytohämagglutinin
p	pico-
PNA	peptide nucleic acid
pRb	Retinoblastom-Protein
Rf	Retentionsfaktor (hier: Ausdruck der Laufstrecke einer Probe im Agarosegel im Vergleich zur Gesamtlaufstrecke)
Rn	normalisiertes Reportersignal
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	kleine nukleäre (small nuclear) RNA
SSC	Natriumcitrat (sodium salt citrate)
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
T-ALL	akute lymphoblastische Leukämie der T-Zellreihe
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
Taq Polymerase	Thermus aquaticus DNA Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TDC	test drug concentration
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
t-Loop	telomeric loop
TMB	Tetramethylbenzidin
TRAP	Telomeric Repeat Amplification Protocol
TRF	Telomer-Restriktionsfragmente (hier: synonym für Telomerlänge)
TRF1, 2	Telomer-bindende Proteine 1, 2 (telomeric repeat binding factor 1, 2)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-) Aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TS	Telomerasesubstrat
TSR8	Telomerasesubstrat, das um 8 repetitive Telomersequenzen verlängert ist
U	Einheit (unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VT	Volumenteil
WTS	Weichteilsarkom
w/v	Masse/Volumen

1. Einleitung

1.1. Telomere und Telomerase

Nach den Anfängen der Telomerforschung in den dreißiger und vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts stieg Mitte der neunziger Jahre das Interesse in der onkologischen Grundlagenforschung für die Telomere und das Enzym Telomerase. Zur Zeit beschäftigen sich viele Forschungsgruppen weltweit mit diesem Thema, um einen Beitrag zum besseren Verständnis der komplexen Telomer- und Telomerasebiologie zu leisten.

1.1.1. Telomere

Telomere als „Schutzkappen“ der Chromosomen

Die Grundlagen für die heutige Telomerforschung schufen in den dreißiger und vierziger Jahren des vorigen Jahrhunderts die späteren Nobelpreisträger Hermann J. Müller und Barbara McClintock am Institut für Tiergenetik in Edingburgh und an der Universität von Missouri in Columbia. Den Begriff „Telomer“, abgeleitet aus dem Griechischen τέλος (*telos*, Ende) und μέρος (*meros*, Teil), prägte der Genetiker H. J. Müller 1938. Er bezeichnete die terminalen Chromosomenenden als „Telomere“ und erkannte ihre Bedeutung für die Stabilität der Chromosomen. Mit Hilfe von Röntgenstrahlen erzeugte er Brüche in den Chromosomen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und fand dabei heraus, dass nach Bestrahlung wenigstens zwei neu gebildete Chromosomenenden für eine Fusion nötig waren, während die ursprünglich freien Chromosomenenden nicht miteinander fusionierten (Müller, 1938). Nur einige Jahre später (1941) wurden H. J. Müllers Beobachtungen von B. McClintock bestätigt, die Auswirkungen der mittels "breakage-fusion-bridge cycles" ausgelösten Chromosomenbrüche an Maispflanzen (*Zea mays*) untersuchte (McClintock, 1941). H. J. Müller und B. McClintock erkannten somit unabhängig voneinander, dass die Chromosomenenden eine spezielle Struktur aufweisen, die den Chromosomen Stabilität verleiht.

Erst ca. 40 Jahre später (1978) wurde erstmals die Telomerasequenz der Chromosomenenden des Ciliaten *Tetrahymena* von Joseph G. Gall und Elizabeth

Blackburn entschlüsselt, welche eine kurze G-reiche Sequenz - TTGGG – darstellt (Blackburn & Gall, 1978). Seitdem wurden die Telomersequenzen zahlreicher Lebewesen bestimmt, wobei der Aufbau der Telomere vom Einzeller bis hin zum Mensch durch eine T- und G- Nukleotid reiche, kurze, vielfach wiederholende Sequenz charakterisiert ist.

Im Jahre 1988 konnten Robert Moyzis und seine Mitarbeiter die aus 6 Basen bestehende menschliche Telomersequenz - TTAGGG – identifizieren (Moyzis et al., 1988). Im Gegensatz zur Telomersequenz, die nur aus wenigen Basen aufgebaut ist, bestehen Telomere aus einer Vielzahl sich wiederholender Sequenzen ("Repeats") doppelsträngiger DNA, einem überhängenden Einzelstrang sowie assoziierten Proteinen. Aufgrund des sogenannten „Endreplikationsproblems“ bildet der G-reiche Strang der Telomere einen überhängenden Einzelstrang am 3'-Ende des Chromosoms. Die Anzahl der reinen Telomer-Sequenzen ist variabel und unterscheidet sich von Art zu Art. Während beim Mensch die Telomerlänge zwischen 5 und 15 kb beträgt (Morin, 1989), weist die Maus 5- bis 10-mal längere Telomere auf (Forsyth et al., 2002). Diese nicht kodierenden Nukleoproteinstrukturen schützen die Chromosomenenden vor enzymatischer Degradation, Rekombination und Fusionen mit anderen Chromosomenenden (Blackburn, 1991; Vaziri & Benchimol, 1996). Neben dieser „Schutzkappen“-Funktion spielen die Telomere eine wichtige Rolle bei der Paarung der homologen Chromosomen während der Meiose (Morin, 1997). Ein Verlust der „Kappenfunktion“ kann sich in terminalen Fusionen (dizentrische Chromosomen) und chromosomaler Instabilität äußern (Counter et al., 1992).

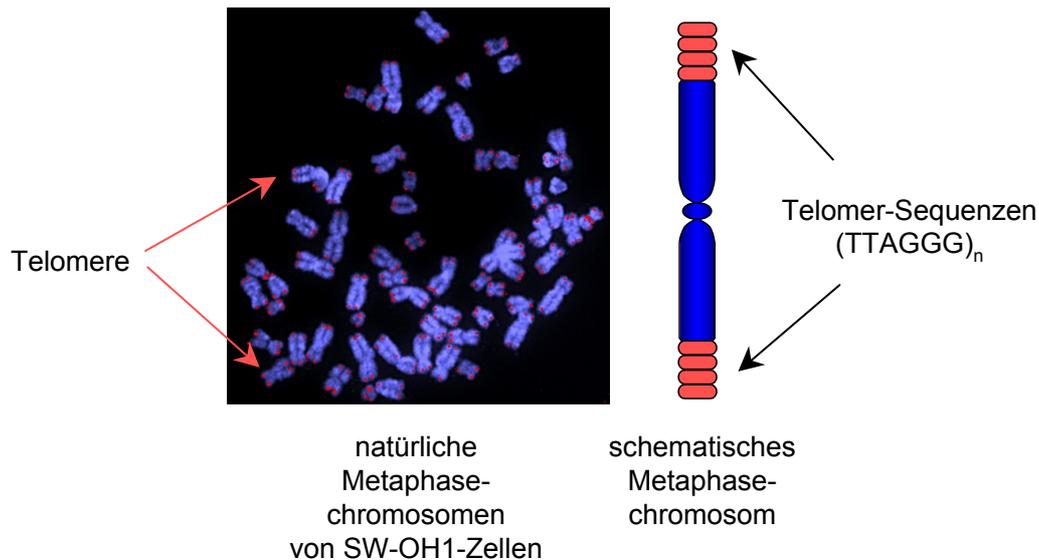


Abb. 1.1: Telomere bilden die Chromosomenenden. Telomere: rot-gefärbt, chromosomale DNA: blau-gefärbt (Schema adaptiert nach Keith et al., 2001).

Telomerstruktur

Bislang wurden verschiedene Telomer-bindende Proteine in Säugerzellen identifiziert, die an den doppelsträngigen Telomerbereich oder an den Einzelstrang binden (Blasco, 2002). Als Telomer-bindende Proteine wurden beim Menschen TRF1 (telomeric repeat binding factor 1) und TRF2 (telomeric repeat binding factor 2) charakterisiert. Während TRF1 über einen negativen "feed back"-Mechanismus die Telomerlänge reguliert (van Steensel & de Lange, 1997), verhindert TRF2 die Fusionen der Chromosomenenden, indem es zum Erhalt des einzelsträngigen Telomerbereichs beiträgt (van Steensel et al., 1998). Zwei TRF1 beeinflussende Proteine wurden beschrieben: *In vitro*-Untersuchungen zeigten eine modifizierende Wirkung des Enzyms Tankyrase (TRF1-interacting, ANKYrin-related ADP-ribose polymerase) auf TRF1. Tankyrase hebt die Bindung von TRF1 an die Telomer-DNA auf, so dass die Telomer-DNA für das Enzym Telomerase zugänglich wird (Smith et al., 1998; Zhu et al., 1999). Im Gegensatz dazu wird die Bindung von TRF1 an die Telomere durch TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2) vermittelt (Kim et al., 1999). Neben den TRF1 bindenden Proteinen wurde hRap1 (TRF2-interacting telomeric protein Rap1), als TRF2 bindendes Protein beschrieben, welches an der Regulation der Telomerlänge beteiligt ist (Li et al., 2000a). In Säugerzellen wurde ein Zusammenhang zwischen dem Protein Ku86 - eine Untereinheit der DNA-

abhängigen Proteinkinase - und Telomeren identifiziert (Hsu et al., 1999). So führt die Abwesenheit von Ku86 zu einem verstärkten Auftreten von Chromosomenfusionen (Hsu et al., 2000; Samper et al., 2000).

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte die spezielle Formation der Chromosomenenden nachgewiesen werden, welche die „Schutzkappenfunktion“ der Telomere ermöglicht. In diesen Versuchen wurde gezeigt, dass die Chromosomenenden kein stumpfes Ende, sondern eine sogenannte „Loop-Struktur“ bilden, die durch die Telomer-bindenden Proteine und dem überhängenden Einzelstrang von etwa 200 bis 300 bp vermittelt wird (Griffith et al., 1999; Wright et al., 1997). Dabei bildet die doppelsträngige Telomer-DNA den t (telomeric) -Loop, während das freie 3'-Ende der Telomere den doppelsträngigen Telomerbereich durchbricht und den D (displacement) -Loop formiert. Die Hauptfunktion der Telomer-bindenden Proteine TRF1 und TRF2 scheint in der Stabilisierung dieser Loop-Struktur zu liegen (Griffith et al., 1999; siehe Abb. 1.2).

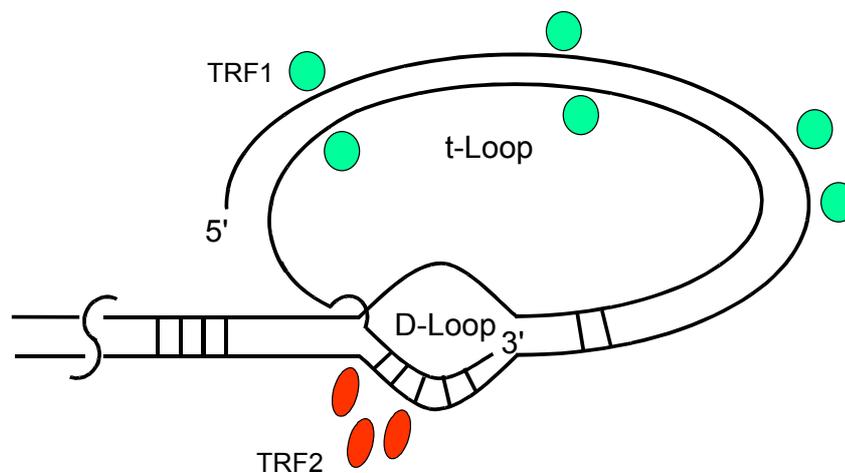


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Loop-Struktur von Chromosomenenden (adaptiert nach Dhaene et al., 2000). TRF1, 2: Telomer-bindende Proteine 1, 2; t-Loop: telomeric-Loop, D-Loop: displacement-Loop.

Durch die Ausbildung dieser Loop-Struktur sind die Chromosomenenden vor enzymatischer Degradation und Interaktionen mit anderen Chromosomenenden geschützt. Solange die Formation der Loop-Struktur aufrechterhalten bleibt, sind die Chromosomenenden für das Enzym Telomerase nicht zugänglich und eine Telomer-Verlängerung durch Telomerase ist nicht möglich.

Telomere und das „Endreplikationsproblem“

Dem zu Beginn des 20. Jahrhunderts (1908) von Alexis Carrel aufgestellten Konzept, dass Vertebraten-Zellen in der Zellkultur eine unbegrenzte Lebensspanne aufweisen, widersprachen 1961 die Beobachtungen von Hayflick und Moorhead. Sie demonstrierten, dass fötale humane Fibroblasten nur eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen durchlaufen, bevor sie ihr Wachstum einstellen (Hayflick & Moorhead, 1961). Dieser Zustand der „Seneszenz“, der auch als Hayflick-Limit bezeichnet wird, hängt nicht vom Alter der Zellen ab, sondern von der Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen („replikative Seneszenz“). Alexei M. Olovnikov beschrieb Anfang der 70er Jahre den Zusammenhang zwischen dem Verlust von Telomersequenzen aufgrund des sogenannten Endreplikationsproblems und der dadurch ausgelösten replikativen Seneszenz (Olovnikov, 1973). Der Nobelpreisträger James D. Watson, der Mitentwickler des Doppelhelix-Modells der DNA, beschrieb 1972 unabhängig von Olovnikov ebenfalls das „Endreplikationsproblem“ (Watson, 1972). Da Olovnikovs „Theory of Marginotomy“ ursprünglich in russischer Sprache geschrieben worden war, wurde seine Theorie erst 1973 mit der Übersetzung ins Englische weltweit bekannt.

Das Endreplikationsproblem besteht in der Unfähigkeit der konventionellen DNA-Polymerasen, die Replikation linearer DNA vollständig durchzuführen. Um neue Tochterstränge zu synthetisieren, benötigt die Polymerase kurze, 8-12 bp umfassende, RNA-Sequenzen, sogenannte Primer, von denen aus die Polymerisation in 5'-3'-Richtung gestartet wird. Im Anschluss an die Synthese werden die RNA-Sequenzen wieder entfernt und die entstandenen Lücken durch eine von einem weiter stromaufwärts liegenden Primer ausgehenden Polymerisation aufgefüllt. Die Entfernung der Primer am 5'-Ende führt jedoch zur Verkürzung des Tochterstrangs und Bildung eines 3'-Überhanges. Somit würde ohne Möglichkeit einer Kompensation jede weitere Zellteilung zu einem progredienten Verlust der schützenden Telomer-DNA und schließlich zum Verlust von kodierenden Chromosomenbereichen führen.

Die Chromosomenenden normaler somatischer Zellen verlieren aufgrund des beschriebenen Endreplikationsproblems bei jeder Zellteilung 50 – 200 bp. Bei Erreichen einer kritischen Telomerlänge wird über die Zellzyklus kontrollierenden Proteine p53 und pRb das „Mortalitätsstadium 1“ (M1, „Hayflick-Limit“) ausgelöst.

Daher bezeichnet man die Telomere auch als eine Art „mitotische Uhr“, welche die Anzahl der möglichen Zellteilungen bis zum Erreichen der kritischen Telomerlänge (Hayflick-Limit) determiniert. *In vitro* können Zellen z. B. durch Transfektion mit viralen Onkogenen (z. B. SV40T, HPV E6) das M1-Stadium umgehen. *In vivo* wird dieser Vorgang z.B. bei der Entstehung von Tumorzellen durch Mutationen in Genen wie p53 und pRb/p16^{INK4a} beobachtet. Die Zellen können sich weiter teilen bis sie aufgrund starker Chromosomenschäden (Deletions- und Translokationschromosomen), die durch starke Telomerverkürzung ausgelöst werden, absterben. Nur einzelnen Zellen (1 von 10⁷) gelingt es (Shay & Wright, 2001), dieses „Mortalitätsstadium 2“ (M2), auch "crisis" genannt, durch Reaktivierung des Enzyms Telomerase zu überwinden. Da die Zellen nun die Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation erhalten haben, wird die Telomerase auch als das „Unsterblichkeitsenzym“ bezeichnet (Chiu & Harley, 1997; Counter et al., 1992).

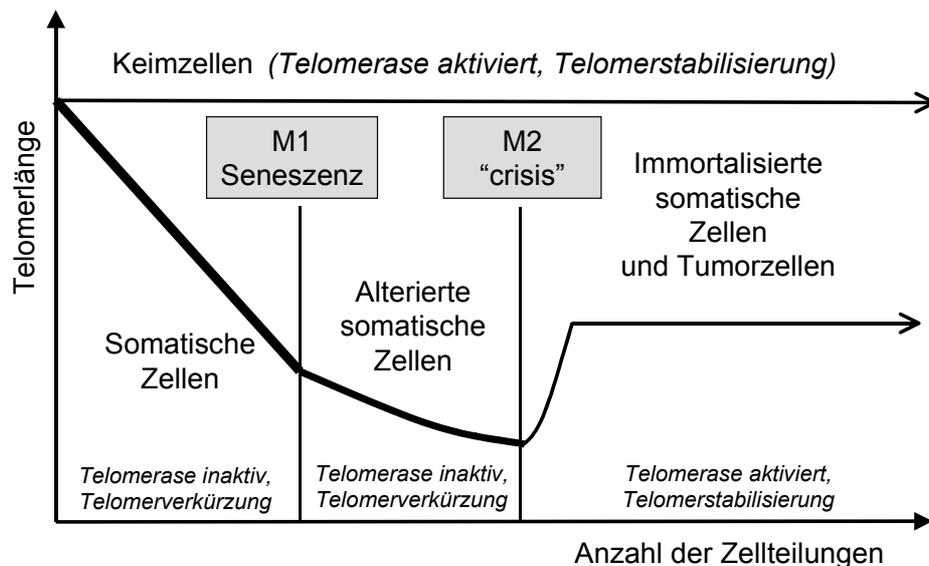


Abb. 1.3: Telomer-Hypothese der Zellalterung und Immortalisierung (modifiziert nach Rohde et al., 1998).

1.1.2. Telomerase

Aufbau der Telomerase

Carol W. Greider und Elizabeth H. Blackburn beschrieben 1985 erstmals bei der Protozoenart *Tetrahymena* die Aktivität des bis dahin unbekanntes Enzyms Telomerterminal-Transferase, welches auch als Telomerase bezeichnet wird (Greider & Blackburn, 1985). Vier Jahre später wurde Telomerase erstmals in einer humanen Tumorzelllinie entdeckt (Morin, 1989). Die humane Telomerase, eine Reverse Transkriptase, stellt einen multimerischen Enzymkomplex dar, der aus einer RNA-Komponente, einer katalytischen Untereinheit und mehreren assoziierten Proteinen besteht. Mittels der internen RNA-Komponente ist die Telomerase zur De-novo-Synthese telomerischer DNA befähigt. Trotz intensiver Untersuchungen in den letzten Jahren ist es bis heute noch nicht gelungen, die Struktur der humanen Telomerase mit einem Molekulargewicht von ca. 1000 kDa vollständig aufzuklären. Die RNA-Komponente der menschlichen Telomerase hTR (human telomerase RNA) besteht insgesamt aus ca. 450 Nukleotiden, die wiederum einen 11 bp umfassende RNA-Matrize (5'-CUAACCCUAAC-3') beinhaltet, die komplementär zur Telomerasequenz ist (Feng et al., 1995).

1997 wurde erstmals die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase hTERT (human telomerase reverse transcriptase) identifiziert und kloniert (Kilian et al., 1997; Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997). Das hTERT-Gen ist auf Chromosom 5 lokalisiert, umfasst mehr als 35 kb und besteht aus 16 Exons und 15 Introns (Cong et al., 1999; Wick et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass das aus 1132 Aminosäuren bestehende 127-kDa Protein die konservierten Motive 1, 2 und A bis E bekannter Reverser Transkriptasen (RT) enthält. Zusätzlich ist das hTERT-Protein neben diesen RT-Domänen durch ein Telomerase-spezifisches T-Motiv gekennzeichnet (Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997). Diese Telomerase-spezifische T-Domäne scheint eine wichtige Rolle zu spielen bei der Bindung der RNA-Komponente an die katalytische Untereinheit hTERT (Lai et al., 2001).

Das Telomerase-spezifische T-Motiv und die 7 RT-Motive sind in unterschiedlichen Exons lokalisiert. So befindet sich das T-Motiv in Exon 3, die RT-Motive 1 und 2 in Exon 4, das RT-Motiv B in Exon 9, das RT-Motiv C in Exon 10 und die RT-Motive D und E in Exon 11. Das RT-Motiv A wird durch die beiden Exons 5 und 6 kodiert (Wick

Telomerase bindet. Nach Translokation der Telomerase kann eine neue Elongationsrunde starten.

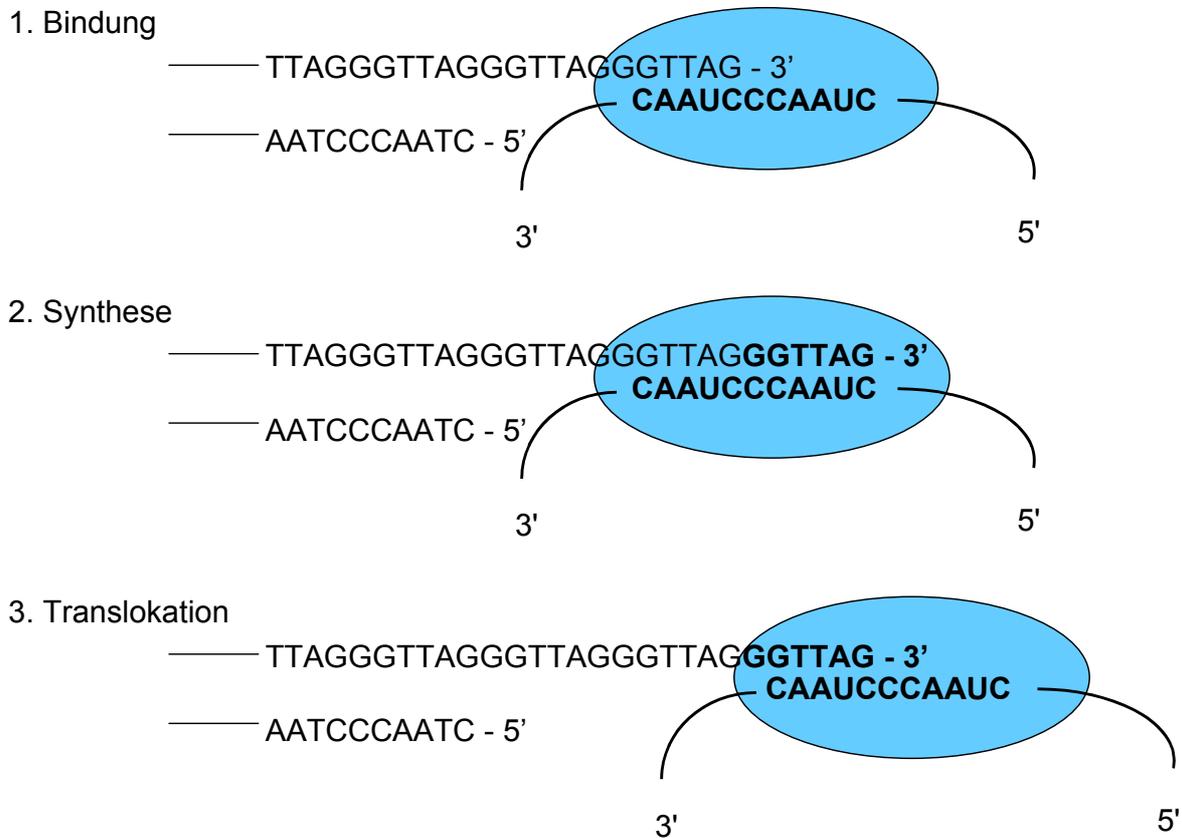


Abb. 1.5: Schematische Arbeitsweise der Telomerase (adaptiert nach Rohde et al., 1998).

Während die Verlängerung des G-reichen Überhangs durch das Zusammenwirken der katalytischen Untereinheit hTERT und der RNA-Komponente hTR der Telomerase erfolgt, wird der C-reiche Strang am 5'-Ende durch konventionelle DNA-Polymerasen verlängert (Greider, 1996).

Telomerase und ihre Bedeutung

Durch die Expression des Enzyms Telomerase besitzen Zellen die Fähigkeit zu unbegrenzter Proliferation, während Zellen ohne Telomerase aufgrund des Telomer-Verlustes mit einem Wachstumsstopp reagieren. Nachdem 1994 von Kim und seinen Mitarbeitern ein sensitiver TRAP (telomeric repeat amplification protocol) - Assay für die Messung der Telomeraseaktivität in biologischen Proben beschrieben worden war (Kim et al., 1994), wurden mehr als 1000 Studien durchgeführt, in denen

die Telomeraseaktivität von Tumorproben untersucht wurde. Unabhängig von der Art des Tumors wurde in mehr als 85% aller Tumore die Expression des Enzyms Telomerase festgestellt, während im Normalgewebe keine Aktivität nachweisbar war (Shay & Bacchetti, 1997). Somit wird die Telomerase zur Zeit als der universellste Tumormarker betrachtet (Hiyama & Hiyama, 2003).

Beim Menschen ist Telomerase während der Embryonalentwicklung in allen Geweben exprimiert und wird zum Zeitpunkt der Geburt in somatischen Zellen bis auf wenige Ausnahmen ausgeschaltet (Ulaner & Giudice, 1997; Wright et al., 1996). Zellen der Keimbahn zeigen eine hohe Telomeraseaktivität und können auf diese Weise die ursprüngliche Telomerlänge erhalten (Wright et al., 1996). Im Gegensatz zu den Keimzellen reicht die geringe Enzymaktivität in Basalzellen von Haut- und Schleimhaut (Harle-Bachor & Boukamp, 1996), Haarfollikeln (Ramirez et al., 1997), Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts (Bachor et al., 1999), hämatopoetischen Stammzellen sowie B- und T-Lymphozyten (Weng et al., 1998) nicht aus, um die Telomere vor einer kritischen Längenverkürzung zu bewahren.

Telomerase als diagnostischer Marker

Aufgrund der bereits erwähnten hohen Telomerase-Expression in malignen Zellen im Vergleich zu nicht malignen Zellen scheint die Telomerase als klinisch-diagnostischer Tumormarker geradezu prädestiniert. Die Entwicklung des hoch sensitiven TRAP-Assays, welcher eine Telomeraseaktivitätsbestimmung in einem Extrakt mit nur 50 telomerasepositiven Zellen erlaubt, ermöglicht die Bestimmung des Enzyms in sehr kleinen Proben (z.B. Feinnadelbiopsien) unterschiedlicher Gewebetypen. Neben der Bestimmung von Telomerase in Gewebeproben ist der Nachweis des Enzyms auch in Blut-, Urin- und Stuhlproben sowie in Spüllösungen der Lunge und der Harnblase möglich.

Dass der TRAP-Assay eine sehr sensitive Methode darstellt, konnte in einer prospektiven Studie gezeigt werden. In dieser Studie wurden Feinnadelbiopsien, die von 220 Patientinnen mit Mammatumoren stammten, auf Telomeraseaktivität untersucht. Da die Feinnadelbiopsie ein einfaches und risikoarmes Verfahren der Biopsie darstellt, ist ihr klinischer Einsatz zur Gewinnung von Zellmaterial für zytologische Untersuchungen weit verbreitet. Parallel zur Telomeraseaktivitätsbestimmung wurden zytologische Untersuchungen anhand dieser Biopsien

durchgeführt. Zusätzlich wurden die Proben nach operativem Eingriff histologisch beurteilt. Im Rahmen dieser Vergleichsstudie konnte die Überlegenheit der Sensitivität (77% vs. 67%) und Spezifität (93% vs. 72%) des TRAP-Assays gegenüber der konventionellen zytologischen Diagnose gezeigt werden. Die Bestimmung der Telomeraseaktivität könnte somit die herkömmlichen zytologischen Untersuchungsmethoden ergänzen, um die Anzahl falsch-negativer Ergebnisse zu reduzieren (Hiyama et al., 2000).

Schätzungsweise werden 50% der Blasen Tumoren mittels der konventionellen zytologischen Untersuchungsmethoden nicht erkannt (Granger et al., 2002). Auch für diese Tumorart konnte beschrieben werden, dass die Bestimmung der Telomeraseaktivität in Spülflüssigkeiten der Harnblase im Vergleich zu den zytologischen Analysen eine sensitivere Methode zur Identifizierung des Tumors darstellt (Kinoshita et al., 1997).

Telomerase als prognostischer Marker

In zahlreichen Studien wurde versucht, die Expression des Enzyms Telomerase mit dem klinischen Verlauf verschiedener Tumorentitäten zu korrelieren. In einem klassischen Beispiel für die mögliche Bedeutung der Telomeraseaktivität als klinischer Prognosefaktor konnte eine Korrelation zwischen der Telomeraseaktivität und der Aggressivität von Neuroblastomen gezeigt werden (Hiyama et al., 1995a). Neuroblastome sind die häufigsten extrakraniellen soliden Tumore im Kindesalter, die sich von unreifen Zellen des sympathischen Nervensystems ableiten. Das biologische Verhalten der Neuroblastome, welches sich im klinischen Verlauf äußert, ist sehr variabel. In der Anzahl dominieren die disseminierten Neuroblastome des Stadiums 4. Tumore dieses Stadiums zeigen ein sehr aggressives Verhalten und sind trotz multimodaler Therapie nicht heilbar. Im Gegensatz zu Kindern mit Neuroblastomen des Stadiums 4 wird für Patienten mit Neuroblastomen der Stadien 1, 2 und 4S eine bessere Prognose beschrieben. Neuroblastome des Stadiums 4S zeigen häufig Spontanremissionen (Humpl & Gutjahr, 1999). In der Studie von Hiyama et al. wiesen Patienten mit einem Neuroblastom des fortgeschrittenen Stadiums 4 hohe Telomeraseaktivitäten auf, während bei der Sonderform des Stadiums 4 (4S), die auf Säuglinge bis zum 12. Lebensmonat beschränkt ist und eine gute Prognose hat, keine oder nur eine geringe Telomeraseaktivität nachzuweisen

war. Somit könnten die Spontanremissionen und die gute klinische Prognose der Neuroblastome des Stadiums 4S durch das Fehlen oder die geringe Telomeraseaktivität mit zu erklären sein.

Für andere Tumorarten, wie den Meningiomen (Langford et al., 1997), Magenkarzinomen (Kakeji et al., 2001), kolorektalen Karzinomen (Tatsumoto et al., 2000) und akuten Leukämien (Ohyashiki et al., 1997), konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und der Prognose der Erkrankung festgestellt werden. In diversen Studien wurde das Ausmaß der Telomeraseaktivität in Abhängigkeit vom Tumorstadium der Erkrankung untersucht. So konnte z.B. bei Patientinnen mit Mammakarzinomen eine Korrelation zwischen Tumorstadium und Telomeraseaktivität beobachtet werden (Hiyama et al., 1996); auch für Tumore des Magens (Hiyama et al., 1995b; Tatsumoto et al., 2000) konnte dieser Zusammenhang gezeigt werden.

Nach den derzeitig vorliegenden Daten scheint der Nachweis der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT nicht als Surrogatparameter für die Telomeraseaktivität dienen zu können. So konnte zwar für hepatozelluläre Karzinome, Hauttumore, Weichteilsarkome und Zervixtumore eine Korrelation zwischen Expression von hTERT und Telomeraseaktivität beschrieben werden (Hisatomi et al., 1999; Takakura et al., 1998; Wu et al., 1999a; Yan et al., 1999a), ein Zusammenhang zwischen beiden Parametern war jedoch nicht in jedem Fall gegeben. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand scheint die Bestimmung einer funktionellen aktiven Telomerase der am besten geeignete Parameter zu sein, um Aussagen über Diagnose und Prognose von Tumorerkrankungen treffen zu können.

Telomerlänge als diagnostischer bzw. prognostischer Marker

In verschiedenen Studien wurde untersucht, inwiefern die Bestimmung der Telomerlänge von Tumorzellen von klinischer Bedeutung ist. Da Tumorzellen mehr Zellteilungen absolviert haben als normale gesunde Zellen, sind bei Tumorzellen trotz Telomeraseaktivität kürzere Telomerlängen zu erwarten als im gesunden Gewebe (Counter et al., 1992; Counter et al., 1994; Strahl & Blackburn, 1996). Dieser nach der Telomerhypothese postulierte Zusammenhang konnte in verschiedenen Untersuchungen bestätigt werden (de Lange et al., 1990; Engelhardt et al., 1997a; Hastie et al., 1990). Für einige Tumore wurden nicht nur verkürzte

Telomere, sondern auch unveränderte oder verlängerte Telomere im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt. Diese Beobachtungen wurden z.B. für das Nierenzellkarzinom (Dahse et al., 1996) und für das Basalzellkarzinom (Wainwright et al., 1995) gemacht. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse scheint die Bestimmung der Telomerlänge im Gegensatz zur Telomeraseaktivität nicht als Diagnosefaktor klinisch anwendbar zu sein.

Hinsichtlich des Potentials der Telomerlänge als Prognosefaktor von Tumorerkrankungen wurde für Neuroblastome (Hiyama et al., 1992), Brustkrebs (Odagiri et al., 1994) und Hirntumore (Hiraga et al., 1998) ein Zusammenhang zwischen einer schlechten klinischen Prognose und einer Verkürzung der Telomere beschrieben. Im Gegensatz dazu finden sich bei Patienten mit Bronchialkarzinomen (Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom) verlängerte Telomere, die mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert sind (Shirotani et al., 1994). Neben Untersuchungen zur Telomerlänge bei soliden Tumoren wurden Studien bei verschiedenen Leukämiearten durchgeführt. So konnte z. B. bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) gezeigt werden, dass die Bestimmung der Telomerlänge als Marker für den Krankheitsverlauf bzw. Schweregrad der Erkrankung fungieren könnte. Tumorzellen, die sich in der Blastenkrise befanden, zeigten kürzere Telomere als vor der Krise. Darüber hinaus zeigten Patienten zu einem frühen Stadium der Erkrankung längere Telomere (Iwama et al., 1997). Somit könnte die Telomerlänge bei leukämischen Erkrankungen als prognostischer Tumormarker für den Krankheitsverlauf und als Parameter für ein Ansprechen auf die Therapie dienen.

Bedeutung der Telomerase für die Tumorthherapie

Die traditionelle Behandlung von Tumorerkrankungen besteht aus einer Bestrahlungstherapie des Tumors, einer operativen Entfernung des Tumors oder einer systemischen Therapie mit z.B. Zytostatika sowie aus einer Kombination dieser unterschiedlichen Verfahren. Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Körperzellen im wesentlichen durch eine der (physiologischen) Wachstumskontrolle entzogenen gesteigerten Zellteilungsrate. Da Zytostatika nur an proliferierenden, d.h. sich in einer Phase des Zellzyklus, nicht jedoch in der G₀-(Ruhe-)Phase befindlichen Zellen wirksam werden, können auch gesunde Gewebe mit einem hohen Zellumsatz

(Knochenmark/Hämatopoese, Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts, Haarwurzeln, Keimdrüsen) geschädigt werden. Darüber hinaus sprechen viele Tumorzellen durch Entwicklung von Resistenzmechanismen nicht mehr auf diese chemotherapeutischen Substanzen an. Neue Therapiestrategien wie die gezielte Hemmung spezifischer Tumormarker könnten somit einen Beitrag zur Optimierung der Tumortherapie leisten.

Da im Gegensatz zu den meisten normalen somatischen Zellen in mehr als 85% aller malignen Tumore eine hohe Telomeraseaktivität nachweisbar ist, stellt die Hemmung dieses „Unsterblichkeitsenzym“ einen neuen, vielversprechenden Ansatz in der Therapie verschiedener Tumoren dar. Ziel der Telomeraseinhibition ist die Wiederherstellung der Mortalität von Zellen. Die Induktion von Zellseneszenz bzw. Zelltod kann durch Erreichen einer kritischen Telomerlänge oder durch Destabilisierung der Telomerstruktur erfolgen (Karlseder et al., 2002). Somit stellen das Enzym Telomerase und die Telomere Zielstrukturen für eine Krebstherapie dar. Da es sich bei der Telomerase um einen multimerischen Enzymkomplex handelt, bieten die einzelnen Bausteine, die dem Enzym seine Funktionalität verleihen, verschiedene Angriffspunkte für pharmakologische Interventionen.

Mit Hilfe dominant negativer hTERT (DN-hTERT) exprimierender Tumorzellen konnte das Prinzip der Telomeraseinhibition nachgewiesen werden. Außer in Zellkulturexperimenten konnte auch *in vivo* durch die Einführung DN-hTERT exprimierender Ovarialkarzinomzellen in Nacktmäuse das Tumorstadium im Vergleich zu Zellen mit dem Wildtyp bzw. dem Kontrollvektor eingeschränkt werden (Hahn et al., 1999).

Bislang wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren identifiziert, die eine Rolle in der Regulation der hTERT-Genexpression spielen (Kyo et al., 2000). So wurde eine Erhöhung der Telomeraseaktivität basierend auf einem Anstieg der hTERT mRNA-Transkription durch c-myc als Transkriptionsfaktor beschrieben worden (Wu et al., 1999b). Es konnte gezeigt werden, dass eine „Herab-Regulation“ der c-myc-Expression zu einer Abnahme der Telomeraseaktivität führte (Grand et al., 2002). Weiterhin konnte durch gezielte Hemmung der RNA-Komponente der Telomerase (hTR) durch (modifizierte) Antisense-Oligonukleotide (PNA-Moleküle (peptide nucleic acid), 2'-O-Methyl-RNA und 2', 5'-Oligoadenylat) eine Telomeraseinhibition erreicht werden (Glukhov et al., 1998; Herbert et al., 1999; Kondo et al., 1998a; Norton et al., 1996).

Eine weitere Möglichkeit der Hemmung der Telomeraseaktivität besteht in der Inhibition der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT. Die ersten Versuche zur Hemmung der hTERT wurden mit dem in der HIV-Therapie eingesetzten Reverse Transkriptase-Inhibitor Azidothymidin durchgeführt. In den meisten Studien konnte trotz einer Telomeraseinhibition bzw. Telomerverkürzung keine Induktion von Seneszenz oder Apoptose nach Behandlung mit Azidothymidin gezeigt werden (Gomez et al., 1998; Melana et al., 1998; Murakami et al., 1999; Strahl and Blackburn, 1996). Experimentelle Erfolge wurden mit der von Böhlinger Ingelheim entwickelten Substanz BIBR1532 (2-[(E)-3-naphtalen-2-yl-but-2-enoylamino]-benzoesäure; siehe Abb. 1.6) erzielt. Bei dieser Substanz handelt es sich um einen nicht nukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitor, der in Zellkulturversuchen bei verschiedenen Tumorzelllinien zu einer Verkürzung der Telomere und zu einem seneszenten Phänotyp führte. Darüber hinaus konnte unter Einsatz dieses Inhibitors in einem Maus-Xenograft-Modell eine Reduktion der Tumorgrößen gegenüber Kontrolltieren festgestellt werden (Damm et al., 2001).

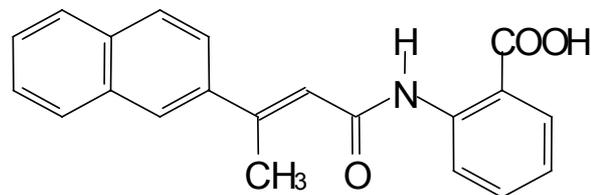


Abb. 1.6: Strukturformel des Telomeraseinhibitors BIBR1532.

Ein vielversprechender Ansatzpunkt für eine mögliche Telomerasehemmung basiert auf der Inhibition der Interaktion zwischen dem Enzym Telomerase und seinem Substrat, den Telomeren. Durch den hohen Anteil von Guaninbasen innerhalb der Telomere wird die Ausbildung einer G-Quadruplex-Struktur (siehe Abb. 1.7), einer Sekundärstruktur der DNA, ermöglicht, welche durch Rückfaltung des überhängenden freien Telomerendes zustande kommt. Da Telomerase nur an linearen Chromosomenenden binden kann, wird somit eine Interaktion zwischen dem Enzym und seinem Substrat verhindert. Diese indirekte Hemmung der Telomerase kann durch G-Quadruplex-stabilisierende Substanzen verstärkt werden. Die ersten *in vitro* eingesetzten Substanzen dieser Art waren unselektiv und interagierten auch mit DNA-Bereichen außerhalb des guaninreichen Telomereinzelsstrangs (Mergny et al., 1999). Zu den derzeitigen potenten und selektiven G-Quadruplex-interagierenden

Substanzen zählen neben designten Substanzen (u.a. Derivate des 9-Anilin-Proflavins, Triazine, Fluoroquinophenoxazine, pentacyclische Acridinderivate) auch Naturstoffe wie Telomestatin (Duan et al., 2001; Gowan et al., 2001; Kim et al., 2002; Koepfel et al., 2001; Read et al., 2001; Riou et al., 2002).

Das Acridinderivat BRACO19 (9-[4-(N,N-dimethylamino)phenylamino]-3,6-bis(3-pyrrolidinopropion-amido)acridin) repräsentiert einen der potentesten Telomeraseinhibitoren. Dabei liegen die Konzentrationen von BRACO19 für eine Hemmung der Telomeraseaktivität im zellfreien System im nanomolaren Bereich. In Zellkulturversuchen konnten durch micromolare BRACO19-Konzentrationen zellwachstumshemmende Effekte und Induktion von Seneszenz in Tumorzellen erzielt werden. Darüber hinaus wurden antitumorale Wirkungen *in vivo* anhand eines Maus-Xenograft-Modells beschrieben (Gowan et al., 2002).

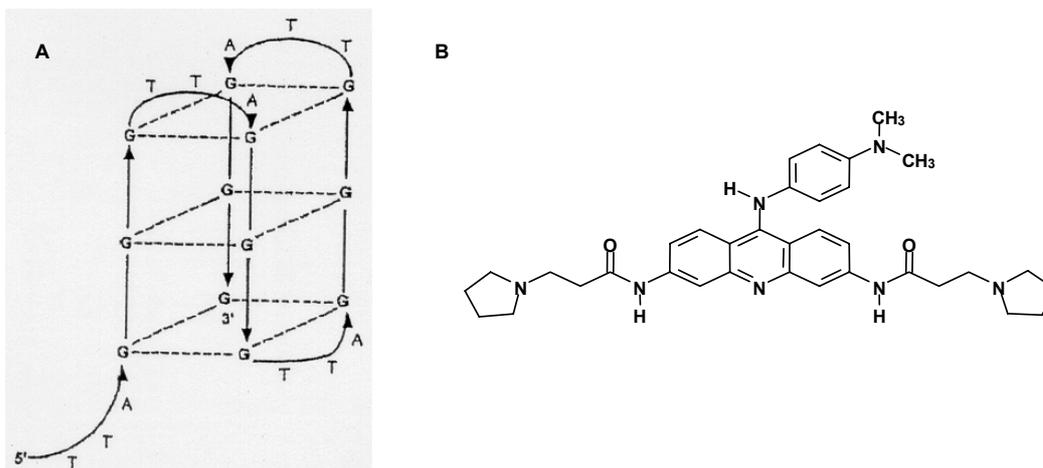


Abb. 1.7: G-Quadruplex-Struktur des guaninreichen Einzelstrangs der Telomere (A); Strukturformel der G-Quadruplex-stabilisierenden Substanz BRACO19 (B).

Wie bereits erwähnt, führt neben einer Destabilisierung der Telomerstruktur das Erreichen einer kritisch kurzen Telomerlänge zum Zelltod. Somit scheint der Einsatz von Telomeraseinhibitoren in erster Linie bei Tumoren mit sehr kurzen Telomeren sinnvoll zu sein, weil bei diesen ein schnellerer antiproliferativer Effekt zu erwarten ist als bei Tumoren mit langen Telomeren. Da jedoch für ein klinisches Ansprechen mehr als 20 Zellteilungen nötig sind, um die kritische Telomerlänge zu erreichen, ist mit einem verzögerten antiproliferativen Effekt zu rechnen (Lag-Phase). Infolgedessen sollten nach einer initialen Chemotherapie, Tumorresektion und/oder Bestrahlung Telomeraseinhibitoren über längere Zeit additiv zur Chemo- und/oder

Strahlentherapie angewendet werden, um ein Tumorwachstum während dieser Lag-Phase zu vermeiden (siehe Abb. 1.8).

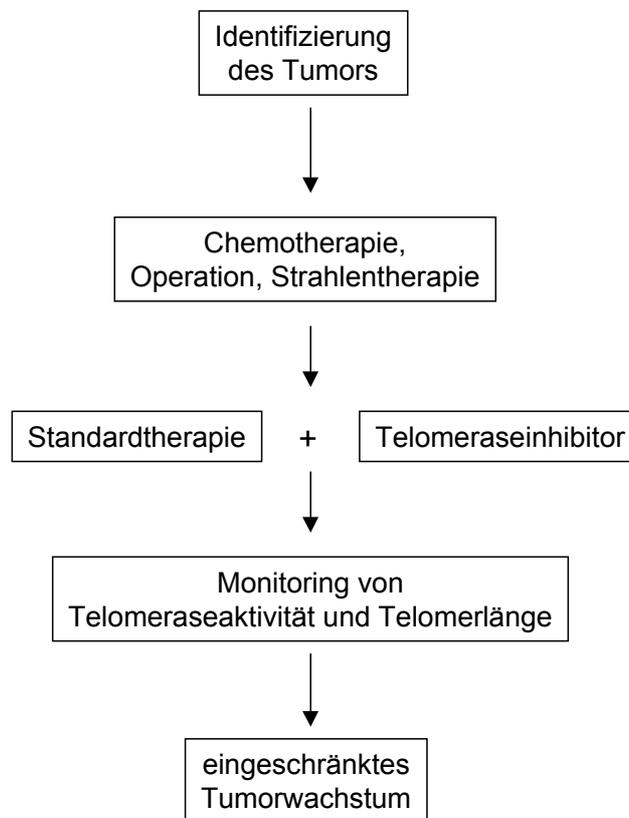


Abb. 1.8: Strategie für eine Therapie mit Telomeraseinhibitoren (nach Corey, 2002).

Weiterhin könnte der Einsatz von Telomeraseinhibitoren möglicherweise eine wichtige Bedeutung in der Therapie chemoresistenter Tumore haben. So konnte neben der wirksamen Telomeraseinhibition in Glioblastomzellen eine Sensitivierung der ursprünglich Cisplatin resistenten Zellen erzielt werden (Kondo et al., 1998b).

Ob eine kritische Telomerverkürzung oder Telomerdysfunktion zu Apoptose oder zusätzlicher genetischer Instabilität führt, könnte von der Funktionalität des Tumor-Suppressor-Proteins p53 abhängen (de Lange & Jacks, 1999; Faraoni & Graziani, 2000; Hackett & Greider, 2002). Somit stellen Telomeraseinhibitoren ein neuartiges, komplexes Therapieprinzip dar, auf das möglicherweise nur bestimmte Subtypen von Tumoren (-zellen) mit einer Regression ansprechen, d.h. eine antitumorale Wirkung dieser neuen Substanzen könnte von der Funktionalität bestimmter zellulärer "checkpoints" (z. B. p53-Status) abhängig sein. Für die Einschätzung der Wirksamkeit von Telomeraseinhibitoren sollte außerdem berücksichtigt werden, dass in seltenen Fällen alternative Telomer-Verlängerungsmechanismen (ALT)

beschrieben wurden (Bryan & Reddel, 1997). Diese werden durch Rekombinationsvorgänge an den Telomeren ermöglicht (Wang & Zakian, 1990), so dass Resistenzphänomene über diesen Mechanismus denkbar wären.

Die bisher mit Telomeraseinhibitoren erzielten Ergebnisse basieren auf *in vitro* bzw. *in vivo* Untersuchungen an Tiermodellen, so dass der therapeutische Nutzen dieser Substanzen erst durch deren Einsatz in klinischen Studien beurteilt werden kann.

1.2. Weichteilsarkome

Bei den Weichteilsarkomen (WTS) handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe maligner mesenchymaler Tumore, die nach den ZNS-Tumoren und Neuroblastomen zu den häufigsten soliden Tumoren im Kindesalter zählen (Koscielniak et al., 2002). Embryonale Rhabdomyosarkome, alveoläre Rhabdomyosarkome und periphere neuroektodermale Tumore gehören zu den am meisten diagnostizierten WTS-Subtypen, wobei die embryonalen Rhabdomyosarkome im Gegensatz zu den anderen Subtypen eine relativ gute klinische Prognose besitzen (Harms, 1995; Helmke et al., 2001; Koscielniak et al., 1999; Koscielniak et al., 2002). Neue Tumormarker könnten die schwierige (Differential)Diagnose erleichtern und damit einen Beitrag zur frühzeitigen Erkennung und zur Therapieoptimierung von WTS leisten (Schmidt & Harms, 1990).

1.3. Akute lymphoblastische Leukämie vom T-Zell-Typ

Akute lymphoblastische Leukämien (ALL) sind die häufigsten bösartigen Neubildungen im Kindesalter, deren Anteil über 50% aller hämatologischen Neoplasien im Kindesalter beträgt. ALL kann immunologisch in die B-Linien ALL und T-Linien ALL klassifiziert werden. Aufgrund des hohen Rezidivrisikos zählt die T-ALL, die 10% der akuten Leukämien ausmacht, zu den bösartigsten kindlichen Leukämieformen (Downing & Shannon, 2002; Henze, 1999).

1.4. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Patienten mit den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn haben im Vergleich zu gesunden Personen in Abhängigkeit von

der Ausdehnung der Erkrankung und der Erkrankungsdauer ein erhöhtes Risiko, an Dickdarmkrebs zu erkranken (Ullmann, 2002). Bislang sind weder die genauen Ursachen bekannt, die zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen führen, noch die Mechanismen vollständig aufgeklärt, die über neoplastische Transformationen zum Kolonkarzinom beitragen (Usselman et al., 2001).

1.5. Fragestellung

1.5.1. Telomere, Telomeraseaktivität und hTERT mRNA-Expression als diagnostische bzw. prognostische Marker

Die in den letzten Jahren durchgeführten Studien zu Telomeren, Telomeraseaktivität und hTERT-Expression als diagnostische bzw. prognostische Marker basieren hauptsächlich auf Untersuchungen von Tumorerkrankungen im Erwachsenenalter. Zu den bisher untersuchten Tumorerkrankungen im Kindesalter zählen z.B. Neuroblastome (Hiyama et al., 1997; Hiyama et al., 1995a; Poremba et al., 1999; Reynolds et al., 1997), Wilms Tumore (Dome et al., 1999) und akute leukämische Erkrankungen, insbesondere vom B-Zell-Typ (B-ALL; Engelhardt et al., 1998; Malaska et al., 2000; Verstovsek et al., 2003). Bislang gibt es jedoch keine systematischen Untersuchungen zur Telomerlänge, Telomeraseaktivität und Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT bei Weichteilsarkomen (WTS) und T-ALL im Kindesalter, die eine Aussage zu deren diagnostischen bzw. prognostischen Wert zulassen. Aufgrund dieser offenen Fragen ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Ziele:

1. Haben Telomerlänge, Telomeraseaktivität und hTERT-Expression eine Bedeutung als diagnostische bzw. prognostische Marker für WTS und T-ALL im Kindesalter?
2. Können die Bestimmung von Telomerlänge, Telomeraseaktivität und hTERT-Expression einen Beitrag zur Therapieoptimierung der kindlichen WTS und T-ALL leisten?

Bisher konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob eine „Herauf-Regulation“ der Telomeraseaktivität bereits in Kolonschleimhaut von Patienten mit chronisch

entzündlichen Darmerkrankungen erfolgt. Es sollte deshalb untersucht werden, ob Telomeraseaktivität als prädiktiver Marker bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen geeignet ist. Durch Untersuchungen von Telomeraseaktivität in Biopsieproben von Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist eine „Herauf-Regulation“ der Telomeraseaktivität bereits in Kolonmukosa von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachweisbar?
2. Eignet sich die Enzymaktivität als prognostischer Marker für Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen?
3. Können mit Hilfe der Telomeraseaktivität Patienten identifiziert werden, die ein erhöhtes Risiko aufweisen, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln?

1.5.2. Telomere und Telomerase als Angriffspunkte für pharmakologische Interventionen

Da Telomerase in mehr als 85% aller Tumorzellen nachgewiesen wurde, stellt die Hemmung dieses Enzyms einen möglichen Ansatzpunkt für ein neues Prinzip in der Tumorthherapie dar. Deshalb beschäftigte sich ein weiterer Teil der Arbeit mit der pharmakologischen Beeinflussung der Telomerase. Es wurde zum einen die Effektivität neuer, vielversprechender Telomeraseinhibitoren getestet, zum anderen sollten Zellmodelle charakterisiert und etabliert werden, die für die Austestung von Telomeraseinhibitoren geeignet sind.

An einer WTS-Zelllinie, die sich durch hohe Telomeraseaktivität und kurze Telomere auszeichnet, sollten neue, vielversprechende Telomeraseinhibitoren unterschiedlicher Struktur und Wirkungsweise getestet werden. Folgende Frage sollte geklärt werden:

1. Kann eine Hemmung der Telomeraseaktivität von WTS-Zellen mit Telomeraseinhibitoren unterschiedlicher Wirkmechanismen in zellfreien Systemen und in der Zellkultur erzielt werden?

Ein wesentliches Problem in der Tumorthherapie stellen Resistenzentwicklungen von Tumorzellen gegenüber Zytostatika dar, die zu einem Therapieversagen führen können. In diesem Teil der Arbeit sollte ein Modellsystem etabliert werden, das gegenüber einem herkömmlichen Zytostatikum resistent sein sollte. Es sollten damit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kann ein Zellmodell etabliert werden, das zur Austestung von Telomeraseinhibitoren geeignet ist, um die Frage zu klären, ob die Behandlung mit Telomeraseinhibitoren bei Zytostatika resistenten Zellen neben einer wirksamen Enzymhemmung zu einer Sensitivierung gegenüber dem Zytostatikum führt?
2. Werden Veränderungen von Telomerlänge und Telomeraseaktivität unter Resistenzentwicklung beobachtet?

Der p53-Status scheint im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz der Telomeraseinhibitoren von Bedeutung zu sein. Bei p53-negativen Tumoren könnte durch Einsatz von Telomeraseinhibitoren eine zusätzliche genetische Instabilität ausgelöst werden, was als nachteiliger Effekt der Therapie anzusehen wäre (Martens & Lange, 2000). Somit stellen Zellsysteme mit unterschiedlichem p53-Status geeignete Modelle dar, um ein Nutzen-Risiko-Verhältnis von Telomeraseinhibitoren beurteilen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die WTS-Zelllinien hinsichtlich folgender Fragestellung untersucht werden:

1. Stellen die WTS-Zelllinien geeignete Testsysteme für Telomeraseinhibitoren dar, mit deren Hilfe das Nutzen-Risiko-Verhältnis von Telomeraseinhibitoren beurteilt werden kann?

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass der Schwerpunkt dieser Arbeit auf Untersuchungen zur Bedeutung von Telomeren, Telomerase und hTERT-Expression als diagnostische bzw. prognostische Marker bei malignen und prämaligen Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter lag. Im zweiten Teil der Arbeit sollten auf zellulärer Ebene neue Erkenntnisse zur pharmakologischen Beeinflussung von Telomerase und Telomeren gewonnen werden, um einen Beitrag zum besseren Verständnis für neue Therapieoptionen von Tumorerkrankungen zu leisten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Telomeranalytik (TRF-Assay)

Roti [®] -Phenol	Roth, Karlsruhe
Chloroform (pro analysi)	Merck, Darmstadt
RNase out Ribonuclease Inhibitor (40U/μl)	Gibco BRL, Karlsruhe
Proteinase K	Quiagen, Hilden
RNase A	Quiagen, Hilden
Hinfl	New England Biolabs, Schwalbach
NEBuffer 2 (für Hinfl)	New England Biolabs, Schwalbach
λ-DNA	Roche, Mannheim
Agarose ultraPure	Gibco BRL, Karlsruhe
Telomersonde: (TTAGGG) ₇ , 5'-Digoxigenin-Label	Roth, Karlsruhe
1 kb Ladder (DNA-Marker)	Gibco BRL, Karlsruhe
DNA Molecular Weight Marker II, Dig-labeled	Roche, Mannheim
DIG Oligonucleotide Tailing Kit	Roche, Mannheim
Lasana Bio-Magermilch-Pulver	Humana Milchunion eG, Herford
Anti-Digoxigenin-AP	Roche, Mannheim
CSPD [®] , ready-to-use	Roche, Mannheim
CDP-Star [®] , ready-to-use	Roche, Mannheim

Proteinbestimmung

Bicinchonic Acid Solution (BCA)	Sigma, Deisenhofen
Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat 4% (w/v)	Sigma, Deisenhofen

Bestimmung der Telomeraseaktivität

TRAP _{EZE} [®] Telomerase Detection Kit	Q BIOgene, Heidelberg
TS-Primer:	MWG-Biotech, Ebersberg
5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3',	
5' IR-Farbstoff (Markierung)	
Taq DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Mineralöl (DNase-, RNase, Protease frei)	Sigma, Deisenhofen

TEMED	Gibco BRL, Karlsruhe
Long Ranger Gel Solution (50%)	Biozym, Hess. Oldendorf

Bestimmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase

RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Quiagen, Hilden
TaqMan [®] Reverse Transcription Reagents Kit	Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan [®] Universal Master Mix	Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan [®] Ribosomal RNA Control Reagents Kit	Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA
forward primer hTERT (2673U): 5'-TGACACCTCACCTACCCAC-3'	Applied Biosystems, Weiterstadt
reverse primer hTERT (2767 L): 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3'	Applied Biosystems, Weiterstadt
hTERT-Sonde: 5'-ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3' 5'-FAM-, 3'-TAMRA-Markierung	Applied Biosystems, Weiterstadt

Zellbiologische Arbeiten

Cell Proliferation ELISA, BrdU (Kit)	Roche, Mannheim
Platinex [®] (Cisplatin)	Bristol, München
BRACO19	Cancer Research UK Biomolecular Structure Group, the School of Pharmacy, University of London, London, England
BIBR1532	Böhringer Ingelheim Pharma KG, Biberach
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Rhodamin-Phalloidin	Molecular Probes, Eugene, USA
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen
RNase A	Roche, Mannheim
RPMI-Medium	Biochrom, Berlin
FCS	Gibco BRL, Karlsruhe
PBS (pH 7,4)	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Human-Fibronectin	Biochrom, Berlin

Vectashield® Mounting Medium for Fluorescence	Vector Laboratories Burlingame, USA
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
PBS	Biochrom, Berlin
Aqua Spüllösung	Delta-Pharma GmbH, Pfullingen
Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein Clone DO-7	DAKO, Glostrup, Dänemark

2.1.2. Medien, Puffer, Lösungen

2.1.2.1. Medien

RPMI 10% FCS	RPMI	
	FCS	10%
	Glutamin	2 mM
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 µg/ml

2.1.2.2. Puffer, Lösungen

Telomeranalytik (TRF-Assay)

DNA-Extraktionspuffer (pH 7,5)	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	0,1 mM
	SDS	0,5%
TE-Puffer (pH 8,0)	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
10x TBE-Puffer (Elektrophoresepuffer)	Tris-Base	0,89 M
	Borsäure	0,89 M
	EDTA	2 mM
10x Probenauftragspuffer	Bromphenolblau	0,41%
	Xylen Cyanol	0,41%
	Saccharose	67%
Denaturierungslösung	NaCl	1,5 mM
	NaOH	0,5 M
Neutralisierungslösung	Tris-Base	1,0 M
	NaCl	1,5 M
20x SSC (pH 7,0)	NaCl	3,0 M
	Tri-Na-Citrat	0,3 M
(Prä-)Hybrimix	SSC (20x)	5x
	Milchpulver	5%
	Formamid	50%
	N-Lauroylsarkosin (30%)	0,1%
	SDS (20%)	0,02%
	(Telomersonde)	10-25 pmol

Maleinsäurepuffer (pH 7,5)	Maleinsäure	100 mM
	NaCl	150 mM
Blockierungspuffer 10%	Milchpulver	10%
	Maleinsäurepuffer (pH 7,5)	
Puffer 3 (pH 9,5)	Tris-HCl	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	50 mM
SDS 10%	SDS	20 g
	H ₂ O	ad 200 ml
Stripping-Lösung	NaOH	0,2 M
	SDS	0,1%

Bestimmung der Telomeraseaktivität

CHAPS-Lysepuffer (Bestandteil im TRAPEZE®)	Q BIOgene, Heidelberg	
10x TBE-Puffer (Sequenzierpuffer)	Tris-Base	0,89 M
	Borsäure	0,89 M
	EDTA	10 mM

Bestimmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase

10x MOPS-Puffer (pH 7,0)	MOPS (freie Säure)	200 mM
	Na-Acetat	50 mM
	EDTA	10 mM
1x FA-Laufpuffer	10x MOPS-Puffer	100 ml
	37%ige Form- aldehyd-Lösung	20 ml
	Wasser (RNase-frei)	ad 1000 ml
5x Ladungspuffer	wässrig gesättigte Bromphenolblau- Lösung	16 µl
	500 mM EDTA (pH 8,0)	80 µl
	37%ige Form- aldehyd-Lösung	720 µl
	100%iges Glycerol	2 ml
	Formamid	3084 µl
	10x MOPS-Puffer	4 ml
	Wasser (RNase-frei)	ad 10 ml

Zellbiologische Methoden

PFA 4% (pH 7,4)	PFA	10 g
	10x PBS	25 ml
	NaOH 10mM	1 ml
	Wasser	ad 250 ml

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Puffer mit destilliertem (dest.) Wasser hergestellt.

Wenn keine anderen Bezugsquellen angegeben sind, wurden die Chemikalien in bester handelsüblicher Qualität bezogen von: Sigma (Deisenhofen), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Oncor Appligene (Heidelberg).

2.1.3. Geräte und Hilfsmittel

Allgemein genutzte Geräte und Hilfsmittel

Waagen

Präzisionswaage P 1210	Mettler-Wagen GmbH, Gießen
Feinwaage AC 100	Mettler-Wagen GmbH, Gießen

Zentrifugen

Biofuge 22R (Kühlzentrifuge)	Heraeus Instruments, Hanau
Rotixa/RP (Kühlzentrifuge)	Hettich GmbH, Tuttlingen
Biofuge 13	Heraeus Instruments, Hanau
Rotanta/S	Hettich GmbH, Tuttlingen

Wasserbad

Thermostat KH-3	Biometra, Göttingen
Wasserbad	Memmert GmbH & Co KG, Schwabach

pH-Messgerät

pH-Meter CG 840	Schott, Mainz
-----------------	---------------

Pipetten

0,5 -10 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
für TaqMan [®] : 1-20 µl	Eppendorf, Hamburg

Telomer-Analytik (TRF-Assay)

DNA-Messung

GeneQuant DNA/RNA Calculator	Pharmacia Biotech, Freiburg
------------------------------	-----------------------------

Gelelektrophorese

GNA-200 Submarine Electrophoresis Unit	Pharmacia Biotech, Freiburg
--	-----------------------------

Geldokumentation

Videokamera und Videoprinter	Cybertech, Berlin
------------------------------	-------------------

Southern Blotting

VacuGene XL Vacuum Blotting System	Pharmacia Biotech, Freiburg
Nylon membranes, positively charged	Roche, Mannheim
The Belly Dancer (Hybridization Water Bath)	STOVALL Life Science, Greensboro, USA

Detektion

Hyperfilm, Amersham	Amersham Buchler GmbH, Braunschweig
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche, Mannheim

Proteinbestimmung

Diode-array Spectrophotometer HP 8452 A	Hewlett Packard, Waldbronn
Novaspec II	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

Bestimmung der Telomeraseaktivität*PCR-Gerät*

PTB Thermal Cycler (Lab-Line)	CLF, Emersacker
-------------------------------	-----------------

Spezielle Reaktionsgefäße

Safe-Lock 0,5 ml (Eppendorf)	Multimed, Kirchheim/Teck
SafeSeal-Tips (DNase-, RNase-, pyrogenfrei)	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
Multi-Sicherheitsreaktionsgefäße (RNase-frei)	Roth, Karlsruhe

Detektion

DNA-Sequencer Modell 4000	MWG-Biotech, Ebersberg
Zubehör für DNA-Sequencer:	MWG-Biotech, Ebersberg
Glasplatten (25 cm)	
Spacer 0,4 mm	
Haifischzahn-Kamm 0,4 mm, 48 Taschen	

Bestimmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase*RNA-Messung*

GeneQuant DNA/RNA Calculator	Pharmacia Biotech, Freiburg
------------------------------	-----------------------------

Geldokumentation

Videokamera und Videoprinter	Cybertech, Berlin
------------------------------	-------------------

cDNA-Synthese

PCR-Gerät: PTB Thermal Cycler (Lab-Line) CLF, Emersacker

PCR-Gerät

ABI Prism 7700 Sequence Detection System Perkin Elmer Applied Biosystems,
Foster City, USA

Spezielle Reaktionsgefäße

Thermo-Fast[®] 96, Non-Skirted ABgene, Epsom, Surrey, UK

Zellbiologische Arbeiten*Zellkultivierung*

Corning[®], Costar[®] Zellkulturflaschen Corning GmbH Life Sciences, Wiesbaden
6-Well-Zellkulturplatten Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Lab-Tek[®] Chamber Slide Nalge Nunc International, Naperville, USA

Zellzählung

Neubauer-Zählkammer Roth, Karlsruhe

Zellzyklusbestimmung mittels FACS

FACScan Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg

(Laser: Argon 488 nm,
Detektor/Filter: 585 nm, PE/PI)

Mikroskopische Analysen

Konfokales Lasermikroskop DM IRBE Leica Microsystems, Wetzlar
(Laser: Argon 488 nm, 514 nm,
Helium-Neon 633 nm)

Fluoreszenzmikroskop DM RA Leica Microsystems, Wetzlar
(Filter: N2.1, Anregungsfilter, BP515-560)

Cytospins

Cytospin 3 Shandon GmbH, Frankfurt

Cytoträger Shandon GmbH, Frankfurt

Software zur Auswertung

ONE-DScan[®] (Version 1994) Scanalytics, Billerica, Ontario, Canada

Excel[®] 97 für Windows Microsoft Corporation, München

GraphPad Prism[®] GraphPad Software, Inc., San Diego, USA

CELLQuest[™] (Version 3.0.1f) Becton Dickinson, Heidelberg

Leica QFluoro Version V1.0a Leica Microsystems, Wetzlar

Confocal Software Version Leica Microsystems, Wetzlar

GrabIT (Version 6.01) Rauscher GmbH, Olching

2.1.4. Biologisches Untersuchungsmaterial

2.1.4.1. Zelllinien

2.1.4.1.1. Weichteilsarkomzellen

Die etablierten und charakterisierten WTS-Zelllinien sowie Zellpellets dieser Zelllinien wurden uns von Frau PD Dr. E. Koscielniak (Olgahospital, Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Die Etablierung dieser Zelllinien erfolgte aus Primärtumor- und Rezidivmaterial von 12 Kindern und Jugendlichen mit WTS, von denen die meisten in der CWS-Studie („Cooperative Weichteilsarkom Studie“; Koscielniak et al., 1999) eingeschlossen waren. Bei den meisten Zelllinien handelte es sich um nicht experimentell immortalisierte Zellen.

2.1.4.1.2. A-549-Zellen

Die humane Lungenkarzinom-Zelllinie A-549 wurde von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSMZ) bezogen.

2.1.4.2. Patientenmaterial

2.1.4.2.1. Blasten von Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie vom T-Zell-Typ

Von 20 Patienten mit T-ALL stellte uns Herr PD Dr. J. Greil (Universitätskinderklinik Tübingen) sowohl kryokonservierte Blasten als auch bereits isolierte DNA und cDNA dieser Proben zur Verfügung. Dabei wurden die Blasten im Rahmen der Initialdiagnostik (n=16) bzw. im Rahmen von Nachuntersuchungen (n=3) aus Knochenmark durch Knochenmarkpunktionen bzw. bei der Blutbilddiagnose aus peripherem Blut der Patienten gewonnen. Bei einem Patienten stammten die Blasten aus einem Pleuraerguss. Nach der Diagnosestellung wurden die Patienten nach dem jeweiligen aktuellen ALL-BFM-Protokoll (BFM, Berlin/Frankfurt/Münster) behandelt und gegebenenfalls wurde eine allogene Knochenmarktransplantation bzw. eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt. Bei den Patienten handelte es sich

um 5 Mädchen und 15 Jungen mit einem Durchschnittsalter (zum Zeitpunkt der Probenentnahme) von 8,8 Jahren.

2.1.4.2.2. Kontrollproben

Frau PD Dr. E. Koscielniak (Olgahospital, Stuttgart) überließ uns bereits isolierte DNA-Proben, die aus Leukozyten von EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) - behandelten Vollblutproben von 19 Kindern und Jugendlichen ohne WTS im Alter von 3 bis 17 Jahren stammten.

Als Kontrollen für die T-ALL-Proben stellte uns Herr PD Dr. J. Greil Zellpellets von Phytohämagglutinin (PHA) stimulierten und nicht stimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von drei gesunden, jungen, erwachsenen Spendern zur Verfügung.

2.1.4.2.3. Gewebeproben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darm- erkrankungen

Die Kolonbiopsien wurden vom Robert Bosch Krankenhaus, Stuttgart, vom Krankenhaus Bietigheim, Bietigheim-Bissingen, Krankenhaus Bad Cannstatt, Stuttgart, und von der gastro-onkologischen Praxis Dr. E. Höring, Stuttgart, zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden bei endoskopischen Untersuchungen mit Hilfe von kleinen Biopsie-Zangen entnommen. Die insgesamt 114 untersuchten Biopsien stammten von 42 verschiedenen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 44 Jahren. Handelte es sich um Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung, wurden bis zu 5 Biopsieproben entlang des Kolons entnommen. Dabei wurden sowohl Proben aus gesunder, normaler Schleimhaut als auch aus entzündeten Kolonbereichen genommen. Der Entnahmeort der Biopsien wurde mit Hilfe eines Dokumentationsbogens angegeben. Die Gewebeproben der Kontrollgruppe stammten von Patienten, die aufgrund unspezifischer intestinaler Beschwerden einer Koloskopie unterzogen wurden. Alle Gewebeproben wurden nach der Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Eine entsprechende weitere Probe wurde jeweils in Paraffin eingebettet und histologisch untersucht.

Es wurden nur Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in die Studie eingeschlossen, deren Erkrankung durch histologische Untersuchungen bestätigt wurde und deren klinische Daten vollständig dokumentiert worden waren. So wurden von den ursprünglich 92 Patienten 42 in die Studie aufgenommen. Unter den 42 Personen, die ausgewertet werden konnten, waren 18 Patienten mit Colitis ulcerosa (Durchschnittsalter: 51 Jahre, Erkrankungsdauer: 0-32 Jahre), 10 Patienten mit Morbus Crohn (Durchschnittsalter: 37 Jahre, Erkrankungsdauer: 0-26 Jahre) und 14 Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Durchschnittsalter: 45 Jahre). Der Schweregrad der chronisch-entzündlichen Erkrankung wurde im Dokumentationsbogen für die einzelnen Patienten durch einen Score von 0 bis 3 (Score 0: keine Aktivität, Score 1: leichte Aktivität, Score 2: mäßige Aktivität; Score 3: ausgeprägte Aktivität) angegeben. Die Medikation der Patienten wurde anhand des Dokumentationsbogens registriert. Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Landesärztekammer von Baden-Württemberg genehmigt und die Einverständniserklärung der Patienten in schriftlicher Form eingeholt. Auf der folgenden Seite ist der Patienten-Dokumentationsbogen abgebildet, wie er den jeweils zuständigen Ärzten vorlag.

Patienten-Dokumentationsbogen für Colitis / Telomerase-Studie

Name, Vorname des Patienten:

Patienten-Nr.:

Geburtsdatum:

Datum der Untersuchung:

ETIKETT

Angaben zur Erkrankung/ Anamnese (alle Patienten !)

Diagnose/ Grund für Endoskopie:.....

Frühere **Tumorerkrankungen** des Patienten: ja nein

Wenn ja, wann ?..... Welche ?.....

Fälle von **Dickdarmkrebs in der Familie:** ja nein nicht bekannt

Wenn ja, Verwandtschaftsgrad:.....

Raucher: ja neinnicht mehr

Regelmäßige Einnahme Aspirin® (ASS) ja nein wie oft:.....

Regelmäßige Einnahme anderer NSAIDs: ja nein wie oft:.....

Erweiterte Angaben bei Patienten mit Colitis ulcerosa/ Morbus Crohn

Jahr (Monat) der Ersterkrankung/ Diagnosestellung:.....

Aktivität der Erkrankung:

0 (Remission) 1 („mild“) 2 („moderate“) 3 („severe“)

Verdacht auf familiäre adenomatöse Polyposis: ja nein nicht bekannt

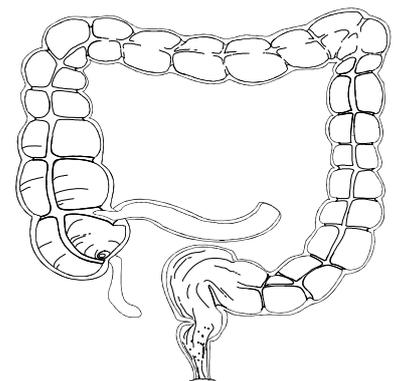
Verdacht auf sklerosierende Cholangitis: ja nein nicht bekannt

Bisherige Therapie mit:.....

Charakterisierung der Biopsieproben

Bitte **in** nebenstehender **Abbildung Entnahmestellen** der Biopsien **kennzeichnen** und **mit der jeweiligen** Probennummer (Lfd. Nr.) versehen.

Charakterisierung in untenstehender Tabelle:
In **zutreffender Spalte** ankreuzen („X“) bzw. in **letzter Spalte** charakterisieren.



Nummer Probe für Studie (wie Etikett)	Nummer für Histologie BITTE HIER EINTRAGEN ↓	normales Gewebe ohne Entzündung (Kontrolle)	Entzündliches Gewebe (leicht: X) (stark: XX)	Bemerkung/andere Charakterisierung
1				
2				
3				
4				
5				

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung von Zelllinien (WTS-Zellen, A-549-Zellen)

Die Zelllinien wurden in einem Brutschrank mit 5% CO₂-Atmosphäre, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 37°C inkubiert, deren Medium zwei- bis dreimal pro Woche gewechselt wurde. Bei allen Zelllinien wurde RPMI 1640 Medium +10% fötales Kälberserum (FCS), + 2 mM Glutamin, + 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin eingesetzt. Um die Zellen in die G₀-Phase zu drängen, wurde anstelle von 10% Serum 0,1% FCS eingesetzt. Die WTS-Zelllinie GR-OH1 wurde zusätzlich in mit Fibronectin (5 µg/cm²) beschichteten Zellkulturflaschen kultiviert, während alle anderen Zelllinien in unbeschichteten Flaschen im Brutschrank inkubiert wurden.

Das Passagieren erfolgte nach Erreichen der Konfluenz der Zellen. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS (phosphate buffered saline) gewaschen und anschließend mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde die Trypsinaktivität gestoppt, die Zellen wurden durch Pipettieren resuspendiert und anschließend in der gewünschten Dichte ausgesät. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der „Neubauer“-Zählkammer und die Zellkonzentration pro ml ließ sich wie folgt bestimmen:

$$\text{Zellzahl / ml} = (\text{Anzahl der Zellen} / \text{Anzahl der ausgezählten Quadrate}) \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

Tab. 2.1: Formel zur Bestimmung der Zellzahl nach Neubauer.

2.2.1.2. Etablierung Cisplatin resistenter A-549-Zellen

Nach Aussäen der A-549-Zellen in der gewünschten Dichte und Erreichen der Adhärenz (ca. 2 h nach der Zellvereinzelung) wurde Cisplatin in der jeweiligen Konzentration den Zellen zugesetzt. Als Kontrollen dienten A-549-Zellen, die nur im Medium jeweils parallel angesetzt wurden. Die Zellen wurden jeweils über 5 Passagen bei einer Cisplatin-Konzentration kultiviert, bevor eine Dosissteigerung

vorgenommen wurde; passagiert wurde jeweils bei Erreichen der Konfluenz. Die Verdünnung der Cisplatin-Lösungen erfolgte von der Stammverdünnung (Cisplatin in isotonischer NaCl-Lösung) ausgehend jeweils mit Medium. Folgende Cisplatin-Konzentrationen wurden eingesetzt: 150 nM, 300 nM, 600 nM, 1200 nM, 1800 nM, 2400 nM und 3000 nM.

2.2.1.3. Behandlung der WTS-Zelllinien mit Telomeraseinhibitoren

Analog den A-549-Zellen wurde die WTS-Zelllinie SW-OH1 in der gewünschten Dichte ausgesät und nach Erreichen der Adhärenz wurden die jeweiligen Lösungen der Telomeraseinhibitoren BRACO19 und BIBR1532 (Strukturformeln siehe Abb. 1.6 und 1.7) zugegeben.

Die Stammlösungen der Inhibitoren wurden nach Angaben des Herstellers mit dem entsprechenden Lösungsmittel hergestellt: BRACO19 wurde in sterilem Wasser gelöst, BIBR1532 in Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Verdünnung der Inhibitor-Lösungen erfolgte von den jeweiligen Stammlösungen ausgehend mit Medium. Bei den mit BIBR1532 behandelten Zellen betrug im Medium die Endkonzentration an DMSO 0,01%. Neben der eigentlichen Inkubation mit den Inhibitoren wurden die Zellen zur Kontrolle mit 0,01% DMSO bzw. Wasser über ein bis drei Tage kultiviert. Mit folgenden Inhibitor-Konzentrationen wurden die Zellen über den jeweiligen Zeitraum von ein bis drei Tagen behandelt:

<i>Telomeraseinhibitor</i>	<i>eingesetzte Inhibitor-Konzentrationen</i>	<i>Zeitraum der Inkubation</i>
BRACO19	3 μ M	1, 2 und 3 Tage
BIBR1532	12 μ M	1, 2 und 3 Tage

Tab. 2.2: Angabe der eingesetzten Telomeraseinhibitor-Konzentrationen in den bis zu drei Tagen dauernden Zellkulturversuchen.

2.2.1.4. Bestimmung der Zellproliferation (BrdU-Assay)

Mit Hilfe des "Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)" Kit wurde die Bestimmung der Zellproliferation durchgeführt. Dieser Test ist geeignet, um z.B. die Chemosensitivität von Tumorzellen gegenüber verschiedenen Zytostatika zu

bestimmen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Einbau des Thymidinanalogs 5-Brom-2`-desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen. BrdU wird durch spezifische BrdU-Antikörper mit konjugierter Meerrettichperoxidase (POD) detektiert, welche das zugegebene Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Die Durchführung des Assays erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers in „96-Well-Platten“. Je nach Zelllinie wurden 3×10^3 – 1×10^4 Zellen pro „well“ ausgesät und 48 h mit den entsprechenden Konzentrationen Cisplatin oder des jeweiligen Telomeraseinhibitors bei 37°C inkubiert. Nach einer anschließenden 24-stündigen Behandlung bei 37°C mit BrdU wurden die Zellen fixiert und denaturiert, bevor der Antikörper für 90 min zugesetzt wurde. Nach Zugabe des TMB-Substrats folgte eine 20-minütige Inkubation zur Farbentwicklung. Die Absorption wurde schließlich im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen, wobei die Intensität der Farbentwicklung im direkten Verhältnis zur Anzahl proliferierender Zellen steht.

2.2.1.5. Bestimmung des Zellzyklus (FACS-Analyse)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence activated cell sorting) ist es möglich, nach Einbau von Propidiumiodid den DNA-Gehalt proliferierender Zellen zu bestimmen. Durch Bestimmung des DNA-Gehalts kann indirekt auf die Anzahl der Zellen geschlossen werden, die sich in den verschiedenen Zellzyklusphasen befinden. Zur Erstellung eines DNA-Histogramms genügen ca. 10^6 Zellen. Die Fixierung der Zellen erfolgte unter Zugabe von 1 ml eiskaltes (-20°C) Ethanol durch Vortexen des Zellpellets. Bis zur weiteren Verwendung wurden die fixierten Zellen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor der DNA-Messung wurde das Zellpellet abzentrifugiert und der Ethanolüberstand abdekantiert. Nachdem das Zellpellet in 1 ml PBS in 1% Glucose-Lösung resuspendiert worden war, wurde die Zellsuspension mit 2 mg RNase A und 50 µl Propidiumiodid-Lösung (1 mg/ml) versetzt. Die Auswertung der Kern-DNA-Profile wurde mit einem Durchflusszytometer und der entsprechenden Analysesoftware durchgeführt.

2.2.1.6. Färbung der Actin-Filamente mittels Rhodamin-Phalloidin

Phalloidin ist ein hochgiftiges Alkaloid, das aus dem Knollenblätterpilz *Amanita phalloides* isoliert wird. Durch seine spezifische Bindung an Actin-Filamente kann es in Form fluoreszierender Derivate (z.B. Rhodamin-Phalloidin) zur Anfärbung der Actin-Filamente von Zellen verwendet werden.

Für die Phalloidin-Färbung wurden die Zellen in Kammern von „Chamber Slides“ (aus Glas) kultiviert. Nach 2-tägiger Inkubation bei 37°C auf diesen speziellen Objektträgern wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 10 min mit 4%iger Paraformaldehyd (PFA) -Lösung fixiert. Nachdem die Zellen wiederum dreimal mit PBS gewaschen worden waren, wurden die Zellen 5 min mit dem Detergens Triton X-100 (0,25% in PBS) behandelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 200 µl Phalloidin-Lösung (5 µl 6,6 µM Phalloidin-Stammlösung in 200 µl PBS/BSA1%; BSA, Rinderserumalbumin) 1 h unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Um einen Fluoreszenzverlust von Rhodamin zu vermeiden, wurden die folgenden Arbeitsschritte in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Nach 3 Waschschritten mit PBS wurden die Zellen kurz mit 70%iges Ethanol behandelt, so dass sie anschließend mit Vectashield® eingedeckt werden konnten. Die Auswertung dieser Färbung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz- bzw. konfokalen Lasermikroskops.

2.2.1.7. Nachweis von p53

Die WTS-Zelllinien wurden anhand von Cytospins auf ihren p53-Status untersucht. Für die Präparation der Cytospins (1000 rpm, 8 min) wurden jeweils 10^4 Zellen der WTS-Zelllinien (10^4 Zellen/100 µl Zellkulturmedium) eingesetzt. Die Färbung des Tumorsuppressor-Proteins p53 erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper der Firma DAKO, dessen Erkennungsstelle sich am N-Terminus zwischen den Aminosäuren 19 bis 26 des menschlichen p53-Proteins befindet. Mit Hilfe des Antikörpers kann der p53-Status (Wildtyp, mutierte Form) der Zellen festgestellt werden. Die mutierte Form ist durch eine bräunliche Färbung der Zellkerne vom Wildtyp zu unterscheiden.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Bestimmung der Telomerlänge (TRF-Analyse)

2.2.2.1.1. DNA-Isolierung und Bestimmung der DNA-Konzentration

DNA-Isolierung aus Zellkulturmaterial

Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion. Diese Standardmethode ermöglicht eine hohe Ausbeute an DNA, die für die Bestimmung der Telomerlänge mittels Southernblot-Analyse erforderlich ist. Die Zellpellets wurden entsprechend ihrer Zellzahl im Extraktionspuffer (0,5 ml Puffer für 10^6 Zellen) resuspendiert. Die Zugabe von RNase A orientierte sich an der Vorschrift des QIAamp[®] DNA Mini Kits, so dass 40 μ l RNase A (10 mg/ml) je Zellextrakt eingesetzt wurden. Die Zellsuspension wurde für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert und der anschließende Proteinverdau erfolgte nach Zusatz von 6 μ l Proteinase K (20 mg/ml) pro 1 ml Zellsuspension über Nacht bei 50°C im Wasserbad. Nach Extraktion der genomischen DNA mittels Phenol-Chloroform-Methode erfolgte die Fällung der DNA nach der Standardmethode der Alkohol-Fällung mit 0,1 VT Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 VT absolutes Ethanol. Die Zellpellets wurden je nach Größe in einem bestimmten Volumen Tris-EDTA (TE) -Puffer gelöst.

Messung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Photometers in einer Quarzküvette bei 260 nm durchgeführt. Die Proben wurden mit TE-Puffer so verdünnt, dass sie im Absorptionsbereich zwischen 0,1 und 1,0 gemessen wurden. Die Messung der Proben erfolgte jeweils in einer Doppelbestimmung. Es wurden jeweils mindestens zwei Messungen durchgeführt. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 μ g DNA pro ml. Aus dem Verhältnis der $OD_{260\text{ nm}}$ und der $OD_{280\text{ nm}}$ erhält man außerdem eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung. Eine proteinfreie Lösung weist demnach ein Verhältnis von 1,7-1,9 auf. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$[\text{DNA}] = 50 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.2.1.2. Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde in nativen, horizontalen Agarosegelen durchgeführt. 0,8% Agarosegele wurden eingesetzt für die Kontrolle der Integrität der DNA, des Restriktionsverdau und für die Auftrennung der Restriktionsfragmente. Die Agarose wurde im entsprechenden Volumen 1x Tris-Borat-EDTA (TBE) -Puffer gelöst und im Mikrowellenherd vollständig aufgeschmolzen. Nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurde die Gellösung in eine vorbereitete Gelapparatur luftblasenfrei gegossen. Sobald das Agarosegel ausgegärt war, konnte der Kamm für die Probenaschen entfernt und die Elektrophoresekammer mit 0,5x TBE-Puffer gefüllt werden. Die einzelnen DNA-Proben wurden mit dem Volumen Probenpuffer gemischt, dass seine Endkonzentration 1/6 des Gesamtvolumens betrug. Anschließend wurden die Proben mit dem Auftragspuffer in die Geltaschen pipettiert. Als Größenmarker wurde ein DNA-Längenstandard (1 kb-Leiter) eingesetzt. Der anschließende Gellauf erfolgte für die Kontrolle der DNA-Integrität und des Verdau bei 100 V für 1 bzw. 1,5 h, für die Auftrennung der Restriktionsfragmente bei 60 V für 15,5 h. Die beiden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylen Cyanol des Probenpuffers ermöglichten eine Abschätzung der Auftrennung der DNA-Fragmente während des Gellaufs. Nach 10-30 min Inkubation des Gels im Ethidiumbromid-Färbebad (0,5 µg/ml in 1x TBE) konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente unter kurzweiligem UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Videodokumentationssystems aufgenommen werden.

2.2.2.1.3. Restriktion und Fällung der DNA-Fragmente

Restriktion

Der Restriktionsverdau der hochmolekularen DNA erfolgte nach der Überprüfung der Integrität der DNA im Agarosegel mit dem Restriktionsenzym Hinfl. Hinfl ist aufgrund seiner Erkennungssequenz (siehe Tab. 2.3) ein Enzym mit häufigen Schnittstellen im subtelomerischen Bereich.

<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Erkennungssequenz</i>
Hinfl	5`...G ↓ A N T C...3` 3`...C T N A ↑ G...5`

Tab. 2.3: Beschreibung der DNA-Erkennungssequenzen des Restriktionsenzym Hinfl.

Nach dem durchgeführten Enzymverdau mit Hinfl können die ungeschnittenen Telomere von den zahlreichen kurzen DNA-Fragmenten im Agarosegel getrennt werden. Die Zusammensetzung des Restriktionsansatzes erfolgte nach Angaben des Herstellers; pro 1 µg DNA wurden 2 U Hinfl eingesetzt. Nachdem der Restriktionsansatz über Nacht bei 37°C inkubiert und der Restriktionsverdau im Gel kontrolliert worden war, wurden die Restriktionsfragmente mittels Alkohol-fällung, wie unter 2.2.2.1.1. beschrieben, gefällt. Die DNA-Fragmente wurden in dem Volumen TE-Puffer gelöst, so dass die Endkonzentration 1 µg DNA pro 1 µl TE-Puffer betrug.

2.2.2.1.4. Southern Blotting

Das Prinzip des Southern Blots besteht darin, DNA-Fragmente, die zuvor mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge getrennt wurden, auf einer Membran zu fixieren, um später durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können. Dieses Verfahren wurde 1975 von Edwin Southern entwickelt und dementsprechend nach ihm benannt.

Von den in TE-Puffer gelösten Restriktionsfragmenten wurden bis zu 17,5 µg DNA auf das Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde unter den Bedingungen, wie in Abschnitt 2.2.2.1.2. erwähnt, durchgeführt und die Fragmente nach Inkubation des Gels im Ethidiumbromidfärbebad (0,5 µg/ml in 1x TBE) unter kurzweiligem UV-Licht (302 nm) detektiert. Nach durchgeführter Videodokumentation wurde das Gel für weitere 5 min mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt. Diese künstlich ausgelöste Depurinisierung der DNA zerlegt lange DNA-Fragmente in kleinere Bruchstücke und ermöglicht so eine bessere Transfereffizienz. Der Southern Blot erfolgte mit einem Vakuum-Blotter, zur Fixierung der DNA wurde eine Nylonmembran eingesetzt. Nachdem das Gel auf die Membran gelegt worden war, wurde die DNA durch eine 20-minütige Inkubation in Denaturierungslösung bei 50 mbar denaturiert. Nach Entfernen der Denaturierungslösung wurde Neutralisierungslösung auf das Gel gegeben und es wurde für 20 min bei 50 mbar

neutralisiert. Der Transfer erfolgte mit ca. 700 ml 20x SSC (sodium salt citrate; pH 7,0) bei 50 mbar über 90 min. Nach den 90 min wurde die Membran 5 min in 2x SSC gewaschen, anschließend zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm; 124 mJ) kovalent an die Membran gebunden („cross-linking“).

2.2.2.1.5. Markierung der Sonden

Als spezifische Telomersonde wurde ein Oligonukleotid bestehend aus 7 Telomer-Repeats [(TTAGGG)₇] eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine nicht radioaktive Nachweismethode zur Identifizierung der Telomerfragmente durchgeführt, indem die Sonde mit Digoxigenin (DIG) markiert wurde. Die Markierungsreaktion erfolgte mit dem „DIG Oligonukleotide Tailing Kit“ nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die Effizienz der Markierung mittels „Dot blot“ kontrolliert. Die neu gelabelte Telomersonde wurde mit den Kontrollen des „Tailing Kits“ (eine unter optimalen Bedingungen markierte Sonde und eine ursprünglich unmarkierte Kontrollsonde, die gemeinsam mit der Telomersonde markiert wurde) und der von der Firma Roth nur 5'-markierten Telomersonde in Konzentrationen von 2,5 pmol/μl bis 0,025 fmol/μl verglichen. Nach dem Auftragen von 1 μl der jeweiligen Verdünnungen auf die Nylonmembran und anschließender Fixierung im UV-Licht, wurde die Membran analog den im Abschnitt „Detektion“ beschriebenen Arbeitsschritten behandelt. Durch Vergleich der Signalintensitäten konnte die Markierungseffizienz ermittelt werden.

2.2.2.1.6. Prähybridisierung und Hybridisierung

Prähybridisierung

Nachdem die DNA, wie unter 2.2.2.1.4. beschrieben, an die Membran gebunden worden war, wurden die Membranen in Hybridisierungsröhren in einem Hybridisierungssofen unter Rotieren für mind. 30 min bei 42°C mit dem Prähybridisierungspuffer inkubiert. Die Prähybridisierung diente dazu, noch verbleibende freie Bindungsstellen zu blockieren.

Hybridisierung

Die anschließende Hybridisierung wurde mit dem Hybridisierungspuffer durchgeführt. Dieser Puffer unterscheidet sich vom Prähybridisierungsmix, dass er frisch denaturierte Telomersonde enthält.

Das entsprechende Aliquot der Sonde wurde 5 min bei 55°C im Wasserbad denaturiert und anschließend direkt auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C unter Rotieren im Hybridisierungsofen. Sowohl die Prä- als auch die Hybridisierung wurden jeweils mit 20 ml des entsprechenden Puffers durchgeführt. Um unspezifische Bindungen der Sonde zu vermeiden, wurde die Membran zweimal 15 min mit 2x SSC/0,1% SDS (SDS, Natriumdodecylsulfat) bei der gleichen Temperatur, mit der zuvor hybridisiert wurde, gewaschen. Anschließend folgten zwei Waschschrte in 2x SSC und Maleinsäurepuffer/0,1% Tween für je 5 min bei Raumtemperatur.

2.2.2.1.7. Detektion der Telomer-Restriktionsfragmente

Das Prinzip der Detektion der Telomer-Restriktionsfragmente (TRF) beruht darauf, dass die mit DIG gelabelte Telomersonde von einem gegen DIG spezifischen Antikörper erkannt wird, an dem alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Die alkalische Phosphatase lässt sich dann über eine enzymatische Reaktion nachweisen.

Die Membranen wurden für mind. 1 h in Blockierungslösung inkubiert, um die unbesetzten Bindungsstellen für den Antikörper zu maskieren. Anschließend wurde der Antikörper in der Blockierungslösung 1:5000 verdünnt und die Membranen mit dieser Lösung mind. 45 min unter Bewegung (Überkopfdreher) inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde anschließend durch zwei Waschschrte in Maleinsäurepuffer/0,1% Tween für je 15 min entfernt. Die Inkubationen und Waschschrte erfolgten bei Raumtemperatur.

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgt durch Erzeugung eines Chemilumineszenzsignals. Als Substrat dient CSPD[®] (3-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]Decan}-4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz) bzw. CDP-Star[®] (2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor) Tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat, Dinatriumsalz), welches durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert wird. Das dabei entstehende metastabile

Phenolat-Anion emittiert bei seinem Zerfall Licht mit einem Maximum von 477 nm. Dieses Lumineszenzsignal kann auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Da für die Umsetzung des Chemilumineszenzsignals ein alkalischer pH-Wert benötigt wird, wurde die Membran mit Puffer 3 (pH 9,5) vorbehandelt. Anschließend wurde die Membran mit 1 ml CSPD[®]- bzw. CDP-Star[®]-Lösung 5 min im Dunkeln inkubiert. Das überschüssige Substrat wurde entfernt und die Membran wurde in einer Filmkassette bei 37°C mind. 30 min vorinkubiert, ehe die Filmexposition erfolgte. Die Vorbehandlung mit Puffer 3, das Inkubieren des Chemilumineszenzsubstrats und die Exposition der Filme wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.2.1.8. Auswertung und Berechnung der mittleren Restriktionsfragmentlänge

Die entwickelten Filme wurden eingescannt und die Signale mit Hilfe des Computerprogramms ONE-DScan densitometrisch analysiert. Die gewonnenen Daten (jeweils % Retentionsfaktor (Rf) und integrierte optische Dichte an der Stelle i) wurden für die Berechnung in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft[®] Excel 97 übernommen. Auf dem Gel wurden als Marker eine „1 kb-Leiter“ (1018 bp, 1636 bp, 2036 bp, 3054 bp, 4072 bp, 5090 bp, 6108 bp, 7126 bp, 8144 bp, 9162 bp, 10180 bp, 11198 bp, 12216 bp) und ein mit DIG markierter Längenstandard (2027 bp, 2322 bp, 4361 bp, 6557 bp, 9416 bp, 23130 bp) mitgeführt, denen zu den % Rf-Werten die entsprechenden Molekulargewichte zugeordnet wurden. Somit konnten allen zur Berechnung ins Excel 97 übernommenen % Rf-Werten die jeweiligen Fragmentlängen zugeteilt werden. Die mittlere Restriktionsfragmentlänge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$M = \frac{\sum(OD_i \times L_i)}{\sum OD_i}$$

M: mittlere Fragmentlänge
OD_i: integrierte optische Dichte an der Stelle i
L_i: Fragmentlänge an der Stelle i

Tab. 2.4: Formel zur Berechnung der mittleren Telomer-Restriktionsfragmentlänge (TRF).

Aufgrund der Tatsache, dass lange Telomer-Restriktionsfragmente mehr Sonde binden können als kurze, geht mit Hilfe dieser Formel die Fragmentlänge an der Stelle i (L_i) ein, um eine Verschiebung der mittleren Telomerlänge zu höheren Fragmentlängen zu vermeiden.

2.2.2.2. Bestimmung der Telomeraseaktivität

2.2.2.2.1. Aufarbeitung des Probenmaterials

WTS-Zellen, A-549-Zellen

Die Aufarbeitung der Zellpellets erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers des TRAP_{EZE}[®] Telomerase Detection Kit. 10^6 Zellen wurden in 200 μ l CHAPS-Lysepuffer resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend in ein Multi-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (20 min, 12.000 rpm, 4°C) wurde ein Aliquot des Überstands für die Proteinbestimmung entnommen. Für die Telomeraseanalytik wurden ein Aliquot des Überstandes und das Originallysat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

T-ALL-Proben

Da es sich bei den T-ALL-Proben um kryokonservierte Blasten handelte, wurden die Zellen vor der eigentlichen Zellaufarbeitung mit PBS gewaschen, um mögliche PCR-inhibitorische Effekte durch das Einfriermedium zu vermeiden. Analog zur Probenaufarbeitung wurden die Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt. Da bei der Mehrzahl der Patientenproben keine genauen Angaben zur Zellzahl vorlagen, wurden die Zellpellets je nach ihrer Größe in max. 500 μ l CHAPS-Lysepuffer resuspendiert. Ansonsten erfolgte die Aufarbeitung des Probenmaterials nach den Angaben des Herstellers des TRAP_{EZE}[®]-Assays und die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, aufbewahrt.

Kolonbiopsieproben

Die Biopsieproben wurden direkt in den Multi-Reaktionsgefäßen in 200-250 µl CHAPS-Lysepuffer, welcher mit RNase-Inhibitor versetzt war (200 U/ml), resuspendiert. Analog dem Protokoll des TRAP_{EZE}[®] Telomerase Detection Kit wurden die Proben auf Eis inkubiert, zentrifugiert, aliquotiert, schockgefroren und anschließend wie in der für die WTS- und A-549-Zellen beschriebenen Weise gelagert.

2.2.2.2.2. Bestimmung des Proteingehalts

Die Proteinbestimmung der jeweiligen Proben erfolgte mittels Bicinchoninsäure (BCA) -Kit. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Protein mit Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bildet (Biuret-Reaktion). Die Cu²⁺-Ionen des Komplexes werden zu Cu⁺-Ionen reduziert, die mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden. 50 µl der Proteinlösung wurden in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml 2,2'-Bicinchoninsäure-Lösung und 20 µl 4%iger Kupfer-(II)-sulfat-Lösung versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde innerhalb von 30-60 min die Absorption der auf Raumtemperatur abgekühlten Proben bei 562 nm gemessen. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden bekannte Mengen (0-50 µg) Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Die Messung der Kalibrierlösungen und Proben erfolgten jeweils in Doppelbestimmung.

2.2.2.2.3. Bestimmung der alkalischen Phosphatase

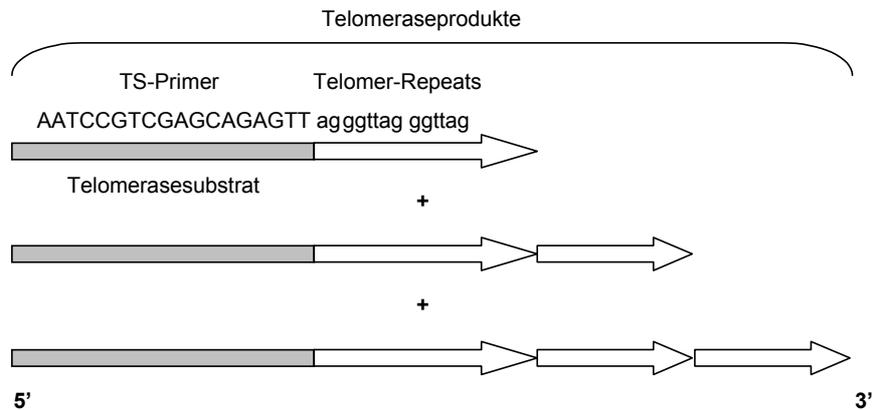
Für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase, die als Kontrolle für eine intakte Enzymaktivität gilt, wurden die lysierten Proben auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetragen. Die Membran wurde 30 min in einer 1%igen Blockierungslösung inkubiert und anschließend zweimal für je 10 min in Maleinsäurepuffer/0,1% Tween gewaschen. Nach Äquilibrieren der Membranen mit Puffer 3 (pH 9,5) wurde CSPD[®]-Lösung, ein Chemilumineszenzsubstrat für alkalische Phosphatase, über die Filter verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 37°C erfolgte die Filmexposition und -entwicklung bei Raumtemperatur.

2.2.2.2.4. Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)

Die Methode des „Telomeric Repeat Amplification Protocol“ (TRAP) zur Bestimmung der Telomeraseaktivität *in vitro* wurde von Kim et al. (1994) entwickelt. Der verwendete TRAP_{EZE}[®] Telomerase Detection Kit der Firma Q BIOgene basiert auf einer verbesserten Variante des von Kim et al. entwickelten TRAP-Assays. Diese auf Basis einer PCR-Reaktion beruhende, sehr sensitive Methode ermöglicht die Bestimmung geringster Enzymmengen. Nach Angaben des Herstellers sind bereits Extrakte mit 50 telomerasepositiven Zellen detektierbar. Der TRAP-Assay besteht aus zwei Schritten (siehe Abb. 2.1):

1. Schritt: Extensionsreaktion, Bildung des Telomeraseprodukts: Addition von Telomerrepeats an das Telomerase substrat, einem telomerähnlichen Oligonukleotid.
2. Schritt: PCR-Reaktion: Amplifikation der gebildeten Telomeraseprodukte.

1. Extensionsreaktion durch Telomerase



2. Amplifikation der Telomeraseprodukte durch PCR

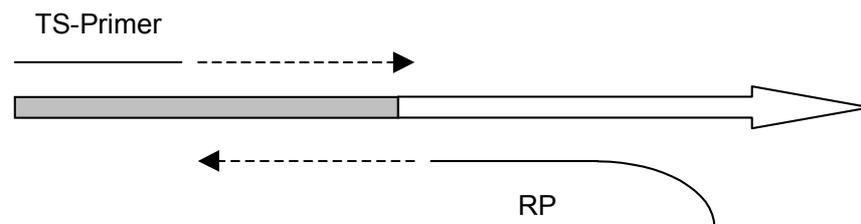


Abb. 2.1: Darstellung des Prinzips des Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP)-Assays (modifiziert nach Q Biogene "TRAP_{EZE}[®] Telomerase Detection Kit").

Im ersten Schritt dient der „forward primer“ als Telomerasesubstrat, so dass in telomerasepositiven Proben immer ein oder mehrere Hexanukleotide der Sequenz (GGTTAG) an das freie 3'-Ende des Telomerasesubstrats angehängt werden. Im zweiten Schritt dienen die gebildeten Telomeraseprodukte als Matrize für die PCR-Reaktion, bei welcher der TS-Primer nun als „forward primer“ und der RP-Primer als „reverse primer“ fungiert. Die so entstehende, um jeweils 6 Basen verlängerte, typische „Telomeraseleiter“ startet aufgrund der PCR-Bedingungen bei 50 Basen. In der folgenden Abb. 2.2 sind beispielhaft typische Telomeraseleitern dargestellt.

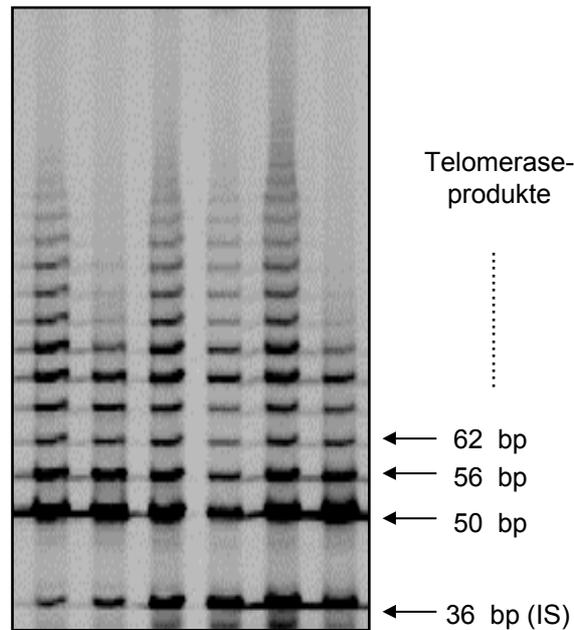


Abb. 2.2: Darstellung der mittels Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP)-Assay gebildeten Telomeraseprodukte. Telomeraseprodukte bilden die typische Telomeraseleiter, die aufgrund der PCR-Bedingungen bei 50 bp beginnt. Die 36 bp-Bande stellt die interne Kontrollbande dar, IS: interner Standard.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der TRAP_{EZE}[®] Telomerase Detection Kit mit einigen Modifikationen verwendet. Eine Veränderung gegenüber der Standardmethode war der Einsatz des mit einem Infrarotfarbstoff markierten TS-Primers. Die Markierung des TS-Primers am 5'-Ende mit einem im Infrarotlicht anregbaren Farbstoff ermöglichte die Detektion der PCR-Produkte auf nicht radioaktivem Weg mit Hilfe eines Infrarot-Lasers eines automatischen DNA-Sequenzers. Die PCR-Bedingungen und die eingesetzten Proteinmengen bzw. Zellzahlen wurden für die jeweiligen Proben optimiert. Ansonsten wurde die Bestimmung der Telomeraseaktivität analog dem Protokoll des TRAP_{EZE}[®] Telomerase Detection Kit durchgeführt. Alle Arbeitsschritte des TRAP-Assays (von der Herstellung der Verdünnungen bis zum Bedecken des PCR-Ansatzes mit Mineralöl) wurden auf Eis durchgeführt. Die Originallysate der Proben bzw. die PCR-Aliquots wurden sofort nach Herstellung der jeweiligen Verdünnung wieder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Zubereiten des „PCR-Mastermix“ und das Vorlegen des „PCR-Mastermix“ in die Reaktionsgefäße wurde in einem anderen Raum und mit getrennten Pipettensätzen durchgeführt als das Herstellen der Probenverdünnungen und die Zugabe der Proben zum „Mastermix“. Aus Gründen der Kontaminationsgefahr wurden beim

Pipettieren Filterspitzen eingesetzt. Der TRAP_{EZE}[®] Telomerase Detection Kit enthält alle notwendigen Reagenzien, um Telomeraseaktivität in Zellen bzw. Geweben nachzuweisen; Tab. 2.5 zeigt die Zusammensetzung des PCR-Mastermix.

	<i>Reagenz</i>	<i>µl pro Ansatz</i>
„Mastermix“	10x TRAP-Reaktionspuffer	5,0
	50x dNTP Mix	1,0
	TS-Primer	10-20 pmol (0,7-1,4)
	Primer Mix	1,0
	Taq Polymerase	2 U (0,4)
	Wasser (PCR-Qualität)	39,2-39,9

Tab. 2.5: Zusammensetzung des PCR-Mastermix des verwendeten nicht radioaktiven TRAP-Assays.

Zu den vorgelegten 48 µl „Mastermix“ pro Reaktionsgefäß wurden 2 µl der entsprechend verdünnten Probe pipettiert. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug damit 50,0 µl. Als „Negativkontrolle“ dienten in jeder PCR-Reaktion 2 µl CHAPS-Lysepuffer, um PCR-Artefakte und -Kontaminationen auszuschließen. 0,5-1,0 µl TSR8, das um 8 „Telomer-Repeats“ verlängerte Telomerasesubstrat, dienten als „Positivkontrolle“ zur Überprüfung der Effizienz der PCR-Reaktion und der Detektion der PCR-Produkte. CHAPS-Lysepuffer und TSR8 wurden jeweils anstelle der Proben zum „Mastermix“ gegeben. Vor Durchführung der PCR wurde jeder PCR-Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt. Tab. 2.6 zeigt den Temperatur-Zeit-Verlauf des TRAP-Assays.

<i>TRAP-Assay</i>	<i>Temperatur, Zeit</i>
1. Schritt: Extension	30°C, 30 min
Inaktivierung der Telomerase	94°C, 2 min
2. Schritt: PCR-Reaktion	
Denaturierung	94°C, 30 sec
Synthese	57°C, 30 sec
Anzahl PCR-Zyklen (Denaturierung/Synthese)	33-35 Zyklen
Post-Synthese	57°C, 2 min
Endtemperatur	20°C

Tab. 2.6: Beschreibung des Temperatur-Zeit-Verlaufs des nicht radioaktiven TRAP-Assays.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Telomeraseaktivitäten der Kolonbiopsien, WTS-Zellen und A-549-Zellen wurden mit dieser beschriebenen modifizierten Methode des TRAP-Assays durchgeführt. Da bei der Bestimmung der Telomeraseaktivität der T-ALL-Proben keine eindeutigen Ergebnisse gewonnen werden konnten, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. P. Boukamp (Deutsches Krebsforschungszentrum DKFZ, Heidelberg) die Enzymaktivität dieser Proben mit der radioaktiven Variante (^{32}P) des TRAP-Assays untersucht. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 10%igen nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel.

2.2.2.2.5. Zelllysatversuche mit Telomeraseinhibitoren

Die Telomeraseinhibitoren BRACO19 und BIBR1532 wurden in den Zelllysatversuchen (zellfreier TRAP-Assay) der WTS-Zelllinien SW-OH1 eingesetzt. Die Versuche wurden in der Weise durchgeführt, dass die Substanzen direkt in der jeweiligen Konzentration zum „Mastermix“ pipettiert wurden. Die Verdünnung der BIBR1532-Lösung wurde ausgehend von der Stammlösung (Lösungsmittel-Konzentration: 100% DMSO) mit Wasser hergestellt, so dass die Endkonzentrationen an DMSO je PCR-Ansatz zwischen 0,03% und 0,003% betragen. Um inhibitorische Einflüsse vom Lösungsmittel auf die PCR bzw. Telomeraseaktivität auszuschließen, wurden die entsprechenden Konzentrationen DMSO, wie sie in den Inhibitor-Lösungen vorlagen, zur Kontrolle zum „Mastermix“ pipettiert.

<i>Telomeraseinhibitor</i>	<i>eingesetzte Konzentrationen</i>
BRACO19	1,0 / 0,5 / 0,1 μ M
BIBR1532	10,0 / 5,0 / 1,0 μ M

Tab. 2.7: Darstellung der eingesetzten Konzentrationen der verwendeten Telomeraseinhibitoren im zellfreien TRAP-Assay.

Damit das Volumen des „Mastermix“ von 48 μ l gewährleistet war, wurde dementsprechend weniger Volumen Wasser zum Reaktionsmix gegeben. Nach der 30-minütigen Extensionszeit wurde die PCR, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, durchgeführt.

2.2.2.2.6. Auftrennung der Produkte im Polyacrylamidgel (TRAP-Gel)

Das Auftrennen der PCR-Produkte erfolgte in einem nicht denaturierenden 6%igen Polyacrylamidgel (0,4 mm) in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur. Aufgrund der Markierung des TS-Primers („forward primer“) mit einem IR-Farbstoff besaßen alle PCR-Produkte diese Farbstoffmarkierung und konnten beim Durchlaufen des Gels vom Infrarotlaser des automatischen Sequenzers detektiert werden. Aus folgenden Reagenzien wurde das Gel gegossen:

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen</i>
dest. Wasser	33,5 ml
50%ige Acrylamid-Lösung	4,9 ml
10x TBE (zum Sequenzieren)	1,6 ml
10%ige APS-Lösung	327 μ l
TEMED	40 μ l

Tab. 2.8: Zusammensetzung des 6%igen nativen (nicht denaturierenden) Polyacrylamidgels des TRAP-Gel-Assays. APS: Ammoniumperoxodisulfat, TEMED: N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin.

Als Laufpuffer wurde 0,4x TBE-Puffer (Sequenzierpuffer) verwendet. Nach Fokussierung des Lasers und einem 20-30-minütigen Vorlauf zur Erwärmung des Gels wurden die Proben aufgetragen. Hierfür wurden 2 μ l jeder Probe aus dem PCR-Ansatz entnommen und mit 2 μ l 2x Probenpuffer versetzt. Von dieser Mischung wurden jeweils 2 μ l auf das Gel aufgetragen. Folgende Bedingungen herrschten

während des Vorlaufs und der Auftrennung der PCR-Produkte: 35 mA, 31,5 W, 1500 V und 50°C. Die Dauer eines Gellaufs betrug ca. 40 min; anschließend konnten die Proben analysiert werden.

2.2.2.2.7. Auswertung der Telomeraseaktivität (TRAP-Gel)

Die Auswertung der Telomeraseaktivität erfolgte visuell durch Beurteilung der Intensität der Banden und der Anzahl der Sprossen der Telomeraseleitern. Die Proben wurden stets ohne Kenntnis der Reihenfolge der Proben (Blindauswertung) beurteilt und im Falle der „Colitisstudie“ durch zwei unabhängige Personen ausgewertet, denen die klinischen Daten der Proben nicht bekannt waren.

Im Rahmen der „Colitis-Studie“ und bei der Untersuchung der Telomeraseaktivität der T-ALL-Proben erfolgte die Beurteilung der Telomeraseaktivität der Proben anhand zusätzlicher Kontrollproben.

Um die Telomeraseaktivität der einzelnen Kolon-Biopsieproben miteinander vergleichen zu können, wurde eine Semiquantifizierung der Enzymaktivität durchgeführt. Hierfür wurde die Enzymaktivität der Gewebeproben bei zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen (0,08 und 0,008 µg Protein/PCR-Ansatz) beurteilt. Die Telomeraseaktivität der Biopsieproben wurde in Relation zur Telomeraseaktivität einer Kolonkarzinomprobe und einer korrespondierenden Probe aus normaler Kolonschleimhaut bewertet. Diese beiden Proben wurden bei den TRAP-Assays in einer Konzentration von 0,08 µg Protein je PCR-Ansatz als Kontrollen eingesetzt. Der Kolonkarzinomprobe wurde ein Score von 3 (starke Telomeraseaktivität) und der normalen Schleimhautprobe ein Score von 0 (keine Telomeraseaktivität) bei dieser Konzentration zugeteilt. So konnte für jede Biopsieprobe das Ausmaß der Telomeraseaktivität für beide Proteinkonzentrationen ermittelt werden. Der endgültige Telomeraseaktivitätsscore setzte sich aus den beiden Einzelscores, welche die untersuchten Proben bei der jeweiligen Proteinkonzentration erhielten, zusammen. Eine Probe konnte maximal einen Endscore von 4 erhalten, wenn sie bei beiden Konzentrationen eine Telomeraseaktivität von 3 aufwies. Der Endscore der Biopsieproben konnte 0 (keine Aktivität), 1 (schwache Aktivität), 2 (mäßige Aktivität), 3 (starke Aktivität) und 4 (sehr starke Aktivität) betragen.

Um eine semiquantitative Bestimmung der Telomeraseaktivität der T-ALL-Patientenproben durchführen zu können, wurden die Enzymaktivitäten mit denen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und denen von mit Phytohämagglutinin (PHA) stimulierten PBMC gesunder, erwachsener Spender verglichen. Den stimulierten PBMC wurde eine Telomeraseaktivität von 3 (sehr starke Aktivität) und den nicht stimulierten Zellen eine Aktivität von 0 (keine Aktivität) zugeordnet. Die Telomeraseaktivitäten der Patientenproben und der Kontrollproben wurden bei Einsatz von 0,04 µg Protein je PCR-Ansatz beurteilt.

Um falsch negative Ergebnisse, verursacht durch PCR-Inhibitoren, wie z.B. Hämoglobin, auszuschließen, wurden folgende Kontrollen durchgeführt:

1. Bei der Beurteilung der Proben wurde die 36 Basen umfassende Bande (interner Standard, IS) einbezogen. Diese probeninterne Kontrollbande setzt sich aus dem Primer K1, dem Template TSK1 und dem TS Primer zusammen. Bei Vorhandensein von PCR-Inhibitoren würde eine Amplifikation dieser 36 bp-Bande nicht stattfinden.
2. Die Telomeraseaktivität der Proben wurde in mind. 2 verschiedenen Verdünnungen bestimmt (Ausnahme: T-ALL-Proben). Sind Inhibitoren der Taq-Polymerase in dem Extrakt enthalten, ist die Probe bei höheren Proteinkonzentrationen telomerasenegativ, während sie jedoch bei geringeren Proteinkonzentrationen eine typische Telomeraseleiter zeigt. Darüber hinaus ermöglicht die Beurteilung der Telomeraseaktivität bei unterschiedlichen Verdünnungen einen semiquantitativen Vergleich der Telomeraseaktivitäten der Proben.
3. Die telomerasenegativen Proben wurden mit telomerasepositiven A-549-Zellen gemischt, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen.

2.2.2.3. Bestimmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT)

2.2.2.3.1. RNA-Isolierung und Bestimmung der RNA-Konzentration

RNA-Isolierung aus Zellkulturmaterial

Das Grundprinzip der RNA-Isolierung besteht darin, Zellen zu lysieren, RNasen zu inaktivieren und anschließend RNA aus dem Lysat zu isolieren. Auf diese Weise wird Gesamt-RNA erhalten, die ein Gemisch aus rRNA, mRNA, tRNA und snRNA

darstellt, wobei rRNA ca. 80-90% und mRNA nur einen Anteil von ca. 2% der Gesamt-RNA ausmacht. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Isolierung der RNA mit Hilfe des „RNeasy® Mini Kit“ einschließlich eines DNase I-Verdau nach den Angaben des Herstellers. Zunächst wurden die Zellpellets in einem denaturierenden guanidinisothiocyanathaltigen Puffer, welcher RNasen inaktiviert, aufgenommen und homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit Ethanol versetzt, um geeignete Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silica-Gel-Membran zu gewährleisten. Im letzten Schritt wurde die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert. Da mit dieser Methode selektiv Moleküle mit einer Größe von über 200 Nukleotiden isoliert werden, war das Eluat mit mRNA angereichert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

Messung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte wie die unter 2.2.2.1.1. beschriebene Messung der DNA-Konzentration. Die Herstellung der Verdünnung der zu messenden Proben erfolgte mit RNase-freiem Wasser. Bei der Berechnung der RNA-Konzentration wurde ein RNA spezifischer Multiplikationsfaktor (40) berücksichtigt wurde. Die Konzentration wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$[\text{RNA}] = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Gelelektrophorese

Die Integrität der erhaltenen RNA wurde in nativen, horizontalen 1,2% denaturierenden Agarosegelen kontrolliert. Hierzu wurde die Agarose im entsprechenden Volumen 10x 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)-Puffer gelöst und im Mikrowellenherd vollständig geschmolzen. Nach dem Abkühlen auf ca. 65°C wurden 1,8 ml 37% Formaldehyd-Lösung zu 100 ml Gellösung gegeben und anschließend wurde die Mischung in eine vorbereitete Gelapparatur gegossen. Nach ca. 30 min war die Gellösung erstarrt und konnte mit 1x Formaldehyd (FA)-Laufpuffer überschichtet werden. Die erforderliche Probenmenge (200 ng) wurde mit 1/5 des Gesamtvolumens 5x Ladungspuffer versetzt und direkt in die Probentaschen pipettiert. Die anschließende Elektrophorese wurde bei 80 V für 1,5 h durchgeführt. Nach Färben im Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml in 1xTBE) erfolgte die Detektion der

RNA-Gele unter UV-Licht (302 nm). Die 28S rRNA- und die 18S rRNA-Bande der Proben sollten als scharfe Banden im Gel zu detektieren sein, wobei die 28S rRNA-Bande zweimal intensiver ist als die 18S rRNA-Bande. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Videodokumentationssystems festgehalten.

2.2.2.3.2. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des „TaqMan Reverse Transcription Reagents kit“, indem mRNA als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese diente. Hierfür wurden 2 µg RNA je Probe in 38,5 µl RNase-freiem Wasser eingesetzt und anschließend mit 61,5 µl Reverse Transkription (RT)-Reaktionsmix (siehe Tab. 2.9) versetzt.

	<i>Reagenz</i>	<i>µl pro Ansatz</i>
<i>RT-Reaktionsmix</i>	10xTaqMan RT Puffer	10
	25 mM MgCl ₂	22
	2,5 mM dNTP Mix	20
	50 µM Random Hexamere	5
	RNase Inhibitor (20 U/µl)	2
	Multi Scribe Reverse Transkriptase (50 U/µl)	2,5

Tab. 2.9: Zusammensetzung des Reverse Transkription (RT)-Reaktionsmix für die cDNA-Synthese; dNTP: Desoxynukleotidtriphosphat.

Die Hybridisierung der „Random Hexamere“ an die Ausgangs-DNA wurde für 10 min bei 25°C durchgeführt, anschließend erfolgte die cDNA-Synthese für 60 min bei 48°C, bevor im letzten Schritt das Enzym für 5 min bei 95°C inaktiviert wurde.

2.2.2.3.3. Real-time TaqMan[®] PCR

Die katalytische Untereinheit der Telomerase (hTERT) wurde durch real-time TaqMan[®] PCR quantifiziert.

Aufbauend auf den Arbeiten von Holland et al. (1991) und Lee et al. (1993) wurde die TaqMan[®]-Technologie entwickelt, welche die Möglichkeit bietet, PCR-Produkte während ihrer Amplifikation zu detektieren.

Diese Methode macht sich die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase zu Nutze. Hierfür wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (6-Carboxyfluoreszein, FAM) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (6-Carboxytetramethylrhodamin, TAMRA) trägt. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenzenergieübertrag (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die Taq Polymerase auf diese Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe -und damit auch der FET- zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an, d.h. der Anstieg der Fluoreszenz ist direkt der Anreicherung an Amplifikat proportional. Eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgt mit Hilfe einer Kalibriergeraden eines gewählten Standards.

Die Auswahl der Sonde und Primer für die Amplifikation der hTERT orientierte sich an der Arbeit von Bieche et al. (2000). Die von Ulaner et al. (1998) beschriebenen Spleißversionen der hTERT-Transkripte können aufgrund der experimentellen Bedingungen der TaqMan[®]-PCR in der vorliegenden Arbeit nicht differenziert werden.

Die Sequenzen der eingesetzten Primer und der verwendeten Sonde sowie deren Platzierung innerhalb des Amplikons sind in Tab. 2.10 zusammengefasst.

<i>Gen und Oligonukleotid</i>	<i>Lage</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>
hTERT		
Forward Primer	2673U, Exon 10	TGACACCTCACCTCACCCAC
Reverse Primer	2767L, Exon 11	CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC
Sonde	2711U, Exon 11	^{FAM} ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG ^{TAMRA} -OH

Tab. 2.10: Charakterisierung der in der TaqMan[®] PCR eingesetzten Primer und der verwendeten Sonde; FAM: 6-Carboxyfluoreszein, TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin.

Für die PCR wurden 150 ng cDNA der zu bestimmenden Proben mit dem Reaktionsmix zu 25 µl ergänzt, der "1x TaqMan Universal Master Mix", je 300 nM der

Primer und 150 nM Sonde enthielt. Um bei der Quantifizierung von hTERT mRNA auf Unterschiede in der Gesamtmenge an RNA zu normalisieren, wurde 18S rRNA als endogene Kontrolle eingesetzt. Primer und Sonde für diese Kontrolle waren im "TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents kit" enthalten. Zur Quantifizierung der 18S rRNA wurden 0,01 ng cDNA der zu bestimmenden Proben eingesetzt. Um eine Quantifizierung der hTERT Expression zu ermöglichen, wurden Kalibriergeraden für hTERT und 18S rRNA durch Verdünnungsreihen hergestellt. Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurde die Lungenkarzinom-Zelllinie A-549 eingesetzt, die eine hohe Telomeraseaktivität aufweist. Die PCR wurde mittels "ABI Prism Sequence Detection System SDS 7700" unter folgenden Bedingungen durchgeführt (siehe Abb. 2.3).

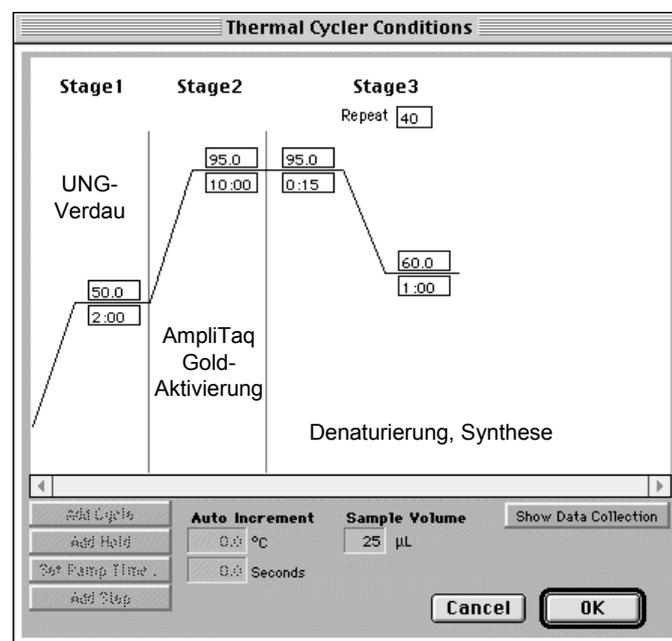


Abb. 2.3: Darstellung des Temperatur-Zeit-Verlaufs während der real-time TaqMan[®] PCR; UNG: Uracil N-Glykosylase.

Bei jedem real-time TaqMan[®] PCR-Lauf wurden hTERT und 18S rRNA der Proben und A-549-Zellen in einer Dreifachbestimmung gemessen. Bei jeder PCR wurden „Negativkontrollen“ mitgeführt, indem anstelle der cDNA-Probe Wasser zum RT-Reaktionsmix pipettiert wurde.

2.2.2.3.4. Auswertung der TaqMan®-Daten der hTERT mRNA-Expression

Das Signal der TaqMan® PCR repräsentiert die Veränderung in der Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffs aufgrund der Hydrolyse der sequenzspezifischen Sonde. Störende Fluktuationen der Fluoreszenz werden mit Hilfe eines passiven Referenzfarbstoffs, der dem Reaktionspuffer zugesetzt ist, ausgeglichen. Dieser normalisierende Effekt geht in die Berechnung als normalisiertes Reportersignal (R_n) ein: ein R_n -Wert entspricht dem Quotienten der Emissions-Intensität des Reporter-Farbstoffs dividiert durch die Emissions-Intensität des passiven Referenzfarbstoffs. Auf diese Weise können unspezifische Einflüsse wie Konzentrationsänderungen aufgrund von Volumenschwankungen (Pipettierfehler) ausgeglichen werden. Weitere Schwankungen, die nicht auf dem PCR-abhängigen Nuklease-Verdau basieren, werden berücksichtigt, indem das während der PCR-Zyklen erstellte Hintergrundsignal (Signal der Negativkontrolle) vom jeweiligen R_n -Wert abgezogen wird. Als Messwert erhält man den sogenannten C_T -Wert (Threshold Cycle), welcher der Zyklenzahl entspricht, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporterfluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird. Für die Quantifizierung wurde bei jeder PCR eine serielle Verdünnung einer Referenz-cDNA mitgeführt und daraus eine Kalibriergerade aus C_T gegen den Logarithmus der eingesetzten RNA-Menge erstellt. Da die Lungenkarzinom-Zelllinie A-549 eine hohe Telomeraseaktivität aufweist, wurden diese Zellen zur Erstellung der Kalibriergeraden eingesetzt. Dazu wurde mRNA von A-549-Zellen in cDNA umgeschrieben, die anschließend so verdünnt wurde, dass Konzentrationen von 0,001 ng - 10 ng RNA für die Erstellung der 18S rRNA-Kalibriergerade und Konzentrationen von 2 ng – 200 ng für die Erstellung der hTERT-Kalibriergerade dienen. Die Quantifizierung der gemessenen Proben erfolgte anschließend relativ zu dieser Kalibriergeraden durch folgende Formel:

$$\log(\text{Menge Zielgen}) = (C_T\text{-Wert der Probe} - b) / m$$

b = y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden

m = Steigung der Kalibriergeraden

Tab. 2.11: Gleichung zur Bestimmung der RNA-Menge von 18S rRNA bzw. hTERT in den untersuchten Proben.

2.2.3. Immunhistochemische Methoden

2.2.3.1. Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Kolonbiopsieproben wurden am Gewebeschnitt immunhistochemisch charakterisiert, indem mittels Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) der Entzündungsgrad nach folgendem System (siehe Tab. 2.12) bestimmt wurde.

<i>Enterozyten</i>	<i>Score</i>	<i>Lamina Propria</i>	<i>Score</i>
		<i>Mononukleäre Zellen</i>	
Normal	0	Normal	0
Verlust von einzelnen Zellen	1	Leichte Zunahme	1
Verlust von Zellgruppen	2	Mäßige Zunahme	2
Ulzeration	3	Starke Zunahme	3

<i>Krypten</i>	<i>Score</i>	<i>Neutrophile Granulozyten</i>	<i>Score</i>
Normal	0	Normal	0
Einzelne Entzündungszellen	1	Leichte Zunahme	1
Kryptitis	2	Mäßige Zunahme	2
Kriptenabzess	3	Starke Zunahme	3

Tab. 2.12: System zur Bestimmung des Entzündungsgrads der Biopsieproben anhand der Hämalaun-Eosin (HE) -gefärbten Gewebeschnitte in Anlehnung an Usselman et al. (2001). Bei jedem Gewebeschnitt wurden alle vier Parameter (Enterozyten, Lamina Propria/Mononukleäre Zellen, Krypten, neutrophile Granulozyten) beurteilt, so dass den Proben maximal ein Gesamtscore von 12 zugeteilt werden konnte.

Die Auswertung der HE-gefärbten Gewebeschnitte erfolgte durch einen sehr erfahrenen Pathologen, dem die klinischen Daten der Patienten und Ergebnisse der Telomeraseaktivitätsbestimmung nicht bekannt waren. Durch die Addition der einzelnen Scores der beurteilten Parameter (Enterozyten, Lamina Propria/ Mononukleäre Zellen, Krypten, neutrophile Granulozyten) konnten die Proben minimal einen Gesamtscore von 0 (normal) und maximal einen Gesamtscore von 12 (sehr stark entzündet) erreichen. Die untersuchten Proben wurden bzgl. ihres Gesamtscores in drei Gruppen unterteilt:

<i>Gruppe</i>	<i>Gesamtscore</i>	<i>Ausmaß der Entzündung</i>
1	0 – 2	normale Schleimhaut, nicht entzündet
2	3 – 7	mäßig entzündet
3	8 -12	stark entzündet

Tab. 2.13: Anhand des ermittelten Gesamtscores wurde der Entzündungsgrad der jeweiligen Proben bestimmt. Die Proben wurden nach dem Ausmaß der Entzündung in 3 Gruppen eingeteilt.

Die statistische Auswertung der Telomeraseaktivitäten der Biopsieproben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen basierte auf diesem HE-Score. Bei allen durch den HE-Score charakterisierten Biopsieproben (n=114) wurde die Telomeraseaktivität bei zwei verschiedenen Verdünnungen gemessen (0,08 µg und 0,008 µg Protein je PCR-Ansatz).

Aus den Einzelwerten der Telomeraseaktivität der Biopsieproben wurden in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad der Mukosa „entzündungsspezifische Mittelwerte“ bei jedem Patienten gebildet. D.h. stammten bei einem Patienten mehrere Biopsien aus normaler (HE-Score: 0-2), mäßig entzündeter (HE-Score: 3-7) oder stark entzündeter Schleimhaut (HE-Score: 8-12), gingen die Telomeraseaktivitäten der Biopsien mit demselben Entzündungsgrad in die Bildung des „entzündungsspezifischen Mittelwertes“ ein.

Neben den „entzündungsspezifischen Mittelwerten“ wurde der „individuelle Median“ aus den Telomeraseaktivitäten aller Biopsien für jeden Patienten ermittelt.

Die einzelnen Patientencharakteristika sind in Tab. 2.14 und 2.15 zusammengefasst.

Patient	Alter [Jahre]*	Dauer der Erkrankung [Jahre]	Grad (Median) der akuten Entzündung [#]	Aktuelle Medikation		Anzahl der untersuchten Biopsien [‡]		
				CED [§]	NSAR [†]	0-2	3-7	8-12
1	49	10	0,5	B	nein	1	1	0
2	70	2	2	C	nein		2	2
3	33	4	1	A	nein	1	4	0
4	59	11	0,5	B	nein	2	2	0
5	36	4	0,5	C	nein	3	1	0
6	37	Neu- diagnose	2	A	nein	1	2	1
7	42	2	2	A	nein	1	3	1
8	72	4	0,5	D	nein	3	0	1
9	55	32	1	B	k.A.	4	1	0
10	34	8	1	D	nein	2	3	0
11	62	k.A.	1	D	k.A.	2	3	0
12	69	25	0	D	ja	3	2	0
13	25	2	0	B	k.A.	4	0	1
14	69	6	1,5	D	nein	0	1	0
15	68	8	1	A	ja	0	1	0
16	26	1	3	D	ja	0	0	1
17	51	16	0	A	k.A.	1	0	0
18	60	2	1	D	nein	0	1	0

Tab. 2.14: Klinische Angaben zu den untersuchten Patienten mit Colitis ulcerosa; *Alter zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme, [#]basiert auf Beurteilung der neutrophilen Granulozyten, siehe Tab. 2.12; k.A.: keine Angabe; [§]Einteilung der Patienten nach Art der Medikation in vier Gruppen (A-D), siehe Abschnitt 3.1.3.1.3., CED: chronisch entzündliche Darmerkrankungen; [†]regelmäßige Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAR), [‡]Anzahl der untersuchten Biopsien aus gesunder (HE-Score: 0-2), mäßig entzündeter (HE-Score: 3-7) und stark entzündeter (HE-Score: 8-12) Kolonmukosa.

Patient	Alter [Jahre]*	Dauer der Erkrankung [Jahre]	Grad (Median) der akuten Entzündung [#]	Aktuelle Medikation		Anzahl der untersuchten Biopsien [‡]		
				CED [§]	NSAR [†]	0-2	3-7	8-12
1	28	6	2	D	ja	2	2	0
2	22	2	0	C	ja	3	0	0
3	30	10	1	D	nein	1	0	1
4	33	6	1,5	B	nein	1	2	1
5	59	26	1	B	k.A.	0	3	2
6	34	2	1	D	k.A.	3	0	2
7	64	12	0	A	nein	4	1	0
8	53	12	0	D	nein	5	0	0
9	25	Neudiagnose	0	A	k.A.	1	0	0
10	22	4 Monate	1	B	nein	1	0	0

Tab. 2.15: Klinische Angaben zu den untersuchten Patienten mit Morbus Crohn; *Alter zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme, [#]basiert auf Beurteilung der neutrophilen Granulozyten, siehe Tab. 2.12; k.A.: keine Angabe; [§]Einteilung der Patienten nach Art der Medikation in vier Gruppen (A-D), siehe Abschnitt 3.1.3.1.3., CED: chronisch entzündliche Darmerkrankungen; [†]regelmäßige Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAR), [‡]Anzahl der untersuchten Biopsien aus gesunder (HE-Score: 0-2), mäßig entzündeter (HE-Score: 3-7) und stark entzündeter (HE-Score: 8-12) Kolonmukosa.

2.2.4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Zur Beschreibung von Stichproben wurde der Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) sowie der Median berechnet. Für Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Mehr als zwei Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test mit einem nachfolgenden Dunn's Multiple Comparison Test ("Post-Test") verglichen. Zur Darstellung eines Zusammenhangs zwischen zwei Messgrößen wurde eine lineare Regression berechnet. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte wurde mit einer nicht linearen Regressionsanalyse durchgeführt; IC₉₀-Werte wurden anhand der Parameter der Kurvengleichung der nicht linearen Regressionsanalyse ermittelt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Telomere, Telomeraseaktivität und hTERT mRNA-Expression als diagnostische bzw. prognostische Marker

3.1.1. Telomerlänge, Telomeraseaktivität und hTERT mRNA-Expression bei kindlichen Weichteilsarkomen

3.1.1.1. *Telomerlänge von Weichteilsarkomzelllinien*

Die Telomerlängen-Bestimmung der verschiedenen Proben wurde wie in Abschnitt 2.2.2.1. beschrieben durchgeführt. Leukozyten, die von Kindern und Jugendlichen ohne WTS stammten, dienten als Kontrollen für die WTS-Zelllinien. Insgesamt wurden Telomerlängen bei 19 Kindern und Jugendlichen ohne WTS im Alter von 3 bis 17 Jahren analysiert. Die zur Verfügung stehenden DNA-Mengen der einzelnen Kontrollproben reichte in den meisten Fällen (n = 16) nur für Einzelbestimmungen. Die Bestimmung der Telomerlängen ist in einem repräsentativen Southern Blot in Abb. 3.1 dargestellt, während Tab. 3.1 eine Datenübersicht der einzelnen Kontrollen zeigt.

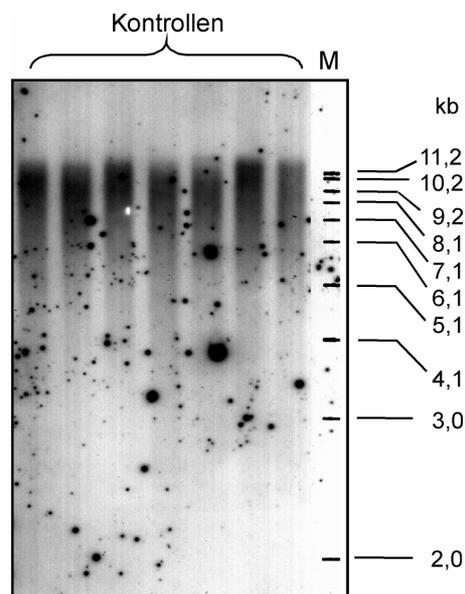


Abb. 3.1: Repräsentativer Southern Blot; Vergleich der Telomerlängen in Leukozyten der Kontrollproben mittels Southernblot-Analyse; M = Längenstandard („1 kb-Leiter“). Neben dem „1 kb-Marker“ wurde ein DIG-gelabelter Längenstandard eingesetzt. Die schwarzen Punkte stellen Artefakte nicht gelöster Partikel der CDP-Star®-Lösung dar.

<i>Patient</i>	<i>Alter [Jahre]</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>TRF [bp]</i>
1	17	w	8341
2	9	w	8308
3	14	m	8020
4	7	w	8345
5	11	w	8610
6	15	m	7718
7	15	w	7690
8	8	m	7856
9	7	m	8083
10	11	w	8407
11	11	m	7940
12	7	m	7810
13	3	m	8888
14	12	w	8514
15	17	w	8437
16	10	m	8374
17	7	w	8833
18	5	m	8655
19	6	m	8979

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Patientendaten und der Ergebnisse der Telomerlängen-Bestimmung der einzelnen Kontrollproben mittels Telomer-Restriktionsfragment (TRF)-Analyse. Aufgrund der begrenzt zur Verfügung stehenden DNA-Mengen konnte nur bei den Proben 9, 11 und 12 eine Doppelbestimmung (Angabe des MW) durchgeführt werden; bei den anderen Proben erfolgte je eine Einzelbestimmung; w: weiblich, m: männlich.

Obwohl die Bestimmung der Telomerlängen in den Leukozyten der 19 Kontrollen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang ($p > 0,05$) zwischen Telomerlänge und kalendarischem Alter der Kinder und Jugendlichen ergab, ist ein Trend einer Assoziation zu beobachten. Die Daten sind in Abb. 3.2 dargestellt.

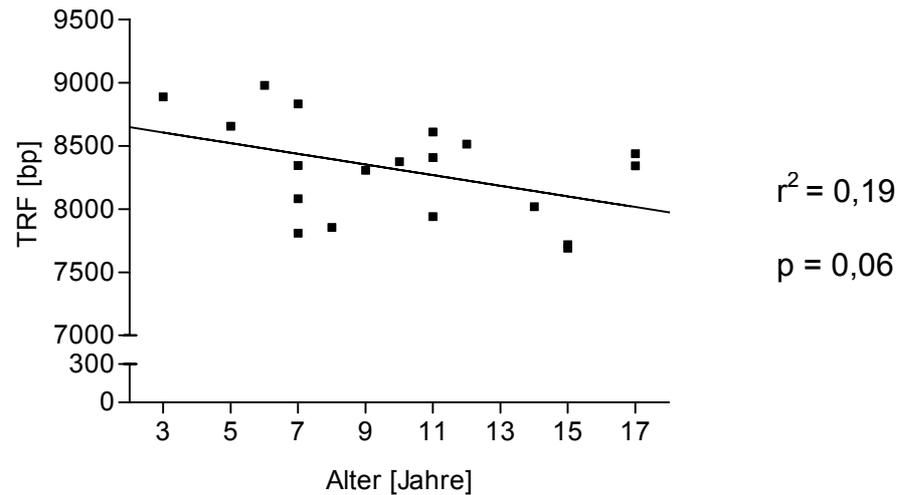


Abb. 3.2: Darstellung der mittels Southernblot-Analyse ermittelten Telomerlängen (TRF) in Leukozyten von 19 gesunden Kinder und Jugendlichen in Abhängigkeit vom kalendarischen Alter.

Diese Werte bestätigten den in der Literatur beschriebenen Zusammenhang zwischen der Abnahme der Telomerlänge in Leukozyten mit dem kalendarischen Alter des Patienten (Hastie et al., 1990). Hiermit wurde indirekt die Validität der Methode der Telomerlängen-Bestimmung mittels Southernblot-Analyse bestätigt und somit die Basis für die weitere Bestimmung der Telomerlängen im Rahmen dieser Arbeit geschaffen.

Soweit genügend Probenmaterial vorhanden war, wurden die Telomerlängen der 12 WTS-Zelllinien (siehe Tab. 3.2) in 2 bis 3 voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt.

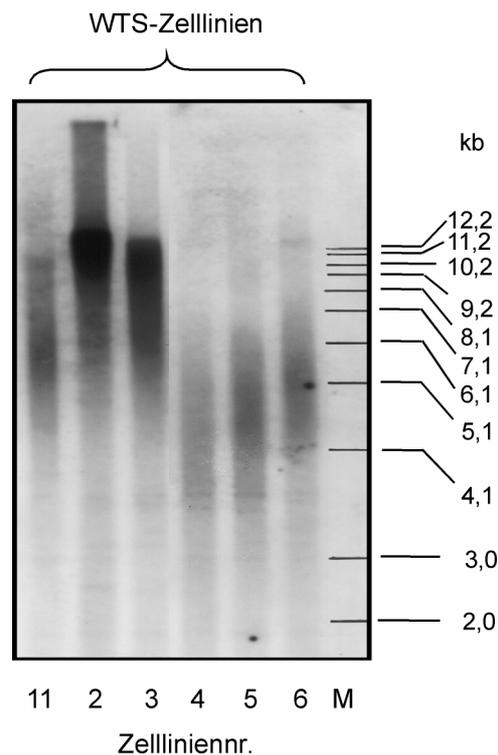


Abb. 3.3: Repräsentative Southernblot-Analyse; Vergleich der Telomerlängen der WTS-Zelllinien; 11, 2-6 = untersuchte Zelllinie; M = Längenstandard („1 kb-Leiter“). Neben dem „1 kb-Marker“ wurde ein DIG-gelabelter Längenstandard eingesetzt.

Wie der repräsentative Southern Blot in Abb. 3.3 verdeutlicht, zeigten die untersuchten WTS-Proben sehr heterogene Telomerlängen, wobei diese in einem Bereich von 3,7 bis 9,0 kb lagen. Die Telomerlängen der WTS-Zelllinien, die von Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 6 Jahren analysiert wurden, waren statistisch signifikant kürzer ($MW \pm SD$; $6,0 \pm 1,6$ kb; $n = 12$) als die der „altersgematchten“ Kontrollproben ($8,5 \pm 0,5$ kb), die von 7 Kindern mit einem Durchschnittsalter von 5 Jahren stammten ($p < 0,005$) (siehe Abb. 3.4).

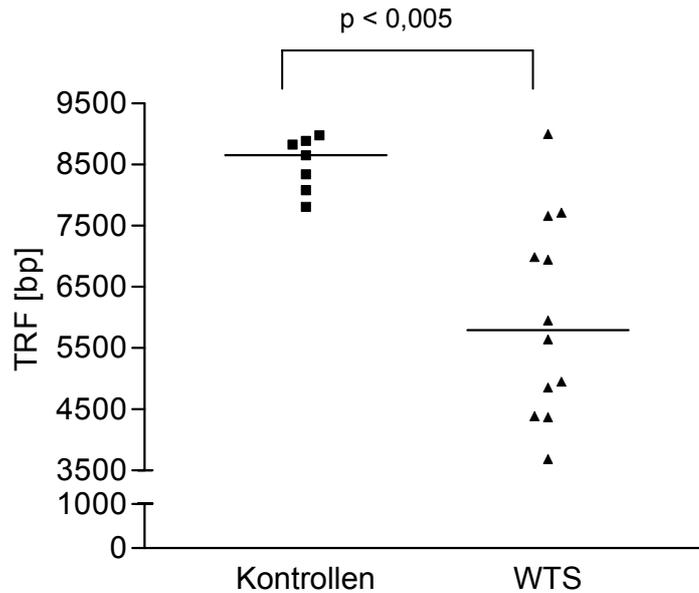


Abb. 3.4: Vergleich der mittels Southern Blot ermittelten Telomerlängen der Kontrollen und der WTS-Zelllinien. Die Kontrollen stammten von Kindern mit einem Durchschnittsalter von 5 Jahren; die WTS-Zelllinien wurden von Patienten mit einem Durchschnittsalter von 6 Jahren analysiert. 10 einzelne Datenpunkte der WTS stellen Mittelwerte aus 2 bis 3 Einzelbestimmungen dar. Die horizontalen Balken geben die Mediane an. Es bestand ein statistisch signifikanter Unterschied in der Telomerlänge zwischen beiden Gruppen.

Es wurde nun abgeklärt, ob ein Zusammenhang zwischen der Telomerlänge und dem WTS-Subtyp besteht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass periphere neuroektodermale Tumore tendenziell längere Telomerlängen aufweisen ($MW \pm SD$; $7,9 \pm 1,0$ kb; $n = 3$) als embryonale Rhabdomyosarkome ($6,2 \pm 0,7$ kb; $n = 3$), Rhabdoidtumore (RT; $5,3 \pm 1,6$ kb; $n = 4$) und alveoläre Rhabdomyosarkome, die mit einer durchschnittlichen Telomerlänge von $4,3 \pm 0,8$ kb ($n = 2$) die kürzesten Telomere zeigten. Aufgrund der geringen Fallzahlen konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Telomerlängen und den WTS-Subtypen ermittelt werden (siehe Abb. 3.5).

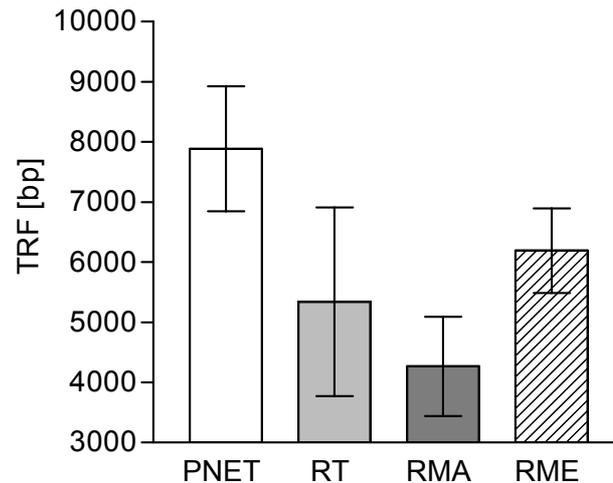


Abb. 3.5: Vergleich der mittels Southernblot-Analyse ermittelten Telomerlängen (MW ± SD) der WTS-Subtypen. Statistisch signifikante Unterschiede in der Telomerlänge zwischen den 4 Gruppen wurden nicht festgestellt. PNET: periphere neuroektodermale Tumore (n=3), RT: Rhabdoidtumore (n=4), RMA: alveoläre Rhabdomyosarkome (n=2), RME: embryonale Rhabdomyosarkome (n=3).

Weiterhin konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$, Mann Whitney-Test) in den Telomerlängen zwischen den beiden Gruppen der prognostisch günstigen WTS (embryonale Rhabdomyosarkome) und der prognostisch ungünstigen WTS (periphere neuroektodermale Tumore, Rhabdoidtumore, alveoläre Rhabdomyosarkome) festgestellt werden.

Darüber hinaus wurden Patientendaten wie Alter und Geschlecht und die untersuchte Zellkulturpassage mit den ermittelten Telomerlängen in Beziehung gesetzt. Es konnte jedoch keine Assoziation zwischen der Telomerlänge und dem Patientenalter zum Zeitpunkt der Zelletablierung ($r^2 = 0,049$; $p = 0,49$), dem Geschlecht der Patienten ($p = 0,49$) und der Anzahl der untersuchten Passage der WTS-Zellen ($r^2 = 0,0008$; $p = 0,93$) festgestellt werden.

In der folgenden Tab. 3.2 sind die untersuchten Zelllinien, Patientendaten und ermittelten Telomerlängen zusammenfassend dargestellt.

<i>Patientenalter*</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>WTS-Subtyp</i>	<i>Zelllinien-nr.</i>	<i>Name der etablierten Zelllinie</i>	<i>untersuchte Zellkultur-passage</i>	<i>TRF [bp]</i>
21 J. 2 M.	w	PNET	1	KN-OH1	51	6943
11 J. 8 M.	w	PNET	2	GR-OH1	62	8998
6 J.	w	PNET	3	KKJ-P	16	7715
10 M.	m	RT	4	SW-OH1	28	4372
11 M.	w	RT	5	PL377	51	4387
1 J. 5 M. [†]	m	RT	6	Wa-2 [#]	93	4950
6 M.	m	RT	7	MON [§]	7	7662
3 J. 10 M.	m	RMA	8	FL-OH1	13	3683
19 J.	w	RMA	9	HÄ-OH1	11	4852
4 J. 2 M.	m	RME	10	RUCH-3	53	5949
1 Tag	m	RME	11	DI-OH1	9	6986
1 J. 3 M.	w	RME	12	RUCH-2 [‡]	56	5641

Tab. 3.2: Zusammenfassung der wichtigsten Daten der Patienten mit WTS, von denen Zelllinien etabliert wurden, und Darstellung der Ergebnisse der Telomer-Restriktionsfragment (TRF)-Analyse der Zelllinien; * zum Zeitpunkt der Zelletablierung; † zum Zeitpunkt der Diagnose; J.: Jahr, M.: Monat; w: weiblich, m: männlich; PNET: periphere neuroektodermale Tumore, RT: Rhabdoidtumore, RMA: alveoläre Rhabdomyosarkome, RME: embryonale Rhabdomyosarkome; [#] Handgretinger et al., 1990; [§]Versteeg et al., 1998; [‡] Scholl et al., 2000; während die TRF-Werte der RUCH-3- und RUCH-2-Zellen auf Einzelbestimmungen basieren, wurden die TRF-Mittelwerte der anderen Proben aus 2 bis 3 Einzelbestimmungen gebildet.

3.1.1.2. *Telomeraseaktivität von Weichteilsarkomzelllinien*

Die Telomeraseaktivität der 12 WTS-Zelllinien wurde bei verschiedenen Proteinkonzentrationen mittels TRAP-Gel-Assay bestimmt; dabei wurden Proteinkonzentrationen von 0,5 und 0,05 µg Protein je PCR-Ansatz eingesetzt. Da eine Konzentration von 0,05 µg Protein je PCR-Ansatz sich als am besten geeignet für den Vergleich der Telomeraseaktivitäten der 12 WTS-Zelllinien erwies, wurde sie als „Standardkonzentration“ definiert. Die Beurteilung der Telomeraseaktivität „negativ“ (-), „schwach“ (+) und „stark“ (++) basierte auf dem Vergleich der Telomeraseleitern der Proben, indem Anzahl und Intensität der Banden berücksichtigt wurden. Einen Überblick über die gemessenen Telomeraseaktivitäten

der 12 WTS-Zelllinien bei 0,05 µg Protein je PCR-Ansatz zeigt ein repräsentatives TRAP-Gel in Abb. 3.6.

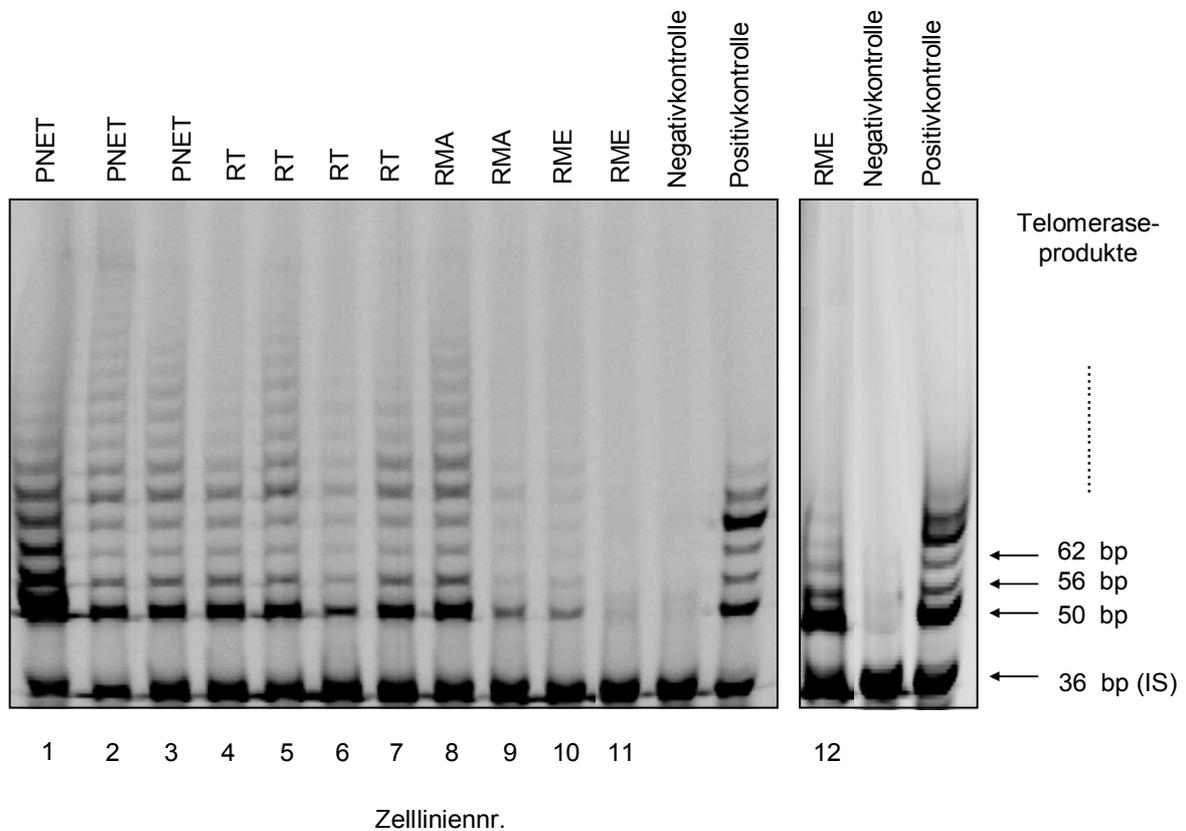


Abb. 3.6: Bestimmung der Telomeraseaktivität der 12 WTS-Zelllinien mit dem TRAP-Gel-Assay. WTS-Zelllinien (1-12), Negativkontrolle (CHAPS-Lysepuffer), Positivkontrolle (TSR8); PNET: periphere neuroektodermale Tumore, RT: Rhabdoidtumore, RMA: alveoläre Rhabdomyosarkome, RME: embryonale Rhabdomyosarkome. Eingesetzte Proteinmenge je PCR-Ansatz: 0,05 µg.

Wie Abb. 3.6 verdeutlicht, zeigten vier der zwölf untersuchten WTS keine (Probe 11) oder eine schwache Telomeraseaktivität (Proben 9, 10, 12), während 8 WTS-Zelllinien (Proben 1-8) eine hohe Telomeraseaktivität aufwiesen. Eine Übersicht der gemessenen Telomeraseaktivitäten der 12 WTS-Zelllinien bei 0,5 und 0,05 µg Protein je PCR-Ansatz gibt Tab. 3.3.

Zell- linien- nr.	Zell- linie	WTS- Subtyp	Tumormaterial, aus dem die Zelllinie etabliert wurde	untersuchte Zellkultur- passage	Telomeraseaktivität	
					Proteinkonzentration bezogen auf einen PCR-Ansatz	
					0,5 µg	0,05 µg
1	KN-OH1	PNET	Rezidiv	51	++	++
2	GR-OH1	PNET	Primärtumor	62	++	++
3	KKJ-P	PNET	Primärtumor	16	++	++
4	SW-OH1	RT	Primärtumor	28	++	++
5	PL377	RT	Primärtumor	51	++	++
6	Wa-2	RT	Rezidiv	93	++	++
7	MON	RT	n.b.	7	++	++
8	FL-OH1	RMA	Primärtumor	13	++	++
9	HÄ-OH1	RMA	Rezidiv	11	++	+
10	RUCH-3	RME	Rezidiv	53	++	+
11	DI-OH1	RME	Primärtumor	9/11	+	-
12	RUCH-2	RME	Primärtumor	54	+	+

Tab. 3.3: Ergebnisse der Bestimmung der Telomeraseaktivität der WTS-Zelllinien bei 2 verschiedenen Proteinkonzentrationen; Telomeraseaktivität: ++ = stark, + = schwach; - = nicht detektierbar; PNET: periphere neuroektodermale Tumore, RT: Rhabdoidtumore, RMA: alveoläre Rhabdomyosarkome, RME: embryonale Rhabdomyosarkome; n.b.: nicht bekannt.

Wie anhand von Abb. 3.6 und Tab. 3.3 deutlich wird, zeigten die embryonalen Rhabdomyosarkome keine oder nur eine schwache Telomeraseaktivität bei der „Standardkonzentration“, während die WTS-Zelllinien der peripheren neuroektodermalen Tumore, Rhabdoidtumore und alveolären Rhabdomyosarkome eine hohe Telomeraseaktivität aufwiesen. Lediglich eine Zelllinie eines alveolären Rhabdomyosarkoms (Probe 9) besaß eine schwache Aktivität des Enzyms. Ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,02$, Mann Whitney-Test) in der Telomeraseaktivität ergab sich zwischen den beiden Gruppen der prognostisch günstigen WTS (embryonale Rhabdomyosarkome) und der prognostisch ungünstigen WTS (periphere neuroektodermale Tumore,

Rhabdoidtumore, alveoläre Rhabdomyosarkome). Weiterhin zeigten die Untersuchungen, dass Telomeraseaktivität unabhängig von der Art des Tumormaterials (Primärtumor, Rezidiv) war, aus dem die Zelllinie etabliert wurde ($p=0,79$).

Bei allen Proben wurde die Telomeraseaktivität auch zusätzlich bei 0,005 μg Protein pro PCR-Ansatz bestimmt, um das Vorhandensein möglicher PCR-Inhibitoren auszuschließen. Darüber hinaus wurde bei den Zelllinien alkalische Phosphatase untersucht, um mögliche Fehler bei der Probenaufarbeitung zu detektieren. Sowohl die Bestimmungen der Telomeraseaktivität bei 0,005 μg Protein je PCR-Ansatz und die Untersuchungen der alkalischen Phosphatase ließen nicht auf PCR-Inhibitoren bzw. Fehler in der Probenaufarbeitung schließen. Ebenso konnte bei einer Mischung, die aus der telomerasenegativen RME-Probe (Probe 11) und telomerasepositiven A-549-Zellen (Lungenkarzinomzelllinie) bestand, keine Abnahme der Telomeraseaktivität der A-549-Zellen beobachtet werden, was den Ausschluss von PCR-Inhibitoren erlaubt. Die Abb. 3.7 veranschaulicht die Telomeraseaktivität dieser Zelllysatzmischungen, bestehend aus der telomerasenegativen DI-OH1-Probe und den telomerasepositiven A-549-Zellen.

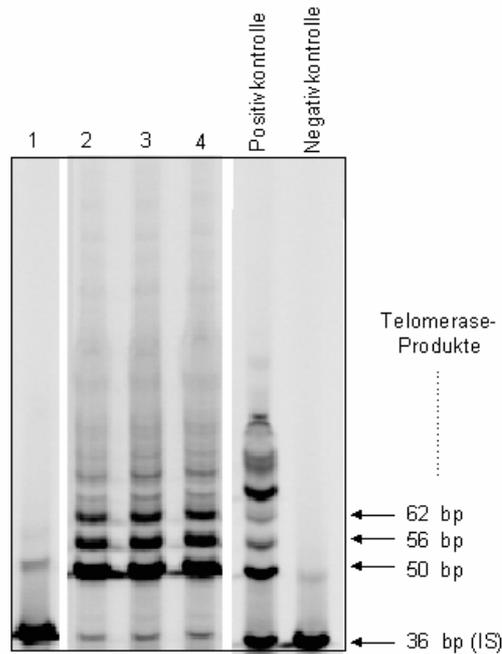


Abb. 3.7: Bestimmung der Telomeraseaktivität von A-549-Zellen und von Zelllysatzmischungen mit dem TRAP-Gel-Assay; Proben DI-OH1 (1), A-549 (2), A-549 gemischt mit DI-OH1 (3, 4), Positivkontrolle (TSR8), Negativkontrolle (CHAPS-Lysepuffer); eingesetzte Proteinmenge je PCR-Ansatz (DI-OH1): 0,05 μ g (1, 3), 0,005 μ g (4); eingesetzte Zellzahl je PCR-Ansatz (A-549): 500 (2, 3, 4).

Da Unterschiede in der Telomeraseaktivität der einzelnen WTS-Zelllinien durch PCR-Inhibitoren oder Aufarbeitungsfehler ausgeschlossen werden konnten, verdeutlichen die Untersuchungen, dass eine günstige Prognose der WTS mit einer fehlenden bzw. geringen Telomeraseaktivität assoziiert ist, während eine ungünstige Prognose mit einer hohen Telomeraseaktivität einhergeht.

3.1.1.3. *hTERT mRNA-Expression von Weichteilsarkomzelllinien*

Nachdem gezeigt worden war, dass die verschiedenen WTS-Zelllinien und WTS-Subtypen unterschiedliche Telomeraseaktivitäten aufwiesen, wurde nun untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT und der Telomeraseaktivität besteht. Mit Hilfe der real-time TaqMan[®] PCR wurde die hTERT-Expression auf mRNA-Ebene quantifiziert. In der folgenden Tabelle (Tab. 3.4) sind die Ergebnisse der real-time PCR dargestellt.

Zelllinien- nr.	Zelllinie	WTS- Subtyp	untersuchte Zellkultur- passage	hTERT $m_{A-549\text{ RNA}} [g]$	18S rRNA $m_{A-549\text{ RNA}} [g]$	hTERT normalisiert auf 18S rRNA
1	KN-OH1	PNET	51	$1,22 \times 10^{-07}$	$1,95 \times 10^{-10}$	625
2	GR-OH1	PNET	62	$1,65 \times 10^{-07}$	$3,43 \times 10^{-10}$	482
3	KKJ-P	PNET	16	$1,22 \times 10^{-07}$	$3,08 \times 10^{-10}$	397
4	SW-OH1	RT	28	$3,71 \times 10^{-08}$	$3,52 \times 10^{-10}$	105
5	PL377	RT	51	$2,01 \times 10^{-07}$	$5,74 \times 10^{-10}$	350
6	Wa-2	RT	93	$1,05 \times 10^{-08}$	$2,87 \times 10^{-11}$	367
7	MON	RT	7	$3,96 \times 10^{-08}$	$8,84 \times 10^{-10}$	45
8	FL-OH1	RMA	14	$3,76 \times 10^{-06}$	$3,45 \times 10^{-10}$	10.900
9	HÄ-OH1	RMA	13	$1,43 \times 10^{-08}$	$2,82 \times 10^{-10}$	51
10	RUCH-3	RME	77	$3,51 \times 10^{-07}$	$4,36 \times 10^{-10}$	805
11	DI-OH1	RME	9	$4,18 \times 10^{-09}$	$6,29 \times 10^{-10}$	7
12	RUCH-2	RME	55	$3,60 \times 10^{-09}$	$3,67 \times 10^{-10}$	10

Tab. 3.4: Darstellung der Werte der real-time TaqMan® PCR-Analyse. hTERT = Zielgen; 18S rRNA = endogene Kontrolle; hTERT normalisiert ($hTERT_N$) = $hTERT/18S\ rRNA$. Werte für hTERT und 18S rRNA stellen Mittelwerte aus 3 Einzelmessungen dar. PNET: periphere neuroektodermale Tumore, RT: Rhabdoidtumore, RMA: alveoläre Rhabdomyosarkome, RME: embryonale Rhabdomyosarkome.

Die ermittelte, normalisierte hTERT-Expression ($hTERT_N$) zeigte in den 12 untersuchten Zelllinien eine sehr hohe Variabilität und reichte von 7 bis 10.900. Bei den Untersuchungen wurde deutlich, dass die Proben, die bei der „Standardkonzentration“ (0,05 µg Protein je PCR-Ansatz) Telomeraseaktivität aufwiesen, auch hTERT exprimierten. Bei den zwei WTS-Zelllinien, die keine oder eine schwache Telomeraseaktivität aufwiesen (Proben 11, 12), konnte eine sehr geringe hTERT-Expression ($hTERT_N$: 7 bzw. 10) gemessen werden. Eine größere Diskrepanz wurde lediglich bei einer Probe (Probe 10) festgestellt, die im Gegensatz zu ihrer schwachen Telomeraseaktivität eine hohe hTERT-Expression ($hTERT_N$: 805) aufwies. Die Beziehung der auf 18S rRNA normalisierten hTERT-Expression ($hTERT_N$) und der Telomeraseaktivität der untersuchten Zelllinien ist in der folgenden Abb. 3.8 dargestellt.

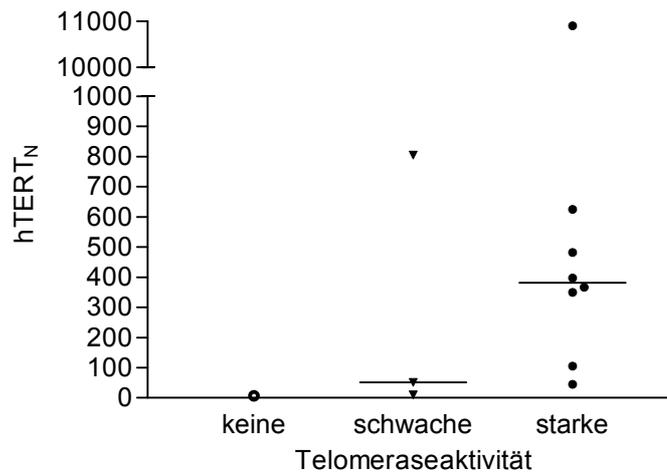


Abb. 3.8: Vergleich der auf 18S rRNA normalisierten hTERT-Expression (hTERT_N) mit der Telomeraseaktivität der WTS-Zelllinien. Die dargestellten Telomeraseaktivitäten wurden bei 0,05 µg Protein je PCR-Ansatz ermittelt. Die horizontalen Linien geben die Mediane an. Statistisch signifikante Unterschiede in der hTERT-Expression zwischen den 3 Gruppen wurden nicht festgestellt.

Obwohl sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen hTERT-Expression und Telomeraseaktivität zeigte, scheint eine Tendenz zur Assoziation zwischen diesen beiden Parametern zu bestehen.

Wie bei den Telomerlängen wurde kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der hTERT-Expression zwischen den beiden Gruppen der prognostisch günstigen WTS (embryonale Rhabdomyosarkome) und der prognostisch ungünstigen WTS (periphere neuroektodermale Tumore, Rhabdoidtumore, alveoläre Rhabdomyosarkome) beobachtet.

Nach der Analyse von Telomerlänge, Telomeraseaktivität und hTERT-Expression wurden die ermittelten Telomerlängen mit der Telomeraseaktivität bzw. hTERT-Expression verglichen. Es zeigte sich weder ein Zusammenhang zwischen Telomerlänge und Telomeraseaktivität (siehe Abb. 3.9) noch zwischen Telomerlänge und hTERT-Expression (siehe Abb. 3.10).

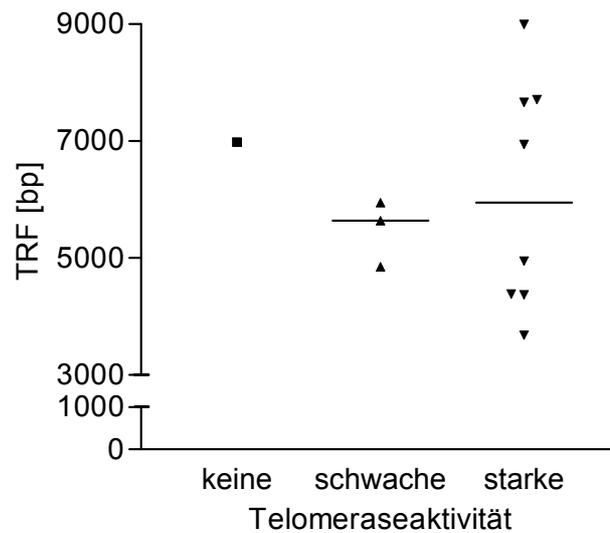


Abb. 3.9: Vergleich zwischen Telomerlänge und Telomeraseaktivität der WTS-Zelllinien. Die dargestellten Telomeraseaktivitäten wurden bei 0,05 µg Protein je PCR-Ansatz ermittelt. Die horizontalen Linien geben die Mediane an. Statistisch signifikante Unterschiede in der Telomerlänge zwischen den 3 Gruppen wurden nicht festgestellt.

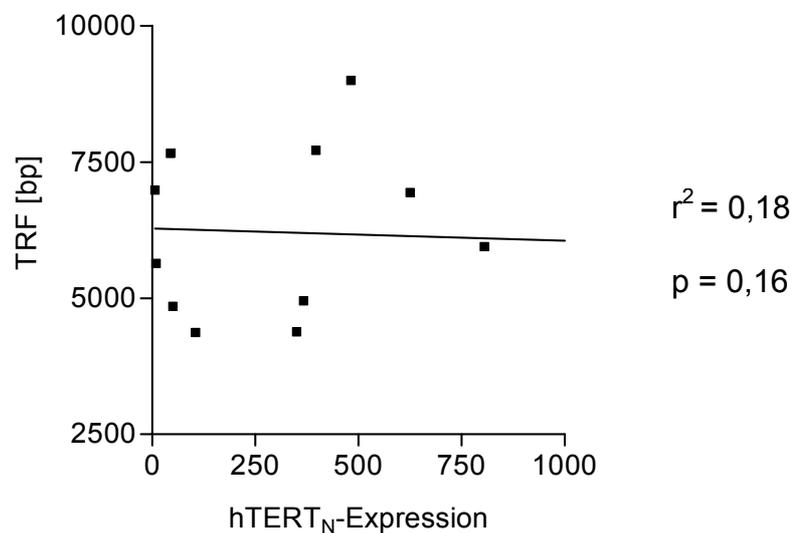


Abb. 3.10: Darstellung der mittels Southernblot-Analyse ermittelten Telomerlängen von 12 WTS-Zelllinien in Abhängigkeit von der hTERT_N-Expression. Zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen den Telomer-Restriktionsfragmenten (TRF) und der hTERT_N-Expression wurde eine lineare Regression berechnet. In dieser Graphik ist Probe 8 mit dem Extremwert von 10.900 als Datenpunkt nicht enthalten.

3.1.2. Telomerlänge, Telomeraseaktivität und hTERT mRNA-Expression bei akuter lymphoblastischer Leukämie vom T-Zell-Typ (T-ALL)

Bislang wurden weder Telomerlänge noch Telomeraseaktivität und hTERT-Expression maligner T-Zellen bei T-ALL systematisch analysiert. In Kooperation mit Herrn PD Dr. J. Greil von der Universitätskinderklinik Tübingen wurden kryokonservierte Blasten von Kindern und Jugendlichen mit T-ALL in einer retrospektiven Studie untersucht. Bei den untersuchten Patientenproben (n=20) handelte es sich in 17 Fällen um Blasten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und damit vor Therapiebeginn isoliert worden waren, und in 3 Fällen um Blasten, die von Patienten nach einem Rezidiv stammten.

3.1.2.1. *Telomerlänge und T-ALL*

Die Untersuchung der Telomerlänge der Patientenproben mittels Southernblot-Analyse zeigte eine heterogene Verteilung. Die ermittelten Telomerlängen der T-ALL-Blasten wurden wie die Telomerlängen der WTS-Zelllinien mit den Telomeren von Kontrollen (Leukozyten) verglichen. Da nicht von allen 20 Patienten genügend Probenmaterial zur Verfügung stand, wurden die Telomerlängen bei 14 Patienten bestimmt. Während die gemessenen Telomerlängen aller T-ALL-Proben zwischen 3,5 kb und 8,1 kb ($6,4 \pm 1,3$ kb, Durchschnittsalter der Patienten: 8 Jahre) lagen, betragen die Telomere der 19 Kontrollen im Durchschnitt $8,3 \pm 0,4$ kb (Durchschnittsalter: 10 Jahre). Die T-ALL-Blasten zeigten damit statistisch signifikant ($p < 0,0001$) kürzere Telomere als die Kontrollen. Diese Ergebnisse sind in Abb. 3.11 zusammenfassend dargestellt.

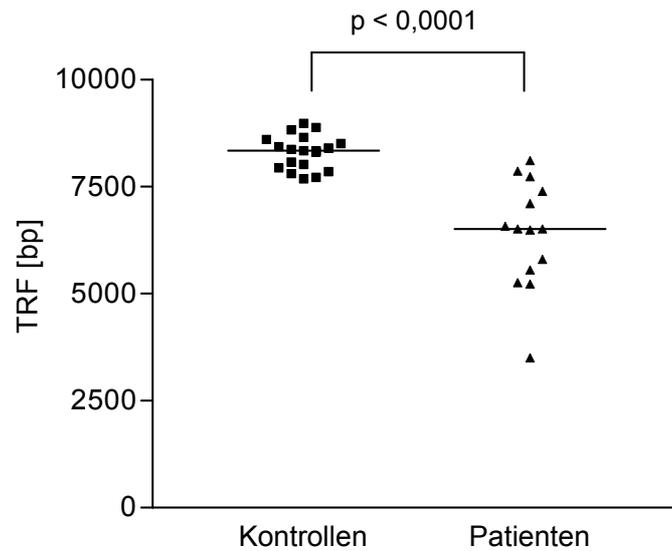


Abb. 3.11: Vergleich der Telomerlängen der Kontrollproben mit den Patientenproben. Die Bestimmung der Telomer-Restriktionsfragmente (TRF) erfolgte mit der Southernblot-Analyse. Die Datenpunkte der Patientenproben stellen Mittelwerte aus bis zu 4 voneinander unabhängigen Analysen dar. Da nicht von allen 20 Patienten genügend Probenmaterial zur Verfügung stand, wurden 14 Blastenproben untersucht. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet. Es bestand ein statistisch signifikanter Unterschied in der Telomerlänge zwischen den beiden Gruppen.

Im Gegensatz zu den Telomerlängen der Kontrollen (siehe Abb. 3.2 in Abschnitt 3.1.1.1.) sind die Telomere der T-ALL-Proben nicht abhängig vom Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Um die mögliche Bedeutung der Telomerlänge als prognostischer Marker beurteilen zu können, wurden die Patienten bzgl. des klinischen Verlaufs ihrer Erkrankung in zwei Gruppen (ungünstiger bzw. günstiger klinischer Verlauf der T-ALL) eingeteilt:

<i>Gruppe</i>	<i>Klinischer Verlauf</i>
Gruppe A	ungünstig; Entwicklung eines Rezidivs und / oder Tod des Patienten
Gruppe B	günstig; Erreichen der Remission

Tab. 3.5: Einteilung der T-ALL-Patienten in zwei Gruppen bzgl. des klinischen Verlaufs ihrer Erkrankung.

Bei Vergleich der Telomerlängen der Blastenproben konnte kein Zusammenhang zwischen Telomerlänge und dem klinischen Verlauf der T-ALL festgestellt werden. In

Abb. 3.12 sind die ermittelten Telomerlängen der beiden Patientengruppen gegenübergestellt.

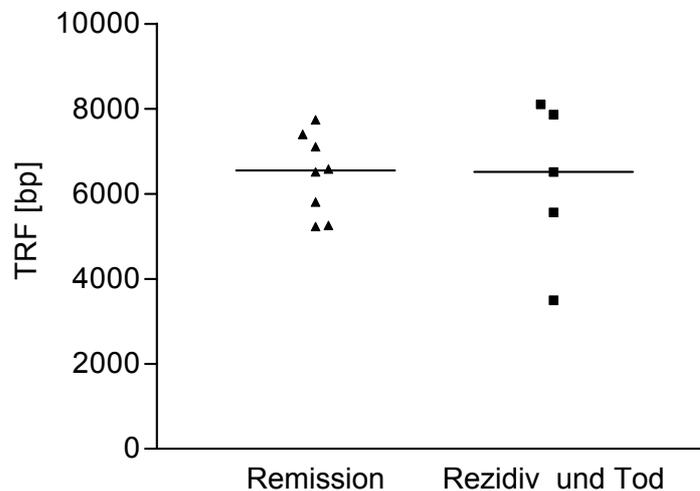


Abb. 3.12: Vergleich der Telomerlängen der Blastenzellen in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf der T-ALL. Die Bestimmung der Telomer-Restriktionsfragmente (TRF) erfolgte mit der Southernblot-Analyse. Die Datenpunkte sind mit Ausnahme von 2 Proben Mittelwerte aus 2 bis 4 voneinander unabhängigen Einzelbestimmungen. Da bei Patient Nr. 14 der klinische Verlauf nicht bekannt ist, konnten von den 14 untersuchten Proben hinsichtlich der Telomerlänge nur 13 Proben in der Graphik dargestellt werden. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der Telomerlänge zwischen beiden Gruppen.

3.1.2.2. *Telomeraseaktivität und T-ALL*

Die Telomeraseaktivität der T-ALL-Blasten wurde mit Hilfe des radioaktiven TRAP-Assays ermittelt. Anhand der bei jedem TRAP-Assay mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen wurde die Telomeraseaktivität der Patientenproben semiquantitativ beurteilt. Während die nicht stimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) keine Telomeraseaktivität aufwiesen (Negativkontrolle, Score 0), zeigten die mit Phytohämagglutinin (PHA) -stimulierten PBMC (Positivkontrolle) eine sehr ausgeprägte Enzymaktivität. Dieser Enzymaktivität wurde der Score 3 (sehr starke Telomeraseaktivität) zugeordnet.

Von den 20 untersuchten Proben zeigten 12 eine sehr starke (Score 3), zwei eine starke (Score 2), fünf eine schwache (Score 1) und eine Probe keine

Telomeraseaktivität (Score 0). Bei der Probe (Patient 4), bei der keine Telomeraseaktivität festzustellen war, konnte jedoch alkalische Phosphatase nachgewiesen werden. Da außerdem bei der PCR die interne 36 bp-Kontrollbande nachweisbar war, konnten bei dieser Probe Probenaufarbeitungsfehler oder das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren ausgeschlossen werden, welche ein falsch-negatives Ergebnis zur Folge hätten. Die Ergebnisse des TRAP-Assays sind in der folgenden Abb. 3.13 dargestellt.

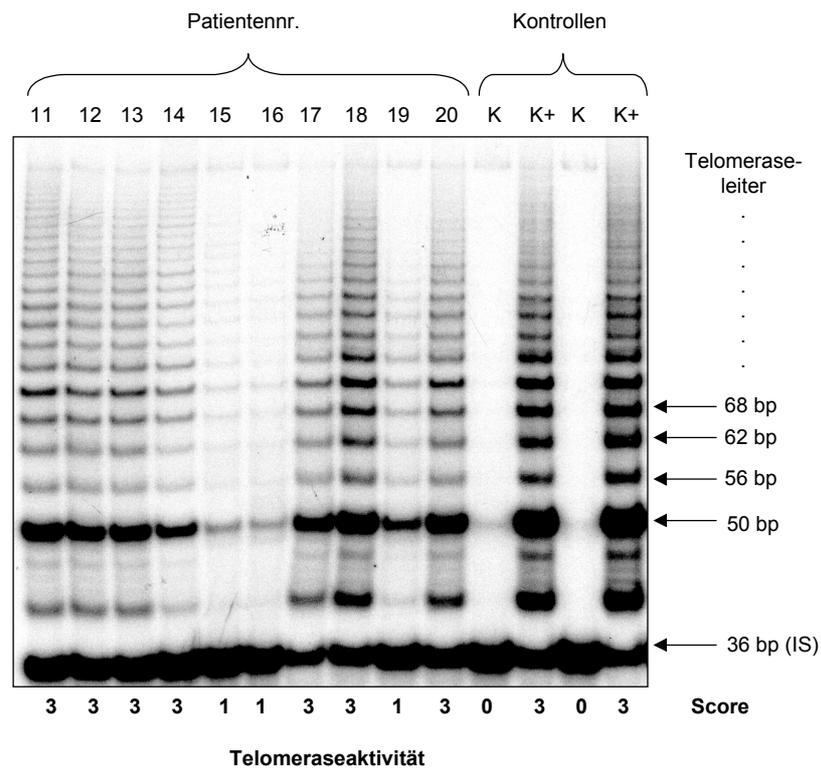
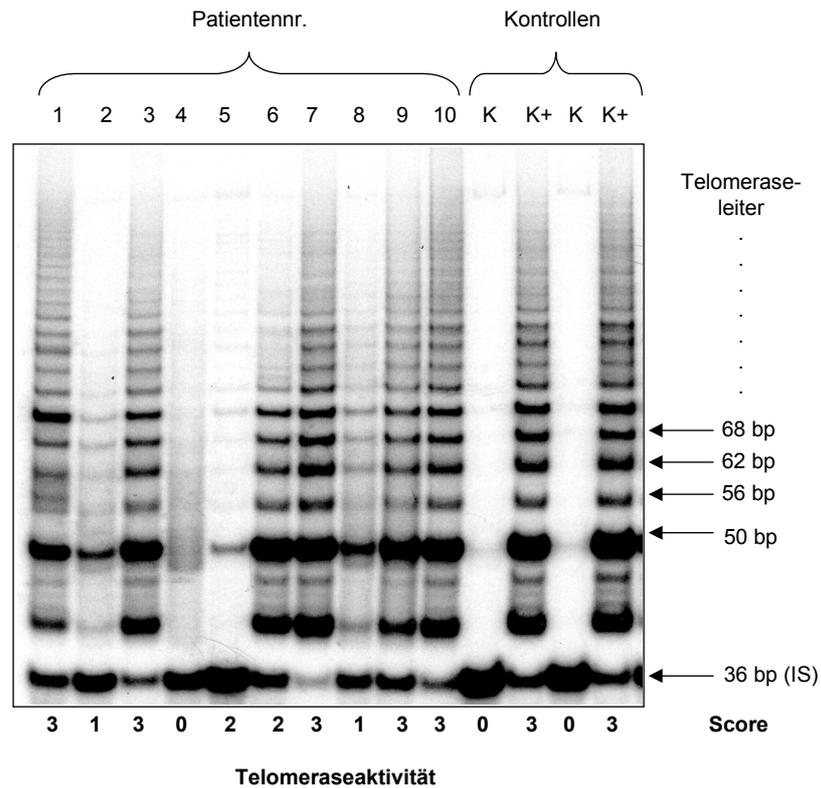


Abb. 3.13: Bestimmung der Telomeraseaktivität der T-ALL-Patientenproben und der Kontrollproben mittels radioaktiven TRAP-Gel-Assays. Die eingesetzten Proteinmengen der Proben betragen 0,04 μ g je PCR-Ansatz. Proben: T-ALL-Patientenproben (1-20), K: Negativkontrolle, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC), K+: Positivkontrolle, Phytohämagglutinin (PHA) stimulierte PBMC. Telomeraseaktivität: Score 3 (sehr starke), Score 2 (starke), Score 1 (schwache), Score 0 (keine).

Wie die Telomerlängen wurden auch die Telomeraseaktivitäten der Blastenproben mit dem klinischen Verlauf der T-ALL der Patienten verglichen. Die Patienten, die eine Remission erreichten, zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der Telomeraseaktivität der Blasten im Vergleich zu denen, die ein Rezidiv entwickelten bzw. an den Folgen der T-ALL verstarben.

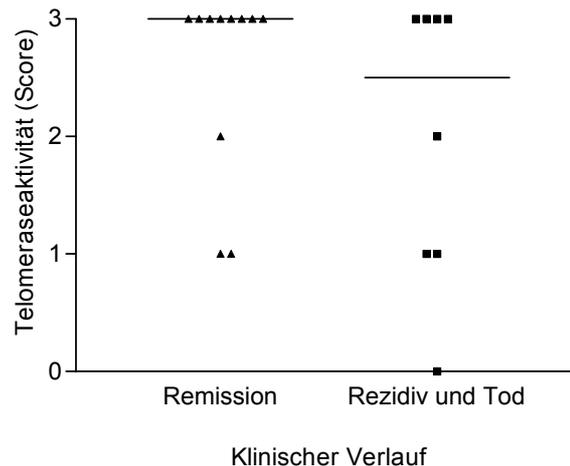


Abb. 3.14: Vergleich der Telomeraseaktivitäten der Patientenproben, die vom Zeitpunkt der Diagnosestellung stammen, in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf der T-ALL. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet. Da bei Patient Nr. 14 der klinische Verlauf nicht bekannt ist, sind von den 20 untersuchten Proben hinsichtlich der Telomeraseaktivität 19 Proben in der Graphik dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Telomeraseaktivität zwischen beiden Gruppen bestand nicht.

3.1.2.3. *hTERT mRNA-Expression und T-ALL*

Neben der Telomerlänge und der Telomeraseaktivität wurde die Expression der katalytischen Untereinheit hTERT der Telomerase quantifiziert. Die hTERT-Expression wurde auf die 18S rRNA normalisiert ($hTERT_N$). Da nicht von allen Patienten genügend Probenmaterial zur Verfügung stand, wurde die hTERT-Expression bei 18 Patienten bestimmt. Die Patientenproben zeigten eine hohe Variabilität (141 bis 424.000) in der Expression von hTERT. Als Kontrolle wurde die hTERT-Expression isolierter PBMC eines gesunden, erwachsenen Spenders untersucht, die eine sehr geringe Expression von 1420 aufwiesen. Die Ergebnisse der TaqMan[®] PCR-Analyse sind in der folgenden Abb. 3.15 veranschaulicht.

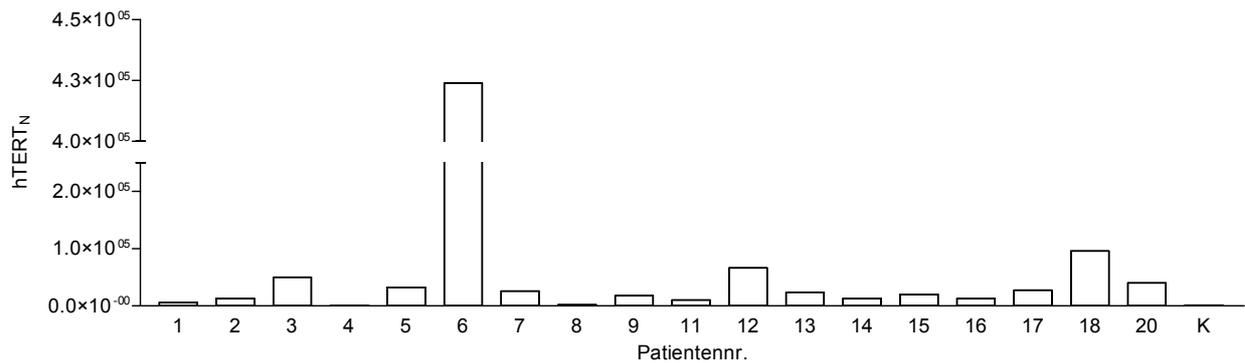


Abb. 3.15: Darstellung der mittels real-time TaqMan® PCR gemessenen hTERT-Expression der Blasten von Patienten (1-20) mit T-ALL. Da nicht von allen 20 Patienten genügend Probenmaterial zur Verfügung stand, wurden 18 Proben auf ihre hTERT-Expression untersucht. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes dienten als Kontrollen (K). Die hTERT-Expression wurde auf 18S rRNA normalisiert: $hTERT_{N} = hTERT / 18S \text{ rRNA}$. Die Mittelwerte von hTERT und 18S rRNA wurden jeweils aus 3 Einzelmessungen gebildet.

Beim Vergleich der hTERT-Expression der T-ALL-Blasten mit dem klinischen Verlauf der T-ALL konnte kein Unterschied in der hTERT-Expression zwischen den Patientengruppen mit einem günstigen und ungünstigen klinischen Verlauf beobachtet werden (siehe Abb. 3.16).

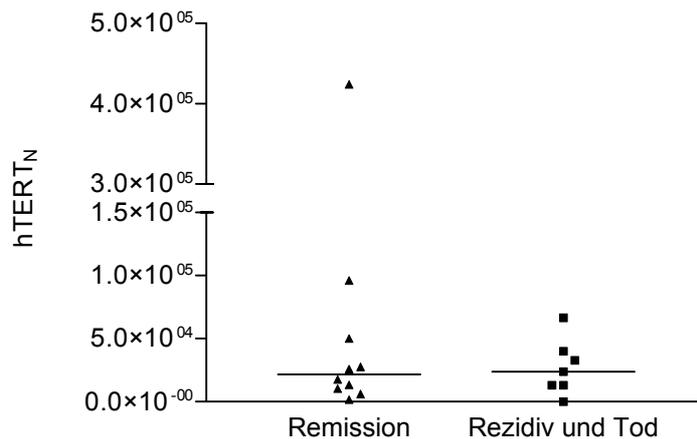


Abb. 3.16: Darstellung der hTERT-Expression der Patientenproben in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf der T-ALL. Da nicht von allen 20 Patienten genügend Probenmaterial zur Verfügung stand, wurden 18 Proben auf ihre hTERT-Expression untersucht. Da bei Patient Nr. 14 der klinische Verlauf nicht bekannt ist, sind von den 18 untersuchten Proben 17 Proben in der Graphik dargestellt. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der hTERT-Expression zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

Da die T-ALL-Zellen unterschiedliche Telomeraseaktivitäten und variable hTERT-Expressionen aufwiesen, wurde nun überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität und der Expression der katalytischen Untereinheit hTERT besteht. Dabei konnte festgestellt werden, dass alle Proben, die Telomeraseaktivität zeigten, auch eine hTERT-Expression besaßen, die allerdings sehr heterogen war (1740-424.000). Die Probe, bei der keine Telomeraseaktivität feststellbar war, zeigte eine sehr geringe hTERT-Expression von 141. Beim Vergleich des Ausmaßes der Telomeraseaktivität und der hTERT-Expression konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der hTERT-Expression bei den Proben mit schwacher, starker und sehr starker Telomeraseaktivität beobachtet werden (siehe Abb. 3.17).

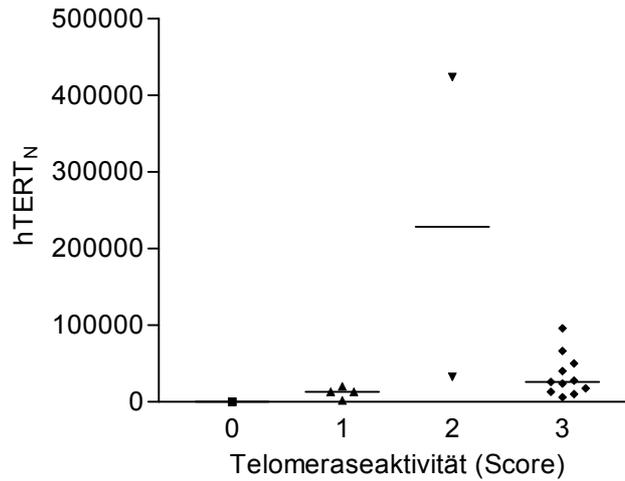


Abb. 3.17: Darstellung der normalisierten hTERT-Expression ($hTERT_N$) und Telomeraseaktivität der T-ALL-Proben. Da nicht von allen 20 Patienten genügend Probenmaterial zur Verfügung stand, wurden 18 Proben auf ihre hTERT-Expression untersucht. Zur Charakterisierung der Gesamtdaten ist der Median eingezeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede in der hTERT-Expression zwischen den 4 Gruppen wurden nicht festgestellt.

Die folgende Tab. 3.6 fasst die Patientendaten und die Ergebnisse der untersuchten biochemischen Marker zusammen.

Patient	Alter [Jahre] [†]	Ort der Proben- entnahme	Blasten- anteil [%]	Behandlungs- protokoll [§]	Klinischer Verlauf	TRF [bp]	Telomerase- aktivität	hTERT _N
1	5,0	KM*	80	MR	Remission	7107	3	6,19 x 10 ³
2	6,5	PBL*	96	HR	Remission	---	1	1,33 x 10 ⁴
3	12,9	PBL*	90	HR	Remission	7736	3	5,0 x 10 ⁴
4	7,5	KM*	n.b.	MR	Rezidiv, †	8108	0	1,41 x 10 ²
5	5,5	KM [#]	65	MR	Rezidiv	6516	2	3,29 x 10 ⁴
6	6,0	PBL*	98	HR	Remission	---	2	4,24 x 10 ⁵
7	4,0	PBL*	93	HR	Remission	5258	3	2,59 x 10 ⁴
8	5,2	KM*	97	HR	Remission	6576	1	1,74 x 10 ³
9	17,7	PBL*	98	HR	Remission	6516	3	1,75 x 10 ⁴
10	7,6	KM*	80	MR	Remission	---	3	---
11	2,3	KM*	98	MR	Remission (verstorben an Histiozytose)	7394	3	1,04 x 10 ⁴
12	15,2	KM [#]	97	HR	Rezidiv, †	---	3	6,65 x 10 ⁴
13	4,0	PBL [#]	71	HR	Rezidiv, †	3500	3	2,38 x 10 ⁴
14	2,1	KM*	70	HR	Rezidiv, †	7865	3	1,3 x 10 ⁴
15	10,4	Pleura- erguss*	96	HR	n.b.	6486	1	2,0 x 10 ⁴
16	13,9	PBL*	82	HR	Rezidiv, †	5559	1	1,32 x 10 ⁴
17	13,0	KM*	86	HR	Remission (verstorben an Multiorgan- versagen)	5806	3	2,75 x 10 ⁴
18	12,4	KM*	99	MR	Remission	5231	3	9,62 x 10 ⁴
19	12,4	KM*	92	HR	Rezidiv, †	---	1	---
20	12,5	KM*	92	HR	Rezidiv, †	---	3	4,01 x 10 ⁴

Tab. 3.6: Zusammenfassung und Charakterisierung der Patientendaten und der untersuchten biochemischen Marker. [†]Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme, KM: Knochenmark, PBL: peripheres Blut, *Probenentnahme zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, [#]Probenentnahme nach einem Rezidiv, [§]aktuelles ALL-BFM-Protokoll, HR: Hochrisikozweig, MR: mittleres Risiko, †: verstorben, n.b.: nicht bekannt, TRF: Telomer-Restriktionsfragmente, hTERT_N: normalisierte hTERT-Expression, ---: Bestimmung konnte nicht durchgeführt werden, da zu wenig Probenmaterial zur Verfügung stand.

3.1.3. Telomeraseaktivität bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

3.1.3.1. Telomeraseaktivität in Kolonbiopsien verschiedener Patientengruppen

In dieser Arbeit wurden insgesamt 114 Biopsien, die 42 Patienten im Rahmen von endoskopischen Untersuchungen entnommen wurden, auf ihre Telomeraseaktivität analysiert. Diese 114 Biopsien, die von 18 Colitis ulcerosa-, 10 Morbus Crohn-Patienten und 14 Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Kontrollen) stammten, gingen in die statistische Auswertung ein.

3.1.3.1.1. Immunhistochemische Charakterisierung der Kolonbiopsieproben

Da die gesammelten Biopsien aus 4 verschiedenen Krankenhäusern und Arztpraxen stammten und somit die makroskopischen und histologischen Diagnosen durch verschiedene Personen durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse der Beurteilung des Entzündungsgrades wahrscheinlich nicht einheitlich. Um diese Variabilitäten auszugleichen, wurden alle Gewebeschnitte mit Hämalaun-Eosin (HE) gefärbt und von einem sehr erfahrenen Referenz-Pathologen bzgl. ihres Entzündungsgrades, wie in Abschnitt 2.2.3.1. beschrieben, beurteilt. Der Gesamtscore, der das Ausmaß der Entzündung angibt, setzte sich aus 4 untersuchten Parametern (Enterozyten, Krypten, mononukleäre Zellen, neutrophile Granulozyten) zusammen. Im Rahmen dieser Studie wurden Scores von 0 bis 10 für die Gewebeschnitte ermittelt. Um die Präzision und Richtigkeit der Bestimmung des Entzündungsgrad der Gewebeproben mit Hilfe der HE-Färbung zu beurteilen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Gewebeproben der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen höhere Entzündungsscores aufweisen als die Gewebeproben der Kontrollgruppe. Der Vergleich der Entzündungsscores in den 17 Biopsien ergab, dass die Kontrollen einen durchschnittlichen Score von $1,4 \pm 1,0$ aufwiesen; bei den 62 Proben der Colitis ulcerosa-Patienten betrug der Score $3,8 \pm 3,0$ und bei den 35 Proben von Morbus Crohn-Patienten ergab sich ein Mittelwert von $3,0 \pm 3,3$. Erwartungsgemäß zeigten die Kolonproben der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen deutlich höhere Entzündungsscores ($p < 0,05$) als die der

Kontrollen. Durch die Bestätigung der aufgestellten Hypothese konnte die Validität der Bewertung des Entzündungsgrades anhand der HE-Färbung belegt werden.

3.1.3.1.2. Telomeraseaktivität in Kolonbiopsien verschiedener Patientengruppen

Insgesamt wurden 62 Biopsien von Colitis ulcerosa-Patienten, 35 Biopsien von Morbus Crohn-Patienten und 17 Biopsien der Kontrollgruppe auf ihre Telomeraseaktivität untersucht. Abb. 3.18 zeigt ein repräsentatives TRAP-Gel der untersuchten Proben.

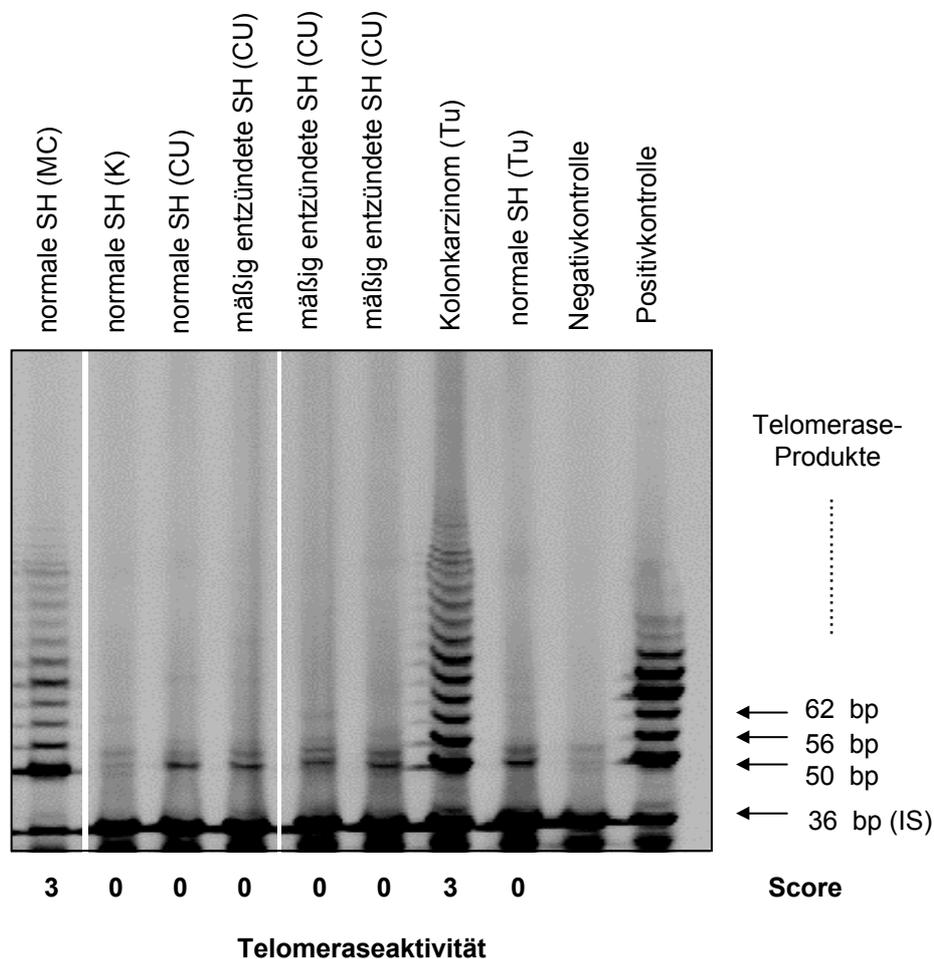


Abb. 3.18: Vergleich der Telomeraseaktivitäten von Biopsieproben der Schleimhaut (SH) mit dem TRAP-Gel-Assay. MC: Morbus Crohn, K: Kontrollgruppe, CU: Colitis ulcerosa, Tu: Tumorprobe (Kolonkarzinom); N: gesunde Kolonschleimhaut des Tumorpatienten (Tu); Negativkontrolle (CHAPS-Lysepuffer), Positivkontrolle (TSR8); Telomeraseaktivität: Score 3 (starke), Score 2 (mäßige), Score 1 (schwache), Score 0 (keine); Einsatz von 0,08 µg Protein je PCR-Ansatz.

Es wurden nur die Biopsien auf Telomeraseaktivität untersucht, bei denen zuvor alkalische Phosphatase nachgewiesen worden war.

Um eine Semiquantifizierung der Telomeraseaktivitäten der einzelnen Gewebeproben durchzuführen, wurden zum einen bei jedem TRAP-Assay Kontrollen mitgeführt, denen ein bestimmter Telomeraseaktivitätsscore zugeteilt wurde, zum anderen wurden die Enzymaktivitäten der Biopsieproben bei zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen (0,08 und 0,008 µg Protein/PCR-Ansatz) beurteilt. Somit konnte das Ausmaß der Telomeraseaktivität für die Biopsieproben bei beiden Proteinkonzentrationen ermittelt werden. Der endgültige Telomeraseaktivitätsscore bildete sich aus den beiden Einzelscores, welche die untersuchten Proben bei der jeweiligen Proteinkonzentration erhielten.

Von den 114 untersuchten Biopsien zeigten 61,4% keine (Score 0), 27,2% eine schwache (Score 1), 3,5% eine mäßige (Score 2), 4,4% eine starke (Score 3) und 3,5% eine sehr starke Telomeraseaktivität (Score 4). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tab. 3.7 dargestellt.

<i>Kolonschleimhaut</i>	<i>Kontrollen</i>	<i>Colitis ulcerosa</i>	<i>Morbus Crohn</i>
normal	0,40 ± 0,51 (15)	0,43 ± 0,96 (28)	0,62 ± 1,02 (21)
leicht bis mäßig entzündet	1/3 (2)	0,96 ± 1,22 (27)	0,50 ± 1,07 (8)
stark entzündet	---	0,43 ± 0,79 (7)	0,33 ± 0,52 (6)

Tab. 3.7: Semiquantitativer Score (MW ± SD) der Telomeraseaktivität in Kolonschleimhaut der Kontrollen und der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen; Zahlen in Klammern geben die Anzahl der untersuchten Biopsien an. Der Entzündungsgrad der Kolonschleimhaut wurde von einem erfahrenen („blinden“) Pathologen anhand der Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung der Gewebeproben bestimmt.

Die Untersuchungen zeigen deutlich, dass sowohl in normaler Schleimhaut der Kontrollen als auch in der gesunden Schleimhaut der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine geringe Telomeraseaktivität vorhanden war. Ein Vergleich innerhalb der Colitis ulcerosa- und der Morbus Crohn-Gruppe ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Telomeraseaktivität zwischen normaler Schleimhaut und mäßig bzw. stark entzündeten Gewebeabschnitten (siehe

Abb. 3.19). Darüber hinaus konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Telomeraseaktivität zwischen den beiden Gruppen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie mit denen ohne chronisch entzündliche Darmerkrankungen festgestellt werden.

Die „entzündungsspezifischen Mittelwerte“ (siehe Abschnitt 2.2.3.1.) der Telomeraseaktivitäten von gesunder, mäßig und stark entzündeter Schleimhaut von Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten sind in Abb. 3.19 veranschaulicht.

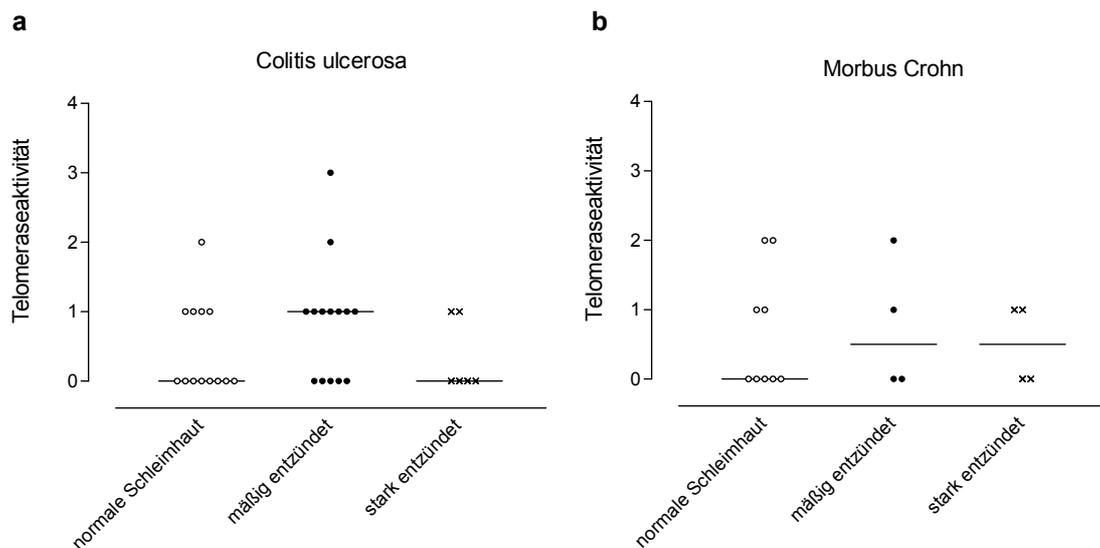


Abb. 3.19: Vergleich der Telomeraseaktivitäten gesunder und mäßig bzw. stark entzündeter Schleimhaut von Kolonbiopsieproben von a) Colitis ulcerosa-Patienten und b) Morbus Crohn-Patienten; die horizontalen Linien geben die Mediane an. Datenpunkte stellen „entzündungsspezifische Mittelwerte“ aus bis zu 5 Biopsien pro Patient dar. Statistisch signifikante Unterschiede in der Telomeraseaktivität zwischen den drei Entzündungsgraden wurden bei beiden Patientengruppen nicht festgestellt.

3.1.3.1.3. Telomeraseaktivität und Patienten- bzw. Krankheitsfaktoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Enzym Telomerase in entzündeten Geweben von Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten gegenüber normaler Kolonschleimhaut nicht erhöht ist, stellte sich die Frage, ob die regelmäßige Einnahme von Medikamenten, die als Standardtherapie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt werden, möglicherweise die Telomeraseaktivität beeinflusst haben könnte.

Zu den Arzneistoffen, die standardmäßig bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt werden, zählen u.a. 5-Aminosalicylsäure (5-ASA = Mesalazin, Salofalk®; Sulfasalazin, Azulfidine®), Glukokortikoide wie z.B. Prednison (Decortin®) bzw. Hydrocortison (Colifoam®) und Azathioprin (Imurek®).

Die Patienten wurden nach Art der Therapie (keine Medikation, Mono- oder Kombinationstherapie) in 4 Gruppen eingeteilt.

<i>Gruppe</i>	<i>Medikation</i>
A	keine Einnahme von Medikamenten
B	Monotherapie: 5-ASA / Sulfasalazin
C	Monotherapie: Glukokortikoide
D	Kombinationstherapie: 5-ASA / Sulfasalazin bzw. Azathioprin + Glukokortikoide oder 5-ASA / Sulfasalazin + Azathioprin + Glukokortikoide + Infliximab

Tab. 3.8: Einteilung der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nach Art der Medikation; 5-ASA = 5-Aminosalicylsäure.

Bei Vergleich der Telomeraseaktivitäten der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die keine Medikation erhielten, mit denen, die 5-ASA / Sulfasalazin bzw. Azathioprin und Glukokortikoide (und Infliximab) einnahmen, wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Telomeraseaktivität innerhalb der Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Gruppe festgestellt; in die Auswertung gingen die Telomeraseaktivitäten der gesunden, mäßig und stark entzündeten Schleimhaut ein. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.9 dargestellt.

<i>Medikation</i>	<i>Colitis ulcerosa</i>	<i>Morbus Crohn</i>
Gruppe A	0,63 ± 1,26 (16)	0,17 ± 0,41 (6)
Gruppe B	0,56 ± 1,03 (16)	1,10 ± 0,88 (10)
Gruppe C	0,88 ± 0,64 (8)	2,00 ± 2,00 (3)
Gruppe D	0,68 ± 1,17 (22)	0,31 ± 0,48 (16)

Tab. 3.9: Semiquantitativer Score (MW ± SD) der Telomeraseaktivität in Kolonschleimhaut der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Abhängigkeit von der Medikation; in die Auswertung gingen die Telomeraseaktivitäten der gesunden, mäßig und stark entzündeten Schleimhaut ein. Gruppe A: keine Medikation, Gruppe B: Einnahme von 5-Aminosalicylsäure bzw. Sulfasalazin, Gruppe C: Einnahme von Glukokortikoiden, Gruppe D: 5-ASA / Sulfasalazin bzw. Azathioprin + Glukokortikoide oder 5-ASA / Sulfasalazin + Azathioprin + Glukokortikoide + Infliximab; Zahlen in Klammern geben die Anzahl der untersuchten Biopsien an.

Bei den Proben der Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn- Patienten, bei denen eine mäßige bzw. starke Telomeraseaktivität (Score 2 bzw. 3) festgestellt wurde (siehe Abb. 3.19), bestand ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Art der Therapie und der Telomeraseaktivität.

Es wurde weiterhin geprüft, ob die regelmäßige Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika wie z.B. Acetylsalicylsäure, die evtl. zur Chemoprävention bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen angewendet werden, die Telomeraseaktivität beeinflussen könnten. Hierzu wurden die Telomeraseaktivitäten der gesunden und entzündeten Gewebe der Patienten (n=5), bei denen eine regelmäßige Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika registriert war, mit denjenigen verglichen (n=16), bei denen diese Medikamente nicht verabreicht wurden. Ein Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und der Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika konnte weder bei den Colitis ulcerosa- noch den Morbus Crohn-Patienten festgestellt werden ($p > 0,05$).

<i>Medikation</i>	<i>Colitis ulcerosa</i>	<i>Morbus Crohn</i>
keine Einnahme von NSAR	0,62 ± 1,07 (39)	0,59 ± 0,87 (17)
Einnahme von NSAR	0,86 ± 1,07 (7)	1,14 ± 1,46 (7)

Tab. 3.10: Semiquantitativer Score (MW ± SD) der Telomeraseaktivität in Kolonschleimhaut der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Abhängigkeit von der Anwendung von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAR). In die Auswertung gingen die Telomeraseaktivitäten der gesunden, mäßig und stark entzündeten Schleimhaut ein. Zahlen in Klammern geben die Anzahl der untersuchten Biopsien an.

Um zu klären, inwiefern Erkrankungsdauer und Aktivität der Erkrankung einen Einfluss auf die Telomeraseaktivität besitzen, wurden diese klinischen Daten mit der Telomeraseaktivität in Beziehung gesetzt.

Die durchschnittliche Erkrankungsdauer der Colitis ulcerosa-Patienten betrug 8,1 Jahre (MW ± SD; 8,1 ± 8,8 Jahre), die der Morbus Crohn-Patienten 7,6 ± 7,9 Jahre. Auch hier konnte kein Zusammenhang zwischen der untersuchten Telomeraseaktivität und der Dauer der Erkrankung beobachtet werden; die Ergebnisse sind in Abb. 3.20 graphisch dargestellt.

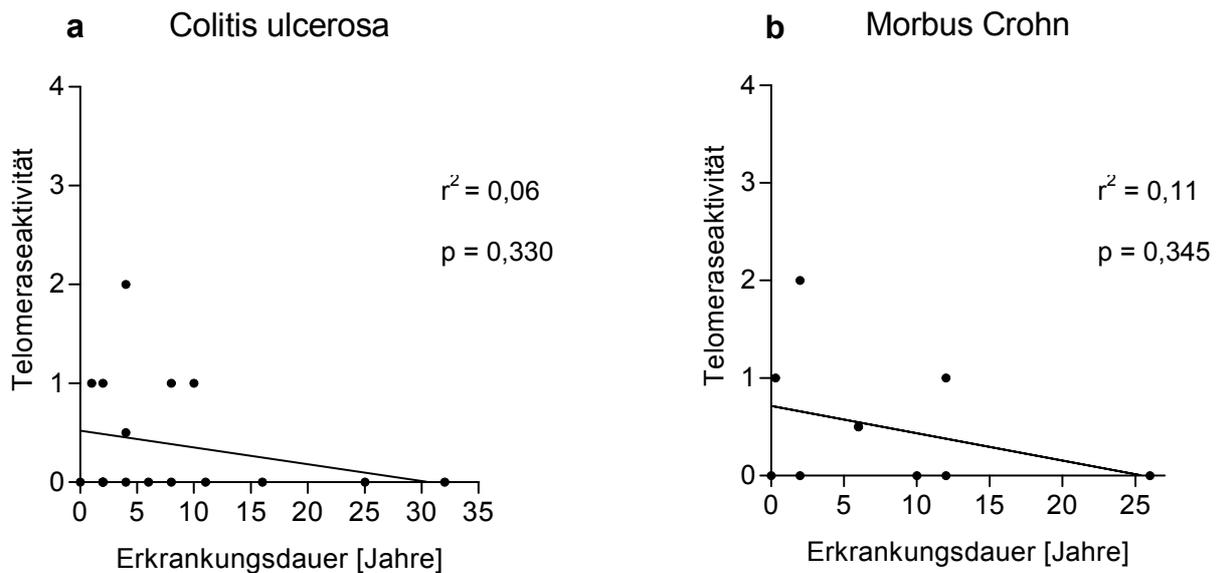


Abb. 3.20: Darstellung der Telomeraseaktivitäten der Biopsieproben von a) Colitis ulcerosa-Patienten und b) Morbus Crohn-Patienten in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer. Für die Auswertung wurden die Telomeraseaktivitäten von gesunder, mäßig und stark entzündeter Schleimhaut der Patienten eingeschlossen. Datenpunkte stellen „individuelle Mediane“ aus bis zu 5 Biopsien pro Patient dar.

Der Grad der akuten Entzündung wurde histologisch anhand der HE-Färbungen der Gewebeschnitte beurteilt (siehe Abschnitt 2.2.3.1). Bei den Colitis ulcerosa-Patienten ($n=18$) lag der Grad (Median) der akuten Entzündung zwischen 0 (keine akut Entzündung) und 3 (ausgeprägte akute Entzündung). In der Morbus Crohn-Gruppe ($n=10$) wurde der Grad (Median) der akuten Entzündung mit einem analogen Score von 0 bis 2 beschrieben. Bzgl. der Telomeraseaktivität konnte keine Beziehung zur akuten Entzündung der chronisch entzündlichen Darmerkrankung konstatiert werden.

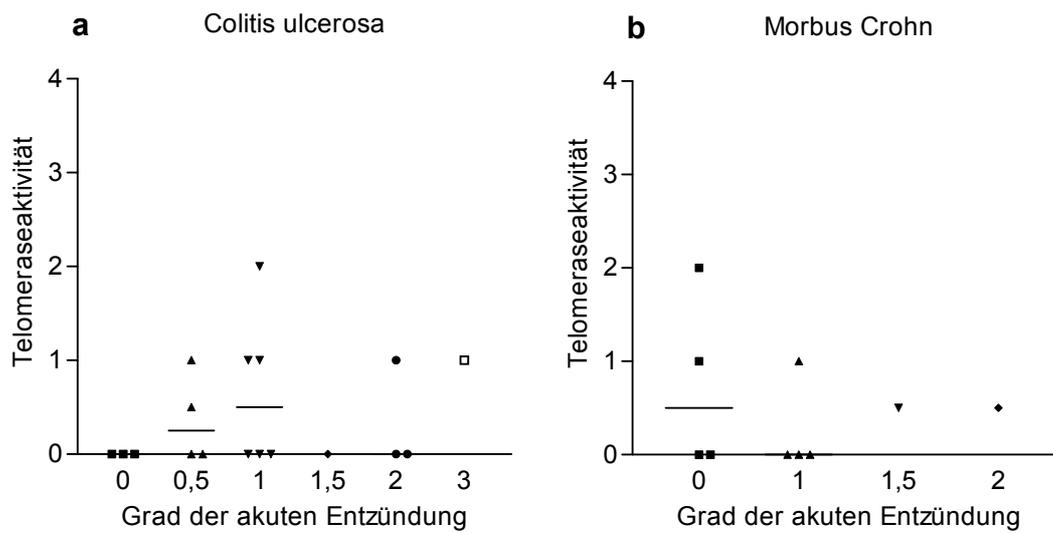


Abb. 3.21: Darstellung der Telomeraseaktivitäten von Kolonbiopsieproben von a) Colitis ulcerosa-Patienten und b) Morbus Crohn-Patienten in Abhängigkeit von dem Grad (Median) der akuten Entzündung. Für die Auswertung wurden die Telomeraseaktivitäten von gesunder, mäßig und stark entzündeter Schleimhaut der Patienten eingeschlossen. Datenpunkte stellen „individuelle Mediane“ aus bis zu 5 Biopsien je Patient dar; die horizontalen Linien geben die Mediane an. Statistisch signifikante Unterschiede in der Telomeraseaktivität zwischen den akuten Entzündungsgraden wurden bei Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten nicht festgestellt.

3.2. Telomere und Telomerase als Angriffspunkte für pharmakologische Interventionen

3.2.1. Austestung von Telomeraseinhibitoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Telomeraseinhibitoren (BRACO19, BIBR1532) mit unterschiedlichen Angriffspunkten an der Weichteilsarkom (WTS) - Zelllinie SW-OH1 bzgl. ihrer potentiellen Telomerasehemmung getestet.

3.2.1.1. Effekte der Telomeraseinhibitoren im zellfreien TRAP-Assay

Mit Hilfe des zellfreien TRAP-Assays konnte der Einfluss der Telomeraseinhibitoren BRACO19 und BIBR1532 auf die Telomeraseaktivität der Zelllinie SW-OH1 bestimmt werden. Die Versuche wurden mindestens zweimal durchgeführt und in allen Bestimmungen wurden 0,05 µg Protein je PCR-Ansatz eingesetzt.

Der Telomeraseinhibitor BRACO19 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen zum jeweiligen Zelllysate gegeben und zeigte im zellfreien TRAP-Assay eine konzentrationsabhängige Inhibition der Telomerase im Zelllysate der SW-OH1-Zellen. Für die Konzentrationen 1 µM und 0,5 µM BRACO19 je PCR-Ansatz fand sich eine deutliche Hemmung der Telomeraseaktivität im Zelllysate mittels TRAP-Assay. Dies äußerte sich in einer Abnahme der Bandenanzahl und Intensität der Banden der Telomeraseleiter. 0,1 µM BRACO19 wiesen keinen Effekt auf die Telomeraseaktivität der Zelllinie auf. Von der Substanz BIBR1532 wurden Konzentrationen von 10 µM, 5 µM und 1 µM in den Zelllysateversuchen eingesetzt. Dabei zeigten Konzentrationen von 10 µM und 5 µM des Inhibitors eine deutliche Hemmung der Telomeraseaktivität, während 1 µM BIBR1532 einen schwächeren Effekt aufwies. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abb. 3.22 dargestellt, welche ein repräsentatives TRAP-Gel zeigt.

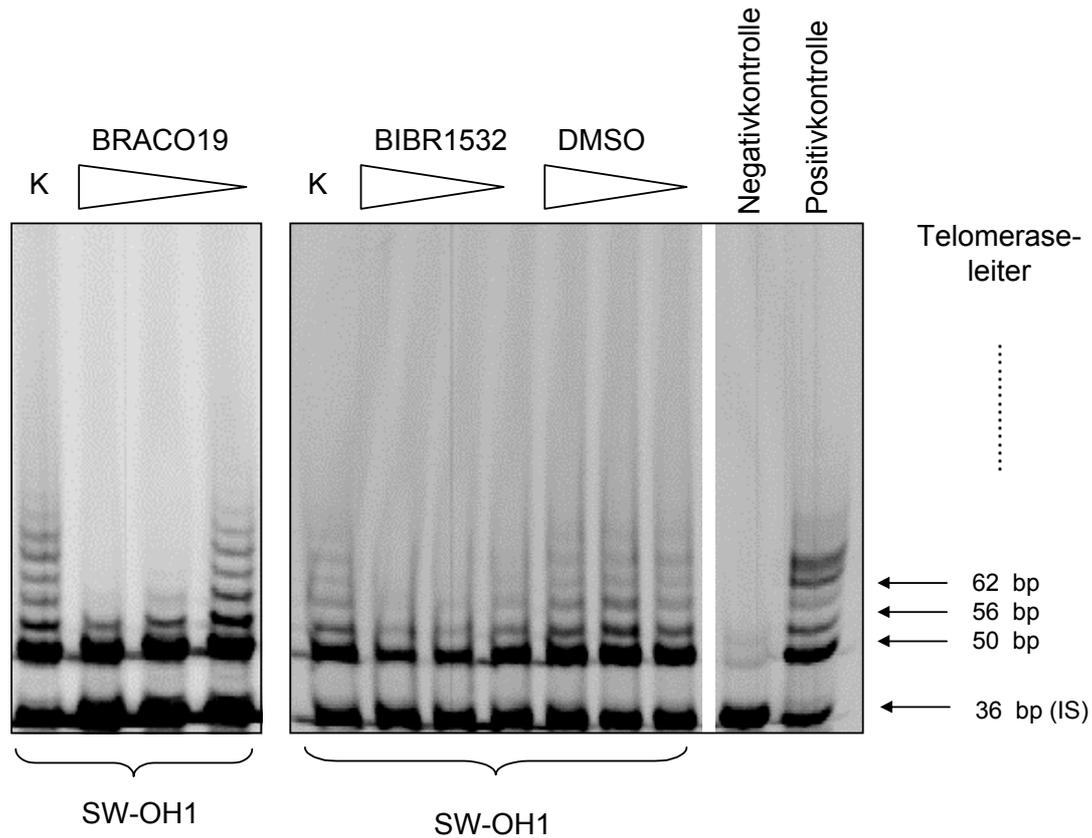


Abb. 3.22: Bestimmung der Telomeraseaktivität der WTS-Zelllinie SW-OH1 in Abhängigkeit von der eingesetzten BRACO19- und BIBR1532-Konzentration mit dem TRAP-Gel-Assay. Einsatz von 0,05 μg Protein je PCR-Ansatz. K = unbehandelte Zelllinie (Kontrolle); ▽ = mit BRACO19 behandelte Zellen in abnehmender Konzentration; eingesetzte BRACO19-Konzentrationen: 1, 0,5 und 0,1 μM; ▽ = mit BIBR1532 behandelte Zellen in abnehmender Konzentration; eingesetzte BIBR1532-Konzentrationen: 10, 5 und 1 μM; ▽ = mit DMSO behandelte Zellen (Lösungsmittelkontrolle); Negativkontrolle (CHAPS-Lysepuffer), Positivkontrolle (TSR8).

Somit wurde sowohl für die G-Quadruplex stabilisierende Substanz BRACO19 als auch für den nicht nukleosidischen Reverse Transkriptase-Hemmer BIBR1532 eine konzentrationsabhängige Hemmung der Telomeraseaktivität in der SW-OH1-Zelllinie festgestellt.

3.2.1.2. Effekte der Telomeraseinhibitoren in der Zellkultur

Nachdem der hemmende Effekt von BRACO19 und BIBR1532 im zellfreien TRAP-Assay für die WTS-Zellen SW-OH1 gezeigt werden konnte, erfolgte die Austestung dieser Inhibitoren in der Zellkultur. Zunächst wurde der Einfluss der beiden

Substanzen auf das Proliferationsverhalten der WTS-Zelllinie SW-OH1 mit Hilfe des in Abschnitt 2.2.1.4. beschriebenen BrdU-Assays getestet. Dieser Proliferationsassay wurde für jede Substanz in zwei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt, so dass die IC_{50} -Werte (siehe Tab. 3.12) Mittelwerte beider Messungen darstellen. Da der Telomeraseinhibitor BIBR1532 nach Angaben des Herstellers in DMSO gelöst war, wurde ein BrdU-Assay mit der höchsten DMSO-Konzentration (0,5%), wie sie in der BIBR1532-Arbeitslösung vorlag, parallel durchgeführt, um Einflüsse des Lösungsmittels auf das Proliferationsverhalten der Zellen auszuschließen. Die Ergebnisse der Proliferationsbestimmung der WTS-Zellen unter Behandlung mit den Telomeraseinhibitoren sind in Abb. 3.23 dargestellt.

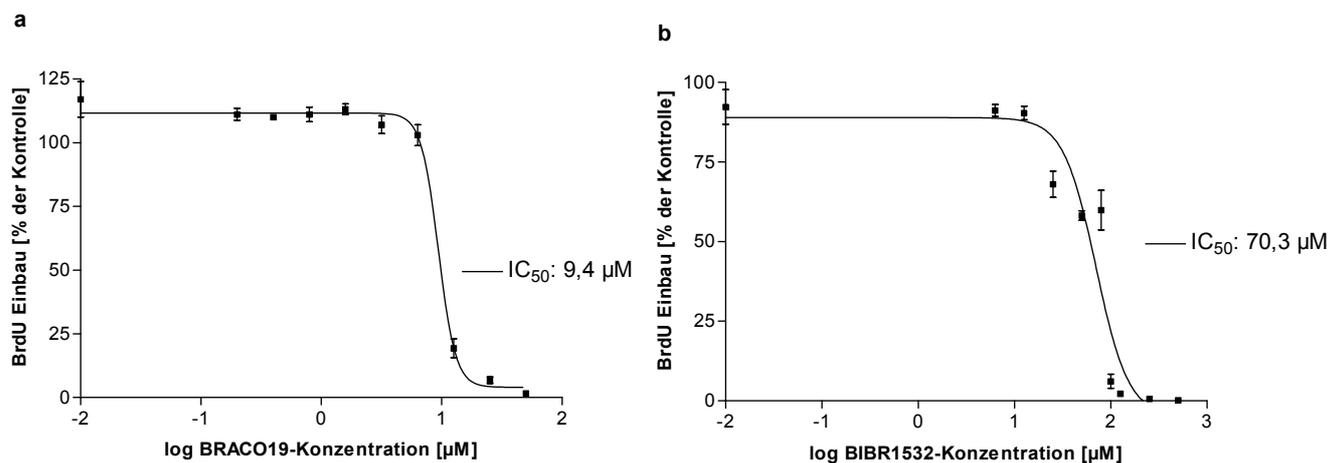


Abb. 3.23: Bestimmung der Proliferationsfähigkeit von SW-OH1-Zellen mit Hilfe des BrdU-ELISA-Assays, die mit den Telomeraseinhibitoren BRACO19 (A) bzw. BIBR1532 (B) behandelt wurden. Die Zellen wurden 3 Tage mit 0,2 bis 50 μM BRACO19 bzw. mit 1,6 bis 500 μM BIBR1532 behandelt. Die einzelnen Datenpunkte stellen Mittelwerte aus mindestens 4 Einzelmessungen dar.

In der folgenden Tab. 3.12 sind die Mittelwerte der IC_{50} -Bestimmungen für beide Telomeraseinhibitoren angegeben.

<i>Telomeraseinhibitor</i>	<i>IC₅₀-Wert</i>
BRACO19	9,3 µM
BIBR1532	61,2 µM

Tab. 3.12: IC₅₀-Werte der Telomeraseinhibitoren BRACO19 und BIBR1532 für die SW-OH1-Zellen mit Hilfe des BrdU-ELISA-Assays. Die IC₅₀-Werte stellen Mittelwerte aus 2 unabhängigen BrdU-Assays dar.

Die in der Zellkultur eingesetzten Inhibitorkonzentrationen BRACO19 und BIBR1532 orientierten sich an den Ergebnissen des zellfreien TRAP-Assays und der Proliferationsbestimmung im BrdU-Assay; d.h. die Inhibitorkonzentrationen wurden so gewählt, dass sie über den im zellfreien TRAP-Assay jeweils telomerasehemmenden Konzentrationen und unterhalb der jeweiligen IC₅₀-Werte lagen. Da nicht zytotoxische Inhibitorkonzentrationen in den Zellkulturversuchen eingesetzt wurden, war eine uneingeschränkte Proliferation der Zellen gewährleistet und mögliche Änderungen der Telomeraseaktivität als Folge eines veränderten Proliferationsverhaltens konnten ausgeschlossen werden. In den Zellkulturversuchen wurden folgende Inhibitorkonzentrationen eingesetzt: 3 µM BRACO19 und 12 µM BIBR1532.

Die Zellen wurden nach einmaliger Zugabe über 1 bis 3 Tage mit den entsprechenden Konzentrationen der jeweiligen Substanz inkubiert, so dass die Effekte auf die Telomeraseaktivität nach 24 h, 48 h und 72 h untersucht werden konnten. Um unspezifische Effekte auf die Telomeraseaktivität durch die verwendeten Lösungsmittel auszuschließen, wurden die Zellen analog zu den eingesetzten Telomeraseinhibitorkonzentrationen mit den jeweiligen Konzentrationen des Lösungsmittels über 1 bis 3 Tage behandelt und die Telomeraseaktivität ebenfalls nach 24 h, 48 h und 72 h überprüft. Die Ergebnisse der 1- bis 3-tägigen Inkubation der SW-OH1 Zellen mit den Inhibitoren BRACO19 und BIBR1532 ist in Abb. 3.24 dargestellt.

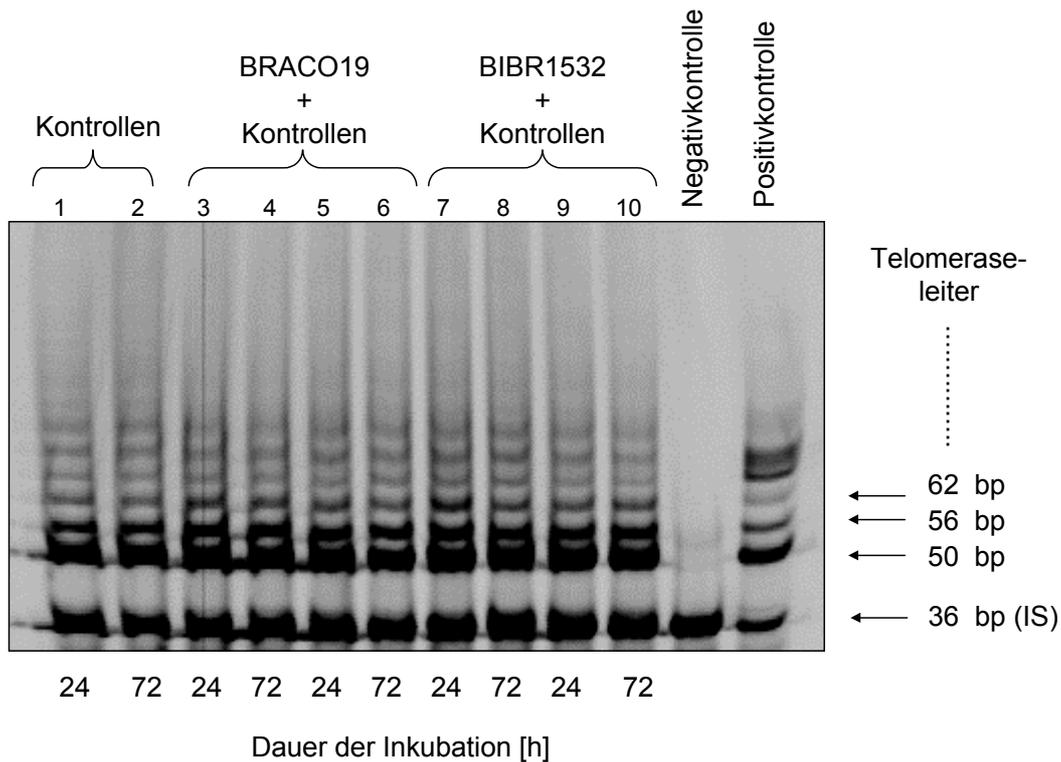


Abb. 3.24: Bestimmung der Telomeraseaktivität der mit Telomeraseinhibitor behandelten WTS-Zellen (SW-OH1) im Vergleich zu den Kontrollzellen mit dem TRAP-Gel-Assay. Alle Bestimmungen erfolgten mit 0,05 µg Protein je PCR-Ansatz; Spuren 1, 2: Kontrollen = unbehandelte Zellen; Spuren 3, 4: mit 3 µM BRACO19 behandelte Zellen; Spuren 5, 6: Lösungsmittel-Kontrollen; Spuren 7, 8: mit 12 µM BIBR1532 behandelte Zellen; Spuren 9, 10: Lösungsmittel-Kontrollen; Negativkontrolle (CHAPS-Lysepuffer), Positivkontrolle (TSR8).

Die Zellkulturversuche zeigten, dass weder die G-Quadruplex stabilisierende Substanz BRACO19 noch der nicht nukleosidische Reverse Transkriptase-Hemmer BIBR1532 in den eingesetzten Konzentrationen die Telomeraseaktivität der SW-OH1-Zellen nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation inhibieren konnten. Diese Ergebnisse basieren auf zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchsreihen. Im anschließenden zellfreien TRAP-Assay wurde eine Hemmung der Telomeraseaktivität der jeweiligen Zelllysate der Zellkulturversuchsreihe mit Konzentrationen von 1 µM BRACO19 und 10 µM BIBR1532 erzielt.

Die durchgeführten Zelllysateversuche zeigten, dass die verwendeten Substanzen BRACO19 und BIBR1532 grundsätzlich das Potential zur Hemmung des Enzyms Telomerase aufweisen. Eine Hemmung der Telomeraseaktivität mittels dieser Substanzen konnte in Zellkulturversuchen jedoch nicht bestätigt werden, was z.B.

durch eine unzureichende zelluläre Aufnahme der Inhibitoren mit bedingt sein könnte.

3.2.2. Modellsysteme zur Untersuchung der Wirkung von Telomerase-inhibitoren

3.2.2.1. Etablierung eines Zellmodells zur Testung von Telomeraseinhibitoren- A-549-Zellen als Testmodell

3.2.2.1.1. Cisplatin und Proliferationsverhalten von A-549-Zellen

Mit Hilfe des BrdU-Assays wurde das Proliferationsverhalten der A-549-Zellen, wie unter 2.2.1.4. beschrieben, gegenüber verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen bestimmt. Das Ergebnis eines repräsentativen Assays ist in Abb. 3.25 dargestellt.

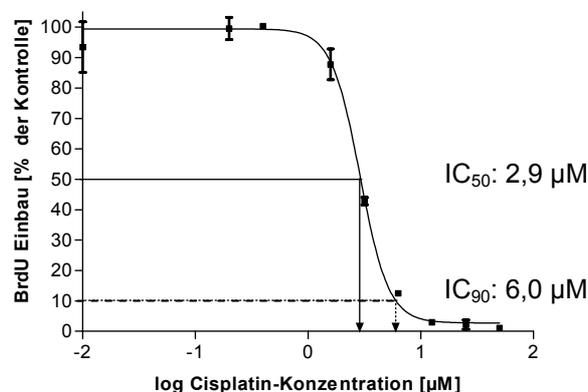


Abb. 3.25: Bestimmung der Proliferationsfähigkeit von A-549-Zellen in Abhängigkeit von der Cisplatin-Konzentration mit Hilfe des BrdU-ELISA-Assays. Die Zellen wurden 3 Tage mit 0,2 bis 50 µM Cisplatin behandelt. In dieser Graphik sind die Ergebnisse eines repräsentativen BrdU-Assays dargestellt, bei dem ein IC_{50} -Wert von 2,9 µM bzw. ein IC_{90} -Wert von 6,0 µM ermittelt wurde. Die einzelnen Datenpunkte stellen Mittelwerte aus mindestens 4 Einzelmessungen dar.

In zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten konnte für Cisplatin ein IC_{50} -Wert von 3,0 µM ermittelt werden. An diesem Wert orientierte sich die Anfangskonzentration Cisplatin, mit der die Inkubation der Zellen begonnen wurde. Es wurde die Cisplatin-Konzentration eingesetzt, die keine einschränkende Wirkung auf die Zellproliferation hatte. Die Inkubation der Zellen startete mit 150 nM Cisplatin.

Von dieser ersten Konzentration ausgehend wurden die nachfolgenden eingesetzten Konzentrationen verdoppelt. Die Annäherung an den IC_{50} -Wert erfolgte in kleineren Schritten, so dass ab 1200 nM bis Erreichen des IC_{50} -Werts jeweils die Cisplatin-Konzentration um 600 nM erhöht wurde. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei jeder Konzentration über 5 Passagen (Schema siehe Tab. 3.13).

<i>eingesetzte Cisplatin-Konzentration über je 5 Passagen</i>	<i>fortlaufende Passagen während der Versuchsreihe</i>
150 nM	1-5
300 nM	6-10
600 nM	11-15
1200 nM	16-20
1800 nM	21-25
2400 nM	26-30
3000 nM	31-35

Tab. 3.13: Schema zur Inkubation der A-549-Zellen mit Cisplatin. Die A-549-Zellen wurden mit den jeweiligen Cisplatin-Konzentrationen über 5 Passagen inkubiert.

Zu Beginn, während und am Ende der Versuchsreihe wurde der IC_{50} -Wert sowohl der unbehandelten A-549-Zellen als auch der mit Cisplatin behandelten Zellen überprüft. Die Ergebnisse des BrdU-Assays der Kontrollzellen und der mit 1200 nM Cisplatin behandelten Zellen (beide nach 20 Passagen getestet) sind in der folgenden Abb. 3.26 dargestellt.

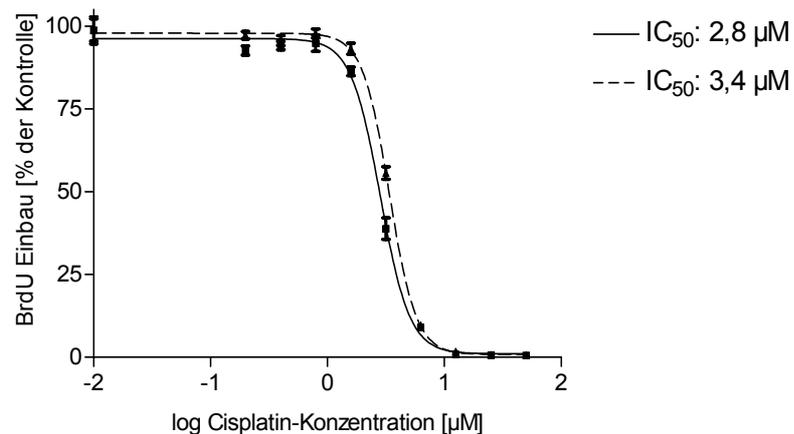


Abb. 3.26: Bestimmung der Proliferationsfähigkeit ohne Cisplatin behandelte (—) und mit 1200 nM Cisplatin behandelte (---) A-549-Zellen mit Hilfe des BrdU-ELISA-Assays. Die Zellen wurden 3 Tage mit 0,2 bis 50 µM Cisplatin behandelt. In dieser Graphik sind die Ergebnisse eines repräsentativen BrdU-Assays dargestellt, bei dem IC₅₀-Werte von 2,8 µM für die unbehandelten A-549-Zellen und 3,4 µM für die mit Cisplatin behandelten Zellen ermittelt wurden. Die einzelnen Datenpunkte stellen Mittelwerte aus mindestens 4 Einzelmessungen dar.

Nachdem die Zellen mit 150, 300, 600 und 1200 nM Cisplatin jeweils über 5 Passagen behandelt worden waren, konnte eine minimale Veränderung des IC₅₀-Werts (3,4 µM) gegenüber dem der Kontrollzellen (2,8 µM) beobachtet werden. Zum Abschluss der Versuchsreihe konnte eine deutliche Veränderung des IC₅₀-Werts der mit 3000 nM Cisplatin behandelten Zellen konstatiert werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.27 veranschaulicht.

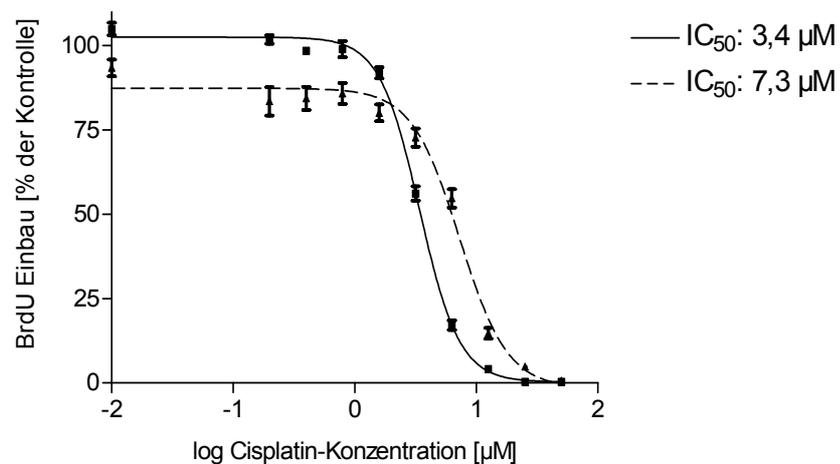


Abb. 3.27: Bestimmung der Proliferationsfähigkeit ohne Cisplatin behandelte (—) und mit 3000 nM Cisplatin behandelte (---) A-549-Zellen mit Hilfe des BrdU-ELISA-Assays. Die Zellen wurden 3 Tage mit 0,2 bis 50 µM Cisplatin behandelt. In dieser Graphik sind die Ergebnisse eines repräsentativen BrdU-Assays dargestellt, bei dem IC₅₀-Werte von 3,4 µM für die unbehandelten A-549-Zellen und 7,3 µM für die mit Cisplatin behandelten Zellen ermittelt wurden. Die einzelnen Datenpunkte stellen Mittelwerte aus mindestens 4 Einzelmessungen dar.

Wie die Ergebnisse verdeutlichen, zeigten am Ende der Versuchsreihe, d.h. nach 35 Passagen bei einer Endkonzentration von 3000 nM, die behandelten A-549-Zellen eine Verdopplung des IC₅₀-Wertes.

Um das Verhalten der A-549-Zellen hinsichtlich Sensitivität und Resistenz gegenüber Cisplatin beurteilen zu können, wurden in Anlehnung an Kurbacher et al. (1997) die IC₅₀- und IC₉₀-Werte vor Beginn der Versuchsreihe, während der Versuchsreihe nach Behandlung mit 1200 nM Cisplatin und zum Schluss der Versuchsreihe nach Behandlung mit 3000 nM Cisplatin verglichen. Die einzelnen IC₅₀- und IC₉₀-Werte sind in Tab. 3.14 zusammengefasst.

	IC_{50}	IC_{90}	<i>Sensitivität*</i>	
<i>vor Versuchsreihe</i>	2,9 μ M	6,0 μ M	$IC_{90} \leq 100\%$ TDC und $IC_{50} \leq 25\%$ TDC	starke Sensitivität
<i>nach 1200 nM Cisplatin-Behandlung (nach 20 Passagen)</i>	3,4 μ M	6,2 μ M	$IC_{90} \leq 100\%$ TDC und $IC_{50} > 25\%$ TDC	schwache Sensitivität
<i>nach 3000 nM Cisplatin-Behandlung (nach 35 Passagen)</i>	7,3 μ M	17,3 μ M	$IC_{90} > 100\%$ TDC und $IC_{50} > 25\%$ TDC	Resistenz

Tab. 3.14: IC_{50} - und IC_{90} -Werte von Cisplatin für die unbehandelten und Cisplatin-behandelten A-549-Zellen. *100% Test Drug Concentration (TDC) für Cisplatin: 3,8 μ g/ml = 13 μ M (in Anlehnung an ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay, DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. C. Sartori, Hamburg); Definition für Sensitivität und Resistenz nach Kurbacher et al. (1997).

Während die A-549-Zellen vor Versuchsbeginn gegenüber Cisplatin eine starke Sensitivität aufwiesen, wurde nach Inkubation mit 1200 nM Cisplatin eine schwache Sensitivität und nach Behandlung mit 3000 nM Cisplatin eine Resistenz gegenüber Cisplatin festgestellt.

Neben der Bestimmung des IC_{50} -Werts wurde das Zellwachstum der Zellen unter Cisplatin-Behandlung analysiert. Es wurde festgestellt, dass die mit 3000 nM Cisplatin behandelten Zellen eine deutliche Wachstumsverzögerung zeigten. Während die Zellzahl der mit 150 nM Cisplatin behandelten Zellen in 72 h auf das Sechsfache anstieg, zeigten die mit 3000 nM Cisplatin behandelten Zellen in diesem Zeitraum nur noch eine Verdopplung ihrer Zellzahl.

3.2.2.1.2. Telomeraseaktivität und Cisplatin

Die Telomeraseaktivität der A-549-Zellen wurde bei jeder eingesetzten Cisplatin-Konzentration analysiert, wobei pro PCR-Ansatz 500 bzw. 50 Zellen eingesetzt wurden. In den beiden folgenden Abb. 3.28 und 3.29 sind exemplarisch die Telomeraseaktivitäten der mit der geringsten (150 nM) und der höchsten (3000 nM) Cisplatin-Konzentration behandelten A-549-Zellen dargestellt.

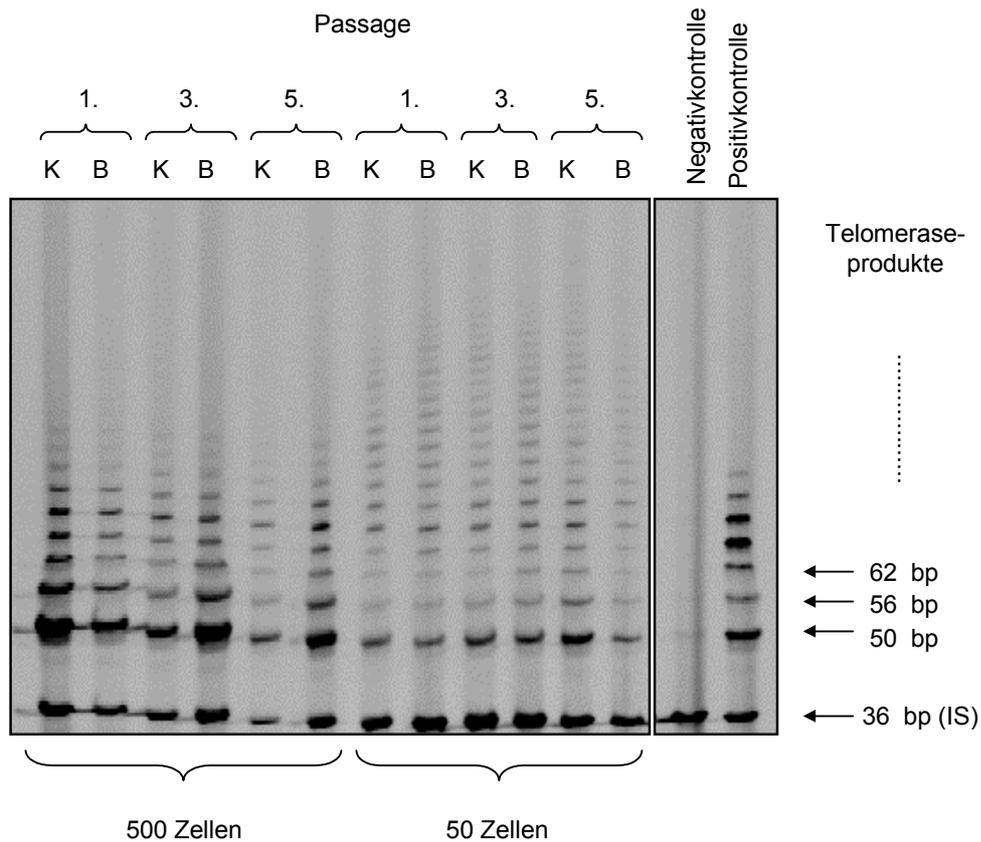


Abb. 3.28: Bestimmung der Telomeraseaktivität der A-549-Zellen mit dem TRAP-Gel-Assay. Je PCR-Ansatz wurden 500 bzw. 50 Zellen eingesetzt; die mit 150 nM Cisplatin behandelten Zellen (B) sind je Passage direkt neben den Kontrollen (K) aufgetragen; Negativkontrolle (CHAPS-Lysepuffer), Positivkontrolle (TSR8).

Die unbehandelten Kontrollen zeigten im TRAP-Gel bei Einsatz von 500 Zellen pro PCR-Ansatz leichte Telomereschwankungen, während bei der 10-fachen Verdünnung (50 Zellen pro PCR-Ansatz) gleichmäßige Telomeraseleitern beobachtet werden konnten. Anhand dieser gleichmäßigen Telomeraseleitern wurde die Telomeraseaktivität der mit 150 nM Cisplatin behandelten Zellen beurteilt. Mit Ausnahme einer Probe konnte keine Abnahme in der Anzahl und Intensität der Banden zu den Kontrollen festgestellt werden. Da die Probe mit der schwächer ausgebildeten Telomeraseleiter im Vergleich zur Kontrolle bei Einsatz der höheren Zellzahl je PCR-Ansatz eine relativ starke Telomeraseaktivität aufwies, ist insgesamt auch bei dieser Probe nicht von einer Inhibition der Telomerase durch Cisplatin auszugehen.

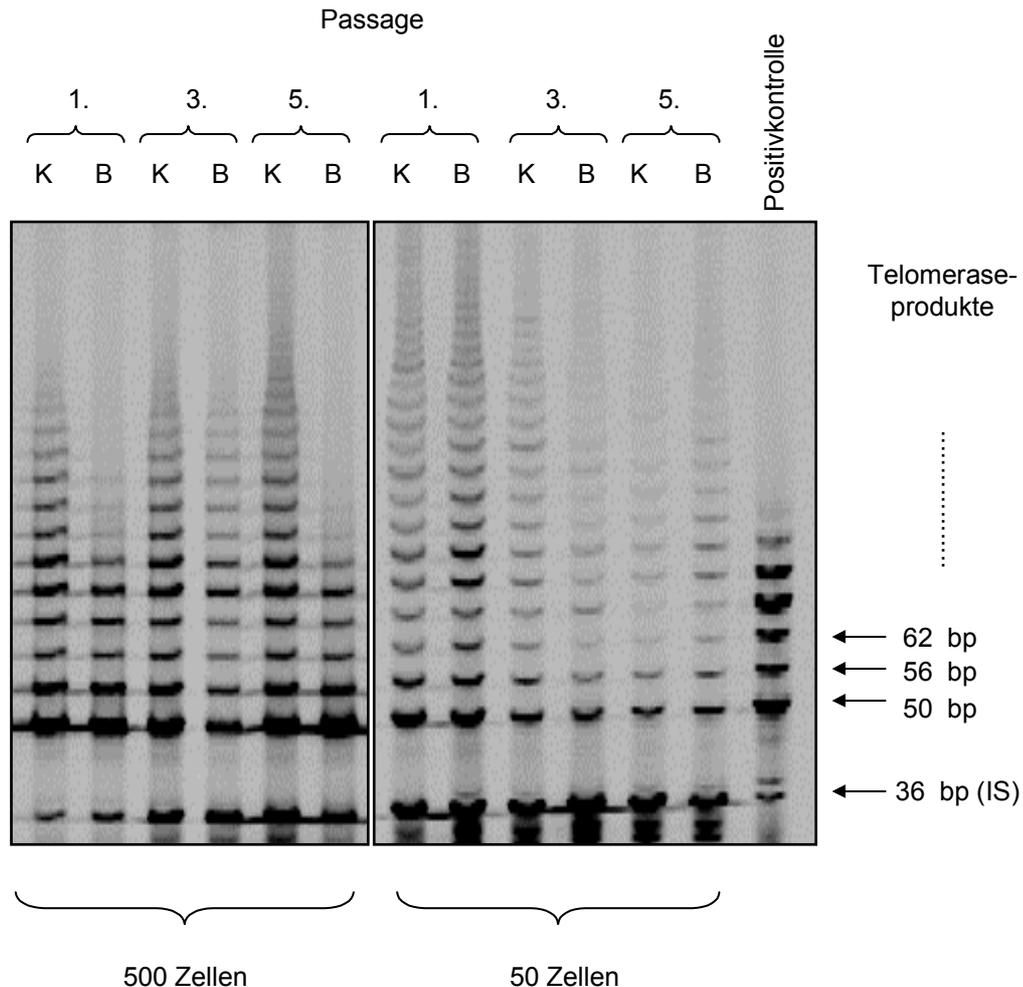


Abb. 3.29: Bestimmung der Telomeraseaktivität der A-549-Zellen mit dem TRAP-Gel-Assay, pro PCR-Ansatz wurden 500 bzw. 50 Zellen eingesetzt; die mit 3000 nM Cisplatin behandelten Zellen (B) sind je Passage direkt neben den Kontrollen (K) aufgetragen; (Kontrollen); Positivkontrolle (TSR8).

Für die mit 3000 nM Cisplatin inkubierten Zellen zeigte sich bei Einsatz von 500 Zellen pro PCR-Ansatz eine leichte Abnahme der Telomeraseaktivität im Vergleich zu den Kontrollen, die in diesem Gel gleichmäßige Telomeraseleitern zeigen. Bei Einsatz der 10-fachen Verdünnung der Zelllysate in der PCR (50 Zellen pro PCR-Ansatz) konnte keine Veränderung in der Telomeraseaktivität der mit Cisplatin inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die allmähliche Konzentrationssteigerung von Cisplatin während der Versuchsreihe nicht zu einer Veränderung der Telomeraseaktivität der A-549-Zellen führte.

3.2.2.1.3. Telomerlänge und Cisplatin

Vorausgesetzt es stand genügend Probenmaterial zur Verfügung, wurde die Telomerlänge in mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Veränderungen der Telomerlängen der A-549-Zellen unter Behandlung mit steigenden Cisplatin-Konzentrationen sind den Telomerlängen der Kontrollen in der Abb. 3.30 gegenübergestellt.

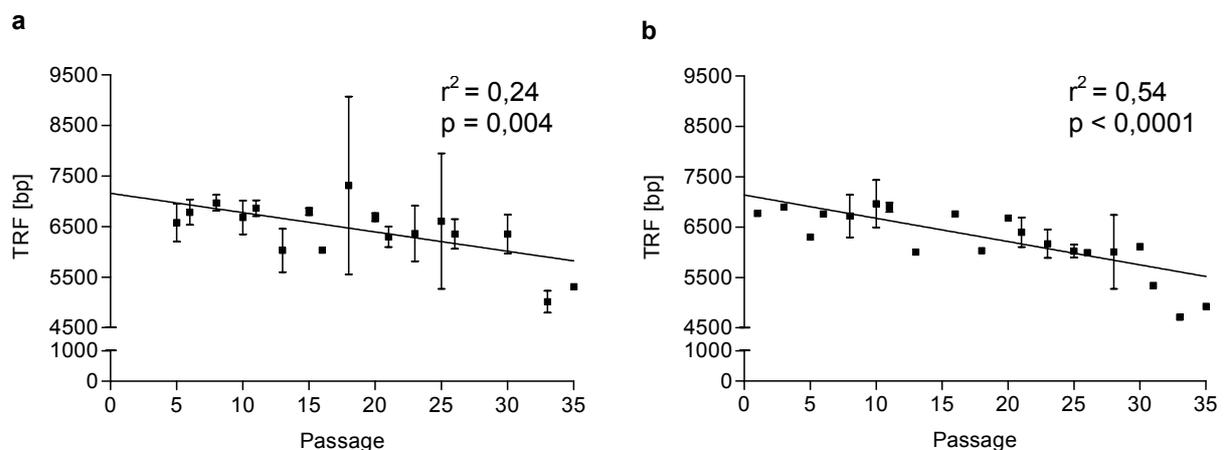


Abb. 3.30: Vergleich der Telomerlängen der über 18,5 Wochen (35 Passagen) kultivierten A-549-Zellen: Kontrollen (a) und Cisplatin behandelte Zellen (b). Vorausgesetzt es stand genügend Probenmaterial zur Verfügung, wurden die Telomer-Restriktionsfragmente (TRF) der Proben in mind. zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten bestimmt.

Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 35 Passagen war sowohl bei den Kontrollen als auch den mit Cisplatin behandelten Zellen eine Abnahme der mittleren Telomerlängen festzustellen. Tab. 3.14 zeigt die gemessenen Werte der Telomerlängen der untersuchten Proben.

<i>eingesetzte Cisplatin-Konzentration über je 5 Passagen</i>	<i>fortlaufende Passagen während der Versuchsreihe</i>	<i>Kontrollen</i>	<i>Cisplatin behandelte Zellen</i>
		TRF [bp]	TRF [bp]
150 nM	1-5	6577	6656
300 nM	6-10	6810	6813
600 nM	11-15	6562	6447
1200 nM	16-20	6676	6492
1800 nM	21-25	6421	6196
2400 nM	26-30	6351	6039
3000 nM	31-35	5162	4994

Tab. 3.15: Telomerlängen der mit Cisplatin behandelten Zellen; bei jeder Konzentration wurden die Telomerlängen der Zellen der 1., 3. und 5. Passage bestimmt, d.h. die Mittelwerte setzen sich aus bis zu 3 Proben der unterschiedlichen Passagen zusammen.

Die Daten demonstrieren, dass die Abnahme der Telomerlänge Passagezeitabhängig ist und nicht durch die Cisplatin-Behandlung verursacht wurde, da auch bei den unbehandelten Zellen (Kontrollen) eine Verkürzung der Telomerlänge zu beobachten war.

3.2.2.1.4. Morphologische Veränderungen der A-549-Zellen

Der mittels Lichtmikroskop gewonnene Eindruck einer morphologischen Veränderung der mit Cisplatin behandelten Zellen konnte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops und des konfokalen Lasermikroskops bestätigt werden. Zum einen veränderten die behandelten Zellen ihre Form und Größe, d.h. die mit 3000 nM Cisplatin behandelten Zellen verloren ihre abgerundete Gestalt und waren ungefähr doppelt so groß wie die Kontrollzellen. Während die Kontrollzellen eine Breite von ca. 26 μm aufwiesen, waren die mit 3000 nM Cisplatin behandelten Zellen ca. 50 μm breit. Zum anderen bildeten die Zellen unter der Cisplatin-Behandlung Veränderungen im Zytoskelett aus (siehe Abb. 3.32).

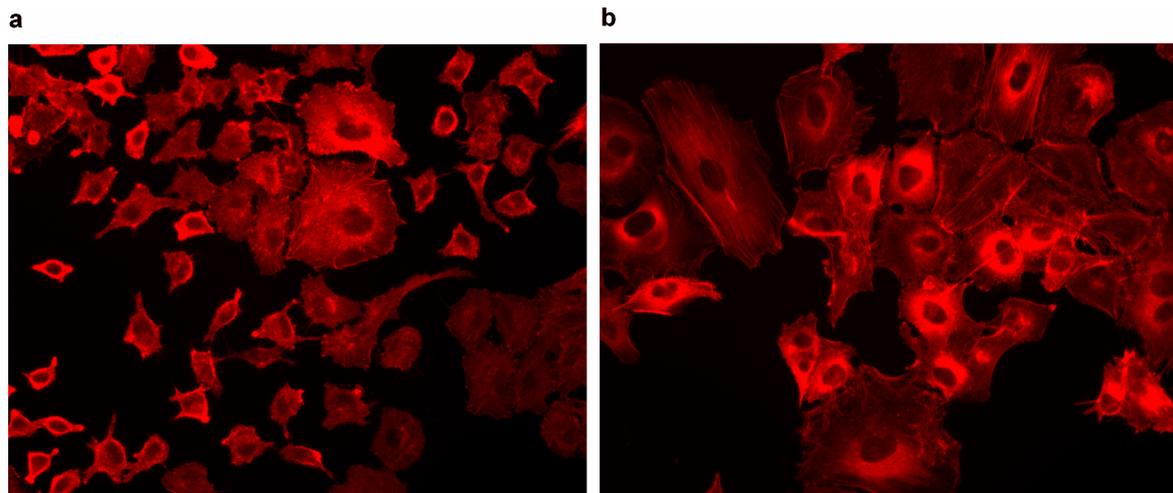


Abb. 3.32: Darstellung der Actin-Filamente des Zytoskeletts der A-549-Zellen mittels Rhodamin-Phalloidin-Färbung. Im Vergleich zu den Kontrollzellen (a) zeigten die mit 1800 nM Cisplatin behandelten A-549-Zellen (b) Veränderungen im Zytoskelett. Die Zellen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.2.2.1.5. Zellzyklus und Cisplatin

Mit Hilfe der FACS (fluorescence activated cell sorting) -Analyse konnte durch Bestimmung des DNA-Gehalts nach Propidiumiodid-Einbau eine Veränderung des Zellzyklus durch Cisplatin beobachtet werden. Die mit 3000 nM Cisplatin behandelten Zellen zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen einen geringeren Prozentsatz an Zellen in der S-Phase und einen höheren Anteil an Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus (siehe Abb. 3.33).

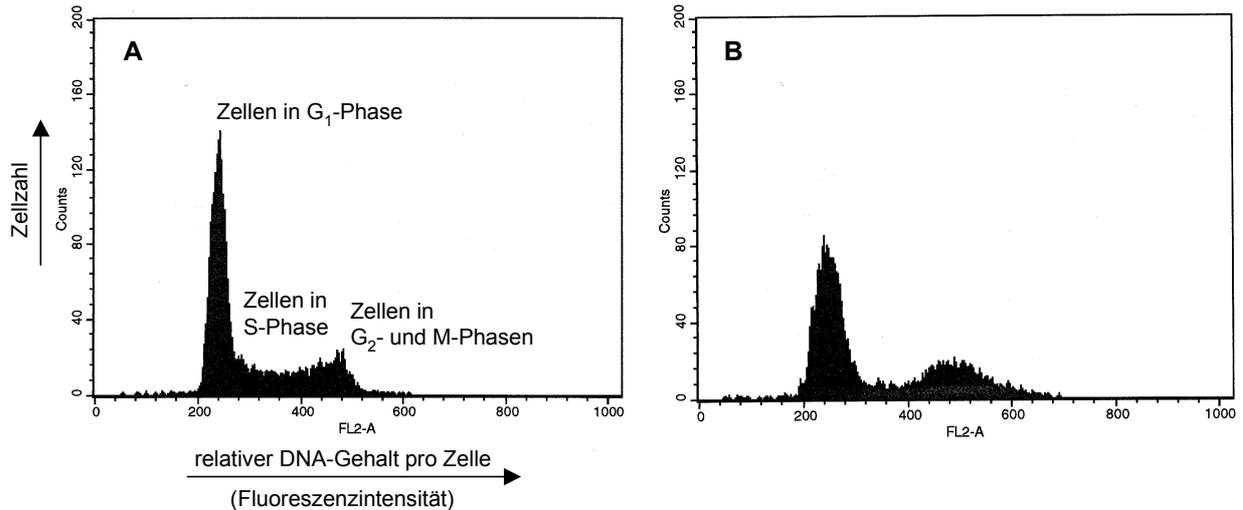


Abb. 3.33: Analyse des DNA-Gehalts proliferierender A-549-Zellen durch Bestimmung des DNA-Gehalts nach Propidiumiodid-Einbau mittels FACS-Analyse; G_1 -Phase: DNA-Gehalt: diploid ($2n$), S-Phase: DNA-Replikation, G_2 -Phase: verdoppelter Chromosomensatz ($4n$); Kontrollzellen (A), mit 3000 nM Cisplatin behandelte Zellen (B).

Die Graphik verdeutlicht die prozentuale Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Während sich ca. 55% der Kontrollzellen in der G_1 -Phase, 33% in der S-Phase und 12% in der G_2 /M-Phase befanden, waren 60% der mit 3000 nM Cisplatin behandelten A-549 Zellen in der G_1 -Phase, 12% in der S-Phase und 28% in der G_2 /M-Phase. Die Daten der Zellzyklusanalysen zeigten weder bei den Kontrollzellen noch bei den mit Cisplatin behandelten Zellen die für apoptotische Zellen typischen Signale (Chromosomensatz $< 2n$). Da bei dieser Art der Zellzyklusbestimmung mittels FACS nicht zwischen G_0 - und G_1 -Phase unterschieden werden kann, wurden die A-549-Zellen unter FCS-Entzug (0,1% FCS) kultiviert, um sie in die G_0 -Phase zu „drängen“. Aufgrund der zellzyklus-abhängigen Telomeraseaktivität ist in der G_0 -Phase eine Abnahme der Enzymaktivität zu erwarten. Nach 24, 48 und 96 h FCS-Entzug wurden die Zellen geerntet und anschließend auf ihre Telomeraseaktivität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Telomeraseaktivität in Abhängigkeit von der Zeitdauer des FCS-Entzugs abnahm und dass die Telomeraseaktivität in Zellen, die sich in der G_0 -Phase befinden, reduziert ist.

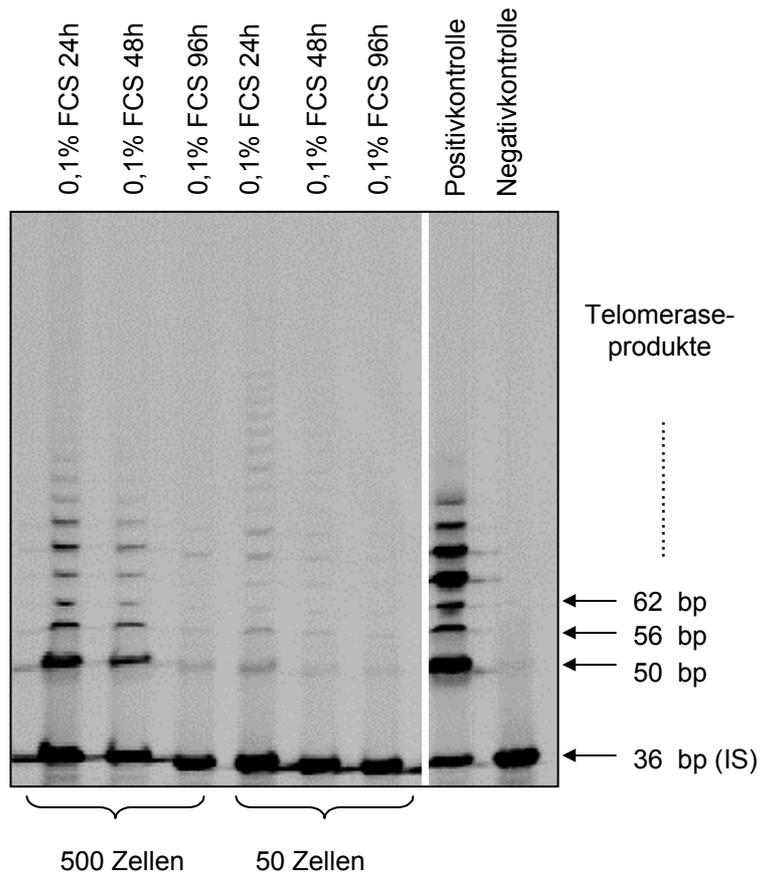


Abb. 3.34: Bestimmung der Telomeraseaktivität der normalen A-549-Zellen mit dem TRAP-Gel-Assay. Je PCR-Ansatz wurden 500 bzw. 50 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden über 24h, 48h und 96h unter FCS-Entzug (0,1% FCS) kultiviert; Positivkontrolle (TSR8), Negativkontrolle (CHAPS-Lysepuffer).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass in diesem Fall die mit Cisplatin behandelten Zellen sich nicht in der G₀-Phase befanden, da eine Abnahme der Telomeraseaktivität zu erwarten gewesen wäre.

3.2.2.2. p53-Status von Weichteilsarkomzellen

Von den analysierten Proben (FL-OH1, SW-OH1, GR-OH1, DI-OH1, MON, RUCH-3) konnte nur bei der Zelllinie SW-OH1 eine mutierte Form des p53 festgestellt werden, während die anderen Zelllinien den Wildtyp des Proteins aufwiesen. Die mutierte Form ist durch eine bräunliche Färbung der Zellkerne vom Wildtyp zu unterscheiden. In Abb. 3.35 ist eine repräsentative immunhistochemische Färbung des p53-Status der Zelllinien SW-OH1 und FL-OH1 dargestellt.

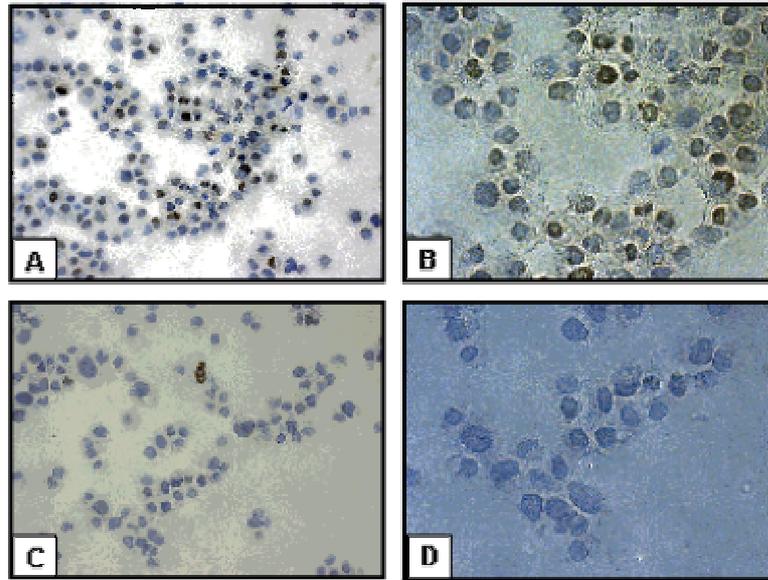


Abb. 3.35: Immunohistochemische Färbung von p53 der WTS-Zelllinien; A) und B) SW-OH1-Zelllinie: 20- bzw. 40-fache Vergrößerung, mutierte Form p53; C) und D) FL-OH1-Zelllinie: 20- bzw. 40-fache Vergrößerung; Wildtyp p53.

Unter den 12 untersuchten WTS-Zelllinien gibt es deutliche Unterschiede in der Telomeraseaktivität, der Telomerlänge und in dem p53-Status. Damit bieten sich diese Zelllinien als Modelle für systematische Untersuchungen mit Telomeraseinhibitoren an.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Bedeutung von Telomeren, Telomeraseaktivität und hTERT-Expression als diagnostische bzw. prognostische Marker bei malignen Erkrankungen im Kindesalter sowie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durchgeführt. Des Weiteren wurden Telomere bzw. Telomerase als potentielle Angriffspunkte für pharmakologische Interventionen beschrieben sowie Zellsysteme zur Austestung von Telomeraseinhibitoren charakterisiert und etabliert.

Bedeutung von Telomeren, Telomeraseaktivität und hTERT mRNA-Expression als diagnostische bzw. prognostische Marker bei Weichteilsarkomen

Bislang liegen keine detaillierten Untersuchungen zur Telomerlänge, Telomeraseaktivität und hTERT-Expression bei kindlichen Weichteilsarkomen (WTS) vor. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig systematische Untersuchungen zur Telomerlänge, Telomeraseaktivität und hTERT mRNA-Expression bei Weichteilsarkom-Zelllinien, die aus Tumoren von Kindern und Jugendlichen etabliert worden waren, durchgeführt.

WTS repräsentieren eine sehr heterogene Gruppe maligner Tumoren, die bei Kindern unter 16 Jahren nach Leukämieerkrankungen, ZNS-Tumoren und Neuroblastomen mit 7% die vierthäufigste Tumorart darstellen (Koscielniak et al., 2002). Im Kindesalter zählen Rhabdomyosarkome, die in embryonale und alveoläre Rhabdomyosarkome unterschieden werden, mit über 50% zu den häufigsten diagnostizierten WTS. Erfahrungen aus WTS-Studien im Kindes- und Jugendalter zeigen, dass embryonale Rhabdomyosarkome Weichteiltumore darstellen, die mit einer günstigen klinischen Prognose assoziiert sind, während für periphere neuroektodermale Tumore, alveoläre Rhabdomyosarkome und Rhabdoidtumore eine schlechte klinische Prognose beschrieben wird (Helmke et al., 2001; Koscielniak et al., 1999; Koscielniak et al., 2002). Trotz immunhistochemischer und cytogenetischer Methoden ist es nicht immer möglich, eine eindeutige (Differential)diagnose von malignen Weichteiltumoren zu stellen (Harms, 1995; Schmidt & Harms, 1990), so

dass molekulargenetische Charakteristika oder neue Tumormarker die Diagnose vereinfachen könnten.

Nach der Telomerhypothese sollten Tumorzellen kürzere Telomere aufweisen als normale somatische Zellen. Für verschiedene solide Tumorarten wie z.B. kolorektale Karzinome, Ovarialkarzinome und Neuroblastome konnte dieser Zusammenhang gezeigt werden (Counter et al., 1994; Hastie et al., 1990; Hiyama et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit wurden Telomerlängen von 12 WTS-Zelllinien und von Leukozyten, die von Kindern ohne WTS stammten und als Kontrollproben dienten, verglichen. Dabei zeigten die WTS-Zelllinien, die von Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 6 Jahren analysiert wurden, mit $6,0 \pm 1,6$ kb signifikant kürzere Telomere ($p < 0,005$) als die Kontrollproben ($8,5 \pm 0,5$ kb), die von Kindern mit einem Durchschnittsalter von 5 Jahren stammten. Diese Messungen stimmen mit Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen überein, die andere Sarkomentitäten analysiert haben. Neben Engelhardt und Mitarbeitern, die in Gewebeproben verschiedener Sarkomsubtypen kürzere Telomere im Vergleich zum normalen gesunden Gewebe feststellten (Engelhardt et al., 1997a), beobachtete die Arbeitsgruppe von Schneider-Stock, dass maligne Schwannome und Leiomyosarkome kürzere Telomerlängen aufwiesen als die korrespondierenden Blutproben der Patienten (Schneider-Stock et al., 1998).

Während in dieser Arbeit sehr homogene Telomerlängen bei den Kontrollen gemessen wurden, wiesen die WTS-Zelllinien eine sehr heterogene Verteilung der Telomerlängen von 3,7 bis 9,0 kb auf. Obwohl aufgrund der geringen Fallzahl ($n=12$) keine signifikanten Unterschiede in der Telomerlänge zwischen den vier untersuchten WTS-Subtypen festgestellt wurden, zeigten tendenziell periphere neuroektodermale Tumore mit 7,9 kb die längsten Telomere, während embryonale Rhabdomyosarkome (6,2 kb) und Rhabdoidtumore (5,4 kb) kürzere Telomerlängen und alveoläre Rhabdomyosarkome mit 4,3 kb die kürzesten Telomere aufwiesen. Diese Ergebnisse werden durch Beobachtungen von Schneider-Stock et al. (1998) unterstützt, die in malignen Schwannomen deutlich kürzere Telomere (4,4 kb) feststellten als in malignen fibrösen Histiocytyomen (8,7 kb). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Telomerlängen der WTS-Subtypen könnte durch eine bei den jeweiligen Entitäten zu verschiedenen Zeitpunkten stattfindende Telomerase-Reaktivierung sein (Schneider-Stock et al., 1998).

Neben der Telomerlänge wurden die Telomeraseaktivitäten der 12 WTS-Zelllinien bestimmt. Dabei erwies sich der Einsatz von 0,05 µg Protein je PCR-Ansatz (Standardkonzentration) als die am besten geeignete Konzentration, um die Telomeraseaktivitäten der einzelnen Proben miteinander zu vergleichen. Von den 12 untersuchten Zelllinien wiesen 8 Proben bei der Standardkonzentration eine starke Telomeraseaktivität auf, 3 Proben eine schwache und bei einer Probe wurde keine Telomeraseaktivität festgestellt. Die Bestimmungen ergaben einen signifikanten Unterschied ($p < 0,02$) in der Telomeraseaktivität zwischen den prognostisch günstigen (embryonale Rhabdomyosarkome) und den prognostisch ungünstigen WTS (periphere neuroektodermale Tumore, Rhabdoidtumore, alveoläre Rhabdomyosarkome). Während die von embryonalen WTS etablierten Zelllinien keine oder nur geringe Telomeraseaktivität aufwiesen, zeigten die Proben der aggressiven Subtypen (periphere neuroektodermale Tumore, Rhabdoidtumore, alveoläre Rhabdomyosarkome) mit Ausnahme einer Zelllinie hohe Telomeraseaktivitäten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Telomeraseaktivität als biologischer Marker für WTS im Kindes- und Jugendalter geeignet ist, da aufgrund der Enzymaktivität WTS mit günstiger und ungünstiger klinischer Prognose differenziert werden können.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit Zelllinien untersucht wurden, können die ermittelten Telomeraseaktivitäten die *in vivo* Bedingungen des Tumors, aus dem die Zelllinien etabliert wurden, widerspiegeln. So zeigten Hiraga et al. (1998), dass sowohl in etablierten Zelllinien aus neuroepithelialen Tumoren als auch im Originaltumorgewebe Telomeraseaktivität nachweisbar war. Diese Daten verdeutlichen, dass Zelllinien als geeignete Modellsysteme in Frage kommen, um die Eigenschaften eines Tumors abzubilden.

Ein Zusammenhang zwischen Telomeraseaktivität und der klinischen Prognose wurde bereits für verschiedene WTS des Erwachsenenalters beschrieben. Eine Korrelation zwischen Telomeraseaktivität und aggressivem biologischem Verhalten wurde für Liposarkome beschrieben (Schneider-Stock et al., 1999). Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen Telomeraseaktivität und aggressivem klinischen Verhalten von Synovialsarkomen und malignen fibrösen Histiocyten gezeigt werden (Sangiorgi et al., 2001). Bei Patienten mit diesen Tumorentitäten war das Auftreten von Lungenmetastasen mit einer hohen Telomeraseaktivität der Tumorproben assoziiert. Es muss erwähnt werden, dass im Gegensatz zu den

bereits genannten Studien Yan et al. (1999a) keinen Zusammenhang zwischen Telomeraseaktivität und dem Tumorgrad der WTS im Erwachsenenalter feststellten. Da alle untersuchten benignen WTS-Läsionen keine Telomeraseaktivität und nur 57% der untersuchten WTS Telomeraseaktivität aufwiesen, schlussfolgerten sie, dass die Enzymaktivität nicht als zuverlässiger diagnostischer und prognostischer Marker für WTS geeignet ist. Eine mögliche Erklärung für den beobachteten hohen Prozentsatz telomerasenegativer WTS könnte das Vorkommen von Telomerase-unabhängigen Telomer-Verlängerungsmechanismen, den sogenannten ALT-Mechanismen („Alternative Lengthening of Telomeres“), sein. Ulaner et al. (2003) bestätigten diese Vermutungen, indem sie zeigten, dass die Mehrzahl der untersuchten Osteosarkome keine Telomeraseaktivität, sondern ALT-Mechanismen aufwiesen. Das Vorkommen von ALT-Mechanismen war ebenso wie das Ausmaß der Telomeraseaktivität mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten verbunden. Während die Telomerlängen der meisten telomerasepositiven humanen Tumorzellen oder immortalisierten Zelllinien sehr homogen sind und weniger als 10 kb betragen, sind für ALT-positive Zellen sehr heterogene Telomerlängen charakteristisch, die durchschnittlich 20 kb aufweisen (Henson et al., 2002). Nach den derzeit vorliegenden Daten kommen ALT-Mechanismen in Tumoren mesenchymalen Ursprungs häufiger vor als in Tumoren epithelialen Gewebes (Reddel et al., 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch lassen nicht auf das Vorhandensein von ALT-Mechanismen bei den 12 WTS-Zelllinien schließen, da die WTS-Zellen keine extrem langen Telomere aufwiesen.

Fasst man sechs Studien zusammen, zeigten von den insgesamt 210 analysierten Sarkomen 56% keine Telomeraseaktivität (Aogi et al., 2000; Bovee et al., 2001; Scheel et al., 2001; Schneider-Stock et al., 1999; Yan et al., 1999a; Yoo & Robinson, 2000). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wiesen jedoch 92% der analysierten WTS-Zelllinien Telomeraseaktivität auf. Erklärbar ist die Diskrepanz in den Prozentzahlen sehr wahrscheinlich in der mangelnden Differenzierung dieser Studien; während in der vorliegenden Arbeit nur maligne Weichteiltumore untersucht wurden, bezieht sich die Angabe der 56% telomerasenegativen Sarkome sowohl auf Weichteiltumore als auch auf andere Sarkomarten, wie z.B. maligne Knochentumore (Osteosarkome, Chondrosarkome). Darüber hinaus wurde in den genannten Studien Tumorgewebe von Sarkomarten des Erwachsenenalters analysiert, während im

Rahmen dieser Arbeit Zelllinien untersucht wurden, die aus Tumormaterial von kindlichen WTS etabliert wurden.

In Übereinstimmung mit verschiedenen Studien (Kim et al., 1994; Yan et al., 2002) zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit keinen Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und der Telomerlänge der WTS-Zelllinien. Da für die aggressiven WTS (periphere neuroektodermale Tumore, Rhabdoidtumore, alveoläre Rhabdomyosarkome) mit Ausnahme einer Zelllinie (alveoläres Rhabdomyosarkom) starke Telomeraseaktivitäten gemessen wurden, könnte die Variabilität der Telomerlängen aus einer Kombination von Telomeraseaktivität und dem Zeitpunkt der Aktivierung des Enzyms abhängig sein und nicht nur von der Telomeraseaktivität allein. Schneider-Stock et al. (1998) postulierten, dass die Heterogenität der Telomerlängen von Liposarkomen durch eine zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfindende Telomerasereaktivierung zu erklären sei. Eine Ursache für die Beobachtung, dass periphere neuroektodermale Tumore längere Telomere aufweisen als alveoläre Rhabdomyosarkome, könnte in einer sehr frühen Reaktivierung des Enzyms liegen. Da beide WTS-Subtypen hohe Telomeraseaktivitäten zeigten, könnte eine frühe Telomerasereaktivierung bei peripheren neuroektodermalen Tumoren einen stärkeren Telomerverlust kompensieren, während bei alveolären Rhabdomyosarkomen erst nach einer stärkeren Telomerverkürzung das Enzym aktiviert würde.

Interessanterweise wurde für die telomerasenegative Zelllinie DI-OH1, die aus Tumormaterial von einem einen Tag alten Kind mit einem embryonalen Rhabdomyosarkom etabliert wurde, eine Telomerlänge von 6,9 kb ermittelt. Im Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Telomerlängen für Nabelschnurblut Neugeborener, die ca. 8 bis 11 kb betragen (Friedrich et al., 2001; Okuda et al., 2002), weisen die DI-OH1-Zellen deutlich kürzere Telomere auf. Da für ALT-positive Zellen sehr heterogene und lange Telomere typisch sind, weisen die Ergebnisse der Telomerbestimmung nicht auf ALT-Mechanismen bei dieser Zelllinie hin. Die Vermutung liegt nahe, dass die Abwesenheit von telomerase-abhängigen und telomerase-unabhängigen Telomerverlängerungsmechanismen zu einem progredienten Telomerverlust führt. Der in der Zellkultur beobachtete Proliferationsstopp der Zellen nach nur wenigen Passagen unterstützt diese Vermutung. Die Abwesenheit von Telomerverlängerungsmechanismen und die Beobachtungen bzgl. des Verhaltens in der Zellkultur weisen darauf hin, dass die DI-

OH1-Zellen zwar maligne transformiert, aber noch nicht immortalisiert waren. Interessanterweise betrug die Überlebenszeit von dem Patienten, aus dessen Tumormaterial die Zelllinie etabliert wurde, 1 Jahr und 10 Monate, während die Patienten, deren Zelllinien hohe Telomeraseaktivitäten aufwiesen, deutlich früher verstarben (durchschnittliche Überlebenszeit: 3,4 Monate).

Bei den 12 WTS-Zelllinien wurde zusätzlich die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT auf mRNA-Ebene quantifiziert. Dabei wurden sehr heterogene hTERT-Expressionen festgestellt, die zwischen 6,7 und 10.900 (1179 ± 3073) lagen. Bei den 11 Proben, die bei Einsatz von 0,05 µg Protein je PCR-Ansatz Telomeraseaktivität aufwiesen, konnte auch hTERT-Expression festgestellt werden. Nur eine geringe Expression von hTERT (6,7 und 9,8) zeigten die beiden WTS-Zelllinien, bei denen keine oder geringe Telomeraseaktivität nachweisbar war. Darüber hinaus war bei einer Probe (alveoläres Rhabdomyosarkom) mit geringer Telomeraseaktivität die höchste hTERT-Expression (10.900) zu verzeichnen. Obwohl kein signifikanter Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und hTERT mRNA-Expression bestand, weisen die Daten auf eine Assoziation zwischen den beiden Parametern hin. Die im Einzelfall deutliche Diskrepanz zwischen Enzymaktivität und hTERT mRNA-Expression könnte durch die Spleißvarianten der hTERT-Transkripte zu erklären sein, welche die Regulation der Telomeraseaktivität beeinflussen (Ulaner et al., 1998). Da die verschiedenen Spleißversionen aufgrund der experimentellen Bedingungen der TaqMan[®]-PCR nicht differenziert werden konnten, sind weitere Untersuchungen zur Erfassung möglicher Spleißvarianten erforderlich. Neben den Spleißversionen der hTERT-Transkripte könnten Modifikationen der RNA-Komponente und posttranskriptionale Veränderungen der verschiedenen Telomerase assoziierten Proteine und der katalytischen Untereinheit hTERT zu Diskrepanzen zwischen Enzymaktivität und hTERT mRNA-Expression führen (Takakura et al., 1998).

Obwohl „Korrelationen“ zwischen hTERT mRNA-Expression und Telomeraseaktivität bei WTS postuliert wurden (Yan et al., 2002; Yan et al., 1999a), zeigte die Arbeit von Yan et al. (1999a), dass vier der hTERT-positiven WTS keine Telomeraseaktivität aufwiesen. Nachdem auch für andere Tumorarten (z.B. Zervixkarzinom, Hauttumore) Diskrepanzen zwischen hTERT mRNA-Expression und Telomeraseaktivität beschrieben worden waren (Takakura et al., 1998; Wu et al., 1999a), verdeutlichen

sowohl die genannten Studien als auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der Nachweis von hTERT die Bestimmung der Telomeraseaktivität nicht ersetzen kann.

Zusammenfassend weisen die WTS-Ergebnisse darauf hin, dass Telomeraseaktivität als prognostischer bzw. diagnostischer Marker für kindliche WTS dienen kann. Weitere Untersuchungen, die höhere Patientenzahlen und die Analyse von Tumorgewebe einschließen, sind notwendig, um die endgültige klinische Bedeutung dieser Ergebnisse zu bestätigen.

Bedeutung von Telomerlänge, Telomeraseaktivität und hTERT mRNA-Expression als diagnostische bzw. prognostische Marker bei akuter lymphoblastischer Leukämie vom T-Zell-Typ (T-ALL)

Die meisten Studien, in denen Untersuchungen zur Telomerlänge und Telomeraseaktivität in hämatologischen Neoplasien beschrieben sind, basieren auf geringen Patientenzahlen und wurden bei Erwachsenen mit leukämischen Erkrankungen durchgeführt. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand wurden in drei Arbeiten Untersuchungen zur Telomerlänge und Telomeraseaktivität bei AML und ALL im Kindesalter durchgeführt (Engelhardt et al., 1998; Malaska et al., 2000; Verstovsek et al., 2003), wobei die Untersuchungen zur ALL hauptsächlich bei Patienten mit der B-Linien ALL (B-ALL) durchgeführt wurden. Malaska et al. (2000) analysierten leukämische Zellen von sechs Kindern mit ALL, differenzierten jedoch nicht zwischen den Untergruppen (T- und B-Linien-ALL). Aufgrund dessen gibt es bislang keine detaillierten Daten zur kindlichen T-Linien ALL (T-ALL).

Anhand von 20 T-ALL-Proben wurden erstmalig detaillierte Untersuchungen zur Telomerlänge, Telomeraseaktivität und hTERT-Expression durchgeführt. Da das Probenmaterial nicht ausreichte, um die genannten biochemischen Marker bei allen 20 Proben zu untersuchen, wurde Telomerase bei 20 Proben, hTERT bei 18 Proben und die Telomerlänge bei 14 Proben analysiert. Es wurde überprüft, ob diese neben den bisher bekannten Prognosefaktoren, wie z.B. Leukämiezellmasse und Patientenalter (Henze, 1999), als prognostische Marker geeignet sind. ALL stellen die häufigsten bösartigen Erkrankungen im Kindesalter dar, wobei die T-Zell-

Leukämie 10% aller akuten lymphoblastischen Leukämien ausmacht (Downing & Shannon, 2002).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Telomerlängen von Patienten mit akuten Leukämien kürzere Telomere aufweisen als die entsprechenden Kontrollen. Takauchi et al. (1994) beobachteten bei Patienten mit AML, dass deren aus Knochenmark isolierten leukämischen Zellen kürzere Telomere aufwiesen als Lymphozyten des peripheren Bluts von Kontrollpersonen. Diese Beobachtungen wurden durch Yamada et al. (1995) und Ohyashiki et al. (1997) bestätigt. Yamada et al. zeigten, dass in Blastenzellen von AML- und ALL-Patienten kürzere Telomere vorhanden waren als in den mononukleären Zellen des Bluts derselben Patienten zum Zeitpunkt der Remission. Ohyashiki et al. untersuchten Patienten mit AML und ALL (B-Linien ALL) und stellten fest, dass bei 47 der 55 AML-Patienten und bei 8 der 23 ALL-Patienten die Blastenzellen (aus peripherem Blut oder Knochenmark) kürzere Telomere aufwiesen als die mononukleären Zellen des peripheren Bluts der Kontrollgruppe.

In der vorliegenden Arbeit wurden Telomerlängen aus Blastenzellen, die aus Knochenmark oder peripheren Blut zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oder nach Auftreten eines Rezidivs von 14 Kindern und Jugendlichen mit T-ALL (Durchschnittsalter: 8 Jahre) entnommen worden waren, bestimmt. Als Kontrollen dienten Leukozyten von 19 Kindern und Jugendlichen ohne T-ALL (Durchschnittsalter: 10 Jahre). Da aus ethischen Gründen die Entnahme von Proben aus Knochenmark bei gesunden Personen nicht möglich ist, wurden Telomerlängen ausschließlich aus Leukozyten peripheren Bluts bestimmt. Da weder Unterschiede in den Telomerlängen zwischen den einzelnen Zellpopulationen peripheren Bluts noch zwischen mononukleären Zellen peripheren Bluts und Knochenmarks bestehen, sind Leukozyten aus peripherem Blut als Kontrollen geeignet (Fujimura, 1995; Yamada et al., 1995).

Die Telomerlängen der 19 Kontrollen betragen $8,3 \pm 0,4$ kb. Dabei konnte ein Trend eines Zusammenhangs zwischen der Telomerlänge der Leukozyten und dem kalendarischen Alter der Kontrollpersonen festgestellt werden ($p=0,06$, $r^2=0,19$). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Hastie et al. (1990).

Die Telomerlängen-Bestimmung der Patientenproben zeigte eine sehr heterogene Verteilung der Telomerlängen; dabei schwankten die Telomerlängen der Blastenzellen zwischen 3,5 bis 8,1 kb ($6,4 \pm 1,3$ kb). Bei Vergleich der Telomerlängen der Patientenproben mit den Kontrollen wurde ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) festgestellt. Dabei wiesen die Blastenzellen der T-ALL-Patienten deutlich kürzere Telomere auf als die peripheren Blutzellen der Kontrollen. Bei einem Patienten (Patient 13) stammten die Blasten aus Rezidivmaterial und interessanterweise zeigten diese Blasten eine sehr kurze Telomerlänge von 3,5 kb, was auf eine besonders starke Proliferation dieser Zellen hinweist.

Somit konnte gezeigt werden, dass bei der kindlichen T-ALL leukämische Zellen deutlich kürzere Telomere aufweisen als gesunde, nicht leukämische Zellen. Die kürzeren Telomere der Blasten sind durch eine gesteigerte Zellteilungsrate im Vergleich zu den gesunden Zellen erklärbar. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stehen in Übereinstimmung mit den für akuten Leukämien beschriebenen Beobachtungen (Ohyashiki et al., 1997; Takauchi et al., 1994; Yamada et al., 1995). Damit wird deutlich, dass die Telomerlänge als diagnostischer Marker für kindliche T-ALL dienen kann. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Telomerlänge und dem klinischen Verlauf der Patienten festgestellt werden, was den prognostischen Wert dieser Bestimmung einschränkt.

Obwohl in den meisten somatischen Zellen keine Telomeraseaktivität nachzuweisen ist, konnte gezeigt werden, dass in normalen Leukozyten Telomeraseaktivität vorhanden ist (Broccoli et al., 1995). Verschiedene Arbeiten untersuchten das Ausmaß der Telomeraseaktivität in Lymphozyten des peripheren Bluts und stellten fest, dass B- und T-Zellen sowie Monozyten eine geringe Telomeraseaktivität aufweisen, deren Aktivität sich nach Stimulation mit einem Mitogen erhöhte (Hiyama et al., 1995c; Igarashi & Sakaguchi, 1996; Igarashi & Sakaguchi, 1997; Norrback et al., 1996).

Um die Telomeraseaktivitäten der Blastenzellen von den Patienten miteinander semiquantitativ vergleichen zu können, wurden deren Telomeraseaktivitäten mit der Aktivität von mit Phytohämagglutinin stimulierten und nicht stimulierten mononukleären Zellen des peripheren Bluts von gesunden, jungen Erwachsenen bei Einsatz von 0,04 µg Protein je PCR-Ansatz in Beziehung gesetzt. Da aus ethischen

Gründen gesunden Personen keine Zellen des Knochenmarks entnommen werden können, wurden mononukleäre Zellen peripheren Bluts eingesetzt. Aufgrund der Tatsache dass Zellen des Knochenmarks und mononukleäre Zellen des peripheren Bluts sich nicht in ihrer Telomeraseaktivität unterscheiden, eignen sich periphere Blutzellen als Kontrollen (Ohyashiki et al., 1997).

Die stimulierten mononukleären Zellen des peripheren Bluts Zellen zeigten, wie erwartet, eine deutlich höhere Telomeraseaktivität als die nicht stimulierten Zellen der gesunden Erwachsenen. Anhand dieser Kontrollproben konnte eine Semiquantifizierung der Telomeraseaktivität der Patientenproben durchgeführt werden. Von den 20 untersuchten T-ALL-Proben wiesen 12 Proben eine vergleichbar starke Telomeraseaktivität auf wie die mit Phytohämagglutinin stimulierten mononukleären Zellen peripheren Bluts (Score 3). Während bei 2 Proben eine mittelstarke Telomeraseaktivität (Score 2) und bei 5 Proben eine schwache Enzymaktivität (score 1) nachweisbar war, zeigte eine Probe (Patient 4) keine Telomeraseaktivität (score 0). Die Messungen zeigten deutlich höhere Telomeraseaktivitäten in den Blastenzellen im Vergleich zu den nicht stimulierten mononukleären Zellen. Dabei konnten im Gegensatz zu Beobachtungen von Xu et al. (1998) in Rezidivmaterial ebenso starke Telomeraseaktivitäten festgestellt werden wie in Blasten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung entnommen wurden. Die höheren Telomeraseaktivitäten leukämischer T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen werden durch die bisher in der Literatur beschriebenen Daten zu akuten Leukämien unterstützt (Broccoli et al., 1995; Counter et al., 1995; Engelhardt et al., 2000; Engelhardt et al., 1998; Li et al., 2000b; Malaska et al., 2000; Ohyashiki et al., 1997; Zhang et al., 1996).

In verschiedenen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Telomeraseaktivität und dem klinischen Verlauf von akuten Leukämien bei Kindern festgestellt. Für die kindliche AML konnte gezeigt werden, dass eine geringere Telomeraseaktivität mit einer längeren Überlebenszeit einherging (Verstovsek et al., 2003). Engelhardt et al. (1998) und Malaska et al. (2000) untersuchten in ihren Studien die Telomeraseaktivität von Kindern mit ALL und AML zum Zeitpunkt der Diagnose und während des Krankheitsverlaufs. Dabei nahm die zum Zeitpunkt der Diagnose vorhandene sehr starke Telomeraseaktivität im Verlauf der Therapie bis zum Erreichen der Remission ab. Im Gegensatz zu diesen drei Studien standen in der vorliegenden Arbeit nur Blasten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oder

nach einem Rezidiv den Patienten entnommen worden waren, zur Verfügung. Aufgrund dessen können die Ergebnisse nicht direkt mit den bisher publizierten Daten zur Bedeutung der Telomeraseaktivität als prognostischer Marker verglichen werden. Es wird jedoch deutlich, dass die Bestimmung der Telomeraseaktivität von Blastenzellen, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung entnommen wurden, nicht geeignet ist, um Patienten mit einem klinisch günstigeren Verlauf (Erreichen einer Remission) von Patienten mit einem klinisch ungünstigen Verlauf (Entwicklung eines Rezidivs und Tod) zu differenzieren. Wie die Arbeiten von Engelhardt et al. (1998), Malaska et al. (2000) und Verstovsek et al. (2003) verdeutlichen, kann der Krankheitsverlauf mittels Telomeraseaktivität verfolgt werden, d.h. eine regelmäßige Kontrolle der Telomeraseaktivität vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und während der nachfolgenden Therapie könnte evtl. einen Beitrag zur Therapieoptimierung der kindlichen T-ALL leisten.

Wie bei den WTS-Zelllinien wurden auch bei den T-ALL-Proben sehr variable Expressionen der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT festgestellt (141 bis 424.000, 49.020 ± 96.640). Alle telomerasepositiven T-ALL-Proben zeigten höhere hTERT-Expressionen als die Kontrollprobe (nicht stimulierte mononukleären Blutzellen des peripheren Bluts). Im Gegensatz zu Untersuchungen von Ohyashiki und Mitarbeitern und der Arbeitsgruppe von Xu, die eine Korrelation zwischen Telomeraseaktivität und hTERT-Expression bei Patienten mit AML und ALL zeigten (Ohyashiki et al., 2001; Xu et al., 1998), konnte für die kindliche T-ALL kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Telomeraseaktivität und hTERT-Expression festgestellt werden. Eine Tendenz zur Assoziation zwischen beiden Parametern war jedoch zu erkennen. Spleißvarianten der hTERT-Transkripte (Ulaner et al., 1998), Modifikationen der RNA-Komponente, posttranskriptionale Veränderungen der verschiedenen Telomerase assoziierten Proteine und der katalytischen Untereinheit hTERT könnten die Diskrepanz zwischen Enzymaktivität und hTERT mRNA-Expression erklären (Takakura et al., 1998).

Insgesamt wird deutlich, dass mit Hilfe der Telomerlänge, Telomeraseaktivität und hTERT-Expression zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine Aussage zum klinischen Verlauf der Patienten getroffen werden kann. Inwiefern mit Hilfe der Telomerlänge und Telomeraseaktivität der Krankheitsverlauf oder das

(Nicht)Ansprechen einer Therapie verfolgt werden kann, müssen weitere klinische Untersuchungen zeigen.

Bedeutung von Telomeraseaktivität als prognostischer Marker bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Patienten mit den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn weisen in Abhängigkeit von der Ausdehnung der Erkrankung und der Erkrankungsdauer ein erhöhtes Risiko auf, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln (Ullmann, 2002). Die wesentliche diagnostische Maßnahme bei diesen Erkrankungen stellt die endoskopische Untersuchung dar (Brentnall, 1999; Ekbohm et al., 1990; Ullmann, 2002). Bei Patienten mit ausgedehntem chronisch entzündlichem Befall sind regelmäßige endoskopische Kontrollen mit Entnahme von Biopsieproben zur Tumorfürherkennung erforderlich. Solange keine besseren diagnostischen Maßnahmen verfügbar sind, stellen nach dem derzeitigen Kenntnisstand endoskopische Untersuchungen die geeignetste Methode dar, um prämaligne dysplastische Läsionen frühzeitig zu erkennen. Der Nachweis von biologischen Markern könnte die histologische Beurteilung der Gewebeproben ergänzen und damit Risikopatienten frühzeitig identifizieren.

Die genauen Ursachen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind bislang nicht bekannt; genauso wenig kennt man die genauen Mechanismen, die zur neoplastischen Transformation zum Kolonkarzinom führen (Usselman et al., 2001). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass kolorektale Karzinome eine hohe Telomeraseaktivität aufweisen (Boldrini et al., 2002; Engelhardt et al., 1997b; Unate et al., 1998; Yan et al., 1999b; Kleideiter et al., 2002). Bisher konnte allerdings die Frage nicht eindeutig geklärt werden, ob Telomerase bereits in der Mukosa von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen stärker aktiviert ist als im gesunden Gewebe.

Telomeraseaktivitäten wurden in insgesamt 114 Biopsieproben, die von Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten sowie von Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Kontrollen) stammten, bei Einsatz von 0,08 und 0,008 µg Protein je PCR-Ansatz bestimmt. Von den untersuchten Proben wiesen

61,4% keine, 27,2% eine schwache, 3,5% eine mäßige, 4,4% eine starke und 3,5% eine sehr starke Telomeraseaktivität auf.

Weil nur 11,4% der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Biopsien eine mäßig bis sehr starke Telomeraseaktivität aufwiesen, lag die Vermutung nahe, dass von der Biopsieentnahme bis zur eigentlichen PCR die Enzymintegrität der Probe gelitten haben könnte. Da allerdings zuvor die einwandfreie Qualität des Zelllysats durch Bestimmung der alkalischen Phosphatase bestätigt wurde, konnten falsch-negative Ergebnisse, die z. B. durch Fehler bei der Probenaufarbeitung verursacht worden wären, in der Bestimmung der Telomeraseaktivität ausgeschlossen werden. Da die Telomerasaktivität bei 2 verschiedenen Proteinkonzentrationen gemessen wurden, konnten ebenso falsch-negative Ergebnisse, die durch die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren zustande gekommen wären, ausgeschlossen werden. Falls dennoch PCR-Inhibitoren in den Proben vorhanden gewesen wären, wäre dies durch den Ausfall der 36 bp-Bande (interne Kontrolle) im TRAP-Assay belegt worden. D.h. der hohe Anteil an telomerasenegativen Proben ist weder durch Fehler in der Probenaufarbeitung noch durch das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren zu erklären.

Dass Telomeraseaktivität in normaler intestinaler Mukosa vorhanden sein kann, geht aus Literaturdaten hervor (Bachor et al., 1999; Hiyama, 1996). In Übereinstimmung mit beiden Studien wurde Telomeraseaktivität sowohl in normaler Kolonschleimhaut der Kontrollen ($0,40 \pm 0,51$) als auch in gesunder Mukosa von Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten ($0,43 \pm 0,96$ bzw. $0,62 \pm 1,02$) nachgewiesen. Damit konnten die Ergebnisse von Hiyama et al. (1996) und Bachor et al. (1999) bestätigt werden, dass in selbsterneuernden Geweben bzw. kontinuierlich proliferierenden Zellen Telomeraseaktivität vorhanden ist. Darüber hinaus zeigten die Messungen der Telomeraseaktivität, dass auch die mäßig und stark entzündeten Bereiche der Kolonschleimhaut von Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten Telomeraseaktivität aufweisen, diese sich jedoch nicht von der Enzymaktivität normaler Mukosa innerhalb der Erkrankungsgruppe unterscheiden. Des Weiteren bestanden keine wesentlichen Unterschiede in der Telomeraseaktivität der gesunden und entzündeten Schleimhaut zwischen den beiden Erkrankungsgruppen. In ähnlichen Untersuchungen mit sehr kleinen Patientenzahlen wiesen vier der zehn analysierten Colitis ulcerosa-Proben eine schwache Telomeraseaktivität auf. Engelhardt sowie Yoshida und Mitarbeiter zeigten, dass drei der sieben untersuchten

Colitis ulcerosa-Proben und drei von fünf Morbus Crohn-Proben telomerasepositiv waren (Engelhardt et al., 1997b; Yoshida et al., 1997).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den beiden erwähnten Studien beobachteten Usselman et al. (2001) in allen Kolonabschnitten statistisch signifikant geringere Telomeraseaktivitäten in Biopsien von Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zu den Kontrollen. Sie schlussfolgerten, dass ein Defizit an Telomerase die strukturelle Integrität des Gewebes beeinträchtigt und somit zur Pathogenese von Colitis ulcerosa beiträgt.

Es konnte weiterhin kein Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität und der Einnahme von Arzneistoffen, die standardmäßig bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen angewendet werden (5-Aminosalicylsäure, Sulfasalazin, Glukokortikoide, Azathioprin) gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Usselman et al. (2001).

Die Erkrankungsdauer und der Grad der akuten Entzündung wiesen keinen Einfluss auf die Telomeraseaktivität der Biopsieproben von Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten auf. Da bei der Angabe der Erkrankungsdauer nur der zeitliche Aspekt und nicht der klinische Verlauf der Erkrankung berücksichtigt wird, könnte dies eine Ursache für den fehlenden Zusammenhang zwischen Telomeraseaktivität und Erkrankungsdauer sein.

Es muss geschlossen werden, dass die Telomerase nicht als prognostischer Marker bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen geeignet ist, da keine Unterschiede in den Enzymaktivitäten einerseits zwischen den normalen und entzündeten Kolonabschnitten von Colitis ulcerosa- bzw. Morbus Crohn-Patienten sowie andererseits im Vergleich zur normalen Mukosa der gesunden Kontrollgruppe bestanden. Telomeraseaktivität kann somit nicht als prädiktiver Test für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dienen.

Telomere und Telomerase als Angriffspunkte für pharmakologische Interventionen

Die Telomerase ist nicht nur als diagnostischer und prognostischer Marker für Tumorerkrankungen in der Diskussion, sondern sie stellt auch eine neue, viel-

versprechende Zielstruktur in der Tumorthherapie dar. Der potentielle klinische Nutzen der Telomerasehemmung wird dabei durch Studien unterstützt, die für einige Tumorarten einen Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Prognose der Erkrankung gezeigt haben (Hiyama et al., 1995a; Langford et al., 1997; Ohyashiki et al., 1997; Tatsumoto et al., 2000). Bislang wurden verschiedene Substanzen auf ihre telomerasehemmende Wirkung hauptsächlich *in vitro* untersucht. Die Telomeraseinhibitoren BRACO19 und BIBR1532 stellen neuartige Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen dar. Während es sich bei BRACO19 um eine G-Quadruplex stabilisierende Substanz handelt (Gowan et al., 2002), hemmt BIBR1532 als nicht kompetitiver, nicht nukleosidischer Reverse Transkriptase-Hemmer spezifisch die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT (Damm et al., 2001; Pascolo et al., 2002).

Aufgrund der Tatsache, dass ein schnellerer antiproliferativer Effekt von Telomeraseinhibitoren bei Tumoren mit kurzen Telomeren zu erwarten ist, wurde die WTS-Zelllinie SW-OH1, die sehr kurze Telomere aufweist (4,4 kb), modellhaft für die Untersuchung mit den Substanzen BRACO19 und BIBR1532 eingesetzt.

Beide Substanzen wurden im zellfreien TRAP-Assay auf ihre potentielle Telomerasehemmung untersucht. In der Literatur wird BRACO19 als einer der effektivsten Telomeraseinhibitoren im zellfreien System beschrieben, der einen IC_{50} -Wert von ca. 0,1 μ M aufweist (Gowan et al., 2002). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit hingegen zeigten deutliche telomeraseinhibitorische Effekte im zellfreien TRAP-Assay ab 0,5 μ M. Die Unterschiede der ermittelten wirksamen Konzentrationen, könnten durch die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zu erklären sein. Während Gowan et al. (2002) Zellextrakte einer Mammakarzinom-Zelllinie (21NT) einsetzten, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt der Telomeraseinhibitoren anhand von WTS-Zellen untersucht.

Im Gegensatz zu Untersuchungen von Damm et al. (2001) sowie Pascolo et al. (2002), die im zellfreien System eine 50%ige Hemmung der Telomeraseaktivität von HeLa-Zellen mit ca. 0,1 μ M BIBR1532 erzielten, zeigten die Versuche in dieser Arbeit eine deutliche Hemmung der Telomeraseaktivität der SW-OH1-Zellen erst ab 5 μ M. Diese Beobachtungen werden durch die Arbeit von Barma et al. (2003) unterstützt, die eine 50%ige Hemmung der Telomeraseaktivität bei Einsatz von 5 μ M BIBR1532 im zellfreien TRAP-Assay beschrieben.

Ein Grund für die Diskrepanz der ermittelten effektiven Konzentrationen könnte die Präparation der eingesetzten Extrakte sein. Während in dieser Arbeit und in den Untersuchungen von Barma et al. (2003) lysierte Zellen eingesetzt wurden, führten Damm et al. (2001) und Pascolo et al. (2002) den TRAP-Assay mit aufgereinigten Enzymfraktionen durch (Damm et al., 2001; Schnapp et al., 1998). Im Zellysate enthaltene endogene Bestandteile könnten die Wirkung des Inhibitors beeinträchtigen, indem sie ihn binden oder modifizieren. Andererseits könnten Zellbestandteile mit Telomerase interagieren und somit die Wirkung des Inhibitors reduzieren (Barma et al., 2003). Aus diesen Gründen wären native Zellysate geeignetere Testsysteme, da sie der *in vivo* Situation ähnlicher sind.

Nachdem im Lysat der SW-OH1-Zellen die telomeraseinhibitorische Wirkung der Substanz BRACO19 eindeutig nachgewiesen worden war, sollte die potentielle Telomerasehemmung dieser Substanz in der Zellkultur bestätigt werden. Gowan et al. (2002) beschrieben in ihrer Arbeit, dass eine Hemmung der Telomeraseaktivität bei der Mammakarzinom-Zelllinie 21NT nach 8-tägiger Behandlung mit 2 μM BRACO19 zu beobachten war. Warum die Hemmung der Telomeraseaktivität durch diese Substanz verzögert eintritt, ist bislang unklar. Es ist denkbar, dass der Effekt der G-Quadruplex stabilisierenden Substanz durch Regulationsprozesse zwischen Telomeren, Telomer assoziierten Proteinen und Telomerase selbst vermittelt wird (Gowan et al., 2002).

Um die Frage zu klären, ob bei einer anderen Zelllinie ein Effekt von BRACO19 auf die Telomeraseaktivität evtl. schon zu einem früheren Zeitpunkt eintritt, wurden die SW-OH1-Zellen über 3 Tage mit 3 μM BRACO19 behandelt. Allerdings zeigte die Inkubation mit BRACO19 keine Wirkung auf die Telomeraseaktivität; weder nach 24 h noch nach 48 h und 72 h war ein Einfluss auf die Enzymaktivität zu beobachten. Obwohl in der vorliegenden Arbeit Zellen einer anderen Tumorentität eingesetzt wurden als in den Zellkulturversuchen von Gowan et al. (2002), scheinen sich die Beobachtungen von Gowan et al. zu bestätigen. Die Ergebnisse der Zellkulturversuche lassen vermuten, dass längere Inkubationszeiten notwendig sind, um die Telomeraseaktivität der SW-OH1-Zellen zu beeinflussen. Somit sollten weitere Zellkulturversuche durchgeführt werden, die längere Inkubationszeiten einschließen, um die evtl. durch regulatorische Prozesse vermittelte Telomerasehemmung zu gewährleisten.

In der vorliegenden Arbeit wurde wie für BRACO19 die telomeraseinhibitorische Wirkung der Substanz BIBR1532 im Zellysate eindeutig nachgewiesen. Infolgedessen sollte analog zu BRACO19 das telomeraseinhibitorische Potential dieser Substanz in der Zellkultur bestätigt werden. Da BIBR1532 als Reverser Transkriptase-Hemmer spezifisch die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT hemmt, ist eine Inhibition der Telomeraseaktivität im Vergleich zu BRACO19, dessen eigentliche Zielstruktur die Telomere darstellen, bereits zu einem früheren Zeitpunkt zu vermuten.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des zellfreien TRAP-Assays zeigte auch die Behandlung der SW-OH1-Zellen mit 12 µM BIBR1532 über 3 Tage in der Zellkultur keinen Effekt auf die Enzymaktivität. So war weder nach 24 h noch nach 48 h und 72 h eine Inhibition der Telomeraseaktivität festzustellen. Ein Grund für den fehlenden Effekt des Telomeraseinhibitors könnte eine nicht ausreichende Stabilität des Telomerase-Inhibitor-Komplexes sein. Eine zweite Erklärung könnte in einer mangelnden Aufnahme der Substanz in die SW-OH1-Zellen begründet sein. Um eine mögliche Telomeraseinhibition mittels BIBR1532 zu erzielen, sind weitere Zellkulturversuche nötig. Durch längere Inkubationszeiten und die Anwendung verschiedener Transfektionstechniken (z.B. Elektroporation, Einsatz von FuGENE[®], Lipofectin[®]), die eine Penetration der Substanz in die Zellen ermöglichen, könnte evtl. eine Telomeraseinhibition mittels BIBR1532 erreicht werden.

Damm et al. (2001) zeigten in ihren Experimenten an verschiedenen Tumorzelllinien, dass eine über 100 Tage dauernde Behandlung mit BIBR1532 zu einer deutlichen Telomerverkürzung führte, die mit Auftreten eines seneszenten Phänotyps assoziiert war. Ebenso beschrieben sie ein vermindertes Tumorstadium in Mäusen, denen diese Substanz oral verabreicht wurde. Weiterhin wurde der Einfluss der Inhibitorbehandlung auf transkriptionelle Veränderungen verschiedener Gene analysiert. Dabei zeigte sich, dass in den ersten 56 Tagen der Behandlung keine Veränderung der hTERT-Expression festzustellen war, während nach Erreichen der Seneszenz eine 5-fache Abnahme der hTERT-Expression beobachtet wurde. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit untersuchten Damm et al. jedoch nicht den Einfluss der Inhibitorbehandlung auf die Telomeraseaktivität.

Ein wesentliches Problem in der Tumorthherapie stellen Resistenzen von Tumorzellen gegenüber Zytostatika dar. Die Entwicklung neuer chemotherapeutischer Strategien zur Überwindung dieser Chemoresistenzen würde einen wichtigen Beitrag für die

effektive Behandlung von Tumoren leisten. So könnte der Einsatz von Telomeraseinhibitoren möglicherweise hilfreich in der Therapie chemoresistenter Tumore sein. Verschiedene Arbeiten konnten bisher zeigen, dass die Anwendung von Telomeraseinhibitoren zu einer Sensitivierung gegenüber den ursprünglich Zytostatika resistenten Zellen führte. Durch Transfektion eines Telomerase-Antisense-Vektors in einer humanen Glioblastom-Zelllinie erfolgte neben einer wirksamen Telomeraseinhibition eine Sensitivierung der ursprünglich Cisplatin resistenten Zellen (Kondo et al., 1998b). Ähnliche Beobachtungen beschrieben Ludwig und Mitarbeiter (Ludwig et al., 2001). Sie stellten neben einer effektiven Telomeraseinhibition mittels Ribozymen eine Sensitivierung der Zellen gegenüber Topoisomerasehemmern fest. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Anwesenheit von Telomerase Tumorzellen vor einen möglichen durch Zytostatika induzierten Zelltod bewahrt (Biroccio et al., 2003).

Um das Potential verschiedener Telomeraseinhibitoren zur Aufhebung einer Chemoresistenz von Tumorzellen bewerten zu können, sind geeignete Zellmodelle erforderlich. Zu diesem Zweck wurde unter allmählicher Dosissteigerung mit nicht zytotoxischen Cisplatin-Konzentrationen ein Subklon der Lungenkarzinomzelllinie A-549 etabliert, der gegenüber diesem herkömmlichen Zytostatikum einen ca. zweifach höheren IC_{50} -Wert aufwies als die unbehandelten Zellen.

Die zytostatische Wirkung von Cisplatin beruht auf einer Interkalation zwischen den Guaninbasen des DNA-Strangs, welche zu einer Hemmung der Replikation führt. Aufgrund dessen ist ein Einfluss dieser Substanz auf die guaninreichen Telomerenden bzw. auf die Interaktion zwischen den Chromosomenenden und Telomerase zu vermuten. Die Arbeitsgruppe von Burger behandelten eine Testis-Zelllinie mit 2 μ M Cisplatin (entspricht dem IC_{50} -Wert) über 6 Tage und beobachteten eine Abnahme der Telomeraseaktivität. Sie vermuteten, dass die Inhibition infolge einer G-Pt-G-Interkalation durch Cisplatin an den Telomerenden erfolgte (Burger et al., 1997). Eine Telomerverkürzung unter Cisplatin-Behandlung beschrieben Ishibashi et al. (1998). Sie behandelten HeLA-Zellen mit 0,5 μ M Cisplatin und stellten bereits nach 24 Stunden eine Verkürzung der Telomere fest. Die Reduktion der Telomerlänge konnte jedoch trotz weiterer Cisplatin-Behandlung nicht aufrechterhalten werden; nach 10 Tagen hatten die Telomere wieder ihre ursprüngliche Länge erreicht (Ishibashi & Lippard, 1998).

Es stellte sich nun die Frage, ob eine Hemmung der Telomeraseaktivität und eine Telomerverkürzung der A-549-Zellen unter Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin eintritt. Die Zellkulturversuche dieser Arbeit zeigten, dass die langsame Dosissteigerung von nicht zytotoxischen Cisplatin-Konzentrationen (unterhalb des IC_{50} -Wertes) die Telomeraseaktivität und Telomerlänge der A-549-Zellen nicht beeinflusste. Da sowohl bei den Kontrollzellen als auch den mit Cisplatin behandelten Zellen ab Woche 30 der Zellkultivierung eine Abnahme der Telomerlänge zu beobachten war, beruht die Reduktion der Telomerlänge unter Umständen auf einer Selektion von Zellklonen mit kurzen Telomeren anstatt auf einem spezifischen Cisplatin-Effekt.

Da der Effekt einer Telomeraseinhibition von der Ausgangstelomerlänge einer Tumorzelle abhängt, scheint ein Einsatz bei Tumoren mit sehr kurzen Telomeren sinnvoll (Gowan et al., 2002). Die Autoren behandelten eine Zelllinie mit sehr kurzen Telomeren und eine Zelllinie mit längeren Telomeren mit dem Telomeraseinhibitor BRACO19 und stellten nur bei den Zellen mit den kürzeren Telomeren (2 bis 3 kb) ein reduziertes Zellwachstum fest. Untersuchungen von Biroccio et al. (2003) zeigten, dass das Ausmaß einer Chemosensitivität von Tumorzellen vielmehr vom funktionellen Status der Telomere abhängt als von der Telomeraseaktivität selbst. So wiesen Melanomzellen mit dysfunktionellen Telomeren gegenüber Cisplatin eine höhere Sensitivität auf als Zellen mit funktionellen Telomeren. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Auswirkungen einer Telomeraseinhibition auf eine Sensitivierung gegenüber Zytostatika zu evaluieren. Für diese Experimente eignet sich das in der vorliegenden Arbeit etablierte Zellmodell. Anhand der Cisplatin resistenten A-549-Zellen kann analysiert werden, ob neben einer effektiven Telomeraseinhibition eine Sensitivierung der ursprünglich Cisplatin resistenten Zellen erfolgt und ob diese vom funktionellen Status der Telomere abhängig ist.

Weiterhin zeigten verschiedene Studien, dass eine Telomeraseinhibition ohne feststellbare Veränderungen der Telomerlänge und unabhängig von der Ausgangstelomerlänge der Tumorzellen zu einem Verlust von Zellviabilität führte (Kim et al., 2001; Saretzki et al., 2001). Darüber hinaus beobachteten Karlseder et al. (2002), dass eine Beeinflussung der Funktionalität der Telomerbindenden Proteine (TRF1, TRF2) eine Destabilisierung der Telomere verursachte, die zu den gleichen Effekten (Seneszenz, Zelltod) führte, die ansonsten mit einer Telomerverkürzung

einhergehen. Um den klinischen Nutzen von Telomeraseinhibitoren besser beurteilen zu können, müssen systematische Untersuchungen an Zellsystemen durchgeführt werden, die klären können, unter welchen zellulären Bedingungen ein Einsatz von Inhibitoren zur Zellseneszenz oder Apoptose führt. So stellen die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten WTS-Zelllinien aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Telomerlängen geeignete Systeme dar. Um zu überprüfen, ob eine Telomeraseinhibitor unabhängig von der Ausgangstelomerlänge von Tumorzellen ist, eignen sich die GR-OH1-Zellen und die FL-OH1-Zellen als Modellsysteme, die lange und kurze Telomere aufweisen (GR-OH1: 9 kb, FL-OH1-Zellen: 3,7 kb).

Ob eine kritische Telomerverkürzung zu Apoptose oder zusätzlicher genetischer Instabilität führt, hängt wahrscheinlich außerdem vom funktionellen Zustand bestimmter Proteine (z.B. p53) ab, die an Signaltransduktionswegen für Seneszenz und Apoptose beteiligt sind. Somit könnte die Behandlung von p53-negativen Tumoren mit Telomeraseinhibitoren anstelle des beabsichtigten antiproliferativen Effekts von Tumorzellen eine Tumorprogression fördern (de Lange & Jacks, 1999; Faraoni & Graziani, 2000; Hackett & Greider, 2002).

Bislang wurden zahlreiche *in vitro*-Untersuchungen mit verschiedenen Telomeraseinhibitoren unterschiedlicher Angriffspunkte bzw. Wirkungsmechanismen durchgeführt; allerdings wurden die verwendeten Zellsysteme in Hinblick auf ihre Ausgangstelomerlänge und Empfindlichkeit meistens ungenügend charakterisiert. Telomeraseinhibitoren stellen ein neuartiges, komplexes Therapieprinzip dar, auf das möglicherweise nur bestimmte Subtypen von Tumoren (-zellen) mit einer Regression ansprechen bzw. eine Antitumorwirkung mit bestimmten zellulären "checkpoints" (z. B. p53-Status) verknüpft ist. Aufgrund dessen sind systematische Untersuchungen erforderlich, um zu klären, bei welchen Tumoren der Einsatz von Telomeraseinhibitoren erfolgversprechend ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der p53-Status der WTS-Zelllinien untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die SW-OH1-Zellen mutiertes p53 aufweisen, während die anderen Zelllinien Wildtyp p53 exprimieren. Da die Zelllinien SW-OH1 und FL-OH1 ungefähr gleich lange Telomere aufweisen (ca. 4 kb), sich aber in ihrem p53-Status unterscheiden, stellen diese beiden Zelllinien geeignete Systeme für die Austestung von Telomeraseinhibitoren dar, um in Zukunft das Ansprechen auf eine Telomeraseinhibition bei unterschiedlichem p53-Status zu beurteilen.

Mit den beschriebenen A-549- und WTS-Zellmodellen eröffnen sich neue Testsysteme für Telomeraseinhibitoren, um zukünftig deren Effektivität in Abhängigkeit von Telomerlänge, Resistenzfaktoren und p53-Status abzuklären. Solche Untersuchungen sind Gegenstand eines laufenden Folgeprojektes.

Erst die klinische Anwendung von Telomeraseinhibitoren wird beweisen können, ob das neue Therapieprinzip den hohen Erwartungen gerecht werden kann. Da sich momentan keine Substanzen in der klinischen Prüfung befinden, ist ein therapeutischer Einsatz für den Klinikalltag heute noch nicht abzusehen (Corey, 2002; Rezler et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der diagnostische und prognostische Stellenwert von Telomeren, Telomerase und hTERT-Expression bei WTS und T-ALL im Kindesalter abgeklärt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Telomerase als prädiktiver Marker bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht in Frage kommt. Die gewonnenen neuen Erkenntnisse zum Potential von Telomerase und Telomeren als Zielstrukturen für eine neuartige Tumorbehandlung können einen Beitrag zur Therapieoptimierung von Tumorerkrankungen leisten.

5. Zusammenfassung

Telomere stellen die nicht kodierenden Nukleoproteinstrukturen an den Chromosomenenden dar, welche die Chromosomen vor enzymatischer Degradation, Rekombination und Fusion schützen. Das Enzym Telomerase ist für die Stabilisierung der Telomere verantwortlich. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass Telomerase Zellen die Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation verleiht, während die Abwesenheit dieses Enzyms zu einem progredienten Verlust von Telomersequenzen mit nachfolgender Zellseneszenz bzw. Apoptose führt. Immortale Tumorzellen stabilisieren ihre natürlichen Chromosomenenden durch die telomerasevermittelte De-novo-Synthese der DNA-Sequenz der Telomere. Aufgrund der Tatsache dass Telomerase in über 85% aller Tumore nachgewiesen wurde, wurden zahlreiche Untersuchungen zur klinischen Bedeutung von Telomeren und Telomerase durchgeführt.

Bislang ist weitestgehend unklar, ob Telomerlänge, Telomeraseaktivität und die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT als diagnostische bzw. prognostische Marker bei kindlichen Weichteilsarkomen (WTS) und akuter lymphoblastischer Leukämie der T-Zell-Linie (T-ALL) im Kindesalter geeignet sind. Um diese Fragen zu klären, wurden im ersten Teil der Arbeit bei WTS und T-ALL im Kindesalter die genannten biochemischen Marker untersucht.

Die Telomerlängen der WTS-Zellen und der leukämischen Zellen wurden mit der Southernblot-Analyse bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die WTS-Zelllinien als auch die Blasten signifikant kürzere Telomere aufwiesen als die „altersgematchten“ Kontrollen. Bei den WTS-Zellen konnte kein Zusammenhang zwischen Telomerlänge und der klinischen Prognose der WTS-Subtypen festgestellt werden, ebenso bestand keine Assoziation zwischen Telomerlänge und dem klinischen Verlauf der T-ALL. Die Bestimmungen der Telomerlängen wurden ergänzt durch Untersuchungen der Telomeraseaktivitäten mittels TRAP (telomeric repeat amplification protocol) -Assay. Dabei zeigte sich bei der T-ALL kein Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und dem klinischem Verlauf, während bei den WTS-Zelllinien das Ausmaß der Enzymaktivität mit der Prognose der WTS-Subtypen assoziiert war. Es bestand ein statistisch signifikanter Unterschied in der Telomeraseaktivität zwischen den beiden Gruppen der prognostisch günstigen WTS

(embryonale Rhabdomyosarkome) und der prognostisch ungünstigen WTS (periphere neuroektodermale Tumore, Rhabdoidtumore, alveoläre Rhabdomyosarkome). Die unterschiedlichen Telomeraseaktivitäten deuten darauf hin, dass Telomerase als diagnostischer bzw. prognostischer Marker für kindliche WTS dienen kann, da mit Hilfe der Enzymaktivität die verschiedenen WTS-Subtypen differenziert werden können.

Weiterhin wurde sowohl bei den WTS-Zelllinien als auch den leukämischen Zellen die Expression von hTERT mittels real-time TaqMan[®] PCR analysiert. Obwohl in der vorliegenden Arbeit weder bei WTS-Zelllinien noch leukämischen Zellen ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Telomeraseaktivität und hTERT-Expression festgestellt werden konnte, war ein Trend einer Assoziation zwischen beiden Parametern zu beobachten. Ein Zusammenhang zwischen hTERT-Expression und dem WTS-Subtyp bzw. zwischen hTERT-Expression und dem klinischen Verlauf der T-ALL konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Bislang wurde nicht eindeutig geklärt, ob Telomerase bereits in der Kolonschleimhaut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen „herauf-reguliert“ ist. Deshalb wurde weiterhin untersucht, inwiefern Telomeraseaktivität bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als prädiktiver Marker geeignet ist. Es konnten keine Unterschiede in den Enzymaktivitäten einerseits zwischen den normalen und entzündeten Kolonabschnitten von Colitis ulcerosa- bzw. Morbus Crohn-Patienten sowie andererseits im Vergleich zur normalen Mukosa der gesunden Kontrollgruppe beobachtet werden. Die Bestimmung der Telomeraseaktivität ist damit nicht als prognostischer Marker geeignet und kann nicht als Test für die Identifizierung von Patienten, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms haben, eingesetzt werden.

Da Tumorzellen durch das Enzym Telomerase ihre unbegrenzte Fähigkeit zur Proliferation erlangen, stellt die Inhibition des Enzyms einen neuen hoffnungsvollen Ansatz für die Tumorthherapie dar. Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen mit neuen vielversprechenden Telomeraseinhibitoren unterschiedlicher Wirkmechanismen durchgeführt, um das therapeutische Potential von Telomerase und Telomeren abzuklären.

Anhand eines Zellmodells konnte die Effektivität dieser neuartigen Substanzen in Zelllysaten mittels TRAP-Assay nachgewiesen werden, eine Inhibition der Telomerase in Zellkulturversuchen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Des Weiteren wurden Modellsysteme etabliert und charakterisiert, die für die Austestung von Telomeraseinhibitoren genutzt werden können. Zum einen wurde ein Cisplatin resistentes Zellsystem entwickelt. Dieses eignet sich zur Austestung von Telomeraseinhibitoren unter der Fragestellung, ob ein Einsatz dieser Substanzen zu einer Sensitivierung gegenüber ursprünglich Zytostatika resistenten Zellen führt. Weiterhin wurden telomerasepositive Zellsysteme mit unterschiedlichem p53-Status identifiziert, die zukünftig als Modellsysteme verwendet werden können, um das Nutzen-Risiko-Verhältnis einer Behandlung mit Telomeraseinhibitoren besser beurteilen zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig der klinische Stellenwert von Telomeren und Telomerase als diagnostische und prognostische Marker bei WTS und T-ALL im Kindesalter abgeklärt werden. Darüber hinaus wurde bestätigt, dass die Anwendung von Telomerase als prädiktiver Marker bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Limitationen unterliegt. Die auf zellulärer Ebene durchgeführten Versuche zur pharmakologischen Beeinflussung von Telomerase und Telomeren sowie die Etablierung und Charakterisierung geeigneter Modellsysteme tragen zu einem besseren Verständnis von Nutzen und Risiko einer Tumortherapie mit Telomeraseinhibitoren bei.

6. Literaturverzeichnis

- Aogi, K., Woodman, A., Urquidi, V., Mangham, D. C., Tarin, D., and Goodison, S. (2000). Telomerase activity in soft-tissue and bone sarcomas. *Clin Cancer Res* 6, 4776-4781.
- Bachor, C., Bachor, O. A., and Boukamp, P. (1999). Telomerase is active in normal gastrointestinal mucosa and not up-regulated in precancerous lesions. *J Cancer Res Clin Oncol* 125, 453-460.
- Barma, D. K., Elayadi, A., Falck, J. R., and Corey, D. R. (2003). Inhibition of telomerase by BIBR 1532 and related analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 13, 1333-1336.
- Beattie, T. L., Zhou, W., Robinson, M. O., and Harrington, L. (1998). Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol* 8, 177-180.
- Bieche, I., Nogues, C., Paradis, V., Olivi, M., Bedossa, P., Lidereau, R., and Vidaud, M. (2000). Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res* 6, 452-459.
- Biroccio, A., Gabellini, C., Amodei, S., Benassi, B., Del Bufalo, D., Elli, R., Antonelli, A., D'Incalci, M., and Zupi, G. (2003). Telomere dysfunction increases cisplatin and ecteinascidin-743 sensitivity of melanoma cells. *Mol Pharmacol* 63, 632-638.
- Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569-573.
- Blackburn, E. H., and Gall, J. G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120, 33-53.
- Blasco, M. A. (2002). Telomerase beyond telomeres. *Nat Rev Cancer* 2, 627-633.
- Boldrini, L., Faviana, P., Gisfredi, S., Zucconi, Y., Di Quirico, D., Donati, V., Berti, P., Spisni, R., Galleri, D., Materazzi, G., *et al.* (2002). Evaluation of telomerase in the development and progression of colon cancer. *Int J Mol Med* 10, 589-592.
- Bovee, J. V., van Den Broek, L. J., Cleton-Jansen, A. M., and Hogendoorn, P. C. (2001). Chondrosarcoma is not characterized by detectable telomerase activity. *J Pathol* 193, 354-360.
- Brentnall, T. A. (1999). Risk factors for development of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. In *Advances in inflammatory bowel diseases.*, P. Rutgeerts, J. F. Colombel, S. B. Hanauer, J. Schölmerich, G. N. J. Tytgat, and A. van Gossum, eds. (Dordrecht/ Boston/ London, Kluwer Academic Publishers), pp. 159-167.
- Broccoli, D., Young, J. W., and de Lange, T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9082-9086.
- Bryan, T. M., and Reddel, R. R. (1997). Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. *Eur J Cancer* 33, 767-773.
- Burger, A. M., Double, J. A., and Newell, D. R. (1997). Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *Eur J Cancer* 33, 638-644.
- Chiu, C. P., and Harley, C. B. (1997). Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med* 214, 99-106.
- Colgin, L. M., Wilkinson, C., Englezou, A., Kilian, A., Robinson, M. O., and Reddel, R. R. (2000). The hTERT α splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia* 2, 426-432.
- Cong, Y. S., Wen, J., and Bacchetti, S. (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 8, 137-142.

- Corey, D. R. (2002). Telomerase inhibition, oligonucleotides, and clinical trials. *Oncogene* 21, 631-637.
- Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., and Bacchetti, 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., Gupta, J., Harley, C. B., Leber, B., and Bacchetti, S. (1995). Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85, 2315-2320.
- Counter, C. M., Hirte, H. W., Bacchetti, S., and Harley, C. B. (1994). Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2900-2904.
- Dahse, R., Fiedler, W., Ernst, G., Kosmehl, H., Schlichter, A., Schubert, J., and Claussen, U. (1996). Changes in telomere lengths in renal cell carcinomas. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 42, 477-485.
- Damm, K., Hemmann, U., Garin-Chesa, P., Huel, N., Kauffmann, I., Priepke, H., Niestroj, C., Daiber, C., Enekel, B., Guilliard, B., *et al.* (2001). A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *Embo J* 20, 6958-6968.
- de Lange, T., and Jacks, T. (1999). For better or worse? Telomerase inhibition and cancer. *Cell* 98, 273-275.
- de Lange, T., Shiue, L., Myers, R. M., Cox, D. R., Naylor, S. L., Killery, A. M., and Varmus, H. E. (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10, 518-527.
- Dhaene, K., Van Marck, E., and Parwaresch, R. (2000). Telomeres, telomerase and cancer: an update. *Virchows Arch* 437, 1-16.
- Dome, J. S., Chung, S., Bergemann, T., Umbricht, C. B., Saji, M., Carey, L. A., Grundy, P. E., Perlman, E. J., Breslow, N. E., and Sukumar, S. (1999). High telomerase reverse transcriptase (hTERT) messenger RNA level correlates with tumor recurrence in patients with favorable histology Wilms' tumor. *Cancer Res* 59, 4301-4307.
- Downing, J. R., and Shannon, K. M. (2002). Acute leukemia: a pediatric perspective. *Cancer Cell* 2, 437-445.
- Duan, W., Rangan, A., Vankayalapati, H., Kim, M. Y., Zeng, Q., Sun, D., Han, H., Fedoroff, O. Y., Nishioka, D., Rha, S. Y., *et al.* (2001). Design and synthesis of fluoroquinophenoxazines that interact with human telomeric G-quadruplexes and their biological effects. *Mol Cancer Ther* 1, 103-120.
- Ekbom, A., Helmick, C., Zack, M., and Adami, H. O. (1990). Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 323, 1228-1233.
- Engelhardt, M., Albanell, J., Drullinsky, P., Han, W., Guillem, J., Scher, H. I., Reuter, V., and Moore, M. A. (1997a). Relative contribution of normal and neoplastic cells determines telomerase activity and telomere length in primary cancers of the prostate, colon, and sarcoma. *Clin Cancer Res* 3, 1849-1857.
- Engelhardt, M., Drullinsky, P., Guillem, J., and Moore, M. A. (1997b). Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 3, 1931-1941.
- Engelhardt, M., Mackenzie, K., Drullinsky, P., Silver, R. T., and Moore, M. A. (2000). Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture. *Cancer Res* 60, 610-617.
- Engelhardt, M., Ozkaynak, M. F., Drullinsky, P., Sandoval, C., Tugal, O., Jayabose, S., and Moore, M. A. (1998). Telomerase activity and telomere length in pediatric patients with malignancies undergoing chemotherapy. *Leukemia* 12, 13-24.

- Faraoni, I., and Graziani, G. (2000). Telomerase as a potential anticancer target: growth inhibition and genomic instability. *Drug Resist Updat* 3, 3-6.
- Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J., and et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236-1241.
- Forsyth, N. R., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2002). Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69, 188-197.
- Friedrich, U., Schwab, M., Griese, E. U., Fritz, P., and Klotz, U. (2001). Telomeres in neonates: new insights in fetal hematopoiesis. *Pediatr Res* 49, 252-256.
- Fujimura, T. (1995). Telomere shortening in hematopoietic neoplasias and its clinical implications. *J Tokyo Med Coll* 53, 652-663.
- Glukhov, A. I., Zimnik, O. V., Gordeev, S. A., and Severin, S. E. (1998). Inhibition of telomerase activity of melanoma cells in vitro by antisense oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 368-371.
- Gomez, D. E., Tejera, A. M., and Olivero, O. A. (1998). Irreversible telomere shortening by 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 107-110.
- Gowan, S. M., Harrison, J. R., Patterson, L., Valenti, M., Read, M. A., Neidle, S., and Kelland, L. R. (2002). A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity. *Mol Pharmacol* 61, 1154-1162.
- Gowan, S. M., Heald, R., Stevens, M. F., and Kelland, L. R. (2001). Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes. *Mol Pharmacol* 60, 981-988.
- Grand, C. L., Han, H., Munoz, R. M., Weitman, S., Von Hoff, D. D., Hurley, L. H., and Bearss, D. J. (2002). The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo. *Mol Cancer Ther* 1, 565-573.
- Granger, M. P., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2002). Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol* 41, 29-40.
- Greider, C. W. (1996). Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 65, 337-365.
- Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
- Hackett, J. A., and Greider, C. W. (2002). Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* 21, 619-626.
- Hahn, W. C., Stewart, S. A., Brooks, M. W., York, S. G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R. L., Knoll, J. H., Meyerson, M., and Weinberg, R. A. (1999). Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 5, 1164-1170.
- Handgretinger, R., Kimmig, A., Koscielnak, E., Schmidt, D., Rudolph, G., Wolburg, H., Paulus, W., Schilbach-Stueckle, K., Ottenlinger, C., Menrad, A., and et al. (1990). Establishment and characterization of a cell line (Wa-2) derived from an extrarenal rhabdoid tumor. *Cancer Res* 50, 2177-2182.
- Harle-Bachor, C., and Boukamp, P. (1996). 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* 93, 6476-6481.

- Harms, D. (1995). Soft tissue sarcomas in the Kiel Pediatric Tumor Registry. *Curr Top Pathol* 89, 31-45.
- Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M. B., Arruda, I., and Robinson, M. O. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275, 973-977.
- Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K., and Allshire, R. C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346, 866-868.
- Hayflick, L., and Moorhead, P. (1961). The serial activation of human diploid cell strains. *Exp Cell Research* 25, 285-621.
- Helmke, L., Engler, S., Mattke, A., and Henne-Bruns, D. (2001). Extrarenal malignant rhabdoid tumors in childhood. *Med Pediatr Oncol* 36, 317-319.
- Henson, J. D., Neumann, A. A., Yeager, T. R., and Reddel, R. R. (2002). Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 21, 598-610.
- Henze, G. (1999). Leukämien. In *Krebs bei Kindern und Jugendlichen-Klinik und Praxis der pädiatrischen Onkologie*. P. Gutjahr, ed. (Köln, Deutscher Ärzte-Verlag GmbH), pp. 240-274.
- Herbert, B., Pitts, A. E., Baker, S. I., Hamilton, S. E., Wright, W. E., Shay, J. W., and Corey, D. R. (1999). Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14276-14281.
- Hiraga, S., Ohnishi, T., Izumoto, S., Miyahara, E., Kanemura, Y., Matsumura, H., and Arita, N. (1998). Telomerase activity and alterations in telomere length in human brain tumors. *Cancer Res* 58, 2117-2125.
- Hisatomi, H., Nagao, K., Kanamaru, T., Endo, H., Tomimatsu, M., and Hikiji, K. (1999). Levels of telomerase catalytic subunit mRNA as a predictor of potential malignancy. *Int J Oncol* 14, 727-732.
- Hiyama, E., Gollahon, L., Kataoka, T., Kuroi, K., Yokoyama, T., Gazdar, A. F., Hiyama, K., Piatyszek, M. A., and Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 88, 116-122.
- Hiyama, E., and Hiyama, K. (2003). Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett* 194, 221-233.
- Hiyama, E., Hiyama, K., Ohtsu, K., Yamaoka, H., Ichikawa, T., Shay, J. W., and Yokoyama, T. (1997). Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* 33, 1932-1936.
- Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., Ichikawa, T., and Matsuura, Y. (1992). Length of telomeric repeats in neuroblastoma: correlation with prognosis and other biological characteristics. *Jpn J Cancer Res* 83, 159-164.
- Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., Matsuura, Y., Piatyszek, M. A., and Shay, J. W. (1995a). Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1, 249-255.
- Hiyama, E., Saeki, T., Hiyama, K., Takashima, S., Shay, J. W., Matsuura, Y., and Yokoyama, T. (2000). Telomerase activity as a marker of breast carcinoma in fine-needle aspirated samples. *Cancer* 90, 235-238.
- Hiyama, E., Yokoyama, T., Tatsumoto, N., Hiyama, K., Imamura, Y., Murakami, Y., Kodama, T., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., and Matsuura, Y. (1995b). Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 55, 3258-3262.
- Hiyama, E., Hiyama, K., Tatsumoto, N., Kodama, T., Shay, J. W., and Yokoyama, T. (1996). Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol* 9, 453-458.

- Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., Ishioka, S., and Yamakido, M. (1995c). Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* *155*, 3711-3715.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., and Gelfand D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 7276-7280.
- Holt, S. E., Aisner, D. L., Baur, J., Tesmer, V. M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J. B., Morin, G. B., Toft, D. O., Shay, J. W., *et al.* (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* *13*, 817-826.
- Hsu, H. L., Gilley, D., Blackburn, E. H., and Chen, D. J. (1999). Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 12454-12458.
- Hsu, H. L., Gilley, D., Galande, S. A., Hande, M. P., Allen, B., Kim, S. H., Li, G. C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T., and Chen, D. J. (2000). Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev* *14*, 2807-2812.
- Humpl, T., and Gutjahr, P. (1999). Neuroblastome. In *Krebs bei Kindern und Jugendlichen-Klinik und Praxis der pädiatrischen Onkologie*. P. Gutjahr, ed. (Köln, Deutscher Ärzte-Verlag GmbH), pp. 388-408.
- Igarashi, H., and Sakaguchi, N. (1996). Telomerase activity is induced by the stimulation to antigen receptor in human peripheral lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* *219*, 649-655.
- Igarashi, H., and Sakaguchi, N. (1997). Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood* *89*, 1299-1307.
- Ishibashi, T., and Lippard, S. J. (1998). Telomere loss in cells treated with cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 4219-4223.
- Iwama, H., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J. H., Hayashi, S., Kawakubo, K., Shay, J. W., and Toyama, K. (1997). The relationship between telomere length and therapy-associated cytogenetic responses in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer* *79*, 1552-1560.
- Kakeji, Y., Maehara, Y., Koga, T., Shibahara, K., Kabashima, A., Tokunaga, E., and Sugimachi, K. (2001). Gastric cancer with high telomerase activity shows rapid development and invasiveness. *Oncol Rep* *8*, 107-110.
- Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* *295*, 2446-2449.
- Keith, N. W., Evans, T. R., and Glasspool, R. M. (2001). Telomerase and cancer: time to move from a promising target to a clinical reality. *J Pathol* *195*, 404-414.
- Kilian, A., Bowtell, D. D., Abud, H. E., Hime, G. R., Venter, D. J., Keese, P. K., Duncan, E. L., Reddel, R. R., and Jefferson, R. A. (1997). Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* *6*, 2011-2019.
- Kim, M. M., Rivera, M. A., Botchkina, I. L., Shalaby, R., Thor, A. D., and Blackburn, E. H. (2001). A low threshold level of expression of mutant-template telomerase RNA inhibits human tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7982-7987.
- Kim, M. Y., Vankayalapati, H., Shin-Ya, K., Wierzba, K., and Hurley, L. H. (2002). Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. *J Am Chem Soc* *124*, 2098-2099.
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* *266*, 2011-2015.

- Kim, S. H., Kaminker, P., and Campisi, J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* 23, 405-412.
- Kinoshita, H., Ogawa, O., Kakehi, Y., Mishina, M., Mitsumori, K., Itoh, N., Yamada, H., Terachi, T., and Yoshida, O. (1997). Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 89, 724-730.
- Kleideiter, E., Friedrich, U., Möhring, A., Walker, S., Höring, E., Maier, K.-E., Fritz, P., and Klotz, U. (2002). Telomerase activity in chronic inflammatory bowel disease (IBD). *Eur J Clin Pharmacol* 58 (7), S80.
- Koeppel, F., Riou, J. F., Laoui, A., Mailliet, P., Arimondo, P. B., Labit, D., Petitgenet, O., Helene, C., and Mergny, J. L. (2001). Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes. *Nucleic Acids Res* 29, 1087-1096.
- Kondo, S., Kondo, Y., Li, G., Silverman, R. H., and Cowell, J. K. (1998a). Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA. *Oncogene* 16, 3323-3330.
- Kondo, Y., Kondo, S., Tanaka, Y., Haqqi, T., Barna, B. P., and Cowell, J. K. (1998b). Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* 16, 2243-2248.
- Koscielniak, E., Harms, D., Henze, G., Jurgens, H., Gadner, H., Herbst, M., Klingebiel, T., Schmidt, B. F., Morgan, M., Knietig, R., and Treuner, J. (1999). Results of treatment for soft tissue sarcoma in childhood and adolescence: a final report of the German Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study CWS-86. *J Clin Oncol* 17, 3706-3719.
- Koscielniak, E., Morgan, M., and Treuner, J. (2002). Soft tissue sarcoma in children: prognosis and management. *Paediatr Drugs* 4, 21-28.
- Kurbacher, C. M., Bruckner, H. W., Cree, I. A., Kurbacher, J. A., Wilhelm, L., Poch, G., Indefrei, D., Mallmann, P., and Andreotti, P. E. (1997). Mitoxantrone combined with paclitaxel as salvage therapy für platinum-refractory ovarian cancer: laboratory study and clinical pilot trial. *Clin Cancer Res* 3, 1527-1533.
- Kyo, S., Takakura, M., Taira, T., Kanaya, T., Itoh, H., Yutsudo, M., Ariga, H., and Inoue, M. (2000). Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res* 28, 669-677.
- Lai, C. K., Mitchell, J. R., and Collins, K. (2001). RNA binding domain of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* 21, 990-1000.
- Langford, L. A., Piatyszek, M. A., Xu, R., Schold, S. C., Jr., Wright, W. E., and Shay, J. W. (1997). Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Hum Pathol* 28, 416-420.
- Lee, L. G., Connell, C. R., and Bloch, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21, 3761-3766.
- Li, B., Oestreich, S., and de Lange, T. (2000a). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* 101, 471-483.
- Li, B., Yang, J., Andrews, C., Chen, Y. X., Toofanfard, P., Huang, R. W., Horvath, E., Chopra, H., Raza, A., and Preisler, H. D. (2000b). Telomerase activity in preleukemia and acute myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 36, 579-587.
- Ludwig, A., Saretzki, G., Holm, P. S., Tiemann, F., Lorenz, M., Emrich, T., Harley, C. B., and von Zglinicki, T. (2001). Ribozyme cleavage of telomerase mRNA sensitizes breast epithelial cells to inhibitors of topoisomerase. *Cancer Res* 61, 3053-3061.

- Malaska, J., Sklenickova, M., Krejci, K., Fajkusova, L., Bajer, M., Hrstkova, H., and Fajkus, J. (2000). Telomerase activity and expression and telomere analysis in situ in the course of treatment of childhood leukemias. *Blood Cells Mol Dis* 26, 534-539.
- Martens, U., and Lange, W. (2000). Telomerase-Hemmung. Ein neues therapeutisches Konzept in der Onkologie? *Arzneimitteltherapie* 12, 387-392.
- McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26, 234-282.
- Melana, S. M., Holland, J. F., and Pogo, B. G. (1998). Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Clin Cancer Res* 4, 693-696.
- Mergny, J. L., Mailliet, P., Lavelle, F., Riou, J. F., Laoui, A., and Helene, C. (1999). The development of telomerase inhibitors: the G-quartet approach. *Anticancer Drug Des* 14, 327-339.
- Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., *et al.* (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.
- Morin, G. B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59, 521-529.
- Morin, G. B. (1997). The implications of telomerase biochemistry for human disease. *Eur J Cancer* 33, 750-760.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., and Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)*n*, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6622-6626.
- Müller, H. J. (1938). The remaking of the chromosomes. *The Collecting Net* 13, 181-195.
- Murakami, J., Nagai, N., Shigemasa, K., and Ohama, K. (1999). Inhibition of telomerase activity and cell proliferation by a reverse transcriptase inhibitor in gynaecological cancer cell lines. *Eur J Cancer* 35, 1027-1034.
- Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., and Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959.
- Nakayama, J., Saito, M., Nakamura, H., Matsuura, A., and Ishikawa, F. (1997). TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* 88, 875-884.
- Norrback, K. F., Dahlenborg, K., Carlsson, R., and Roos, G. (1996). Telomerase activation in normal B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 88, 222-229.
- Norton, J. C., Piatyszek, M. A., Wright, W. E., Shay, J. W., and Corey, D. R. (1996). Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nat Biotechnol* 14, 615-619.
- Odagiri, E., Kanada, N., Jibiki, K., Demura, R., Aikawa, E., and Demura, H. (1994). Reduction of telomeric length and c-erbB-2 gene amplification in human breast cancer, fibroadenoma, and gynecomastia. Relationship to histologic grade and clinical parameters. *Cancer* 73, 2978-2984.
- Ohyashiki, J. H., Hayashi, S., Yahata, N., Iwama, H., Ando, K., Tauchi, T., and Ohyashiki, K. (2001). Impaired telomere regulation mechanism by TRF1 (telomere-binding protein), but not TRF2 expression, in acute leukemia cells. *Int J Oncol* 18, 593-598.
- Ohyashiki, J. H., Ohyashiki, K., Iwama, H., Hayashi, S., Toyama, K., and Shay, J. W. (1997). Clinical implications of telomerase activity levels in acute leukemia. *Clin Cancer Res* 3, 619-625.

- Okuda, K., Bardeguet, A., Gardner, J. P., Rodriguez, P., Ganesh, V., Kimura, M., Skurnick, J., Awad, G., and Aviv, A. (2002). Telomere length in the newborn. *Pediatr Res* 52, 377-381.
- Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41, 181-190.
- Pascolo, E., Wenz, C., Lingner, J., Huel, N., Priepke, H., Kauffmann, I., Garin-Chesa, P., Rettig, W. J., Damm, K., and Schnapp, A. (2002). Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *J Biol Chem* 277, 15566-15572.
- Poremba, C., Willenbring, H., Hero, B., Christiansen, H., Schafer, K. L., Brinkschmidt, C., Jurgens, H., Bocker, W., and Dockhorn-Dworniczak, B. (1999). Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis. *Ann Oncol* 10, 715-721.
- Ramirez, R. D., Wright, W. E., Shay, J. W., and Taylor, R. S. (1997). Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. *J Invest Dermatol* 108, 113-117.
- Read, M., Harrison, R. J., Romagnoli, B., Tanious, F. A., Gowan, S. H., Reszka, A. P., Wilson, W. D., Kelland, L. R., and Neidle, S. (2001). Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4844-4849.
- Reddel, R. R., Bryan, T. M., Colgin, L. M., Perrem, K. T., and Yeager, T. R. (2001). Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat Res* 155, 194-200.
- Reynolds, C. P., Zuo, J. J., Kim, N. W., Wang, H., Lukens, J. N., Matthay, K. K., and Seeger, R. C. (1997). Telomerase expression in primary neuroblastomas. *Eur J Cancer* 33, 1929-1931.
- Rezler, E. M., Bearss, D. J., and Hurley, L. H. (2003). Telomere inhibition and telomere disruption as processes for drug targeting. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 359-379.
- Riou, J. F., Guittat, L., Mailliet, P., Laoui, A., Renou, E., Petitgenet, O., Megnin-Chanet, F., Helene, C., and Mergny, J. L. (2002). Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2672-2677.
- Rohde, V., Sommerfeld, H. J., Sattler, H. P., and Wullich, B. (1998). [Telomerase in tumors: facts and perspectives]. *Urologe A* 37, 386-394.
- Samper, E., Goytisolo, F. A., Slijepcevic, P., van Buul, P. P., and Blasco, M. A. (2000). Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep* 1, 244-252.
- Sangiorgi, L., Gobbi, G. A., Lucarelli, E., Sartorio, S. M., Mordenti, M., Ghedini, I., Maini, V., Scrimieri, F., Reggiani, M., Bertoja, A. Z., *et al.* (2001). Presence of telomerase activity in different musculoskeletal tumor histotypes and correlation with aggressiveness. *Int J Cancer* 95, 156-161.
- Saretzki, G., Ludwig, A., von Zglinicki, T., and Runnebaum, I. B. (2001). Ribozyme-mediated telomerase inhibition induces immediate cell loss but not telomere shortening in ovarian cancer cells. *Cancer Gene Ther* 8, 827-834.
- Scheel, C., Schaefer, K. L., Jauch, A., Keller, M., Wai, D., Brinkschmidt, C., van Valen, F., Boecker, W., Dockhorn-Dworniczak, B., and Poremba, C. (2001). Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas. *Oncogene* 20, 3835-3844.
- Schmidt, D., and Harms, D. (1990). The applicability of immunohistochemistry in the diagnosis and differential diagnosis of malignant soft tissue tumors. A reevaluation based on the material of the Kiel Pediatric Tumor Registry. *Klin Padiatr* 202, 224-229.
- Schnapp, G., Rodi, H. P., Rettig, W. J., Schnapp, A., and Damm, K. (1998). One-step affinity purification protocol for human telomerase. *Nucleic Acids Res* 26, 3311-3313.

- Schneider-Stock, R., Epplen, C., Radig, K., Oda, Y., Dralle, H., Hoang-Vu, C., Epplen, J. T., and Roessner, A. (1998). On telomere shortening in soft-tissue tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* *124*, 165-171.
- Schneider-Stock, R., Rys, J., Jaeger, V., Niezabitowski, A., Kruczak, A., Sokolowski, A., and Roessner, A. (1999). Prognostic significance of telomerase activity in soft tissue sarcomas. *Int J Oncol* *15*, 775-780.
- Scholl, F. A., Betts, D. R., Niggli, F. K., and Schafer, B. W. (2000). Molecular features of a human rhabdomyosarcoma cell line with spontaneous metastatic progression. *Br J Cancer* *82*, 1239-1245.
- Shay, J. W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* *33*, 787-791.
- Shay, J. W., Werbin, H., and Wright, W. E. (1996). Telomeres and telomerase in human leukemias. *Leukemia* *10*, 1255-1261.
- Shay, J. W., and Wright, W. E. (2001). Aging. When do telomeres matter? *Science* *291*, 839-840.
- Shirotani, Y., Hiyama, K., Ishioka, S., Inyaku, K., Awaya, Y., Yonehara, S., Yoshida, Y., Inai, K., Hiyama, E., Hasegawa, K., and et al. (1994). Alteration in length of telomeric repeats in lung cancer. *Lung Cancer* *11*, 29-41.
- Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A., and de Lange, T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* *282*, 1484-1487.
- Strahl, C., and Blackburn, E. H. (1996). Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol* *16*, 53-65.
- Takakura, M., Kyo, S., Kanaya, T., Tanaka, M., and Inoue, M. (1998). Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res* *58*, 1558-1561.
- Takauchi, K., Tashiro, S., Ohtaki, M., and Kamada, N. (1994). Telomere reduction of specific chromosome translocation in acute myelocytic leukemia. *Jpn J Cancer Res* *85*, 127-130.
- Tatsumoto, N., Hiyama, E., Murakami, Y., Imamura, Y., Shay, J. W., Matsuura, Y., and Yokoyama, T. (2000). High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* *6*, 2696-2701.
- Ulaner, G. A., and Giudice, L. C. (1997). Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. *Mol Hum Reprod* *3*, 769-773.
- Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H., Giudice, L. C., and Hoffman, A. R. (1998). Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* *58*, 4168-4172.
- Ulaner, G. A., Huang, H. Y., Otero, J., Zhao, Z., Ben-Porat, L., Satagopan, J. M., Gorlick, R., Meyers, P., Healey, J. H., Huvos, A. G., and et al. (2003). Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma. *Cancer Res* *63*, 1759-1763.
- Ullmann, T. A. (2002). Cancer in inflammatory bowel disease. *Curr Treatm Options Gastroenterol* *5*, 163-171.
- Unate, H., Ikeguchi, M., Kaibara, N., Okamura, D., Nishihara, S., Katoh, M., and Oshimura, M. (1998). Telomerase activity and microsatellite instability in colorectal cancer and adenoma. *Int J Oncol* *13*, 1223-1228.
- Usselman, B., Newbold, M., Morris, A. G., and Nwokolo, C. U. (2001). Deficiency of colonic telomerase in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* *96*, 1106-1112.

- van Steensel, B., and de Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385, 740-743.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.
- Vaziri, H., and Benchimol, S. (1996). From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol* 31, 295-301.
- Versteeg, I., Sevenet, N., Lange, J., Rousseau-Merck, M. F., Ambros, P., Handgretinger, R., Aurias, A., and Delattre, O. (1998). Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394, 203-206.
- Verstovsek, S., Manshouri, T., Smith, F. O., Giles, F. J., Cortes, J., Estey, E., Kantarjian, H., Keating, M., Jeha, S., and Albitar, M. (2003). Telomerase activity is prognostic in pediatric patients with acute myeloid leukemia: comparison with adult acute myeloid leukemia. *Cancer* 97, 2212-2217.
- Wainwright, L. J., Middleton, P. G., and Rees, J. L. (1995). Changes in mean telomere length in basal cell carcinomas of the skin. *Genes Chromosomes Cancer* 12, 45-49.
- Wang, S. S., and Zakian, V. A. (1990). Telomere-telomere recombination provides an express pathway for telomere acquisition. *Nature* 345, 456-458.
- Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239, 197-201.
- Weinrich, S. L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V. M., Holt, S. E., Bodnar, A. G., Lichtsteiner, S., Kim, N. W., Trager, J. B., *et al.* (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* 17, 498-502.
- Weng, N. P., Hathcock, K. S., and Hodes, R. J. (1998). Regulation of telomere length and telomerase in T and B cells: a mechanism for maintaining replicative potential. *Immunity* 9, 151-157.
- Wick, M., Zubov, D., and Hagen, G. (1999). Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 232, 97-106.
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., and Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18, 173-179.
- Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D., and Shay, J. W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* 11, 2801-2809.
- Wu, A., Ichihashi, M., and Ueda, M. (1999a). Correlation of the expression of human telomerase subunits with telomerase activity in normal skin and skin tumors. *Cancer* 86, 2038-2044.
- Wu, K. J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J., and Dalla-Favera, R. (1999b). Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* 21, 220-224.
- Xu, D., Gruber, A., Peterson, C., and Pisa, P. (1998). Telomerase activity and the expression of telomerase components in acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 102, 1367-1375.
- Yamada, O., Oshimi, K., Motoji, T., and Mizoguchi, H. (1995). Telomeric DNA in normal and leukemic blood cells. *J Clin Invest* 95, 1117-1123.
- Yan, P., Benhattar, J., Coindre, J. M., and Guillou, L. (2002). Telomerase activity and hTERT mRNA expression can be heterogeneous and does not correlate with telomere length in soft tissue sarcomas. *Int J Cancer* 98, 851-856.
- Yan, P., Coindre, J. M., Benhattar, J., Bosman, F. T., and Guillou, L. (1999a). Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in soft tissue tumors: correlation with grade, histology, and proliferative activity. *Cancer Res* 59, 3166-3170.

Yan, P., Saraga, E. P., Bouzourene, H., Bosman, F. T., and Benhattar, J. (1999b). Telomerase activation in colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 189, 207-212.

Yi, X., White, D. M., Aisner, D. L., Baur, J. A., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2000). An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity. *Neoplasia* 2, 433-440.

Yoo, J., and Robinson, R. A. (2000). Expression of telomerase activity and telomerase RNA in human soft tissue sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* 124, 393-397.

Yoshida, K., Sugino, T., Goodison, S., Warren, B. F., Nolan, D., Wadsworth, S., Mortensen, N. J., Toge, T., Tahara, E., and Tarin, D. (1997). Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells in colonic luminal washings and its related clinical implications. *Br J Cancer* 75, 548-553.

Zhang, W., Piatyszek, M. A., Kobayashi, T., Estey, E., Andreeff, M., Deisseroth, A. B., Wright, W. E., and Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human acute myelogenous leukemia: inhibition of telomerase activity by differentiation-inducing agents. *Clin Cancer Res* 2, 799-803.

Zhu, L., Smith, S., de Lange, T., and Seldin, M. F. (1999). Chromosomal mapping of the tankyrase gene in human and mouse. *Genomics* 57, 320-321.

Eigene Veröffentlichungen

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden/werden veröffentlicht in:

Kleideiter, E., Schwab, M., Friedrich, U., Koscielniak, E., Schäfer, B. W., and Klotz, U. Telomerase activity in cell lines of pediatric soft tissue sarcomas. *Pediatr Res* (in press).

Abstracts:

Kleideiter, E., Friedrich, U., Möhring, A., Walker, S., Höring, E., Maier, K.-E., Fritz, P., and Klotz, U. (2002). Telomerase activity in chronic inflammatory bowel disease (IBD). *Eur J Clin Pharmacol* 58 (7), S80.

Kleideiter, E., Schwab, M., Friedrich, U., Koscielniak, E., Schäfer, B. W., and Klotz, U. (2002) Telomerase activity as a potential marker for clinical outcome in juvenile soft tissue sarcomas (STS). *Eur J Clin Pharmacol* 58 (7), S81.

Kleideiter, E., Bangerter, U., Schwab, M., Niethammer, D., Greil, J., and Klotz, U. (2003). Telomeres and telomerase in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). In European Collaboration: Towards drug development and rational drug therapy. The Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics Istanbul, June 24-28, 2003. F. C. Tulunay, and M. Orne, eds. (Berlin/ Heidelberg/ New York, Springer-Verlag), p. 96.

Kleideiter, E., Bangerter, U., Schwab, M., Niethammer, D., Klotz, U., and Greil, J. (2003). Expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) and telomere length in acute lymphoblastic leukaemia. *Klin Pädiatr* 215, 194.

Weitere Veröffentlichungen:

Krump-Konvalinkova, V., Kleideiter, E., Friedrich, U., Klotz, U., and Kirkpatrick, C. J. (2003). Tumorigenic conversion of endothelial cells. *Exp Mol Pathol* (in press).

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis Juli 2003 am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Klotz angefertigt und von Herrn Prof. Dr. H. P. T. Ammon von der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen betreut.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Klotz für die Überlassung des interessanten Themas. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie seine ständige Bereitschaft, rasch und unkompliziert Hilfestellungen zu leisten, haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. H. P. T. Ammon bedanke ich mich für seine Bereitschaft und Interesse, die Arbeit von Seiten der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. M. Eichelbaum danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem technisch hervorragend ausgestatteten Institut anfertigen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt den „Telomerologen“: Frau Dr. U. Friedrich danke ich besonders herzlich für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken sowie ihre außerordentlich engagierte Betreuung zu Beginn meiner Promotionszeit. Bei Frau A. Möhring bedanke ich mich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und wertvollen Diskussionen. Als technische Mitarbeiterin stand mir in erster Linie Frau D. Weller zur Seite, der ich besonders herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor danke.

An dieser Stelle bedanke ich mich bei Herrn Dr. M. Schwab, der durch den Aufbau klinischer Kooperationsprojekte einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat.

Herrn Dr. P. Fritz danke ich sowohl für seine motivierende Begeisterung und engagierte Unterstützung für dieses Projekt als auch für die Auswertung der histologischen Untersuchungen.

Ferner möchte ich mich bei Frau K. Gawronski für die Durchführung der HE-Färbung der Gewebeschnitte bedanken.

Frau PD Dr. E. Koscielniak, Frau K. Simon-Klingenstein (Olgahospital, Stuttgart) sowie Herrn PD Dr. B. W. Schäfer (Universitäts-Kinderklinik, Zürich) danke ich für die zur Verfügung gestellten WTS-Zelllinien und das entsprechende Probenmaterial.

Frau Dr. Adolph (Institut für Klinische Genetik, Stuttgart) danke ich für die Chromosomenanalyse der WTS-Zellen.

Bei Herrn Dr. A. Londoño-Vallejo (INSERM, Paris, Frankreich) möchte ich mich recht herzlich für die Durchführung der Q-FISH-Analyse bedanken.

Ich danke Herrn PD Dr. J. Greil und Frau Dr. U. Bangerter von der Universitäts-Kinderklinik in Tübingen für die Überlassung des Probenmaterials und die gute Zusammenarbeit im Rahmen des T-ALL-Projekts.

Frau PD Dr. P. Boukamp und Herrn H. Stammer (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ, Heidelberg) danke ich für die Durchführung des radioaktiven TRAP-Assays. Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau PD Dr. P. Boukamp für ihre hilfreichen Diskussionen und ihre unkomplizierte und rasche Unterstützung bei aufgetretenen Problemen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. S. Walker (Krankenhaus Bietigheim), Herrn Dr. E. Höring (gastro-onkologische Praxis, Stuttgart), Herrn Dr. K. Maier (Krankenhaus Bad Cannstatt) und Herrn Prof. K.-P. Thon (Robert Bosch Krankenhaus, Stuttgart) bedanke ich mich für die Sammlung der Kolon-Biopsieproben.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Dr. van der Kuip für seine intensive Unterstützung im Rahmen der zellbiologischen Arbeiten und für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen. Bei Herrn Dr. U. Griese bedanke ich mich für viele hilfreiche Ratschläge und Tipps zur Lösung molekularbiologischer Probleme.

Bei Frau Dr. M. Buck und Herrn Dr. H. van der Kuip möchte ich mich für das hilfreiche Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Herrn B. Borstel danke ich für die mir entgegengebrachte Hilfe bei der Lösung vieler aufgetretener Computerprobleme.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Der Robert Bosch Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich mich sehr herzlich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken, die mich während meines Studiums und der Anfertigung der Dissertation stets unterstützt haben.

Liste der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren neben Herrn Prof. Dr. U. Klotz (Stuttgart) und Herrn Prof. Dr. H. P. T. Ammon (Tübingen) die Herren Professoren:

G. Blaschke, Münster

H. Glasl, Münster

R. Gröning, Münster

A. Nahrstedt, Münster

P. Rohdewald, Münster

B. Unterhalt, Münster

E. Verspohl, Münster

Lebenslauf

Persönliches:	Elke Kleideiter geboren am 24.01.1974 in Coesfeld
Schulausbildung:	
1980 - 1984	St.-Ludgerus-Grundschule, Coesfeld
1984 - 1993	Gymnasium Nepomucenum, Coesfeld Abschluss: Abitur
Berufsausbildung:	
04/1994 – 10/1998	Pharmaziestudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
03/1996	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/1998	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
1998 – 1999	Pharmaziepraktikum:
11/1998 – 04/1999	Apotheke der Kliniken des Landkreises Heidenheim
05/1999 – 10/1999	Gerburgis-Apotheke, Nottuln
11/1999	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
12/1999	Erteilung der Approbation als Apothekerin
seit 01/2000	Anfertigung der Dissertation am Dr. Margarete Fischer-Bosch- Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart
12/2002	Scholar-in-Training Award: Kleideiter, E. et al.: "Telomerase activity as prognostic marker in pediatric soft tissue sarcomas" AACR (American Association for Cancer Research) Special Conference in Cancer Research, "The Role of Telomeres and Telomerase in Cancer", San Francisco, USA (A40)
01/2000 – 06/2003	Stipendiatin der Robert Bosch Stiftung