

**Regulation des humanen *TERT* Gen Promotors im
transgenen Mausmodell [*Mus musculus* (Linneaus)]**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
am Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Julia Maxi Weise (geb. Ritz)

Hamburg, August 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. Wolfgang Deppert
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. Hans-Peter Mühlbach
Tag der Disputation: 10. November 2006

Hamburg, den 18. Oktober 2006



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Lieberei'.

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Diese Arbeit wurde am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert, Abteilung für Tumorstudiologie, durchgeführt und von Herrn Dr. Çağatay Güneş betreut.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach, Universität Hamburg

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. auf Kongressen präsentiert:

Ritz, J. M., Kühle, O., Riethdorf, S., Sipos, B., Deppert, W., Englert, C., and Güneş, C. (2005). A novel transgenic mouse model reveals humanlike regulation of an 8-kbp human *TERT* gene promoter fragment in normal and tumor tissues. *Cancer Res* 65, 1187-1196.

Weise, J. M., and Güneş, C. (2006). Telomeres and telomerase. A survey about methods and recent advances in cancer diagnostic and therapy. *Histol Histopathol* 21, 1249-1261.

AACR Special Conference: The Role of Telomeres and Telomerase in Cancer, 03.11. - 07.11.2004, San Francisco CA ,USA.

3rd European Workshop on Telomerase and Telomeres in Cancer and Aging, 21.11. - 23.11.2004, Ladenburg.

Für Gerrit

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	3
1.1. Replikation	3
1.2. Telomere	5
1.3. Mechanismen zur Erhaltung der Telomerlänge und -funktion	7
1.4. Telomerase: Komponenten und Funktion	8
1.5. Regulation der Telomerase	12
1.5.1. Transkriptionelle Regulation der <i>hTERT</i> Expression	12
1.5.2. Posttranskriptionelle Modifikationen und epigenetische Mechanismen	14
1.6. Telomerase und Telomere als Angriffspunkt in der Krebstherapie	16
1.7. Telomerase im Mausmodell	17
1.8. <i>hTERTp-lacZ</i> Mausmodell	19
2. FRAGESTELLUNG	21
3. MATERIAL UND METHODEN	23
3.1. Material	23
3.1.1. Geräte	23
3.1.2. Chemikalien	25
3.1.3. Kits	26
3.1.4. Lösungen und Puffer	27
3.1.5. Antikörper	29
3.1.6. Plasmide	29
3.1.7. Primer	30
3.1.8. Eukaryotische Zelllinien	30
3.1.9. Mammalia	31
3.2. Molekularbiologische Methoden	31
3.2.1. RNA-Isolierung und RT-PCR	31
3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32

3.2.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
3.2.4.	DNA-Gelelektrophorese	33
3.2.5.	DNA-Marker radioaktiv labeln	34
3.3.	Proteinbiochemische Methoden	34
3.3.1.	<i>Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) assay</i>	34
3.3.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	36
3.4.	Histologische Methoden	36
3.4.1.	Vibratom-Einbettung	36
3.4.2.	X-Gal Färbung von Hoden	36
3.4.3.	Herstellung von Gewebeschnitten am Mikrotom	37
3.4.4.	H & E-Färbung	38
3.4.5.	Immunhistochemie	38
3.5.	Zellbiologische Methoden	39
3.5.1.	Passagieren von Zellen	39
3.5.2.	Kryokonservierung von Zellen	39
3.5.3.	Isolierung von Maus embryonalen und adulten Fibroblasten (MEF's und MAF's)	40
3.5.4.	Wachstum in Softagar	40
3.5.5.	Stimulation von MEF's mit Chromatin-verändernden Substanzen	41
3.6.	Eingriffe an transgenen Mäusen	42
3.6.1.	Partielle Hepatektomie und Isolierung von Hepatozyten	42
4.	ERGEBNISSE	43
4.1.	Vergleich der Telomeraseaktivität in verschiedenen Organen bei Mensch und Maus	43
4.1.1.	<i>hTERT</i> Expression ist in adulten humanen Organen stringent kontrolliert	43
4.1.2.	Endogene <i>mTERT</i> Expression in normalen Mausgeweben	45
4.2.	Expression des <i>lacZ</i> Reportergens unter der Kontrolle eines 8,0 kbp langen Fragmentes des humanen TERT Promotors in transgenen Mäusen	46
4.2.1.	Expression des hTERTp-<i>lacZ</i> Reportergen Konstrukts im transgenen Mausmodell zeigt ein „human-ähnliches“ Muster	47
4.2.2.	Histologische Analyse der <i>lacZ</i> Reportergen Expression im Hoden	50
4.2.3.	Ansteigende hTERT Promotoraktivität im Hoden während der Geschlechtsreife	53
4.2.4.	<i>lacZ</i> Reportergen Expression und Telomeraseaktivität in der Haut während des Haarzyklus	56
4.2.5.	<i>lacZ</i> Reportergen Expression und Telomeraseaktivität in primären Fibroblasten in Abhängigkeit vom <i>p53</i> Status	61
4.2.6.	Aktivität des humanen <i>TERT</i> Gen Promotors in einem Mausmodell für Mammakarzinome	67
4.2.7.	hTERT Promotoraktivität und <i>mTERT</i> Expression werden während der Leberregeneration induziert	73

4.3.	Induktion des hTERT Promotors mit Trichostatin A	75
5.	DISKUSSION	77
5.1.	„Human-ähnliche“ Aktivität eines ektopischen hTERT Promotors im transgenen Mausmodell	78
5.2.	Zelltypspezifische Aktivität des hTERT Promotors im Hoden	80
5.3.	Aktivität des hTERT Promotors während des Haarzyklus	81
5.4.	hTERT Promotoraktivität in primären Fibroblasten	83
5.5.	Induktion des hTERT Promotors in einem Mausmodell für Mammakarzinome	85
5.6.	Induktion des hTERT Promotors während der Leberregeneration	87
5.7.	Vergleich der beiden hTERTp-<i>lacZ</i> transgenen Mauslinien	88
5.8.	Ausblick	89
6.	LITERATURVERZEICHNIS	92
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	106
8.	DANKSAGUNG	110

Zusammenfassung

Das Enzym Telomerase ist für die vollständige Replikation der Chromosomenenden, der Telomere, zuständig. Die Telomeraseaktivität wird in den meisten humanen Geweben während der Differenzierung inhibiert, aber in ca. 90 % aller humanen Krebsarten und Tumorzelllinien induziert (Kim *et al.*, 1994; Meyerson *et al.*, 1997; Nakayama *et al.*, 1998). In normalen Geweben ist die Telomerase nur in speziellen Zellen wie Keimbahnzellen oder Progenitorzellen aktiv und dort für die Homöostase der Organe wichtig. Die Aktivität der Telomerase unterliegt also beim Menschen einer stringenten Kontrolle und wird in den meisten Zellen unterdrückt.

Für die Funktion der Telomerase sind zwei ihrer Komponenten essentiell: die katalytische Untereinheit TERT (Meyerson *et al.*, 1997), die als reverse Transkriptase fungiert, und die RNA Untereinheit TERC (Blasco *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1995), die als Matrize für TERT dient. Während die humane TERC Komponente konstitutiv exprimiert ist (Avilion *et al.*, 1996), wird die humane TERT (*hTERT*) Expression stringent kontrolliert (Kolquist *et al.*, 1998). Daher kann die *hTERT* Expression, die in erster Linie über die Initiation der Transkription reguliert wird, als limitierender Faktor für die Telomeraseaktivität angesehen werden.

Das Verständnis über die Regulation von *hTERT* ist von großer Bedeutung für die Krebsforschung und bietet viel versprechende Ansatzmöglichkeiten bezüglich der Therapie.

In dieser Arbeit wurde das transgene Mausmodell *hTERTp-lacZ* analysiert, bei dem das bakterielle *lacZ* Reportergen, das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert, unter der Kontrolle eines 8,0 kbp langen Fragmentes des humanen TERT Gen Promotors exprimiert wird. In diesem Modellsystem kann die Regulation des *hTERT* Promotors *in vivo* untersucht werden. Anhand von RT-PCR Analysen konnte gezeigt werden, dass sich die *hTERT* Promotoraktivität in zwei *hTERTp-lacZ* transgenen Mauslinien, 6340.3 und 6335.5, „human-ähnlich“ verhält. Das bedeutet, dass der ektopische *hTERT* Promotor in den meisten somatischen Zellen inaktiv ist. Im Gegensatz zu der murinen TERT Expression, die in einer großen Bandbreite von Organen nachweisbar ist, zeigt der *hTERT* Promotor nur im Hoden der transgenen Mäuse eine starke Aktivität.

Die zelltypspezifische Expression des *lacZ* Reportergens wurde in den Keimbahnzellen des Hodens, dem Organ mit der stärksten hTERT Promotoraktivität, mittels X-Gal Färbung und β -Galaktosidase Immunhistochemie dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass der hTERT Promotor in der transgenen Mauslinie 6340.3 während proliferativer bzw. regenerativer Prozesse wie dem Haarzyklus oder nach partieller Hepatektomie spezifisch induziert wird.

Eines der wichtigsten Resultate dieser Arbeit war die Induktion des humanen und murinen TERT Promotors während der Tumorgenese in einem bitransgenen Mausmodell für Mammakarzinome hTERTp-*lacZ* / *p53*^{+/-} / BALB/c. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von bekannten *TERT* Aktivatoren wie *c-myc* und *ER81* sowie Tumormarkern wie *her2* und *ESX*, die in humanen Mammakarzinomen eine Rolle spielen, ebenfalls im Tumorgewebe erhöht ist.

Bei der vergleichenden Analyse der hTERT Promotoraktivität in den transgenen Mauslinien 6340.3 und 6335.5 wurde eine stringendere Kontrolle der hTERT Promotor-vermittelten *lacZ* Expression in der Mauslinie 6335.5 offensichtlich. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Integrationsort des Transgens bei 6335.5 epigenetischen Regulationsmechanismen unterliegt. In der Tat wurde eine Induktion des hTERT Promotors in 6335.5 primären Fibroblasten nach Behandlung mit dem Histon-Deacetylasen Inhibitor Trichostatin A gezeigt.

Das hTERTp-*lacZ* transgene Mausmodell zeigt eine „human-ähnliche“ und zelltypspezifische Expression des *lacZ* Reportergens unter der Kontrolle des humanen TERT Promotors. Insbesondere die transgene Mauslinie 6340.3 hat sich als geeignet erwiesen, um die gewebsspezifische Regulation des humanen TERT Promotors unter physiologischen Bedingungen während regenerativer Prozesse und der Tumorgenese zu untersuchen.

1. Einleitung

1.1. Replikation

Die Erbinformation wird bei jeder Zellteilung von Zelle zu Zelle weitergegeben. Dazu muss die DNA als Träger der genetischen Information repliziert werden.

Das Erbgut eukaryotischer Organismen ist im Gegensatz zu den Prokaryoten auf mehrere lineare Chromosomen verteilt. Diese Veränderung trägt zu einer höheren genetischen Diversität bei der sexuellen Reproduktion bei und ermöglicht einen evolutionären Vorteil bezüglich der natürlichen Selektion.

Neben den Vorteilen, die lineare Chromosomen bergen, stellen sie aber auch besondere Ansprüche an die Zelle. Die Zelle muss zwischen den Chromosomenenden und Chromosomenbrüchen unterscheiden können, um nur im zweiten Fall DNA-Reparaturmechanismen einzuschalten. Außerdem müssen die freien Chromosomenenden vor Nukleasen geschützt werden.

Eine weitere Herausforderung ist die vollständige Replikation der Chromosomen während der Zellteilung. Die Replikation wird als semi-konservativ bezeichnet, da bei jeder Zellteilung jeweils einer der parentalen DNA-Stränge an die Tochterzelle weitergegeben wird (Waga und Stillman, 1998). Der komplementäre DNA-Strang entsteht bei der Replikation durch die DNA-Polymerasen *de novo*. Um die DNA für den Replikationsapparat zugänglich zu machen, entwinden DNA-Topoisomerasen die DNA, wobei DNA-Helikasen die komplementären DNA-Stränge lösen. Die einzelsträngige DNA wird von Proteinen wie RPA (*replication protein A*) stabilisiert.

Die komplementären DNA-Stränge verlaufen antiparallel. Aufgrund der Eigenschaft der DNA-Polymerasen, freie 3'-OH-Enden nur in 5'-3'-Richtung zu verlängern, ergibt sich eine kontinuierliche Synthese des Leitstrangs und eine diskontinuierliche des Folgestrangs an der Replikationsgabel (Fig. 1.1.).

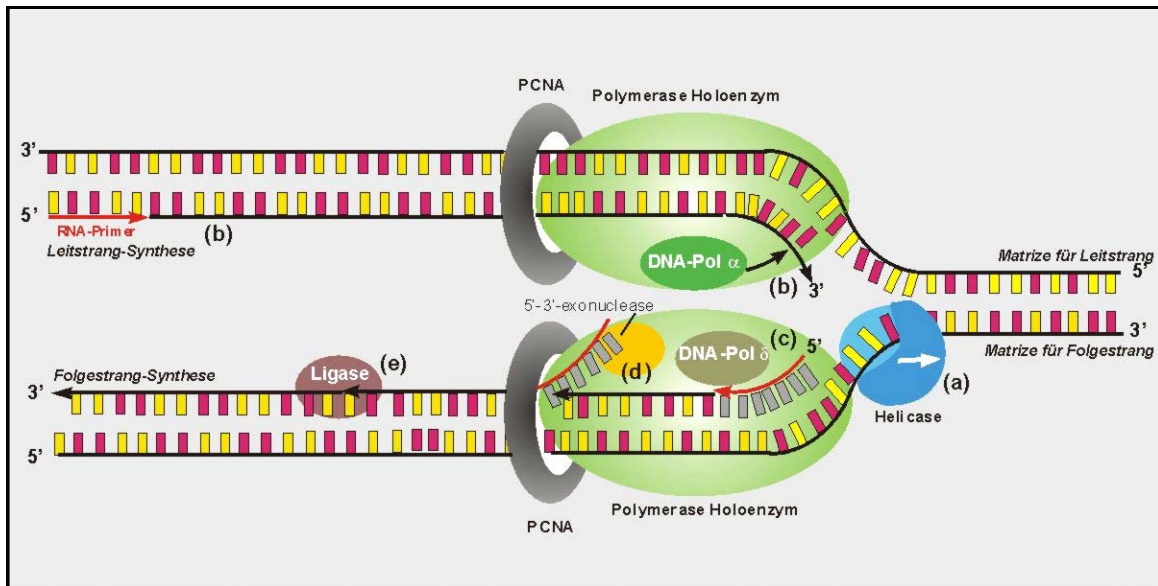


Fig. 1.1.: Schematische Darstellung der Replikationsgabel mit dem Replikationsapparat

(aus http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/replikat.htm).

Mit Hilfe der DNA-Helikase wird die Replikationsgabel geöffnet. Neben der kontinuierlichen Synthese des Leitstrangs durch die DNA-Polymerase kann der Folgestrang nur in Form von kurzen Okazaki-Fragmenten synthetisiert werden.

Eukaryoten besitzen mindestens fünf DNA-Polymerasen (α , δ , ϵ , β , γ). Die DNA-Polymerase α fungiert als Primase und leitet die Replikation ein, indem sie kurze RNA-Primer synthetisiert, die von den DNA-Polymerasen δ und ϵ verlängert werden. Bei der diskontinuierlichen DNA-Synthese des Folgestrangs hybridisieren bei jeder weiteren Entwindung der Replikationsgabel neue RNA-Primer, von denen ausgehend nur kurze DNA-Fragmente, die Okazaki-Fragmente, synthetisiert werden. Die RNA-Primer werden anschließend von der RNase HI und FEN1 abgebaut und die entstandene Lücke durch die DNA-Polymerase δ wieder aufgefüllt, wobei das freie 3'-OH-Ende des neu synthetisierten DNA-Strangs als Primer dient. Die DNA-Ligase I ist für die kovalente Verknüpfung der neu gebildeten DNA-Fragmente verantwortlich.

Das wohl gewichtigste Problem bei der Replikation von linearer DNA - das End-Replikations-Problem - tritt auf, weil bei der diskontinuierlichen DNA-Synthese des Folgestrangs die DNA-Polymerase die distalsten Enden der Chromosomen nicht replizieren kann (Olovnikov, 1971; Watson, 1972; Olovnikov, 1973). An der Stelle, wo der äußerste RNA-Primer hybridisiert, entsteht nach Abbau des RNA-Primers eine Lücke von 8-12 Nukleotiden, die nicht aufgefüllt werden kann. Dieser Umstand hat einen Verlust genetischen Materials bei jeder Zellteilung zur Folge.

Interessanterweise verkürzen sich die Chromosomenenden humaner Zellen bei jeder Mitose um 100-150 bp (Harley *et al.*, 1990). Dieser Umstand lässt sich nicht allein dadurch erklären, dass bei der Replikation eine Lücke von 8-12 Nukleotiden an den Chromosomenenden entsteht, die nicht repliziert werden kann. Es wird vermutet, dass Nukleasen während der Replikation die ungeschützten Chromosomenenden angreifen.

Die Zelle verfügt über einen Mechanismus, um den Verlust genetischen Materials bei jeder Zellteilung zu verhindern. Und zwar liegt die Lösung dieses Problems in der speziellen Struktur der Chromosomenenden, den Telomeren (Müller, 1938; McClintock, 1942), und dem Enzym Telomerase (Greider und Blackburn, 1985).

1.2. Telomere

Telomere sind komplexe Strukturen bestehend aus der Telomer-DNA und assoziierten Proteinen. Die Telomer-DNA besitzt kurze repetitive, GT-reiche Sequenzen, die zwischen den Spezies hoch konserviert sind. Beim Menschen und anderen Vertebraten ist die Sequenz (TTAGGG)_n. Je nach Spezies variiert die Anzahl an Tandemwiederholungen und somit auch die Länge der Telomere. So weisen die Telomere beispielsweise bei *Saccharomyces cerevisiae* (Zakian, 1989) eine Länge von ca. 300 bp, bei *Mus musculus* (Kipling und Cooke, 1990) von bis zu 150 kbp und in humanen somatischen Zellen (Moyzis *et al.*, 1988; Lindsey *et al.*, 1991) von 5-15 kbp je nach Zelltyp und Alter des Donors auf.

Die Telomer-DNA besitzt einen 150-300 bp langen 3'-Überhang, der sich zurückfalten, in die doppelsträngige DNA eindringen und dort hybridisieren kann (Greider, 1999; Griffith *et al.*, 1999). Unter dem Elektronenmikroskop konnte diese Lariatstruktur oder die so genannte *D-loop* und *T-loop* Struktur gezeigt werden (Munoz-Jordan *et al.*, 2001). Allerdings fehlt bisher der Beweis dafür, dass diese Struktur wirklich in dieser Form *in vivo* existiert.

Evident ist jedoch, dass, ob mit oder ohne Lariatstruktur, die Telomer-DNA mit Hilfe der Telomer-bindenden Proteine eine schützende Kappe an den Chromosomenenden bildet, die diese vor End-zu-End-Fusionen, Abbau durch Nukleasen oder Erkennen als Chromosomenbruch protegiert. Zu den humanen Telomer-bindenden Proteinen gehören TRF1 (TTAGGG repeat binding factor 1) (Chong *et al.*, 1995; Broccoli *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1997) und TRF2 (TTAGGG repeat binding factor 2) (van Steensel *et al.*, 1998), die

1.3. Mechanismen zur Erhaltung der Telomerlänge und -funktion

1985 entdeckten Greider und Blackburn in dem Ciliaten *Tetrahymena thermophila* ein Enzym, die Telomerase, das die Telomer-DNA durch Anhängen der repetitiven Telomerasequenz verlängern kann (Greider und Blackburn, 1985). Die Telomerase ist ein Ribonukleoprotein-Komplex, der durch seine reverse Transkriptase Aktivität die Verkürzung der Chromosomenenden bei der Replikation kompensiert. Dieser Mechanismus wirkt dem End-Replikations-Problem entgegen und verhindert den Verlust genetischen Materials bei der Zellteilung.

Die meisten Eukaryoten haben die Fähigkeit, ihre Telomerlänge mit Hilfe der Telomerase zu stabilisieren. Dennoch gibt es einige Ausnahmen. Unter der Gruppe der Insekten haben die Dipteren keine repetitiven Telomerasequenzen an den Enden der Chromosomen. Bei *Drosophila melanogaster* z. B. wird die Telomerlänge über Transposition der beiden *non-LTR* (*long terminal repeats*) Transposons *HeT-A* und *TART* an die Chromosomenenden erhalten (Mason und Biessmann, 1995; Pardue *et al.*, 1996).

Bei Pflanzen ist der *Arabidopsis*-Typ mit der Telomerasequenz (TTTAGGG) hoch konserviert. Allerdings fehlt den Alliaceen diese Sequenz (Pich *et al.*, 1996). Stattdessen weisen deren Chromosomenenden hoch repetitive Satelliten-DNA auf.

In manchen Tumorzellen konnte keine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. In diesen Zellen wird die Telomerefunktion über einen alternativen Mechanismus gewährleistet. Der so genannte ALT-Mechanismus (*alternative lengthening of telomeres*) dient dem Erhalt der Telomere bei der Replikation (Bryan *et al.*, 1997; Muntoni und Reddel, 2005). Die Wirkungsweise dieser alternativen Telomerverlängerung ist im Detail noch nicht gut verstanden, basiert allerdings nach bisherigen Befunden auf Rekombinationsereignissen. Dabei lagern sich die Schwesterchromatiden nach der Replikation asymmetrisch aneinander, und es kommt zu einem nicht-homologen Austausch von Telomer-DNA. Als Folge hat eine Schwesterchromatide längere Telomere als die andere (Fig. 1.3.).

Ob noch andere Mechanismen Anteil an einer alternativen Telomerverlängerung haben, ist bisher noch unklar. Auffällig ist jedoch, dass ALT-Zellen in der Regel deutlich längere Telomere als normale Telomerase-negative oder Telomerase-positive Zellen aufweisen. Dieser Umstand lässt sich nicht so einfach nur mit Rekombinationsereignissen erklären.

verlängert (Fig. 1.4.). Durch die elongierten Telomere können die RNA-Primer weiter außen hybridisieren, so dass auch bei der diskontinuierlichen DNA-Synthese keine genetische Information bei der Replikation verloren geht.

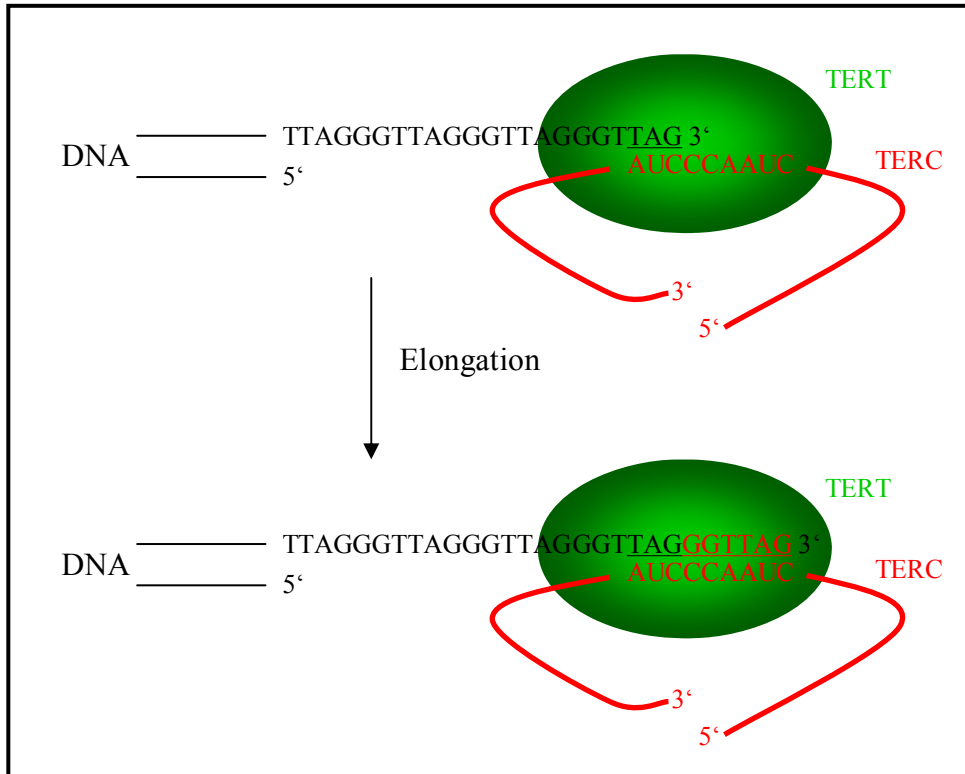


Fig. 1.4.: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Telomerase.

Die RNA Untereinheit TERC hybridisiert mit dem 3'-Überhang der Telomer-DNA und fungiert als Matrize für die reverse Transkriptase TERT, die die repetitiven Telomersequenzen an das freie 3'-OH-Ende addiert. Die Telomerase durchläuft mehrere Zyklen aus Telomerbindung, Telomerverlängerung und Translokation. Dabei hängt ihre Prozessivität, also die Anzahl angehängter Tandemwiederholungen, von den sie bindenden Faktoren ab (nicht dargestellt).

Während die *hTERC* (humane *TERC*) Untereinheit in allen Zellen konstitutiv exprimiert wird (Avilion *et al.*, 1996), ist die *hTERT* (humane *TERT*) Expression in humanen Zellen streng kontrolliert und in normalen somatischen Zellen unterdrückt. Die Telomeraseaktivität korreliert sehr gut mit der *TERT* Expression, so dass diese als der limitierende Faktor für die Telomeraseaktivität angesehen wird (Nakamura *et al.*, 1997; Kolquist *et al.*, 1998).

Nur wenige humane Zellen in Geweben mit hohem proliferativen Potential wie Keimbahnzellen im Hoden oder Stammzellen bzw. die Progenitorzellen weisen Telomeraseaktivität auf (Tab. 1.1.). In diesen sich potentiell oft teilenden Zellen ist eine Aufrechterhaltung der Telomeraseaktivität wichtig, um zu vermeiden, dass die Telomere eine

kritische Länge erreichen, bei der eine genetische Instabilität eintritt, die DNA-Reparaturmechanismen aktivieren würde.

Tab. 1.1.: Telomeraseaktivität in normalen humanen Geweben / Zellen.

Adulte humane Gewebe / Zellen	Ausgewählte Referenzen
Keimbahnzellen	Hohe Telomeraseaktivität im Hoden (Wright <i>et al.</i> , 1996)
Hämatopoetische Zellen	Telomeraseaktivität im Knochenmark und Leukozyten des peripheren Bluts (Broccoli <i>et al.</i> , 1995; Counter <i>et al.</i> , 1995)
Keimzentrum	Telomeraseaktivität in B-Lymphozyten (Norrback <i>et al.</i> , 1996)
Epithel des Gastrointestinal-Trakts	Telomeraseaktivität in der intestinalen Mukosa mit putativen Stammzellen in den Krypten (Hiyama <i>et al.</i> , 2001)
Fibroblasten	Telomeraseaktivität in der S-Phase (Masutomi <i>et al.</i> , 2003)
Haarfollikel	Telomeraseaktivität in der Haarzwiebel im Anagen (Ramirez <i>et al.</i> , 1997)
Endometrium	Telomeraseaktivität in der späten proliferativen Phase (Kyo <i>et al.</i> , 1997)
Basalschicht der Haut	Telomeraseaktivität in der regenerativen Basalschicht der Epidermis (Harle-Bachor und Boukamp, 1996)

Wie bereits erwähnt verkürzen sich die Telomere in humanen somatischen Zellen bei jeder Zellteilung um 50-150 bp (Harley *et al.*, 1990), weil die DNA-Polymerase die äußersten Enden der Telomere nicht zu replizieren vermag. Hayflick und Moorhead konnten an primären humanen Fibroblasten zeigen, dass sie eine endliche Teilungsfähigkeit *in vitro* aufweisen und dann in die zelluläre Seneszenz eintreten (Hayflick und Moorhead, 1961). Dieser Zeitpunkt wird als das „Hayflick Limit“ (replikative bzw. zelluläre Seneszenz) bezeichnet.

Die stetige Verkürzung der Telomere bis zu einem gewissen Schwellenwert wurde für den Wachstumsarrest verantwortlich gemacht (Harley *et al.*, 1990; Harley *et al.*, 1992). Dabei dient die Telomerlänge als Maß für die Teilungsfähigkeit der Zelle, bzw. anders gesagt, die Telomere fungieren als „mitotische Uhr“, die der Zelle ab einer kritischen Telomerlänge signalisieren, ihr Wachstum einzustellen.

Im Gegensatz zur replikativen Seneszenz steht das unendliche Proliferationsvermögen maligner Zellen. Die Telomer-Hypothese zellulärer Seneszenz und Tumorentstehung beschreibt, wie seneszente Zellen das „Hayflick Limit“ überwinden und ein infinites Proliferationsvermögen erlangen können (Fig. 1.5.).

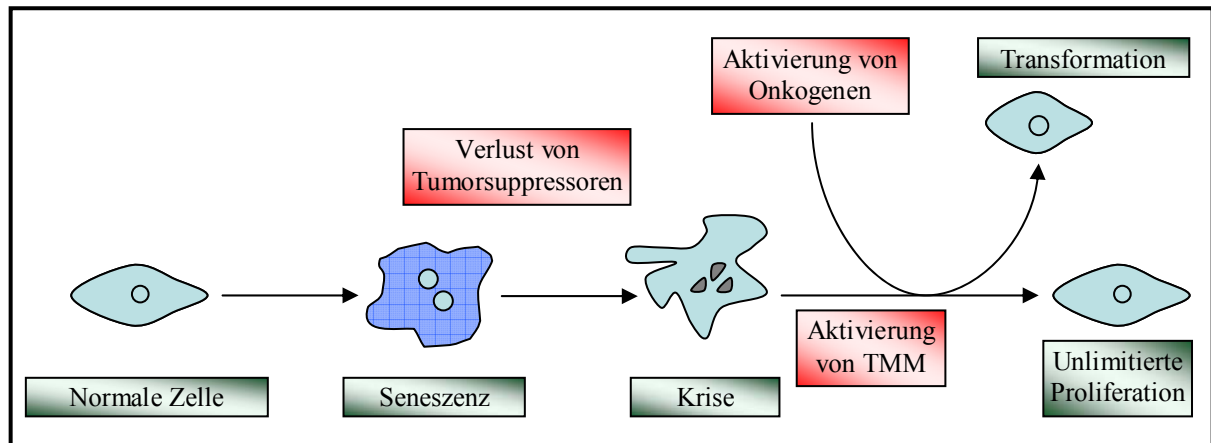


Fig. 1.5.: Telomer-Hypothese zellulärer Seneszenz und Tumorentstehung (nach Neumann und Reddel, 2002).

Wenn bei Telomerase-negativen Zellen aufgrund stetiger Telomerverkürzung bei jeder Replikation eine kritische Telomerlänge unterschritten wird, gehen die Zellen in die Seneszenz („Hayflick Limit“). Der Verlust von Tumorsuppressor Proteinen wie p53 oder Rb kann einigen Zellen eine verlängerte Proliferationskapazität verleihen. Allerdings ist diese durch weitere Telomerverkürzung begrenzt, so dass die Zellen in eine Krise gehen und größtenteils durch Apoptose sterben. Nur einige dieser Zellen können der Krise entkommen, indem sie einen Mechanismus zur Erhaltung / Verlängerung der Telomere (TMM: *telomere maintenance mechanism*), in der Regel die Telomerase, aktivieren. Die Zellen sind immortal, aber noch nicht transformiert. Erst weitere Mutationen wie im Onkogen *ras* können zu einer Transformation der Zelle führen.

Die Aktivierung der Telomerase oder anderer Mechanismen, die die Telomerfunktion erhalten, wird für die Immortalisierung der Zellen während der Tumorgenese als essentiell angesehen. Daher wird die Inhibition der Telomerase in humanen somatischen Zellen als Schutzmechanismus vor Tumorentstehung verstanden (Counter, 1996). Allerdings kann die Telomerase bzw. TERT *per se* nicht als Onkoprotein definiert werden (Harley, 2002), da deren Aktivität die Immortalisierung, aber nicht die Transformation bedingt.

Die wichtige Rolle der Telomerase in der Tumorgenese spiegelt sich in der Tatsache wider, dass 90 % aller humanen Tumore und immortalisierten Zellen *in vitro* hohe Mengen an Telomerase aufweisen (Kim *et al.*, 1994; Meyerson *et al.*, 1997).

Um genetische Faktoren zu identifizieren, die Primärzellen zur Immortalisierung und Transformation befähigen, wurden *in vitro* Modelle etabliert. So konnten Hahn *et al.* an humanen Epithelzellen und Fibroblasten zeigen, dass die ektopische Expression von *hTERT* in Kombination mit den beiden Onkogenen *SV40 large-T* und *h-ras* in der Transformation der Zellen resultiert (Hahn *et al.*, 1999).

Es bedarf folglich weiterer Ereignisse wie z. B. Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressor Genen, um einen transformierten Phänotyp zu erhalten.

1.5. Regulation der Telomerase

Die Telomeraseaktivität ist von verschiedenen Faktoren abhängig:

- Transkription von *TERT*
- Transport und subzelluläre Lokalisation der Telomerase Komponenten
- Zusammenlagerung des Telomerase Ribonukleoproteins
- Zugänglichkeit der Telomere für die Telomerase
- Posttranskriptionelle Modifikationen von *TERT*
- Epigenetische Mechanismen

Dabei spielt die *TERT* Transkription die primäre Rolle für die Regulation der Telomeraseaktivität.

1.5.1. Transkriptionelle Regulation der *hTERT* Expression

Wenn die RNA Komponente *hTERC* zusammen mit der reversen Transkriptase *hTERT* in einem *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem exprimiert wird, kann eine funktionelle Telomerase hergestellt werden (Weinrich *et al.*, 1997; Beattie *et al.*, 1998). Des Weiteren stellt die Transfektion von Telomerase-negativen humanen Fibroblasten mit einer *hTERT* cDNA die Telomeraseaktivität wieder her (Nakayama *et al.*, 1998). Aufgrund der Tatsache, dass die RNA Untereinheit der Telomerase *hTERC* ubiquitär exprimiert wird (Avilion *et al.*, 1996), verdeutlichen diese Befunde, dass die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase *hTERT* als limitierender Faktor für die Telomeraseaktivität anzusehen ist.

Der *hTERT* Promotor hat weder TATA- noch CAAT-Boxen, ist jedoch GC-reich (Cong *et al.*, 1999; Wick *et al.*, 1999). Diese Regionen bilden lange CpG-Inseln im Bereich des ATG-Startkodons. Der Promotor weist zahlreiche Bindungsstellen für verschiedenste Transkriptionsfaktoren auf.

Das Onkoprotein *c-myc* war der erste Transkriptionsfaktor, der als Aktivator der *hTERT* Expression identifiziert wurde (Wang *et al.*, 1998). *c-myc* ist ein Onkogen, das bei Proliferations- und Differenzierungsprozessen eine zentrale Rolle spielt (Grandori *et al.*,

2000). Die Mitglieder der *myc* Genfamilie kodieren für Transkriptionsfaktoren mit einer Aktivierungsdomäne am N-Terminus und einem basischen *Helix-loop-Helix-Zipper* (bHLHZ) am C-Terminus. *c-myc* bindet als Heterodimer mit *max*, einem weiteren bHLHZ Protein, an E-Box Sequenzen (CACGTG) der Zielgen-Promotoren.

Der Transkriptionsfaktor Sp1 bindet an GC-Boxen von Promotoren und aktiviert deren Expression. Sp1 kann mit *c-myc* kooperieren und die *hTERT* Expression zelltypspezifisch aktivieren (Kyo *et al.*, 2000).

Über Deletionsanalysen des *hTERT* Promotors wurde ein 181 bp langer Kern-Promotor aufwärts des Transkriptionsstarts identifiziert, der essentiell für die transkriptionelle Aktivierung von *hTERT* ist (Takakura *et al.*, 1999). Sequenzanalysen haben gezeigt, dass dieser 181 bp Kern-Promotor eine E-Box bei -165 und fünf GC-Boxen, an die Sp1 bindet, enthält. Kyo *et al.* konnten demonstrieren, dass Mutationen in diesen potentiellen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zu einer signifikanten Abnahme der transkriptionellen Promotoraktivität führen (Kyo *et al.*, 2000).

Im Gegenzug führt die Überexpression von *myc/max* oder *Sp1* zu einer Aktivierung des *hTERT* Promotors. Man findet oft eine *c-myc* Überexpression in Telomerase-positiven Zellen wie immortalisierten oder Tumorzellen.

Das Heterodimer *mad1/max* ist der Gegenspieler zu *myc/max* und konkurriert um die Bindung an E-Box Elemente. Während der Differenzierung wird *mad1/max* *in vitro* induziert, was zu einer Inhibition der *hTERT* Expression führt (Güneş *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001).

Goueli und Janknecht zeigten, dass die Onkoproteine *her2/neu*, *ras* und *raf* die *hTERT* Promotoraktivität über den ETS Transkriptionsfaktor ER81 und ERK MAP Kinasen (*mitogen-activated protein*) stimulieren (Goueli und Janknecht, 2004). *Her2/neu* ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, dessen natürlicher Ligand bisher unbekannt ist. Der Rezeptor ist in vielen epithelialen Tumoren exprimiert, und zwar überexprimiert in 20-25 % aller Eierstock- und Brustkrebserkrankungen, 35-45 % aller pankreatischen Adenokarzinome und bis zu 90 % der colorektalen Karzinome (Baxevanis *et al.*, 2004). *ESX* gehört wie ER81 zu den ETS Transkriptionsfaktoren, wird ebenfalls über den *her2/neu* Signalweg induziert und ist mit Mammakarzinomen assoziiert (Chang *et al.*, 1997; Eckel *et al.*, 2003).

Inzwischen wurden zahlreiche weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert, die die *hTERT* Expression zelltypspezifisch regulieren. Dazu gehören E2F-1 (Crowe *et al.*, 2001), WT-1 (Oh *et al.*, 1999), STAT3 (Konnikova *et al.*, 2005) und MZF-2 (Fujimoto *et al.*, 2000).

Bezüglich der Rolle des Tumorsuppressor Proteins p53 ist es nicht eindeutig, ob p53 die *hTERT* Expression beeinflusst. Einerseits wurde veröffentlicht, dass der Tumorsuppressor p53 die *hTERT* Expression inhibiert (Kusumoto *et al.*, 1999; Kanaya *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000b). Diese Inhibition der *hTERT* Expression könnte über die kompetitive Bindung von p53 an den *hTERT* Aktivator Sp1 erfolgen, so dass auf diese Weise die Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 an den *hTERT* Promotor verhindert wird (Kanaya *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000b).

Lin und Elledge haben andererseits postuliert, dass eine Inhibition der *p53* Expression in einer Aktivierung des *hTERT* Promotors resultieren müsste. Über *p53* siRNA in Telomerase-negativen U2OS-Zellen konnte jedoch kein Effekt von p53 auf die *hTERT* Expression festgestellt werden (Lin und Elledge, 2003).

Virale Onkoproteine wie E6 des humanen Papillomavirus 16 (Klingelutz *et al.*, 1996), Steroidhormone wie z. B. der Östrogenrezeptor (Kyo *et al.*, 1999; Misiti *et al.*, 2000) aber auch Substanzen, die antiproliferativ oder differenzierend wirken, wie Interferon- α (Xu *et al.*, 2000a) oder TGF- β (Yang *et al.*, 2001) können die *hTERT* Expression unterdrücken.

1.5.2. Posttranskriptionelle Modifikationen und epigenetische Mechanismen

Das *hTERT* Gen ist auf Chromosom 5p15.33 lokalisiert, und zwar in der distalsten Bande auf dem p-Arm von Chromosom 5 (Bryce *et al.*, 2000). Es besteht aus 16 Exons und 15 Introns und umfasst einen Bereich von über 35 kbp (Cong *et al.*, 1999; Wick *et al.*, 1999). Beim Menschen gibt es verschiedene Spleißvarianten des *hTERT* Gens (Kilian *et al.*, 1997), wobei nur die ungespleißte Variante des *hTERT* Proteins mit Telomeraseaktivität assoziiert ist (Ulaner *et al.*, 2000). Die verschiedenen *hTERT* Varianten werden gewebsspezifisch während der Embryogenese und im adulten Menschen exprimiert (Ulaner *et al.*, 2001). Eines dieser Spleißprodukte, *hTERT* α , trägt eine Deletion in der katalytischen Domäne des Proteins und wirkt als dominant-negativer Inhibitor der Telomeraseaktivität, wenn es in Telomerase-positiven Zellen überexprimiert wird. (Colgin *et al.*, 2000; Yi *et al.*, 2000). Diese Befunde deuten auf eine Beteiligung alternativen Spleißens an der Regulation der Telomeraseaktivität hin.

Posttranslationale Modifikationen der Telomerase wie der subzelluläre Transport, die Zusammenlagerung des Telomerase Ribonukleoproteins und die Zugänglichkeit der Telomere für die Telomerase beeinflussen ebenfalls die Telomeraseaktivität.

In den letzten Jahren wurde zunehmend die Beteiligung epigenetischer Mechanismen an der *hTERT* Genregulation untersucht.

Veränderungen der Chromatinstruktur können die Expression von Genen aktivieren oder inhibieren. Zu den Modifikationen gehören posttranslationale Modifikationen der Histone und der DNA wie Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung. Dieses *chromatin remodeling* beeinflusst die Dichte des Chromatins, also des aufgelockerten euchromatischen (aktive Gene) bzw. dicht gepackten heterochromatischen (inaktive Gene) Zustandes, sowie die Zugänglichkeit der Promotoren für Transkriptionsfaktoren.

In der Regel führt die Acetylierung von Histonen durch Histon-Acetyltransferasen zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität, während die Deacetylierung der Histone mittels Histon-Deacetylasen die Genexpression inhibiert.

Im Zusammenhang mit der epigenetischen Regulation des *hTERT* Promotors konnte demonstriert werden, dass eine Überexpression der *Histon-Deacetylase 1* zu einer Abnahme der *hTERT* Expression und Telomeraseaktivität führt (Hou *et al.*, 2002).

Trichostatin A (TSA) inhibiert reversibel Histon-Deacetylasen, was zu einer Histon-Hyperacetylierung und somit Auflockerung des Chromatins führt (Yoshida *et al.*, 1990). Wenn normale Zellen mit TSA behandelt werden, wird der *hTERT* Promotor durch die daraus resultierende Histon-Hyperacetylierung gezielt induziert (Takakura *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

Die Methylierung von Promotoren durch DNA-Methyltransferasen in CG-reichen Abschnitten, den so genannten CpG-Inseln, kann zu einer Inhibition der Genexpression, *gene silencing*, führen (Keshet *et al.*, 1986).

Der *hTERT* Promotor besitzt mehrere CpG-Inseln im Bereich des ATG-Startkodons (Cong *et al.*, 1999; Wick *et al.*, 1999), die eine Regulation des Promotors über Methylierung vermuten lassen. Allerdings gehen die Meinungen bezüglich einer Regulation der *hTERT* Expression über den Methylierungsstatus im Promotorbereich auseinander.

Devereux *et al.* haben das Methylierungsmuster des *hTERT* Promotors in 37 Zelllinien, darunter normale, immortalisierte und Tumorzellen, untersucht (Devereux *et al.*, 1999). Es

konnte kein genereller Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und *hTERT* Expression festgestellt werden (Devereux *et al.*, 1999; Dessain *et al.*, 2000).

Allerdings konnte demonstriert werden, dass eine Behandlung von Telomerase-negativen ALT-Zellen mit 5' Azacytidin (5' Aza), einem Inhibitor der DNA-Methyltransferasen, die *hTERT* Expression induziert (Devereux *et al.*, 1999; Dessain *et al.*, 2000).

Guilleret *et al.* zeigten dagegen, dass eine Hypermethylierung des *hTERT* Promotors zu seiner Aktivierung führt (Guilleret *et al.*, 2002). Dies steht im Kontrast zu der allgemeinen Annahme, dass Hypermethylierung eher *gene silencing* auslöst (Keshet *et al.*, 1986).

Epigenetische Mechanismen spielen sicherlich bei der Regulation der Telomeraseaktivität eine Rolle, wenn auch eine untergeordnete. Die hauptsächliche Regulation findet über Transkriptionsfaktoren statt, die die *hTERT* Expression steuern.

1.6. Telomerase und Telomere als Angriffspunkt in der Krebstherapie

Da die Telomerase normalerweise in humanen somatischen Zellen unterdrückt wird aber in den meisten Tumoren hochreguliert ist (Kim *et al.*, 1994), kann sie nicht nur als diagnostischer Marker dienen, sondern auch als ideales Ziel in der Krebstherapie angesehen werden (Weise und Güneş, 2006).

Telomerase Inhibitoren würden nur diejenigen Zellen im Organismus betreffen, die Telomerase-positiv sind, also primär die Krebszellen.

Auf der anderen Seite können auch die Telomere selber Ziel in der Krebstherapie sein. Die Telomerlänge in Tumorzellen ist trotz Telomeraseaktivität in der Regel kürzer als in den entsprechenden normalen Zellen (Wu *et al.*, 2003; Gertler *et al.*, 2004), und die hochproliferativen Tumorzellen müssen ihre Telomerstruktur bei jeder Mitose neu aufbauen. Daher bieten Agenzien, die die Telomerstruktur verändern und dadurch ihre wichtigste Funktion, die Kappenstruktur, beeinträchtigen, einen weiteren viel versprechenden Ansatz. Bei Verlust der schützenden Telomer-Kappe an den Chromosomenenden werden DNA-Reparaturmechanismen ausgelöst, die die Zelle in die Seneszenz oder Apoptose führen.

Es gibt verschiedene Ansatzpunkte in der Krebstherapie, die die Telomerase oder Telomere zum Ziel haben (Kelland, 2005):

- Inhibition der Telomerase
- Änderung der Telomerstruktur und -funktion
- Gentherapie
- Telomerase Immuntherapie

1.7. Telomerase im Mausmodell

Im Vergleich zu humanen Geweben unterliegt die murine *TERT* (*mTERT*) Expression einer weniger stringenten Kontrolle. Die meisten Gewebe weisen *mTERT* Expression und Telomeraseaktivität auf (Prowse und Greider, 1995). Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass primäre Mauszellen im Gegensatz zu humanen Primärzellen relativ leicht spontan immortalisieren.

Eine Hypothese für die unterschiedliche Regulation der Telomerase bei Mensch und Maus postuliert, dass in der Maus kein Selektionsdruck in Richtung Inhibition der Telomerase besteht, da diese Tiere in ihrer relativ kurzen Lebensspanne verglichen zum Menschen kaum Tumore entwickeln (Wright und Shay, 2000). Größere und durchschnittlich länger lebende Organismen (Mensch) haben stochastisch gesehen eine höhere Wahrscheinlichkeit, Mutationen zu akkumulieren, die zur Tumorentstehung beitragen können, als kleinere, kurzlebige Lebewesen (Maus).

Auf molekularer Ebene lässt sich die unterschiedliche Regulation der humanen und murinen *TERT* Expression mit der geringen Sequenzhomologie der beiden Promotoren erklären (Fig. 1.6.) (Greenberg *et al.*, 1998).

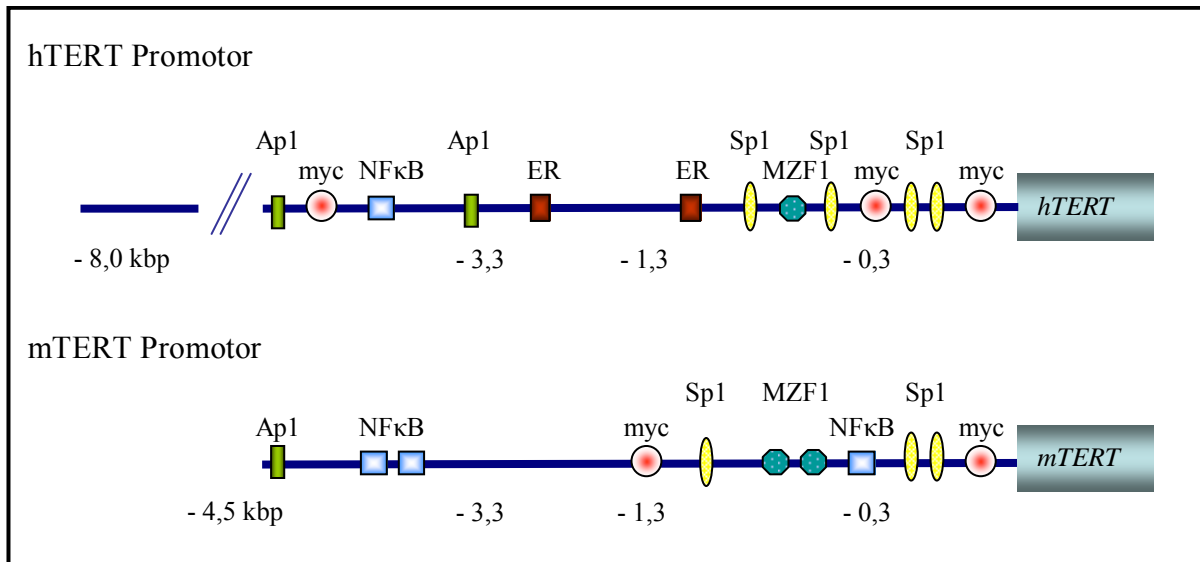


Fig. 1.6.: Schematische Darstellung des humanen und murinen TERT Promotors.

Ein 8,0 kbp und 4,5 kbp Promotorfragment des hTERT bzw. mTERT Promotors sind abgebildet. Einige putative Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die den TERT Promotor regulieren, sind eingezeichnet. Nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Horikawa *et al.* fanden über Mutationsanalysen heraus, dass der hTERT im Gegensatz zum mTERT Promotor eine nicht konservierte GC-Box enthält, die für die humanspezifische Unterdrückung der *hTERT* Expression verantwortlich ist (Horikawa *et al.*, 2005). Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass eher Unterschiede in der Promotor-Sequenz (*cis*-Regulation) als verschiedene Transkriptionsfaktoren (*trans*-Regulation) für die speziesspezifische Expression von *TERT* verantwortlich sind. Die Tatsache, dass Transkriptionsfaktoren und regulatorische Signalwege bei der Proliferation oder Differenzierung in der Regel zwischen den Spezies hoch konserviert sind, stützt ebenfalls die Annahme, dass Expressionsunterschiede auf die jeweiligen Bindestellen der Promotoren für Transkriptionsfaktoren zurückzuführen sind.

Mitte der 90'er Jahre war zunächst nur die RNA Untereinheit der Telomerase in der Maus bekannt, während das murine *TERT* Gen noch nicht kloniert war. Um die Funktion der Telomerase *in vivo* zu untersuchen, wurde daher eine *knock-out* Maus für die RNA Komponente der Telomerase *mTERC* generiert (Blasco *et al.*, 1997). Entgegen der ersten Erwartungen waren die Mäuse lebensfähig. Sie zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp, obwohl vermutet wurde, dass eine funktionelle Telomerase essentiell für die Replikation sei. Da zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt war, dass Mäuse relativ lange Telomere besitzen (Kipling und Cooke, 1990), wurden *mTERC*^{-/-} Mäuse in der Hoffnung untereinander verpaart, dass der Effekt der fehlenden Telomerase auf die Telomerefunktion und die genetische

Stabilität verzögert auftritt. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass sich die Verkürzung der Telomere in den *mTERC*^{-/-} Mäusen von Generation zu Generation auf $4,8 \pm 2,4$ kbp beläuft. In aufeinander folgenden Generationen treten gravierende Phänotypen auf, vor allem in Organen mit hohem Proliferationsindex (Lee *et al.*, 1998). So sind die Mäuse ab der sechsten Generation aufgrund von Defekten in der Spermatogenese infertil. Des Weiteren ist die Proliferationskapazität hämatopoetischer Zellen des Knochenmarks und der Milz reduziert. Rudolph *et al.* demonstrierten in späten *mTERC*^{-/-} Generationen, dass die Tiere verglichen mit Wildtyp Mäusen eine geringere Lebenserwartung, verminderte Stressantwort, langsamere Wundheilung und Merkmale von Alterung wie graue Haare zeigen (Rudolph *et al.*, 1999). Diese Prozesse gehen mit einer zunehmenden genetischen Instabilität einher, die zu Chromosomenfusionen oder Aneuploidie führt (Blasco *et al.*, 1997). In den *mTERC*^{-/-} Mäusen treten trotz fehlender Telomeraseaktivität in späten Generationen spontan Tumore auf (Rudolph *et al.*, 1999). Diese Tumore erhalten wahrscheinlich ihre Telomerfunktion, indem sie den ALT-Mechanismus aktivieren (Niida *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2003).

Der Verlust der Telomerfunktion und die daraus resultierende genetische Instabilität tragen zur Tumorentstehung bei. Damit konnte die Rolle der Telomerase für die Replikation und die Telomer-Hypothese der Krebsentstehung belegt werden.

1.8. hTERTp-*lacZ* Mausmodell

Die Maus, als relativ leicht zu handhabendes Säugetier, bietet einen zweckmäßigen und beliebten Modellorganismus für zahlreiche medizinische Fragestellungen.

Jedoch ist das Mausmodell für Analysen bezüglich der Regulation der Telomerase, um anschließend Rückschlüsse auf die humane Regulation zu ziehen, nur bedingt geeignet, da ihre Aktivität zwischen Mensch und Maus erhebliche Unterschiede aufweist. Der Grund dafür liegt primär an der speziesspezifischen Expression des murinen und humanen *TERT* Gens (Wright und Shay, 2000).

In Vorarbeit zu dieser Dissertation wurde von Dr. Çağatay Güneş (Heinrich-Pette-Institut) ein transgenes Mausmodell etabliert, das das bakterielle *lacZ* Reportergen unter der Kontrolle eines 8,0 kbp langen hTERT Promotorfragments (hTERTp-*lacZ*) exprimiert (Fig. 1.7.). Der humane *TERT* Promotor kann in diesen Tieren *in vivo* und unter physiologischen Bedingungen analysiert werden (Ritz *et al.*, 2005).

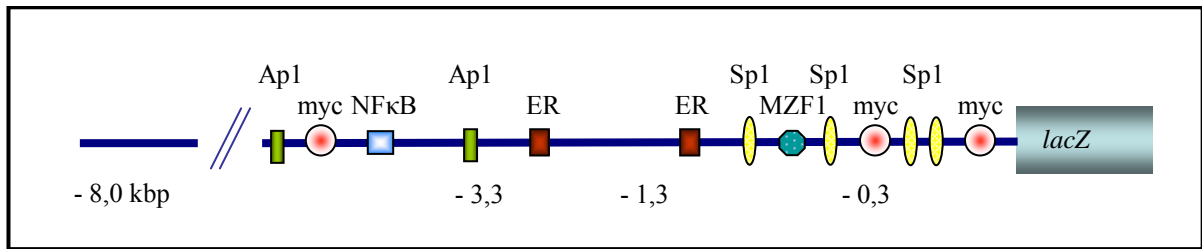


Fig. 1.7.: hTERTp-*lacZ* Konstrukt.

Ein 8,0 kbp langes Fragment des humanen TERT Promotors wurde vor das *lacZ* Reportergen kloniert. Einige putative Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind eingezeichnet. Nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Das Verständnis über die Regulation der *TERT* Expression als limitierender Faktor für die Telomeraseaktivität ist sehr wichtig, wenn man bedenkt, dass die Telomerase in 90 % aller humanen Tumore aktiviert wird (Kim *et al.*, 1994; Meyerson *et al.*, 1997). Allerdings ist die Krebsforschung aus ethischen Gründen auf Zellkultur- oder Tiermodelle beschränkt. Der Nachteil an Zellkulturarbeiten ist, dass die Zellen losgelöst aus ihrem Gewebeverband *in vitro* gehalten werden, so dass die Einflüsse von dem sie normalerweise umgebenden Gewebe nicht berücksichtigt werden können. Daher bietet das transgene hTERTp-*lacZ* Mausmodell in Kombination mit murinen Tumormodellen ein hervorragendes System, um die Regulation des humanen TERT Promotors während der Embryogenese, der Differenzierung und der Tumorgenese zu untersuchen.

2. Fragestellung

Das Verständnis über die der Telomeraseregulation zugrunde liegenden Mechanismen ist für die Krebsforschung von zentraler Bedeutung. In nahezu allen humanen Tumoren wird die Telomeraseaktivität induziert, während sie in normalen somatischen Zellen inhibiert wird (Kim *et al.*, 1994). Daher bieten die Telomerase bzw. die Telomere einen hervorragenden Angriffspunkt in der Krebstherapie.

Die Regulation der Telomeraseaktivität erfolgt im Wesentlichen über die Expression des *hTERT* Gens, das für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert. Aus diesem Grund ist es essentiell, die genauen Regulationsmechanismen der *hTERT* Expression zu kennen.

Um den humanen TERT Promotor unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell generiert, bei dem das *lacZ* Reportergen unter der Kontrolle eines 8,0 kbp Promotorfragments des humanen *TERT* Gens exprimiert wird. Ziel dieser Arbeit war es, die *hTERTp-lacZ* transgenen Mäuse auf ihre Eignung hinsichtlich der *in vivo* Analyse der Aktivität des humanen TERT Promotorfragments zu charakterisieren. Dazu sollte zuerst überprüft werden, ob sich die *hTERT* Promotoraktivität in den transgenen Mäusen eher wie die *hTERT* Expression beim Menschen oder wie die endogene *mTERT* Expression verhält.

Nur wenn sich der *hTERT* Promotor in Organen transgener Mäuse während der Differenzierung und der Tumorgenese „human-ähnlich“ verhält, ist dieses Modell geeignet, um die Regulation des humanen TERT Promotors in diesem System zu untersuchen.

Die Expressionsanalysen des *lacZ* Reportergens sollen in zwei transgenen *hTERTp-lacZ* Mauslinien, 6340.3 und 6335.5, durchgeführt werden. Neben der RT-PCR Analyse der Transgen Expression in ganzen Organen soll darüber hinaus dessen zelltypspezifische Expression in ausgewählten Organen, die beim Menschen *hTERT* exprimieren, kontrolliert werden.

In einem Mausmodell für spontane Mammakarzinome soll überprüft werden, ob der *hTERT* Promotor während der Tumorgenese aktiviert wird. Dazu werden bitransgene Mäuse, *hTERTp-lacZ / p53^{+/-} / BALB/c*, generiert, die heterozygot für das Tumorsuppressor Gen *p53* sind. *p53* heterozygote Tiere entwickeln im BALB/c Hintergrund überwiegend Mammakarzinome (Kuperwasser *et al.*, 2000).

Abschließend soll diskutiert werden, welche der beiden hTERTp-*lacZ* transgenen Mauslinien geeigneter für die Analyse des humanen TERT Promotors *in vivo* ist und welche Anwendungsmöglichkeiten das hTERTp-*lacZ* Mausmodell für das Verständnis der Regulation der Telomerase bietet.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Brutschrank B6060	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Entwicklermaschine	Classic E.O.S. AGFA, Köln
Eismaschine AF 30	Scotsman, Vernon Hills, USA
Feinwaage H54AR	Mettler Toledo, Gießen
Fettstift	DakoCytomation, Glostrup, DK
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher & Schüll, Dassel
Gamma-Zähler LS 6500	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Gefriertruhe -80 °C	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Geldokumentation BioDocAnalyse	Whatman Biometra, Göttingen
Gelkammer Prot. Resolve Maxi DC	Phase, Lübeck
Gelkammer Model 40-0911	Peqlab, Erlangen
Gelkammer Horizon 11.14	Whatman Inc., Dassel
Geltrockner G2000	Fröbel Labortechnik, Lindau
Handschuhe Latex, Nitril	Kimberly-Clark, Zaventem, B
Heizblock Techne Dri-Block DB 2A	Thermo-Dux, Wertheim
Homogenisator Fast Prep FP120	Qbiogene, Heidelberg
Homogenisator-Röhrchen Fast Prep Tubes	Qbiogene, Heidelberg
Imaging Plate Bas-IP MP2040P	Fuji Magnetics, Kleve
Inkubationsschüttler Multitron 2	Infors AG, Bottmingen-Basel, CH
Kühlfalle RT100A	Savant Instruments, Farmingdale NY, USA
Kühlschrank 4-8 °C	Liebherr, Biberach
Magnetrührer COMBIMAG NEO	IKA, Staufen
Magnetrührer MR2002	Heidolph, Schwabach
Membran-Vakuumpumpe MZ2C/1,7	Vakuubrand, Wertheim
Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Mikroskop CK40	Olympus, Hamburg

Mikrotom HM 350 SV	Microm, Walldorf
Mikrowelle NN3256	Panasonic, Hamburg
Mini-Transilluminator	BioRad, München
NAP™5 Säulen, Sephadex™ G-25	Amersham pharmacia biotech, NY, USA
Orbitalschwenker Polymax 2040	Heidolph, Schwabach
Paraffingießstation AP 280-2	Microm, Walldorf
PCR Gefäße 0,2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf
PCR Maschine PTC-200	MJ Research, Watertown MA, USA
pH-Meter PHM82 Standard	Radiometer, Kopenhagen, DK
Phosphoimager Bas 2500	Fuji Magnetics, Kleve
Pipetten 20, 200, 1000 µl	Gilson, Bad Camberg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Reaktionsgefäße 1,5, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenz- und Zentrifugenröhren 15, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme	CEA Deutschland GmbH, Hamburg
Polytron	Kinematica AG, Littau-Luzern, CH
Reinstwassersystem Milli-Q® Academic	Millipore, Schwalbach
Schwenker GFL3015	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Spectrophotometer Ultrosec 3000pro	Amersham pharmacia biotech, NY, USA
Stereolupe Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Sterilbank HERA safe KS18	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Sterilbank HERA safe KS12	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Stromversorgungsgerät EPS 2A 200	Hofer, San Francisco CA, USA
Stromversorgungsgerät Power Pac 300	BioRad, München
Stromversorgungsgerät Power Pac 3000	BioRad, München
Superfrost-Objektträger	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Szintillationszähler LS 5000 TD	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank -20 °C	Liebherr, Biberach
Vakuum Gewebeeinfiltrationsaut. ASP 3000	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Vibratom VT 1000 S	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Vortexer Vortex-Genie	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Waage PE360	Mettler Toledo, Gießen

Waage PM460	Mettler Toledo, Gießen
Waage PB3001-S/FACT	Mettler Toledo, Gießen
Wasserbad GFL1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Wasserbad	Technicon Instruments, Tarrytown NY, USA
Zellkulturschalen	Nunclon™ Surface, Nunc, Roskilde, DK
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Zentrifuge RC50 Plus	Sorvall, Bad Homburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 4 °C 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 4 °C 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Omnifuge 2.0RS	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Zentrifuge Rotana 96	Hettrich Zentrifugen, Tuttlingen

3.1.2. Chemikalien

Die handelsüblichen Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Seelze), Gibco (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen. Des Weiteren wurden folgende Reagenzien benötigt:

Ampicillin	USB Corporation, Cleveland, USA
[γ -P ³²] ATP	Hartmann Analytics, Braunschweig
5' Azacytidin	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
[α -P ³²] dCTP	Hartmann Analytics, Braunschweig
Bradford Reagenz	BioRad, München
ChemMate™ Antibody Diluent	DakoCytomation, Glostrup, DK
ChemMate™ DAB-Chromogen (50 x)	DakoCytomation, Glostrup, DK
ChemMate™ Peroxidase-Blocking	DakoCytomation, Glostrup, DK
ChemMate™ Protein Block	DakoCytomation, Glostrup, DK
Chloroquin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DMEM	Gibco (Invitrogen GmbH), Karlsruhe
DMSO	Calbiochem, San Diego, USA
Eosin Y solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Eukitt	Kindler GmbH & Co, Freiburg
Formaldehydlösung, min. 37 % säurefrei	Merck, Darmstadt

L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, A
Human Total RNA Master Panel II	BD Biosciences, Palo Alto CA, USA
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Natrium-Pyruvat-Lösung	PAA Laboratories, Pasching, A
nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco (Invitrogen GmbH), Karlsruhe
Paraffin Typ 3 (Automat)	Richard-Allan Scientific, Kalamazoo MI, USA
Paraffin Typ 6 (Gießstation)	Richard-Allan Scientific, Kalamazoo MI, USA
peqGOLD dNTP-Set (je 25 µmol)	Peqlab, Erlangen
Penicillin / Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Trichostatin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TUF Target Unmasking Fluid (3 x)	PanPath, Amsterdam, NL
X-Gal	Peqlab, Erlangen

Enzyme:

Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
T4 Polynukleotid-Kinase	Gibco, (Invitrogen GmbH), Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg
Trypsin (1:250) 2,5 % (w/v)	Biochrom AG, Berlin

Größenstandards:

Gene Ruler™ 100 bp DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler™ 1 kbp DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.3. Kits

ChemMate™ DAKO Envision™ Detection Kit	DakoCytomation, Glostrup, DK
peqGOLD RNA PURE solution	Peqlab, Erlangen
ThermoScript™ RT-PCR System	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TRAPeZe Telomerase Detection Kit	Qbiogene, Heidelberg
Turbo DNA-free™	Ambion, Austin TX, USA

3.1.4. Lösungen und Puffer

DEPC-H₂O:	0,1 % (v/v) DEPC in H ₂ O _{deion.} über Nacht RT, autoklavieren
DMEM + 10 % FCS:	13,38 g/l DMEM-Pulver 3,7 g/l NaHCO ₃ in H ₂ O _{deion.} , pH 7,3 sterilfiltrieren 10 % (v/v) FCS
5 x DNA-Gelladepuffer:	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 30 % (v/v) Glycerol
Gelatine-Albumin-Mix:	2,2 g Gelatine in 450 ml PBS unter Hitze lösen + 135 g Rinderalbumin über Nacht bei RT rühren + 90 Saccharose Aliquots bei -20 °C lagern
MAF-Medium:	500 ml DMEM 10 % FCS 5 ml 1 M HEPES 5 ml 100 x nicht-essentielle Aminosäuren 5 ml 100 x L-Glutamin 5 ml 100 x Pen/Strep 5 ml Natrium-Pyruvat
Mowiol:	12 g Polyvinylalkohol 84 ml H ₂ O _{deion.} 6 ml 1 M Tris, pH 8,5 über Nacht bei RT rühren + 30 g Glycerol Zentrifugation für 20 min bei 4000 rpm Aliquots bei -20 °C lagern

10 x PBS:	1,37 M NaCl 0,027 M KCl 0,08 M Na ₂ HPO ₄ 0,015 M KH ₂ PO ₄
5 x RNA-Gelladepuffer:	50 % (v/v) Glycerol 1 Spatelspitze Bromphenolblau 1 x Gebrauchslösung: 3 µl 5 x RNA-Gelladepuffer 12 µl Formamid 2 µl RNA
TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat, pH 8,0 1 mM EDTA
TBE-Puffer:	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA, pH 8,0
10 x TBST:	0,2 M Tris-HCl, pH 7,4 1,37 M NaCl pH 7,6 einstellen 1 % (v/v) Tween 20
TE:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
Trypsin / EDTA:	0,1 % (w/v) Trypsin 0,5 mM EDTA in 1 x PBS

X-Gal Färbelösung:

- 5 mM $K_3Fe(CN)_6$
- 5 mM $K_4Fe(CN)_6$
- 2 mM $MgCl_2$
- 0,01 % Natriumdesoxycholat
- 0,02 % NP-40
- 1 mg/ml X-Gal (in DMFA)
- in 1 x PBS, pH 8,0

3.1.5. Antikörper

Folgende Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Detektion von Proteinen in der Immunhistologie eingesetzt:

anti- β -Gal (Promega): monoklonal Maus, 1:500 bis 1:100 verdünnt

anti-hTERT 2C4 (ab5181 abcam): monoklonal Maus

3.1.6. Plasmide

Folgende Plasmide wurden experimentell eingesetzt:

pSKT-NLS-*lacZ*: *lacZ* Gen mit NLS am N-Terminus (Shahragim Tajbakhsh)

pBABE Puro-*hTERT*: *WT-hTERT* cDNA (Robert Weinberg)

pGRN190-*mTERT*: *mTERT* cDNA (Geron Corporation)

pSKT-hTERTp-*lacZ*: 8,0 kbp hTERT Promoter vor das *lacZ* Gen kloniert
(Çağatay Güneş)

3.1.7. Primer

Folgende Primer wurden für PCR-Analysen eingesetzt:

Tab. 3.1.: Primer.

Primer	Sequenz 5' → 3'	PCR-Produkt	Zyklen (radioaktiv)
<i>GAPDH</i> -For <i>GAPDH</i> -Rev	ACCACAGTCCATGCCATCAC TCCACCACCCTGTTGCTGTA	452 bp	23 (19)
<i>hTERT</i> -For <i>hTERT</i> -Rev	TCTGGATTTGCAGGTGAACAGCC GGGTGGCCATCAGTCCAGGATGG	451 bp	33 (28)
<i>mTERT</i> -For <i>mTERT</i> -Rev	ATGGCGTTCCTGAGTATGGGTGC ACTTCAACCGCAAGACCGAGAGG	279 bp	33 (28)
<i>lacZ</i> -For <i>lacZ</i> -Rev	ATCAGCGATTTCCATGTTGCC AGACCATTTTCAATCCGCACC	358 bp	33 (25)
<i>her2</i> -For <i>her2</i> -Rev	TGCGGGAGCTGCAGCTTCGAA CTTCTTGCAGCCAGCAAATC	698 bp	33
<i>ER81</i> -For <i>ER81</i> -Rev	CAGTGCCTATGATCAGAAGC CAGCTAGGCACTTCTGAGTC	453 bp	33
<i>c-myc</i> -For <i>c-myc</i> -Rev	GCTACGTCCTTCTCCCAA TTCCAGCTCCTCCTCGAGTTAGG	1117 bp	33
<i>ESX</i> -For <i>ESX</i> -Rev	AGCTCAGAAGACCCACCCCTG CTCCAGCAGCTCGATGATCCA	372 bp	33
<i>p53</i> Status: Primer-Mix: <i>p53EVI</i> -For <i>p53EVII</i> -Rev	<i>p53EVI</i> -For, <i>p53EVII</i> -Rev <i>NEOI</i> -For, <i>NEOII</i> -Rev CAGACTTTTCGCCACAGCGTGG GGTAAGGATAGGTCGGCGGTTC	gen. DNA: 520 bp cDNA: 130 bp 330 bp	35
<i>NEOI</i> -For <i>NEOII</i> -Rev	CGCTTGGGTGGAGAGGCTATTC CAGCCGCCGCATTGCATCAGC		

3.1.8. Eukaryotische Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

- HeLa: humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (ATCC: CCL-2™)
- selbst etablierte primäre Maus embrionale Fibroblasten (MEF's) und Maus adulte Fibroblasten (MAF's) (s. 3.5.3.)

3.1.9. Mammalia

Die Mäuse wurden unter spezifisch Pathogen-freien Bedingungen gehalten. Folgende Mausstämme und -linien wurden verwendet:

- C57BL/6J (Jackson Tierhaltung, USA)
- BALB/c (Jackson Tierhaltung, USA)
- $p53^{+/-}$ / BALB/c (Jacks *et al.*, 1994)
- 6340.3 / C57BL/6J: pSKT-hTERTp-*lacZ*
- 6335.5 / C57BL/6J: pSKT-hTERTp-*lacZ*
- 6340.3 / BALB/c: pSKT-hTERTp-*lacZ*
- 6335.5 / BALB/c: pSKT-hTERTp-*lacZ*

Für die Untersuchung des humanen *TERT* Promotors *in vivo* wurde ein transgenes Mausmodell von Dr. Çağatay Güneş generiert, das das *lacZ* Reportergen unter der Kontrolle eines 8,0 kbp langen hTERT Promotorfragments (hTERTp-*lacZ*) enthält. Die Charakterisierung der Aktivität des hTERT Promotors sowohl in normalen adulten Organen als auch während der Tumorgenese in den zwei transgenen Mauslinien 6340.3 und 6335.5 war Gegenstand dieser Arbeit (Ritz *et al.*, 2005).

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. RNA-Isolierung und RT-PCR

Humane Gewebeproben für die RNA-Isolierung und den *TRAP assay* wurden freundlicherweise von Dr. Bence Sipos (Universität Kiel, Institut für Pathologie) zur Verfügung gestellt.

Für die Isolierung von RNA aus murinen oder menschlichen Organen bzw. Zellen wurden 20 bis 50 mg Gewebe oder etwa 10^6 Zellen in 1 ml peqGOLD RNA PURE Solution homogenisiert. Im Falle der Gewebe erfolgte dies mit Hilfe eines Polytrons oder Fast Prep-Gerätes. Anschließend wurde die RNA wie im Protokoll von Peqlab beschrieben präpariert. Um mögliche Kontamination der RNA mit DNA zu vermeiden, wurde ein DNaseI-Verdau mit Turbo DNA-freeTM durchgeführt.

Die Qualität der RNA wurde in einem 1 %igen Agarosegel mit TBE-Puffer überprüft, wobei die Sekundärstrukturen durch 5 minütiges Erhitzen der RNA auf 70 °C im Ladepuffer aufgeschmolzen wurden.

Die reverse Transkription der RNA in Erst-Strang cDNA erfolgte mit dem ThermoScript™ RT-PCR System Kit, wobei 1 µg RNA bzw. gleiche geschätzte Menge anhand des Gels eingesetzt wurde.

Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 100 ng oligo(dT)₂₀ bei 50 °C für 1 h statt. Die Aktivität der reversen Transkriptase wurde durch 15 minütige Inkubation bei 75 °C gestoppt und die verbleibende RNA mit 2 Einheiten RNaseH für 20 min bei 37 °C verdaut. 2 µl der cDNA wurden für PCR-Analysen eingesetzt.

3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur RNA- bzw. DNA-Konzentrationsbestimmung wurde die Nukleinsäure in wässriger Lösung fotometrisch bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Purin- und Pyrimidinbasen) gemessen. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 einer Konzentration von 40 µg RNA/ml bzw. ssDNA und 50 µg dsDNA/ml.

Die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung wurde mit Hilfe des Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Bei 280 nm absorbieren aromatische Aminosäuren von Proteinen. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ein niedrigerer Wert deutet auf eine Verunreinigung der Lösung mit Proteinen hin.

3.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro*. Oligonukleotid-Primer, die komplementär zu der Ausgangs-DNA sind, flankieren den Bereich der Ausgangs-DNA, der vermehrt werden soll. Dazu bedarf es einer hitzestabilen DNA-Polymerase wie der Taq-Polymerase, die die DNA-Synthese bei hohen Temperaturen erlaubt. Im ersten Schritt der Reaktion wird die zu amplifizierende DNA bei 94 °C denaturiert, so dass die doppelsträngige DNA einzelsträngig wird.

Im zweiten Schritt wird die Temperatur gesenkt (je nach Primer 40-70 °C), um ein Hybridisieren der Oligonukleotid-Primer an die Ziel-DNA zu ermöglichen. In der darauf folgenden Elongationsphase (ca. 72 °C) synthetisiert die Taq-Polymerase ausgehend von den

Primern den komplementären Gegenstrang. Die Zahl der Amplifikate wächst exponentiell mit jedem PCR-Zyklus.

Für die Standard-PCR wurden folgende Komponenten eingesetzt:

1 x PCR-Puffer, dNTP's (0,2 mM), Primer For/Rev (0,2 μ M), 10 % DMSO, Taq-Polymerase (1 Einheit), ggf. 0,1 MBq [α -P³²] dCTP. 2 μ l der cDNA und als Positivkontrolle bis zu 10 pg Plasmid-DNA wurden für RT-PCR-Analysen eingesetzt.

Standard PCR-Programm:

94 °C 2 min (Initiale Denaturierung)	}	23 – 35 Zyklen
94 °C 30 sec (Denaturierung)		
55 °C 30 sec (Hybridisierung)		
72 °C 1 min (Elongation)		

Der lineare Bereich der Amplifizierung wurde für jede PCR im Vorwege bestimmt und lag bei kalten PCR's zwischen 23 und 35 Zyklen und bei radioaktiven PCR's zwischen 19 und 28 Zyklen. Der Vorteil radioaktiver PCR's ist, dass es sich um eine sehr sensitive Methode handelt, die eine Quantifizierung der PCR-Produkte erlaubt.

Im Anschluss an die PCR wurden die amplifizierten PCR-Produkte in einem Agarosegel (kalte PCR) bzw. einem 4 %igen PAA-Gel (radioaktive PCR) elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Detektion erfolgte mit Ethidiumbromid (kalte PCR) oder bei radioaktiven PCR's mit Hilfe von Röntgenfilmen oder einer „Imaging Plate“ im „Phosphoimager“. Die Expressionsmengen wurden auf das ubiquitäre Haushaltsgen *GAPDH* (Ercolani *et al.*, 1988) mit Hilfe des Programms TINA 2.0 (Raytest, Straubenhardt) normalisiert.

3.2.4. DNA-Gelelektrophorese

DNA wandert im elektrischen Feld aufgrund des negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats zum Pluspol. Als Matrix verwendet man meistens Agarosegele, die eine Auftrennung der DNA nach ihrem Molekulargewicht ermöglichen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA hängt von ihrer Größe und Faltung, der Agarosekonzentration, den Pufferbedingungen und der Stromstärke ab.

Lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle wandern mit einer Geschwindigkeit durch die Agarosematrix, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größen ist.

Für PCR-Analysen wurde der Ansatz mit 5 x Gelladepuffer versetzt und auf ein 1-2 %iges Agarosegel aufgetragen. Zur Gelherstellung wurde TAE oder TBE als Puffersystem benutzt. Zusätzlich enthielt das Agarosegel Ethidiumbromid (0,5 µg/ml), das in die DNA interkaliert, so dass sie unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 V/cm Gellänge.

Als Größenstandard dienten die „Gene Ruler™ 100 bp und 1 kbp“ DNA-Leitern.

3.2.5. DNA-Marker radioaktiv labeln

Der „Gene Ruler™ 100 bp“ Marker wurde radioaktiv markiert, um auch bei radioaktiven PCR's einen Größenstandard zur Verfügung zu haben.

Dazu wurde eine T4 Polynukleotid-Kinase verwendet. Das Enzym hat eine 5' Polynukleotid-Kinase- und eine 3' Phosphatase-Funktion. Es katalysiert den Transfer einer γ -Phosphatgruppe des [γ -P³²] ATP's auf eine 5' terminale Hydroxylgruppe des Oligonukleotids.

Die Reaktion fand mit 1 µg Marker-DNA, 5 µl 5 x „Exchange Reaction Buffer“, 1 MBq [γ -P³²] ATP, 10 Einheiten T4 Polynukleotid-Kinase in einem Volumen von 25 µl für 10 min bei 37 °C statt. Durch 10 minütiges Erhitzen auf 65 °C wurde die Kinase inaktiviert. Anschließend wurde der markierte Größenstandard über eine Säule, Sephadex™G-25, gereinigt.

Die Labeling-Effizienz wurde mit dem Szintillationszähler überprüft.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) assay

Bei dem „TRAPeze Telomerase Detection Kit“ handelt es sich um eine Weiterentwicklung der original beschriebenen Methode von Kim *et al.* (Kim *et al.*, 1994). Mit Hilfe des TRAP assay kann die Telomeraseaktivität in Zell- oder Gewebeertraktanten bestimmt werden.

Im ersten Schritt verlängert die Telomerase – wenn vorhanden – das 3'-Ende eines Substrat-Oligonukleotids (TS-Primer), indem TTAGGG Reste angehängt werden. In einem zweiten Schritt werden die verlängerten Oligonukleotide in einer PCR amplifiziert, so dass eine höhere Sensitivität erreicht wird. Je nach Prozessivität der Telomerase entsteht eine

Produktleiter, deren Sprossen sich um jeweils sechs Basenpaare Länge unterscheiden, beginnend mit 50 bp.

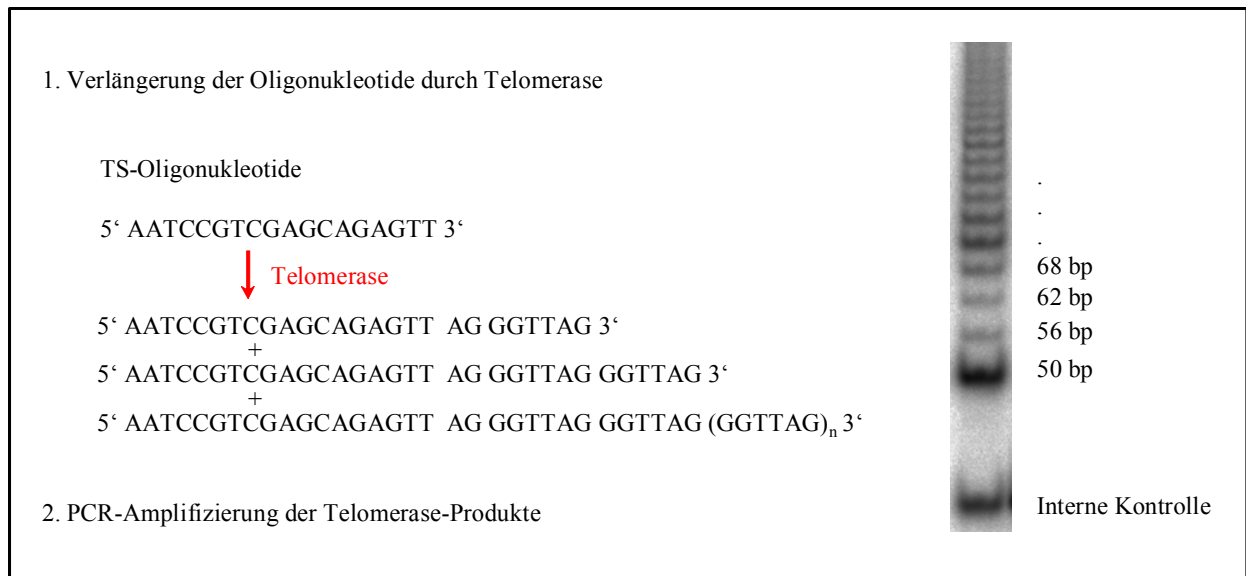


Fig. 3.1.: Schematische Darstellung des *TRAP* assay.

Die Präparation der Gewebe- bzw. Zellextrakte erfolgte wie im Protokoll beschrieben. Für den *TRAP* assay wurden zwischen 100 ng und 1 µg Gesamtprotein eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten Zellextrakte von HeLa Zellen, die eine hohe Telomeraseaktivität aufweisen. Als Negativkontrolle wurden einerseits eine mit Hitze inaktivierte Kontrolle (h. i.) (10 min bei 85 °C), da es sich bei der Telomerase um ein Hitze-sensibles Enzym handelt, und andererseits nur der CHAPS Lysispuffer, um mögliche Kontamination des Puffers mit Telomerase auszuschließen, eingesetzt.

Mit der internen Kontrolle bei 36 bp wird die Effizienz der PCR angezeigt. Wenn der interne Standard nicht amplifiziert wird, deutet das auf eine Inhibition der PCR hin. Dies spielt vor allem eine Rolle bei Zell- oder Gewebeextrakten, die Inhibitoren der Taq-Polymerase enthalten können und somit falsch-negative Ergebnisse erzeugen.

Es wurde die radioaktive Detektion der Telomerase-Produkte gewählt. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde nicht der TS-Primer radioaktiv markiert, sondern der Reaktion wurde [α -P³²] dCTP zugefügt, welches im Laufe der PCR eingebaut wird. Die PCR-Produkte wurden auf einem nicht-denaturierenden 10 %igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von Röntgenfilmen oder einer „Imaging Plate“ im „Phosphoimager“. Zur Auswertung wurde das Programm TINA 2.0 (Raytest, Straubenhardt) benutzt.

3.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration eines Zell- oder Gewebeeextraktes wurde eine Eichgerade im Bereich von 1 bis 10 µg mit BSA erstellt. Dazu wurden 1 bis 10 µg BSA in 800 µl H₂O_{deion.} mit je 200 µl Bradford-Reagenz versetzt (Bradford, 1976), und die OD₅₉₅ wurde nach 5 minütiger Inkubation photometrisch bestimmt. 5 µl der Zell- bzw. Gewebeeextrakte wurden mit 795 µl H₂O und je 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und photometrisch bei 595 nm vermessen. Mit Hilfe der Eichgeraden konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

3.4. Histologische Methoden

3.4.1. Vibratom-Einbettung

Frische Mausegewebe, die am Vibratom geschnitten werden sollten, wurden vorher in einer Gelatine-Albumin-Mixtur eingebettet. Dazu wurden 10 ml Gelatine-Albumin-Mix mit 700 µl 25 % Glutaraldehyd gemischt und in eine kleine Form gegossen. Das Gewebe wurde auf die ausgehärtete Fläche gegeben und mit neuem Gelatine-Albumin-Glutaraldehyd-Gemisch überschichtet. Die so entstandenen Blöcke wurden in das Vibratom eingespannt.

3.4.2. X-Gal Färbung von Hoden

Frisch isolierte Hoden von hTERTp-*lacZ* transgenen Mäusen und Wildtyp Mäusen als Negativkontrolle wurden für zwei Stunden in 4 %iger Formaldehydlösung (in PBS, pH 8,0) fixiert, in Gelatine-Albumin-Mix eingebettet und am Vibratom (100-150 µm) geschnitten. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für eine Stunde bei 37 °C mit X-Gal Färbelösung inkubiert.

Das *lacZ* Gen kodiert für das Enzym β-Galaktosidase, welches das farblose Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid) in das tiefblaue 5-Brom-4-Chlor-Indigo spaltet. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurden die Schnitte dreimal 5 min in PBS, pH 8,0, gewaschen und auf Objektträgern in Mowiol eingedeckelt.

3.4.3. Herstellung von Gewebeschnitten am Mikrotom

Mausgewebe, das histologisch analysiert werden sollte, wurde über Nacht in 4 %iger Formaldehydlösung fixiert und anschließend für zwei Stunden gewässert, um das Fixativ auszuwaschen. Die Infiltration des Gewebes mit Paraffin erfolgte im Gewebeeinfiltrationsautomaten. Dazu wurde das Gewebe über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, der Alkohol wurde durch das Intermedium Xylol verdrängt, und abschließend wurde das Gewebe mit Paraffin durchtränkt.

Programm: Organe 1

Ethanol 70 %	1 h
Ethanol 80 %	1 h
Ethanol 90 %	1 h
Ethanol 95 %	1 h
Ethanol 100 %	1 h
Ethanol 100 %	1,5 h
Xylol I	1 h
Xylol II	1 h
Paraffin Typ 3 58 °C I	1 h
Paraffin Typ 3 58 °C II	1 h
Paraffin Typ 3 58 °C III	1 h

Anschließend wurden die Gewebe in Paraffinblöcke gegossen. Nach dem Aushärten wurden diese am Mikrotom geschnitten (2,5 - 4 μ m) und im Wasserbad bei ca. 45 °C gestreckt. Die Schnitte wurden auf Superfrost-Objektträger aufgenommen und über Nacht bei 40 °C getrocknet. Die Entparaffinierung und Rehydrierung des Gewebes erfolgte manuell in Xylol und absteigender Alkoholreihe.

3.4.4. H & E-Färbung

Die Hämalaun- und Eosinfärbung (H & E-Färbung) ist eine Standardfärbung in der Histologie. Sie dient als Übersichtsfärbung, bei der die Zellkerne durch Hämalaun dunkelblau bis violett und Zytoplasma, Kollagen, Keratin und Erythrozyten durch Eosin rot erscheinen. Entparaffinierte Gewebeschnitte wurden für 6 min in Mayers Hämalaunlösung gefärbt, kurz in Ethanol mit 3 % HCl geschwenkt und anschließend unter fließendem Leitungswasser 4 min gebläut. Daraufhin erfolgte eine 3 minütige Inkubation in alkoholischem Eosin. Die Färbung wurde in $H_2O_{\text{deion.}}$ gestoppt, und die Gewebeschnitte wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe mit einer abschließenden Inkubation in Xylol entwässert und in Eukitt eingedeckelt.

3.4.5. Immunhistochemie

Die histologische Detektion von Proteinen in Formaldehyd fixierten Organen führt zu einer chemischen Veränderung der Antigene. Dies kann eine Maskierung der Epitope hervorrufen, so dass der Antikörper unter Umständen sein Antigen nicht erkennt (Shi *et al.*, 1991). Mit Hitze können die Epitope in vielen Fällen wieder demaskiert werden (Kim *et al.*, 2004b).

Um die Zielproteine besser für ihre Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Gewebeschnitte für 25 min in der Mikrowelle in TUF-Puffer gekocht. Nach 20 minütigem Abkühlen wurde dreimal mit TBST gewaschen und die endogene Peroxidase 5 - 10 min mit „ChemMate™ Peroxidase-Blocking“ inhibiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde ggf. ein 10 minütiger Proteinblock, um Hintergrundfärbung zu minimieren, mit „ChemMate™ Protein Block“ durchgeführt. Die Erstantikörper-Inkubation fand über Nacht bei 4 °C in „ChemMate™ Antibody Diluent“ verdünnt statt. Am Folgetag wurde fünfmal in TBST gewaschen und der Zweitantikörper aus dem „ChemMate™ DAKO Envision™ Detection Kit“ 15 min bei RT inkubiert. Dabei handelt es sich um ein Peroxidase-konjugiertes Polymer, an das Ziege-anti-Kaninchen und -anti-Maus Sekundärantikörper gekoppelt sind. Nach fünfmaligem Waschen mit TBST wurde DAB als Chromogen für die Peroxidase auf die Schnitte gegeben. Das Substratsystem erzeugt an der Stelle des Zielantigens eine braune Färbung. Nach spätestens 10 min wurde die Farbreaktion in $H_2O_{\text{deion.}}$ gestoppt.

Zur Gegenfärbung wurden die Gewebeschnitte für 1 sec in Mayers Hämalaunlösung getaucht, kurz in $H_2O_{\text{deion.}}$ gespült und für 2 min in Leitungswasser gebläut. Abschließend wurde über $H_2O_{\text{deion.}}$ und aufsteigende Alkoholreihe entwässert und schließlich in Eukitt eingedeckelt.

Die Immunhistochemie wurde mit Hilfe von Dr. Sabine Riethdorf und Malgorzata Stoupiec (beide Uniklinikum Eppendorf, Institut für Tumorbiologie, AG Prof. Dr. Pantel, Hamburg) etabliert. Die hTERT Färbung am humanen Hodenschnitt wurde freundlicherweise von Dr. Sabine Riethdorf zur Verfügung gestellt.

3.5. Zellbiologische Methoden

3.5.1. Passagieren von Zellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärenz Zellen, die mit Hilfe der Protease Trypsin von ihrem Substrat gelöst werden können, um die Zellen umzusetzen. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für wenige Minuten mit Trypsin / EDTA bei 37 °C inkubiert. EDTA entzieht den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen, so dass die Kontakte gelockert werden. Wenn sich ca. 80 % der Zellen abgelöst hatten, wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von einem Überschuss an Medium gestoppt. Die Zellen wurden ggf. in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in geeigneter Verdünnung subkultiviert.

Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden vor Kontakt mit den Zellen auf 37 °C erwärmt.

3.5.2. Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeitaufbewahrung von Zellen können diese in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert werden. Dazu wurden die Zellen in eiskaltem Einfriermedium (DMEM + 20 % (v/v) FCS + 10 % (v/v) DMSO) aufgenommen (ca. 1 x 10⁶ Zellen/ml). Anschließend wurden die Zellen in speziellen Kryoröhrchen von Raumtemperatur auf -80 °C heruntergekühlt und in den Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen kurz im 37 °C Wasserbad erwärmt, bis das Einfriermedium mit den Zellen fast vollständig aufgetaut war. Anschließend wurde das Einfriermedium sofort mit Medium verdünnt, da das DMSO giftig für die Zellen ist.

3.5.3. Isolierung von Maus embrionalen und adulten Fibroblasten (MEF's und MAF's)

Zur Isolierung primärer embryonaler Fibroblastenkulturen wurde eine an Tag 14 schwangere Maus mittels zervikaler Dissektion getötet und die Embryonen unter sterilen Bedingungen isoliert. Der Dottersack, der Kopf der Embryonen und die Extremitäten wurden zur DNA-Isolierung zwecks Genotypisierung verwendet.

Das restliche Gewebe wurde in einer Zellkulturschale mit PBS zerkleinert. Um die Zellen zu dissoziieren, erfolgte eine 20 minütige Inkubation in Trypsin / EDTA bei 37 °C. Die Reaktion wurde mit DMEM + 10 % FCS + Pen/Strep abgestoppt. Die Zellen wurden anschließend im 37 °C Inkubator gehalten. Die Kultivierung der MEF's erfolgte nach dem 3T3-Protokoll von Todaro und Green (Todaro und Green, 1963). Dazu wurden je 1×10^6 Zellen auf 10 cm Platten ausgesät und alle 3 - 4 Tage erneut mit 1×10^6 Zellen subkultiviert.

Eine Wachstumskurve wurde erstellt, indem die Zellen jedes Mal beim Splitten gezählt wurden. Der Quotient aus der Anzahl der Zellen nach 3-4 d / 1×10^6 ergibt die Proliferationsrate.

Das Anlegen primärer adulter Fibroblastenkulturen erfolgte nach dem Protokoll aus „Current Protocols in Cell Biology“. Zusammengefasst wurde ein 2 x 2 cm großes Hautstück vom Bauch der Maus präpariert, das wiederum in 3 x 3 mm große Quadrate geschnitten wurde. Die Explantate wurden unter regelmäßigem MAF-Mediumwechsel solange kultiviert, bis genügend Fibroblasten ausgewandert waren.

3.5.4. Wachstum in Softagar

Mit dem Wachstum in Softagar untersucht man, ob Zellen fähig sind, Verankerungs-unabhängig zu wachsen bzw. sich zu teilen.

Es wurden zwei Agarose-Stammlösungen mit 1,2 % und 0,7 % (w/v) Agarose Typ VII in H₂O hergestellt, autoklaviert und im 50 °C Wasserbad flüssig gehalten.

Für jede Zelllinie wurden vier 6 cm Zellkulturschalen mit je 4 ml Grundagar befüllt.

Grundagar:

- 2 ml FCS
- 9 ml 1,2 % Agarose-SL
- 9 ml DMEM doppelt konzentriert

Das doppelt konzentrierte DMEM und das FCS wurden im 37 °C Wasserbad vorgewärmt. Der Grundagar wurde für 1 h bei RT zum Aushärten stehen gelassen.

Überschichtungsagar: 1,5 ml FCS
 6,75 ml 0,7 % Agarose-SL
 6,75 ml DMEM doppelt konzentriert

Der Überschichtungsagar wurde bis zur Zugabe der Zellen im 41 °C Wasserbad erwärmt. Jeweils $1,125 \times 10^5$ Zellen wurden mit 13,5 ml Überschichtungsagar gemischt, und je 3 ml (entspricht $2,5 \times 10^4$ Zellen) wurden auf den Grundagar gegeben und für 1 h bei RT zum Festwerden stehen gelassen.

Die Zellkulturschalen wurden in einer Box für drei Wochen im Inkubator gehalten. Abschließend wurde die Zahl der entstandenen Zellklone bestimmt und statistisch ausgewertet.

3.5.5. Stimulation von MEF's mit Chromatin-verändernden Substanzen

Der Einfluss von verschiedenen Chemikalien, die die Chromatinstruktur verändern, wurde auf die Expression des Transgens hTERTp-lacZ in 6335.5 / BALB/c MEF's getestet. Die Zellen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten (8, 24 und 48 h) geerntet und die RNA für RT-PCR-Analysen isoliert.

Tab. 3.2.: Konzentration der eingesetzten Substanzen.

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
5' Azacytidin	5 mg/ml in H ₂ O	4 µM in DMEM
Chloroquin	50 mg/ml in H ₂ O	100 µM in DMEM
Trichostatin A	1 mg/ml in DMSO	330 nM in DMEM

3.6. Eingriffe an transgenen Mäusen

3.6.1. Partielle Hepatektomie und Isolierung von Hepatozyten

Zur Untersuchung der Regulation des *lacZ* Reportergens unter Kontrolle des hTERT Promotors während der Leberregeneration wurde eine partielle Hepatektomie (PH) durchgeführt. Insgesamt wurden 20 6340.3 / C57BL/6J und 20 WT / C57BL/6J Mäuse operiert.

Dazu hat Dr. Ande Satyanarayana (Medizinische Hochschule Hannover, Abt. Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, AG PD Dr. Rudolph) je drei von fünf Leberlappen an narkotisierten Mäusen entfernt (Tag 0). Je vier transgene und Wildtyp Tiere wurden an Tag 1, 2, 3, 4 und 5 nach PH getötet, und die regenerierende Leber wurde zwecks RNA-Isolierung und *TRAP assay* isoliert.

Des Weiteren wurden von Dr. Henning Wege (Uniklinikum Eppendorf, Abt. Gastroenterologie und Hepatologie, Hamburg) mit Hilfe der Perfusionstechnik Hepatozyten aus 6340.3 / C57BL/6J und 6340.3 / BALB/c Mäusen isoliert und partielle Hepatektomie an drei 6335.5 / C57BL/6J Mäusen (Tag 0, 1, 2 und 3) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Vergleich der Telomeraseaktivität in verschiedenen Organen bei Mensch und Maus

Die humane Telomerase wird während der frühen Entwicklung in den meisten somatischen Zellen herunterreguliert (Wright *et al.*, 1996; Ulaner und Giudice, 1997). Dagegen ist bekannt, dass die Telomerase bei der Maus in fast allen Geweben aktiv ist (Prowse und Greider, 1995; Forsyth *et al.*, 2002).

Es ist bislang nicht ausreichend untersucht, wie hoch die Telomeraseaktivität in unterschiedlichen Organen bei Mensch und Maus ist. In bisherigen Publikationen wurden nur wenige humane und murine Organe in einer Studie untersucht. Da durch die experimentellen Bedingungen durchaus Abweichungen erwartet werden können, sind die Studien von verschiedenen Publikationen bezüglich der *TERT* Expression / Telomeraseaktivität nicht ohne weiteres quantitativ miteinander vergleichbar.

Um die Aktivität der humanen und murinen Telomerase direkt miteinander vergleichen zu können, wurden sowohl die Telomeraseaktivität in unterschiedlichen Geweben als auch die Expression des humanen und murinen *TERT* Gens untersucht (Fig. 4.1. und 4.2.). Dabei konnte auch bestätigt werden, dass die Telomeraseaktivität sehr gut mit der Expression von *TERT* korreliert (Meyerson *et al.*, 1997; Weinrich *et al.*, 1997).

Die Telomeraseaktivität wird mit Hilfe des *TRAP assay* (s. 3.3.1.) bestimmt. Dabei sind nicht nur die Intensitäten der Banden der Produktleiter, sondern auch die Anzahl an „Sprossen“ der Produktleiter, die von der Prozessivität der Telomerase abhängt, entscheidend.

Es muss hier allerdings auch betont werden, dass die Ergebnisse als relative Werte zu betrachten sind, da die *TERT* Expression und Telomeraseaktivität vom Alter der Spender und der Region, aus der die Organprobe genommen wurde, beeinflusst werden. Aus diesem Grund kann die Quantifizierung der Ergebnisse immer nur eine grobe Annäherung an die Realität darstellen.

4.1.1. *hTERT* Expression ist in adulten humanen Organen stringent kontrolliert

In humanen somatischen Zellen wird die *hTERT* Expression bzw. Telomerase reprimiert. Nur in Organen mit hohem proliferativen Potential ist *hTERT* detektierbar (Fig. 4.1. A). Im Hoden

wird *hTERT* am stärksten exprimiert, daneben findet man im Dün- und Dickdarm mittlere *hTERT* Expression. In den übrigen getesteten Organen ist trotz der sehr sensitiven radioaktiven RT-PCR keine oder nur sehr schwache *hTERT* Expression sichtbar. Telomeraseaktivität kann in Proben mit hohen *hTERT* mRNA Mengen wie Hoden und Dickdarm nachgewiesen werden (Fig. 4.1. B).

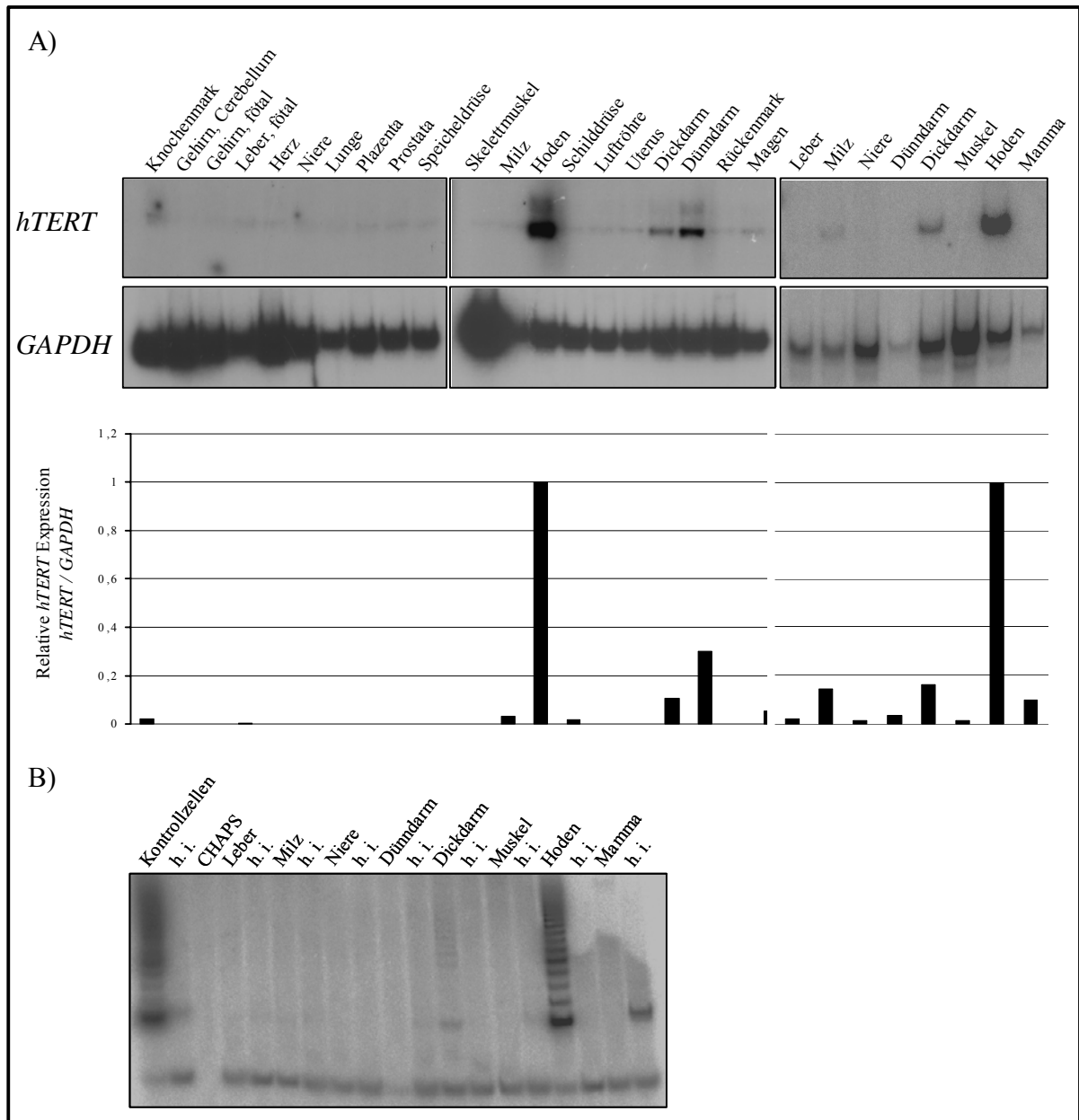


Fig. 4.1.: Endogene *hTERT* Expression und Telomeraseaktivität in humanen Geweben.

A) *hTERT* mRNA Mengen wurden mittels radioaktiver RT-PCR bestimmt. Bei den ersten 20 RNA's handelt es sich um gekaufte Gesamt-RNA, während die folgenden acht RNA's aus tiefgefrorenen Proben der entsprechenden Organe isoliert wurden. Das Balkendiagramm zeigt die relative *hTERT* Expression bezogen auf die Expression des Haushaltsgens *GAPDH*.

B) *TRAP assay* zur Bestimmung der Telomeraseaktivität. Von jedem Gewebe wurden je 1 μ g Proteinextrakt eingesetzt. Nur in Geweben mit deutlicher *hTERT* Expression ist die Telomerase detektierbar.

4.1.2. Endogene *mTERT* Expression in normalen Mausegeweben

Im Gegensatz zum humanen *TERT* Gen wird das murine *TERT* Gen in fast allen Organen exprimiert (Fig. 4.2. A). Wie beim Menschen ist ebenfalls im Hoden der Maus die stärkste *TERT* Expression zu beobachten. Außerdem zeigen folgende Gewebe hohe bis moderate *mTERT* Mengen: Leber, Milz, Dünndarm, Dickdarm, Lunge, Mammagewebe, Eierstock und Eileiter. In diesen Organen korreliert die *mTERT* Expression mit der Telomeraseaktivität (Fig. 4.2. B). Dagegen sind *mTERT* sowie Telomerase in Niere, Muskel, Herz, Haut, Gehirn und Lymphozyten gar nicht oder kaum detektierbar.

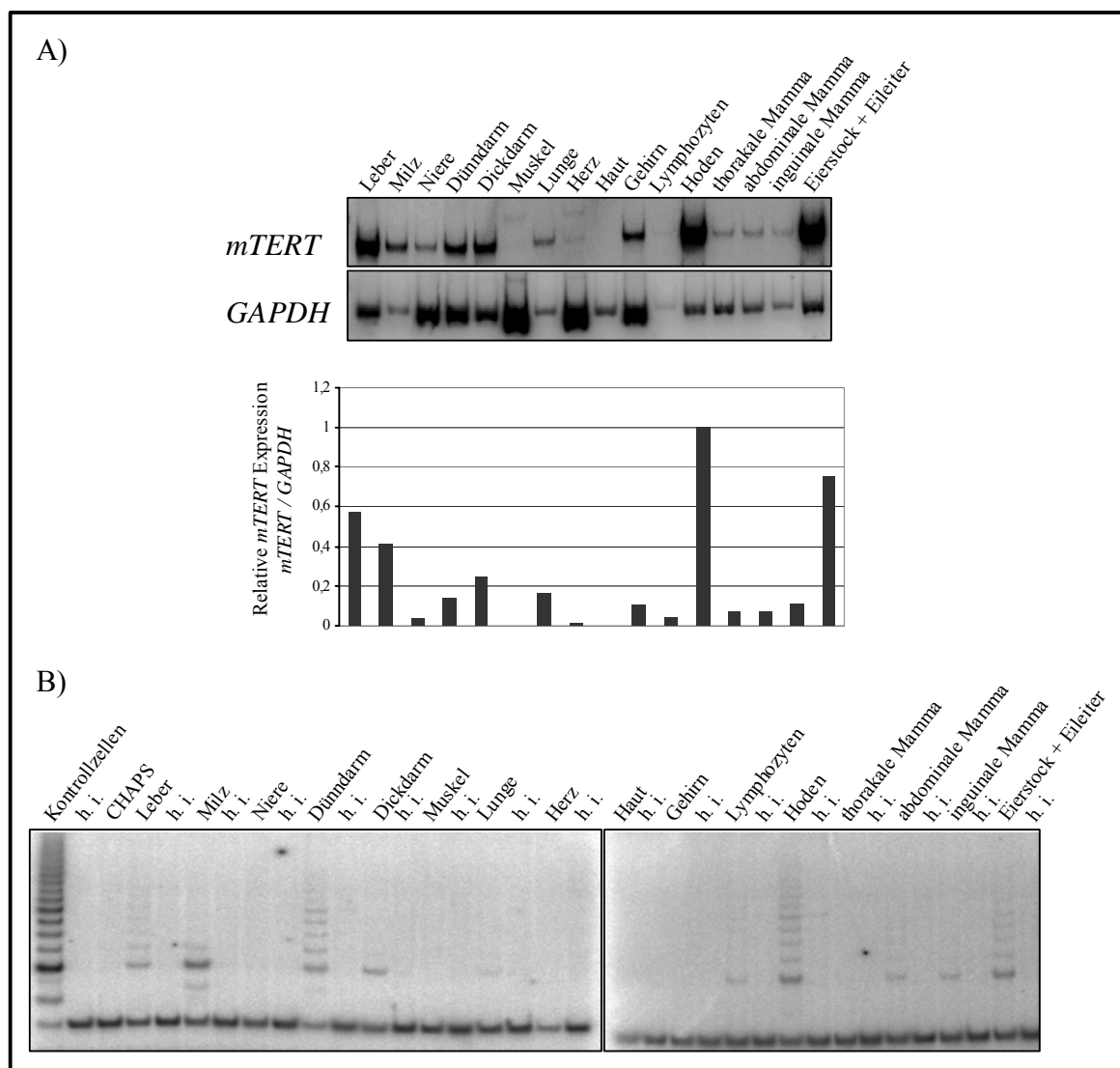


Fig. 4.2.: Endogene *mTERT* Expression und Telomeraseaktivität in murinen C57BL/6J Geweben.

A) *mTERT* Expression wurde mittels radioaktiver RT-PCR bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die relative *mTERT* Expression bezogen auf die Expression des Haushaltgens *GAPDH*.

B) *TRAP assay* zur Bestimmung der Telomeraseaktivität. Von jedem Gewebe wurden je 1 µg Proteinextrakt eingesetzt. Nur in Geweben mit starker *mTERT* Expression ist die Telomeraseaktivität messbar.

Die Expressionsanalysen des humanen und murinen *TERT* Gens bestätigen frühere Veröffentlichungen, die aussagen, dass die *hTERT* Expression sehr viel stringenter als die *mTERT* Expression kontrolliert wird und limitierend für die Telomeraseaktivität ist. Es gibt etliche Hinweise darauf, dass die *TERT* Genexpression primär über die Initiation der Transkription reguliert wird (Wang *et al.*, 1998; Güneş *et al.*, 2000; Ducrest *et al.*, 2001).

Da die Transkriptionsfaktoren in der Regel zwischen den Spezies evolutionär hoch konserviert sind, sind die verschiedenen Expressionsmuster wahrscheinlich auf Unterschiede in den *TERT* Promotoren zurückzuführen. In der Tat ist die Sequenzhomologie des humanen und murinen *TERT* Promotors eher gering (Fig. 1.6.) (Greenberg *et al.*, 1998).

4.2. Expression des *lacZ* Reportergens unter der Kontrolle eines 8,0 kbp langen Fragmentes des humanen *TERT* Promotors in transgenen Mäusen

Um die Regulation des humanen *TERT* Promotors in einem *in vivo* System unter physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, wurde ein transgenes Mausmodell von Dr. Çağatay Güneş generiert.

Diese transgenen Mäuse exprimieren das bakterielle *lacZ* Reportergen unter der Kontrolle eines 8,0 kbp langen Fragmentes des humanen *TERT* Promotors (*hTERTp-lacZ*) (Fig. 4.3.).

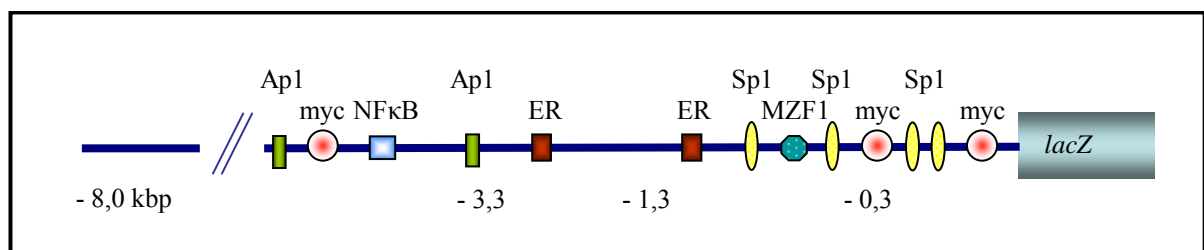


Fig. 4.3.: hTERTp-*lacZ* Konstrukt.

Ein 8,0 kbp langes Fragment des humanen *TERT* Promotors wurde vor das *lacZ* Reportergen kloniert. Einige putative Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind eingezeichnet. Nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Im Folgenden wurde die Aktivität des humanen *TERT* Promotors in zwei dieser transgenen Mauslinien (6340.3 und 6335.5) detailliert analysiert. Dazu wurde die *lacZ* Expression auf mRNA Ebene bestimmt und als relatives Maß für die *hTERT* Promotoraktivität genommen. Die Begriffe *hTERT* Promotoraktivität, *lacZ* mRNA Menge und *lacZ* Expression wurden synonym benutzt. Die murine und humane *TERT* Promotoraktivität in den *hTERTp-lacZ* transgenen Mäusen wurde anhand der *mTERT* und *lacZ* Expression miteinander verglichen,

auch wenn dies aufgrund verschiedener Halbwertszeiten der mRNA nicht hundertprozentig korrekt ist.

Die *lacZ* Expressionsanalysen wurden in normalen adulten Organen der transgenen Mäuse während der Hodenentwicklung, während des Haarzyklus, nach partieller Hepatektomie, in Maus embryonalen *versus* adulten Fibroblasten und in einem Tumormodell für Mammakarzinome vorgenommen.

4.2.1. Expression des hTERTp-*lacZ* Reporter-gen Konstrukts im transgenen Mausmodell zeigt ein „human-ähnliches“ Muster

Zur Bestimmung der hTERT Promotoraktivität in den transgenen Mäusen wurde Gesamt-RNA aus verschiedensten Organen isoliert. Mit Hilfe der sehr sensitiven radioaktiven RT-PCR wurde die Expression von *lacZ* bestimmt und quantifiziert (Fig. 4.4.). Der lineare Bereich der Amplifizierung wurde für jede PCR in Vorexperimenten bestimmt. Um die hTERT Promotoraktivität in verschiedenen Geweben miteinander vergleichen zu können, wurde die *lacZ* Expression auf die des ubiquitären Haushaltsgens *GAPDH* normiert.

In den beiden Mauslinien 6340.3 und 6335.5 zeigt der hTERT Promotor im Hoden die stärkste Aktivität. Im Fall der Linie 6335.5 war die *lacZ* Expression sogar ausschließlich im Hoden und in keinem der anderen getesteten Organe detektierbar. Dagegen ist der hTERT Promotor in der Mauslinie 6340.3 neben der starken Aktivität im Hoden auch in anderen Organen aktiv - allerdings in erheblich geringerem Ausmaß. Dies wird vor allem nach der Normierung auf das ubiquitäre Haushaltsgen *GAPDH* deutlich (Fig. 4.4. A). Setzt man die relative *lacZ* Expression im Hoden auf 1,0, liegt die Expression des Reporter-gens in den übrigen Organen wie Milz, Niere, Dünndarm, Dickdarm, Gehirn, Lymphozyten und Mammagewebe unterhalb von 0,1.

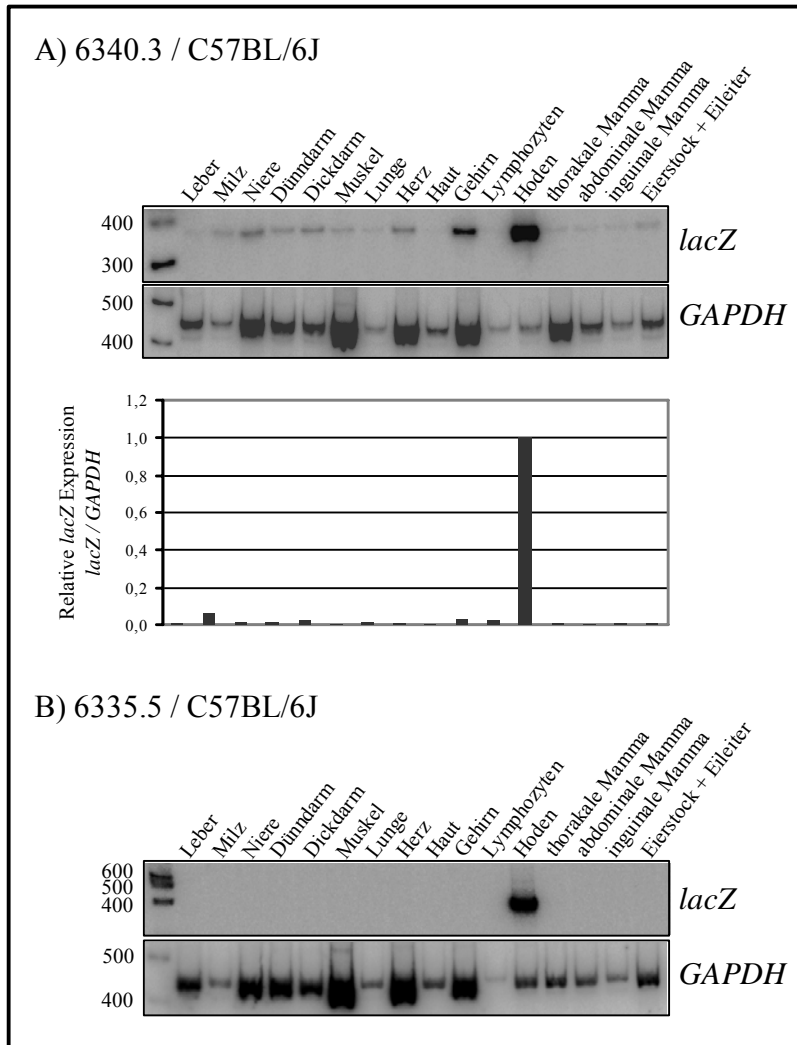


Fig. 4.4.: Aktivität des hTERT Promotors in den hTERTp-*lacZ* transgenen Mauslinien 6340.3 und 6335.5.

Die hTERT Promotoraktivität wurde anhand der Expression des *lacZ* Reportergens gemessen.

A) Mauslinie 6340.3 / C57BL/6J: hTERT Promotoraktivität in adulten Organen mittels radioaktiver RT-PCR.

Das Balkendiagramm zeigt die relative *lacZ* Expression bezogen auf die Expression des Haushaltgens *GAPDH*.

B) Mauslinie 6335.5 / C57BL/6J: hTERT Promotoraktivität in adulten Organen mittels radioaktiver RT-PCR.

GAPDH dient als Ladekontrolle. Nur im Hoden ist *lacZ* Expression detektierbar.

Es sollte auch betont werden, dass die endogene *mTERT* Expression und Telomeraseaktivität in den hTERTp-*lacZ* / C57BL/6J transgenen Mauslinien mit denen in den wildtypischen C57BL/6J Mäusen übereinstimmen (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass durch die Integration des transgenen Konstrukts die Expression des murinen *TERT* Gens bzw. die endogene Telomeraseaktivität nicht beeinflusst wird.

Außerdem sollte hierbei noch darauf hingewiesen werden, dass nach bisherigen langjährigen Beobachtungen keinerlei Auffälligkeiten bei den transgenen Tieren aufgetreten sind. Unter diesen Umständen kann man eine Integration des Transgens in lebenswichtige Chromosomenbereiche ausschließen.

Die Daten der RT-PCR deuten darauf hin, dass sich die Aktivität des humanen TERT Promotors im transgenen Mausmodell sehr „human-ähnlich“ verhält. In Tabelle 4.1. sind die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen der *TERT* Expression in humanen und murinen Geweben *versus* der *lacZ* Reportergen Expression in Organen der transgenen Mauslinien zusammengefasst.

Die auffälligsten Unterschiede der endogenen *TERT* Expression bei Mensch und Maus zeigen sich bei Leber, Milz, Lunge, Gehirn, Mammagewebe, Eierstock und Eileiter. In diesen Organen ist die *mTERT* Expression moderat (Leber, Milz, Eierstock und Eileiter) bzw. schwach (Lunge, Gehirn, Mamma), während die entsprechenden menschlichen Organe gar keine (Leber, Lunge, Gehirn, Mamma, Eierstock und Eileiter) oder sehr schwache (Milz) *hTERT* Expression zeigen.

Es gibt aber auch Übereinstimmungen im *TERT* Expressionsmuster. So zeigen beide Organismen keine oder nur schwache Hintergrundaktivität bezüglich des TERT Promotors in Niere, Muskel, Herz, Haut und Lymphozyten. Bei Mensch und Maus ist die *TERT* Expression im Darm moderat, während der Hoden die stärkste Menge an *TERT* mRNA aufweist.

Tab. 4.1.: Endogene humane und murine *TERT* Expression im Vergleich zur *hTERT* Promotoraktivität in transgenen Mäusen.

	human	6340.3	6335.5	murin
	<i>hTERT</i>	<i>hTERTp-lacZ</i>		<i>mTERT</i>
Leber	-	-	-	++
Milz	-/+	+	-	++
Niere	-	-/+	-	-/+
Dünndarm	++	-/+	-	++
Dickdarm	++	-/+	-	++
Muskel	-	-	-	-
Lunge	-	-/+	-	+
Herz	-	-	-	-/+
Haut	-	-	-	-
Gehirn	-	+	-	+
Lymphozyten	-/+	-/+	-	-/+
Hoden	+++	+++	+++	+++
Mamma	-	-	-	+
Eierstock + Eileiter	-	-	-	++

+++ (starke), ++ (moderate), + (schwache), -/+ (Hintergrund), - (keine) TERT Promotoraktivität

Anhand der Tabelle 4.1. kann man erkennen, dass sich das *hTERTp-lacZ* Konstrukt bezüglich des Expressionsmusters „human-ähnlich“ verhält. Wie im humanen System *hTERT* wird das

hTERTp-*lacZ* Konstrukt im transgenen Mausmodell sehr stringent kontrolliert. Der menschliche Hoden ist das Organ mit der höchsten *hTERT* Expression und Telomeraseaktivität. Genauso verhält es sich mit der hTERT Promotoraktivität in den transgenen Tieren. Der Hoden weist die höchste *lacZ* Reporterexpression auf.

Allerdings gibt es zwischen den beiden transgenen Mauslinien Unterschiede. Bei der Linie 6335.5 konnte die *lacZ* Expression exklusiv im Hoden nachgewiesen werden, während die Mauslinie 6340.3 neben der stärksten hTERT Promotoraktivität im Hoden auch geringe Aktivität in anderen Organen zeigt. Welche der beiden Mauslinien geeigneter für die *in vivo* Analyse der hTERT Promotor Regulation ist, muss über vergleichende Analysen entschieden werden.

4.2.2. Histologische Analyse der *lacZ* Reporterexpression im Hoden

Das *lacZ* Gen ist ein populäres Reporterexpression, da es einen einfachen enzymatischen Nachweis für seine Expression gibt. Es kodiert für das Enzym β -Galaktosidase (β -Gal), welches das farblose Substrat X-Gal spaltet, wobei Galaktose und ein Indoxylderivat, welches nach spontaner Dimerisierung als blauer Farbstoff präzipitiert, entstehen.

Die zelltypspezifische Expression des *lacZ* Reporterexpression wurde mit Hilfe der X-Gal Färbung an Vibratonschnitten (Fig. 4.5.) und β -Gal Immunhistochemie an Paraffinschnitten von Hoden transgener Mäuse überprüft (Fig. 4.6.).

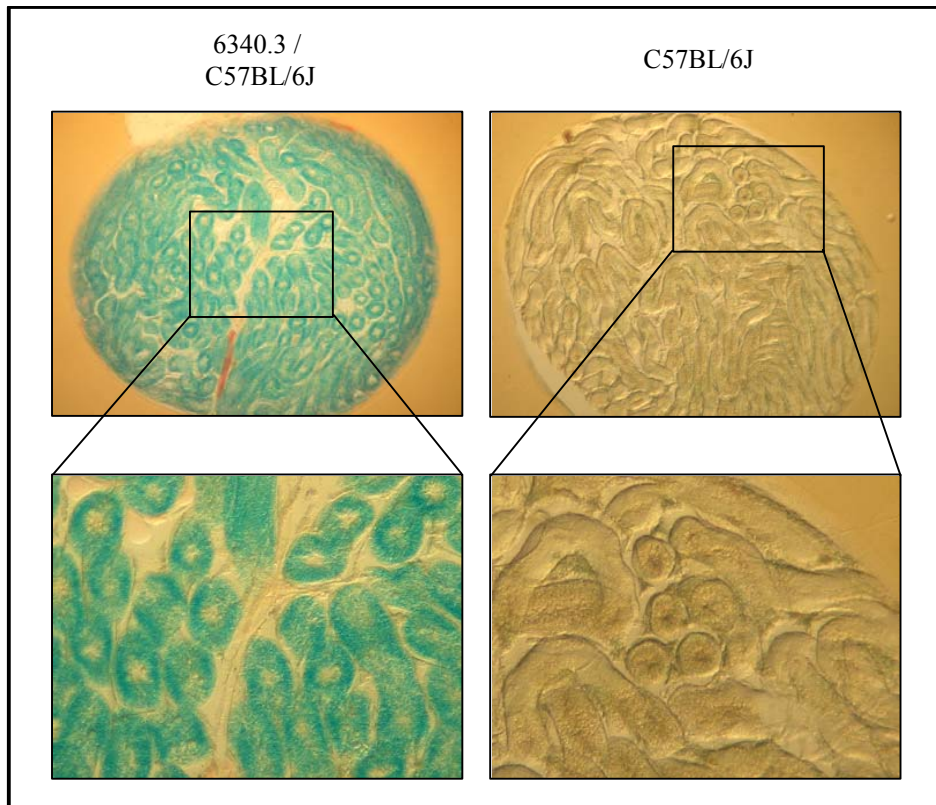


Fig. 4.5.: X-Gal Färbung von Hoden bei 6340.3 / C57BL/6J und Wildtyp C57BL/6J Mäusen.

150 μm Vibratomschnitte von Hoden transgener Mäuse wurden zum Nachweis der β -Galaktosidase mit X-Gal gefärbt. Als Negativkontrolle wurden ebenfalls Hodenpräparate von wildtypischen Mäusen gefärbt. Nur in den Hoden transgener Mäuse entsteht ein blaues Präzipitat (links).

Mit Hilfe der X-Gal Färbung kann auch auf Proteinebene die starke Aktivität des hTERT Promotors im Hoden der transgenen Mäuse gezeigt werden. Die Hodenkanälchen zeigen nur im Hoden der hTERTp-*lacZ* transgenen Maus (Fig. 4.5. links) die charakteristische Blaufärbung. In der Negativkontrolle (Fig. 4.5. rechts) tritt keine Hintergrundfärbung auf.

Vibratomschnitte erlauben eine übersichtliche Analyse des Gewebes, aber es kann nicht zwischen verschiedenen Zelltypen unterschieden werden, da die Schnitte für diesen Zweck zu dick sind (150 μm). Um die zelltypspezifische Aktivität des hTERT Promotors im Hoden transgener Mäuse detaillierter zu untersuchen, wurde β -Gal mittels Immunfärbung an Paraffinschnitten nachgewiesen (Fig. 4.6.).

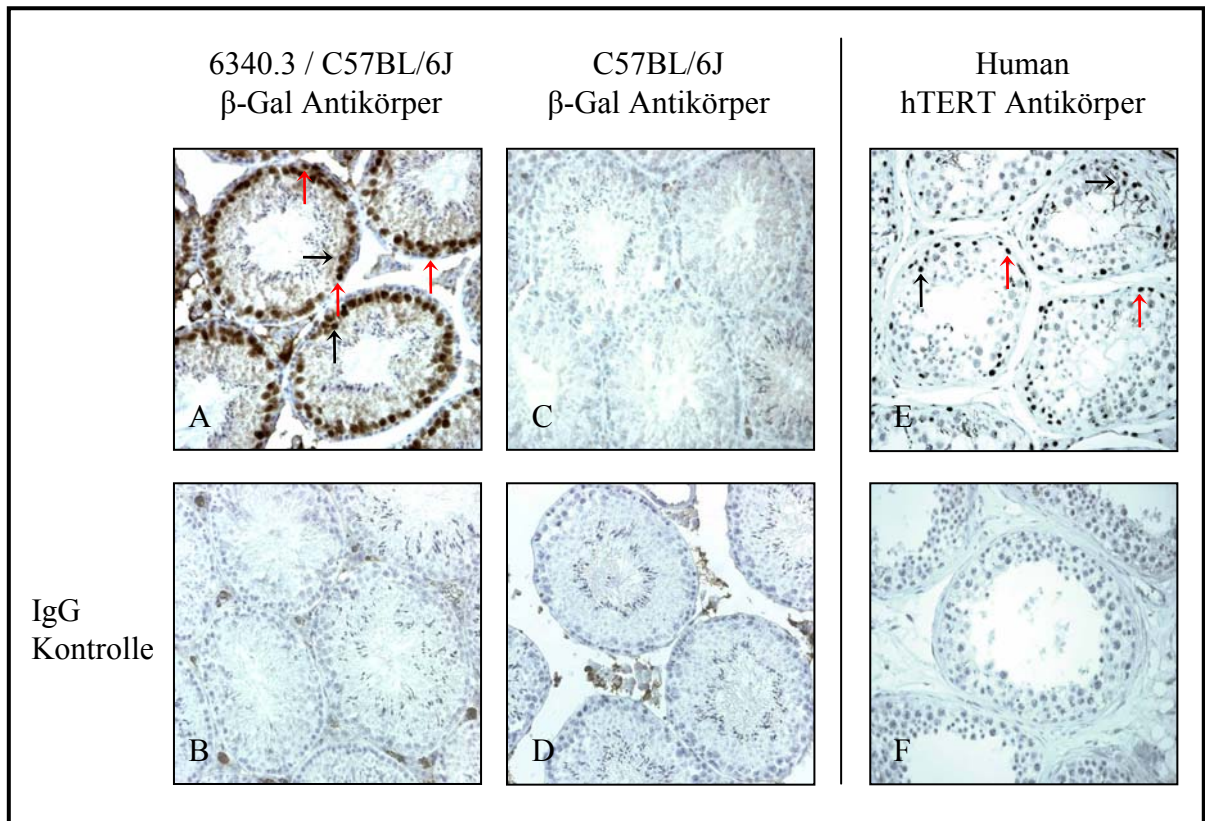


Fig. 4.6.: Immunhistochemie der β -Gal im Hoden bei 6340.3 / C57BL/6J und Wildtyp C57BL/6J Mäusen versus hTERT im humanen Hoden.

2 μ m Paraffinschnitte von Hoden aus 6340.3 / C57BL/6J (A, B) und Wildtyp C57BL/6J (C, D) Mäusen wurden mit β -Gal spezifischen Antikörpern (A, C) oder als Negativkontrolle nur mit IgG Antikörpern (B, D) behandelt. Die humanen Hoden Paraffinschnitte wurden mit einem hTERT spezifischen Antikörper (E) bzw. ebenfalls als Negativkontrolle nur mit IgG Antikörpern (F) inkubiert.

Dabei zeigte sich eine starke β -Gal Färbung in den primordialen Spermatogonien (rote Pfeile) und den primären Spermatozyten (schwarze Pfeile) (Fig. 4.6. A). Die Sertoli- und Leydigzellen sowie die Zellen der späten Spermatogenese weisen keine β -Gal auf. In den Negativkontrollen IgG Kontrolle (Fig. 4.6. B und D) und Wildtyp Hoden (Fig. 4.6. C) trat keine unspezifische Hintergrundfärbung auf.

Bei der hTERTp-*lacZ* transgenen Mauslinie 6335.5 sahen die Färbungen gleich, aber insgesamt schwächer aus (Daten nicht gezeigt, aber vgl. Fig. 4.8. C).

Um zu überprüfen, ob die β -Gal positiven Zellen in den Hoden transgener hTERTp-*lacZ* Mäuse denjenigen Zellen entsprechen, die in humanen Hoden *hTERT* exprimieren, wurde das hTERT Protein in humanen Hodenbiopsien immunologisch nachgewiesen.

Die hTERT Immunfärbung (Fig. 4.6. E) zeigt, dass das endogene hTERT Protein ebenfalls wie die β -Gal, die in den transgenen Mäusen unter der Kontrolle des humanen TERT

Promotors steht, allein in den primordialen Spermatogonien (rote Pfeile) und den primären Spermatozyten (schwarze Pfeile) vorkommt (vgl. Fig. 4.6. A und E). Die immunologische Detektion der β -Gal bestätigt die zelltypspezifische Aktivität des hTERT Promotors. In dem hTERTp-*lacZ* transgenen Mausmodell ist der hTERT Promotor im Hoden wie beim Menschen exklusiv in den Keimbahnzellen hochreguliert.

4.2.3. Ansteigende hTERT Promotoraktivität im Hoden während der Geschlechtsreife

Bei männlichen Mäusen werden die ersten reifen Spermien fünf bis sechs Wochen nach der Geburt produziert, so dass die Männchen im Alter von fünf bis sieben Wochen geschlechtsreif sind.

Die Spermatogenese beginnt in den primordialen Spermatogonien, die an der Basalmembran liegen (Fig. 4.7.). Einige dieser Stammzellen teilen sich mitotisch und differenzieren sich zu primären Spermatozyten. Nach der ersten meiotischen Teilung durchlaufen die sekundären Spermatozyten (haploid) die zweite meiotische Teilung. Die daraus resultierenden Spermatiden entwickeln sich während der Spermiogenese weiter zu Spermien. Die Spermien werden in das Lumen entlassen und gelangen zur vollständigen Reifung in den Nebenhoden.

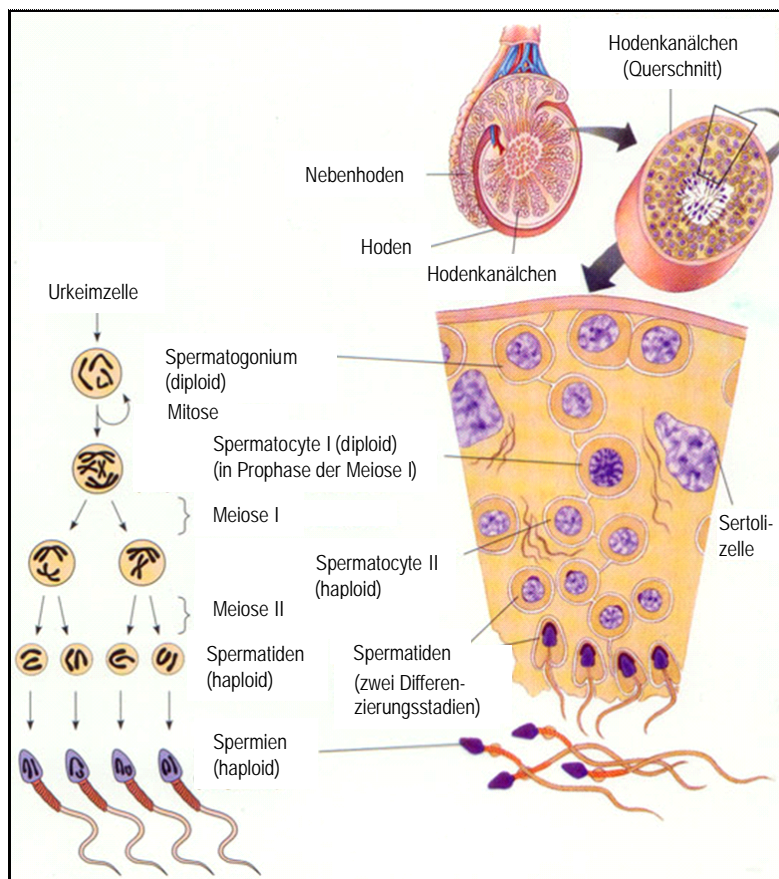


Fig. 4.7.: Die Spermatogenese

(aus Campbell, 2000).

In den Hodenkanälchen differenzieren sich die primordialen Spermatogonien (Urkeimzellen) über mehrere Mitosen und die Meiose zu Spermien. Diese gelangen über das Lumen zum Nebenhoden, wo sie ihre finale Reifung durchlaufen.

Telomeraseaktivität in Hoden von Mäusen wurde ab der sechsten Woche beschrieben (Prowse und Greider, 1995). Dagegen beschreiben Ravindranath *et al.* bei Ratten, dass die Telomerase im Hoden von der Geburt an bis zur vierten Woche hoch sei und danach abnehme (Ravindranath *et al.*, 1997).

Um diese widersprüchlichen Daten zu überprüfen und ebenfalls mit der hTERT Promotoraktivität zu vergleichen, wurden Hoden von zwei, vier und sechs Wochen alten hTERTp-*lacZ* transgenen und Wildtyp Mäusen im C57BL/6J Hintergrund isoliert. Sowohl die endogene *mTERT* Expression (Fig. 4.8. A) und Telomeraseaktivität (Fig. 4.8. B) als auch die hTERT Promotoraktivität (Fig. 4.8. A) in den transgenen Proben wurden untersucht.

Die mRNA Mengen von endogenem *mTERT* weisen während der Hodenentwicklung keine Expressionsunterschiede auf (Fig. 4.8. A), während die hTERT Promotoraktivität im Hoden von zwei Wochen alten zu vier Wochen alten Mäusen in beiden transgenen hTERTp-*lacZ* Mauslinien ansteigt und dann konstant bleibt. Diese Beobachtung korreliert mit der X-Gal Färbung an Vibratomschnitten (Fig. 4.8. C). In Hodenpräparaten von zwei Wochen alten Mäusen zeigen nur vereinzelte Hodenkanälchen β -Gal Aktivität, während in den Hoden von vier und sechs Wochen alten Mäusen ähnlich wie im adulten Hoden (Fig. 4.5. links) alle Hodenkanälchen positiv für β -Gal sind. Dabei sieht man deutlich, dass die β -Gal Aktivität im Hoden der Mauslinie 6340.3 / C57BL/6J deutlich stärker als bei der Linie 6335.5 / C57BL/6J ist. Dies hängt vielleicht mit der stringenteren Regulation des Transgens in der Linie 6335.5 / C57BL/6J zusammen (vgl. Fig. 4.4.).

Verglichen mit den Hoden von vier und sechs Wochen alten Mäusen ist die endogene Telomeraseaktivität in den Hoden von zwei Wochen alten Mäusen höher (Fig. 4.8. B). Die *mTERT* Expression bleibt konstant (Fig. 4.8. A) und korreliert nicht mit der abnehmenden Telomeraseaktivität. Es kann vermutet werden, dass die Telomerase während der Hodenentwicklung noch anderen regulatorischen Mechanismen unterliegt. Diese Mechanismen konnten in diesem Experiment nicht aufgeklärt werden. Doch es wurde evident, dass die Telomerase sehr wohl schon vor der sechsten Woche im Hoden der Maus nachgewiesen werden kann.

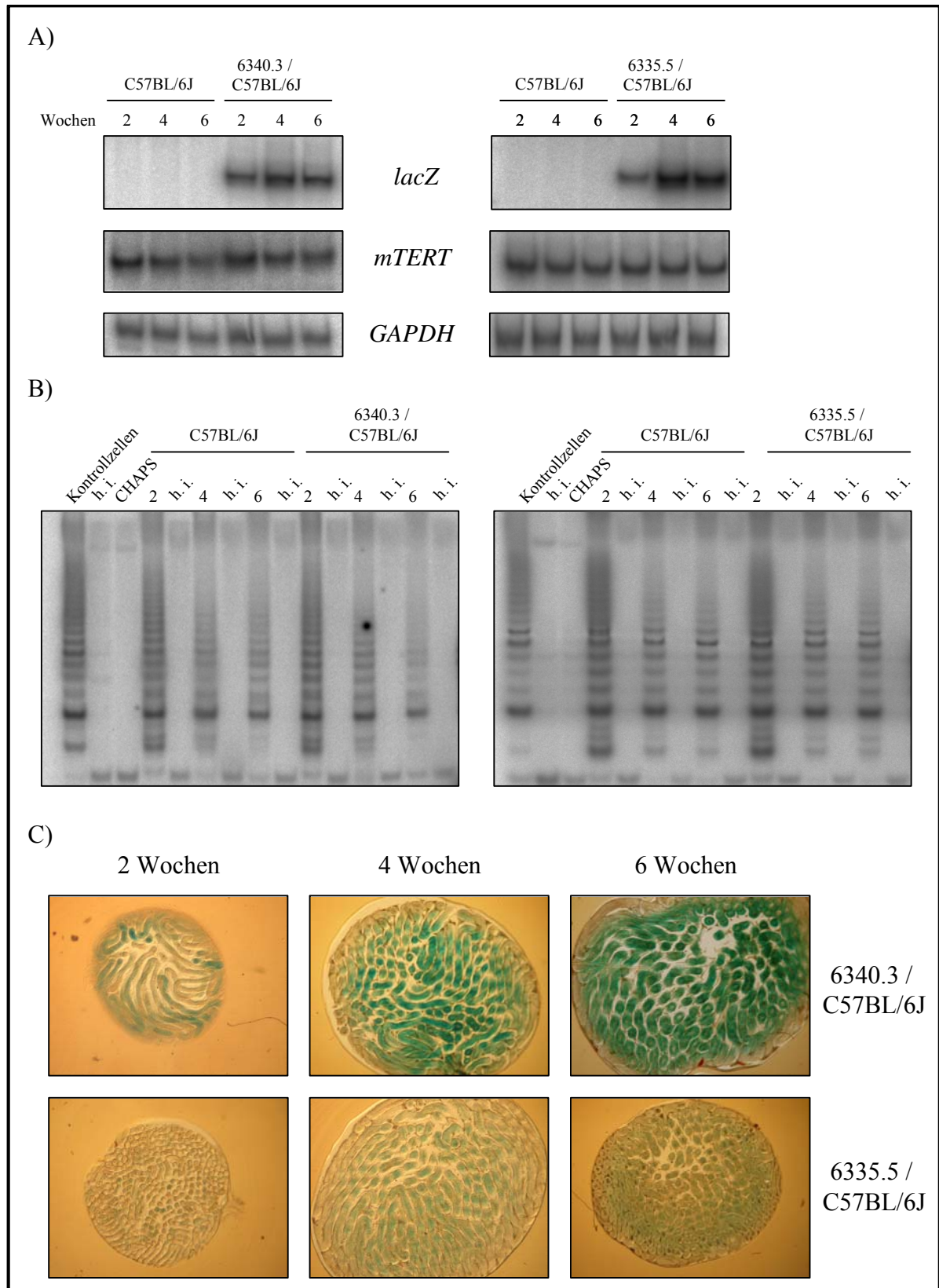


Fig. 4.8.: mTERT und hTERT Promotoraktivität, endogene Telomeraseaktivität und enzymatischer β -Gal Nachweis während der Hodenentwicklung bei hTERTp-*lacZ* / C57BL/6J und Wildtyp C57BL/6J Mäusen.

A) Die RNA aus Hoden von zwei, vier und sechs Wochen alten 6340.3, 6335.5 und Wildtyp Mäusen wurde isoliert. Die *lacZ*, *mTERT* und *GAPDH* (als Ladekontrolle) Expression wurde mittels radioaktiver RT-PCR bestimmt.

B) *TRAP assay* zur Bestimmung der Telomeraseaktivität im Hoden während der Geschlechtsreife von 6340.3, 6335.5 und Wildtyp Mäusen. Von jedem Gewebe wurden je 1 µg Proteinextrakt eingesetzt.

C) X-Gal Färbung der Hoden Vibratonschnitte (100 µm) von zwei, vier und sechs Wochen alten 6340.3 und 6335.5 Mäusen.

4.2.4. *lacZ* Reporter Expression und Telomeraseaktivität in der Haut während des Haarzyklus

Die Verfügbarkeit humaner adulter Stammzellen ist in der Regel der limitierende Faktor für die medizinische Forschung. Daher bieten die *hTERTp-lacZ* transgenen Mäuse ein ideales Modell, um den humanen TERT Promotor *in vivo* in Stamm- und Progenitorzellen zu untersuchen. Die Analyse der *hTERT* Expression und Telomeraseaktivität in der Haut bzw. im Haarfollikel könnte Aufschluss über die Regulation der Telomerase in epidermalen Stammzellen geben.

Die Haarfollikel enthalten multipotente Stammzellen, die alle Zelltypen der Epidermis, des Haares und der Talgdrüse bilden können (Taylor *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2004). Die epidermalen Stammzellen befinden sich in einer kleinen Ausbuchtung seitlich des Haarfollikels, der *bulge area* (Fig. 4.9.). Die ruhenden Stammzellen (*bulge area*) werden als Telomerase-kompetent und deren Tochterzellen (Progenitorzellen), die aus der Stammzellnische auswandern und sich weiter differenzieren, zunächst als Telomerase-positiv angesehen (Ramirez *et al.*, 1997). Für jeden neuen Haarzyklus (Fig. 4.9.) bedarf es dieser Stammzellen als Grundlage für das Wachstum eines neuen Haares.

Im Anagen (Wachstumsphase) ist die Telomerase in Progenitorzellen im Bereich der Haarzwiebel des humanen Haarfollikels aktiv, während die Aktivität im folgenden Catagen (Regressionsphase) und Telogen (Ruhephase) abnimmt (Ramirez *et al.*, 1997). In murinen Hautbiopsien konnten Sarin *et al.* zeigen, dass Telomeraseaktivität nur mit Anagen assoziiert ist (Sarin *et al.*, 2005).

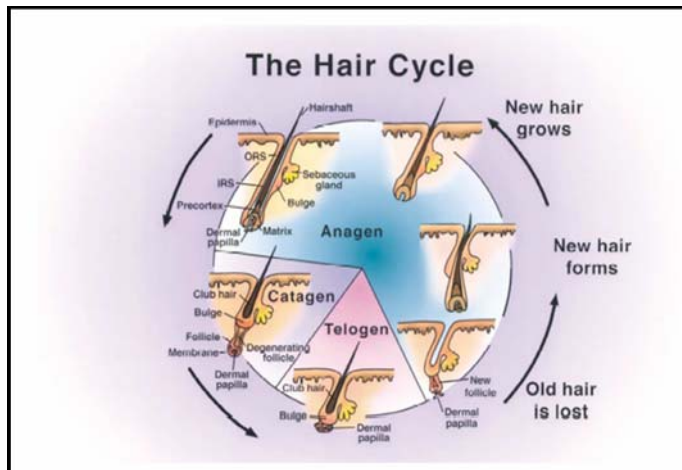


Fig. 4.9.: Der Haarzyklus

(aus Fuchs *et al.*, 2001).

Der Haarfollikel durchläuft kontinuierlich einen Zyklus aus der Wachstumsphase (Anagen), der Regressionsphase (Catagen) und der Ruhephase (Telogen).

Die ersten beiden dieser Zyklen sind in der Maus synchronisiert (Fig. 4.10.), auch wenn die Länge der Phasen je nach Stamm, Geschlecht, Umweltfaktoren und Ernährung variiert (Müller-Röver *et al.*, 2001).

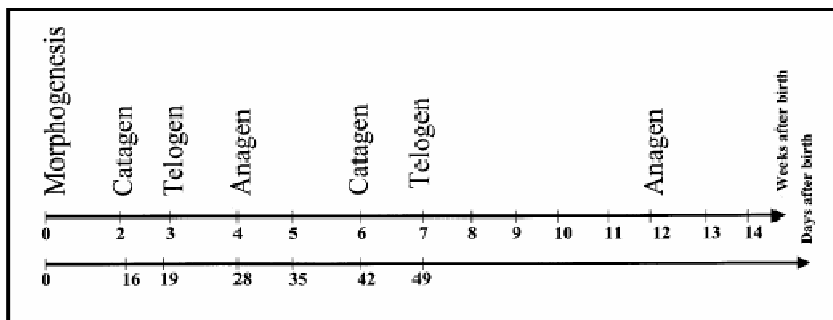


Fig. 4.10.: Zeitskala des Haarzyklus in weiblichen C57BL/6J Mäusen in den ersten 14 Wochen nach der Geburt (aus Müller-Röver *et al.*, 2001).

Der Haarfollikel unterliegt einem immer wiederkehrenden Zyklus von morphologischen Veränderungen. Bei Mäusen startet dieser Zyklus im Alter von zwei Wochen, wenn die Morphogenese abgeschlossen ist, mit einer Apoptose-abhängigen Regression (Catagen) der Haarfollikel, der das Telogen, der Ruhezustand, folgt. Im Anagen, einer Phase schnellen Wachstums, fangen die Haarfollikel wieder an zu proliferieren.

Von den transgenen Tieren wurden Hautbiopsien isoliert, um zu überprüfen, ob die Aktivität des humanen TERT Promotors wie zu erwarten im Anagen ansteigt. Von transgenen hTERTp-lacZ Mäusen und Wildtyp Mäusen, wurde Haut mit Haarfollikeln in der Morphogenese, Telogen 1, Anagen 1, Telogen 2 und Anagen 2 isoliert. Die anagenen und telogenen Phasen wurden durch H & E-Färbungen an Paraffinschnitten dargestellt (Fig. 4.11.).

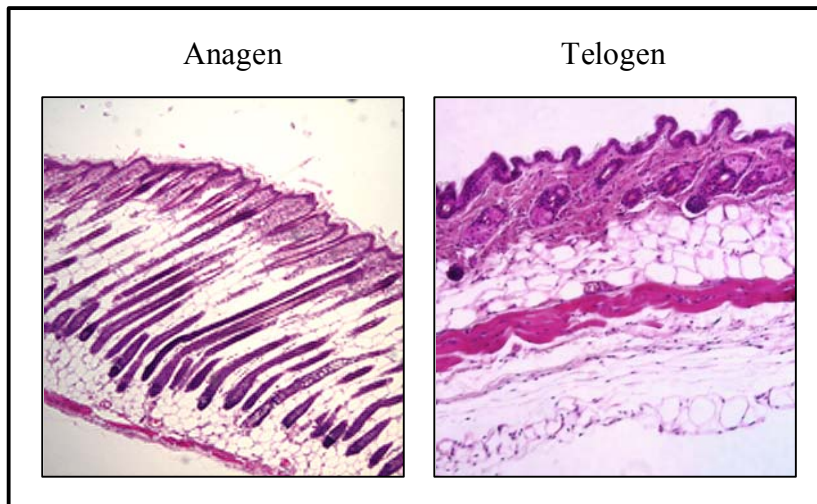


Fig. 4.11.: H & E-Färbung der Haut mit Haarfollikeln der anagenen und telogenen Phase.

Im Anagen (links) hat der Haarfollikel seine maximale Länge (gemessen von der dermalen Papille bis zur Epidermis). Nach der Regression im Catagen schrumpft der Haarfollikel im Telogen (rechts) auf seine minimale Größe.

Mittels radioaktiver RT-PCR wurde die Expression von *mTERT* und *lacZ* während der verschiedenen Phasen des Haarzyklus bestimmt (Fig. 4.12. A und B). Die Telomeraseaktivität wurde mit dem *TRAP assay* nachgewiesen (Fig. 4.12. C und D).

Während der Morphogenese findet man eine hohe *mTERT* Expression, Telomeraseaktivität und hTERT Promotoraktivität (Fig. 4.12.).

Die RT-PCR Analyse und deren Quantifizierung bestätigt, dass im Anagen beide TERT Promotoren eine höhere Aktivität als im Telogen aufweisen (Fig. 4.12. A und B). Allerdings ist dieser Unterschied nur in der ersten telogenen und anagenen Phase deutlich erkennbar. Im zweiten Haarzyklus (T2 und A2) sind die Expressionsunterschiede nicht signifikant. Das könnte daran liegen, dass die Haarfollikel im zweiten Zyklus nicht mehr so gut synchronisiert sind wie im ersten.

An Gesamt-Hautextrakten konnte hier nur eine hohe Telomeraseaktivität während der Morphogenese nachgewiesen werden, die danach abnimmt (Fig. 4.12. C und D). Zwischen Hautbiopsien weiblicher und männlicher Tiere ergab der *TRAP assay* keine Unterschiede in der Telomeraseaktivität (Fig. 4.12. D).

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Stammzellen / Progenitorzellen nur einen geringen Anteil des Haarfollikels ausmachen und es vielleicht zu wenig Haarfollikel pro Hautbiopsie waren, um die Unterschiede in der Telomeraseaktivität im Anagen und Telogen deutlich darzustellen.

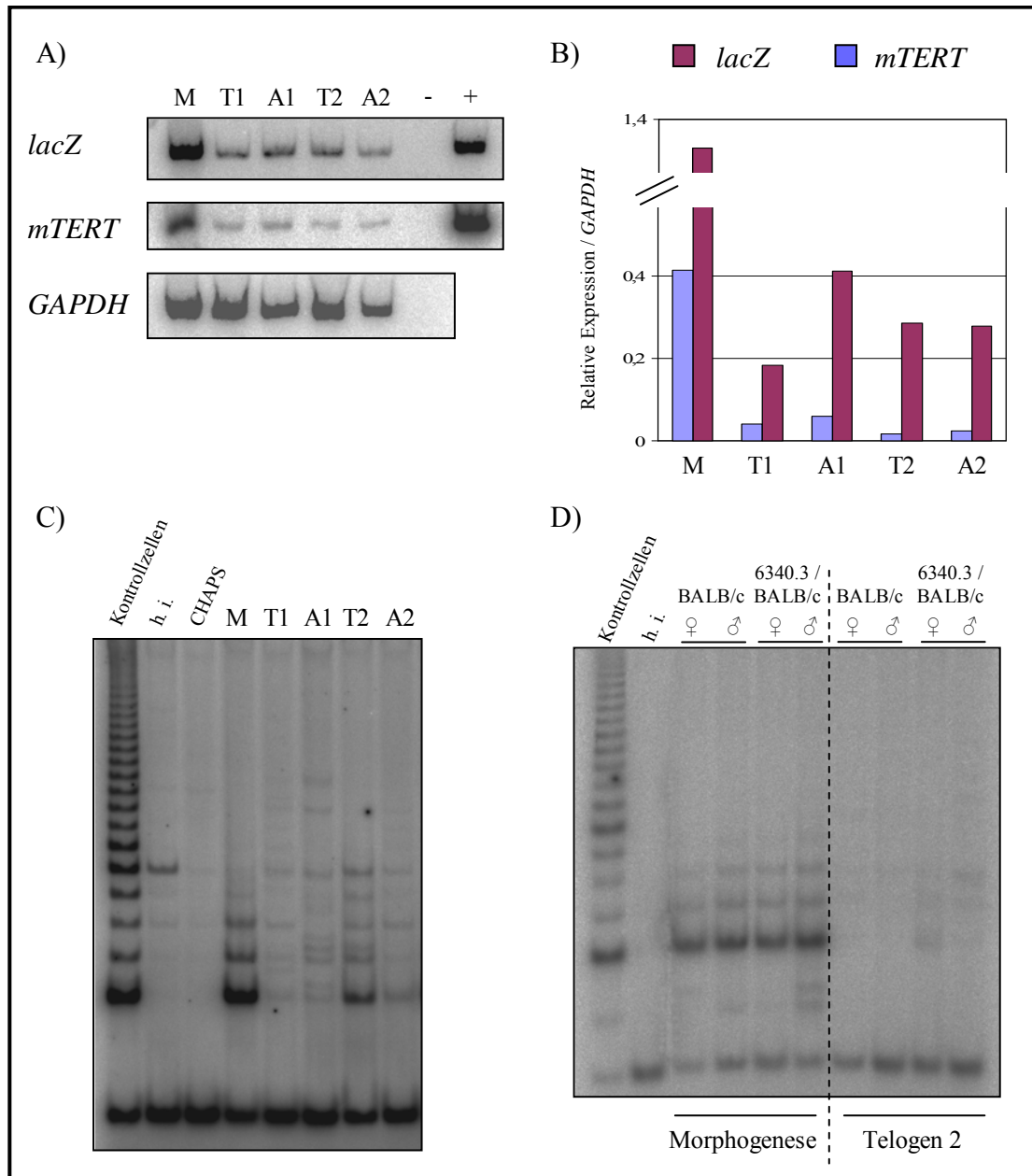


Fig. 4.12.: hTERT Promotoraktivität und *mTERT* Expression sowie Telomeraseaktivität in der Haut während verschiedener Stadien des Haarzyklus (6340.3).

M: Morphogenese, T1: Telogen 1, A1: Anagen 1, T2: Telogen 2, A2: Anagen 2

A) hTERT Promotoraktivität, *mTERT* Expression mittels radioaktiver RT-PCR während verschiedener Phasen des Haarzyklus in weiblichen 6340.3 / BALB/c Mäusen. -: H₂O Negativkontrolle, +: cDNA Positivkontrolle

(B) Das Balkendiagramm zeigt die relative *lacZ* und *mTERT* Expression bezogen auf die Expression des Haushaltsgens *GAPDH*.

C) Telomeraseaktivität zyklisierender Haarfollikel mittels *TRAP assay*. Von jedem Gewebe wurden je 800 Proteinextrakt eingesetzt.

D) *TRAP assay* zum Vergleich der Telomeraseaktivität in Hautextrakten mit Haarfollikeln in der Morphogenese und in der zweiten Telogenphase von sowohl männlichen als auch weiblichen Tieren. Von jedem Gewebe wurden je 1 µg Proteinextrakt eingesetzt.

Bei der transgenen Mauslinie 6335.5 wurde ebenfalls die Menge an *lacZ* mRNA in der Haut während der proliferierenden und ruhenden Phase des Haarzyklus bestimmt. Im Gegensatz zum Telogen konnte in Hautproben von 6335.5 / C57BL/6J Mäusen in der ersten anagenen Phase eine äußerst schwache *lacZ* Reporter gen Expression detektiert werden. Die Telomeraseaktivität ist in der telogenen Phase schwächer als im Anagen (Fig. 4.13.).

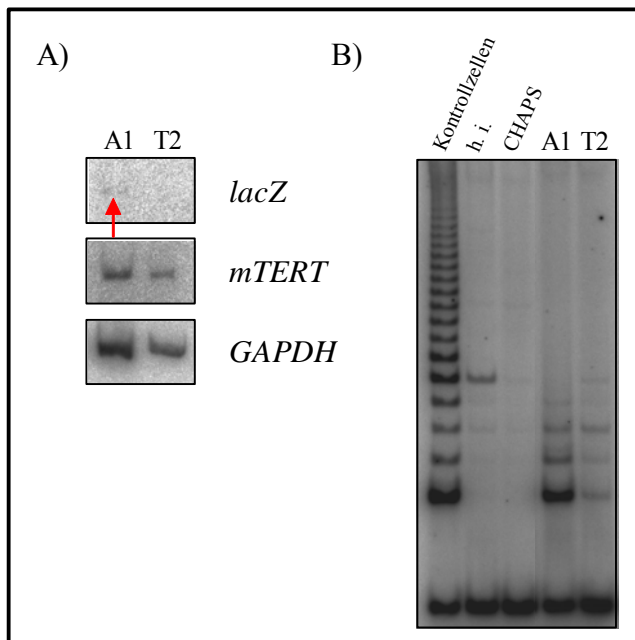


Fig. 4.13.: TERT Promotor- und Telomeraseaktivität im anagenen und telogenen Haarfollikel (6335.5).

A) hTERT Promotoraktivität (roter Pfeil) und *mTERT* Expression mittels radioaktiver RT-PCR während Anagen 1 (A1) und Telogen 2 (T2) des Haarzyklus in weiblichen 6335.5 / C57BL/6J Mäusen.

B) Telomeraseaktivität während Anagen 1 (A1) und Telogen 2 (T2) mittels *TRAP assay*. Von jedem Gewebe wurden je 800 ng Proteinextrakt eingesetzt.

Mittels X-Gal Färbung und β -Gal Immunhistologie wurde versucht, die zelltypspezifische Aktivität der β -Gal in Haarfollikeln hTERTp-*lacZ* transgener Mäuse zu visualisieren. Die hTERT Promotoraktivität wäre in den Progenitorzellen zu erwarten, die in die Haarzwiebel wandern. In genau diesem Abschnitt des humanen Haarfollikels wurde Telomeraseaktivität nachgewiesen (Ramirez *et al.*, 1997).

Erste Versuche die β -Gal mittels X-Gal Färbung oder β -Gal Immunhistologie nachzuweisen waren nicht erfolgreich. Die Proteinmenge an β -Gal in der Haut bzw. den Haarfollikeln scheint für diese Nachweismethoden zu gering zu sein. Variationen der Färbemethoden oder der Nachweis der *lacZ* Expression auf RNA-Ebene mittels der RNA *in situ* Technik könnten zum Erfolg führen.

4.2.5. *lacZ* Reporter Gen Expression und Telomeraseaktivität in primären Fibroblasten in Abhängigkeit vom *p53* Status

In der Literatur wird die Beteiligung des Tumorsuppressor Proteins *p53* an der *hTERT* Regulation kontrovers diskutiert. Während manche Arbeitsgruppen *p53* einen inhibierenden Effekt auf die *hTERT* Expression zusprechen (Kusumoto *et al.*, 1999; Kanaya *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000b), können andere keinen Effekt von *p53* auf die *hTERT* Expression nachweisen (Lin und Elledge, 2003).

Da in den meisten Arbeiten *p53* überexprimiert wurde, beruhen die Ergebnisse auf nicht physiologischen Bedingungen. Die *hTERTp-lacZ* transgenen Mäuse bieten die Möglichkeit, die Aktivität des *hTERT* Promotors in einem Hintergrund mit verschiedenen *p53* Genotypen zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden Maus embrionale Fibroblasten (MEF's) generiert, die das *hTERTp-lacZ* Konstrukt enthalten und die bezüglich *p53* wildtypisch (+/+), heterozygot (+/-) bzw. homozygot *knock-out* (-/-) sind. Bei der *p53* Deletionsmutante wurden die Exons 2 bis 6 des *p53* Gens durch eine Neomycin-Kassette, die zusätzlich als Selektionsmarker dient, ersetzt (Jacks *et al.*, 1994). Insgesamt wurden für die Analysen aus Verpaarungen von *p53*^{+/-} / BALB/c mit 6340.3 / *p53*^{+/-} / BALB/c sechs primäre Zelllinien verwendet:

7-1 / 6340.3 / *p53*^{+/+}, 7-2 / 6340.3 / *p53*^{+/+}, 31-4 / 6340.3 / *p53*^{+/-}, 31-10 / 6340.3 / *p53*^{+/-}, 31-1 / 6340.3 / *p53*^{-/-} und 31-7 / 6340.3 / *p53*^{-/-}.

Die sechs Zelllinien wurden 25 Passagen kultiviert, die Proliferationsrate bestimmt und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für RT-PCR und *TRAP assay* genommen.

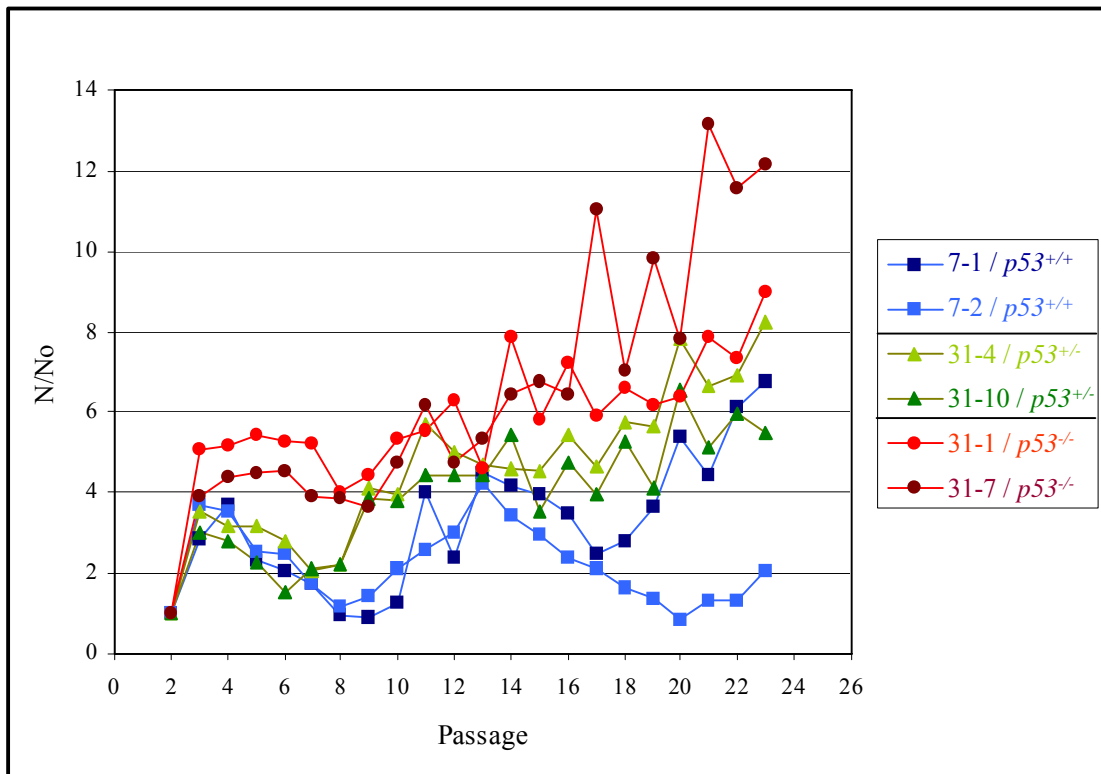


Fig. 4.14.: Wachstumskurve der verschiedenen MEF-Zelllinien.

N/No: Anzahl der Zellen nach 3 bzw. 4 Tagen / Anzahl ausgesäter Zellen (1×10^6)

Die MEF's wurden nach dem 3T3-Protokoll (Todaro und Green, 1963) alle 3 bis 4 Tage gezählt und subkultiviert.

Die Wachstumskurve verdeutlicht (Fig. 4.14.), dass zunächst alle primären MEF-Zelllinien gut proliferieren. Allerdings weisen die $p53^{-/-}$ MEF's konsequent eine höhere Proliferationsrate als die $p53^{+/-}$ MEF's auf, die wiederum schneller als die $p53^{+/+}$ MEF's wachsen. Der $p53$ Status übt einen entscheidenden Einfluss auf Wachstumsparameter wie Proliferationsrate, Dichte der Zellen bei Konfluenz, Seneszenz, Immortalisierung und Transformation aus (Hiyama *et al.*, 1996).

Zwischen der 6. und 10. Passage gehen die MEF's in die Krise und proliferieren für einige Passagen gar nicht oder nur kaum. Diesem seneszenten Status können einige Zellen durch spontane Immortalisierung entkommen. Jenes zeigt sich an der wieder ansteigenden Wachstumskurve ab Passage 10. Bis auf die Zelllinie 7-2 / 6340.3 / $p53^{+/+}$ steigert sich die Proliferationsrate bei den übrigen MEF's kontinuierlich mit steigender Passagenzahl. Bei 7-2 / 6340.3 / $p53^{+/+}$ sinkt die Wachstumskurve ab Passage 13 auf ein Niveau herab, bei dem sich die Zellen nicht mehr teilen. Nach Passage 20 ist wieder ein leichter Anstieg bei der Proliferation zu verzeichnen.

Bei den *p53* defizienten MEF's ist ab der 15. Passage ein Verlust der Kontaktinhibition zu beobachten, und die Zellen wachsen in mehreren Schichten übereinander.

Interessant ist das unterschiedliche Wachstumsverhalten der beiden MEF-Linien 7-1 und 7-2 mit Wildtyp *p53*. Bis zur 17. Passage ist die Proliferationsrate beider Zelllinien ähnlich, dann aber geht die Linie 7-2 in einen eher seneszenten Status über, während die Linie 7-1 ihre Proliferationsrate steigert und eher den *p53*^{+/-} MEF's ähnelt.

Mittels RT-PCR wurde untersucht, wie sich der *p53* Status auf die Expression von *mTERT* und *lacZ* auswirkt und ob sich die Expression mit steigender Passagenzahl, die mit Krise, Seneszenz, Immortalisierung und ggf. Transformation einhergeht, ändert (Fig. 4.15. A). Die Telomeraseaktivität wurde ebenfalls zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Fig. 4.15. B).

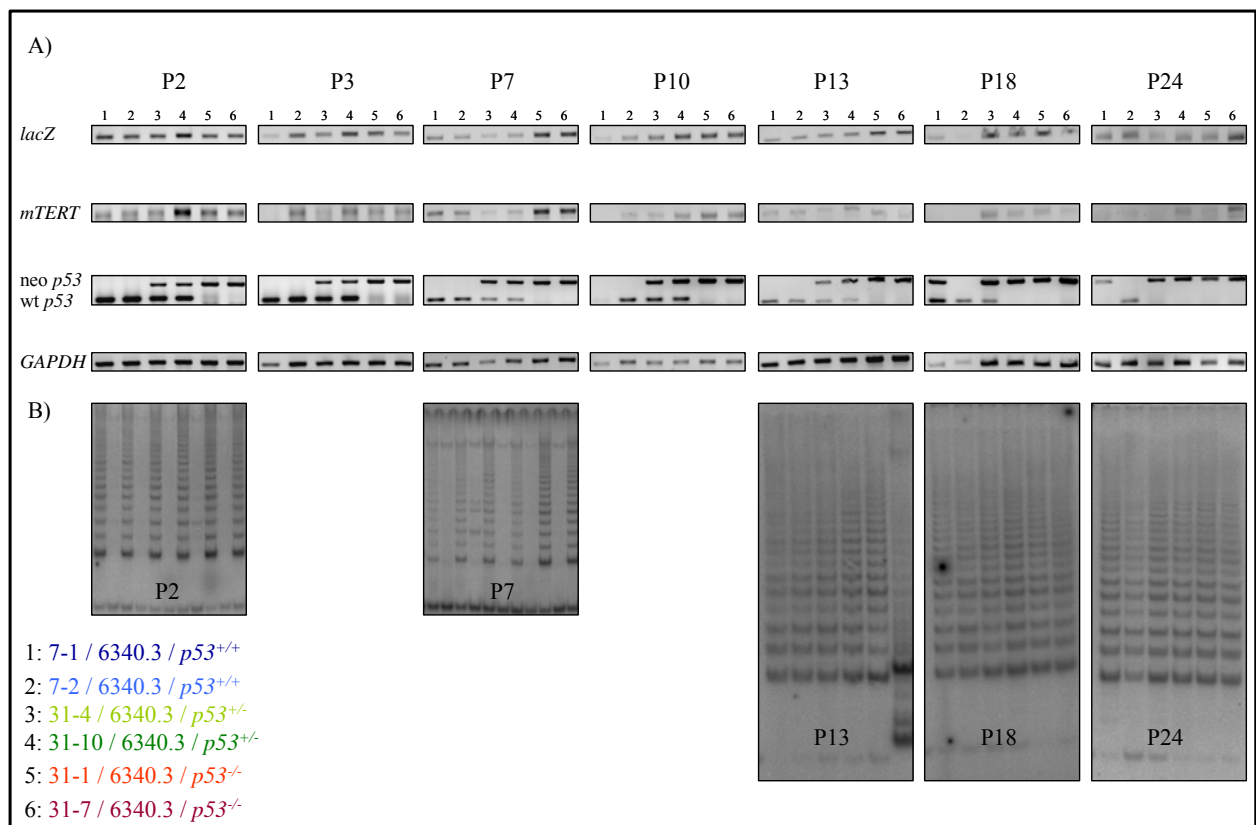


Fig. 4.15.: hTERT Promotoraktivität und *mTERT* Expression sowie Telomeraseaktivität während steigender Passagenzahl der MEF's.

Von verschiedenen Passagen (P) wurden Zellen für RT-PCR und *TRAP assay* geerntet.

A) Die *mTERT* und *lacZ* Expression sowie der *p53* Status (*wt p53*: Wildtyp *p53*, *neo p53*: *p53* Deletionsmutante) wurden mittels RT-PCR bestimmt. *GAPDH* dient als Ladekontrolle.

B) *TRAP assay* zur Bestimmung der Telomeraseaktivität. Von jedem Gewebe wurden je 400 ng Proteinextrakt eingesetzt.

Sowohl das *lacZ* Reportergen als auch das endogene *mTERT* Gen werden in MEF's exprimiert. Unter Berücksichtigung der *GAPDH* Signale zeigen die RT-PCR Daten einen Trend zu einer insgesamt stärkeren Expression der analysierten Gene und einer höheren Telomeraseaktivität in den *p53* defizienten MEF's. Auffällig ist das Expressionsmuster in Passage 7. Hier befinden sich die Zelllinien in der Krise und verlangsamen bzw. stoppen ihre Proliferation. Es ist anzunehmen, dass das *p53* Protein in diesem seneszenten Status stabilisiert wird und unter Umständen Einfluss auf die TERT Promotoraktivität nehmen kann. In der Tat nimmt die Aktivität der TERT Promotoren und der Telomerase in den MEF's mit Wildtyp *p53* während der Krise ab. Diese Reduktion ist nicht bei den *p53* defizienten MEF's zu beobachten, während die *p53* heterozygoten MEF's ein intermediäres Muster zeigen. Nachdem einige Zellen der Krise durch spontane Immortalisierung entkommen konnten, ist auch kaum noch eine Inhibition der TERT Promotoren bzw. der Telomerase durch *p53* nachzuweisen.

Der *p53* Status bleibt nicht mit steigender Passagenzahl konstant. Zwischen der 13. und 18. Passage hat die Zelllinie 31-10 das Wildtyp *p53* Allel abgeschaltet und in der 24. Passage ist dies auch bei der zweiten Zelllinie 31-4 mit ursprünglichem *p53*^{+/-} Status der Fall.

Bei der MEF-Linie 7-1, die ab Passage 17 im Wachstumsverhalten eher den *p53*^{+/-} MEF's ähnelt, zeigt sich in der RT-PCR von Passage 18 eine Bande für die Neomycin-Kassette, die die Deletionsmutante von *p53* repräsentiert (Fig. 4.15. A). Es ist zu vermuten, dass diese Zelllinie beim Subkultivieren mit *p53*^{+/-} MEF's kontaminiert wurde. Das würde auch die veränderte Proliferation erklären. In der 24. Passage hat diese Zelllinie zusätzlich das Wildtyp *p53* Allel abgeschaltet.

Anhand der Wachstumskurve konnte gezeigt werden (Fig. 4.14.), dass einige Zellen ab der 10. Passage spontan immortalisieren. Die Fähigkeit muriner embryonaler Fibroblasten, spontan zu immortalisieren, ist ein bekanntes Verhalten (Todaro und Green, 1963).

Für eine Transformation der Zellen sind in der Regel zusätzliche Mutationen erforderlich, die z. B. Tumorsuppressor Gene wie *p53* betreffen. Nur transformierte Zellen besitzen die Fähigkeit, Verankerungs-unabhängig zu proliferieren. Aus diesem Grund stellt das Wachstum von Zellen in Softagar ein sehr wichtiges Kriterium zur Feststellung der Malignität von Zellen dar. Die Fähigkeit in Softagar zu wachsen, wurde an den MEF's der 10. und 25. Passage getestet (Fig. 4.16. und Tab. 4.2.).

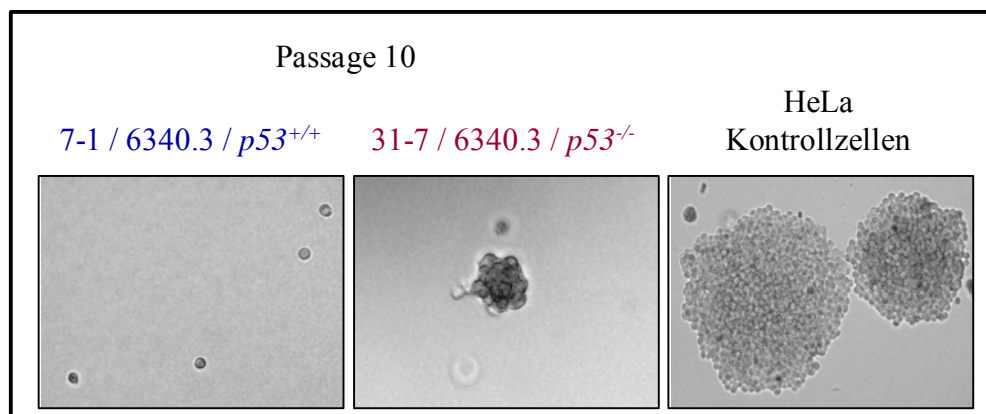


Fig. 4.16.: Transformierte Zellklone, die Verankerungs-unabhängig in Softagar wachsen.

Nach drei Wochen Kultivierung der MEF's aus Passage 10 in Softagar zeigen nur die HeLa Zellen (Positivkontrolle) sehr hohe Klonierungseffizienzen. Bis auf eine Zellkolonie bei 31-7 / 6340.3 / $p53^{-/-}$ konnten die übrigen Zelllinien keine Kolonien bilden.

Bei den MEF's von Passage 10 konnte nur die Zelllinie 31-7 / 6340.3 / $p53^{-/-}$ eine Kolonie im Agar bilden. Nach 25 Passagen waren es durchschnittlich 34 Kolonien. Verglichen mit den HeLa Kontrollzellen ist dies eine sehr geringe Klonierungseffizienz (Tab. 4.2.). Die anderen Zelllinien wiesen noch schwächere Klonierungseffizienzen auf: 7-1 / 6340.3 / $p53^{+/+}$ (0,25), 7-2 / 6340.3 / $p53^{+/+}$ (0,25), 31-4 / 6340.3 / $p53^{+/-}$ (0,25), 31-10 / 6340.3 / $p53^{+/-}$ (0), 31-1 / 6340.3 / $p53^{-/-}$ (1,5). Die Linie 31-7 / 6340.3 / $p53^{-/-}$ mit den meisten Kolonien zeigte auch kontinuierlich die höchste Proliferationsrate (Fig. 4.14.). Bei den MEF's aus Passage 25 ist zu beachten, dass zu diesem Zeitpunkt die Linien 7-1 / 6340.3 / $p53^{+/+}$, 31-4 / 6340.3 / $p53^{+/-}$ sowie 31-10 / 6340.3 / $p53^{+/-}$ die $p53$ Expression abgeschaltet haben (Fig. 4.15. A).

Tab. 4.2.: Fähigkeit der MEF's, in Abhängigkeit vom $p53$ Status in Softagar zu wachsen.

MEF's P10	Kolonien	MEF's P25	Kolonien
7-1 / 6340.3 / $p53^{+/+}$	0	7-1 / 6340.3 / $p53^{+/+}$	0,25
7-2 / 6340.3 / $p53^{+/+}$	0	7-2 / 6340.3 / $p53^{+/+}$	0,25
31-4 / 6340.3 / $p53^{+/-}$	0	31-4 / 6340.3 / $p53^{+/-}$	0,25
31-10 / 6340.3 / $p53^{+/-}$	0	31-10 / 6340.3 / $p53^{+/-}$	0
31-1 / 6340.3 / $p53^{-/-}$	0	31-1 / 6340.3 / $p53^{-/-}$	1,5
31-7 / 6340.3 / $p53^{-/-}$	0,25	31-7 / 6340.3 / $p53^{-/-}$	34
HeLa Kontrolle	> 1000	HeLa Kontrolle	> 1000

Vergleich der Klonierungseffizienzen der sechs Zelllinien aus Passage 10 mit Passage 25. Es wurden je vier 6 cm Zellkulturschalen jeder Zelllinie in Softagar für drei Wochen kultiviert. Die durchschnittliche Anzahl an Kolonien pro Schale ist dargestellt. Die HeLa Zellen fungieren als Positivkontrolle.

Es wurden ebenfalls 6335.5 / BALB/c MEF's etabliert, um die hTERT Promotoraktivität in MEF's dieser hTERTp-*lacZ* transgenen Mauslinie zu untersuchen.

Die 6335.5 / BALB/c MEF's zeigen im Gegensatz zu den 6340.3 / BALB/c MEF's keine *lacZ* Reportergergen Expression (Fig. 4.17.).

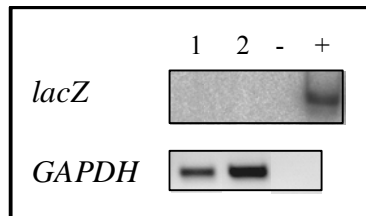


Fig. 4.17.: hTERT Promotoraktivität in 6335.5 / BALB/c MEF's.

1: 96-10 / 6335.5 / $p53^{+/+}$, 2: 84-4 / 6335.5 / $p53^{-/-}$

Die *lacZ* Expression wurde mittels radioaktiver RT-PCR bestimmt. *GAPDH* dient als Ladekontrolle.

-: H₂O Negativkontrolle, +: pSKT-NLS-*lacZ* Positivkontrolle

Die Expression von *hTERT* in primären präseneszenten humanen Fibroblasten wurde bisher erst einmal beschrieben, und zwar ausschließlich während der S-Phase (Masutomi *et al.*, 2003). Daher sollten die hTERT Promotoraktivität, die *mTERT* Expression sowie die Telomeraseaktivität in 6340.3 / BALB/c Maus embrionalen Fibroblasten (MEF's) und auch Maus adulteren Fibroblasten (MAF's) untersucht werden.

In den MAF-Zelllinien 1 / 6340.3 / $p53^{+/+}$ und 19 / 6340.3 / $p53^{-/-}$ zeigt der ektopische hTERT Promotor eine moderate Aktivität, während der endogene mTERT Promotor nur eine schwache Aktivität aufweist (Fig. 4.18. A). Anhand des *TRAP assay* ist eine höhere Telomeraseaktivität in den embryonalen Fibroblasten verglichen mit den adulten Fibroblasten erkennbar (Fig. 4.18. B).

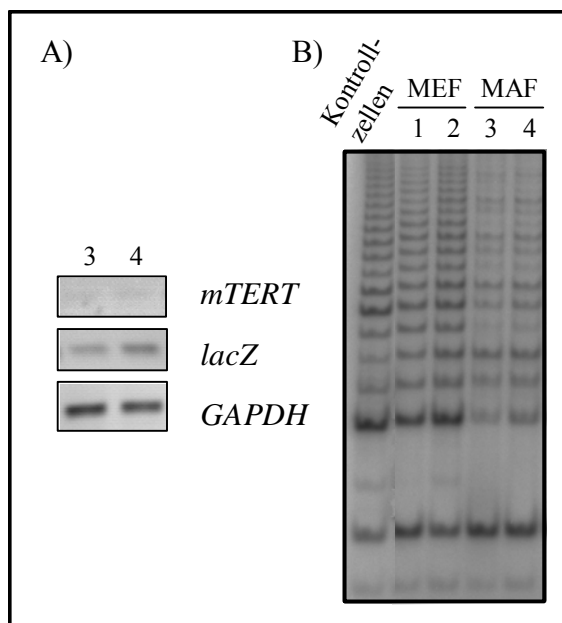


Fig. 4.18.: hTERT Promotoraktivität und *mTERT* Expression sowie Telomeraseaktivität in MAF's.

MEF's: 1: 7-1 / 6340.3 / $p53^{+/+}$, 2: 31-1 / 6340.3 / $p53^{-/-}$

MAF's: 3: 1 / 6340.3 / $p53^{+/+}$, 4: 19 / 6340.3 / $p53^{-/-}$

A) Die *mTERT* und *lacZ* Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt. *GAPDH* dient als Ladekontrolle.

B) *TRAP assay* zur Bestimmung der Telomeraseaktivität. Von jedem Gewebe wurden je 400 ng Proteinextrakt eingesetzt.

4.2.6. Aktivität des humanen *TERT* Gen Promotors in einem Mausmodell für Mammakarzinome

Aufgrund der Tatsache, dass die Telomerase in über 90 % humaner Brustkrebskrankungen hochreguliert wird (Kimura *et al.*, 2003), bot es sich an, die Regulation des hTERTp-*lacZ* Konstrukts in einem Mausmodell für Mammakarzinome zu studieren.

p53 heterozygote BALB/c Mäuse entwickeln spontan Tumore, die zu 42 % Mammakarzinome sind (Kuperwasser *et al.*, 2000; Blackburn *et al.*, 2003). Spontane Mammakarzinome entwickelten sich mit einer Latenzzeit von acht bis vierzehn Monaten.

Mäuse des Inzuchtstammes BALB/c haben eine höhere Tumorzinzidenz, da sie Mutationen in den *Cdkn2a* (*p16^{INK4A}* und *p19^{ARF}*) und *Prkdc* Loci tragen (Zhang *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2001). In diesem Fall enthält der *Cdkn2a* Locus, der für *p16^{INK4A}* und *p19^{ARF}* kodiert, zwei Punktmutationen. *p16^{INK4A}* inhibiert normalerweise die Zellzyklusprogression am Restriktionspunkt von der G1-Phase in die S-Phase, indem das Protein die Phosphorylierung von Rb durch die Zyklin-abhängige Proteinkinase 4 (Cdk4) verhindert. Im BALB/c Inzuchtstamm führt die Punktmutation im *Cdkn2a* Locus zu einer verringerten Fähigkeit von *p16^{INK4A}*, die Phosphorylierung von Rb zu inhibieren und einen Wachstumsarrest zu induzieren (Zhang *et al.*, 1998). Die *p19^{ARF}* Funktion ist nicht beeinträchtigt.

Prkdc kodiert für die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase, die an der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur beteiligt ist. In BALB/c Mäusen ist dieser Locus von zwei Punktmutationen betroffen, was in einer höheren genomischen Instabilität in Mammaepithelien nach Bestrahlung resultiert (Yu *et al.*, 2001).

Um den hTERT Promotor in diesem Mausmodell für Mammakarzinome zu untersuchen, wurden bitransgene hTERTp-*lacZ* / *p53^{+/-}* / BALB/c Mäuse sowohl der Linie 6340.3 als auch 6335.5 generiert und unter Beobachtung gehalten, bis sie sichtbare Tumore aufwiesen. Allerdings stellte sich heraus, dass die Mehrheit der Mäuse keine Mammakarzinome, sondern andere Tumore wie Lymphome oder Sarkome entwickelte. Mehrere weibliche Tiere mussten getötet werden, da sich ihr Uterus im Alter abgesenkt hatte und begann sich „auszustülpen“. Nach 22 Monaten haben von 18 6335.5 / *p53^{+/-}* / BALB/c Tieren sieben Mäuse Mammakarzinome und von 16 6340.3 / *p53^{+/-}* / BALB/c Tieren hat nur eine Maus (# 8) ein thorakales Mammakarzinom entwickelt (Tab. 4.3.). Die Beurteilung der Tumore anhand von

H & E-Färbungen erfolgte freundlicherweise von Dr. Jürgen Löhler und Heidrun Gevensleben (beide Heinrich-Pette-Institut).

Tab. 4.3.: Übersicht über isolierte Tumore aus bitransgenen hTERTp-lacZ / p53^{+/-} / BALB/c Mäusen und hTERT Promotoraktivität sowie Expression ausgewählter Tumormarker.

#	Genotyp	Sex w/m	Alter (Monate)	Tumor	lacZ	mTERT	her2	ESX	ER81	c-myc
11	6335.5 / p53 ^{+/-}	w	8	zerv. Mammakarz.	++	+++	+	-	+	++
87	6335.5 / p53 ^{+/-}	w	12	thor. Mammakarz.	-/+	+++	+	+++	++	+
99	6335.5 / p53 ^{+/-}	w	12	abd. Mammakarz.	-	+++	+	+++	+	+++
30	6335.5 / p53 ^{+/-}	w	16	abd. Mammakarz.	-	+++	+	++	++	++
7	6335.5 / p53 ^{+/-}	w	12	zerv. Mammakarz.	-/+	+++	++	++	++	+++
59	6335.5 / p53 ^{+/-}	w	14	zerv. Mammakarz.	-	+++	++	+++	++	+++
14	6335.5 / p53 ^{+/-}	w	17	zerv. Mammakarz.	-	+++	++	++	++	+++
98	6335.5 / p53 ^{+/-}	w	7	Lymphom	-	+++				
61	6335.5 / p53 ^{+/+}	w	3	ohne, zerv. Mamma	-	+	-/+	-/+	+++	++
8	6340.3 / p53 ^{+/-}	w	13	thor. Mammakarz.	+++	+++	++	++	+++	+
13	6340.3 / p53 ^{+/-}	w	13	Sarkom	++	+				
29	6340.3 / p53 ^{+/-}	m	6	Thymom	++	+++				
24	6340.3 / p53 ^{+/-}	w	15	Sarkom	++	+++				++
11	6340.3 / p53 ^{+/-}	w	13	ohne, zerv. Mamma	+	+	-	-	-	-

Die Mäuse zeigten zu den angegebenen Zeitpunkten deutliche Tumore (außer die Kontrollmäuse # 61 6335.5 / p53^{+/+} und # 11 6340.3 / p53^{+/-}). Die Expression von *lacZ*, *mTERT*, *her2*, *ESX*, *ER81* und *c-myc* in den Tumorproben wurde mittels RT-PCR bestimmt. Deren Expression verglichen mit der in normalem Gewebe (im Falle der Mammakarzinome verglichen mit den übrigen normalen Mammæ derselben Maus) wurde in stark (+++), mittel (++), schwach (+), keine (-) und Hintergrund (-/+) eingeteilt.

Die endogene *mTERT* Expression ist in allen Mammatumoren erhöht. Ebenfalls bekannte Tumormarker wie *her2*, *ESX* (außer im Mammakarzinom von # 11 6335.5 / p53^{+/-}), *ER81* und *c-myc* sind in den tumorigenen Geweben überexprimiert. Der heterozygote *p53* Status ist in allen Fällen in den Tumoren laut RT-PCR erhalten geblieben (exemplarisch bei Fig. 4.19. und 4.21.). Der hTERT Promotor weist in den Tumoren der bitransgenen 6340.3 / p53^{+/-} Tiere eine erhöhte Aktivität auf. Dagegen zeigt der hTERT Promotor in den Tumoren der 6335.5 / p53^{+/-} bitransgenen Mäuse nur in einem Fall (# 11) eine deutliche Reaktivierung (Fig. 4.21.). Auffällig ist, dass gerade in dieser Tumorprobe die *ESX* mRNA nicht erhöht ist.

Im Folgenden sind die vollständigen Analysen von drei Mäusen mit Mammakarzinomen exemplarisch dargestellt.

Die Maus # 8 6340.3 / $p53^{+/-}$ hat im Alter von 13 Monaten ein thorakales Mammakarzinom entwickelt. Die übrigen Mammagewebe zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp. Die RT-PCR Daten ergeben erhöhte *lacZ*, *mTERT*, *her2*, *c-myc*, *ER81* und *ESX* mRNA Mengen im Tumorgewebe (Fig. 4.19. A). Die verstärkte *mTERT* Expression korreliert mit gesteigerter Telomeraseaktivität in dem Tumor (Fig. 4.19. B).

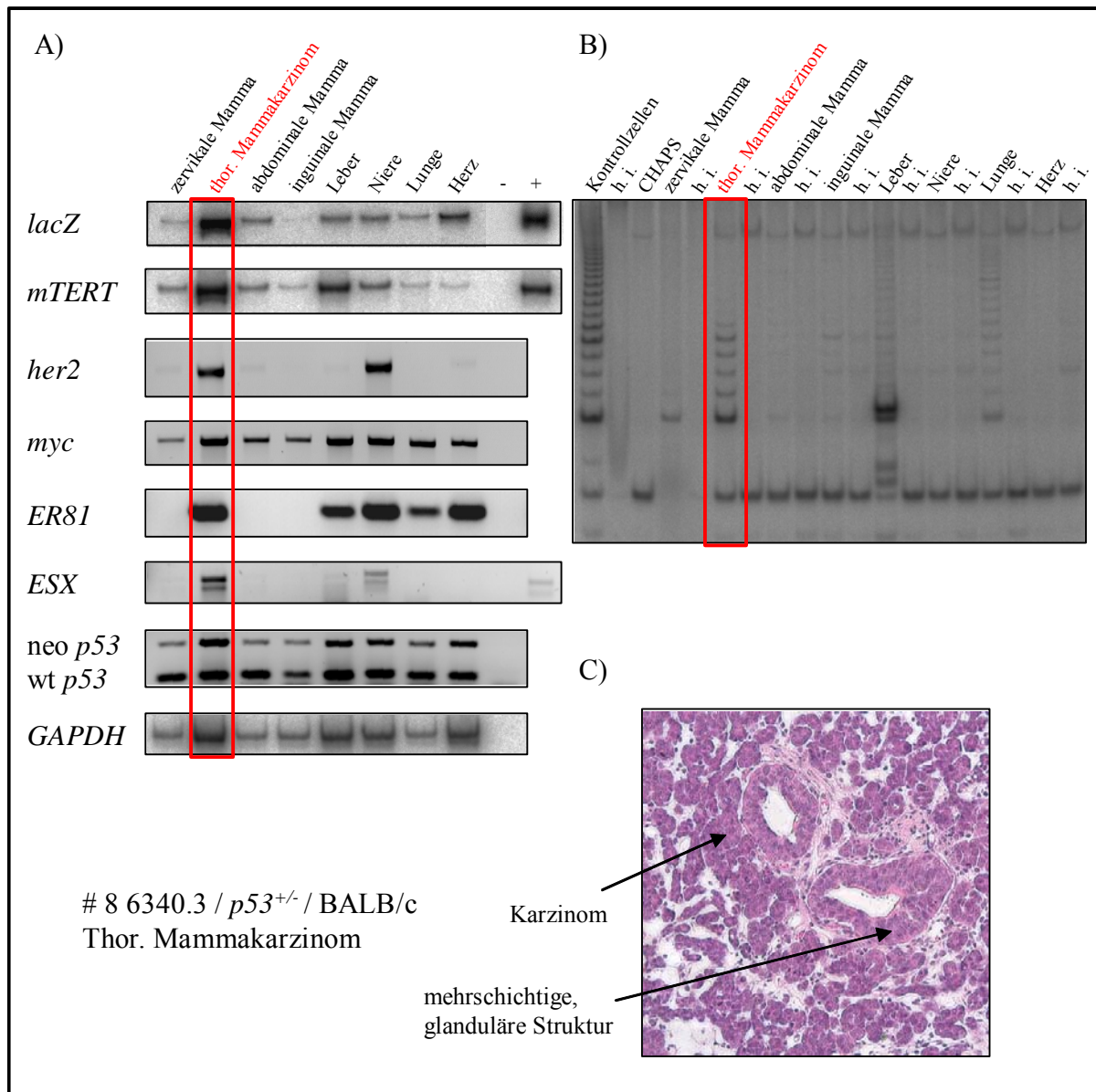


Fig. 4.19.: hTERT Promotoraktivität und verschiedene Tumormarker sind in einem thorakalen Mammakarzinom erhöht.

A) RT-PCR Analyse der *lacZ*, *mTERT*, *her2*, *c-myc*, *ER81*, *ESX*, *p53* und *GAPDH* (als Ladekontrolle) Expression. -: H₂O Negativkontrolle, +: cDNA Positivkontrolle

B) TRAP assay zur Bestimmung der Telomeraseaktivität. Von jedem Gewebe wurden je 100 ng Proteinextrakt eingesetzt.

C) H & E-Färbung des Mammakarzinoms.

In der H & E-Färbung sieht man ein Mammakarzinom mit mehrschichtiger, noch glandulärer Struktur, großen, polymorphen Kernen, einem hohen mitotischen Index und Stromareaktion (Fig. 4.19. C). Mit der β -Gal Immunhistologie kann das Protein nur in den Tumorzellen (rote Pfeile) und nicht in den umgebenden Stromazellen (schwarze Pfeile) detektiert werden (Fig. 4.20. links).

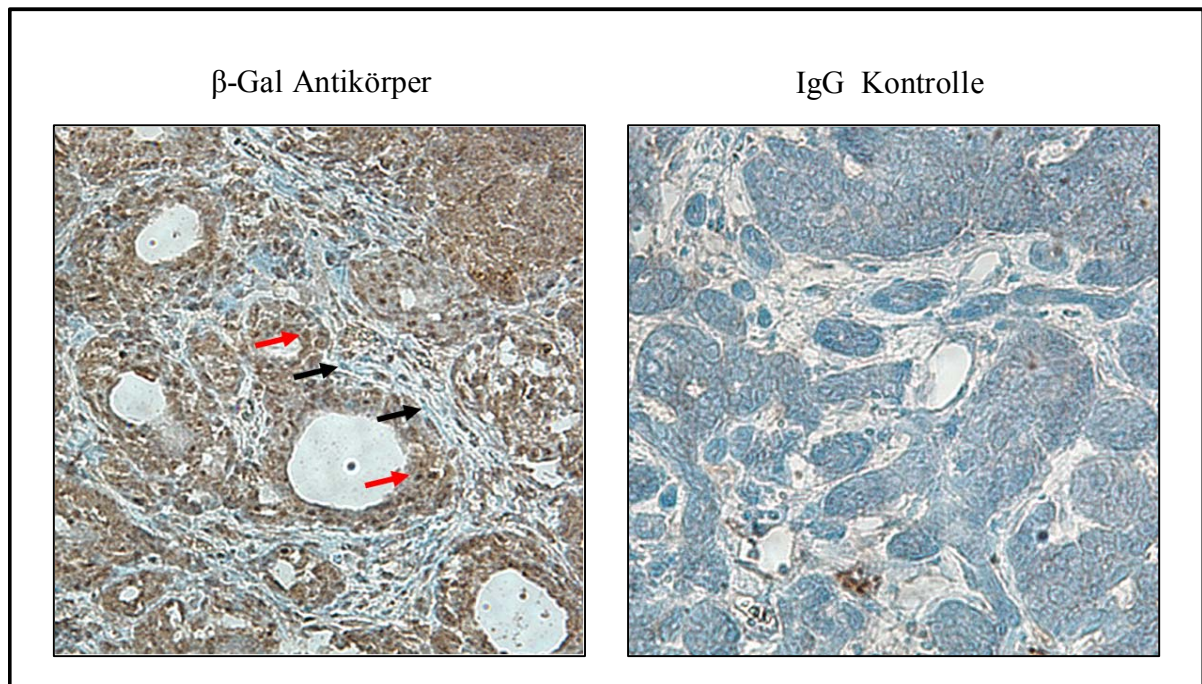


Fig. 4.20.: Detektion der β -Gal in einem thorakalen Mammakarzinom.

Paraffinschnitte des Mammakarzinoms (# 8 6340.3 / $p53^{+/-}$) wurden für immunhistologische Analysen eingesetzt. Dazu wurden sie mit einem β -Gal spezifischen Antikörper (links) bzw. als Negativkontrolle nur mit dem IgG Zweitantikörper (rechts) inkubiert.

Die Maus # 11 6335.5 / $p53^{+/-}$ hat mit acht Monaten ein zervikales Mammakarzinom entwickelt. Die übrigen Mammae wiesen keine Auffälligkeiten auf. In der hTERTp-*lacZ* Mauslinie 6335.5 konnte eine Aktivität des hTERT Promotors in normalen adulten Organen ausschließlich im Hodengewebe detektiert werden (vgl. Fig. 4.4. B). Umso interessanter war das Ergebnis der RT-PCR Analyse, das zeigt, dass der hTERT Promotor nur im tumorigenen zervikalen Mammagewebe reaktiviert wird, in den übrigen normalen Mammae derselben Maus jedoch nicht (Fig. 4.21. A). Bis auf *ESX* sind die Tumormarker *mTERT*, *her2*, *c-myc* und *ER81* ebenfalls im Mammakarzinom erhöht. Die verstärkte *mTERT* Expression korreliert mit hoher Telomeraseaktivität in dem Tumorgewebe (Fig. 4.21. B). Die H & E-Färbung zeigt ein schlecht differenziertes Karzinom (GIII), das eingekapselt vorliegt (Fig. 4.21. C). Es sind

große, polymorphe Kerne, ein hoher mitotischer Index, Nekrosen und Stromareaktion zu erkennen.

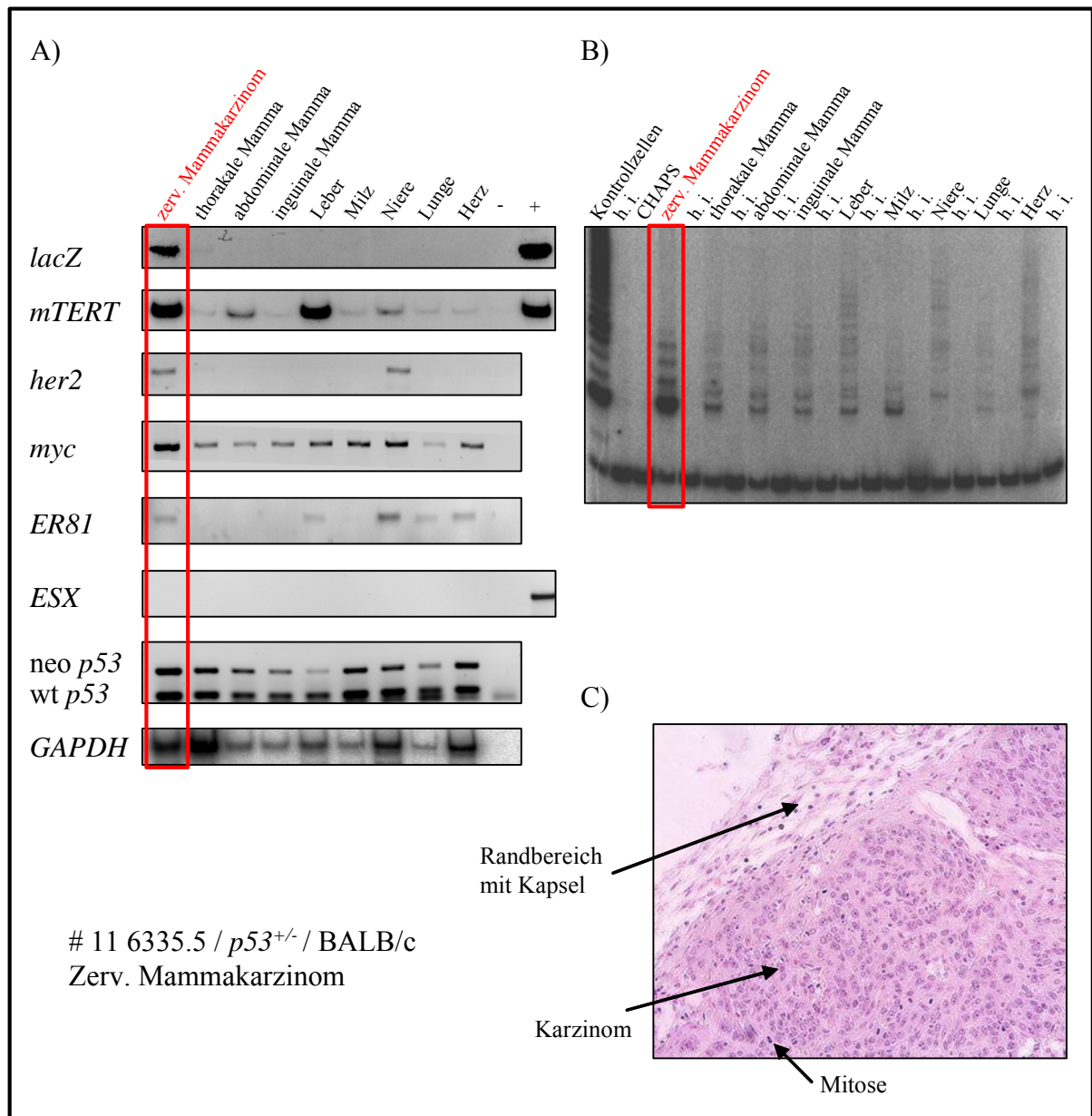


Fig. 4.21.: Induktion der hTERT Promotoraktivität und verschiedener Tumormarker in einem zervikalen Mammakarzinom.

A) RT-PCR Analyse der *lacZ*, *mTERT*, *her2*, *c-myc*, *ER81*, *ESX*, *p53* und *GAPDH* (als Ladekontrolle) Expression. -: H₂O Negativkontrolle, +: cDNA Positivkontrolle

B) TRAP assay zur Bestimmung der Telomeraseaktivität. Von jedem Gewebe wurden je 250 ng Proteinextrakt eingesetzt.

C) H & E-Färbung des Mammakarzinoms.

Die Maus # 14 6335.5 / $p53^{+/-}$ hat im Alter von 17 Monaten ein zervikales Mammakarzinom entwickelt. Die anderen Mammagewebe zeigten ebenfalls keinen offensichtlichen Phänotyp. Im Gegensatz zu den oben gezeigten Fällen wird der hTERT Promotor nicht im Tumorgewebe aktiviert (Fig. 4.22. A), während die analysierten Tumormarker eine erhöhte Expression zeigen.

In der H & E-Färbung sieht man ein schlecht differenziertes Karzinom (GIII), mit großen, polymorphen Kernen, einem hohen mitotischen Index und Stromareaktion (Fig. 4.22. B). Im Fettgewebe ist eine beginnende Neoangiogenese erkennbar. Es sind noch Bereiche normalen Mammagewebes vorhanden (Fig. 4.22. B oben rechts).

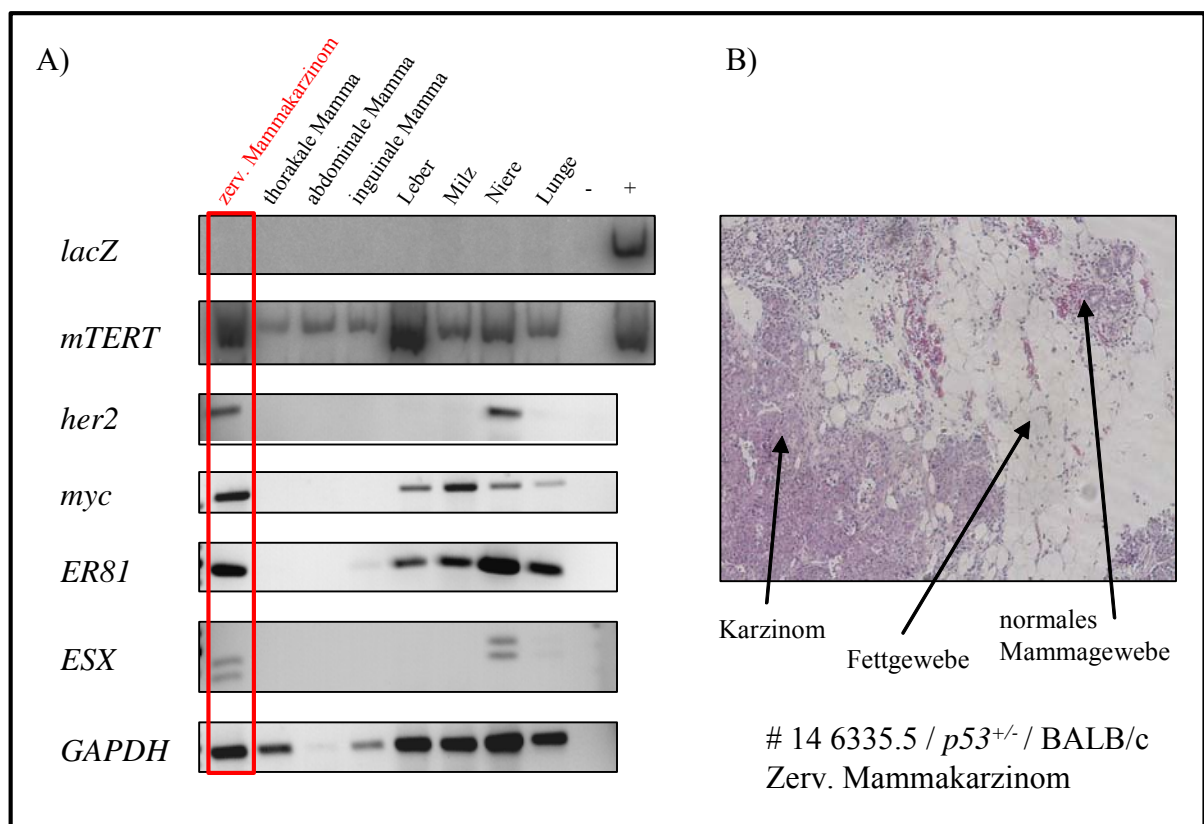


Fig. 4.22.: Induktion verschiedener Tumormarker in einem zervikalen Mammakarzinom, jedoch nicht des hTERT Promotors.

A) RT-PCR Analyse der *lacZ*, *mTERT*, *her2*, *c-myc*, *ER81*, *ESX* und *GAPDH* (als Ladekontrolle) Expression.

-: H₂O Negativkontrolle, +: cDNA Positivkontrolle

B) H & E-Färbung des Mammakarzinoms.

Mit diesem Modell für spontane Mammakarzinome konnte bestätigt werden, dass die *TERT* Expression während der Tumorgenese hochreguliert wird (Kim *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 2003), und zwar sowohl die endogene *mTERT* Expression als auch zum Teil die hTERT Promotoraktivität. Allerdings ist die Anzahl an Tumoren sehr gering, was vor allem darauf

zurückzuführen ist, dass nur wenige der Versuchstiere (8 von 34) in einem relativ langen Zeitraum (bis zu 22 Monaten) tatsächlich Mammakarzinome entwickelt haben.

4.2.7. hTERT Promotoraktivität und mTERT Expression werden während der Leberregeneration induziert

Die Leber als hochregeneratives Organ zeigt bezüglich der Telomeraseaktivität bei Mensch und Maus beachtliche Unterschiede (vgl. Fig. 4.1. und 4.2.). Während beim Menschen keine Telomerase in der Leber detektierbar ist, gehört die Mäuseleber zu den Organen mit sehr hoher Telomeraseaktivität. Normalerweise befinden sich die Hepatozyten in einem Ruhezustand und müssen erst aktiviert werden, damit sie in regenerativen Prozessen anfangen zu proliferieren. In den meisten humanen Leberkrankheiten wie Leberzirrhose, Hepatitis und Leberkarzinomen werden die *hTERT* Expression und Telomerase induziert (Tahara *et al.*, 1995).

Untersuchungen der *hTERT* Expression und Telomeraseaktivität in humanen Leberproben während regenerativer Prozesse oder der Tumorgenese stellen nur Momentaufnahmen dar, weil humane Gewebeproben nur sehr begrenzt verfügbar sind. Das hTERTp-*lacZ* Mausmodell bietet in diesem Fall die exzellente Möglichkeit, nicht nur die Regulation der endogenen *mTERT* Expression und Telomeraseaktivität, sondern aus des hTERT Promotors in der Leber *in vivo* zu analysieren.

Aus diesem Grund wurde die etablierte Methode der partiellen Hepatektomie (PH) bei der Maus angewandt, um regenerative Prozesse zu erforschen. Dabei werden drei der fünf Leberlappen unter Narkose entfernt. Die Zellen in den verbleibenden Leberlappen beginnen zu proliferieren, um den Verlust an Lebermasse zu kompensieren. Dabei werden die ruhenden Hepatozyten aktiviert.

An 20 6340.3 / C57BL/6J und 20 Wildtyp C57BL/6J Mäusen wurden eine PH durchgeführt. Die Expression von *mTERT* sowie die Telomerase- und hTERT Promotoraktivität wurden nach verschiedenen Zeitpunkten mittels RT-PCR und *TRAP assay* analysiert (Fig. 4.23.).

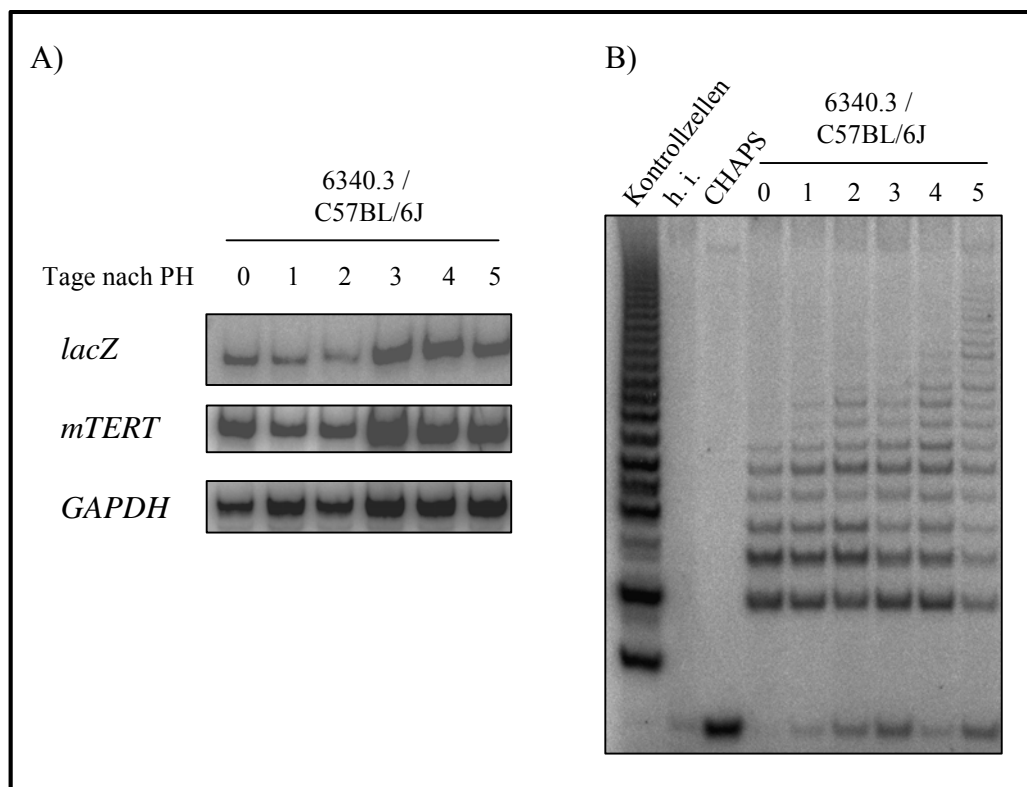


Fig. 4.23.: Induktion der hTERT Promotoraktivität und *mTERT* Expression sowie Telomeraseaktivität während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (6340.3).

hTERT Promotoraktivität, *mTERT* Expression mittels radioaktiver RT-PCR (A) und Telomeraseaktivität (B) mittels *TRAP assay* nach partieller Hepatektomie (PH) an 6340.3 / C57BL/6J Mäusen. *GAPDH* dient als Ladekontrolle. Von jedem Gewebe wurden je 200 ng Proteinextrakt eingesetzt.

Am dritten Tag nach der partiellen Hepatektomie an 6340.3 / C57BL/6J Mäusen zeigt sich ein deutlicher Anstieg in der Expression des *lacZ* Reportergens und von *mTERT*, der auch bei den folgenden Zeitpunkten 4 und 5 Tage anhält (Fig. 4.23. A). Die steigende *mTERT* Expression korreliert mit zunehmender Telomeraseaktivität (Fig. 4.23. B). Bei den Wildtyp Mäusen war ebenfalls wie bei den transgenen Mäusen eine Induktion der *mTERT* Expression am dritten Tag nach PH zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

In einem kleineren experimentellen Ansatz wurde eine partielle Hepatektomie an drei 6335.5 / C57BL/6J Mäusen (Tag 0, 1, 2 und 3) durchgeführt. Die operierte Maus, deren Leber für Tag 2 nach PH vorgesehen war, ist post-operativ gestorben.

Im Gegensatz zur Linie 6340.3 konnte der hTERT Promotor in Mäusen der Linie 6335.5 / C57BL/6J nach partieller Hepatektomie nicht induziert werden. Allerdings ist auch hier ein Anstieg der endogenen *mTERT* Expression am dritten Tag nach partieller Hepatektomie zu beobachten (Fig. 4.24.).

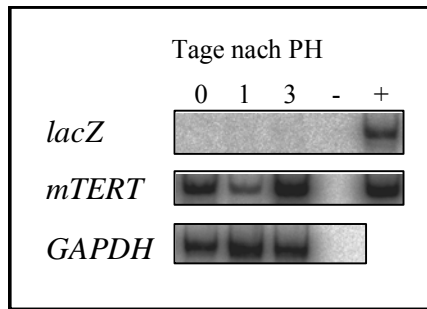


Fig. 4.24.: Keine Induktion der hTERT Promotoraktivität während der Leberregeneration in der Mauslinie 6335.5.

Die *lacZ*, *mTERT* und *GAPDH* (als Ladekontrolle) Expression nach partieller Hepatektomie an 6335.5 / C57BL/6J Mäusen wurde mittels radioaktiver RT-PCR bestimmt.

-: H₂O Negativkontrolle, +: cDNA Positivkontrolle

4.3. Induktion des hTERT Promotors mit Trichostatin A

Die vergleichenden Expressionsanalysen des *lacZ* Reportergens in den hTERTp-*lacZ* transgenen Mauslinien 6340.3 und 6335.5 haben ergeben, dass der humane TERT Promotor in adulten 6335.5 Mäusen exklusiv im Hoden nachweisbar ist (vgl. Fig. 4.4.) und nur in einem Fall der untersuchten Mammakarzinome (vgl. Fig. 4.21.) reaktiviert wurde. Während der hTERT Promotor in Mäusen der Linie 6340.3 in der Haut (vgl. Fig. 4.12. A), in MEF's sowie MAF's (vgl. Fig. 4.15. A und 4.18. A) und in der Leber nach partieller Hepatektomie (vgl. Fig. 4.23. A) aktiv ist, zeigt der hTERT Promotor dagegen in den entsprechenden Organen / Zellen der Linie 6335.5 minimale (vgl. Fig. 4.13. A) oder keine Aktivität (vgl. Fig. 4.17. und 4.24.). Es stellt sich die Frage, wieso der hTERT Promotor in der transgenen Mauslinie 6335.5 verglichen mit der Linie 6340.3 eine geringere Aktivität aufweist (vgl. Fig. 4.4.).

Dafür kann es mehrere Gründe geben. Neben der Anzahl an Transgen-Kopien, die stabil in das Mausgenom integriert wurden, oder dem Integrationsort, der die Transkription des Transgens beeinflussen kann, sind auch epigenetische Regulationsmechanismen denkbar.

Die übergeordnete Chromatinstruktur der genomischen DNA kann durch bestimmte Substanzen so verändert werden, dass die Regulation der Genexpression beeinflusst wird. Vielleicht liegt der Integrationsort des hTERTp-*lacZ* Konstrukts bei der Linie 6335.5 in der Nähe eines heterochromatischen Bereichs, in dem die Gene transkriptionell inaktiv sind.

Daher wurden verschiedene Substanzen daraufhin getestet, ob sie den hTERT Promotor in 6335.5 / BALB/c MEF's induzieren können.

Trichostatin A (TSA) inhibiert reversibel Histon-Deacetylasen, was zu einer Histon-Hyperacetylierung und somit Auflockerung des Chromatins führt (Yoshida *et al.*, 1990). Darüber hinaus gibt es mehrere Publikationen, die zeigen, dass TSA gezielt den hTERT

Promotor in normalen Zellen induzieren kann (Takakura *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

5' Azacytidin (5' Aza) ist ein Cytidin-Analogon, welches nach Einbau in die neu synthetisierte DNA kovalent DNA-Methyltransferasen bindet. Dies resultiert in einer irreversiblen Inhibition der DNA-Methylierung (Jones, 1985; Juttermann *et al.*, 1994). Chloroquin kann in die DNA interkalieren und dadurch die superhelikale Struktur verändern (Broll, 1983; Kwakye-Berko und Meshnick, 1989).

In ersten Experimenten wurden 6335.5 / BALB/c MEF's für 8, 24 und 48 Stunden mit TSA, 5' Aza oder Chloroquin behandelt. Anschließend wurde die Expression von *lacZ*, *mTERT* sowie *GAPDH* als Ladekontrolle mittels RT-PCR bestimmt (Fig. 4.25., nicht alle Zeitpunkte sind dargestellt).

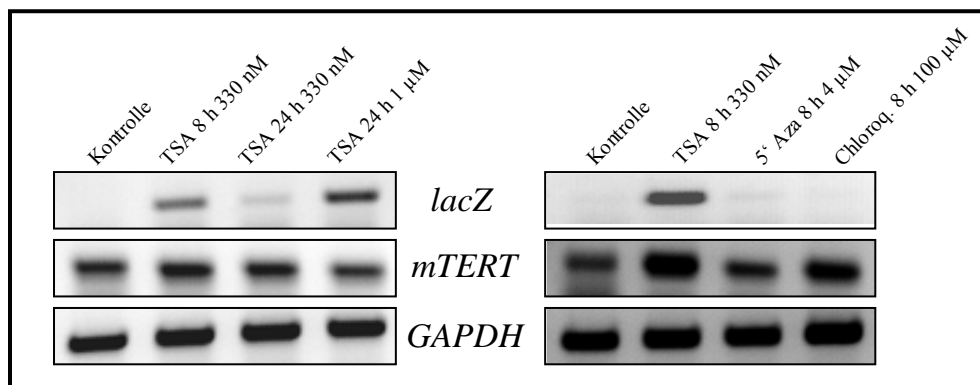


Fig. 4.25.: Induktion des hTERT Promotors in 6335.5 / BALB/c MEF's mit TSA.

6335.5 / BALB/c MEF's wurden mit TSA, 5' Aza bzw. Chloroquin in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die *lacZ* und *mTERT* Expression wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten mittels RT-PCR bestimmt. *GAPDH* dient als Ladekontrolle und unbehandelte Zellen als Negativkontrolle.

Nur TSA, das die Histon-Deacetylasen inhibiert, kann den hTERT Promotor in den 6335.5 MEF's aktivieren (Fig. 4.25.). Weder die Inkubation der Zellen mit 5' Aza noch mit Chloroquin kann den hTERT Promotor induzieren (Fig. 4.25. rechts), auch nicht nach 24 oder 48 Stunden (Daten nicht gezeigt). Die *mTERT* Expression steigt nach TSA und Chloroquin Behandlung an (Fig. 4.25. rechts).

5. Diskussion

Die stringente Regulation der Telomerase in humanen Zellen und deren Aktivierung während der Tumorgenese machen die Telomerase zu einem idealen Ziel in der Krebstherapie. Eine zielgerichtete Therapie gegen Telomerase-positive Zellen würde hauptsächlich die Tumorzellen und nicht die übrigen normalen Zellen des Organismus betreffen. Um jedoch die Telomerase gezielt in malignen Zellen hemmen zu können, müssen die Regulationsmechanismen, denen die Telomerase unterliegt, aufgeklärt werden.

Die Regulation der Telomerase geschieht hauptsächlich über die Initiation der Transkription der katalytischen Untereinheit *hTERT*. Daher ist es essentiell, die regulatorischen Elemente, die den *hTERT* Promotor kontrollieren, zu charakterisieren. In *in vitro* Modellen konnten schon zahlreiche positive (z. B. *c-myc* (Wang *et al.*, 1998), *Sp1* (Kyo *et al.*, 2000), *ESX* (Goueli und Janknecht, 2004)) und negative Regulatoren (z. B. *mad1* (Güneş *et al.*, 2000)) der *hTERT* Expression identifiziert werden.

Allerdings können *in vitro* Daten immer nur Hinweise auf die Situation *in vivo* sein. Die Relevanz dieser Faktoren *in vivo* ist bislang nicht hinreichend geklärt. Der Modellorganismus Maus ist dem Menschen sehr nah und wird oft für medizinische Fragestellungen zur Tumorgenese, Entwicklung oder Genfunktion herangezogen.

Erste Studien zur Telomeraseaktivität in murinen Geweben haben aufgezeigt, dass die Analyse der endogenen *mTERT* Expression nicht geeignet ist, um Rückschlüsse auf die humane Regulation der *hTERT* Expression und Telomeraseaktivität zu ziehen. Die *TERT* Expression bei der Maus wird nicht wie beim Menschen in den meisten Zellen unterdrückt (Chadeneau *et al.*, 1995; Prowse und Greider, 1995; Greenberg *et al.*, 1998). Der Grund dafür liegt primär an der speziesspezifischen Expression des murinen und humanen *TERT* Gens (Wright und Shay, 2000). Obwohl einige Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zwischen beiden Promotoren konserviert sind, haben Sequenzanalysen des humanen und murinen *TERT* Promotors eine eher geringe Sequenzhomologie ergeben (Greenberg *et al.*, 1998). So konnte gezeigt werden, dass der *hTERT* im Gegensatz zum *mTERT* Promotor eine nicht konservierte GC-Box enthält, die für die humanspezifische Unterdrückung der *hTERT* Expression verantwortlich ist (Horikawa *et al.*, 2005).

Diese Befunde sprechen dafür, dass eher Unterschiede in der *cis*-Regulation der Transkription als verschiedene Transkriptionsfaktoren für die speziesspezifische Expression von *TERT* verantwortlich sind. Daher sollte in dieser Arbeit ein transgenes Mausmodell charakterisiert werden, das eine Analyse des humanen *TERT* Promotors *in vivo* und unter physiologischen Bedingungen erlaubt.

Die hTERTp-*lacZ* transgenen Mäuse exprimieren das *lacZ* Reportergen, das für die bakterielle β -Galaktosidase kodiert, unter der Kontrolle eines 8,0 kbp langen hTERT Promotorfragments. In Vorarbeiten wurden von Dr. Çağatay Güneş die hTERTp-*lacZ* transgenen Mäuse generiert. Von 85 potentiellen Gründertieren zeigten elf das Transgen *via* Southern Blot- und PCR-Analyse. In vier dieser elf *lacZ* positiven Tiere konnte die β -Gal mit X-Gal Färbung nachgewiesen werden. Zwei von den vier β -Gal positiven Mauslinien, 6340.3 und 6335.5, wurden in dieser Arbeit hinsichtlich ihres Potentials, die Regulation des hTERT Promotors *in vivo* zu untersuchen, charakterisiert.

5.1. „Human-ähnliche“ Aktivität eines ektopischen hTERT Promotors im transgenen Mausmodell

In den hTERTp-*lacZ* transgenen Mäusen spiegelt das Expressionsmuster des Transgens größtenteils die Expression des *hTERT* Gens in humanen Geweben wider. Beim Menschen zeigt nur der Hoden hohe *hTERT* Expression. Die übrigen untersuchten Organe zeigen keine oder nur sehr schwache *hTERT* Expression. Analog dazu ist die *lacZ* Reportergen Expression im Hoden transgener Tiere am stärksten. Bei der Linie 6335.5 ist die hTERT Promotoraktivität in adulten Mäusen exklusiv auf den Hoden beschränkt, obwohl der hTERT Promotor während der Embryogenese in beiden transgenen Linien, 6335.5 und 6340.3, in verschiedenen hoch proliferativen Organen aktiv ist (Ritz *et al.*, 2005). Die transgene Linie 6340.3 zeigt ein weniger stringentes Expressionsmuster bezüglich des *lacZ* Reportergens. Neben der starken hTERT Promotoraktivität im Hoden findet man auch in den übrigen getesteten Organen sehr schwache *lacZ* mRNA Mengen.

Auch wenn man nicht ausschließen kann, dass *enhancer* oder *silencer* Sequenzen, die außerhalb des gewählten 8,0 kbp hTERT Promotorfragments liegen, Einfluss auf die Regulation des hTERT Promotors nehmen, so scheint das hTERT Promotorfragment dennoch

die wichtigsten regulatorischen Regionen für die korrekte zelltypspezifische Expression in Mäusen zu enthalten. Neben der in dieser Arbeit demonstrierten „human-ähnlichen“ Regulation dieses 8,0 kbp hTERT Promotorfragments konnte Dr. Çağatay Güneş in Vorexperimenten zeigen, dass die *Luziferase* Reporter Gen Expression unter der Kontrolle eben dieses Promotorfragments sowie ebenfalls die endogene *hTERT* Expression nach Induktion der Differenzierung durch Retinsäure-Behandlung in stabil transfizierten humanen hämatopoetischen U937 Zellen abnehmen (persönliche Mitteilung Dr. Çağatay Güneş). In ähnlicher Weise wurde die humane Tumorzelllinie HeLa mit einem 2,0 kbp hTERT Promotorkonstrukt, das die Expression des Reporters *eGFP* (*enhanced green fluorescent protein*) kontrolliert, stabil transfiziert, um Inhibitoren der *hTERT* Expression zu identifizieren (Lin und Elledge, 2003). Kürzlich wurden *eGFP* transgene Mäuse mit 1, 2 und 5 kbp mTERT Promotorfragmenten aufwärts des Transkriptionsstarts generiert (Pericuesta *et al.*, 2006). Die Aktivität aller drei Promotoren ähnelt der der endogenen *mTERT* Expression. Die Autoren haben daraus geschlussfolgert, dass das 1 kbp Promotorfragment ausreichend für die korrekte Regulation der *mTERT* Expression ist. Es wurde sogar anhand von hTERT Promotor Deletionsanalysen postuliert, dass eine 181 bp hTERT Kern-Promotor Region aufwärts des Transkriptionsstarts ausreichend für die transkriptionelle Aktivierung von *hTERT* ist (Takakura *et al.*, 1999).

Allerdings bergen transiente Transfektionsexperimente mit kurzen Promotorfragmenten den Nachteil, dass unter Umständen nicht alle Elemente für eine akkurate Regulation des entsprechenden Gens im Promotorstück enthalten sind und dass mögliche epigenetische Mechanismen in diesem Versuchsansatz nicht zur Regulation der Promotoraktivität beitragen können. Aus diesem Grund sind lange Promotoren für die Generierung transgener Mäuse besser geeignet, da nur mit langen Promotorfragmenten eine Positions-unabhängige Expression des Transgens beobachtet wird (Bonifer *et al.*, 1996).

Horikawa *et al.* haben eine transgene Maus generiert, die das gesamte *hTERT* Gen, inklusive Promotor, Exons und Introns, exprimiert (Horikawa *et al.*, 2005). Die ektopische *hTERT* Expression spiegelt die hTERT Promotoraktivität bzw. *lacZ* Expression der hTERTp-*lacZ* transgenen Mäuse wider. Dieser Befund bekräftigt die Annahmen, dass der 8,0 kbp Promotor im hTERTp-*lacZ* Mausmodell die wichtigsten regulatorischen Elemente für eine korrekte zelltypspezifische Aktivität besitzt und dass die hTERTp-*lacZ* Mäuse geeignet sind, um die Regulation des humanen TERT Promotors *in vivo* zu untersuchen.

5.2. Zelltypspezifische Aktivität des hTERT Promotors im Hoden

Der Hoden repräsentiert das Organ mit der höchsten *hTERT* Expression und Telomeraseaktivität. Die Aufrechterhaltung der Telomerlänge bei der Spermatogenese ist wichtig, damit nur Chromosomen mit langen Telomeren an die Nachkommen weitergegeben werden. Die Urkeimzellen und die primären Spermatozyten sind die Hauptquellen für die Telomeraseaktivität im Hoden (Yamamoto *et al.*, 1999). Während der Spermiogenese werden die *hTERT* Expression und die Telomerase inhibiert.

In den hTERTp-*lacZ* transgenen Mäusen konnte die zelltypspezifische Aktivität des humanen TERT Promotors über β -Gal Immunhistochemie nachgewiesen werden. Nur in den primordialen Spermatogonien und primären Spermatozyten ist die β -Gal detektierbar.

Im Hoden von zwei Wochen alten Mäusen ist anhand der Übersichtsfärbung mit X-Gal ein heterogenes *lacZ* Expressionsmuster erkennbar. Der hTERT Promotor wird nur in wenigen Hodenkanälchen induziert. Mit zunehmendem Alter der Mäuse ist der hTERT Promotor dann in allen Hodenkanälchen aktiv. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Männchen mit zwei Wochen noch präpubertär sind und erst mit fünf bis sieben Wochen ihre Geschlechtsreife erreichen.

Die Beobachtung von Prowse und Greider, dass die Telomerase im murinen Hoden erst ab der sechsten Woche aktiviert wird, konnte nicht bestätigt werden (Prowse und Greider, 1995). Stattdessen wurde eine starke Telomeraseaktivität in Hoden von zwei, vier und sechs Wochen alten Mäusen nachgewiesen, wobei beim 2-Wochen-Wert die stärkste Telomeraseaktivität auftrat. Dieses Ergebnis korreliert eher mit einer Untersuchung an Ratten, in der gezeigt wurde, dass die Telomeraseaktivität von der Geburt an bis zur vierten Woche hoch sei und danach abnehme (Ravindranath *et al.*, 1997).

Inwieweit die Daten die tatsächliche Regulation der Telomerase während der Hodenentwicklung wiedergeben, ist noch in weiteren Experimenten zu klären. Auffällig ist allerdings bei den Resultaten von Prowse und Greider, dass die charakteristische Leiter beim *TRAP assay*, die die Telomeraseaktivität widerspiegelt, fehlt (Fig. 5. Prowse und Greider, 1995).

5.3. Aktivität des hTERT Promotors während des Haarzyklus

Der Haarfollikel unterliegt dem Haarzyklus, der aus aufeinander folgenden Phasen des Wachstums (Anagen), der Regression (Catagen) und der Ruhe (Telogen) besteht (Fuchs *et al.*, 2001; Botchkarev und Paus, 2003).

Für diese weitreichenden morphologischen Veränderungen des Follikels, bei denen im Catagen zweidrittel des Haarfollikels durch Apoptose abgebaut (Weedon und Strutton, 1981) und im folgenden Anagen wieder aufgebaut werden, bedarf es Stammzellen. Die epidermalen Stammzellen sind multipotent und in der *bulge area* seitlich des Haarfollikels lokalisiert. Aus ihnen können alle Zelltypen der Epidermis, des Haares und der Talgdrüse hervorgehen (Taylor *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2004).

Stammzellen haben die einzigartige Fähigkeit, sich asymmetrisch zu teilen, wobei wieder eine Stammzelle und eine sich differenzierende Tochterzelle (Progenitorzelle) entstehen. Die meisten, möglicherweise alle, humanen adulten Organe enthalten Stammzellen (Weissman *et al.*, 2001). Dabei spielen Stammzellen eine wichtige Rolle für die Homöostase der Organe eines Organismus und für regenerative Prozesse. Die Telomerase ist in Zellen nachweisbar, die undifferenziert sind oder die eine hohe proliferative Kapazität wie z. B. Keimbahnzellen und multipotente Progenitorzellen besitzen (Harrington, 2004). Adulte Stammzellen zeigen zwar ebenfalls ein hohes proliferatives Potential, jedoch befinden sie sich meistens in einem ruhenden Stadium und weisen oft keine oder nur schwache Telomeraseaktivität auf, die in der Regel nicht ausreicht, um sukzessive Telomerverkürzungen zu verhindern (Collins und Mitchell, 2002). Aufgrund der geringen Zellteilungen können Stammzellen einen gewissen Telomerverlust tolerieren. Die ruhenden Stammzellen werden folglich als Telomerase-kompetent und deren Abkömmlinge, die Progenitorzellen, die aus der Stammzellnische auswandern und sich weiter differenzieren, zunächst als Telomerase-positiv angesehen (Ramirez *et al.*, 1997).

Die Telomeraseaktivität humaner Stammzellen bzw. der Progenitorzellen ist essentiell für deren proliferative Kapazität. Im Laufe ihrer Differenzierung wird die Telomerase abgeschaltet. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der stringenten Regulation der Telomerase beim Menschen.

Untersuchungen des Haarfollikels haben sowohl beim Menschen als auch bei der Maus gezeigt, dass die Telomeraseaktivität nur mit dem Anagen assoziiert ist (Ramirez *et al.*, 1997; Sarin *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden die endogene *mTERT* Expression und

Telomeraseaktivität sowie die ektopische hTERT Promotoraktivität in Hautbiopsien mit Haarfollikeln in der Morphogenese, dem Telogen 1, Anagen 1, Telogen 2 und Anagen 2 bestimmt. Für die Proben der Morphogenese wurden zwölf Tage alte 6340.3 Mäuse verwendet. In diesem Alter befinden sich die Mäuse noch im Wachstumsprozess und ihr Fell ist noch nicht vollständig entwickelt. Daher sind eine hohe Telomeraseaktivität und *mTERT* sowie *lacZ* Reporter-gen Expression nicht verwunderlich. Für den ersten Haarzyklus konnte deutlich gezeigt werden, dass die *mTERT* Expression und die hTERT Promotoraktivität mit dem Anagen assoziiert sind. Anhand des *TRAP assay* konnte die Hochregulation der Telomeraseaktivität im Anagen nur zum Teil dargestellt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Telomeraseaktivität in Hautextrakten und nicht im Haarfollikel selber gemessen wurde. Um das die Haarfollikel umgebende Gewebe zu reduzieren, wäre eine Abtrennung der Epidermis von der Haut, so dass nur die Basalschicht für die Experimente eingesetzt wird, eine Möglichkeit. Ein weiterer Schritt wäre, die zelltypspezifische *mTERT* Expression *via* Immunhistochemie und die Telomeraseaktivität mit Hilfe des *in situ TRAP assay* nachzuweisen. Für die zelltypspezifische hTERT Promotoraktivität wurde mittels X-Gal Färbung und β -Gal Immunhistochemie versucht, die Lokalisation der β -Gal in der Haut zu untersuchen. Jedoch war die Proteinmenge an β -Gal wahrscheinlich für den immunologischen Nachweis zu gering. Es bestünde allerdings noch die Möglichkeit, die *lacZ* Expression auf RNA-Ebene mit Hilfe der RNA *in situ* Technik histologisch darzustellen.

Es lässt sich allgemein sagen, dass die zelltypspezifische Analyse der *hTERT* Expression für die präzise Funktion der Telomerase im Zusammenhang mit der Tumorgenese oder regenerativen Prozessen immer mehr an Bedeutung gewinnt. Mit dem konventionellen *TRAP assay* oder der *hTERT* RT-PCR werden in der Regel Extrakte mit einer heterogenen Zellpopulation untersucht, so dass keine Auskunft über die zelltypspezifische Aktivität gegeben werden kann. Es wurden zwar auch immunhistochemische Analysen mit Antikörpern gegen hTERT durchgeführt, doch wurde in den meisten Studien der monoklonale NCL-hTERT Antikörper (Novocastra) verwendet. Die Spezifität dieses Antikörpers war schon lange umstritten und nun wurde kürzlich veröffentlicht, dass gerade dieser Antikörper das Phosphoprotein Nucleolin, das im Nukleolus lokalisiert ist, und nicht hTERT detektiert (Wu *et al.*, 2006). Aus diesem Mangel an verlässlichen hTERT Antikörpern ist das hTERTp-*lacZ* Mausmodell sehr attraktiv, um die zelltypspezifische hTERT Promotoraktivität in verschiedensten Geweben mittels β -Gal Immunhistochemie, X-Gal Färbung oder *lacZ* RNA *in situ* zu untersuchen.

5.4. hTERT Promotoraktivität in primären Fibroblasten

Masutomi *et al.* ist es erstmals gelungen, *hTERT* Expression und Telomeraseaktivität in primären humanen Fibroblasten nachzuweisen (Masutomi *et al.*, 2003). Allerdings ist die Aktivität sehr schwach und nur in der S-Phase detektierbar.

In primären embryonalen sowie adulten Mausfibroblasten (MEF's und MAF's) der Linie 6340.3 konnten sowohl endogene *mTERT* Expression und Telomeraseaktivität als auch hTERT Promotoraktivität gezeigt werden. Dabei ist die TERT Promotor- und die Telomeraseaktivität in den MEF's stärker verglichen mit den MAF's. Im Gegensatz zu humanen Fibroblasten kann eine Aktivität des humanen TERT Promotors in den Mausfibroblasten der hTERTp-*lacZ* Linie 6340.3 nachgewiesen werden. Das kann einerseits bedeuten, dass in den Mausfibroblasten die Regulationsmechanismen der *TERT* Expression anders als beim Menschen sind, oder andererseits, dass der verwendete 8,0 kbp lange humane TERT Promotor in diesem speziellen Fall nicht alle Elemente für eine humanspezifische Expression des *lacZ* Reportergens enthält.

Renaud *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass die beiden ersten Exons des *hTERT* Gens für dessen Regulation wichtig sind (Renaud *et al.*, 2005). Das nukleäre Phosphoprotein CTCF wurde als Repressor der *hTERT* Expression identifiziert. CTCF bindet nicht wie die meisten Transkriptionsfaktoren an den Promotor ihrer Zielgene, sondern im Fall des *hTERT* Gens an Exon 1 und 2. Transkriptionsfaktoren wie CTCF, die außerhalb des gewählten 8,0 kbp hTERT Promotorfragments im Bereich der Exons oder Introns des *hTERT* Gens binden, haben in den hTERTp-*lacZ* transgenen Mäusen keinen Einfluss auf die *lacZ* Expression.

Das Wachstumsverhalten der MEF's wurde in Abhängigkeit vom *p53* Status über mehrere Passagen untersucht. Dabei entsprachen die Wachstumsparameter wie Wachstumsrate, Zelldichte bei Konfluenz, Kontaktinhibition, Krise / Seneszenz, Immortalisierung und Transformation prinzipiell den Beobachtungen von Harvey *et al.*, die MEF's aus einem gemischten C57BL/6 und 129/Sv Hintergrund in Abhängigkeit vom *p53* Status *in vitro* charakterisiert haben (Harvey *et al.*, 1993). Die *p53* defizienten MEF's zeigen eine höhere Proliferations- und Immortalisierungsrate als die MEF's mit Wildtyp *p53*. Die für *p53* heterozygoten MEF's liegen bei den untersuchten Parametern zwischen den *p53*^{+/+} und *p53*^{-/-} MEF's, was auf ein von der *p53* Dosis abhängiges Wachstum schließen lässt.

In dieser Arbeit konnte an MEF's gezeigt werden, dass das Tumorsuppressor Protein p53 einen inhibierenden Effekt auf die TERT Promotoraktivität und die Telomerase in MEF's, die sich in einer seneszenten Phase befinden, ausübt. Diese Inhibition der *lacZ* Reporter- und *mTERT* Expression sowie der Telomeraseaktivität ist in den *p53* defizienten MEF's nicht zu beobachten.

Damit korrelieren diese Ergebnisse eher mit der Annahme, dass p53 als negativer Regulator der *hTERT* Expression fungiert (Kusumoto *et al.*, 1999; Kanaya *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000b), als mit dem Standpunkt, dass p53 keinen Einfluss auf die *hTERT* Expression hat (Lin und Elledge, 2003).

In normalen MEF's wird p53 schnell abgebaut, da das p53 Protein in der Regel nur bei Stress wie DNA-Schäden stabilisiert wird (Oren *et al.*, 1981). Daher war die p53 Konzentration in den 6340.3 MEF's wahrscheinlich nur während der Krise in Passage 7 hoch genug, um einen deutlichen Effekt auf die *hTERT* Promotoraktivität zu zeigen. Mit Hilfe von UV- oder γ -Strahlung könnte man p53 gezielt induzieren und seinen Einfluss auf den *hTERT* Promotor im Detail studieren. Erste Experimente in diese Richtung haben noch keine konsistenten Ergebnisse gebracht (Daten nicht gezeigt).

Neben der vermuteten Inhibition der *hTERT* Expression durch p53 wurde ein direkter Einfluss von p53 auf die Telomeraseaktivität vorgeschlagen. Dabei könnte die Bindung von p53 an die Telomerase über TEP1 erfolgen, da gezeigt wurde, dass p53 *in vitro* an TEP1 binden und die Telomeraseaktivität inhibieren kann (Li *et al.*, 1999). Dieser Fragestellung wird ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe durch Kamila Iwanski nachgegangen.

Aufgrund der Tatsache, dass die Aktivierung der Telomerase als essentiell für die Tumorgenese angesehen wird, könnte eine Inhibition der *hTERT* Expression bzw. des Telomerase Holoenzym durch p53 einen weiteren Tumorsuppressor Mechanismus seitens p53 darstellen.

5.5. Induktion des hTERT Promotors in einem Mausmodell für Mammakarzinome

Das Tumorsuppressor Protein p53 ist in über der Hälfte aller menschlichen Tumore mutiert (Harris und Hollstein, 1993). Im Falle des spontanen Mammakarzinoms ist eine p53 Mutation in knapp 40 % der Fälle nachweisbar (Coles *et al.*, 1992). Kuperwasser *et al.* haben ein transgenes Mausmodell für spontane Mammakarzinome etabliert. Die Mäuse sind heterozygot für *p53* und entwickeln im BALB/c Hintergrund, der den Tieren eine genetische Prädisposition für Mammakarzinome verleiht, Tumore, die zu 42 % Mammakarzinome sind (Kuperwasser *et al.*, 2000).

Aufgrund der Tatsache, dass die Telomerase in über 90 % aller humanen Mammakarzinome überexprimiert wird (Kimura *et al.*, 2003), boten sich bitransgene hTERTp-*lacZ* / *p53*^{+/-} / BALB/c Mäuse zum Studium des hTERT Promotors während der Tumorgenese an.

In einem Beobachtungszeitraum von bis zu 22 Monaten haben 6 % der 6340.3 / *p53*^{+/-} / BALB/c Tiere (1 von 16) und 39 % der 6335.5 / *p53*^{+/-} / BALB/c Tiere (7 von 18) Mammakarzinome entwickelt. Des Weiteren traten Lymphome, Thymome und Sarkome auf. Für alle Malignome der Linie 6340.3 / *p53*^{+/-} und für ein Mammakarzinom der Linie 6335.5 / *p53*^{+/-} konnte gezeigt werden, dass der hTERT Promotor während der Tumorgenese induziert wird. Die endogene *mTERT* Expression ist in den Tumoren erhöht und korreliert mit gesteigerter Telomeraseaktivität. Die Induktion beider TERT Promotoren während der Tumorgenese in den bitransgenen Mäusen steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Telomerase in humanen und murinen Tumoren aktiviert wird (Kim *et al.*, 1994; Chadeneau *et al.*, 1995; Broccoli *et al.*, 1996). Neben der *TERT* Überexpression konnte demonstriert werden, dass verschiedene Tumormarker, die im Zusammenhang mit der positiven *TERT* Regulation stehen bzw. die in humanen Mammakarzinomen oft überexprimiert oder amplifiziert sind, wie *c-myc* (Wang *et al.*, 1998), *her2* und *ER81* (Goueli und Janknecht, 2004) sowie *ESX* (Chang *et al.*, 1997) in den malignen Geweben hochreguliert sind.

Bei den Mammakarzinomen der bitransgenen 6335.5 / *p53*^{+/-} Mäuse konnte nur in einem Fall eine deutliche Reaktivierung des hTERT Promotors gezeigt werden. In den übrigen Tumoren dieser Linie war trotz der sehr sensitiven radioaktiven RT-PCR keine eindeutige Induktion des hTERT Promotors nachweisbar. Diese Unterschiede in der hTERT Promotoraktivität zwischen den hTERTp-*lacZ* transgenen Mauslinien 6340.3 und 6335.5 treten in fast allen untersuchten adulten Organen auf und werden im übernächsten Abschnitt diskutiert.

Mit dem hTERTp-*lacZ* / *p53*^{+/-} / BALB/c Mausmodell konnte die Signifikanz der *TERT* Induktion für die Tumorgenese bestätigt werden. Die Beobachtung, dass nur 8 von insgesamt 34 bitransgenen hTERTp-*lacZ* / *p53*^{+/-} Mäusen innerhalb von knapp zwei Jahren Mammakarzinome entwickelt haben, zeigt, dass das Modell nicht für detailliertere Analysen bezüglich der *TERT* Regulation geeignet ist, da die Mammakarzinominzidenz zu gering und die Latenzzeit zu lang ist. Ursprünglich wurde für die *p53*^{+/-} / BALB/c Mäuse beschrieben, dass 90 % der Versuchstiere nach etwa 17 Monaten Tumore entwickelt haben, von denen knapp die Hälfte Mammakarzinome waren (Kuperwasser *et al.*, 2000). Diese hohe Tumorzinidenz trat in den untersuchten bitransgenen hTERTp-*lacZ* / *p53*^{+/-} / BALB/c Mäusen nicht auf, wobei davon ausgegangen werden kann, dass das hTERTp-*lacZ* Konstrukt darauf keinen Einfluss hatte. Die geringe Anzahl an Tumoren bei den untersuchten Tieren könnte eher auf Unterschiede in der Tierhaltung und Pflege beruhen. So konnte z. B. gezeigt werden, dass allein der Zusatz von Antioxidantien zum Futter von *p53*^{-/-} Mäusen das Auftreten von Lymphomen nahezu verhindert (Sablina *et al.*, 2005). Normalerweise entwickeln etwa 90 % der *p53* defizienten Mäuse nach sechs Monaten Tumore, und zwar hauptsächlich Lymphome (Donehower *et al.*, 1992; Jacks *et al.*, 1994). Des Weiteren lässt die doch relativ geringe Anzahl an Versuchstieren (n = 56) in den Experimenten von Kuperwasser *et al.* noch keine allgemeine statistische Prognose über die Tumorzinidenz und den Tumortyp zu.

Neben dem *p53*^{+/-} / BALB/c Mausmodell für spontane Mammakarzinome gibt es in unserer Abteilung noch andere Mausmodelle, um die Tumorgenese zu studieren. Darunter ist ein weiteres Mausmodell für Mammakarzinome und eins für B-Zell-Lymphome.

Die Generierung bitransgener Mäuse ermöglicht es, die Aktivierung der Telomerase und des ektopischen hTERT Promotors (hTERTp-*lacZ*) zu definierbaren Stadien der Tumorprogression zu analysieren. Diese Experimente können Aufschluss darüber geben, wann während der Tumorgenese die Telomerase bzw. die *TERT* Expression aktiviert wird. Des Weiteren bieten diese Tumormodelle die Möglichkeit, den Beitrag bekannter Tumormarker (z. B. *her2*, *c-myc*, *ER81*) zur Tumorentstehung und -progression zu analysieren und deren Expression mit der von *TERT* zu korrelieren. Auf diese Weise könnten neue Regulatoren des TERT Promotors identifiziert und hinsichtlich der Prognose und Diagnose von Malignomen charakterisiert werden.

5.6. Induktion des hTERT Promotors während der Leberregeneration

Bezüglich der *TERT* Expression ist wohl die Leber das auffälligste innerhalb der humanen und murinen Organe. Trotz der regenerativen Fähigkeit in beiden Organismen zeigt die menschliche Leber keine *hTERT* Expression (Tahara *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 1996), während bei der Maus die Leber hohe *mTERT* Expression und Telomeraseaktivität aufweist (Greenberg *et al.*, 1998; Martin-Rivera *et al.*, 1998). Die fehlende bzw. sehr schwache *lacZ* Reportergen Expression in der Leber beider hTERTp-*lacZ* transgenen Mauslinien verdeutlicht, dass der hTERT Promotor in diesem Modell „human-ähnlich“ reguliert wird. Aus diesem Grund stellen die hTERTp-*lacZ* Mäuse ein nützliches Modell dar, um Mechanismen zu erforschen, die für die humane *TERT* Regulation verantwortlich sind.

Die partielle Hepatektomie (PH) ermöglicht eine Analyse der Genexpression während der Leberregeneration. Die Leberregeneration ist ein sehr komplexer Prozess mit einer genau definierten Abfolge zellulärer Prozesse (Satyanarayana *et al.*, 2004; Zimmermann, 2004).

Von den verschiedenen spezialisierten Zelltypen der Leber bilden die Hepatozyten die größte Zellpopulation. Hepatozyten sind nicht terminal differenziert und befinden sich in einem proliferativen Ruhezustand (G₀-Phase). Nach einem Stimulus, wie er z. B. nach PH eintritt, können die Hepatozyten wieder in den Zellzyklus eintreten. Dieser Prozess ist hoch synchronisiert, und nach ein bis zwei Zellteilungen ist die fehlende Lebermasse innerhalb einer Woche wieder hergestellt. Bei Mäusen erreichen die Leberzellen 36 Stunden nach PH den G1/S Übergang, und nach 48 Stunden durchläuft die Mehrheit der Zellen die Replikation in der S-Phase (Satyanarayana *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Linie 6340.3 am dritten Tag nach PH ein Anstieg der hTERT Promotoraktivität sowie der endogenen *mTERT* Expression gezeigt werden. Die Induktion der *TERT* Promotoren überlappt nicht mit der von Satyanarayana *et al.* beschriebenen ersten DNA-Synthese in den Leberzellen 48 Stunden nach PH, sondern findet 24 Stunden später statt. Weitere Experimente sind notwendig, um eine mögliche Korrelation der *TERT* Induktion mit dem Zellzyklus nachzuweisen.

Vorherige Studien bei Wildtyp Mäusen beschreiben steigende *mTERT* mRNA Mengen zwischen 6 und 24 Stunden nach PH und eine Hochregulation der endogenen Telomerase nach 12 bzw. 24 Stunden (Inui *et al.*, 2002; Kojima *et al.*, 2003). Allerdings sind diese Studien nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar, da verschiedene Zeitpunkte nach PH und unterschiedliche Mausstämme untersucht wurden.

5.7. Vergleich der beiden hTERTp-*lacZ* transgenen Mauslinien

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der hTERT Promotor in hTERTp-*lacZ* transgenen Mäusen „human-ähnlich“ verhält und zelltypspezifisch reguliert wird. Allerdings weisen die Expressionsmuster des *lacZ* Reportergens zwischen den beiden transgenen Mauslinien 6335.5 und 6340.3 teilweise erhebliche Unterschiede auf. Zwar zeigen beide Linien die höchste hTERT Promotoraktivität im Hoden, jedoch ist dies bei der Linie 6335.5 das einzige Organ mit *lacZ* Expression. Anhand der X-Gal Färbung von Hodenschnitten wird deutlich, dass verglichen mit der Linie 6340.3 die Menge an β -Gal im Hoden der Linie 6335.5 wesentlich geringer ist. Dies ist auf RNA-Ebene nicht so offensichtlich, da die RT-PCR für beide Linien nicht parallel auf einem Gel aufgetragen wurde. Auffällig ist jedoch das starke *lacZ* Signal im Hoden der Linie 6340.3 bei verhältnismäßig schwachem *GAPDH* Signal, das als Ladekontrolle dient (vgl. Fig. 4.4. A).

Die spezifische Aktivität des humanen TERT Promotors wurde in den hTERTp-*lacZ* transgenen Mäusen während proliferativer bzw. regenerativer Prozesse, die beim Menschen *hTERT* Expression aufweisen, getestet. Dazu wurde die *lacZ* Reportergen Expression während des Haarzyklus, der Tumorgenese, der Leberregeneration und in primären Fibroblasten untersucht.

Im Gegensatz zu der transgenen Mauslinie 6340.3 konnte eine Induktion des hTERT Promotors bei der Linie 6335.5 trotz der angewandten äußerst sensitiven radioaktiven RT-PCR weder in primären Fibroblasten noch während der Leberregeneration nachgewiesen werden. In dem Tumormodell wurde der hTERT Promotor nur in einem von acht untersuchten Tumoren reaktiviert, und im anagenen Haarfollikel war die *lacZ* Reportergen Expression kaum detektierbar.

Die Unterschiede bezüglich der hTERT Promotoraktivität bei den beiden Mauslinien sind wahrscheinlich auf die Anzahl an Transgen-Kopien, die stabil in das Mausgenom integrierten, oder den Integrationsort zurückzuführen. Vielleicht ist das hTERTp-*lacZ* Konstrukt bei der Linie 6335.5 in der Nähe eines heterochromatischen Bereichs integriert, in dem die Gene transkriptionell inaktiv sind. Dieser Mechanismus wird als Positionseffekt bezeichnet. Andererseits könnte das Transgen auch in der Nachbarschaft eines *enhancer* oder *silencer* lokalisiert sein, der die Initiation der Transkription positiv bzw. negativ beeinflusst.

Für 6335.5 MEF's konnte gezeigt werden, dass der hTERT Promotor nach Behandlung der Zellen mit dem Histon-Deacetylasen Inhibitor TSA induziert wird. Einerseits kann dieser

Effekt angesichts der Tatsache, dass schon wiederholt gezeigt wurde, dass TSA die *hTERT* Expression in normalen humanen Zellen induziert (Takakura *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2005), spezifisch für den hTERT Promotor sein. Andererseits kann dieser Befund auch eine unspezifische Folge der Auflockerung des Chromatins und der damit verbundenen besseren Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und die Transkriptionsmaschinerie sein.

Abschließend kann man nach der vergleichenden Analyse der *lacZ* Reporter-Gen Expression in den beiden hTERTp-*lacZ* transgenen Mauslinien sagen, dass die Linie 6340.3 der Linie 6335.5 für zukünftige Experimente vorzuziehen ist. In der Mauslinie 6340.3 verhält sich der hTERT Promotor „human-ähnlicher“. Neben der stärksten hTERT Promotoraktivität im Hoden ist der Promoter auch in anderen Organen schwach aktiv und kann wie beim Menschen während Wachstumsprozessen induziert werden. Es ist nur sinnvoll die Regulation des humanen *TERT* Gen Promotors in einem transgenen Mausmodell zu untersuchen, in dem die Expression des Transgens stark genug ist, um Veränderungen (aktivierende oder inhibierende) der Promotoraktivität durch Stimuli (z. B. während regenerativer Prozesse oder der Tumorgenese) zu detektieren.

5.8. Ausblick

Die strikte Inhibition der *hTERT* Genexpression und Telomeraseaktivität in humanen Zellen und deren Aktivierung in Tumoren machen hTERT als limitierenden Faktor für die Telomerase zu einem viel versprechenden Ziel in der Krebstherapie. Die Suche nach Regulationsmechanismen der Telomeraseaktivität hat in den letzten Jahren einen wichtigen Stellenwert in der Krebsforschung erreicht. Die Telomerase und / oder *hTERT* Expression stellen wichtige Marker für die Diagnose und Prognose von malignen Erkrankungen dar. Darüber hinaus gibt es inzwischen verschiedenste Ansätze, um entweder die Telomeraseaktivität oder die Telomerfunktion selber zu beeinträchtigen. Die meisten dieser Therapieansätze sind allerdings noch nicht in klinische Phasen eingetreten, sondern wurden bisher nur *in vitro* getestet.

Mit Hilfe der Gentherapie können z. B. apoptotische Gene unter der Kontrolle des hTERT Promotors spezifisch in Krebszellen exprimiert werden. Allerdings gibt es beim Menschen einen kleinen Anteil normaler Zellen, die ebenfalls *hTERT* exprimieren (vgl. Tab. 1.1.). Diese

Zellen wären auch von der Gentherapie betroffen. Um den Erfolg einer hTERT Promotor-vermittelten Gentherapie besser abschätzen zu können, stellen die hTERTp-*lacZ* Mäuse ein ideales System dar. Die detaillierte Analyse der hTERT Promotoraktivität in diesen Mäusen ermöglicht es, Voraussagen über die Spezifität einer hTERT Promotor-regulierten Expression apoptotischer Gene für maligne Zellen und mögliche Auswirkungen auf den Organismus zu treffen.

Mit Hilfe des bitransgenen hTERTp-*lacZ* / *p53*^{+/-} / BALB/c Mausmodells für Mammakarzinome und anderer bitransgener Tumormodelle können neue Aktivatoren des hTERT Promotors bei der Tumorgenese identifiziert werden und - nach Verifizierung in humanen Tumoren - zu einer verbesserten Diagnose und Prognose führen. Des Weiteren gestattet die β -Gal Immunhistochemie an Tumoren hTERTp-*lacZ* bitransgener Mäuse eine zelltypspezifische Analyse der hTERT Promotoraktivität. Dies ist besonders wichtig, da bisherige Versuche, hTERT in der humanen Tumordiagnostik nachzuweisen, umstritten sind (Wu *et al.*, 2006).

Neben der Aktivierung der Telomerase in den meisten Tumorerkrankungen spielt sie eine wichtige Rolle für die Homöostase der Organe und für regenerative Prozesse. Ohne eine aktive Verlängerung der Telomere in Stammzellen bzw. Progenitorzellen bei jeder Zellteilung würde der Verlust an genetischem Material zu gravierenden Störungen in hoch proliferativen Geweben führen und möglicherweise die Funktion von Stammzellen beeinträchtigen.

Ein verbessertes Verständnis der Telomeraseregulation während der Leberregeneration könnte z. B. für die Therapie von Leberverletzungen, Hepatitis, Lebertransplantationen, Leberkarzinomen oder anderen chronischen Leberkrankheiten von Nutzen sein.

In dieser Arbeit konnte eine erhöhte hTERT Promotoraktivität am dritten Tag nach partieller Hepatektomie nachgewiesen werden. Eine detaillierte Analyse der hTERT Promotoraktivität während der Leberregeneration und im Zusammenhang mit der Expression von anderen mit diesem Prozess assoziierten Genen steht noch aus. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Leberregeneration isolierte Hepatozyten ermöglichen *in vitro* Analysen des hTERT Promotors in Abhängigkeit vom Zellzyklus und eine Korrelation der hTERT Promotoraktivität mit bekannten Genen, die während der Leberregeneration aktiviert oder inhibiert werden. Über ChIP Analysen (Chromatin Immunpräzipitation) könnten Kandidaten auf ihre Fähigkeit, den hTERT Promotor zu binden, getestet werden.

Interessanterweise gibt es in den letzten Jahren zunehmend Hinweise auf eine zusätzliche Rolle von TERT neben der Verlängerung der Telomere.

In der Tat wurde eine von der Telomerlänge unabhängige Funktion von hTERT während der Transformation bzw. Tumorgenese beschrieben (Stewart *et al.*, 2002).

Sarin *et al.* postulieren ebenfalls eine neue Funktion von TERT, die unabhängig von der Telomeraseaktivität ist (Sarin *et al.*, 2005). In einem *mTERT* induzierbaren transgenen Mausmodell *i-TERT* führt die Überexpression von murinem *TERT* zu einer Aktivierung der epidermalen Stammzellen im Haarfollikel und somit zur Induktion der anagenen Phase. Dieser Mechanismus ist unabhängig von der Telomerasefunktion, da der gleiche Effekt in bitransgenen *i-TERT / mTERC^{-/-}* Mäusen (Blasco *et al.*, 1997), denen die RNA Untereinheit der Telomerase fehlt, auftritt.

Der Effekt der Telomerase und der Telomerlänge auf das Verhalten epidermaler Stammzellen wurde in *mTERC^{-/-}* (Blasco *et al.*, 1997) und *K5-mTERT* (Gonzalez-Suarez *et al.*, 2001) Mäusen analysiert (Flores *et al.*, 2005). Die Anzahl an Stammzellen in der *bulge area* des Haarfollikels nimmt mit steigender *mTERC^{-/-}* Generation zu, weil die Stammzellen Defekte in ihrer Mobilisierung zeigen und in der Stammzellnische akkumulieren. Die *K5-mTERT* Mäuse exprimieren *mTERT* unter der Kontrolle des bovinen Keratin 5 Promotors, der vor allem in Schichtepithelien wie Haut, Uterus, Speiseröhre oder Mundhöhle aktiv ist. Die Überexpression von *mTERT* in diesen Mäusen führt zu einer verstärkten Mobilisierung der epidermalen Stammzellen und einer gesteigerten Wundheilung (Gonzalez-Suarez *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2005).

In diesem Zusammenhang bietet das hTERTp-*lacZ* Mausmodell die spannende Möglichkeit, die Regulation des hTERT Promotors im Haarfollikel und in den epidermalen Stammzellen zu untersuchen. Ein interessanter Aspekt z. B. im Zusammenhang mit der Haarproliferation oder Wundheilung wäre, die Wirkung *hTERT* aktivierender Substanzen auf die ektopische hTERT Promotoraktivität und die endogene *mTERT* Expression / Telomeraseaktivität *in vivo* zu testen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der ektopische hTERT Promotor in dem hTERTp-*lacZ* transgenen Mausmodell „human-ähnlich“ verhält und dass das Modell daher sehr gut geeignet ist, um die zelltypspezifische Regulation des hTERT Promotors *in vivo* und unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Dafür bieten sich Fragestellungen bezüglich der Tumorgenese, regenerativer Prozesse, Stammzellen, Wundheilung oder des Haarwachstums an.

6. Literaturverzeichnis

Avilion, A. A., Piatyszek, M. A., Gupta, J., Shay, J. W., Bacchetti, S., and Greider, C. W. (1996). Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res* 56, 645-650.

Baumann, P., and Cech, T. R. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292, 1171-1175.

Baxevanis, C. N., Sotiropoulou, P. A., Sotiriadou, N. N., and Papamichail, M. (2004). Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein and its potential application in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 53, 166-175.

Beattie, T. L., Zhou, W., Robinson, M. O., and Harrington, L. (1998). Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol* 8, 177-180.

Blackburn, A. C., Brown, J. S., Naber, S. P., Otis, C. N., Wood, J. T., and Jerry, D. J. (2003). BALB/c alleles for Prkdc and Cdkn2a interact to modify tumor susceptibility in Trp53^{+/-} mice. *Cancer Res* 63, 2364-2368.

Blasco, M. A., Funk, W., Villeponteau, B., and Greider, C. W. (1995). Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269, 1267-1270.

Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A., and Greider, C. W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91, 25-34.

Blasco, M. A. (2005). Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging. *Embo J* 24, 1095-1103.

Bonifer, C., Huber, M. C., Jagle, U., Faust, N., and Sippel, A. E. (1996). Prerequisites for tissue specific and position independent expression of a gene locus in transgenic mice. *J Mol Med* 74, 663-671.

Botchkarev, V. A., and Paus, R. (2003). Molecular biology of hair morphogenesis: development and cycling. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 298, 164-180.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Broccoli, D., Young, J. W., and de Lange, T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9082-9086.

- Broccoli, D., Godley, L. A., Donehower, L. A., Varmus, H. E., and de Lange, T. (1996). Telomerase activation in mouse mammary tumors: lack of detectable telomere shortening and evidence for regulation of telomerase RNA with cell proliferation. *Mol Cell Biol* 16, 3765-3772.
- Broccoli, D., Chong, L., Oelmann, S., Fernald, A. A., Marziliano, N., van Steensel, B., Kipling, D., Le Beau, M. M., and de Lange, T. (1997). Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression and conserved protein domains. *Hum Mol Genet* 6, 69-76.
- Broll, H. (1983). [Effect of chloroquine diphosphate on the superhelix structure of DNA and protein synthesis in synovial cells in chronic polyarthritis]. *Wien Klin Wochenschr* 95, 877-880.
- Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A., and Reddel, R. R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 3, 1271-1274.
- Bryce, L. A., Morrison, N., Hoare, S. F., Muir, S., and Keith, W. N. (2000). Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia* 2, 197-201.
- Campbell, N. A. (2000). *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin - Oxford 2, 1035.
- Chadeneau, C., Siegel, P., Harley, C. B., Muller, W. J., and Bacchetti, S. (1995). Telomerase activity in normal and malignant murine tissues. *Oncogene* 11, 893-898.
- Chang, C. H., Scott, G. K., Kuo, W. L., Xiong, X., Suzdaltseva, Y., Park, J. W., Sayre, P., Erny, K., Collins, C., Gray, J. W., and Benz, C. C. (1997). ESX: a structurally unique Ets overexpressed early during human breast tumorigenesis. *Oncogene* 14, 1617-1622.
- Chang, S., Khoo, C. M., Naylor, M. L., Maser, R. S., and DePinho, R. A. (2003). Telomere-based crisis: functional differences between telomerase activation and ALT in tumor progression. *Genes Dev* 17, 88-100.
- Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., and de Lange, T. (1995). A human telomeric protein. *Science* 270, 1663-1667.
- Coles, C., Condie, A., Chetty, U., Steel, C. M., Evans, H. J., and Prosser, J. (1992). p53 mutations in breast cancer. *Cancer Res* 52, 5291-5298.
- Colgin, L. M., Wilkinson, C., Englezou, A., Kilian, A., Robinson, M. O., and Reddel, R. R. (2000). The hTERTalpha splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia* 2, 426-432.
- Collins, K., and Mitchell, J. R. (2002). Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21, 564-579.

- Cong, Y. S., Wen, J., and Bacchetti, S. (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 8, 137-142.
- Counter, C. M., Gupta, J., Harley, C. B., Leber, B., and Bacchetti, S. (1995). Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85, 2315-2320.
- Counter, C. M. (1996). The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat Res* 366, 45-63.
- Crowe, D. L., Nguyen, D. C., Tsang, K. J., and Kyo, S. (2001). E2F-1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Nucleic Acids Res* 29, 2789-2794.
- de Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 323-329.
- Dessain, S. K., Yu, H., Reddel, R. R., Beijersbergen, R. L., and Weinberg, R. A. (2000). Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res* 60, 537-541.
- Devereux, T. R., Horikawa, I., Anna, C. H., Annab, L. A., Afshari, C. A., and Barrett, J. C. (1999). DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res* 59, 6087-6090.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.
- Ducrest, A. L., Amacker, M., Mathieu, Y. D., Cuthbert, A. P., Trott, D. A., Newbold, R. F., Nabholz, M., and Lingner, J. (2001). Regulation of human telomerase activity: repression by normal chromosome 3 abolishes nuclear telomerase reverse transcriptase transcripts but does not affect c-Myc activity. *Cancer Res* 61, 7594-7602.
- Eckel, K. L., Tentler, J. J., Cappetta, G. J., Diamond, S. E., and Gutierrez-Hartmann, A. (2003). The epithelial-specific ETS transcription factor ESX/ESE-1/Elf-3 modulates breast cancer-associated gene expression. *DNA Cell Biol* 22, 79-94.
- Ercolani, L., Florence, B., Denaro, M., and Alexander, M. (1988). Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J Biol Chem* 263, 15335-15341.
- Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J., and et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236-1241.
- Flores, I., Cayuela, M. L., and Blasco, M. A. (2005). Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science* 309, 1253-1256.

Forsyth, N. R., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2002). Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69, 188-197.

Fuchs, E., Merrill, B. J., Jamora, C., and DasGupta, R. (2001). At the roots of a never-ending cycle. *Dev Cell* 1, 13-25.

Fujimoto, K., Kyo, S., Takakura, M., Kanaya, T., Kitagawa, Y., Itoh, H., Takahashi, M., and Inoue, M. (2000). Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT. *Nucleic Acids Res* 28, 2557-2562.

Gertler, R., Rosenberg, R., Stricker, D., Friederichs, J., Hoos, A., Werner, M., Ulm, K., Holzmann, B., Nekarda, H., and Siewert, J. R. (2004). Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 22, 1807-1814.

Gonzalez-Suarez, E., Samper, E., Ramirez, A., Flores, J. M., Martin-Caballero, J., Jorcano, J. L., and Blasco, M. A. (2001). Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *Embo J* 20, 2619-2630.

Goueli, B. S., and Janknecht, R. (2004). Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol Cell Biol* 24, 25-35.

Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., and Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-699.

Greenberg, R. A., Allsopp, R. C., Chin, L., Morin, G. B., and DePinho, R. A. (1998). Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* 16, 1723-1730.

Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.

Greider, C. W. (1999). Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* 97, 419-422.

Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.

Guilleret, I., Yan, P., Grange, F., Braunschweig, R., Bosman, F. T., and Benhattar, J. (2002). Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int J Cancer* 101, 335-341.

- Güneş, C., Lichtsteiner, S., Vasserot, A. P., and Englert, C. (2000). Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Res* 60, 2116-2121.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., and Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468.
- Harle-Bachor, C., and Boukamp, P. (1996). Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6476-6481.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Harley, C. B., Vaziri, H., Counter, C. M., and Allsopp, R. C. (1992). The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 27, 375-382.
- Harley, C. B. (2002). Telomerase is not an oncogene. *Oncogene* 21, 494-502.
- Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M. B., Arruda, I., and Robinson, M. O. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275, 973-977.
- Harrington, L. (2004). Does the reservoir for self-renewal stem from the ends? *Oncogene* 23, 7283-7289.
- Harris, C. C., and Hollstein, M. (1993). Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 329, 1318-1327.
- Harvey, M., Sands, A. T., Weiss, R. S., Hegi, M. E., Wiseman, R. W., Pantazis, P., Giovanella, B. C., Tainsky, M. A., Bradley, A., and Donehower, L. A. (1993). In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* 8, 2457-2467.
- Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Hiyama, E., Gollahon, L., Kataoka, T., Kuroi, K., Yokoyama, T., Gazdar, A. F., Hiyama, K., Piatyszek, M. A., and Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 88, 116-122.
- Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., and Shay, J. W. (2001). Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia* 3, 17-26.
- Horikawa, I., Chiang, Y. J., Patterson, T., Feigenbaum, L., Leem, S. H., Michishita, E., Larionov, V., Hodes, R. J., and Barrett, J. C. (2005). Differential cis-regulation of human

versus mouse TERT gene expression in vivo: identification of a human-specific repressive element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18437-18442.

Hou, M., Wang, X., Popov, N., Zhang, A., Zhao, X., Zhou, R., Zetterberg, A., Bjorkholm, M., Henriksson, M., Gruber, A., and Xu, D. (2002). The histone deacetylase inhibitor trichostatin A derepresses the telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in human cells. *Exp Cell Res* 274, 25-34.

Hsu, H. L., Gilley, D., Blackburn, E. H., and Chen, D. J. (1999). Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12454-12458.

Inui, T., Shinomiya, N., Fukasawa, M., Kobayashi, M., Kuranaga, N., Ohkura, S., and Seki, S. (2002). Growth-related signaling regulates activation of telomerase in regenerating hepatocytes. *Exp Cell Res* 273, 147-156.

Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T., and Weinberg, R. A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4, 1-7.

Jones, P. A. (1985). Altering gene expression with 5-azacytidine. *Cell* 40, 485-486.

Juttermann, R., Li, E., and Jaenisch, R. (1994). Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11797-11801.

Kaminker, P. G., Kim, S. H., Taylor, R. D., Zebajadian, Y., Funk, W. D., Morin, G. B., Yaswen, P., and Campisi, J. (2001). TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem* 276, 35891-35899.

Kanaya, T., Kyo, S., Hamada, K., Takakura, M., Kitagawa, Y., Harada, H., and Inoue, M. (2000). Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res* 6, 1239-1247.

Kelland, L. R. (2005). Overcoming the immortality of tumour cells by telomere and telomerase based cancer therapeutics--current status and future prospects. *Eur J Cancer* 41, 971-979.

Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J., and Cedar, H. (1986). DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 44, 535-543.

Kilian, A., Bowtell, D. D., Abud, H. E., Hime, G. R., Venter, D. J., Keese, P. K., Duncan, E. L., Reddel, R. R., and Jefferson, R. A. (1997). Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 6, 2011-2019.

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.

Kim, S. H., Kaminker, P., and Campisi, J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* 23, 405-412.

Kim, S. H., Beausejour, C., Davalos, A. R., Kaminker, P., Heo, S. J., and Campisi, J. (2004a). TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J Biol Chem* 279, 43799-43804.

Kim, S. H., Kook, M. C., Shin, Y. K., Park, S. H., and Song, H. G. (2004b). Evaluation of antigen retrieval buffer systems. *J Mol Histol* 35, 409-416.

Kimura, M., Koida, T., and Yanagita, Y. (2003). A study on telomerase activity and prognosis in breast cancer. *Med Oncol* 20, 117-126.

Kipling, D., and Cooke, H. J. (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347, 400-402.

Klingelutz, A. J., Foster, S. A., and McDougall, J. K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380, 79-82.

Kojima, H., Kaita, K. D., Xu, Z., Ou, J. H., Gong, Y., Zhang, M., and Minuk, G. Y. (2003). The absence of up-regulation of telomerase activity during regeneration after partial hepatectomy in hepatitis B virus X gene transgenic mice. *J Hepatol* 39, 262-268.

Kolquist, K. A., Ellisen, L. W., Counter, C. M., Meyerson, M., Tan, L. K., Weinberg, R. A., Haber, D. A., and Gerald, W. L. (1998). Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nat Genet* 19, 182-186.

Konnikova, L., Simeone, M. C., Kruger, M. M., Kotecki, M., and Cochran, B. H. (2005). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res* 65, 6516-6520.

Kuperwasser, C., Hurlbut, G. D., Kittrell, F. S., Dickinson, E. S., Laucirica, R., Medina, D., Naber, S. P., and Jerry, D. J. (2000). Development of spontaneous mammary tumors in BALB/c p53 heterozygous mice. A model for Li-Fraumeni syndrome. *Am J Pathol* 157, 2151-2159.

Kusumoto, M., Ogawa, T., Mizumoto, K., Ueno, H., Niiyama, H., Sato, N., Nakamura, M., and Tanaka, M. (1999). Adenovirus-mediated p53 gene transduction inhibits telomerase activity independent of its effects on cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 5, 2140-2147.

Kwakye-Berko, F., and Meshnick, S. R. (1989). Binding of chloroquine to DNA. *Mol Biochem Parasitol* 35, 51-55.

Kyo, S., Takakura, M., Kohama, T., and Inoue, M. (1997). Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 57, 610-614.

Kyo, S., Takakura, M., Kanaya, T., Zhuo, W., Fujimoto, K., Nishio, Y., Orimo, A., and Inoue, M. (1999). Estrogen activates telomerase. *Cancer Res* 59, 5917-5921.

Kyo, S., Takakura, M., Taira, T., Kanaya, T., Itoh, H., Yutsudo, M., Ariga, H., and Inoue, M. (2000). Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res* 28, 669-677.

Lee, H. W., Blasco, M. A., Gottlieb, G. J., Horner, J. W., 2nd, Greider, C. W., and DePinho, R. A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392, 569-574.

Li, H., Cao, Y., Berndt, M. C., Funder, J. W., and Liu, J. P. (1999). Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene* 18, 6785-6794.

Lin, S. Y., and Elledge, S. J. (2003). Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* 113, 881-889.

Lindsey, J., McGill, N. I., Lindsey, L. A., Green, D. K., and Cooke, H. J. (1991). In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res* 256, 45-48.

Martin-Rivera, L., Herrera, E., Albar, J. P., and Blasco, M. A. (1998). Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10471-10476.

Mason, J. M., and Biessmann, H. (1995). The unusual telomeres of *Drosophila*. *Trends Genet* 11, 58-62.

Masutomi, K., Yu, E. Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J. L., Metz, G. B., Brooks, M. W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J. A., *et al.* (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114, 241-253.

McClintock, B. (1942). The Fusion of Broken Ends of Chromosomes Following Nuclear Fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 28, 458-463.

Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., *et al.* (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.

Misiti, S., Nanni, S., Fontemaggi, G., Cong, Y. S., Wen, J., Hirte, H. W., Piaggio, G., Sacchi, A., Pontecorvi, A., Bacchetti, S., and Farsetti, A. (2000). Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol* 20, 3764-3771.

Mitchell, J. R., Wood, E., and Collins, K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402, 551-555.

- Morris, R. J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J. S., Sawicki, J. A., and Cotsarelis, G. (2004). Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 411-417.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., and Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6622-6626.
- Mukhopadhyay, N. K., Gordon, G. J., Maulik, G., Doerre, G., Liu, B. C., Bueno, R., Sugarbaker, D. J., and Jaklitsch, M. T. (2005). Histone deacetylation is directly involved in desilencing the expression of the catalytic subunit of telomerase in normal lung fibroblast. *J Cell Mol Med* 9, 662-669.
- Müller-Röver, S., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmüller, S., Foitzik, K., McKay, I. A., Stenn, K. S., and Paus, R. (2001). A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol* 117, 3-15.
- Müller, H. J. (1938). The remaking of chromosomes. *Collect Net* 13, 181-198.
- Munoz-Jordan, J. L., Cross, G. A., de Lange, T., and Griffith, J. D. (2001). t-loops at trypanosome telomeres. *Embo J* 20, 579-588.
- Muntoni, A., and Reddel, R. R. (2005). The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet* 14, R191-196.
- Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., and Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959.
- Nakayama, J., Saito, M., Nakamura, H., Matsuura, A., and Ishikawa, F. (1997). TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* 88, 875-884.
- Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Ide, T., and Ishikawa, F. (1998). Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 18, 65-68.
- Neumann, A. A., and Reddel, R. R. (2002). Telomere maintenance and cancer -- look, no telomerase. *Nat Rev Cancer* 2, 879-884.
- Niida, H., Shinkai, Y., Hande, M. P., Matsumoto, T., Takehara, S., Tachibana, M., Oshimura, M., Lansdorp, P. M., and Furuichi, Y. (2000). Telomere maintenance in telomerase-deficient mouse embryonic stem cells: characterization of an amplified telomeric DNA. *Mol Cell Biol* 20, 4115-4127.
- Norrback, K. F., Dahlenborg, K., Carlsson, R., and Roos, G. (1996). Telomerase activation in normal B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 88, 222-229.

- Oh, S., Song, Y., Yim, J., and Kim, T. K. (1999). The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J Biol Chem* *274*, 37473-37478.
- Oh, S., Song, Y. H., Yim, J., and Kim, T. K. (2000). Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene* *19*, 1485-1490.
- Olovnikov, A. M. (1971). Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* *201*, 1496-1499.
- Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* *41*, 181-190.
- Oren, M., Maltzman, W., and Levine, A. J. (1981). Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* *1*, 101-110.
- Pardue, M. L., Danilevskaya, O. N., Lowenhaupt, K., Slot, F., and Traverse, K. L. (1996). *Drosophila* telomeres: new views on chromosome evolution. *Trends Genet* *12*, 48-52.
- Pericuesta, E., Ramirez, M. A., Villa-Diaz, A., Relano-Gines, A., Torres, J. M., Nieto, M., Pintado, B., and Gutierrez-Adan, A. (2006). The proximal promoter region of mTert is sufficient to regulate telomerase activity in ES cells and transgenic animals. *Reprod Biol Endocrinol* *4*, 5.
- Pich, U., Fuchs, J., and Schubert, I. (1996). How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosome Res* *4*, 207-213.
- Prowse, K. R., and Greider, C. W. (1995). Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 4818-4822.
- Ramirez, R. D., Wright, W. E., Shay, J. W., and Taylor, R. S. (1997). Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. *J Invest Dermatol* *108*, 113-117.
- Ravindranath, N., Dalal, R., Solomon, B., Djakiew, D., and Dym, M. (1997). Loss of telomerase activity during male germ cell differentiation. *Endocrinology* *138*, 4026-4029.
- Renaud, S., Loukinov, D., Bosman, F. T., Lobanenko, V., and Benhattar, J. (2005). CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucleic Acids Res* *33*, 6850-6860.
- Ritz, J. M., Kuhle, O., Riethdorf, S., Sipos, B., Deppert, W., Englert, C., and Güneş, C. (2005). A novel transgenic mouse model reveals humanlike regulation of an 8-kbp human TERT gene promoter fragment in normal and tumor tissues. *Cancer Res* *65*, 1187-1196.

- Rudolph, K. L., Chang, S., Lee, H. W., Blasco, M., Gottlieb, G. J., Greider, C., and DePinho, R. A. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96, 701-712.
- Sablina, A. A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Agapova, L. S., Kravchenko, J. E., and Chumakov, P. M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 11, 1306-1313.
- Sarin, K. Y., Cheung, P., Gilson, D., Lee, E., Tennen, R. I., Wang, E., Artandi, M. K., Oro, A. E., and Artandi, S. E. (2005). Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature* 436, 1048-1052.
- Satyanarayana, A., Geffers, R., Manns, M. P., Buer, J., and Rudolph, K. L. (2004). Gene expression profile at the G1/S transition of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Cell Cycle* 3, 1405-1417.
- Shen, M., Haggblom, C., Vogt, M., Hunter, T., and Lu, K. P. (1997). Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and TRF1 suggest a role in mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13618-13623.
- Shi, S. R., Key, M. E., and Kalra, K. L. (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39, 741-748.
- Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., and de Lange, T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 20, 1659-1668.
- Stewart, S. A., Hahn, W. C., O'Connor, B. F., Banner, E. N., Lundberg, A. S., Modha, P., Mizuno, H., Brooks, M. W., Fleming, M., Zimonjic, D. B., *et al.* (2002). Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12606-12611.
- Tahara, H., Nakanishi, T., Kitamoto, M., Nakashio, R., Shay, J. W., Tahara, E., Kajiyama, G., and Ide, T. (1995). Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 55, 2734-2736.
- Takakura, M., Kyo, S., Kanaya, T., Hirano, H., Takeda, J., Yutsudo, M., and Inoue, M. (1999). Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res* 59, 551-557.
- Takakura, M., Kyo, S., Sowa, Y., Wang, Z., Yatabe, N., Maida, Y., Tanaka, M., and Inoue, M. (2001). Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells. *Nucleic Acids Res* 29, 3006-3011.
- Taylor, G., Lehrer, M. S., Jensen, P. J., Sun, T. T., and Lavker, R. M. (2000). Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102, 451-461.

- Todaro, G. J., and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17, 299-313.
- Ulaner, G. A., and Giudice, L. C. (1997). Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. *Mol Hum Reprod* 3, 769-773.
- Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H., Oruganti, H., Giudice, L. C., and Hoffman, A. R. (2000). Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *Int J Cancer* 85, 330-335.
- Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H., Giudice, L. C., and Hoffman, A. R. (2001). Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development. *Int J Cancer* 91, 644-649.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.
- Waga, S., and Stillman, B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 67, 721-751.
- Wang, J., Xie, L. Y., Allan, S., Beach, D., and Hannon, G. J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev* 12, 1769-1774.
- Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239, 197-201.
- Weedon, D., and Strutton, G. (1981). Apoptosis as the mechanism of the involution of hair follicles in catagen transformation. *Acta Derm Venereol* 61, 335-339.
- Weinrich, S. L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V. M., Holt, S. E., Bodnar, A. G., Lichtsteiner, S., Kim, N. W., Trager, J. B., *et al.* (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* 17, 498-502.
- Weise, J. M., and Güneş, C. (2006). Telomeres and telomerase. A survey about methods and recent advances in cancer diagnostic and therapy. *Histol Histopathol* 21, 1249-1261.
- Weissman, I. L., Anderson, D. J., and Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 387-403.
- Wick, M., Zubov, D., and Hagen, G. (1999). Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 232, 97-106.
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., and Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18, 173-179.

- Wright, W. E., and Shay, J. W. (2000). Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med* 6, 849-851.
- Wu, K. D., Orme, L. M., Shaughnessy, J., Jr., Jacobson, J., Barlogie, B., and Moore, M. A. (2003). Telomerase and telomere length in multiple myeloma: correlations with disease heterogeneity, cytogenetic status, and overall survival. *Blood* 101, 4982-4989.
- Wu, Y. L., Dudognon, C., Nguyen, E., Hillion, J., Pendino, F., Tarkanyi, I., Aradi, J., Lanotte, M., Tong, J. H., Chen, G. Q., and Segal-Bendirdjian, E. (2006). Immunodetection of human telomerase reverse-transcriptase (hTERT) re-appraised: nucleolin and telomerase cross paths. *J Cell Sci* 119, 2797-2806.
- Xu, D., Erickson, S., Szeps, M., Gruber, A., Sangfelt, O., Einhorn, S., Pisa, P., and Grander, D. (2000a). Interferon alpha down-regulates telomerase reverse transcriptase and telomerase activity in human malignant and nonmalignant hematopoietic cells. *Blood* 96, 4313-4318.
- Xu, D., Wang, Q., Gruber, A., Bjorkholm, M., Chen, Z., Zaid, A., Selivanova, G., Peterson, C., Wiman, K. G., and Pisa, P. (2000b). Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 19, 5123-5133.
- Xu, D., Popov, N., Hou, M., Wang, Q., Bjorkholm, M., Gruber, A., Menkel, A. R., and Henriksson, M. (2001). Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3826-3831.
- Yamamoto, Y., Sofikitis, N., Ono, K., Kaki, T., Isoyama, T., Suzuki, N., and Miyagawa, I. (1999). Postmeiotic modifications of spermatogenic cells are accompanied by inhibition of telomerase activity. *Urol Res* 27, 336-345.
- Yang, H., Kyo, S., Takatura, M., and Sun, L. (2001). Autocrine transforming growth factor beta suppresses telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in human cancer cells. *Cell Growth Differ* 12, 119-127.
- Yi, X., White, D. M., Aisner, D. L., Baur, J. A., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2000). An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity. *Neoplasia* 2, 433-440.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265, 17174-17179.
- Yu, Y., Okayasu, R., Weil, M. M., Silver, A., McCarthy, M., Zabriskie, R., Long, S., Cox, R., and Ullrich, R. L. (2001). Elevated breast cancer risk in irradiated BALB/c mice associates with unique functional polymorphism of the Prkdc (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) gene. *Cancer Res* 61, 1820-1824.
- Zakian, V. A. (1989). Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet* 23, 579-604.

Zhang, S., Ramsay, E. S., and Mock, B. A. (1998). Cdkn2a, the cyclin-dependent kinase inhibitor encoding p16INK4a and p19ARF, is a candidate for the plasmacytoma susceptibility locus, Pctr1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2429-2434.

Zhu, X. D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J. H., and de Lange, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* 25, 347-352.

Zimmermann, A. (2004). Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant* 19 *Suppl* 4, iv6-10.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
5' Aza	5' Azacytidin
bHLHZ	basische „ <i>Helix-loop-Helix-Zipper</i> “
bp, kbp	Basenpaare, Kilobasenpaare
BSA	engl. Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Cdk4	engl. Zyklin-abhängige Proteinkinase 4
cDNA	<i>copy</i> -Deoxyribonukleinsäure
CHAPS	3[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propan sulfonat
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
cm, mm, µm, nm	Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCIS	<i>ductal carcinoma in situ</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMFA	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. Deoxyribonukleinsäure
DNaseI	Deoxyribonuklease I
dNTP	Deoxynukleotid
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
engl.	englisch
FCS	engl. Fötale Kälberserum

g, mg, µg, ng, pg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm, Pikogramm
β-Gal	β-Galaktosidase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gen.	genomisch
ggf.	gegebenenfalls
G ₀ -Phase	<i>gap</i> 0-Phase
G1-Phase	<i>gap</i> 1-Phase
h	engl. Stunde
h	human
HDAC	Histon-Deacetylase
HeLa-Zellen	Tumorzellen eines Zervixkarzinoms von Frau Henrietta Lacks
h. i.	Hitze inaktiviert
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LTR	<i>long terminal repeats</i>
m	männlich
m	murin
M, mM, µM, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar
mA	Milliampère
mad1	Max-Dimerisierungsfaktor 1
MAF's	Maus adulte Fibroblasten
max	Myc-assoziiertes X-Faktor
MEF's	Maus embryonale Fibroblasten
min	Minute
mol, mmol, µmol	Mol, Millimol, Mikromol
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	Anzahl eingesetzter Versuchstiere
Neo	Neomycin
NLS	engl. Kernlokalisierungssignal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
OH	Hydroxylgruppe
P	Passage

PAA	Polyacrylamid
PBS	engl. Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
PH	partielle Hepatektomie
Pot1	<i>protection of telomeres</i>
Prkdc	<i>protein kinase DNA dependent, catalytic subunit</i>
Rb	Retinoblastom
RNA	engl. Ribonukleinsäure
RNaseH	Ribonuklease H
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
s.	siehe
sec	engl. Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SL	Stammlösung
Sp1	<i>specifity protein 1</i>
S-Phase	Synthese-Phase
ss	engl. einzelsträngig
SV40	Simian Virus 40
t	engl. Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris / EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEP1	<i>telomerase-associated protein 1</i>
TERC	engl. Telomerase RNA Komponente (auch TR oder TER)
TERT	Telomerase reverse Transkriptase (auch TRT)
TIN2	<i>TRF1-interacting nuclear protein 2</i>
TPE	<i>telomere position effect</i>

TRAP	<i>telomeric repeat amplification protocol</i>
TRF1 bzw. 2	<i>TTAGGG repeat binding factor 1 bzw. 2</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TSA	Trichostatin A
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
w	weiblich
WT	Wildtyp
w/v	engl. Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert für die Möglichkeit, in seiner Abteilung meine Dissertation anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Dr. Çağatay Güneş möchte ich mich ganz herzlich für die direkte Betreuung der Arbeit und die stetige persönliche und fachliche Unterstützung bei allen Fragen und Problemen bedanken. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich und hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vor allem seine Fähigkeit, Menschen für ein Thema zu begeistern und zu motivieren, hat mir oft weitergeholfen.

Des Weiteren danke ich der gesamten Abteilung Tumorvirologie für die gute Zusammenarbeit sowie für zahlreiche Anregungen und Hilfestellungen. Insbesondere möchte ich mich bei den Mitarbeitern der „Telomerase-Gruppe“, Dr. Çağatay Güneş, Britta Wittek, Kamila Iwanski, Julia Schröder und Kathrin Berke, für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bei Herrn Dr. Jürgen Löhler und Frau Silvia Wegerich (beide Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) und bei Frau Dr. Sabine Riethdorf sowie Frau Malgorzata Stoupiec (beide Uniklinikum Eppendorf, Institut für Tumorbiologie, AG Prof. Dr. Pantel, Hamburg) möchte ich mich für die Hilfe bei der Immunhistochemie und bei der pathologischen Auswertung bedanken.

Dank gilt auch den Mitarbeitern der Tierhaltung, Herrn Hasso Münd, Frau Beate Miksche, Frau Anke Dorendorf und Herrn Matthias Timmermann, für die exzellente Betreuung der Versuchstiere.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meinem Mann Gerrit. Sie haben mich in allen meinen Entscheidungen unterstützt und motiviert.