Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Zentrums für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Direktor: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

Einfluss der Telomeraseinhibition auf die Proliferation von humanen Hepatomazellen und Telomerase-immortalisierten fetalen Hepatozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Sebastian Diedrich

aus Hamburg

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: **11.08.2009**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jörg Petersen

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: **Prof. Dr. Johannes Herkel**

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Jörg-Matthias Pollok

WIDMUNG

Meinen Eltern für Geduld und Vertrauen

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	3
TABELLENVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
HYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	5

	······································
1.1. Telomerbiologie	6
1.1.1. Telomere	6
1.1.2. Telomerase	8
1.1.3. Rolle der Telomerase in der Hepatokarzinogenese	10
1.2. TELOMERE UND TELOMERASE ALS ANGRIFFSPUNKTE FÜR ANTIPROLIFERA	TIVE THERAPIEN12
1.2.1. Ansätze zur Inhibition der Telomerase	

6

1 FINI FITUNC

2.2.2.3.2	cDNA-Synthese	
2.2.2.3.3	Real-time TaqMan® PCR	
2.2.2.3.4	Auswertung der Real-time TaqMan® PCR	
2.3. STATISTISCHE AUSWERTUNG		

3. ERGEBNISSE
3.1. BEHANDLUNG DER ZELLLINIEN MIT TELOMERASEINHIBITOR <u>BIBR 1532</u>
3.1.1. Bestimmung der Telomeraseaktivität (SYBR Green RQ-TRAP)
3.1.2. Telomerverkürzung (Flow-FISH)
3.1.3. Zellzyklusanalyse (FACS)
3.1.4. Zellproliferation
3.1.5. Expression von hTERT und TRF247
3.1.6. Änderungen in der Expression hepatozytenspezifischer Gene

4. DISKUSSI	ION	49
4.1. Ausv	WAHL DER METHODE ZUR TELOMERASEINHIBITION	49
4.2. Wirk	KSAMKEITSNACHWEIS FÜR BIBR 1532	
4.3. Expr	RESSION VON HTERT UND TRF2	
4.4. Anai	LYSE DES ZELLZYKLUSSES UND DER PROLIFERATION	53
4.5. Gene	EXPRESSION	
4.6. Kree	BSTHERAPIE MITTELS TELOMERASEINHIBITION	
4.7. Risik	ken durch den Einsatz von Telomeraseinhibitoren	
4.8. Resü	ĴMEE	60
4.9. Ausb	BLICK	61

5. ZUSAM	MENFASSUNG	

6. LITERATURVERZEICHNIS	••••••	 63

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung	1:	Schematische Darstellung der Telomerverlängerung	9
Abbildung	2:	CellTiter 96 [®] – Optimierung der anfänglichen Zellzahl	22
Abbildung	3:	Zellzyklus-Histogramm von HuH7 Zellen	24
Abbildung	4:	RQ-TRAP Standards	28
Abbildung	5:	Hemmung der Telomeraseaktivität durch BIBR 1532	39
Abbildung	6:	Telomerverkürzung pro Populationsverdoppelung	41
Abbildung	7:	Zellzyklusanalyse von HuH7, HepG2 und FH-hTERT Zellen	44
Abbildung	8:	Proliferation von HuH7, HepG2 und FH-hTERT Zellen	46
Abbildung	9:	Relative Genexpression von hTERT und TRF2	47
Abbildung 1	10:	Relative Expression hepatozytenspezifischer Gene	48

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle	1:	Experimentelle Ansätze zur Telomeraseinhibition	16
Tabelle	2:	Übersicht der durchgeführten Versuche	20
Tabelle	3:	Cycling Parameter SYBR Green RQ-TRAP	27
Tabelle	4:	Zusammensetzung des Master-Mix für die cDNA-Synthese	30
Tabelle	5:	Primer- und Sondensequenzen für die untersuchten Gene	33
Tabelle	6:	Zusammensetzung des Master-Mix für die RT-PCR	35
Tabelle	7:	Cycling Parameter der RT-PCR	35
Tabelle	8:	Telomeraseinhibition im zellfreien System	39
Tabelle	9:	Relative hTERT Expression nach Transfektion mit Qiagen siRNA	40
Tabelle	10:	Telomerverkürzung pro Populationsverdoppelung	42

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALT	ALT-Mechanismus – Alternativer Weg der Telomerverlängerung
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct	Ct-Wert – Schwellenwert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
HAT	humanes Antitrypsin
HNF-4α	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha
HSA	humanes Serumalbumin
HTF	humanes Transferrin
mRNA	Messenger RNA
ODN	Oligodesoxynukleotide
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PD	Population doubling – Populationsverdoppelung
PES	Phenazin-Enthosulfat
PSA	Penicillin + Streptomycin + Amphotericin B
PTGS	Post transcriptional gen silencing
Q-FISH	Quantitative-Fluoreszenz in situ Hybridisierung
RNA	Ribonukleinsäure
RISC	RNA induced silencing complex
RTA	Relative Telomeraseaktivität
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
RQ-TRAP	Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol
siRNA	Small interfering RNA
hTERC	humane Telomerase RNA Komponente
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
TRF	Telomeric repeat binding factor

Hypothese und Fragestellung

Telomeraseinhibition in Hepatomazellen

In präklinischen Studien zur Vorbereitung eines möglichen späteren klinischen Einsatzes bei der Behandlung des hepatozellulären Karzinoms wurden in den letzten Jahren die Telomerase von Hepatomazelllinien (HepG2, BEL-7404) *in vitro* inhibiert. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten unabhängig voneinander die Auswirkungen der Telomerasehemmung auf Zellzyklus, Zellproliferation und Gen-Expression.

In allen Arbeiten konnten eine Telomeraseinhibition und die damit verbundene Verkürzung der Telomere nachgewiesen werden. Die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin führte interessanterweise bereits nach 24h zu einer 40% igen Inhibition der Zellproliferation und einer Akkumulation der Zellen in der G₂/M-Phase (Zhang *et al.*, 2002). Mit Tamoxifen behandelte HepG2 Zellen zeigten einen Proliferationsstopp und die Apoptose von Zellen nach nur 48-72h. (Brandt *et al.*, 2005). Ein Antisense-Oligonukleotid gegen hTERT bewirkte bei HepG2 Zellen eine deutliche Hemmung der Zellteilung nach ca. 72h (Liu *et al.*, 2004).

Fragestellung

Die oben zusammengefassten Ergebnisse zeigen einen raschen Proliferationsarrest nach Telomeraseinhibition in Hepatomazelllinien. Dieser plötzliche Eintritt der Zellen in die Seneszenz bzw. das Absterben der Zellen ist mit der beobachteten Telomerverkürzung und den telomerbiologischen Grundlagen nicht erklärbar. Nach 72h, d.h. nach drei Proliferationsverdoppelungen, kommt es zu einer Telomerverkürzung von max. 0,6 kb (Kilobasen), was alleine keinen Einfluss auf die Zellteilung nehmen würde. Dieses könnte auf einen möglichen Telomerlängen-unabhängigen Effekt der Telomeraseinhibition in Hepatomazelllinien hinweisen, wie dies auch für die Proliferation in anderen Zellsystemen gezeigt wurde (Smith *et al.*, 2003).

1. Einleitung

1.1. Telomerbiologie

1.1.1. Telomere

In eukaryotischen Zellen, somit auch beim Menschen, werden die Enden der linearen Chromosomen von den Telomeren gebildet. Der Begriff ist abgeleitet aus dem Griechischen $\tau \epsilon \lambda o \zeta$ (telos = Ende) und $\mu \epsilon \rho o \zeta$ (meros = Teil). Geprägt wurde er vom Genetiker und späteren Nobelpreisträger Hermann J. Müller im Jahre 1938. Bereits damals erkannte er, dass Telomere eine wichtige Funktion für die Stabilität von Chromosomen haben.

Die Telomere bestehen hauptsächlich aus einer sich hundert- bis tausendfach wiederholenden kurzen DNA-Sequenz und daran gebundener Proteine, insbesondere TRF1 (engl.: telemoric repeat binding factor-1) und TRF2 (Blackburn, 1991; Zakian, 1995). Zusammen bilden sie einen Nukleoproteinkomplex, der das Chromosomenende aufrollt und zur so genannten "loop structure" führt. Diese nicht-kodierenden molekularen Kappen (Griffith *et al.*, 1999) schützen die kodierenden Bereiche des Chromosoms vor enzymatischer Degradation, Rekombination und Fusion. Hinzu kommt noch, dass die Zellen durch die Aufrollung der Telomere zwischen reparaturbedürftigen Doppelstrangbrüchen und natürlichen Chromosomenenden unterscheiden können (Shay and Wright, 2006).

Die Sequenz der sich wiederholenden DNA unterscheidet sich stark von Spezies zu Spezies (Blackburn, 2000; de Lange, 2002). Im Jahre 1988 gelang es Robert Moyzis und seinen Mitarbeitern, die aus 6 Basen bestehende menschliche Telomersequenz – 5'-TTAGGG-3' – zu identifizieren (Moyzis *et al.*, 1988). Im Gegensatz zum Menschen mit seinen einigen tausenden Wiederholungen dieses Hexanukleotids findet man zum Beispiel bei einigen Mausarten ein Vielfaches dieser Länge. Außerdem ergaben weitere Forschungen, dass die Länge der Telomere auch innerhalb einer Art oder eines Gewebes deutliche Unterschiede aufweisen kann (Martens *et al.*, 1998).

Noch zu Beginn des 20. Jahrhunderts glaubte man, dass die somatischen Zellen von Vertebraten eine unbegrenzte Lebensspanne aufweisen. 1961 widersprachen Hayflick und Moorhead dieser Behauptung, da sie an Fibroblasten zeigen konnten, dass diese sich in Kultur nur für eine begrenzte Zeit teilen, bevor sie in Seneszenz (postmitotischer Ruhezustand mit Erhalt der Stoffwechselaktivität) gehen (Hayflick and Moorhead, 1961). Da jede Zellteilung zu einer Verkürzung der Telomere führt, wird irgendwann eine kritische Telomerlänge erreicht und die Chromosomenenden können nicht mehr zuverlässig stabilisiert und geschützt werden (Wright *et al.*, 1989; Levy *et al.*, 1992).

Begründet ist die Verkürzung der Telomere (beim Menschen 50 bis 200 Basenpaare pro Zellteilung) durch die semikonversative Replikation der DNA durch die Polymerase, die so zu einem replikationsassoziierten Verlust von schützender Telomer-DNA führt. Bei der Replikation entfernt die 5'-3' Exonuclease den RNA-Primer des komplementären Stranges der DNA und die DNA-Polymerase hat keine Möglichkeit mehr, die entstandene Lücke am Chromosomenende aufzufüllen. Calvin Harley beschrieb die replikationsabhängige Telomerverkürzung und die dadurch eingeschränkte Proliferationsfähigkeit von somatischen Zellen anschaulich als "mitotische Uhr" (Harley *et al.*, 1990).

Im Gegensatz zu normalen somatischen Zellen lässt sich in den meisten malignen Zellen und Keimbahnzellen eine konstante oder sich nur geringfügig ändernde Telomerlänge feststellen.

1.1.2. Telomerase

Die humane Telomerase besteht aus mehreren Komponenten, die einen Enzymkomplex bilden. Hierzu gehört eine RNA-Komponente (TERC, engl.: telomerase RNA component), die als Matrize für die Neusynthese von Telomersequenzen dient und die Bindung an das Chromosomenende ermöglicht (Feng *et al.*, 1995). Der zweite Teil des Komplexes wird durch eine Proteinkomponente (TERT, engl.: telomerase reverse transcriptase) gebildet, die entscheidend für die katalytische Aktivität des Enzyms ist und deren Expression in den meisten differenzierten humanen Zellen unterdrückt wird (Nakamura *et al.*, 1997).

Die Telomerase wirkt der Telomerverkürzung entgegen und ermöglicht der Zelle eine unbegrenzte Proliferation, wie zum Beispiel in Tumorzellen und Keimbahnzellen. Das Enzym selbst wurde erstmals im Jahre 1985 von Greider und Blackburn in Wimperntierchen nachgewiesen (Greider and Blackburn, 1985).

Die Verlängerung der Telomere geschieht nach folgendem Prinzip: Das Enzym hängt an den überhängenden G-reichen Einzelstrang TTAGGG-Repeats an, indem das freie 3'-Ende des Chromosoms an die RNA-Komponente der Telomerase bindet. Nach Translokation der Telomerase beginnt die Elongation erneut. Der C-reiche Strang am 5'- Ende wird durch die konventionelle DNA-Polymerase verlängert (Greider, 1996).

Während der Embryonalentwicklung des Menschen ist die Telomerase in allen Geweben aktiv und wird normalerweise zum Zeitpunkt der Geburt in den somatischen Zellen ausgeschaltet (Wright *et al.*, 1996; Ulaner and Giudice, 1997). Im Gegensatz dazu kann in mehr als 90% aller Tumore, unabhängig ihrer Art, eine hohe Aktivität des Enzyms Telomerase festgestellt werden (Shay and Bacchetti, 1997). Hierbei korreliert die starke Expression von TERT mit einer hohen Aktivität der Telomerase.



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Telomerverlängerung

Neue Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Regulation der Telomerlänge nicht immer von der Aktivität der Telomerase abhängig ist. Während 90% aller Malignome beim Menschen eine hohe Telomeraseaktivität aufweisen, stabilisieren die restlichen 10% ihre Chromosomenenden auf eine andere Art und Weise (Stewart, 2005). 1995 wurde dieser Telomerase-unabhängige Prozess als ALT-Mechanismus (engl.: alternative lengthening of telomeres) postuliert, der höchstwahrscheinlich auf Rekombination von Telomeren basiert (Rogan *et al.*, 1995; Dunham *et al.*, 2000). Dabei weisen die einzelnen Chromosomen dieser Zellen eine sehr heterogene Telomerlänge auf. Bei dem Osteosarkom ist dieser Mechanismus der Telomerverlängerung sehr häufig zu finden (Ulaner *et al.*, 2004).

1.1.3. Rolle der Telomerase in der Hepatokarzinogenese

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der fünfthäufigste bösartige Tumor in der männlichen Weltbevölkerung und macht fast sechs Prozent aller Krebserkrankungen aus. Jährlich kommt es zu über 550.000 neuen Fällen, davon etwa 50.000 in Europa. Die extrem hohe Letalität führt dazu, dass die meisten Patienten nach Diagnosestellung weniger als ein Jahr überleben und die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 6,5% liegt. Das HCC stellt bei Patienten mit kompensierter Leberzirrhose die häufigste Todesursache dar (Bosch *et al.*, 2004).

Die operative Tumorresektion oder die Lebertransplantation stellen zurzeit die einzigen Verfahren dar, mit denen eine verlässliche Heilung des hepatozellulären Karzinoms erzielt werden kann. Verfahren wie die transarterielle Chemoembolisation (TACE) und die Radiofrequenz-Thermoablation werden eingesetzt, um den Tumor bis zu einer eventuellen Lebertransplantation zu kontrollieren bzw. stehen als palliative Behandlungsmöglichkeiten bei Inoperabilität zur Verfügung (Llovet and Bruix, 2003; Mazzaferro *et al.*, 2004).

Die Telomere und die Telomerase scheinen eine duale Rolle in der Hepatokarzinogenese zu spielen (Hackett and Greider, 2002; Satyanarayana et al., 2004). Die kritische Verkürzung der Telomere führt zu instabilen Chromosomen mit vermehrten chromosomalen Aberrationen (Blasco et al., 1997; Rudolph et al., 1999). Diese chromosomale Instabilität fördert das Entstehen transformierter Zellen. Die Telomerverkürzung spielt somit vermutlich eine wichtige Rolle bei der malignen Entartung von Zellen. Eine Tumorprogression wäre aber ohne die Stabilisierung der Telomere nicht möglich, da sonst den Zellen der Proliferationsarrest oder die Apoptose drohen würde. Diese Stabilisierung wird überwiegend durch die Reaktivierung des Telomeraseenzyms erreicht und geschieht hauptsächlich durch eine gesteigerte

Expression von TERT. In seltenen Fällen wird eine Stabilisierung der Telomerlänge durch den ALT-Mechanismus gesichert.

Das Zusammenspiel von Telomerverkürzung und Reaktivierung der Telomeraseaktivität ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit maßgeblich an der Entstehung neuer Tumoren beteiligt. Die Bedeutung der Telomerase bei der Tumorprogression wurde von verschiedenen Autoren bereits beschrieben (DePinho, 2000; Rudolph *et al.*, 2001).

In kürzlich erschienenen Publikationen wird auch auf Telomerlängen-unabhängige Funktionen der Telomerase hingewiesen. Die Arbeit von Laura Smith zeigt zum Beispiel, dass die Telomeraseaktivität auch Einfluss auf die Expression von Genen hat, die für die Zellproliferation verantwortlich sind (Smith *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Zellen mit erhöhter Telomeraseaktivität eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion und oxitativem Stress aufweisen (Lee *et al.*, 2005).

Möglicherweise haben diese Telomerlängen-unabhängigen Funktionen ebenfalls eine Bedeutung in der Hepatokarzinogenese, wobei aktuell dazu keine aussagekräftigen Daten vorliegen.

1.2. Telomere und Telomerase als Angriffspunkte für antiproliferative Therapien

In der Hemmung der Telomerase bzw. in der direkten Destabilisierung der Telomerestruktur von Tumorzellen liegt ein interessanter Angriffspunkt für eine antiproliferative Therapie, da fast 90% aller Tumoren Telomerase positiv sind. In normalen somatischen Zellen lässt sich dagegen keine Aktivität nachweisen.

Tumorzellen zeigen eine gesteigerte Proliferation bei allerdings relativ kurzen Telomeren, die durch eine hohe Telomeraseaktivität stabilisiert und konstant gehalten werden. Eine universelle Hemmung der Telomerase würde die Tumorzellen in eine mitotische Krise führen und zwangsläufig im generalisierten Zelltod münden (Shay *et al.*, 2006). Normale somatische Zellen hingegen mit ihren langen Telomeren und einer geringen Proliferation würden kaum beeinträchtigt werden. Inwieweit Stammzellen durch diese Therapie geschädigt oder negativ beeinflusst würden, ist zu diesem Zeitpunkt noch unklar. Diese besitzen zwar relativ lange Telomere und teilen sich nur intermittierend, doch sollte sich herausstellen, dass die Telomerase noch Telomerlängen-unabhängige Funktionen besitzt, könnten auch Stammzellen Schaden nehmen.

Die wesentlichen theoretischen Voraussetzungen für den antiproliferativen Effekt einer Substanz, die gezielt die Telomerase inhibiert, wurden von Laura K. White *et al*, folgender Maßen definiert: Der Inhibitor sollte die Aktivität der Telomerase reduzieren, aber anfänglich keinen Effekt auf die Proliferation haben. Durch die Zugabe des Inhibitors sollte eine progressive Verkürzung der Telomere mit jeder Zellteilung erreicht werden und letztendlich Apoptose und Proliferationsarrest nach längerer Therapie zur Folge haben (White *et al.*, 2001). Der Zeitraum bis ein antiproliferativer Effekt sichtbar wird hängt dann direkt von der initialen Telomerlänge ab. Je länger die

anfänglichen Telomere, desto länger wird man auf einen antiproliferativen Effekt warten müssen.

1.2.1. Ansätze zur Inhibition der Telomerase

Auf der einen Seite gibt es einen gentechnischen Ansatz, in dem darauf abgezielt wird, die Bildung von essentiellen Bestandteilen des Telomerase Holoenzyms zu unterdrücken. Hierbei kommen kleine doppelsträngige RNAs zum Einsatz, im Weiteren als siRNAs (engl.: small interfering RNA) benannt. Diese neue revolutionäre Technik wurde zum allerersten Mal von Thomas Tuschl und seiner Arbeitsgruppe im Jahre 1999 beschrieben (Tuschl *et al.*, 1999). Mit ihr war es fortan möglich, einzelne Gene einer Zelle "auszuschalten". Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass die von dem jeweiligen Gen abgelesene mRNA mittels siRNA gebunden und danach von der Zelle abgebaut wird. Die siRNA ist dabei in ihrem Aufbau spiegelbildlich zu der mRNA.

Die z.B. über eine Transfektion in die Zelle eingebrachte siRNA aktiviert den zelleigenen RISC-Komplex (engl.: RNA-induced silencing complex). Dieser zerschneidet daraufhin die zu der siRNA komplementäre mRNA und verhindert damit die Synthese des Proteins. Dieser Abbau von bereits durch Transkription gebildeter mRNA wird als PTGS (engl.: post transcriptional gen silencing) bezeichnet. Dieser natürliche zelluläre Mechanismus wird unter anderem von den Zellen zur Abwehr von viraler RNA genutzt.

In einigen Zellkultur- und Mausexperimenten konnte durch den Einsatz von siRNA gegen TERT (de Souza *et al.*, 2006; Falchetti *et al.*, 2006) und TERC (Kosciolek *et al.*, 2003) eine Hemmung der Telomeraseaktivität erreicht werden und eine replikationsabhängige Telomerverkürzung mit Proliferationsarrest und abnehmendem Tumorwachstum gezeigt werden.

Ein zweiter viel versprechender Ansatz liegt in der kompetitven Hemmung der katalytischen Aktivität des Telomeraseenzyms. Hierbei erzielte man bis jetzt die meisten Ergebnisse mit der Einschleusung einer dominant-negativen TERT-Mutante in humane Telomerase-positive Tumorzellen (Hahn *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999), wobei neben der Telomerverkürzung auch Seneszenz und Apoptose in Zellkultur beobachtet werden konnten.

In neueren Studien zeigten sich *small-molecule* Inhibitoren, wie der Inhibitor BIBR 1532 von Boehringer Ingelheim, und das blockierende Oligonukleotid GRN163L der Firma Geron Corporation als sehr wirkungsvoll (Damm et al., 2001; Hochreiter et al., 2006). Beide Substanzen führten zu einer Verkürzung der Telomerlänge in Tumorzellen in vitro, mit anschließendem Proliferationsarrest und Zelltod. Auch in Experimenten mit Mäusen zeigten sich positive Ergebnisse. Der nicht-nukleosidische small-molecule Inhibitor BIBR 1532 hatte dabei keinen direkten Effekt auf das kurzzeitige Überleben oder Wachstum von Zellen. Er führte jedoch zu einer replikationsabhängigen Verkürzung der Telomere. die einer nach gewissen Anzahl an Populationsverdoppelungen im Proliferationsarrest mündete (Damm et al., 2001).

Die Arbeitsgruppe von Hesham El-Daly zeigte allerdings in Experimenten mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 und malignen Blutzellen, dass der Einsatz von sehr hohen Konzentrationen (ab 120 μ M) zu einer direkten toxischen Wirkung auf die Zellen führt. Erklärt wurde dieses Phänomen damit, dass bei sehr hohen Konzentrationen die Telomerstruktur direkt Schaden nehmen würde und zwar durch den Verlust von TRF2, das für die Stabilität der Telomere entscheidend ist. Gleichzeitig durchgeführte Experimente mit blutbildenden Stammzellen zeigten kaum eine Veränderung in ihrer Zellvitalität. Erst ab extrem hohen Konzentrationen von BIBR 1532 (> 160 μ M) kam es zu direkten Schäden an den Stammzellen (El-Daly *et al.*, 2005). In Studien zum Brustkrebs und Leukämien wurde der Einsatz von BIBR 1532 kombiniert mit einem

Chemotherapeutikum als Therapieansatz *in vitro* getestet. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz des Telomeraseinhibitors die Sensitivität in den Krebszellen gegenüber dem Chemotherapeutikum steigert. Dieser Effekt trat auch in Krebszellen auf, die schon Resistenzen gegen das Chemotherapeutikum gezeigt hatten (Ward and Autexier, 2005).

GRN163L (5'-L-TAGGGTTAGACAA) ist ein Antagonist der RNA-Matrize des Telomeraseenzyms und stellt eine Weiterentwicklung des nicht-konjungierten Oligonukleotids GRN163 dar, welches sich durch seinen angehängten Lipidrest (L = Aminoglycerol-palmitoyl) als deutlich wirksamer bei der Hemmung der Telomeraseaktivität erwies (Herbert et al., 2005). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass GRN163L das Tumorwachstum bei Brustkrebs und Lungentumoren deutlich reduziert oder sogar vollständig in vitro und in vivo unterdrücken kann. Dieses gilt auch für das Wachstum von bereits aufgetretenen Metastasen (Dikmen et al., 2005; Hochreiter et al., 2006). Die Zelllinie A549, die aus einem Andenokarzinom der Lunge abgeleitet wurde, zeigte schon nach wenigen Tagen Behandlung mit GRN163L in der Zellkultur eine Veränderung ihrer Morphologie und verlor weitestgehend ihre Adhäsionsfähigkeit. Dieses führte unabhängig von der Telomerlänge bereits nach kurzer Zeit zu einem Rückgang des Tumorwachstums in vitro (Jackson et al., 2007). Weitere Studien zeigen auch eine erhöhte Sensitivität von Hepatomazellen (Hep3B Zellen) gegenüber Doxorubicin, wenn sie gleichzeitig mit GRN163L behandelt werden (Djojosubroto et al., 2005).

Die Telomere könnte auch direkt als Angriffspunkt dienen: Der guaninreiche 3'-Überhang der Chromosomenenden bildet eine quartäre DNA-Struktur, die als G-Quadruplex bezeichnet wird. Durch diese G-Quadruplex Struktur wird der Zugang zum Telomerende blockiert und damit die Verlängerung der Telomere inhibiert. Dieses lässt

die Schlussfolgerung zu, dass Substanzen, die diese Struktur stabilisieren, auch einen antiproliferativen Effekt aufweisen könnten (Read *et al.*, 1999).

In den letzten Jahren wurden schließlich Daten veröffentlicht, die diesen neuen Therapieansatz untermauern. Dazu gehören unter anderem Arbeiten über die Substanzen Diaminoanthraquione, Fluoren-haltige Substanzen (Perry *et al.*, 1999) und Acridin (Harrison *et al.*, 1999). In einer aktuellen Arbeit konnte die Wirksamkeit der auf die G-Quadruplex Struktur wirkenden Substanz Telomestatin durch eine deutliche Reduktion des Tumorwachstums gezeigt werden (Tauchi *et al.*, 2006).

Wirkungsweise	Beispiele
Kompetitive Verdrängung der katalytischen Untereinheit	- dominant-negatives Konstrukt gegen hTERT
Blockierung der katalytischen Untereinheit	- small-molecule Inhibitor BIBR 1532 - methyl-RNA - GRN163L
Hemmung der Bildung von essentiellen Bestandteilen der Telomerase	- siRNA gegen hTERT - siRNA gegen hTERC
Stabilisierung der G-Quadruplex Struktur der Telomere	- Diaminoanthraquione - Acridin - Telomestatin
Hemmung der hTERT-Funktion	- Antisense-Oligodesoxynukleotide (ODN)

Tabelle 1: Experimentelle Ansätze zur Telomeraseinhibition

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

HuH7 Zellen

Die Zelllinie HuH7 wurden aus einem gut differenzierten hepatozellulären Karzinom eines 57 Jahre alten Japaners etabliert.

Die Zellreihe besitzt ein unbegrenztes Zellwachstum und es kommt ca. alle 36 h zu einer Populationsverdoppelung (Zellkultur bei 37°C und 5% CO₂).

Bei den Zellen sind ein Monolayer-Wachstum im serumfreien Medium und ein Multilayer-Wachstum im serumhaltigen Medium zu beobachten. Unter anderem werden folgende Plasmaproteine exprimiert: Albumin, Präalbumin, α_1 -Antitrypsin, Ceruloplasmin, Fibronogen, Fibronectin, Haptoglobin, Hemopexin, β -Lipoprotein, α_2 -Macroglobulin, β_2 -Microglobulin, Transferrin und α -Fetoprotein. Die Zelllinie ist Telomerase positiv. Die Länge der Telomere liegt bei ca. 24,9 kb (Nakabayashi *et al.*, 1982).

HepG2 Zellen

Die HepG2 Zellen stammen aus einem hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen Jugendlichen.

Die Zellreihe besitzt ein unbegrenztes Zellwachstum und es kommt ca. alle 48 h zu einer Populationsverdoppelung (Zellkultur bei 37°C und 5% CO₂).

Bei dieser Zellreihe ist ein Monolayer- und Multilayer-Wachstum bei Medium mit Serum zu beobachten. Unter anderem werden folgende Plasmaproteine exprimiert: α-Fetoprotein, Albumin, α_2 -Macroglobulin, α_1 -Antitrypsin, Transferrin, Haptoglobin, Ceruloplasmin, Plasminogen, Komplement C4, C3 Aktivator, Fibrinogen, β-Lipoprotein (Knowles *et al.*, 1980; Darlington *et al.*, 1987)

Die Zelllinie ist Telomerase positiv. Die Länge der Telomere liegt bei ca. 5 kb (Furuta *et al.*, 2003).

FH-hTERT Zellen

Bei den FH-hTERT Zellen handelt es sich um fetale Hepatozyten, die von einem menschlichen Feten im Rahmen einer elektiven Abtreibung in der 24. SSW isoliert wurden. Die proliferative Aktivität dieser Zellen lässt normalerweise nach einigen Monaten nach und die Zellen gehen in Seneszenz.

Durch die Reaktivierung der Telomerase wurden die Zellen immortalisiert. Dieses wurde durch ektope TERT Expression erreicht (Wege *et al.*, 2003b). Die Telomeraseaktivität ist bei diesen immortalisierten fetalen Hepatozyten (FH-hTERT) ca. 30-mal so hoch wie in HepG2 Zellen. Normale fetale Hepatozyten zeigen in Zellkultur keine Telomeraseaktivität. Die Telomerlänge liegt bei ca. 11,5 kb.

Die Zellreihe besitzt ein unbegrenztes Zellwachstum und es kommt ca. alle 24 h zu einer Populationsverdoppelung (Zellkultur bei 37°C und 5% CO₂). Die Zellen zeigen ein reines Monolayer-Wachstum.

Die transduzierten Zellen verhalten sich im Bezug auf ihr Differenzierungspotential genauso wie die normalen fetalen Hepatozyten. Eine maligne Transformation ließ sich nicht nachweisen (Haker *et al.*, 2007).

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung von Zelllinien (HuH7, HepG2 und FH-hTERT)

Die Zelllinien HuH7, HepG2 und FH-hTERT wurden in einem Brutschrank mit 5% CO₂-Atmosphäre, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 37°C inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde zwei- bis dreimal pro Woche gewechselt. Bei den HepG2 Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM von Invitrogen) mit 10% fetalem Kälberserum (FBS) und PSA (Penicillin 100 IU/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Amphotericin B 25 µg/ml) eingesetzt. Für die FH-hTERT Zellen wurden dem Medium noch Insulin (Sigma-Aldrich; 5 µg/ml) und Hydroxycortison (Sigma-Aldrich; 2,4 µg/ml) zugesetzt. Alle Zelllinien wurden in T75 (75 cm²)- oder T25 (25 cm²)-Flaschen im Brutschrank inkubiert. Das Passagieren der Zellen erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von 80-100%. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl.: phosphate buffered saline) gewaschen und anschließend mit 0,25% Trypsin – EDTA für 5 min bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von serumhaltigem Medium wurde die Trypsinaktivität gestoppt. Die Zellen wurden durch Pipettieren resuspendiert und schließlich in der gewünschten Dichte ausgesät. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop.

2.2.1.2. Behandlung der Zelllinien mit Telomeraseinhibitor BIBR 1532

Die verschiedenen Zelllinien wurden je nach Versuch in der gewünschten Dichte ausgesät und nach Adhärenz (ca. 24h später) mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 behandelt.

Die Gebrauchslösung von 1 mM des Inhibitors wurde nach Angaben des Herstellers aus der Stammlösung (100 mM in Dimethylsulfoxid) angesetzt: Hierzu wurden 5 μ l der Stammlösung mit 500 μ l DMEM Medium verdünnt. Diese Gebrauchslösung ist mindestens 7 Tage bei 4°C haltbar. Für die Versuche wurde die Gebrauchslösung mit dem jeweiligen Kulturmedium im Verhältnis 1:100 weiter verdünnt. Die Endkonzentration während der Kultivierung lag dann bei 10 μ M und 0,01% Dimethylsulfid (DMSO). Diese Konzentration wurde gewählt, da sich bereits in Zellkulturexperimenten mit anderen Krebszellen eine Inhibition der Telomerase bei 10 μ M zeigen ließ (Damm *et al.*, 2001). Neben der Inkubation mit dem Inhibitor wurden Kontrollen mit 0,01% DMSO-haltigen Kulturmedium für 4-16 Tage kultiviert.

In der Tabelle 2 sind die verschiedenen Versuche und die jeweiligen Inkubationszeiten aufgeführt. Die Konzentration des Inhibitors betrug bei allen Versuchen 10 μ M.

Versuch	Konzentration	Zeitraum der Inkubation
Zellzyklusanalyse	10 µM	
HuH7, HepG2, FH-hTERT		4 Tage
Telomerlänge	10 µM	
HuH7		16 Tage
HepG2		11 Tage
FH-hTERT		10 Tage
Proliferation	10 µM	
HuH7, HepG2, FH-hTERT		10 Tage
Gen-Expression	10 µM	
HuH7		16 Tage
HepG2		11 Tage
FH-hTERT		6 Tage

Tabelle 2: Übersicht über die mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 durchgeführten Versuche

2.2.1.3. Transfektion der Zelllinien mit einer siRNA gegen hTERT

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten mit einer Anzahl von 500.000 pro Well ausgesät. Einen Tag später (ca. 24h) wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. In jedes Well wurden 2 ml serumfreies Medium und die Transfektionslösung bestehend aus dem Transfektionsreagenz JetSI (Polyplus Transfektions) und einer gegen hTERT gerichteten siRNA (Qiagen) pipettiert. Die Transfektionslösung wurde zuvor folgender Maßen angesetzt: Es wurden 8,4 µl des Transfektionsreagenzes JetSI mit 100 µl serumfreie Medium vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µl oder 20 µl der siRNA (Konzentration 20 pmol/µl) hinzu gegeben und durch kurzes Vortexen vermischt. Danach folgte eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

200 μl dieser Transfektionslösung wurden dann in jedes Well pipettiert und die Zellen anschließend bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und 95% relativer Luftfeuchtigkeit für 4 Stunden inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden noch 2 ml Kulturmedium (20% FBS) in jedes Well pipettiert. Die weitere Analyse erfolgte 48h und 72h später.

2.2.1.4. Bestimmung der Zellproliferation (CellTiter 96[®])

Für die Bestimmung der Proliferation wurden 96-Well-Platten (0,3 cm²/Well) verwendet. Die anfängliche Zellzahl betrug bei allen Zelllinien 5.000 Zellen, in 100 μ l Medium pro Well. Diese anfängliche Zellzahl wurde bei Vorversuchen mit 1.000, 5.000 und 10.000 Zellen pro Well ermittelt. Die Abbildung 2 zeigt das Zellwachstum von HepG2 Zellen bei einer anfänglichen Zellzahl von 5.000 pro Well innerhalb von 10 Tagen. Nach Adhärenz (ca. 24h) wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und pro Well 100 μ l neues Kulturmedium mit 10 μ M BIBR 1532 und 0,01% DMSO hinzu gegeben. Die Kontrollzellen wurden mit 0,01% DMSO-haltigen

Kulturmedium behandelt. Beide Medien wurden alle 3 Tage erneuert. Um die Zellproliferation in den nachfolgenden 10 Tagen überwachen zu können, wurde der CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) benutzt. Dieser Assay bietet eine photometrische Methode um die Anzahl der lebenden Zellen zu bestimmen. Er besteht aus einer Tetrazolium-Komponente, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS), und Phenazin-Enthosulfat (PES). Die MTS Komponente wird von lebenden Zellen reduziert und es entsteht das farbige Produkt Formazan. Formazan ist im Kulturmedium löslich. Der Umsatz wird vermutlich durch NADPH oder NADH, welches von den stoffwechselaktiven Zellen mittels ihres Dehydrogenaseenzyms produziert wird, erreicht.

An jedem Tag wurde in 8 Wells 20 µl der CellTiter 96[®]-Lösung mit Hilfe einer Multipipette hinzugeben und für eine Stunde im Brutschrank mit 5% CO₂-Atmosphäre, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 37°C inkubiert. Danach wurde direkt die optische Dichte bei 490 nm in einem Platten-Reader gemessen, wobei die Intensität der Farbentwicklung im direkten Verhältnis zur Anzahl der vitalen Zellen steht.



Abbildung 2: CellTiter 96[®]-Optimierung der anfänglichen Zellzahl. Bei Vorversuchen mit 1.000, 5.000 und 10.000 HepG2 Zellen pro Well, zeigte sich eine anfängliche Zellzahl von 5.000 Zellen pro Well als optimal für einen Beobachtungszeitraum von 10 Tagen.

2.2.1.5. Bestimmungen des Zellzyklus (FACS-Analyse)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS, engl.: fluorescence activated cell sorting) ist es möglich einzelne Zellen zu untersuchen. Durch Verwendung eines DNAspezifischen Farbstoffs kann der DNA-Gehalt einzelner Zellen bestimmt werden. Durch die Bestimmung des DNA-Gehalts können die Zellen den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zugeordnet und die Anzahl der Zellen in den einzelnen Phasen bestimmt werden. Während die Zellen in der G1-Phase einen einfachen DNA-Gehalt (diploid n=2) besitzen, verdoppelt sich dieser in der S-Phase und liegt schließlich in der G2bzw. M-Phase zweifach vor (tetraploid n=4).

Für die Erstellung eines solchen DNA-Histogramms sind ca. 1 Millionen Zellen nötig. In der Abbildung 3 sieht man beispielhaft ein Zellzyklus-Histogramm für HuH7 Zellen. Diese wurden zuerst mit Hilfe des *forward* und *side scatters* fokussiert und anschließend nach ihrem Propidium-Iodid-Gehalt aufgeteilt.

Vor der Analyse müssen die Zellen mit Propidium-Iodid (PI), einem Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis von DNA und RNA, markiert werden. Dazu wurden ca. 5 Millionen Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend zwei Stunden in eiskaltem (-20°C) Ethanol fixiert. Danach wurde das Ethanol durch Zentrifugation (500 g, 5min, 4°C), Absaugung und Waschung mit PBS entfernt.

Das entstandene Zellpellet wurde in 0,5 ml PI-Lösung (25 μ g/ml; Sigma-Aldrich), die auch RNase A (500 IU/ml; Sigma-Aldrich) enthielt, um eine mögliche Fluoreszenzentwicklung durch Bindung von PI an RNA zu verhindern, resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und 95% relativer Luftfeuchtigkeit, erfolgte die Zellzyklusanalyse im Durchflusszytometer (*FACSCanto*; BD Biosciences).



Abbildung 3: Zellzyklus-Histogramm von HuH7 Zellen, Propidium-Iodid gefärbt. Nach Fokussierung und Aufteilung der Zellen nach ihrem PI-Gehalt, werden die Ergebnisse in einem Histogramm dargestellt. Die Intensität der Fluoreszenz ist in der G2/M-Phase doppelt so groß wie in der G0/G1-Phase.

Mit der Analysesoftware *ModFit* (Verity Software House), die ein mathematisches Verfahren benutzt, um die Flächen unter den Kurven zu berechnen, wurden die DNA-Histogramme ausgewertet. Dabei handelt es sich um eine Anwender-unabhängige Methode.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Bestimmungen der Telomerlänge (Flow-FISH)

Beim Flow-FISH handelt es sich um eine Weiterentwicklung der in der Arbeitsgruppe von Peter Landsdorp (Lansdorp *et al.*, 1996) etablierten Q-FISH Methode (Quantitative-Fluoreszenz in situ Hybridisierung). Bei dieser Methode wird FISH mit einer Durchflusszytometrie kombiniert.

Beide Analysemethoden gelten als Alternative zur Southern Blot-Methode, mit der bis vor einigen Jahren die Telomerlängen-Messung humaner Zellen durchgeführt wurde (Oexle, 1998). Der Southern Blot erwies sich als sehr arbeitsintensiv und zeitaufwendig. Außerdem war es nicht möglich die Telomerlänge einzelner Zellen oder von Subpopulationen (Baerlocher *et al.*, 2002) von Zellen innerhalb einer Probe zu bestimmen. Zudem konnte die Telomerlänge nur annäherungsweise genau bestimmt werden (Murnane *et al.*, 1994). Auch die Menge der benötigten DNA (> 2 µg, d.h. > 5 x 10^5 Zellen) war beträchtlich.

Der Flow-FISH Methode liegt eine quantitative Hybridisierung der Telomer-DNA mit einer komplementären Telomer-spezifischen fluoreszenzmarkierten Peptid-Nukleinsäure (5'-[CCCTAA]_n-3') zugrunde (PNA-Sonde; engl.: peptide nucleotid acid) (Rufer *et al.*, 1998). Diese PNAs hybridisieren über Wasserstoffbrücken-vermittelte Basenpaarung und gehen dadurch eine sehr hitzestabile Bindung ein. Mittels Durchflusszytometrie lässt sich dann die telomerspezifische Fluoreszenz schnell und reproduzierbar messen. Die Fluoreszenz verhält sich dabei proportional zur Telomerlänge. Die Telomerlänge wird in kb (Kilobasen) angegeben. Für die Kalibrierung wurde die Länge von Kuhthymozyten im Southern Blot bestimmt und als positive Kontrolle in jedem Ansatz mitgemessen. Ein weiterer Vorteil der Flow-FISH gegenüber der Q-FISH besteht noch darin, dass die Telomersignale aller Chromosomenarme einer Zelle unabhängig vom Zellteilungs-Status gemessen werden können. Die benötigte Mindestanzahl von Zellen (10⁵ Zellen) liegt auch deutlich unter dem der Southern Blot-Methode.

Die Telomerlängen-Messung mittels Flow-FISH wurde in Kooperation mit Prof. Dr. med. Tim H. Brümmendorf, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

2.2.2.2. Bestimmung der Telomeraseaktivität (SYBR Green RQ-TRAP)

2.2.2.2.1. Gewinnung der Zellextrakte

Nach der Ernte und Zählung der Zellen wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen bei 3.000 g für 4 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert und abermals für 4 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet in 200 µl Lyse-Puffer (TRAPeze 1xCHAPS Lysis Buffer, Chemicon) resuspendiert. Dabei wird das komplette Zelllysat gewonnen, die RNA bleibt durch den Puffer intakt. Die Konzentration betrug 1000 Zellen pro µl.

Einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte die Zentrifugation bei 14.500 g für 4 min bei 4°C. Der Überstand (Zellextrakte) wurde dann auf drei Eppendorf-Röhrchen verteilt (50 µl pro Röhrchen). Schockgefroren sind die Proben bei -80°C für 12 Monate haltbar.

2.2.2.2.2. SYBR Green RQ-TRAP

Die relative Telomeraseaktivität (RTA) wurde mittels eines modifiziertem TRAP-Protokolls (engl.: telomeric repeat amplification protocol) bestimmt (Wege *et al.*, 2003a). Der SYBR Green RQ-TRAP Assay wurde mit dem Extrakt von 1000 Zellen, 160 ng des Telomerase Primers TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3', MWG), 80 ng des Anchorage Return Primers ACX (5'-GCGCGGCTTA65CCCTTACCCTTACCCTAACC-3', MWG) (Kim and Wu, 1997) und 20 μl SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) durchgeführt. Hierfür wurden 96-well Platten benutzt und die anschließende Messung der Proben erfolgte im ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems). Das Reaktionsvolumen betrug insgesamt 40 μl.

Im ersten Schritt des TRAP-Assays erfolgt die de novo Synthese der Telomersequenz. Hierzu nutzt das in den Zellextrakten enthaltene Holoenzym Telomerase den TS Primer (Elongation – siehe Abb. 1). Nach der Denaturierung lagert sich der rückwärtsgerichtete Primer ACX an das Telomerprodukt an. Im folgenden Schritt findet dann die Amplifikation mittels Taq-Polymerase statt (40 Zyklen). Bei jedem Zyklus wird SYBR Green in den Doppelstrang interkaliert und ermöglicht so indirekt die Telomeraseaktivität zu bestimmen, d.h. die Synthese von Telomersequenz pro Zeit.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
De novo Synthese der Telomersequenz	25	20:00
Aktivierung der Polymerase	95	10:00
Cycling (40x)		
Denaturierung	95	0:10
Annealing/Amplifikation	60	1:00

Tabelle 3: Cycling Parameter SYBR Green RQ-TRAP

Die gemessenen Werte wurden mit einer Standardkurve von 293T Zellen (siehe Abbildung 4), die Telomerase-positiv sind (1000, 500, 100, 50, 10, 0 Zellen), in Beziehung gesetzt und daraus die relative Telomeraseaktivität (RTA) ermittelt. Alle Proben wurden in Tripletts gemessen. Als Negativkontrollen dienten RNase-inaktivierte Proben und der Lyse-Puffer, die bei jeder Messung mitgeführt wurden.







Abbildung 4:

Die Abbildung zeigt die Standard- (A) und Amplifikationskurve (B) von 293T Zellen (1.000, 500, 100, 50 und 10), mit dessen Hilfe die relative Telomeraseaktivität (RTA) der Zellen bestimmt wurde.

2.2.2.3. Bestimmung der Gen-Expression (RT-PCR)

2.2.2.3.1. RNA-Isolierung und Bestimmung der RNA-Konzentration

Das Grundprinzip der RNA-Isolierung besteht darin, die Zellen zu lysieren und die Gesamt-RNA (rRNA, mRNA, tRNA und snRNA) aus den Zellen zu gewinnen. Auf einen RNase-freien Arbeitsplatz ist hierbei besonders zu achten.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Isolierung der RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) einschließlich eines DNase I-Verdaus nach Angaben des Herstellers. Zunächst wurde eine Lösung aus einem guanidin-thiocyanhaltigen-Puffer und β -Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1 (350 µl + 3,5 µl) hergestellt und diese nach Absaugen des Mediums und Waschung mit PBS auf die Zellen (5 Millionen) gegeben. Nach ca. 2 Minuten wurden die Zellen mit einem Schaber gelöst und in ein 2 ml-Röhrchen überführt. Dort wurden die Zellen mit einer Kanüle (0,9 mm Durchmesser) homogenisiert.

Nach Zugabe von 350 µl 70%igen Ethanol, der die geeigneten Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silica-Gel-Membran gewährleistet, wurde die Probe mehrmals mit Pufferlösungen (RW1 und RPE) gewaschen. Um die RNA von genomischer DNA zu reinigen, wurde ein DNase I-Verdau durchgeführt und schließlich die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (260/280 nm). Bis zur weiteren Verwendung wurden die verschiedenen Proben bei -80°C gelagert.

2.2.2.3.2. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des Thermoscript RT-Kit (Invitrogen), indem mRNA als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese diente. Dazu wurde jeder Probe

(1 µg Gesamt-RNA) RNase-freies Wasser hinzugegeben, bis ein Endvolumen von 10 µl erreicht war. Nach Zugabe von 1 µl oligo $(dT)_{20}$ -Primer, wurde die Probe 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt.

Hinterher wurden 9 µl Master-Mix (siehe Tab. 4) hinzugefügt und die cDNA-Synthese erfolgte bei 55°C für 45 min und nachfolgender Terminierung bei 85°C für 5 min im Thermocycler.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

Master-Mix				
Reagenz	µl pro Ansatz			
5xcDNA Synthesis Buffer	4			
0,1 M DTT	1			
RNaseOUT (40 U/µl)	1			
10 mM dNTP Mix	2			
ThermoScript RT (15 U/μl)	1			

 Tabelle 4:
 Zusammensetzung des Master-Mix für die cDNA-Synthese

 (DTT: Dithiothreitol, dNTP: Desoxynukleotidtriphosphat)

2.2.2.3.3. Real-time TaqMan® PCR

Die Real-time TaqMan® PCR ermöglicht es, die PCR-Produkte schon während der Amplifikation zu detektieren. Als Grundlage dieser Methode dienten unter anderem die Arbeiten von Holland (Holland *et al.*, 1991) und Lee (Lee *et al.*, 1993).

Die eingesetzten TaqMan®-Sonden bestehen aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende

mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (6-Carboxyfluoreszein, FAM) markiert ist und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Black hole 1) trägt. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird durch die Nähe zum Quencher die entstehende Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes unterdrückt. Dieses Phänomen wird als "Förster resonance energy transfer" (FRET) bezeichnet und wurde vom deutschen Physiker Theodor Förster 1946 entdeckt.

Während des PCR-Zyklus hybridisiert die TaqMan®-Sonde mit dem komplementären DNA-Strang. Sobald die Taq-Polymerase auf Grund ihrer Exonucleaseaktivität das 5'-Ende der Sonde während der PCR-Zyklen abbaut, wird die Fluoreszenz des Reporters nun nicht mehr durch den Quencher gelöscht und kann gemessen werden. Entsprechend der Anhäufung von PCR-Produkten steigt auch die Fluoreszenz des Reporters mit jedem Zyklus an. Somit ist der Anstieg der Fluoreszenz direkt proportional zu der Menge der amplifizierten DNA-Abschnitte.

Die gemessene Expression von humanen Serumalbumin (HSA), humanem α_1 -Antitrypsin (HAT), humanem Transferrin (HTF), hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF-4 α), hTERT und TRF2 wurde dann mit der stabil exprimierten humanen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (hGAPDH) ins Verhältnis gesetzt und verglichen.

Primerdesign und -optimierung

Alle Primer wurden mit dem Programm PrimerExpress (Applied Biosystems) entworfen. Die Oligonukleotidsequenzen wurden mit BLAST (engl.: basic local alignment search tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) auf Spezifität kontrolliert und bestätigt.

Zur Optimierung der Primerkonzentration für eine Hybridisierungstemperatur von 60°C wurden Ansätze verschiedener Konzentrationsverhältnisse des vorwärts gerichteten Primers (F) und des rückwärts gerichteten Primers (R) ausgetestet.

Dazu wurde durch Zugabe von 20 μ l H₂0 (PCR-grade) pro nmol des Primers (MWG) eine Primerlösung von 50 pmol/ μ l angesetzt. Anschließend wurden Verdünnungsstufen der Primer nach folgendem Schema hergestellt: 50 nM (3 μ l Primerlösung + 294 μ l ddH₂O), 300 nM (6 μ l Primerlösung + 94 μ l ddH₂O) und 900 nM (20 μ l Primerlösung + 91 μ l ddH₂O).

Der Reaktionsansatz enthielt 10 µl SYBR Green Master-Mix (Applied Biosystems), 1µl ddH₂O, 5µl positive cDNA Kontrolle (20 ng/µl) und jeweils 1µl verdünnten F sowie R. Eine Negativkontrolle (ddH₂O) anstelle der cDNA wurde mitgeführt, um Primer-Dimer Bildungen festzustellen.

Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für 1 Minute, das Annealing der Primer und die Elongation bei 60°C und ebenfalls 1 Minute (Two step-PCR). Es wurden 30 Zyklen im ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) durchgeführt.

Das Konzentrationsverhältnis der Primer ist optimal, wenn sich keine Primer-Dimer Bildungen zeigen und keine Selbstinhibition der Primer erfolgt.

In der Tabelle 5 sind die Sequenzen und optimalen Konzentrationen der Primer und Sonden für die untersuchten Gene aufgeführt.

Gen		Sequenz	Konzentration (nM)
HSA	F:	AGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTG	900
	T:	ACATTCAAGCAGATCTCCATGGCAGCA	300
	R:	AGGTCCGCCCTGTCATCAG	300
НАТ	F:	TCGCTACAGCCTTTGCAATG	300
	т:	AGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGG	300
	R:	TTGAGGGTACGGAGGAGTTCC	300
HTF	F:	GTGTATCAGCAGAGACCACCGA	300
	т:	TTCTCCATTCATGATCTTGGCGATGCA	300
	R:	CATCCAAGCTCATGGCATCA	900
HNF-4α	F:	GCGATCCAGGGAAGATCAAG	50
	т:	TCCAAGCTCACCTGCACCTGGGA	300
	R:	CATACTGGCGGTCGTTGATGT	50
hTERT	F:	TCTACTCCTCAGGCGACAAG	300
	т:	CTCCGAGCGCCAGTCAGGCT	300
	R:	CAGAAAGATGGTCTCCACGA	900
TRF2	F:	GTGAGGGTGGCTCGGAACT	50
	т:	CAGCCCAAGAACAAGCGCATGACAA	300
	R:	CTCCTCCAAGACCAATCTGCTTA	300
hGAPDH	F:	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGTAA	300
	т:	TGTTGCCATCAATGACCCCTTCATTG	300
	R:	CATGGGTGGAATCATATTGGAAC	300

Tabelle 5:Primer (5'-3') und Sonden (5'-FAM, 3'-BH1) für die untersuchten GeneF: Forward T: Sonde R: Reverse

Validierung der RT-PCR

Um die Effizienz der PCR-Bedingungen für das interne Kontrollgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (hGAPDH) und das zu analysierende Gen zu überprüfen, wurde eine Validierung durchgeführt. Hierfür wurde von der positiven Kontroll-cDNA
eine serielle Verdünnung hergestellt (20, 10, 5, 2, 1, 0,5 und 0,2 ng/µl). Der Reaktionsansatz bestand aus 5 µl cDNA, 10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 4 µl H₂0 (PCR-Grade) und 1 µl Primer-Probe-Mix. Für den Primer-Probe-Mix wurden die optimalen Konzentrationen an vorwärts und rückwärts gerichteten Primer sowie der dazugehörigen Hybridisierungssonde (siehe Tabelle 5) eingesetzt. Als negative Kontrolle wurde die cDNA durch ddH₂0 ersetzt. Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für 10 Sekunden, das Annealing der Primer mit Elongation bei 60°C für 1 Minute. Es wurden 40 Zyklen im ABI PRISM 7900 durchgeführt.

Danach wurde das Fluoreszenzniveau bzw. die entstandene Produktmenge in einer logarithmischen Funktion gegen die Anzahl der Zyklen dargestellt. Die Anzahl der Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenzsignal einen vorgegebenen Schwellenwert im linearen Bereich der logarithmischen Funktion übersteigt, ergibt den C_T-Wert. Die Differenz zwischen den C_T-Werten des Zielgens und des Kontrollgens sollte in jeder Verdünnungsstufe vergleichbar groß ausfallen ($\Delta C_T = C_T$ Zielgen – C_T Kontrollgen). Eine Standardkurve wurde durch das Auftragen des Logarithmus der eingesetzten cDNA Menge gegen die errechneten ΔC_T -Werte erstellt.

Eine vergleichbare Effizienz zeigt sich darin, dass der ermittelte Kurvenanstieg zwischen -0,1 und +0,1 liegt.

PCR Protokoll

Für die Real-time PCR wurden 384-Well Platten benutzt. Die spätere Messung erfolgte im ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems). Das Reaktionsvolumen betrug insgesamt 10 μl. In jedem Well wurden 50 ng cDNA der verschiedenen Proben eingesetzt.

Master-Mix

Reagenz	µl pro	Ansatz	
2xTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosyster	ns)	5	
Primer/Probe Mix	(0,5	
H ₂ O (PCR-grade) (Sigma)		1	
cDNA	:	3,5	

 Tabelle 6:
 Zusammensetzung des Master-Mix für die Real-time PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
AmpErase	50	2:00
Aktivierung der Polymerase	95	10:00
Cycling (40x)		
Denaturierung Annealing/Amplifikation	95 60	0:10 1:00

Tabelle 7:Cycling Parameter der Real-time PCR. Die AmpErase ist ein Enzym (Uracil-DNA-
Glycosylase), das vor Kontaminationen mit Amplifikaten aus vorhergehenden PCRs
schützt. Bevor die Real-time PCR startet, werden derartige Amplifikate spezifisch
abgebaut, da sie Desoxy-Uracil enthalten.

2.2.2.3.4. Auswertung der Real-time TaqMan® PCR

Von dem ermittelten C_T -Wert des einzelnen Genes wurde der C_T -Wert des hGAPDH abgezogen, dieses ergibt den so genannten ΔC_T -Wert. Um nun die behandelten und unbehandelten Proben vergleichen zu können, werden die ΔC_T -Werte voneinander subtrahiert. Die Zahl 2 wird abschließend mit dem negativen Wert des Subtraktionsergebnisses ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) potenziert, um die relative Expression zu berechnen.

Dieses Ergebnis zeigt, um wie viel höher bzw. niedriger die Expression des Genes im Vergleich zur unbehandelten Probe ist.

Rechenbeispiel für HSA:			
	$1(05) = 20.24 (C, W_{corr} + CARDH) = 2.20 (AC, W_{corr})$		
C _T -wert HuH / Kontrolle:	$16,95 - 20,24 (C_{\rm T} - wert nGAPDH) = -3,29 (\Delta C_{\rm T} - wert)$		
C _m -Wert HuH7 BIBR ·	$1655 - 2126(C_{m}Wert hGAPDH) = -471(AC_{m}Wert)$		
C1 Weit Hull/ Bible.			
$-4,71 - (-3,29) = -1,42$ ($\Delta\Delta C_{\rm T}$ -	Wert)		
$2^{-(-1,42)} = 27$			
2 231			
Die Expression von humanem Serumalbumin ist in mit BIBR 1532 behandelten Zellen um das			
Draifacha arhäht			
Drenacne ernont.			

2.3. Statistische Auswertung

Die durchgeführten Experimente wurden mindestens mit drei separaten Ansätzen durchgeführt und zweimal wiederholt. Die gezeigten Daten sind die Durchschnittswerte \pm Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Student-t-Test für unpaarige Stichproben. Ein Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn der p-Wert < 0,05 war.

3. Ergebnisse

3.1. Behandlung der Zelllinien mit Telomeraseinhibitor BIBR 1532

Die nachfolgenden Ergebnisse zeigen den Einfluss des Telomeraseinhibitors BIBR 1532 (Boehringer Ingelheim) auf die unmittelbare Zellproliferation, den Zellzyklus und die Genexpression (hTERT, TRF2, HNF-4 α , HSA, HAT und HTF) von HuH7, HepG2 und FH-hTERT Zellen.

Zu Beginn werden Ergebnisse über die Inhibition des Telomeraseenzyms durch BIBR 1532 und die daraus resultierende Telomerverkürzung mittels RQ-TRAP und Flow-FISH dargestellt. Darauf folgt die Zellzyklusanalyse anhand der Durchflusszytometrie, die Auswertung der Überwachung der Proliferation über 10 Tage und abschließend werden die Ergebnisse über Gen-Expressionsveränderungen veranschaulicht.

3.1.1. Bestimmung der Telomeraseaktivität (SYBR Green RQ-TRAP)

TRAP-Extrakte wurden mit 0 nM, 10 nM und 100 nM BIBR 1532 inkubiert und die relative Telomeraseaktivität (RTA) mittels eines modifizierten TRAP-Protokolls bestimmt. Bei einer Konzentration von 10 nM konnte keine Reduzierung der Telomeraseaktivität beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 100 nM zeigte sich bei allen drei Zelllinien eine deutliche Inhibition der Telomerase. Die Telomeraseaktivität bei den HuH7 und HepG2 Zellen sank bei 100 nM auf ca. 55% und bei den FH-hTERT Zellen auf knapp 30% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollextrakten (siehe Abbildung 5).



Abbildung 5: Hemmung der Telomeraseaktivität durch BIBR 1532 in HuH7, HepG2 und FH-hTERT Zellextrakten. Die gemessenen Werte wurden mit einer Standardkurve von 293T Zellen, die Telomerase-positiv sind, in Beziehung gesetzt. Daraus wurde die relative Telomeraseaktivität (RTA) berechnet. (* = signifikant im Vergleich zu 0 nM)

Es wurden auch Vorexperimente mit einer Methyl-RNA (dem Inhibitor VI von Calbiochem) und einer kommerziellen siRNA (Qiagen) gegen hTERT durchgeführt. Der Inhibitor VI zeigte bei direkter Zugabe zu den TRAP-Extrakten mit einer Konzentration von 8250 μ M eine sehr hohe Hemmung der Telomerase. In der Tabelle 8 sind beide Telomeraseinhibitoren aufgeführt und verglichen.

Telomeraseinhibitor	Zelllinie	Inhibition (%)	
BIBR 1532 100 nM (Boehringer Ingelheim)	HuH7 HepG2 FH-hTERT	47 ± 1,8 42 ± 3,0 70 ± 6,3	
Inhibitor VI 8250 μM (Calbiochem)	HuH7 HepG2 FH-hTERT	98 ± 1,4 100 ± 0 81 ± 0,3	

Tabelle 8:Austestung verschiedener Telomeraseinhibitoren im zellfreien System. Die Tabelle zeigt
die Hemmung der Telomeraseaktivität durch BIBR 1532 und den Inhibitor IV in HuH7,
HepG2 und FH-hTERT Zellen. Bei der Zugabe von BIBR 1532 konnte eine Hemmung
zwischen 40 und 70% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gezeigt werden. Der
Inhibitor VI hemmte die Aktivität der Telomerase zu fast 100% bei den
Hepatomazelllinien, die FH-hTERT Zellen wurden zu 80% gehemmt.

Die Entscheidung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 weiterzuarbeiten, ist darin begründet, dass die Methyl-RNA und die siRNA erst durch Transfektion in die Zellen gelangen können. Dieses hätte weitere Kontrollen erforderlich gemacht und auch eine zusätzliche Manipulation der Zellen bedeutet. Weiterhin war die Reproduzierbarkeit der durch die siRNA veränderten hTERT Expression in den Zellen nicht optimal, was wahrscheinlich auf eine starke Variation in der Transfektionseffizienz zurückgeführt werden kann (siehe Tabelle 9). Hinzu kommt, dass die hTERT Expression in FH-hTERT sehr hoch ist (Wege, 2002). Dieses ist möglicherweise ungünstig für den Einsatz einer siRNA, da die Expression nicht ausreichend vermindert werden kann, um die Telomeraseaktivität entscheidend zu senken.

siRNA	Zelllinie	Konzentration	relative Expression von hTERT
Qiagen - HP GenomeWide 1027400	HuH7 HuH7 HuH7 HuH7	100 nM 100 nM 100 nM 100 nM	$0,36 \pm 0,09$ $1,37 \pm 0,32$ $4,03 \pm 0,91$ 0.38 ± 0.10
	HuH7	100 nM	$0,\!38\pm0,\!10$

Tabelle 9:Relative hTERT Expression nach Transfektion mit Qiagen siRNA. Die starke Variation in
der Transfektionseffizienz führte zu unzureichend reproduzierbaren Ergebnissen der
relativen hTERT Expression.

Ein Nachweis der Telomeraseinhibition durch BIBR 1532 nach Behandlung der Zellkultur, anschließender Gewinnung der Zellextrakte und Messung war nicht möglich, da der Inhibitor reversibel an das katalytische Zentrum der Telomerase bindet und sich bei Gewinnung der Zellextrakte vom katalytischen Zentrum löst.

3.1.2. Telomerverkürzung (Flow-FISH)

Die Telomerlängen-Messung mittels Flow-FISH wurde als Nachweismethode benutzt, um eine Aussage über die Wirkung des Telomeraseinhibitors BIBR 1532 auf die Telomerlänge machen zu können. Dieser Nachweis war auf Grund der reversiblen Hemmung des Inhibitors am katalytischen Zentrum der Telomerase mittels SYBR Green RQ-TRAP nur im zellfreien System möglich gewesen.

Hierzu wurde zu 2 Zeitpunkten die Telomerlänge der Zelllinien HuH7, HepG2 und FHhTERT nach der Behandlung mit BIBR 1532 gemessen. Es zeigte sich bei allen drei Zelllinien eine signifikante Verkürzung der Telomere (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: Telomerlängenverkürzung pro Populationsverdoppelung (PD). Die Telomerlänge der Zelllinien HuH7, HepG2 und FH-hTERT wurden vor und nach der Behandlung mit BIBR 1532 mittels Flow-FISH ermittelt. Es zeigte sich bei allen drei Zelllinien eine signifikante Verkürzung der Telomerlänge unter dem Einfluss des Telomeraseinhibitors.

Die Telomerverkürzung betrug bei HuH7 ca. 250 bp, bei HepG2 Zellen ca. 160 bp und bei den FH-hTERT Zellen bis zum 11. Tag ca. 425 bp pro PD (siehe Tabelle 10).

Zelllinie	Telomerlänge (kb) Kontrolle / BIBR 1532	Verkürzung pro PD
HuH7	24,91 \pm 0,49 / 22,30 \pm 0,81 (p=0,009)	245 bp \pm 130 bp
HepG2	$4,58 \pm 0,25$ / $3,66 \pm 0,48$ (p=0,032)	164 bp \pm 92 bp
FH-hTERT	11,14 \pm 1,45 / 6,46 \pm 0,49 (p=0,001)	425 bp \pm 174 bp

Tabelle 10:Übersicht über die berechnete Telomerverkürzung von HuH7, HepG2 und FH-hTERT
Zellen pro Populationsverdoppelung (PD).

3.1.3. Zellzyklusanalyse (FACS)

Die Zellreihen HuH7, HepG2 und FH-hTERT wurden insgesamt für 4 Tage mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 behandelt. Anschließend wurde eine Analyse des Zellzyklusses mittels FACS durchgeführt.

Vergleicht man die HuH7 und HepG2 Zellen, die mit BIBR 1532 behandelt wurden, mit den unbehandelten Kontrollen, zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus (*HuH7: p = 0,62; HepG2: p = 0,19*). Bei den HuH7 Zellen lag der Anteil der sich in der S-Phase (S-Phase = aktive DNA-Replikation) befindenden Zellen bei jeweils 24-25% (siehe Abbildung. 7A). Die HepG2 Zellen zeigten einen S-Phasen-Anteil von jeweils 29-30% (Abb. 7B). Bei den FHhTERT Zellen zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied (p = 0,93) in der S-Phase zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen. Dieser Anteil lag bei beiden zwischen 19-20% (Abb. 7C).

A

HuH7





B

Kontrolle **BIBR 1532** Aggreg Dip G Dip G2 43,10 +/- 1,47 G0/G1-Phase: 43,31 +/- 0,99 G0/G1-Phase: 2000 2000 30,02 +/- 2,08 28,61 +/- 1,23 S-Phase S-Phase: 26,88 +/- 0,64 28,08 +/- 0,56 G2/M-Phase: G2/M-Phase: 200 1500 Number Number 8 8 500 0 250 100 150 Channels (PE-A) 50 200 50 100 Channels (PE-A)

C FH-hTERT



Abbildung 7: Analyse des Zellzyklusses von HuH7 (A), HepG2 (B) und FH-hTERT Zellen (C) mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Nach einer Behandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 für 4 Tage konnte kein signifikanter Unterschied im Zellzyklus von HuH7, HepG2 und FH-hTERT Zellen gezeigt werden.

3.1.4. Zellproliferation

Um den Einfluss des Telomeraseinhibitors BIBR 1532 auf die unmittelbare Zellproliferation überwachen zu können, wurde der "CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay" (Promega) benutzt.

Bei den HuH7 Zellen zeigte sich innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums von 10 Tagen kein signifikanter Unterschied im Zellwachstum bei den mit BIBR 1532 behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Die einzelnen Ergebnisse der durchgeführten Messungen zeigt die Abbildung 8A. Auch HepG2 Zellen zeigten bis zum 10. Tag der Messung keine signifikante Verlangsamung oder Steigerung der Zellproliferation bei den mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abb. 8B).

FH-hTERT Zellen, die mit BIBR 1532 behandelt wurden, wiesen ebenfalls hinsichtlich der Zellproliferation keinen signifikanten Unterschied gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen auf (Abb. 8C).

A





С



Abbildung 8: Proliferation von HuH7, HepG2 und FH-hTERT Zellen. In den ersten 10 Tagen konnte kein signifikanter (n. s.) Unterschied in der Zellproliferation bei den mit BIBR 1532 behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen beobachtet werden.

3.1.5. Expression von hTERT und TRF2

Die Zelllinien HuH7, HepG2 und FH-hTERT wurden mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 über mehrere Tage behandelt, die gesamte RNA der Zellen extrahiert, cDNA generiert und die Expression von hTERT und TRF2 mittels Real-time PCR ermittelt und mit unbehandelten Kontrollen verglichen.

Das von der Zelle regulierte Gen hTERT ist entscheidend für die Telomeraseaktivität, da es das katalytische Zentrum des Telomeraseenzyms bildet. Die Expression von TRF2 ist ausschlaggebend für die Stabilität der Telomere. Die in der Abbildung 9 dargestellten Werte zeigen die relative Expression der beiden Gene im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Hierbei zeigen Werte über 1 eine erhöhte Expression des Gens, Werte unter 1 eine erniedrigte Expression im Vergleich zu den Kontrollen (unbehandelt, Expression = 1).

Unter Beachtung der Abweichungen zwischen verschiedenen Messungen ergaben sich bei den BIBR behandelten Zellen keine wesentlichen Änderungen in der Expression von hTERT und TRF2. In HuH7 Zellen zeigte sich ein geringfügiger Anstieg der TRF2 Expression, wohingegen in HepG2 Zellen eine Reduktion um 50% beobachtet wurde.



Abbildung 9: Die Abbildung zeigt die relative Genexpression von hTERT und TRF2 von mit BIBR 1532 behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (=1). Die Zahl hinter den Zelllinien zeigt die Dauer der Behandlung.

3.1.6. Änderungen in der Expression hepatozytenspezifischer Gene

HuH7, HepG2 und FH-hTERT Zellen wurden mit BIBR 1532 über mehrere Tage behandelt. Anschließend wurde die gesamte RNA der Zellen extrahiert, cDNA generiert und die Expression von HNF-4 α , HSA, HAT und HTF mittels Real-time PCR ermittelt und mit unbehandelten Kontrollen verglichen. HNF-4 α ist ein Transkriptionsfaktor in Leberzellen. HSA, HAT und HTF sind Gene, die vor allem in Hepatozyten exprimiert werden. Die in der Abbildung 10 dargestellten Werte zeigen die Expression der verschiedenen Gene im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Hierbei zeigen Werte über 1 eine erhöhte Expression des Gens, Werte unter 1 eine erniedrigte Expression im Vergleich zu den Kontrollen (n=1).

Die HuH7 Zellen zeigten eine erhöhte Expression von HNF-4 α und HSA nach BIBR 1532 Behandlung von insgesamt 16 Tagen, HAT und HTF blieben unverändert in ihrer Expression. Bei den HepG2 Zellen waren die Expression von HSA, HAT und HTF nach 11 Tagen vermindert. FH-hTERT Zellen zeigten nach 6 Tagen einen leichten Anstieg von HSA und HAT, die HNF-4 α und HTF Expression war weitgehend unverändert.



Abbildung 10: Die Abbildung zeigt die Expression von HNF-4α, HSA, HAT und HTF von mit BIBR 1532 behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (=1). In HuH7 und FHhTERT Zellen zeigte sich eine Erhöhung der Expression von einigen Genen, dagegen war in HepG2 Zellen die Expression der hepatozytenspezifischen Gene weitgehend vermindert.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der unmittelbare Einfluss einer gezielten und spezifischen Hemmung des Telomeraseenzyms auf das Wachstum von humanen Hepatomazellen (HuH7 und HepG2 Zellen) und Telomerase-immortalisierten fetalen Hepatozyten (FH-hTERT) untersucht.

4.1. Auswahl der Methode zur Telomeraseinhibition

Um die Aktivität der Telomerase zu inhibieren stehen verschiedene Methoden zur Auswahl. Neben der direkten Hemmung der katalytischen Aktivität durch ein Antisense-Konstrukt gegen hTERT ist die Blockierung der katalytischen Untereinheit mittels *small-molecule* Inhibitoren oder einer Methyl-RNA möglich. Wird die Bildung von essentiellen Bestandteilen des Enzyms in der Zelle durch die Einschleusung einer siRNA gegen hTERT oder TERC unterdrückt, führt dieses ebenfalls zu einer Hemmung der Telomeraseaktivität. In Vorexperimenten mit dem Inhibitor VI und BIBR 1532 konnte eine kompetitive Hemmung der Telomerase im zellfreien System bei HuH7, HepG2 und FH-hTERT Zellen, die durch eine ektope hTERT Expression eine hohe Telomeraseaktivität haben, gezeigt werden. Dabei zeigte die Methyl-RNA von Calbiochem eine sehr hohe Hemmung der Telomerase von fast 100% bei allen Zelllinien, der *small-molecule* Inhibitor BIBR 1532 führte zu einer Inhibition der Telomerase um 40-70%.

Auch der Einsatz einer siRNA gegen hTERT von der Firma Qiagen wurde an HuH7 Zellen und HepG2 Zellen getestet. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass die RNA-Interferenz (auch *RNA-Silencing* genannt) eine viel versprechende Methode zur gezielten Inhibition von hTERT darstellt. In den Hepatomazelllinien SMMC-7721, HepG2 und HCCLM3 konnte mittels einer siRNA

die Expression von hTERT signifikant gesenkt werden, was wiederum zu einer Reduktion der Telomeraseaktivität führte und schließlich eine Verlangsamung der Proliferationgeschwindigkeit zur Folge hatte (Zhang *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006).

Die Reproduzierbarkeit in den von uns durchgeführten Experimenten mit der siRNA von Qiagen war jedoch unzureichend. 72h nach der Transfektion mit der siRNA lag die relative hTERT Expression zwischen dem 0,4 und 4-fachen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Daher wurde von einer weiteren Optimierung abgesehen und die Entscheidung getroffen, die kompetitive Hemmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase als Angriffspunkt für weitere Experimente zu nehmen.

Die endgültige Entscheidung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 die anschließenden Experimente durchzuführen, war darin begründet, dass die Methyl-RNA erst durch den Umweg einer Transfektion in die Zellen gelangen kann, was wiederum weitere Kontrollen nach sich gezogen und auch eine zusätzliche Manipulation der Zellen bedeutet hätte. Dagegen diffundiert der *small-molecule* Inhibitor BIBR 1532 ungehindert durch die Zellmembran und ist auch bei Einsatz von Serum und Antibiotika im Medium wirksam.

4.2. Wirksamkeitsnachweis für BIBR 1532

Es konnte gezeigt werden, dass die kompetitive Hemmung der Telomerase durch BIBR 1532 zu einer signifikanten Verkürzung der Telomere führt. Sie lag bei den HuH7 Zellen bei ca. 250 bp und bei den HepG2 Zellen bei ca. 160 bp pro Zellteilung. Die Telomere der immortalisierten FH-hTERT Zellen verloren sogar über 400 bp bei jeder Zellteilung.

Diese signifikante Telomerverkürzung mittels BIBR 1532 wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Stammzelltumoren, die mit der gleichen Konzentration (10 μ M) des Telomeraseinhibitors behandelt wurden, zeigten einen kontinuierlichen Verlust von 32 bp pro Zellteilung (Mueller *et al.*, 2007). Des Weiteren konnten auch bei Lungen-, Brust- und Prostatakarzinomen ähnliche Telomerverkürzungen beobachtet werden. Diese lagen ebenfalls bei ca. 30 bp pro Zellteilung (Damm *et al.*, 2001).

Die für diesen Inhibitor ermittelte IC_{50} von 100 nM für die extrahierte Telomerase mittels RQ-TRAP stimmt mit Werten früherer Publikationen überein (Damm *et al.*, 2001; Pascolo *et al.*, 2002).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass es durch den Einsatz von BIBR 1532 zu einer signifikanten Verkürzung der Telomere in Telomerase-positiven Tumorzellen kommen kann. Bei den Hepatomazellen (HuH7 und HepG2) und den immortalisierten FH-hTERT Zellen konnte dabei eine Telomerverkürzung pro Zellteilung beobachtet werden, die um das 5- bis 10-fache über denen in der Literatur beschriebenen Tumorzellen lag. Die unterschiedliche Verkürzung der Telomere könnte darin begründet sein, dass es sich um verschiedene Zellarten handelt, die wiederum individuell auf die Inhibition der Telomerase reagieren. Des Weiteren wäre es möglich, dass der Unterschied in der Telomerverkürzung bei jeder Zellteilung durch die Effektivität der Telomeraseinhibition bestimmt wird.

Da normale Telomerase-negative Zellen ca. 50-200 bp pro Zellteilung verlieren (Mueller *et al.*, 2007), lassen die Daten darauf schließen, dass die Inhibition der Telomerase in HuH7, HepG2 und FH-hTERT Zellen mittels BIBR 1532 effektiv war.

4.3. Expression von hTERT und TRF2

Die kompetitive Hemmung der Telomerase mittels $10\mu M$ BIBR 1532 hatte keinen relevanten Einfluss auf die Expression von hTERT oder TRF2.

Dieses war auch nicht unmittelbar zu erwarten, da eine toxische Wirkung von BIBR 1532 erst ab einer Konzentration von 120 μ M von der Arbeitsgruppe El-Daly beschrieben und auf den Verlust von TRF2 zurückgeführt wurde (El-Daly *et al.*, 2005). Die Expression von hTERT ist dabei ausschlaggebend für die Telomeraseaktivität, da es das katalytische Zentrum des Telomeraseenzyms bildet. Die Funktion von TRF2 liegt in der Stabilisierung der Telomere. Die Expression war bei den HuH7 Zellen leicht gesteigert und bei den HepG2 Zellen reduziert. Die behandelten FH-hTERT Zellen zeigten nach 6 Tagen keinen signifikanten Unterschied in der Expression von hTERT oder TRF2 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Inhibitor in dieser Konzentration selektiv die Telomeraseaktivität hemmt und höchstwahrscheinlich keine Veränderungen in der Genexpression in Hepatomazellen und FH-hTERT Zellen von hTERT und TRF2 auslöst.

Diese Spezifität von BIBR 1532 auf das Telomeraseenzym wurde bereits von Klaus Damm im Jahre 2001 beschrieben. Damals konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von anderen Polymerasen, Helikasen und Transkriptasen ausblieb, wenn sie mit Konzentrationen von BIBR 1532 bis 100 µM behandelt wurden.

BIBR 1532 hemmt selektiv die Telomerase und kann somit zur Untersuchung der Auswirkungen der Telomeraseinhibition auf die Proliferation eingesetzt werden.

4.4. Analyse des Zellzyklusses und der Proliferation

Fast 90% aller Tumorzellen zeigen eine gesteigerte Proliferation bei relativ kurzen Telomeren, die durch eine hohe Telomeraseaktivität stabilisiert und konstant gehalten werden (Kim *et al.*, 1994; Shay *et al.*, 1997). Eine umfassende Hemmung der Telomerase würde die Tumorzellen nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen in eine mitotische Krise führen und zwangsläufig den generalisierten Zelltod zur Folge haben (Shay *et al.*, 2006).

Bei den durchgeführten Experimenten sollte nun der unmittelbare Einfluss der Telomerasehemmung auf den Zellzyklus und die Proliferation untersucht werden, da zuvor verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander diesen direkten Zusammenhang beschrieben haben (Zhang *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Brandt *et al.*, 2005). Diese Daten zeigten bereits nach ca. 3-4 Tagen eine Verlangsamung der Proliferation nach vorausgegangener Inhibition der Telomerase in den Tumorzellen. Beim Einsatz von Telomeraseinhibitoren kommt es normalerweise zu Verzögerungen bis zum Eintreten des antiproliferativen Effektes. Diese Latenzphase ist dabei abhängig

von der initialen Telomerlänge der Krebszelle.

HuH7 Zellen haben eine Telomerlänge von ca. 24 kb. Sollte es in den ersten Tagen zu einer Proliferationsverlangsamung kommen, kann diese nicht Telomer-bedingt sein, da die Zellen bei einer Hemmung der Telomerase nur ca. 250 bp pro Zellteilung verlieren und dieses wäre nicht kritisch für die Zelle.

Die Hepatomazellen HuH7 und HepG2 sowie die immortalisierten FH-hTERT Zellen wurden für 4 Tage mit BIBR 1532 behandelt und anschließend wurde mittels FACS der Zellzyklus analysiert. Es konnten bei keiner Zelllinie signifikante Unterschiede des Zellzyklusses im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen festgestellt werden. Besonders eventuelle Verminderungen der sich in der S-Phase befindenden Zellen

durch die BIBR 1532 Behandlung wären von Interesse gewesen, da diese auf eine veränderte Proliferation hätte schließen lassen können.

Bei den HuH7 Zellen lag der Anteil der sich in der S-Phase befindenden Zellen bei jeweils 24%. Die HepG2 Zellen zeigten einen unveränderten S-Phase-Anteil von jeweils 29%. Bei den immortalisierten FH-hTERT Zellen lag der Anteil von den sich in der S-Phase befindenden Zellen mit und ohne Behandlung mit BIBR 1532 bei 19%.

In der anschließenden Überwachung der Proliferation der Zellen über einen Zeitraum von 10 Tagen konnte bei den HuH7 Zellen keine signifikante Veränderung (p > 0,05) bei den mit BIBR 1532 behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen festgestellt werden.

Die HepG2 Zellen zeigten ebenfalls keine signifikante Verlangsamung der Proliferation (p > 0,05), wenn sie mit dem BIBR 1532 behandelt wurden. Diese Daten stimmen mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Miho Furuta überein. Dort konnte ebenfalls nach signifikanter Telomerasehemmung in HepG2 Zellen keine Veränderung der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollen in den ersten Wochen nachgewiesen werden (Furuta *et al.*, 2003).

Bei den FH-hTERT Zellen ließ sich bei keiner Messung ein signifikant schnelleres oder langsameres Wachstum bei den behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen.

Vergleicht man diese Daten mit Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen, die Stammzellen-, Lungen-, Brust- und Prostatakarzinome mit BIBR 1532 über einen längeren Zeitraum behandelt haben, zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Bei keinem der Behandlungsversuche kam es innerhalb der ersten Tage und Wochen zu einer veränderten Proliferation der mit dem Telomeraseinhibitor behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Einige Zellreihen zeigten erst nach über 100 Populationsverdoppelungen ein verlangsamtes Zellwachstum (Damm *et al.*, 2001; Mueller *et al.*, 2007).

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse und der Proliferationsüberwachung im Zusammenhang, geben die Daten keinen sicheren Hinweis darauf, dass die Hemmung der Telomerase einen unmittelbaren Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat. Die Analyse der S-Phase nach 4 Tagen und die Ergebnisse der Zellüberwachung über den Zeitraum von 10 Tagen, geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass die gezielte Inhibition der Telomerase die Proliferation in Hepatomazellen unmittelbar nicht verändert.

Damit würden diese Daten den Publikationen von S. Brandt (Brandt *et al.*, 2005), R. Zhang (Zhang *et al.*, 2002) und S. Liu (Liu *et al.*, 2004) widersprechen, in denen beschrieben wurde, dass die Inhibition der Telomeraseaktivität zu kurzfristigen Veränderungen (nach ca. 3-4 Tagen) im Zellwachstum und dem Überleben von Hepatomazellen führt.

Die Ergebnisse stimmen aber mit den Daten aus der Publikation von Klaus Damm überein, in der beschrieben wird, dass die Inhibition der Telomerase mittels BIBR 1532 zu keinen Veränderungen im Zellwachstum führt, bis die Telomere eine kritische Länge erreicht haben und die Zellen ihr Wachstum darauf hin verlangsamen (Damm *et al.*, 2001). Die Telomerlänge scheint also entscheidend dafür zu sein, wie lange die Zellen proliferieren.

Damit konnte die Hypothese, dass die Telomerase einen Telomerlängen-unabhängigen Effekt auf das Zellwachstum in Hepatomazellen hat, nicht bestätigt werden. Die Inhibition des Telomeraseenzyms führte zu keiner unmittelbaren Veränderung im Zellzyklus oder im Zellwachstum von Hepatomazellen und immortalisierten fetalen Hepatozyten.

4.5. Genexpression

Um Aussagen über Veränderungen der Genexpression der mit BIBR 1532 behandelten Zellen machen zu können, wurden die Zelllinien HuH7, HepG2 und FH-hTERT über mehrere Tage mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 behandelt. Dabei wurden Veränderungen der Expression von folgenden Genen untersucht: HNF-4 α zählt zu den Hauttranskriptionsfaktoren in Hepatozyten und reguliert Gene, die zur Bildung von speziellen Eiweißen für den Glukosetransport und den Glukosestoffwechsel wichtig sind. Auch die Differenzierung der Leberzellen wird über diesen Transkriptionsfaktor gesteuert (Sladek, 1993). Bei HSA, HAT und HTF handelt es sich um Proteine, die spezifisch in Hepatozyten exprimiert werden.

Die behandelten Zelllinien zeigten sehr unterschiedliche Genexpressionveränderungen. Die Hepatomazelllinien HuH7 und HepG2 verhielten sich fast komplett gegensätzlich. Während eine erhöhte Expression von HSA, HAT und HTF bei den HuH7 Zellen nachzuweisen war, verringerte sich die Expression dieser Gene bei den HepG2 Zellen fast auf die Hälfte im Vergleich zu den Kontrollen. Den Transkriptionsfaktor HNF-4 α exprimierten beide Zelllinien verstärkt, nachdem sie mehrere Tage (HuH7 16 Tage und HepG2 11 Tage) mit BIBR 1532 behandelt wurden. Bei HuH7 Zellen war die Expression 3-mal, bei HepG2 Zelle 2-mal höher.

Die FH-hTERT Zellen wurden für 6 Tage und mit dem Telomeraseinhibitor behandelt. Nach diesem Zeitraum zeigte sich eine Erhöhung der Expression der hepatozytenspezifischen Gene im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Beim Serumalbumin war er um das 3,5 fache, beim Antitrypsin um das 8,5 fache erhöht. Das Transferrin wurde doppelt so stark exprimiert. Der Transkriptionsfaktor HNF-4 α blieb in seiner Expression unverändert.

Insgesamt zeigt die Genexpressionsanalyse, dass die Inhibition der Telomerase keine großen Auswirkungen auf die Expression von hepatozytenspezifischen Genen hat. Der leichte Anstieg der Expression in HuH7 und FH-hTERT Zellen könnte als Differenzierungsimpuls gedeutet werden. Jedoch erschwert das niedrige Expressionsniveau der untersuchten Gene die Aussage über eventuelle Expressionsveränderungen. Bisher wurden von anderen Arbeitsgruppen keine Ergebnisse publiziert, mit denen man die Daten über die Genexpression hepatozytenspezifischer Gene unter Telomeraseinhibition vergleichen könnte.

Zusätzliche Experimente (z.B. Western-Blot) sind daher unbedingt erforderlich, um weitere Daten zu generieren. Damit wären dann robustere Aussagen zum Expressionsverhalten dieser Zelllinien unter dem Einfluss einer gezielten Telomeraseinhibition möglich.

4.6. Krebstherapie mittels Telomeraseinhibition

Wie in der Einleitung beschrieben, stellt das HCC ein großes Problem im klinischen Alltag dar und es bedarf dringend einer effektiven systemischen Therapie für fortgeschrittene Tumorstadien. Da die Telomeraseaktivität bei fast 90% aller HCCs erhöht ist (Lee *et al.*, 2004; Satra *et al.*, 2007), stellt die selektive Hemmung der Telomerase einen viel versprechender Ansatz zur antiproliferativen Therapie dar.

In zahlreichen Publikationen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Telomerase zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums bzw. zur Reduzierung der Tumorlast geführt hat (Zhang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004; Hochreiter *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2007). Zu bedenken ist dabei, dass es beim Einsatz von Telomeraseinhibitoren zu Verzögerungen bis zum Eintreten des antiproliferativen Effektes kommt. Diese so genannte "lag phase" oder auch Latenzphase ist dabei abhängig von der initialen Telomerlänge der Krebszelle (White *et al.*, 2001). Dieses gilt besonders für den Einsatz von Telomeraseinhibitoren wie BIBR 1532, die ausschließlich die Telomerase inhibieren, wodurch der antiproliferative Effekt auf die Tumorzellen erst einsetzt, wenn die Telomere entsprechend kurz sind. Ein Telomerlängen-unabhängiger Effekt auf das Zellwachstum von Hepatomazellen nach gezielter Inhibition der Telomerase ließ sich in dieser Arbeit nicht nachweisen.

Bei Tumoren mit anfänglich sehr langen Telomeren wäre daher eine Kombination mit zytotoxischen Substanzen obligat, um eine rasche Tumorkontrolle zu erzielen. Andernfalls würde die Monotherapie mit BIBR 1532 dazu führen, dass Tumore mit sehr langen Telomeren in dieser Latenzphase ungehindert weiter wachsen können. Je nach Aggressivität des Tumors könnte dieses fatale Folgen für den Patienten haben und würde zu keiner Verbesserung der Prognose führen.

Die Kombination mit anderen Chemotherapeutika erscheint des Weiteren sinnvoll, da gezeigt werden konnte, dass der Einsatz von Telomeraseinhibitoren (z.B. BIBR 1532 oder GRN163L) das Ansprechen von Tumorzellen auf Zytostatika (z.B. Doxorubicin) erhöhen kann (Djojosubroto *et al.*, 2005). Dieser Effekt war ebenfalls in Krebszellen zu beobachten, die schon Resistenzen gegen das in der Chemotherapie eingesetzte Medikament gezeigt hatten (Ward *et al.*, 2005).

Dieser positive Synergismus ist allerdings nicht bei allen Zytostatika zu beobachten. Bei Versuchen mit Stammzelltumoren wurde der Einfluss von BIBR 1532 in Kombination mit Cisplatin getestet. Die Tumorzellen zeigten dabei keine erhöhte Sensitivität gegenüber Cisplatin, wenn sie gleichzeitig mit dem Telomeraseinhibitor behandelt wurden (Mueller *et al.*, 2007).

Ende 2008 veröffentlichte Daten zeigen, dass auch der Knockdown von hTERT zu einem gesteigerten Ansprechen gegenüber Chemotherapeutika führen kann. HepG2

Zellen, in denen mittels siRNA die hTERT Expression gesenkt wurde, zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cisplatin (Guo *et al.*, 2008).

Zusätzliche Experimente und Untersuchungen sind notwendig, um weitere Daten und Erkenntnisse zu gewinnen. Damit wären genauere Aussagen über den Einfluss der Telomeraseaktivität und der Expression von hTERT auf die Proliferation von Tumorzellen möglich.

4.7. Risiken durch den Einsatz von Telomeraseinhibitoren

Es stellt sich natürlich auch die Frage, welche Probleme und Gefahren mit dem Einsatz von Telomeraseinhibitoren verbunden sein könnten.

Es wäre möglich, dass die behandelten Krebszellen selbst Resistenzen gegen den Inhibitor entwickeln oder sogar unter diesem Selektionsdruck einen alternativen Weg zur Verlängerung ihrer Telomere ausbilden bzw. aktivieren (Dunham et al., 2000). Ein Beispiel für solch einen alternativen Weg der Telomerverlängerung stellt z.B. der ALT-Mechanismus dar, der beim Osteosarkom häufiger zu finden ist (Ulaner et al., 2004). Über diesen Mechanismus, der unter anderem auf der Rekombination von verschieden langen Telomeren der Tumorzelle basiert, halten ca. 10% aller Tumoren die Länge ihrer Telomere konstant. Einige Arbeitsgruppen beschäftigen sich bereits mit der Blockierung dieses alternativen Weges der Telomerverlängerung (Zhong et al., 2007). Des Weiteren ist zu beachten, dass der Einsatz von Telomeraseinhibitoren auch die Stammzellen des Körpers schädigen könnten, da diese ebenfalls eine Telomeraseaktivität aufweisen (Wright et al., 1996) oder kanzerogen auf diese Zellen wirken. Stammzellen haben allerdings deutlich längere Telomere als Tumorzellen und teilen sich auch nur intermittierend (White et al., 2001). Der Schaden, den die

Stammzellen durch eine Telomeraseinhibition nehmen, könnte daher vielleicht vernachlässigbar sein.

Definitiv sollten Patienten, die mit Telomeraseinhibitoren behandelt werden, engmaschig kontrolliert werden, um rechtzeitig negative Effekte auf andere Telomerase-positive somatische Zellen (z.B. aktivierte Lymphozyten) erkennen zu können.

4.8. Resümee

Telomeraseinhibitoren stellen einen interessanten und vielversprechenden neuen Ansatz in der antiproliferativen Therapie von Tumoren mit hoher Telomeraseaktivität dar. Die Latenz bis zum Eintreten eines therapeutischen Effekts durch eine gezielte Hemmung der Telomerase mittels kompetitiver Blockierung des katalytischen Zentrums, gemessen an der Tumorgröße, wird bei Patienten mit HCC nach unseren Daten von der anfänglichen Telomerlänge der Tumorzellen beeinflusst.

Daher sollten Telomeraseinhibitoren in Kombination mit Chemotherapeutika oder der Strahlentherapie eingesetzt werden, um eine unmittelbare Kontrolle des Tumorwachstums zu erzielen.

Es sind aber noch zahlreiche weitere Experimente und vor allem klinische Studien und Daten nötig, um das Potenzial dieser neuen Therapieansätze beurteilen zu können.

Welcher Therapieansatz zur Telomerasehemmung in Tumorzellen (Immunotherapie, Gentherapie oder der Einsatz von *small-molecule* Inhibitoren) schließlich den erwünschten klinischen Erfolg bringt, wird sich hoffentlich in den nächsten Jahren zeigen (Shay and Keith, 2008).

4.9. Ausblick

In kürzlich veröffentlichten Daten von Lee (Lee *et al.*, 2008), Cereser, Fitchett und Parkinson wird erneut das Thema einer Telomerlängen-unabhängigen Funktion der Telomerase postuliert. Interessanterweise scheint dabei nicht die Telomeraseaktivität selbst ausschlaggebend zu sein, sondern die Konzentration von hTERT in den Zellen.

Je höher die Expression von hTERT in embryonalen Fibroblasten war, desto stressresistenter wurden die Zellen gegenüber dem Einfluss von Staurosporin, einem Alkaloid, das die Apoptose in Zellen induziert. Das Expressionsniveau der RNA-Komponente (TERC) des Telomeraseenzyms hatte dabei keinen Einfluss auf die protektive Wirkung von hTERT auf die Zellen. Selbst das völlige Fehlen von TERC führte zu keiner Veränderung in der schützenden Wirkung der katalytischen Untereinheit.

Vorläufig veröffentlichte Daten von Cereser, Fitchett und Parkinson lassen vermuten, dass die Expression von hTERT Einfluss auf die Regulation von Genen hat, die an der Zelldifferenzierung und Zellteilung beteiligt sind. Die Aktivität des Telomeraseenzyms in den untersuchten Keratinozyten scheint dabei keine Rolle zu spielen.

Eine bereits 2003 veröffentlichte Arbeit von Laura L. Smith zeigte ähnliche Ergebnisse (Smith *et al.*, 2003). Epithelzellen, die mit hTERT transfiziert wurden, wiesen eine höhere Expression von Genen auf, die für die Zellproliferation verantwortlich sind. Die in dieser Arbeit veröffentlichten Daten, lassen jedoch darauf schließen, dass die

reine spezifische Inhibition der Telomerase keinen direkten Einfluss auf das Überleben von Hepatomazellen hat.

5. Zusammenfassung

Die Telomerase, ein Ribonukleoprotein mit reverser Transkriptaseaktivität, ist für die chromosomale Stabilität und die Teilungsfähigkeit einer Zelle entscheidend. Normalerweise ist die Telomeraseaktivität in ausdifferenzierten menschlichen Zellen niedrig oder nicht nachweisbar. Dieses führt zu einem fortschreitenden Verlust von Telomer-DNA mit jeder Zellteilung, was zwangsläufig die Seneszenz oder den Tod der Zelle zur Folge hat. Die Telomerlänge bestimmt also maßgeblich die Anzahl der Zellteilungen. In 90% aller malignen Tumoren, so auch im hepatozellulären Karzinom, lässt sich eine hohe Telomeraseaktivität nachweisen, die es den Tumorzellen ermöglicht sich mit stabilen Telomeren unbegrenzt zu teilen. Viele Arbeiten an malignen Tumoren haben gezeigt, dass es bei einer gezielten Hemmung der Telomerase zu einer Wachstumsverlangsamung oder sogar zu einem Rückgang der Tumorgröße kommt. Die gezielte Inhibition des Telomeraseenzyms stellt daher einen interessanten Ansatz für eine wachstumshemmende Therapie dar, insbesondere in der Hepatologie.

Die Ergebnisse mit dem *small-molecule* Telomeraseinhibitor BIBR 1532, der kompetitiv und reversibel das aktive Zentrum blockiert, zeigen, dass eine gezielte Inhibition der Telomerase von Hepatomazellen und in Zellen mit ektoper hTERT Expression (fetale Hepatozyten) möglich ist.

Es kam dabei zu einer signifikanten Telomerverkürzung, jedoch nicht zu einer unmittelbaren Veränderung im Zellzyklus oder bei der Proliferation. Damit konnte die Hypothese, dass die Telomerase einen Telomerlängen-unabhängigen Effekt auf die unmittelbare Proliferation hat, nicht bestätigt werden.

Die durch die Behandlung hervorgerufenen Expressionsveränderungen zeigten bei den Zelllinien ein inhomogenes Bild. Insgesamt scheint die alleinige Hemmung der Telomeraseaktivität noch keinen ausreichenden Differenzierungsreiz darzustellen.

6. Literaturverzeichnis

- 1. Baerlocher GM, Mak J, Tien T, and Lansdorp PM (2002) Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: tips and pitfalls. Cytometry 47: 89-99.
- 2. Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. Nature 350: 569-573.
- 3. Blackburn EH (2000) Telomere states and cell fates. Nature 408: 53-56.
- Blasco MA, Lee HW, Rizen M, Hanahan D, DePinho R, and Greider CW (1997) Mouse models for the study of telomerase. Ciba Found Symp 211: 160-170.
- 5. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, and Cleries R (2004) Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. Gastroenterology 127: S5-S16.
- 6. Brandt S, Heller H, Schuster KD, and Grote J (2005) The tamoxifen-induced suppression of telomerase activity in the human hepatoblastoma cell line HepG2: a result of post-translational regulation. J Cancer Res Clin Oncol 131: 120-128.
- Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Hauel N, Kauffmann I, Priepke H, Niestroj C, Daiber C, Enenkel B, Guilliard B, Lauritsch I, Muller E, Pascolo E, Sauter G, Pantic M, Martens UM, Wenz C, Lingner J, Kraut N, Rettig WJ, and Schnapp A (2001) A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. EMBO J 20: 6958-6968.
- 8. Darlington GJ, Kelly JH, and Buffone GJ (1987) Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. In Vitro Cell Dev Biol 23: 349-354.
- 9. de Lange T (2002) Protection of mammalian telomeres. Oncogene 21: 532-540.
- de Souza NP, Alves G, and Fiedler W (2006) Telomerase inhibition by an siRNA directed against hTERT leads to telomere attrition in HT29 cells. Oncol Rep 16: 423-428.
- 11. DePinho RA (2000) The age of cancer. Nature 408: 248-254.
- 12. Dikmen ZG, Gellert GC, Jackson S, Gryaznov S, Tressler R, Dogan P, Wright WE, and Shay JW (2005) In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: a novel human telomerase inhibitor. Cancer Res 65: 7866-7873.
- Djojosubroto MW, Chin AC, Go N, Schaetzlein S, Manns MP, Gryaznov S, Harley CB, and Rudolph KL (2005) Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma. Hepatology 42: 1127-1136.
- 14. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, and Reddel RR (2000) Telomere maintenance by recombination in human cells. Nat Genet 26: 447-450.

- El-Daly H, Kull M, Zimmermann S, Pantic M, Waller CF, and Martens UM (2005) Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532. Blood 105: 1742-1749.
- 16. Falchetti ML, Fiorenzo P, Mongiardi MP, Petrucci G, Montano N, Maira G, Pierconti F, Larocca LM, Levi A, and Pallini R (2006) Telomerase inhibition impairs tumor growth in glioblastoma xenografts. Neurol Res 28: 532-537.
- 17. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, and . (1995) The RNA component of human telomerase. Science 269: 1236-1241.
- Furuta M, Nozawa K, Takemura M, Izuta S, Murate T, Tsuchiya M, Yoshida K, Taka N, Nimura Y, and Yoshida S (2003) A novel platinum compound inhibits telomerase activity in vitro and reduces telomere length in a human hepatoma cell line. Int J Cancer 104: 709-715.
- Greider CW (1996) Telomere length regulation. Annu Rev Biochem 65: 337-365.
- 20. Greider CW and Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell 43: 405-413.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, and de Lange T (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell 97: 503-514.
- 22. Guo X, Wang W, Zhou F, Lu Z, Fang R, Jia F, Bu X, Li R, Zhang B, Wu M, and Wei L (2008) siRNA-mediated inhibition of hTERT enhances chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. Cancer Biol Ther 7: 1555-1560.
- 23. Hackett JA and Greider CW (2002) Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. Oncogene 21: 619-626.
- 24. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, and Weinberg RA (1999) Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. Nat Med 5: 1164-1170.
- 25. Haker B, Fuchs S, Dierlamm J, Brummendorf TH, and Wege H (2007) Absence of oncogenic transformation despite acquisition of cytogenetic aberrations in long-term cultured telomerase-immortalized human fetal hepatocytes. Cancer Lett 256: 120-127.
- 26. Harley CB, Futcher AB, and Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature 345: 458-460.
- 27. Harrison RJ, Gowan SM, Kelland LR, and Neidle S (1999) Human telomerase inhibition by substituted acridine derivatives. Bioorg Med Chem Lett 9: 2463-2468.
- 28. Hayflick L and Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 25: 585-621.

- 29. Herbert BS, Gellert GC, Hochreiter A, Pongracz K, Wright WE, Zielinska D, Chin AC, Harley CB, Shay JW, and Gryaznov SM (2005) Lipid modification of GRN163, an N3'-->P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition. Oncogene 24: 5262-5268.
- Hochreiter AE, Xiao H, Goldblatt EM, Gryaznov SM, Miller KD, Badve S, Sledge GW, and Herbert BS (2006) Telomerase template antagonist GRN163L disrupts telomere maintenance, tumor growth, and metastasis of breast cancer. Clin Cancer Res 12: 3184-3192.
- 31. Holland PM, Abramson RD, Watson R, and Gelfand DH (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.
- Jackson SR, Zhu CH, Paulson V, Watkins L, Dikmen ZG, Gryaznov SM, Wright WE, and Shay JW (2007) Antiadhesive effects of GRN163L - An oligonucleotide N3'->P5' thio-phosphoramidate targeting telomerase. Cancer Res 67: 1121-1129.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, and Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 266: 2011-2015.
- 34. Kim NW and Wu F (1997) Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). Nucleic Acids Res 25: 2595-2597.
- 35. Knowles BB, Howe CC, and Aden DP (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science 209: 497-499.
- 36. Kosciolek BA, Kalantidis K, Tabler M, and Rowley PT (2003) Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference. Mol Cancer Ther 2: 209-216.
- 37. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, and Tanke HJ (1996) Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. Hum Mol Genet 5: 685-691.
- Lee CM, Hsu CY, Eng HL, Huang WS, Lu SN, Changchien CS, Chen CL, and Cho CL (2004) Telomerase activity and telomerase catalytic subunit in hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenterology 51: 796-800.
- 39. Lee J, Sung YH, Cheong C, Choi YS, Jeon HK, Sun W, Hahn WC, Ishikawa F, and Lee HW (2008) TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. Oncogene 27: 3754-3760.
- 40. Lee LG, Connell CR, and Bloch W (1993) Allelic discrimination by nicktranslation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Res 21: 3761-3766.

- 41. Lee MK, Hande MP, and Sabapathy K (2005) Ectopic mTERT expression in mouse embryonic stem cells does not affect differentiation but confers resistance to differentiation- and stress-induced p53-dependent apoptosis. J Cell Sci 118: 819-829.
- 42. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, and Harley CB (1992) Telomere end-replication problem and cell aging. J Mol Biol 225: 951-960.
- 43. Liu SX, Sun WS, Cao YL, Ma CH, Han LH, Zhang LN, Wang ZG, and Zhu FL (2004) Antisense oligonucleotide targeting at the initiator of hTERT arrests growth of hepatoma cells. World J Gastroenterol 10: 366-370.
- 44. Llovet JM and Bruix J (2003) Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. Hepatology 37: 429-442.
- 45. Lu XD, Qin WX, Pan DN, Li JJ, Wan DF, Wen CJ, Li CJ, Gu JR, and Yang SL (2004) [A DNA vector-based RNAi technology to inhibit the activity of the telomerase of cell line HCCLM3]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 84: 1381-1385.
- 46. Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, Ward RK, and Lansdorp PM (1998) Short telomeres on human chromosome 17p. Nat Genet 18: 76-80.
- 47. Mazzaferro V, Battiston C, Perrone S, Pulvirenti A, Regalia E, Romito R, Sarli D, Schiavo M, Garbagnati F, Marchiano A, Spreafico C, Camerini T, Mariani L, Miceli R, and Andreola S (2004) Radiofrequency ablation of small hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients awaiting liver transplantation: a prospective study. Ann Surg 240: 900-909.
- 48. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, and Wu JR (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.
- 49. Mueller S, Hartmann U, Mayer F, Balabanov S, Hartmann JT, Brummendorf TH, and Bokemeyer C (2007) Targeting telomerase activity by BIBR1532 as a therapeutic approach in germ cell tumors. Invest New Drugs 25: 519-524.
- 50. Murnane JP, Sabatier L, Marder BA, and Morgan WF (1994) Telomere dynamics in an immortal human cell line. EMBO J 13: 4953-4962.
- 51. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, and Sato J (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. Cancer Res 42: 3858-3863.
- 52. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, and Cech TR (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. Science 277: 955-959.
- 53. Oexle K (1998) Telomere length distribution and Southern blot analysis. J Theor Biol 190: 369-377.

- 54. Pascolo E, Wenz C, Lingner J, Hauel N, Priepke H, Kauffmann I, Garin-Chesa P, Rettig WJ, 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.
- 55. Perry PJ, Read MA, Davies RT, Gowan SM, Reszka AP, Wood AA, Kelland LR, and Neidle S (1999) 2,7-Disubstituted amidofluorenone derivatives as inhibitors of human telomerase. J Med Chem 42: 2679-2684.
- Read MA, Wood AA, Harrison JR, Gowan SM, Kelland LR, Dosanjh HS, and Neidle S (1999) Molecular modeling studies on G-quadruplex complexes of telomerase inhibitors: structure-activity relationships. J Med Chem 42: 4538-4546.
- 57. Rogan EM, Bryan TM, Hukku B, Maclean K, Chang AC, Moy EL, Englezou A, Warneford SG, la-Pozza L, and Reddel RR (1995) Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. Mol Cell Biol 15: 4745-4753.
- 58. Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C, and DePinho RA (1999) Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. Cell 96: 701-712.
- 59. Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW, and DePinho RA (2001) Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. Nat Genet 28: 155-159.
- 60. Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, and Lansdorp PM (1998) Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. Nat Biotechnol 16: 743-747.
- 61. Satra M, Gatselis N, Iliopoulos D, Zacharoulis D, Dalekos GN, and Tsezou A (2007) Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in liver tissues from patients with hepatocellular cancer and chronic viral hepatitis. J Viral Hepat 14: 41-47.
- 62. Satyanarayana A, Manns MP, and Rudolph KL (2004) Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. Hepatology 40: 276-283.
- 63. Shay JW and Bacchetti S (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. Eur J Cancer 33: 787-791.
- 64. Shay JW and Keith WN (2008) Targeting telomerase for cancer therapeutics. Br J Cancer 98: 677-683.
- 65. Shay JW and Wright WE (2006) Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. Nat Rev Drug Discov 5: 577-584.
- 66. Sladek FM (1993) Orphan receptor HNF-4 and liver-specific gene expression. Receptor 3: 223-232.

- 67. Smith LL, Coller HA, and Roberts JM (2003) Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. Nat Cell Biol 5: 474-479.
- 68. Stewart SA (2005) Telomere maintenance and tumorigenesis: an "ALT"ernative road. Curr Mol Med 5: 253-257.
- 69. Tauchi T, Shin-ya K, Sashida G, Sumi M, Okabe S, Ohyashiki JH, and Ohyashiki K (2006) Telomerase inhibition with a novel G-quadruplexinteractive agent, telomestatin: in vitro and in vivo studies in acute leukemia. Oncogene 25: 5719-5725.
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, and Sharp PA (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. Genes Dev 13: 3191-3197.
- 71. Ulaner GA and Giudice LC (1997) Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. Mol Hum Reprod 3: 769-773.
- 72. Ulaner GA, Hoffman AR, Otero J, Huang HY, Zhao Z, Mazumdar M, Gorlick R, Meyers P, Healey JH, and Ladanyi M (2004) Divergent patterns of telomere maintenance mechanisms among human sarcomas: sharply contrasting prevalence of the alternative lengthening of telomeres mechanism in Ewing's sarcomas and osteosarcomas. Genes Chromosomes Cancer 41: 155-162.
- 73. Ward RJ and Autexier C (2005) Pharmacological telomerase inhibition can sensitize drug-resistant and drug-sensitive cells to chemotherapeutic treatment. Mol Pharmacol 68: 779-786.
- 74. Wege H (2002) Immortalization of human hepatocytes by the ectopic expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). Med. Dissertation. Universität Witten/Herdecke.
- 75. Wege H, Chui MS, Le HT, Tran JM, and Zern MA (2003a) SYBR Green realtime telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. Nucleic Acids Res 31: E3.
- 76. Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, Malhi H, Sappal BS, Kumaran V, Gupta S, and Zern MA (2003b) Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. Gastroenterology 124: 432-444.
- 77. White LK, Wright WE, and Shay JW (2001) Telomerase inhibitors. Trends Biotechnol 19: 114-120.
- 78. Wright WE, Pereira-Smith OM, and Shay JW (1989) Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. Mol Cell Biol 9: 3088-3092.
- 79. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, and Shay JW (1996) Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. Dev Genet 18: 173-179.

- 80. Zakian VA (1995) Telomeres: beginning to understand the end. Science 270: 1601-1607.
- 81. Zhang PH, Tu ZG, Yang MQ, Huang WF, Zou L, and Zhou YL (2004) [Experimental research of targeting hTERT gene inhibited in hepatocellular carcinoma therapy by RNA interference]. Ai Zheng 23: 619-625.
- 82. Zhang PH, Zou L, and Tu ZG (2006) RNAi-hTERT inhibition hepatocellular carcinoma cell proliferation via decreasing telomerase activity. J Surg Res 131: 143-149.
- Zhang RG, Guo LX, Wang XW, and Xie H (2002) Telomerase inhibition and telomere loss in BEL-7404 human hepatoma cells treated with doxorubicin. World J Gastroenterol 8: 827-831.
- 84. Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, and Robinson MO (1999) Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. Genes Dev 13: 2388-2399.
- 85. Zhong ZH, Jiang WQ, Cesare AJ, Neumann AA, Wadhwa R, and Reddel RR (2007) Disruption of telomere maintenance by depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 complex in cells that use alternative lengthening of telomeres. J Biol Chem 282: 29314-29322.
Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Ansgar W. Lohse, dem Ärztlichen Direktor der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Zentrums für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, der mir die Möglichkeit gab meine Dissertation in seiner Klinik zu erstellen.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jörg Petersen und meinem Betreuer Dr. med. Henning Wege gilt mein besonderer Dank für die raschen Rückmeldungen und die fachliche Bewertung meiner Arbeit.

Zu jeder Zeit meiner Tätigkeit erhielt ich eine erstklassige Unterstützung von meiner Arbeitsgruppe "Leberregeneration und Telomerase AG", die mit großem Engagement von meinem Betreuer Dr. med. Henning Wege geleitet wird. In diesem Zusammenhang möchte ich meinen persönlichen Dank Dr. rer. nat. Björn Haker, Nadine Knuth und Dipl.-Biol. Denise Heim aussprechen. Ihre Hilfe hat einen großen Anteil am Zustandekommen dieser Dissertation. Ohne ihre Anleitung und Unterstützung wäre eine zeitige Fertigstellung meiner Arbeit während des Studiums nur schwer erreichbar gewesen.

Der Arbeitsgruppe "Telomer-/Stammzellbiologie" von Prof. Dr. Tim H. Brümmendorf danke ich für die Unterstützung bei der Erhebung der Daten.

Abschließend bedanke ich mich noch bei meiner Freundin Laura Schweikert und bei meinen Eltern Ingeborg und Peter Diedrich, die im gesamten Zeitraum um mein seelisches und körperliches Wohl bemüht waren.