
**Untersuchungen zum onkogenen Potential von
Telomerase-immortalisierten humanen Hepatozyten
in Langzeitkultur**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
im Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg**

**vorgelegt von Björn Haker
aus Anklam**

Hamburg 2007

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
I. EINLEITUNG	4
I. 1. HEPATOKARZINOGENESE	4
I.2. STRUKTUR UND FUNKTION DER TELOMERE.....	5
I. 3. REPLIKATIONSABHÄNGIGE TELOMERVERKÜRZUNG	8
I.4. BEDEUTUNG DER TELOMERASE FÜR DIE ZELLULÄRE PROLIFERATION	9
I.5. TELOMERLÄNGEN-UNABHÄNGIGE FUNKTIONEN DER TELOMERASE	12
I.6. ROLLE DER TELOMERASE UND TELOMERE IN DER KREBSENTSTEHUNG	13
I.7. AKTIVIERUNG DER TELOMERASE IN DER HEPATOKARZINOGENESE.....	15
I.8. DNA SCHÄDEN UND IHRE REPARATUR.....	16
I.9. DAS TUMORSUPPRESSORPROTEIN P53 UND DIE DNA-REPARATUR.....	16
I.10. TELOMERASE-VERMITTELTE IMMORTALISIERUNG	19
I. 11. FRAGESTELLUNG	20
II. METHODEN.....	21
II.1. ZELLKULTUR.....	21
II.2. ÜBERPRÜFUNG AUF MYKOPLASMENKONTAMINATION.....	23
II.3. RNA ISOLIERUNG UND REVERSE TRANSKRIPTION	23
II.4. PRIMEROPTIMIERUNG FÜR TERT, p53, GAPDH.....	24
II.5. VALIDIERUNG DER REAL-TIME PCR	26
II.6. EXPRESSIONSANALYSE VON TERT UND P53.....	27
II.7. ANALYSE DER TELOMERASEAKTIVITÄT.....	29
II.8. ANALYSE DER TELOMERLÄNGE.....	30

II.9. ZYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN	30
II.10. SOFTAGARASSAY	31
II.11. NACKTMAUSASSAY	32
II.12. INDUKTION VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN	32
II.13. IMUNOBLOTANALYSE	33
II.14. ZELLZYKLUSANALYSE	34
II. 15. STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	35
III. ERGEBNISSE.....	36
III. 1. TERT-EXPRESSION, TELOMERASEAKTIVITÄT UND TELOMERLÄNGE	36
<i>III.1.a. TERT-Expression.....</i>	<i>37</i>
<i>III.1.b. Relative Telomeraseaktivität (RTA).....</i>	<i>37</i>
<i>III.1.c. Telomerlänge</i>	<i>38</i>
III. 2. ENTWICKLUNG VON ANEUPLOIDIEN IN IMMORTAL. HEPATOZYTEN.....	39
<i>III.2.a. Karyogramme</i>	<i>39</i>
<i>III. 2. b. Multicolor-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (M-FISH)</i>	<i>42</i>
III. 3. SOFTAGARASSAY	44
III. 4. NACKTMAUSASSAY	45
III. 5. P53-EXPRESSION	46
III. 6. P53-INDUZIERTER ZELLZYKLUSARRESTES NACH DNA-SCHÄDIGUNG.....	47
<i>III. 6. a. Immunoblot</i>	<i>47</i>
<i>III. 6. b. Durchflusszytometrie</i>	<i>49</i>
IV. DISKUSSION	54
IV. 1. IMMORTALISIERUNG VON HEPATOZYTEN	54
IV.2. TELOMERASE UND KREBS	56

IV.3. ZYTOGENETISCHE VERÄNDERUNGEN IN IMMORTALISIERTEN ZELLEN	57
IV.4. DAS TUMORSUPPRESSORGEN P53.....	60
V. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSSICHTEN	62
VI. LITERATUR.....	64
VII. DANKSAGUNG	74

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct	Ct-Wert; Schwellenwert-Zyklus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FHC	fötale Hepatozyten
FHA/FHB	Telomerase-immortalisierte fötale Hepatozyten
hGAPDH	humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEK-293	entartete Nierenzelllinie (Human Embryonic Kidney)
HepG2	Leberkarzinomzelllinie
HuH7	Leberkarzinomzelllinie
hTERC	humane Telomerase RNA Komponente
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PD	Populationsverdoppelung
RNA	Ribonukleinsäure
RTA	Relative Telomerase Aktivität
RQ-TRAP	Real-time quantitative telomeric repeat amplification

Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit das fünfthäufigste Malignom und macht fast sechs Prozent aller Krebserkrankungen aus. Soweit bekannt ist, läuft die Hepatokarzinogenese (Leberkrebsentstehung) vermutlich als mehrstufiger Entartungsvorgang ab, wobei die Aktivierung der Telomerase als ein entscheidender Schritt angesehen wird. Die Erforschung der molekularen Abläufe der Leberkrebsentstehung wird vor allem durch das Fehlen einer geeigneten humanen Leberzelllinie behindert.

Durch Reaktivierung der Telomeraseaktivität mittels retroviraler Transduktion der katalytischen Untereinheit TERT (telomerase reverse transcriptase) wurden humane fötale Hepatozyten immortalisiert und in der vorliegenden Arbeit als ein Zellkultursystem proliferierender Hepatozyten hinsichtlich ihres onkogenen Potentials untersucht.

Die immortalisierten Hepatozyten zeigten im Verlauf der Langzeitkultur, d.h. bis zu 150 Populationsverdoppelungen (PD), eine stabile TERT-Expression und Telomeraseaktivität. Telomerase-immortalisierte fötale Hepatozyten durchliefen bis zu 150 Zellteilungen (Ende des Experiments) mit stabilen Telomeren. Im Gegensatz dazu verkürzten sich die Telomere von Kontrollzellen ohne Telomeraseaktivität pro Zellteilung um 100 bis 150 Basenpaare (bp), bis sie nach ca. 35 Zellteilungen in Seneszenz gingen. Die Seneszenz ist ein postmitotischer Zustand, der, unter Aufrechterhaltung der Stoffwechselaktivität, weitere Zellteilungen verhindert.

Mittels zytogenetischer Untersuchungen der immortalisierten Zellen wurden im Verlauf der Langzeitkultur numerische Veränderungen (Monosomie X und Trisomie 7) in jeweils zwei voneinander unabhängig immortalisierten Klonen festgestellt. Die

Veränderungen hatten keinen Einfluss auf die DNA-Reparaturantwort. Durch Untersuchungen mit M-FISH (Multicolor Fluoreszenz in situ Hybridisierung) konnten in numerisch veränderten oder unveränderten immortalisierten Hepatozyten keine weiteren strukturellen chromosomalen Veränderungen, z. B. Translokationen oder Inversionen, im Verlauf der Langzeitkultur gefunden werden.

Trotz andauernder Proliferation fand sich im Softagarassay kein verankerungs-unabhängiges Wachstum als Hinweise auf eine mögliche maligne Transformation. Außerdem wurden immortalisierte Hepatozyten subkutan in immundefiziente Nacktmäuse gespritzt. Nach mehreren Monaten konnte kein Tumorwachstum als Kennzeichen von Onkogenität festgestellt werden. Als Positivkontrolle wurden Leberkrebszellen (HepG2) ausplatiert bzw. entartete Nierenzellen (HEK-293) in Nacktmäuse gespritzt.

In ca. 50% aller humanen Tumore wurden Mutationen in Allelen des Tumorsuppressorgens p53 nachgewiesen. Die Tumor hemmende Wirkung von p53 basiert u.a. auf der Einleitung des Zellzyklusarrests am G1/S-Übergangspunkt im Rahmen der DNA Reparaturantwort.

Durch eine Expressionsanalyse, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem p53-Expressionsniveau in immortalisierten Hepatozyten mit oder ohne numerische Veränderungen sowie primären Hepatozyten detektiert werden.

Zur Überprüfung der ungestörten p53-Funktion wurden DNA-Doppelstrangbrüchen induziert (ionisierte Strahlung, Camptothecin). Durchflusszytometrie und Immunoblots bestätigten eine ungestörte DNA-Schadensantwort via Stabilisierung von p53 und folgender p21-Aktivierung, welche zur Induktion eines G1/S Zellzyklusarrestes in den immortalisierten Hepatozyten führt.

Die als Kontrollzellen verwendeten nicht-immortalisierten Hepatozyten und frisch isolierte adulte Hepatozyten ergaben ähnliche Ergebnisse.

Die funktionell intakte p53-vermittelte Schadensantwort zeigt somit indirekt, dass die Telomerase-immortalisierten Hepatozyten keine mutierten Allele von p53 enthalten.

Zusammenfassend gesagt, zeigen die hier untersuchten Telomerase-immortalisierten Hepatozyten, trotz einiger numerischer Veränderungen, noch keine onkogene Transformation und stellen daher ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der molekularen Grundlagen der Hepatokarzinogenese in Langzeitkultur dar.

I. Einleitung

I. 1. Hepatokarzinogenese

Leberkrebs ist weltweit mit jährlich 500.000 neuen Fällen, davon ca. 50.000 in Europa, das fünfthäufigste Malignom und macht fast sechs Prozent aller Krebserkrankungen aus (Bosch et al., 2004). Kennzeichnend für das hepatozelluläre Karzinom ist eine extrem hohe Letalität mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 6,5%. Die meisten Patienten überleben die Diagnosestellung weniger als ein Jahr. Vor diesem Hintergrund wurde in den letzten zehn Jahren intensiv über die molekularen Grundlagen der Hepatokarzinogenese geforscht. So konnten unter anderem Veränderungen im Rezeptor der Tyrosinkinase und im Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau durch Proteasomen (Roberts and Gores, 2005) detektiert werden. Außerdem wurden Mutationen im Retinoblastoma-Tumorsuppressor-Signalweg oder in p16^{INK4} (Moradpour and Blum, 2005) sowie die Aktivierung des Wnt-Signalweges beschrieben (Giles et al., 2003). Des Weiteren scheint eine erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren, z. B. insulin-like growth factor II und hepatocyte-growth factor, ebenfalls eine Rolle in der Hepatokarzinogenese zu spielen (Moradpour and Blum, 2005). Die bis zum jetzigen Zeitpunkt beschriebenen molekularen Veränderungen ließen sich nicht in allen untersuchten Biopsien detektieren. Aus diesem Grund konnte bisher kein überzeugendes Model für die molekulare Grundlage der Entstehung von Leberkrebs entwickelt werden. Im Gegensatz dazu kann in der großen Mehrzahl maligner Tumore des Menschen, so auch im hepatozellulären Karzinom (HCC), eine hohe Telomeraseaktivität gemessen werden. Die Hepatokarzinogenese verläuft vermutlich als mehrstufiger Prozess ab, wobei die Telomeraseaktivierung als ein entscheidender Schritt angesehen wird. Für

genauere Untersuchungen der Hepatokarzinogenese gibt es zum jetzigen Zeitpunkt keine geeignete humane Leberzelllinie. So können frisch isolierte primäre Hepatozyten nur für eine begrenzte Zeit kultiviert werden. Im Gegensatz dazu lassen sich Leberkrebszelllinien über lange Zeit kultivieren, sind aber bereits maligne und somit ungeeignet für die Untersuchung des Entartungsvorgangs. Durch Reaktivierung der Telomerase wurden fötale Hepatozyten immortalisiert (Wege et al., 2003c) und im Rahmen dieser Arbeit als ein Zellkultursystem proliferierender Hepatozyten hinsichtlich ihres onkogenen Potentials untersucht. Da sie per se noch nicht entartet sind und ein unbegrenztes Teilungspotential besitzen, stellen sie ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Hepatokarzinogenese in Langzeitkultur dar.

I.2. Struktur und Funktion der Telomere

Mitte der Dreißiger Jahre haben unabhängig voneinander Barbara McClintock bei ihren Untersuchungen von *Zea mays* Chromosomen und Herman J. Muller bei genetischen Arbeiten an *Drosophila melanogaster* entdeckt, dass Chromosomen eine spezielle stabilisierende Endstruktur besitzen. Muller prägte 1938 den Begriff Telomer, abgeleitet vom griechischen telos für Ende und meros für Teil. *McClintock* beschrieb unter anderem, dass ohne diese Endstrukturen Chromosomen aneinander haften sowie ungewöhnliche strukturelle Veränderungen durchlaufen. Telomere bilden die Endstrukturen eukaryotischer Chromosomen. Sie bestehen hauptsächlich aus einer sich hundert- bis tausendfach wiederholenden kurzen DNA-Sequenz. Die nicht-kodierende Sequenz ist evolutionär konserviert, wobei Variationen beschrieben worden sind, z.B. 5'-TTTAGGG bei Höheren Pflanzen und 5'-TTAGGG bei Vertebraten (Blackburn, 1991; Moyzis et al., 1988; Zakian, 1995). Es gibt eine

Vielzahl von Telomer-bindenden Proteinen, insbesondere telomeric repeat binding factor 1 und 2 (TRF1 und 2) (Bilaud et al., 1997; Broccoli et al., 1997; Zhong et al., 1992) sowie protection of telomeres-1 (POT1) (Baumann and Cech, 2001). Sie stehen miteinander in Wechselwirkung und erzeugen eine Chromatinstruktur, die sich von der Nukleosomenkette im restlichen Teil des Chromosoms unterscheidet. Dieser Nukleoproteinkomplex, der die Chromosomenenden aufwindet (Griffith et al., 1999) (Abbildung I.1.), wird häufig als Telosom bezeichnet (Liu et al., 2004). Ein weiteres strukturelles Merkmal der Telomere ist die Bildung von Kappen unter Mitwirkung der gebundenen Telomerproteine. Dabei werden die Telomere zurückgefaltet und bilden die so genannte D-Schleife (Displacement), welche unter Umständen die gesamte Telomerasequenz umfassen kann (Abbildung I.1.). Der 3'-Einzelstrangüberhang wird ebenfalls zurückgefaltet und in den oberen DNA-Doppelstrang des Telomers aufgenommen, wodurch die so genannte T-Schleife („Telomere-loop“) entsteht (Cerni, 2000). Die gebildeten stabilen Telomerkappen ermöglichen eine Unterscheidung zwischen reparaturbedürftigen DNA-Doppelstrangbrüchen und natürlichen Chromosomenenden. Sie bieten einen Schutz vor enzymatischer Degradation sowie vor Fusion der Chromosomenenden und homologer Rekombination. Infolgedessen sind intakte Telomerkappen notwendig, um chromosomale Instabilität in eukaryotischen Zellen zu verhindern (Blackburn, 2000; Takai et al., 2003). Außerdem sind Telomere an der Positionierung der Chromosomen innerhalb des Zellkerns und der Formung von Heterochromatin sowie der vollständigen Replikation der chromosomalen DNA beteiligt. Überdies spielen sie eine wichtige Rolle im Rahmen der Chromosomenseparation während der Mitose (Greider, 1996).

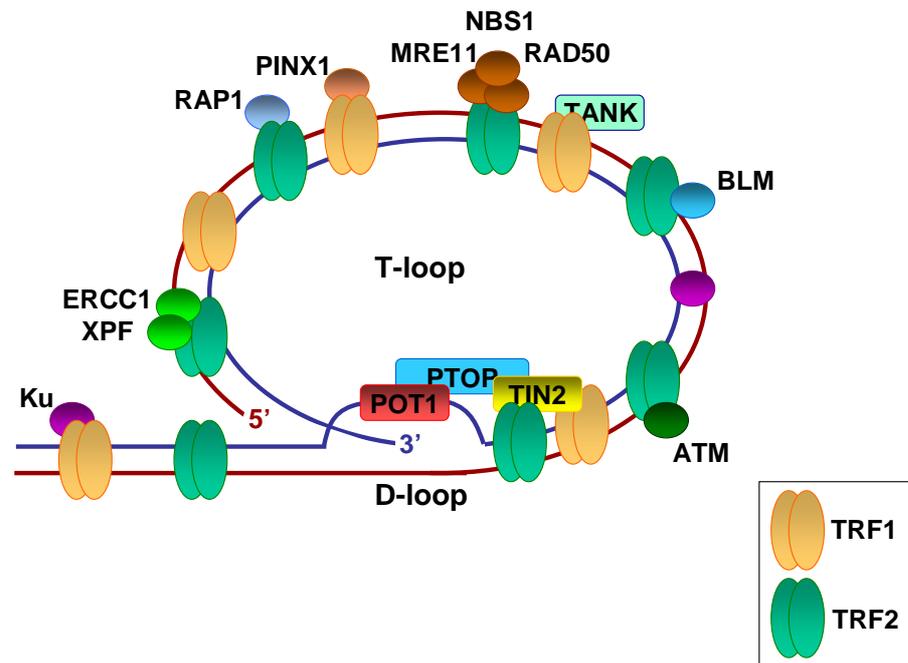


Abbildung I.1. Schematische Darstellung der Telomerstruktur mit stabilisierenden Proteinen: Neben telomeric repeat binding factor 1 und 2 (TRF1 und 2) und protection of telomeres (POT) gibt es noch andere telomerbindende Proteine, die zur Bildung einer stabilen Telomerkappe beitragen.

Telomere können unterschiedlich lang sein. Während in humanen somatischen Zellen die Telomerlänge zum Zeitpunkt der Geburt durchschnittlich 15 bis 20 Kilobasen (kb) beträgt, weisen somatische Zellen einzelner Maus- oder Katzenarten ein Vielfaches dieser Länge auf. Darüber hinaus ist die Telomerlänge geschlechtsabhängig und variiert überdies zwischen einzelnen Individuen innerhalb einer Art. Es konnten außerdem deutliche Längenunterschiede zwischen verschiedenen Geweben und sogar von Chromosomenarm zu Chromosomenarm gezeigt werden (Martens et al., 1998).

I. 3. Replikationsabhängige Telomerverkürzung

Aufgrund der unvollständigen semikonservativen DNA-Replikation (Olovnikov, 1973) sowie aktiver enzymatischer Prozesse während der S-Phase des Zellzyklus, kommt es bei jeder Zellteilung zu einer Verkürzung der Telomere und somit zum replikationsbedingten Verlust von Bindungsstellen für stabilisierende Proteine (Allsopp et al., 1995). Beim Menschen beträgt die Telomerverkürzung zwischen 50 bis 200 Basenpaare je Zellteilung. Nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen, bei fötalen Hepatozyten nach ca. 30 bis 40 Populationsverdopplungen (Wege et al., 2003a), wird eine kritische Telomerlänge erreicht, welche die Bildung von stabilen und schützenden molekularen Kappen am Chromosomenende nicht mehr zulässt (Levy et al., 1992). Bereits 1961 beobachteten Hayflick und Moorhead, dass Fibroblasten sich in Kultur nur für eine begrenzte Zeit teilen, bevor sie in Seneszenz eintreten, einem irreversiblen postmitotischen Ruhezustand mit Erhalt der Stoffwechselaktivität. Die zelluläre Seneszenz ist genetisch festgelegt und wird in nahezu allen Körperzellen (ausgenommen Keimbahn- und Stammzellen) nach einer bestimmten replikativen Lebensspanne oder nach irreparablen Erbgutschäden aktiviert und verhindert weitere Zellteilungen.

Die replikative Lebensspanne bis zum Erreichen der Seneszenz wurde in den Experimenten von Hayflick und Moorhead jedoch nicht durch die Zeit in Zellkultur, sondern durch die Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen und damit letztlich, wie später erkannt wurde, von der replikationsbedingten Telomerverkürzung bestimmt. Aufgrund von Beobachtungen in Fibroblasten beschrieb Calvin Harley die teilungsbedingte Telomerverkürzung und dadurch begrenzte Proliferationsfähigkeit von somatischen Zellen anschaulich als „mitotische Uhr“ (Harley et al., 1990). Im Gegensatz zu somatischen Zellen konnte in Keimbahnzellen und in den meisten

Tumorzelllinien eine stabile oder sich nur langsam ändernde Telomerlänge festgestellt werden. Aber nicht nur die Länge der Telomere ist für eine ungestörte Proliferation von Bedeutung, sondern vielmehr deren Gesamtfunktion, welche wiederum von den stabilisierenden Proteinen und deren Zusammenspiel mit der Telomer-DNA abhängig ist. So führen zum Beispiel auch Modifikation der stabilisierenden Proteine und/oder Inhibition ihrer Synthese zur Destabilisierung der Telomere. Der Verlust der Telomerschutzfunktion führt zum Proliferationsarrest und unter Umständen in Tumorzellen auch zum Tod nach mitotischer Katastrophe (Shay and Wright, 2006).

I.4. Bedeutung der Telomerase für die zelluläre Proliferation

Um den Telomerverlust auszugleichen und die Telomerlänge zu stabilisieren, synthetisiert das Ribonukleoprotein Telomerase neue Telomersequenz de novo direkt an das Chromosomenende, vermutlich noch vor Beginn der eigentlichen Replikation. Das Holoenzym wurde erstmalig 1985 von Greider und Blackburn in Ciliaten der Art *Tetrahymena thermophila* nachgewiesen (Greider and Blackburn, 1985). Es besitzt eine RNA-Komponente (telomerase RNA component, TERC), welche zur Bindung an das Chromosomenende und als Matrize für die Neusynthese von Telomersequenzen dient (Feng et al., 1995). Entscheidend für die katalytische Aktivität ist jedoch eine essentielle Reverse Transkriptase (telomerase reverse transcriptase, TERT). Die wichtigsten Schritte der Neusynthese von Telomersequenz werden im Folgenden kurz beschrieben und schematisch dargestellt.

Nach Bindung des Telomerasekomplexes an das 3'-Telomerende und der Neusynthese von Telomersequenz (Elongation) erfolgt die Translokation des Enzymkomplexes und eine erneute Elongation (Abbildung I.2.). Die Synthese des

komplementären 5'-Stranges erfolgt anschließend von einer DNA-abhängigen Polymerase.

Die Expression der katalytischen Untereinheit TERT ist in den meisten differenzierten humanen Zellen, so auch in differenzierten nicht proliferierenden Hepatozyten, welche sich in der G0-Phase des Zellzykluses befinden, unterdrückt (Nakamura et al., 1997). Im Gegensatz dazu wird TERT in den meisten Keimbahnzellen und Tumorzellen exprimiert, wodurch sie über ein unbegrenztes Proliferationsvermögen verfügen. In diesen Zellen lassen sich sehr hohe Spiegel für die Expression von TERT sowie eine hohe Telomeraseaktivität nachweisen. Des Weiteren wurden mehrere Telomerase-bindende Proteine identifiziert, insbesondere telomerase associated protein 1 (TP1) und Dyskerin, welche die Aktivität des Enzyms modulieren (Abbildung I.2.).

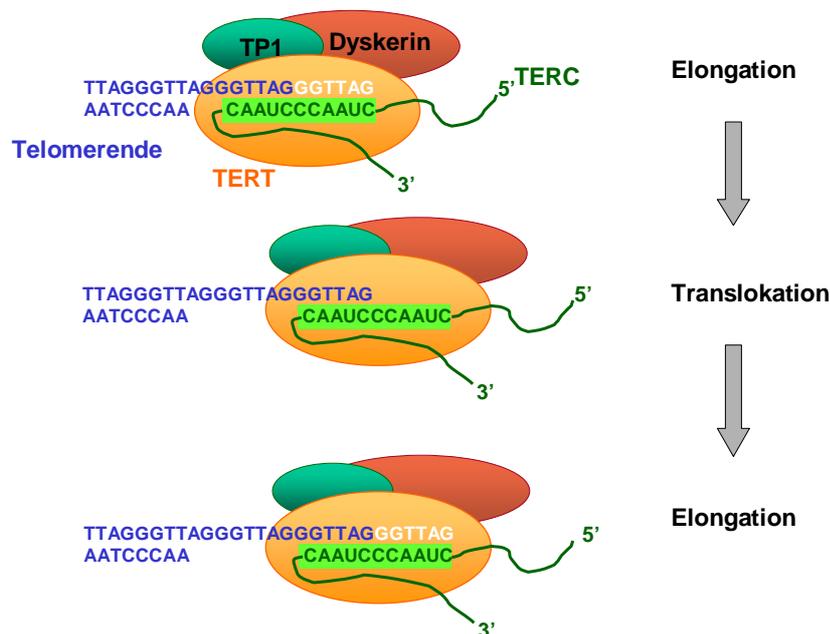


Abbildung I.2. Funktion der Telomerase: Zuerst bindet die RNA-Komponente (TERC) des Enzymkomplexes an das 3'-Ende des Telomers. Die folgende Reverse Transkription wird durch die Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) katalysiert. Nach der Neusynthese von Telomersequenz (Elongation) verschiebt sich der Telomerasekomplex (Translokation) in Richtung 5'-Ende des Telomers und eine erneute Elongation kann beginnen.

Die Bedeutung der Telomerase für eine ungestörte zelluläre Proliferation wurde eindrücklich in Mausexperimenten belegt. Mäuse, deren Telomeraseaktivität durch homozygote Deletion von TERC unterdrückt wurde, zeigten eine kontinuierliche Telomerverkürzung, die in späteren Generationen mit extrem kurzen Telomeren zu einer Zunahme von Fusionen führte. Die Mäuse mit instabilen Chromosomenenden wiesen Defekte in der Spermatogenese bis hin zur Infertilität, Milzatrophy und Störung der Wundheilung auf (Blasco et al., 1997). Innerhalb des Untersuchungszeitraumes kam es zu einem 4- bis 6-fach erhöhtem Auftreten von Tumoren, wahrscheinlich aufgrund der gesteigerten genetischen Instabilität (Rudolph et al., 1999).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Regulation der Telomerlänge nicht nur von der Aktivität der Telomerase und der Geschwindigkeit der replikationsbedingten Telomerverkürzung bestimmt wird. Während 90% der humanen Tumore eine hohe Telomeraseaktivität aufweisen, werden in den verbleibenden 10% die Chromosomenenden auf eine andere Art und Weise stabilisiert (Stewart, 2005). Ein Telomerase-unabhängiger Prozess der Telomerstabilisierung wurde erstmalig 1995 postuliert und als ALT-Mechanismus (alternative lengthening of telomeres) bezeichnet (Rogan et al., 1995).

I.5. Telomerlängen-unabhängige Funktionen der Telomerase

Neben der Stabilisierung der Telomere werden in neueren Publikationen auch Funktionen der Telomerase berichtet, die unabhängig von der Telomerlänge ablaufen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben beschrieben, dass eine erhöhte Telomeraseaktivität zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion und oxidativem Stress führt.

In TERT-transduzierten murinen embryonalen Stammzellen mit hoher Telomeraseaktivität wurde beispielsweise ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Telomeraseaktivität und einer verringerten Apoptosefähigkeit beschrieben (Lee et al., 2005). In embryonalen Stammzellen mit hoher Telomeraseaktivität konnte eine verringerte Akkumulation von Peroxiden als Hinweis auf eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress nachgewiesen werden (Armstrong et al., 2005).

I.6. Rolle der Telomerase und Telomere in der Krebsentstehung

In der überwiegenden Mehrzahl von humanen Tumorzellen kann eine hohe Telomeraseaktivität gemessen werden, während im umliegenden, nicht malignen Gewebe sich kaum aktive Telomerase nachweisen lässt (Kim et al., 1994; Kim and Wu, 1997; Shay and Bacchetti, 1997). Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde in letzter Zeit eine duale Rolle der Telomere und der Telomerase im Rahmen der Karzinogenese beschrieben (Hackett and Greider, 2002; Satyanarayana et al., 2004). Nach dieser Hypothese führt zunächst eine kritische Verkürzung der Telomere zu instabilen Chromosomen mit einer deutlich erhöhten Rate an chromosomalen Aberrationen, zum Beispiel Fusionen (Blasco et al., 1997) und Aneuploidien (Rudolph et al., 1999). Die Telomerverkürzung spielt somit möglicherweise eine wichtige Rolle in der malignen Transformation von Zellen. Für die weitere Karzinogenese ist die Aufrechterhaltung und Stabilisierung der kurzen Telomere eine Voraussetzung (Hanahan and Weinberg, 2000), um eine mitotische Katastrophe mit Proliferationsarrest und Zelltod zu vermeiden. Ein Gleichgewicht der Telomerlänge in den genetisch veränderten Zellen wird durch Reaktivierung der Telomerase oder in seltenen Fällen durch einen ALT-Mechanismus verursacht (Abbildung I.3.). Die Telomeraseaktivierung geschieht hauptsächlich durch Re-Expression der katalytischen Untereinheit TERT.

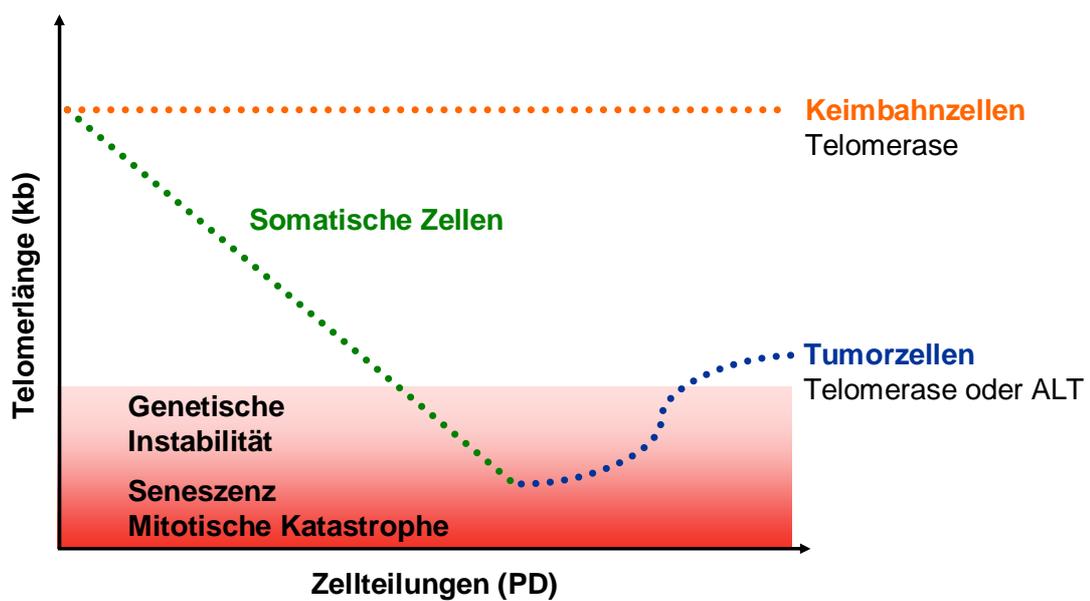


Abbildung I.3. Replikationsabhängige Telomerverkürzung: Keimbahnzellen mit aktiver Telomerase besitzen konstant lange Telomere. In somatischen Zellen nimmt auf Grund der inaktiven Telomerase die Telomerlänge mit jeder Zellteilung (PD) ab und die genetische Instabilität zu, bis sie seneszent werden. Unter bestimmten Umständen entarten somatische Zellen und werden zu Tumorzellen in denen die Telomerase oder ein alternativer Prozess (ALT) die Telomerlänge stabilisiert. Tumorzellen können aber auch nach einer mitotischen Katastrophe absterben (*kb* = Kilobasen).

Verschiedene Autoren haben die Aktivierung von Telomerase als einen frühen Schritt in der Entwicklung und im weiteren Wachstum von humanen Tumoren identifiziert. Die alleinige Aktivierung der Telomerase ist aber noch nicht ausreichend, um eine Zelle entarten zu lassen (Harley, 2002). Nach dem derzeitigen Modell der Karzinogenese ist es für eine maligne Transformation ausreichend, wenn neben der TERT vermittelten Telomeraserekonstitution eine relativ kleine Anzahl zellulärer Signalwege unterbrochen oder gestört wird. In dieser Hinsicht konnten Hahn et al. *in vitro* zeigen, dass sich normale humane epitheliale Vorläuferzellen durch die ektope Expression von TERT sowie dem Simian Virus 40 großem T-

Onkoprotein (SV40T) und einem onkogenen Allel von H-ras in Krebszellen umwandeln lassen (Hahn et al., 1999).

I.7. Aktivierung der Telomerase in der Hepatokarzinogenese

Im Verlauf der letzten zehn Jahre wurden mehrere Gene und Signalwege, die an der Entstehung von hepatozellulären Karzinomen beteiligt zu sein scheinen, entdeckt. Sie konnten allerdings nicht in allen untersuchten Biopsien beschrieben werden, so dass bis heute kein geeignetes Modell der Pathogenese entwickelt werden konnte.

Im Gegensatz dazu konnte in fast allen untersuchten hepatozellulären Karzinomen Telomeraseaktivität nachgewiesen werden, was die Bedeutung einer ungehinderten Proliferationsfähigkeit im Rahmen der Krebsentstehung unterstreicht. 1997 bestätigten Kojima et al. eine hohe Telomeraseaktivität in 85% der hepatozellulären Karzinome. Im Kontrast zur hohen Enzymaktivität variiert die Telomerlänge in den hepatozellulären Karzinomen von 2,0 bis zu 16,0 kb, wobei 44% der Telomere kürzer und 17% länger sind als die Telomere des umgebenden nicht malignen Gewebes (Kojima et al., 1997). Außerdem konnten verschiedene Arbeitsgruppen eine Aktivierung der Telomerase in präkanzerösen hepatischen Knoten nachweisen (Hytioglou et al., 1998; Oh et al., 2003; Takaishi et al., 2000). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass im Rahmen der Leberkrebsentstehung die Aktivierung der Telomerase ein frühes Ereignis im mehrstufigen Entartungsvorgang zu sein scheint.

I.8. DNA Schäden und ihre Reparatur

Die DNA ist einer anhaltenden Schädigung durch endogene Stoffwechselprozesse und exogener Einflüsse, wie z. B. ionisierender Strahlung, UV-Strahlung sowie chemischer Kanzerogene (z. B. Ethidiumbromid), ausgesetzt. Die Schäden reichen von Basenverlust, chemischer Modifizierung wie Oxidation oder Alkylierung, bis zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Bevor die Schäden aufgrund eines Replikationsfehlers zu Mutationen führen können, wird die DNA-Verdoppelung gestoppt, und der fehlerhafte Abschnitt kann durch verschiedene DNA-Reparaturmechanismen repariert werden. Die Mismatchreparatur beseitigt Basenfehlpaarungen, die durch Replikationsfehler entstanden sind, während Basenexzisionsreparatur spezifisch oxidative oder alkylierte Basenmodifikationen behebt. Die Nukleotidexzisionsreparatur kommt z. B. bei UV-Schäden zum Einsatz und repariert großräumige DNA-Addukte. DNA-Doppelstrangbrüche können durch die Wirkung von Topoisomerase-Inhibitoren (z. B. Camptothecin) oder durch ionisierte Strahlung entstehen. Für die Beseitigung gibt es mindestens zwei Reparaturwege: homologe Rekombination und nicht-homologe Enden-Verknüpfung. Alternativ kann bei irreparablen Schäden auch Apoptose induziert werden. Im Rahmen der Reparaturantwort wird der Zellzyklus gestoppt. Bei DNA-Doppelstrangbrüchen ist p53 an der Arretierung des Zellzyklus beteiligt.

I.9. Das Tumorsuppressorprotein p53 und die DNA-Reparatur

Für die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität kommt dem Tumorsuppressorgen p53 eine große Bedeutung zu. Seine Tumor hemmende Eigenschaft wird allein schon durch die Tatsache demonstriert, dass in ca. 50% aller humanen Tumore, so auch in Lebertumoren, Mutationen in p53-Allelen

nachgewiesen werden konnten (Harris, 1996; Laurent-Puig and Zucman-Rossi, 2006). Die DNA-Sequenz von p53 kann in eine N-terminale Transaktivierungsdomäne, eine DNA-Bindungsdomäne und eine C-terminale regulatorische Region eingeteilt werden. Die meisten Mutationen finden sich in der Region der DNA-Bindungsdomäne und führen z. B. zu chromosomaler Instabilität und zur Unterbrechung der DNA Schadensantwort (Hahn and Weinberg, 2002). Die tumorsuppressive Wirkung von p53 lässt sich auf die Funktion als Transkriptionsfaktor zurückführen. Es steuert die Expression einer Vielzahl von Genen. So werden u. a. Gene reguliert, welche in die Zellzykluskontrolle, Apoptose und in die Reparatur von DNA-Schäden involviert sind. Innerhalb des Zellzyklus agiert p53 u.a. als „Wächter“ am G1/S-Übergangspunkt. Als Antwort auf DNA-Schädigung initiiert p53 die Expression des Tumorsuppressorproteins p21. Das Protein p21 ist ein Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor und bindet u. a. an die Zyklin abhängige Kinase 4 (cyclin dependent kinase, Cdk4), wodurch deren Kinaseaktivität inhibiert wird. Über weitere Schritte wird der Zellzyklus dann effektiv arretiert, sodass die nötigen DNA-Reparaturprozesse stattfinden können (Abbildung I.4.). Sind die DNA Schäden irreparabel, induziert p53 die Transkription des proapoptotisch wirkenden Proteins Bax.

In normalen, ungestressten Zellen unterliegt p53 einem ständigen Ubiquitin-vermittelten mdm2-abhängigen Abbau. Es kommt nur in geringer Konzentration vor und hat eine Halbwertszeit von 15 bis 20 Minuten. Infolge von DNA-Schäden kommt es zu verschiedenen Modifikationen, wie Acetylierung und Phosphorylierung am Protein, wodurch kein Proteinabbau mehr stattfindet und somit p53 stabilisiert wird.

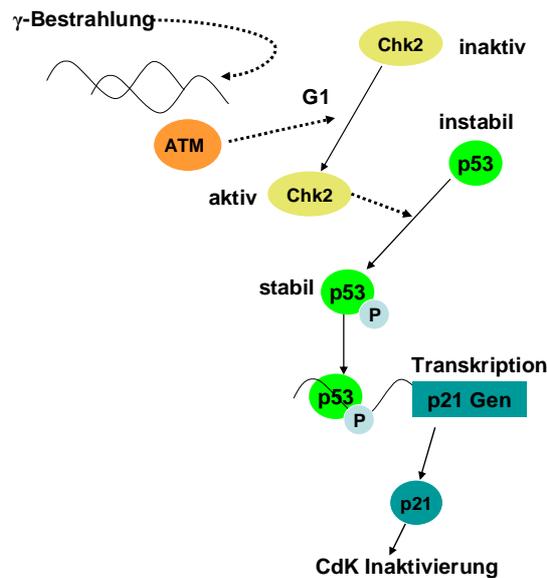


Abbildung I.4. Schematische Darstellung eines p53-induzierten Zellzyklusarrestes nach DNA-Schädigung: ATM-Kinase (Ataxia Telangiectasia Mutation) detektiert als Sensor DNA-Doppelstrangbrüche und aktiviert durch Phosphorylierung die Checkpoint Kinase 2 (Chk2), die dann p53 phosphoryliert. Das stabilisierte p53 induziert die vermehrte Transkription von p21, welches anschließend die Zyklin-abhängige Kinase 4 (CdK4) blockiert und somit zum Zellzyklusarrest führt.

Interessanterweise ähneln kurze Telomere, die nicht mehr in der Lage sind intakte Telomerkappen zu formen, DNA-Doppelstrangbrüchen. Sie lösen DNA-Reparaturmechanismen aus, denen ein p53-vermittelter Zellzyklusarrest vorangeht (Karlseder et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass das Tumorsuppressorprotein p53 eine zentrale Rolle in der Telomer-vermittelten Seneszenz spielt und somit der Status der Telomere mit dem Schutz der chromosomalen Integrität in Zusammenhang steht (d'Adda di Fagagna et al., 2003).

I.10. Telomerase-vermittelte Immortalisierung

Wie demonstriert werden konnte, sind proliferierende humane Zellen, in denen keine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden kann, empfänglich für eine Telomerase-vermittelte Immortalisierung (Bodnar et al., 1998; Klinger et al., 2006). Da Telomerase-immortalisierte Zellen viele Eigenschaften der nicht-immortalisierten Zellen beibehalten, wurden auch Telomerase-immortalisierte humane Leberzellen als Zellen für eine lebergerichtete Zelltherapie evaluiert (Nguyen et al., 2005; Zalzman et al., 2003). Die lebergerichtete Zelltherapie soll den Mangel an adäquaten Spenderlebern ausgleichen. Bis heute konnte jedoch keine solche geeignete Zelltherapie für den medizinischen Einsatz erfolgreich entwickelt werden.

Durch ektope Expression von TERT, der katalytischen Untereinheit der Telomerase, wurden fötalen Hepatozyten immortalisiert (Wege et al., 2003c). Hierdurch wurden die Telomere stabilisiert und unterlagen nicht der replikationsbedingten Verkürzung. Da die untersuchten Zellen unkompliziert in Zellkultur expandiert werden können und nach den vorliegenden Ergebnissen keine maligne Transformation per se besitzen, stellen sie ein geeignetes Modell zur Untersuchung der malignen Entartung von sich teilenden Leberzellen dar.

I. 11. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden Telomerase-immortalisierte fötale Hepatozyten hinsichtlich ihres malignen Potentials, insbesondere der zytogenetischen Stabilität und der p53 vermittelten DNA Schadensantwort, in Langzeitkultur untersucht.

Die Hepatokarzinogenese läuft vermutlich als ein mehrstufiger Prozess ab, in dem die Reaktivierung der Telomerase als ein entscheidender Schritt angesehen wird. Es ist daher von großem Interesse zu untersuchen, ob eine Reaktivierung der Telomerase in Hepatozyten per se zu einer möglichen Entartung führt.

Eine aktive Telomerase ist essentiell für die Aufrechterhaltung intakter, stabiler Telomere, welche ihrerseits zytogenetische Veränderungen verhindern. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Telomerase-immortalisierte Hepatozyten zytogenetische Veränderungen entwickeln.

Das Ziel künftiger Arbeiten ist die Etablierung der immortalisierten Hepatozyten als ein Zellkulturmodell zur Untersuchung der Hepatokarzinogenese.

Nachdem die Zellen bereits aktive Telomerase besitzen, welches als ein entscheidender Schritt in der Hepatokarzinogenese angesehen wird, ist es denkbar, durch weitere gezielte Veränderungen, z.B. die Integration von Hepatitis B Viren oder die Wirkung von chemischen Substanzen (z.B. reactive oxygen species, ROS), Malignität zu induzieren. Im Verlauf dieser Experimente könnten neue Erkenntnisse zu den molekularen Grundlagen der Hepatokarzinogenese gewonnen werden.

II. Methoden

Benötigte Puffer und Lösungen wurden entweder kommerziell erworben oder nach Rezepten aus „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 2002) angesetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die üblichen Labormaterialien oder Chemikalien verwendet.

II.1. Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von Wege et al. (Wege et al., 2003c) immortalisierte humane fötale Hepatozyten verwendet. Zu diesem Zweck wurden humane fötale Hepatozyten für ein bis zwei Wochen kultiviert und in zwei unabhängig voneinander durchgeführten retroviralen Transduktionen mit TERT, der katalytischen Untereinheit der Telomerase, immortalisiert. Anschließend wurden zwei Zellpopulationen (FHA und FHB) separat in Zellkultur propagiert. Die so gewonnenen immortalisierten Zellen wurden über längere Zeit kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten der Langzeitkultur untersucht.

Als Kontrollzellen wurden nicht-immortalisierte fötale Hepatozyten (FHC) benutzt. Weiterhin wurden die von Leberkarzinomzellen abgeleiteten Zelllinien HepG2 und HuhH7, sowie die von humanen embryonalen Nierenzellen abgeleiteten HEK-293 (Human Embryonic Kidney) und frisch isolierte humane Hepatozyten als Kontrollzellen eingesetzt. Die Gewinnung von primären humanen Hepatozyten erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. J. Petersen, I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Dandri et al., 2001).

Die immortalisierten Hepatozyten wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM-Medium; Gibco) unter Zusatz von Insulin (5 µg/ml; Sigam-Aldrich), Hydrocortison (2,4 µg/ml; Sigam-Aldrich), 10%iges hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (Gibco) sowie Penicillin (100 U/ml; Gibco), Streptomycin (100 µg/ml; Gibco) und Amphotericin B (2,5 mg/ml; Gibco) kultiviert. Das DMEM-Medium für HEK-293, HepG2 und HuH7 Zellen enthielt kein Insulin und Hydrocortison. Die Zellen wurden im Zellkulturinkubator (Heraeus, HS 12) bei 37°C, 5%iger CO₂-Atmosphäre und 95%iger relativer Luftfeuchtigkeit in 25 cm²- bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen (Sarstedt) kultiviert. Die immortalisierten Hepatozyten wachsen als Monolayer mit einer Generationszeit von 24 bis 48 Stunden. Bei 90 bis 100%iger Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 gesplittet. Dazu wurde das alte DMEM-Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (Phosphate Buffered Saline; pH 7,4; Gibco) gewaschen. Der Verdau mit 0,25% Trypsin-EDTA (Gibco) im Zellkulturinkubator wurde nach 5 Minuten durch Zugabe des Vollmediums gestoppt. Anschließend wurde die Zellzahl sowie die daraus folgend Zellteilungsrate mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer und eines Mikroskops (Leica, DMIC) bestimmt. Um einen Vorrat an Zellen zu haben, wurden regelmäßig 3 Millionen Zellen in 1 ml Gefriermedium, bestehend aus 90% fötalem Kälberserum und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich), in Flüssigstickstoff eingefroren. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten an einer sterilen Reinraumwerkbank (Heraeus, BB 16).

II.2. Überprüfung auf Mykoplasmenkontamination

Die Überprüfung auf eine mögliche Mykoplasmenkontamination erfolgte alle 3 bis 4 Monate. Hierfür wurden Zellen in eine Kunststoffpetrischale (Durchmesser 60 mm; Nunc) ausgesät und bei einer 50 bis 70%igen dichten Monolayerkultur untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen einmal mit PBS sowie einmal mit DAPI-Methanol Lösung (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid; 0,1 mg/ml; Sigma-Aldrich) gewaschen und anschließend für 15 Minuten mit der DAPI-Methanol Lösung im Zellkulturschrank inkubiert. Zuletzt wurde das Färbemittel abgegossen und mehrmals mit PBS gewaschen, bevor mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv (Carl Zeiss) mikroskopiert wurde.

Bei auftretender Mykoplasmenkontamination wurden die Zellen mit Pleuromutilin (BMC 1) und Tetrazyklin (BMC 2) Derivaten (Roche), die im oben beschriebenen Vollmedium aufgelöst wurden, behandelt. Dafür wurden die Zellen für drei Tage in BMC 1 Medium (Endkonzentration 10 µg/ml) und für vier Tage in BMC 2 Medium (Endkonzentration 5 µg/ml) kultiviert. Nach insgesamt drei Wochen wurde die Behandlung beendet und nochmals eine Überprüfung auf Mykoplasmenbefall durchgeführt.

II.3. RNA Isolierung und Reverse Transkription

RNA wurde mittels RNA Mini Kit (Qiagen) aus den Zellen extrahiert. Ein zusätzlicher Dnase-Verdau zur Eliminierung kontaminierender genomischer DNA erfolgte im Verlauf der RNA-Extraktion an Hand der Angaben des Herstellers (Qiagen). Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit der Präparation wurde die Absorption der jeweiligen RNA-Lösung bei 260 und 280 nm im Spektralphotometer (Eppendorf, BioPhotometer) ermittelt. Die

Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Absorptionsmaximum der aromatischen Pyridin- und Pyrimidinringe der Nukleinsäurebasen bei 260 nm.

Proteine zeigen aufgrund ihrer aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsspektrum bei 280 nm. Der Wert des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm (ratio) sollte bei einer kontaminationsfreien RNA-Lösung zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Integrität der RNA wurde in 1%iger Agarosegelelektrophorese überprüft (1 g Agarose [Sigma-Aldrich], 100 ml TAE-Puffer). Für die anschließende Reverse Transkription wurde zunächst 1 µg totale RNA sowie 1 µl oligo(dT)₂₀-Primer (Invitrogen) pro Ansatz eingesetzt und auf 11 µl Gesamtvolumen mit ddH₂O aufgefüllt. Nach Denaturierung für 5 Minuten bei 65°C wurden 4 µl 5xcDNA Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase OUT (40 U/µl) und 2 µl 10 mM dNTP sowie 1 µl ThermoScript RT (15 U/µl; ThermoScript RT-PCR System, Invitrogen; Thermocycler Applied Biosystems, Gene Amp PCR System 9700) hinzugefügt. Die Reverse Transkription erfolgte für 45 Minuten bei 55°C, gefolgt von der Termination für 5 Minuten bei 85°C und dem Abkühlen für 5 Minuten bei 4°C. Der hergestellten cDNA wurden 20 µl ddH₂O hinzugefügt (Endkonzentration der cDNA: 20 ng/µl).

II.4. Primeroptimierung für TERT, p53, hGAPDH

Alle Primer wurden mit dem Programm PrimerExpress der Firma Applied Biosystems entworfen. Die Spezifität der Oligonukleotidsequenzen wurde mit BLAST in einer Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kontrolliert und bestätigt.

Zur Optimierung der Primer für die PCR-Reaktionen wurden systematisch Ansätze verschiedener Konzentrationsverhältnisse des vorwärts gerichteten Primers (F) und

des rückwärts gerichteten Primers (R) ausgetestet. Zunächst wurde durch Zugabe von 20 µl Nuklease Freiem Wasser (Sigma-Aldrich) pro nmol gelieferten Primer (MWG) eine Primerlösung von 50 pmol/µl angesetzt. Anschließend wurden Verdünnungsstufen der Primer wie folgt hergestellt: 50 nM (3 µl Primerlösung + 294 µl ddH₂O), 300 nM (6 µl Primerlösung + 94 µl ddH₂O) und 900 nM (20 µl Primerlösung + 91 µl ddH₂O). Da die Annealing-Temperatur für alle Reaktionsansätze auf einer Platte konstant ist, musste eine optimale Kombination der Primerkonzentrationen für diese Temperatur gefunden werden.

Die möglichen Kombinationen der verschiedenen Primerkonzentrationen (Tabelle II.1.) wurden im Doppelansatz ausgetestet.

Primerkonzentration	50 nM F	300 nM F	900 nM F
50 nM R	X	X	X
300 nM R	X	X	X
900 nM R	X	X	X

Tabelle II.1. Kombinationen von Primerkonzentrationen in nM: *Ein optimales Verhältnis der Primerkonzentrationen ist gegeben, wenn sich keine Primer-Dimer bilden und keine Primerselbstinhibitionen stattfinden. F: vorwärts gerichteter Primer; R: rückwärts gerichteter Primer*

Ein Reaktionsansatz enthielt 10 µl SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl ddH₂O, 5 µl positive cDNA Kontrolle (20 ng/µl) und jeweils 1 µl des verdünnten F-Primers sowie 1 µl des R-Primers. Um die Bildung von Primer-Dimer auszuschließen, wurde zu jeder Primerkombination eine Negativkontrolle in Form

einer ddH₂O Probe anstelle der cDNA mitgeführt. Diese wurden im Einzelansatz gemessen.

Die Denaturierung erfolgte für 1 Minute bei 95°C, das Annealing der Primer für 1 Minute bei 60°C. Anschließend erfolgte für 1 Minute die Elongation bei 72°C. Es wurden 30 Zyklen im ABI Prism 7700 Thermal Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Optimal ist das Primerkonzentrationsverhältnis, wenn sich keine Primer-Dimer bilden und keine Primerselbstinhibition stattfinden.

II.5. Validierung der Real-Time PCR

Um die Effizienz der PCR-Bedingungen für das interne Kontrollgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (hGAPDH) und dem zu analysierenden Zielgen zu überprüfen, wurden beide im Vergleich validiert. Hiefür wurde von der zu verwendenden cDNA eine serielle Verdünnung hergestellt (20 ng/μl; 10 ng/μl; 5 ng/μl; 2 ng/μl; 1 ng/μl; 0,5 ng/μl; 0,2 ng/μl). Ein Reaktionsansatz setzte sich aus 5 μl cDNA, 10 μl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 4 μl Nuklease Freiem ddH₂O und 1 μl Primer-Probemischung zusammen. Für den Primer-Probemischung wurde die optimale Konzentration an F-Primer und R-Primer sowie der dazugehörigen Black Hole Quencher-1-3' gelabelte Hybridisierungsprobe (300 nM; MWG) eingesetzt. Im Kontrollansatz wurde die cDNA durch ddH₂O ersetzt. Das Programm des ABI Prism 7700 Thermal Cyclers war wie zuvor beschrieben. Nach Durchführung der PCR wurde das Fluoreszenzniveau bzw. die entstandene Produktmenge, in einer logarithmischen Funktion gegen die Anzahl der Zyklen dargestellt. Die Anzahl der Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert im linearen Bereich der logarithmischen Funktion überstieg, ergab den Ct-Wert. Die Differenz zwischen den Ct-Werten des Zielgenes

und des Kontrollgenes sollte in jeder betrachteten Verdünnungsstufe vergleichbar groß ausfallen ($\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Kontrollgen}}$). Durch das Auftragen des Logarithmus der eingesetzten cDNA Menge gegen die errechneten ΔCt -Werte wurde eine Standardkurve erstellt. Für eine effiziente PCR sollte der ermittelte Kurvenanstieg kleiner als 0,1 ausfallen (User Bulletin No. 2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System; Applied Biosystems).

II.6. Expressionsanalyse von TERT und p53

Die Expression von TERT und p53 wurde mittels quantitativer Real-Time PCR im ABI Prism 7700 Thermal Cycler analysiert.

Die verwendeten Konzentrationen für Primer und Hybridisierungsproben sind in Tabelle II.2. angegeben. Für einen Reaktionsansatz wurden 10 μl TaqMan Universal PCR Master Mix, 1 μl Primer/Probe Mix (20x) und 4 μl PCR ddH₂O (Gibco) sowie 5 μl (= 100 ng) cDNA eingesetzt. Der TaqMan Universal PCR Master Mix enthält die Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dGTP, dCTP und dUTP (statt dTTP). Im Verlauf der Amplifikation wird durch die Taq-DNA-Polymerase anstelle eines dTTP ein dUTP als komplementäres Desoxynukleotid zum dATP des Matrizenstranges eingebaut. Das Enzym Uracil-N-Glykolyase ist ebenfalls im TaqMan Universal PCR Master Mix enthalten. Es erkennt und katalysiert die Spaltung von dUTP in DNA. Da sich dUTP nicht in natürlich vorliegender DNA oder RT-generierter cDNA, aber immer anstelle von dTTP in PCR-Produkten vorhergehender Läufe befindet, dient AmpErase (Applied Biosystems) dem Schutz vor Kontamination durch Amplifikationsprodukte aus einem vorherigen Laufe (Carry-over Kontamination). Dies geschieht vor der Amplifikation für 2 Minuten bei 50°C. Anschließend wird die AmpErase durch Inkubation bei 95°C für 10 Minuten inaktiviert. Der erste von 40

Zyklen beginnt mit der Denaturierung (10 Sekunden bei 95°C) gefolgt vom Annealing der Primer und der Amplifikation (1 Minute bei 60°C). Zur Quantifizierung der TERT Expression wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode verwandt. Als interne Kontrolle („housekeeping gene“) wurde die Expression von hGAPDH, einem in der Glykolyse aktiven Enzym, verwendet. Hierfür wurde ein kommerziell erhältlicher TaqMan Assay (Applied Biosystems) benutzt. Für die Berechnung der relativen Expression von TERT wurde cDNA von HepG2 Leberkarzinomzellen und für die Berechnung der relativen p53-Expression wurde cDNA von HuH7 Leberkarzinomzellen mit in die Expressionsanalysen einbezogen.

Name des Gens	Sequenz Primer-Probe Set	Konz. (nM)
hTERT F	TCTACTCCTCAGGCGACAAG	300
hTERT R	CAGAAAGATGGTGGTCTCCACGA	900
hTERT P	CTCCGAGCGCCAGTCAGGCT	300
hGAPDH F	AGGGCTCGTTTTAACTCTGGTAA	300
hGAPDH R	CATGGGTGGAATCATATTGGAAC	300
hGAPDH P	TGTTGCCATCAATGACCCCTTCATTG	300
p53 F	AGACCCAGGTCCAGATGAAG	300
p53 R	CTGGTAGGTTTCTGGGAAGG	900
p53 P	AGCAGCTCCTACACCGGCGGC	300

Tabelle II.2. Verwendete Primer und Hybridisierungsproben: Die Hybridisierungssonden (P) sind am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein markiert und am 3'-Ende mit Black Hole Quencher-1 gequencht. F: vorwärts gerichteter Primer; R: rückwärts gerichteter Primer; hTERT: humane Telomerase Reverse Transkriptase (Produktlänge: 105 Basenpaare [bp]); hGAPDH: humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Produktlänge: 196 bp); p53 (Produktlänge: 144 bp)

II.7. Analyse der Telomeraseaktivität

Die relative Telomeraseaktivität (RTA) wurde mittels eines modifiziertem RQ-TRAP-Protokolls (real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol) im ABI Prism 7700 Thermal Cycler bestimmt (Wege et al., 2003b). Die Zellen werden in CHAPS Puffer (Chemicon) lysiert. Für einen RQ-TRAP-Reaktionsansatz werden 1000 extrahierte Zellen sowie 160 ng Telomerase Primer TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'; MWG) und 80 ng Anchorage Return Primer ACX (5'-GCGCGGCTTA65CCCTTACCCTTACCCTAACC-3'; MWG) (Kim and Wu, 1997) in 40 µl verdünnten SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) eingesetzt. Das in den Zellextrakten enthaltene Holoenzym Telomerase nutzt den TS Primer zur de novo-Synthese der Telomerasequenz (20 Minuten bei 25°C). Nach der Denaturierung (30 Sekunden bei 95°C) lagert sich der rückwärts gerichtete Primer ACX an das Amplicon an, um eine Amplifikation mittels Taq-Polymerase zu ermöglichen (60 Sekunden bei 60°C; 35 Zyklen). Durch die Interkalation von SYBR Green in den entstandenen Doppelstrang kann somit indirekt die Telomeraseaktivität, d. h. die Synthese von Telomerasequenz pro Zeit (Enzymaktivität), bestimmt werden. Der Verankerungsprimer ACX besitzt zwei Basenpaare, die zu Mismatches führen, sowie eine telomerunspezifische Sequenz am 5'-Ende. Dadurch lagert er sich bevorzugt am Ende des entstanden Amplifikationsproduktes an („Verankerung“) und verhindert die zunehmende Verkürzung des PCR-Produktes. Die Enzymaktivität in Telomerase-positiven Hek-293-Zellextrakten diente als relativer Standard, durch welchen der prozentuale Anteil der Telomeraseaktivität in den untersuchten Zellen im Vergleich zur Enzymaktivität in HEK-293 Zellen dargestellt wurde.

II.8. Analyse der Telomerlänge

In Kooperation mit PD Dr. med. Tim H. Brümmendorf, II. Medizinischen Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, wurde die Telomerlänge mittels Telomer-Flow-FISH, einer Kombination aus quantitativer Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) von Zellen der Interphase und Durchflusszytometrie bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Telomer-spezifische fluoreszenzmarkierte Peptidnukleinsäureoligomerproben ($5' \text{-[CCCTAA]}_n \text{-3}'$), welche an die denaturierte Telomersequenz bei geringer Ionenstärke hybridisieren, verwendet (Baerlocher et al., 2002). Die anschließend mittels Durchflusszytometrie gemessene Intensität der Fluoreszenz an den Telomeren korreliert mit der Anzahl der Wiederholungen der Telomersequenz. Die Telomerlänge wird in kb (Kilobasen) angegeben. Für die Kalibrierung wurde die Länge von Kuhthymozyten im Southern Blot bestimmt.

II.9. Zytogenetische Untersuchungen

Die zytogenetischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit Frau Dr. rer. nat. S. Fuchs, Institut für Humangenetik, und PD Dr. med. J. Dierlamm, II. Medizinischen Klinik Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, durchgeführt. Dafür wurden Hepatozyten bei ca. 70%iger Konfluenz für 2 Stunden mit einer Colchicinlösung bedeckt sowie anschließend für 15 Minuten mit einer 0,075 M KCl Lösung überschichtet und abschließend mit Methanol-Essigsäure (3:1) fixiert. Das GTG-Banding der Metaphasen-Chromosomen wurde nach Standardprotokoll in einer Auflösung von 350 bis 450 Banden durchgeführt. Die Karyotypen wurden gemäß dem International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (Schaffer and Tommerup, 2005) beschrieben.

Mittels Multicolor-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Multicolor-FISH) kann jedes einzelne Chromosom individuell mit Fluoreszenzsonden markiert werden. M-FISH wurde mit dem 24xCyte Color Kit für humane Chromosomen nach Angaben des Herstellers (MetaSystems) durchgeführt. Hierfür wurden alle Metphasenchromosomen gleichzeitig mit Fluoreszenzsonden hybridisiert. Jede Sonde ist mit einem von fünf verschiedenen Fluorochromen (DEAC, FITC, Spectrum Orange, Texas Red, Cy5) oder einer spezifischen Kombination aus mehreren Fluorochromen markiert. Als Gegenfärbung wurde 4,6-Diamino-2-Phenylindole eingesetzt. Nach der Hybridisierung wurden mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop und einer hochauflösenden gekühlten CCD-Kamera Grayscale-Bilder aufgenommen. Zuletzt wurde ein 24-Pseudocolor-Bild durch Überlagerung produziert und mittels MetaSystems-Isis-Software analysiert (MetaSystems).

II.10. Softagarassay

Zur Untersuchung des verankerungs-unabhängigen Wachstums, eines Kennzeichens von Tumorzellen, wurden Softagarassays durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 50, 500 und 5000 Zellen in 0,33%iger Agarlösung verdünnt und auf einer 0,5%igen Agarschicht in Zellkulturschalen (60 mm Durchmesser) ausgesät. Nach 15 bis 21 Tagen im Zellkulturinkubator wurde das Koloniewachstum durch mikroskopisches Auszählen ausgewertet. Alle Ansätze wurden als Triplikate durchgeführt. Maligne HepG2 und HuH7 Zellen dienten als Positivkontrollen.

II.11. Nacktmausassay

Ein weiterer Beleg für eine maligne Transformation von Zellen liefert deren Fähigkeit, nach Injektion in die Nacktmaus ein Tumorwachstum auszulösen. Die verwendeten thymusaplastischen Nacktmäuse (*nu/nu*) sind nicht in der Lage, Antikörper gegen die injizierten Zellen zu entwickeln und diese abzustößen. Dadurch entwickeln sich in Nacktmäusen aus entarteten Zellen Tumore, was in Tieren mit intaktem Immunsystem nicht möglich wäre. Das Heranwachsen von Tumoren in Nacktmäusen wird als ein Zeichen von Malignität gewertet. Es wurden 1 Million Zellen in 200 µl Vollmedium suspendiert und subkutan in die rechte und linke Flanke einer Nacktmaus gespritzt. Als Positivkontrolle wurden maligne HEK-293 Zellen benutzt. Die Tiere wurden zweimal pro Woche begutachtet. Nach ca. 2 bis 3 Wochen zeigten sich die ersten stecknadelkopfgroßen Tumore in HEK-293-gespritzten Mäusen. Der Durchmesser des Tumors wurde mittels Messschiebers bestimmt. War er größer als 1 cm, wurden die Tiere mittels Kohlendioxid getötet. Insgesamt wurden die Tiere für 15 Wochen beobachtet. Die Ergebnisse wurden fotografisch festgehalten. Die Tiere wurden von der Zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bezogen und dort unter tiergerechten Aspekten und strenger Hygieneüberwachung gehalten.

II.12. Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen

Für die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wurden kultivierte Zellen trypsiniert und bei 30%iger Konfluenz in 25 cm²-Zellkulturflaschen wieder ausgesät. Nach 24 bis 48 Stunden (ca. 70 bis 80%iger Konfluenz) wurde das Vollmedium gewechselt. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur Gamma-Strahlung (10 Gray; Conservatome, Robatel) ausgesetzt und für ca. 18 Stunden inkubiert.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde durch Zugabe von Camptothecin zum Vollmedium (Endkonzentration 4 μ M; Sigam-Aldrich) die Topoisomerase I für 48 Stunden inhibiert. Diese Behandlung induzierte ebenfalls DNA-Doppelstrangbrüche. Camptothecin wurde in DMSO aufgelöst. Das Endvolumen des Lösungsmittels DMSO im Vollmedium betrug 0,2%. Als weitere Kontrolle wurden unbehandelte Zellen eingesetzt.

II.13. Immunoblotanalyse

16 bis 18 Stunden nach Bestrahlung bzw. 48 Stunden nach Zugabe von Camptothecin wurden die Zellen mit RIPA-Puffer (radio-immunoprecipitation), welcher auch Proteinaseinhibitor (Roche) enthielt, extrahiert. Das Lysat wurde mittels einer Spritze (Öffnungsdurchmesser 20G; Braun) homogenisiert und für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (Heraeus, Biofuge A), für 10 Minuten bei 11000 rpm und 4°C, wurde der Überstand abgenommen. Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit von Pierce nach Angaben des Herstellers im Spektrophotometer (Jenway) bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die Proteinauftrennung erfolgte mittels Elektrophorese im 10%igen denaturierenden Natrium-Polyacrylamid-Gel (Bio-Rad Gelkammer). Anschließend wurden die Proteine auf 0,2 μ m Nitrozellulosemembran (Bio-Rad) im Semi-Dry-Verfahren geblottet (60 mA für 45 Minuten; Bio-Rad).

Um unspezifische Bindungsstellen abzudecken, wurde die Membran nachfolgend für eine Stunde mit 5%igem-Trockenmilch-Blockingpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Primärantikörper wurden in 5%igem-Trockenmilch-Blockingpuffer verdünnt und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert (p53 1:500; p21 1:100; gespaltene Caspase-3 1:500; Ladekontrolle Aktin 1:200; Santa Cruz Biotechnology).

Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten mit Waschpuffer wurde die Membran mit dem Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert (Verdünnung im Blockingpuffer 1:1000; Santa Cruz Biotechnology). Anschließend wurde viermal mit Waschpuffer bei Raumtemperatur für jeweils 10 Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels ECL Western Blotting Analysis System von Amersham Bioscience an Hand der Gebrauchsanleitung und abschließender Autoradiography (Kodak). Für die Quantifizierung der Bandenintensität wurden die Banden der behandelten Proben mit denen der Ladekontrolle (Aktin) ins Verhältnis gesetzt und anschließend mit den Banden der unbehandelten Kontrollen verglichen. Die densitometrische Analyse erfolgte mit dem Programm ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

II.14. Zellzyklusanalyse

16 bis 18 Stunden nach Bestrahlung und 48 Stunden nach Behandlungsbeginn mit Camptothecin wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert (Eppendorf, Centrifuge 5810R) und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden sie wieder behutsam in 0,5 ml PBS resuspendiert, bevor sie in 5 ml eiskaltem 70%igem Ethanol für mindestens 2 Stunden auf Eis fixiert wurden. Dann wurden die Zellen in 5 ml PBS für 5 Minuten rehydriert und bei 500g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 0,5 ml einer Propidium Iodidlösung (Endkonzentration 25 µg/ml PBS), die auch RNase A (500 U/ml; Sigma-Aldrich) enthielt, resuspendiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Verteilung der Zellen im Zellzyklus wurde mittels Durchflusszytometrie am FACS Canto-Durchflusszytometer (Beckton-Dickinson) analysiert. Die Bestimmung des prozentualen Anteils der S-Phase Zellen

erfolgte mit ModFit (Verity Software). Für jede Analyse wurden mindestens 500.000 Zellen gezählt.

II. 15. Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens in drei separaten Ansätzen durchgeführt und zweimal wiederholt. Die gezeigten Daten sind die Durchschnittswerte \pm Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Studenten-t-Test für unpaarige Stichproben. War der p-Wert $< 0,05$, so wurde das Ergebnis als signifikant gewertet.

III. Ergebnisse

Die Entstehung von Leberkrebs läuft vermutlich als mehrstufiger Vorgang ab, wobei die Aktivierung der Telomerase als ein früher Schritt angesehen wird. Die Entartung von Leberzellen ist bis jetzt ungenügend verstanden. Durch Reaktivierung der Telomerase mittels retroviraler TERT-Transduktion, wurden humane fötale Hepatozyten immortalisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen als ein Zellkultursystem proliferierender Hepatozyten hinsichtlich ihres onkogenen Potentials in Langzeitkultur untersucht. Neben zytogenetischen Untersuchungen sowie der Überprüfung des verankerungs-unabhängigen Wachstums als Hinweis auf eine maligne Transformation, wurde die Intaktheit des Tumorsuppressors p53 als „Wächter“ des Zellzykluses im Rahmen der DNA-Schadensantwort analysiert.

III. 1. TERT-Expression, Telomeraseaktivität und Telomerlänge

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Stabilität der TERT-Expression mit nachfolgender Telomeraseaktivität und Telomerstabilisierung in Langzeitkultur zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden immortalisierte humane fötale Hepatozyten (FHA, FHB) sowie Telomerase-negative fötale Hepatozyten (FHC) als Kontrollzellen kultiviert und analysiert. Zum weiteren Vergleich wurden Telomerase-positive Zelllinien aus hepatozellulären Karzinomen (HepG2, HuH7) in die Experimente mit einbezogen.

III.1.a. TERT-Expression

Um die Stabilität der Transduktion zu überprüfen, wurde zuerst die TERT-Expression im Verlaufe der Zellkultur untersucht. Dabei konnte in FHB Zellen nach retroviraler Transduktion mittels quantitativer Real-Time PCR ein relatives Expressionsniveau nachgewiesen werden, welches um zwei Log-Stufen über dem von TERT-positiven Leberkarzinomzelllinien HepG2 und HuH7 liegt. Dieses Expressionsniveau blieb auch im weiteren Verlauf der Langzeitkultur nach 50 bzw. 150 PD (Populationsverdopplungen), was jenseits der natürlichen replikationsbedingten Teilungsrate von maximal 40 PD liegt, stabil erhalten. Im Gegensatz dazu konnte keine TERT-Expression in nicht-immortalisierten FHC Zellen nachgewiesen werden. Als Referenz diente die TERT-Expression in Telomerase-positiven HepG2-Zellen (Expressionsniveau = 1; Tabelle III.1.). Maligne HuH7 Zellen wiesen eine relativ geringe TERT-Expressionsrate auf.

III.1.b. Relative Telomeraseaktivität (RTA)

Die Telomeraseaktivität ist von der Expression und anschließender Translation der katalytischen Untereinheit abhängig. Die Enzymaktivität wurde mittels Real-Time quantitative Telomeric-Repeat Amplification Protokoll gemessen und relativ pro μg Protein ausgedrückt. Maligne HEK-293 Zellen dienten als RTA Standard. In nicht-immortalisierten FHC PD20 Zellen konnte keine Telomeraseaktivität detektiert werden, wohingegen in immortalisierten FHB Zellen in Langzeitkultur, d. h. PD 50 und PD 150, eine RTA von 34 bzw. 160 gemessen werden konnte. In Telomerase-positiven malignen HepG2 und HuH7 konnte ebenfalls relative Telomeraseaktivität nachgewiesen werden (Tabelle III.1.).

III.1.c. Telomerlänge

In Anschluss an die Überprüfung der TERT-Expression und der daraus resultierenden Telomeraseaktivität in immortalisierten Hepatozyten, wurde die Telomerlänge mittels Telomer-Flow-FISH, einer Kombination von Quantitativer-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Durchflusszytometrie (Telomer Flow-FISH) bestimmt.

In nicht-immortalisierten Hepatozyten (FHC) kommt es zu einer Telomerverkürzung von 100 bis 150 bp pro Populationsverdoppelung (Wege et al., 2003c). Demgegenüber konnte in Langzeitkultur immortalisierter Hepatozyten, d. h. innerhalb von 50 PD, eine Stabilisierung der Telomerlänge von über 8 kb nachgewiesen werden. Der Vergleich mit nicht-immortalisierten Zellen FHC PD 20 zeigte, dass immortalisierte Hepatozyten innerhalb von 30 PD weniger als 1,5 kb an Telomerlänge verloren haben. Dieser Wert ist kleiner als die prognostizierte Telomerverkürzung von 3 bis 4,5 kb in FHC Zellen innerhalb von 30 PD.

Im Gegensatz dazu wiesen die Telomerlängen von immortalisierten Hepatozyten FHB PD 50 und PD 150 keine signifikanten Telomerverkürzungen auf (Tabelle III.1.). Außerdem wurden die Telomerlängen der malignen Zelllinien HepG2 und HuH7 gemessen. In HepG2 Zellen waren die Telomere 4,8 kb lang, während HuH7-Zellen 19,2 kb lange Telomere besaßen (Tabelle III.1.).

Zellen	TERT-Expression (TERT/GAPDH)	Telomeraseaktivität (RTA)	Telomerlänge (kb)
FHC PD 20	keine Amplifikation	0.0 ± 0.5	10.3 ± 0.8
FHB PD 50	478 (451 – 506)	34.0 ± 8.5	8.9 ± 0.4
FHB PD 150	431 (342 – 543)	160.7 ± 14.5	8.1 ± 1.1
HepG2	1	100.1 ± 12.6	4.8
HuH7	0.8 (0.6 – 1.1)	335.2 ± 9.9	19.2

Tabelle III.1. Aufrechterhaltung der Telomerlänge in immortalisierten Hepatozyten: *In immortalisierten Hepatozyten (FHB) konnte TERT-Expression und Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. Sie behielten im Verlauf der Zellkultur eine stabile Telomerlänge (kb ± Standardabweichung) bei. Nicht-immortalisierte Hepatozyten (FHC) zeigten keine TERT-Expression und Telomeraseaktivität. Hek-293-Zellextrakte dienten als Standard für die relative Telomeraseaktivität. Die TERT-Expression von malignen HepG2 Zellen wurde als Referenz festgelegt. Für HepG2 und HuH7 Zellen wurde die Telomerlänge nur einmal gemessen. RTA: Relative Telomerase Aktivität; kb: Kilobasen*

Zusammenfassend zeigen die Daten als Folge der konstitutiven ektopen TERT-Expression eine Aufrechterhaltung der Telomeraseaktivität und eine Stabilisierung der Telomere in Langzeitkultur von erfolgreich transduzierten humanen fötalen Hepatozyten.

III. 2. Entwicklung von Aneuploidien in immortalisierten Hepatozyten

III.2.a. Karyogramme

Zur Überwachung möglicher zytogenetischer Veränderungen von immortalisierten fötalen Hepatozyten im Verlauf der Langzeitkultur wurden zu verschiedenen

Replikationszeitpunkten Karyogramme ausgewertet. Als Kontrolle dienten nicht-immortalisierte Hepatozyten (FHC). Diese Zellen wiesen einen unveränderten weiblichen Karyotyp (46,XX) während der ersten Zellkulturpassagen (PD 12 bis 20) und bis zum Zeitpunkt der replikativen Seneszenz (ca. PD 30) auf (Abbildungen III.1. und III.2.). Insgesamt wurden 19 bis 21 Mitosen von FHC Zellen je untersuchten Replikationszeitpunkt analysiert. In Analogie zu den FHC Zellen konnten auch in immortalisierten Hepatozyten FHA und FHB bis zum Replikationszeitpunkt PD 50, welcher jenseits der erwarteten replikativen Seneszenz liegt, keine Veränderungen des Karyotypes festgestellt werden (Abbildungen III.1. und III.2.). Als erste zytogenetische Anomalie wurde eine Trisomie 7 in immortalisierten Hepatozyten im Klon FHA zum Zeitpunkt PD 80 und im Klon FHB nach 100 PD festgestellt. Diese Veränderung wurde in zwei voneinander unabhängig immortalisierten und kultivierten Zellpopulationen (FHA und FHB) gefunden. In FHA PD 80 Zellen wurde in 13 analysierten Mitosen Trisomie 7 als alleinige zytogenetische Anomalie detektiert. Im Gegensatz dazu wurden in FHB Zellen zum Zeitpunkt PD 100 neben Trisomie 7, die in 12 von 31 analysierten Mitosen gefunden wurde, auch andere numerische Veränderungen (u.a. Trisomie 8 und Trisomie 14) festgestellt (Abbildung III.1.). Zum Zeitpunkt PD 100 wurde außerdem eine Mitose mit einer Translokation und mehrere einzelne Mitosen mit Trisomie X sowie 18 gefunden (FHB PD 100; Abbildung III.1.).

In den FHB Zellen wurde nach weiteren 50 PD, d. h. zum Zeitpunkt PD 150, in 23 von 25 untersuchten Mitosen nur noch Trisomie 7 als alleinige numerische Veränderung detektiert. Zum Replikationszeitpunkt PD 250 (Ende des Experiments), konnte in allen untersuchten Mitosen der FHB Zellen Trisomie 7 als einzige zytogenetische Anomalie gefunden werden (Abbildung III.1.). Diese Ergebnisse

deuten darauf hin, dass die Entwicklung von Trisomie 7 während der Expansion in der Zellkultur einen selektiven Vorteil besitzt. Des Weiteren wurde in einer Population von FHA Zellen zum Zeitpunkt PD 40, was der Seneszenzphase in nicht-immortalisierten Hepatozyten entspricht, in 10 von 20 untersuchten Mitosen eine Monosomie X festgestellt.

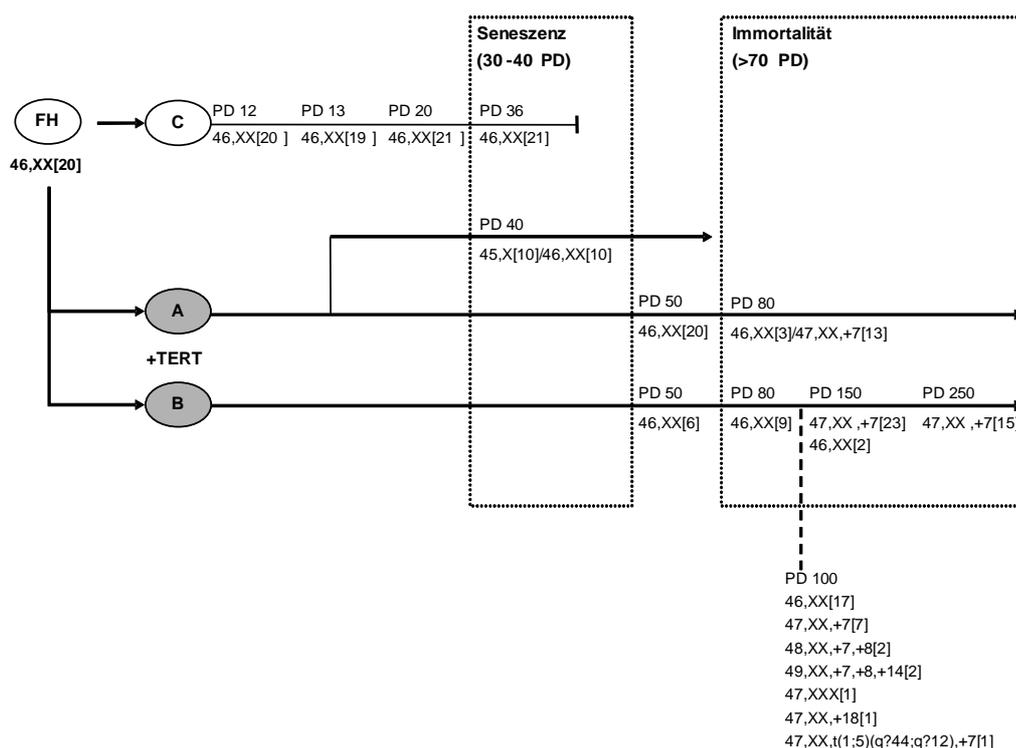


Abbildung III.1. Diagramm der verwendeten Zelllinien: Fötale Hepatozyten wurden von einem Spenderklon (FHC) abgeleitet. Nach der Immortalisierung durch Transduktion mit TERT, wurden zwei Subklone separat kultiviert (FHA und FHB). Der Karyotyp von nicht-immortalisierten fötalen Hepatozyten (FHC) und immortalisierten fötalen Hepatozyten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Populationsverdopplung analysiert (z.B. PD 50 und PD 250 Ende des Experiments). Die Anzahl der untersuchten Mitosen wurde in eckigen Klammern angegeben.

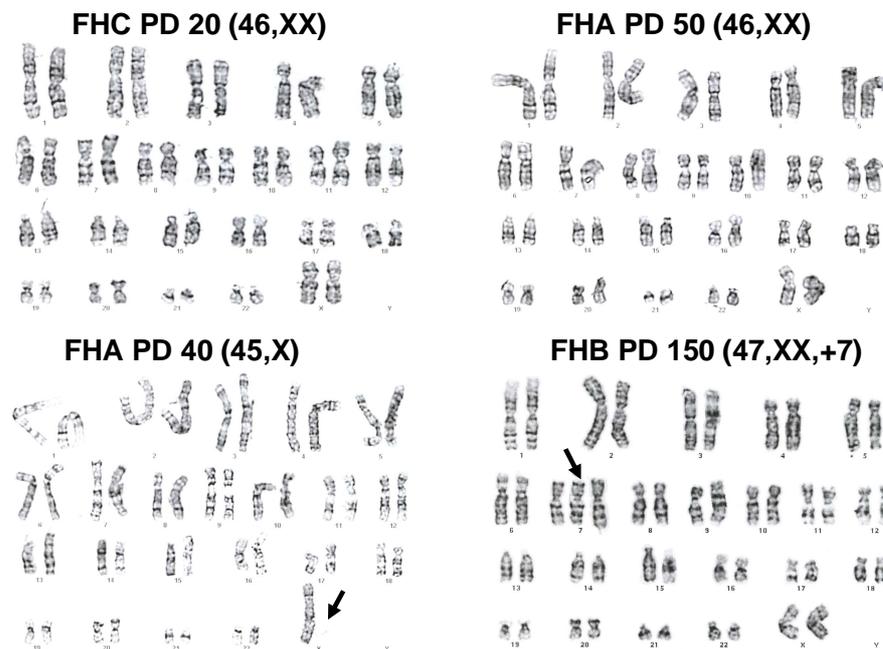


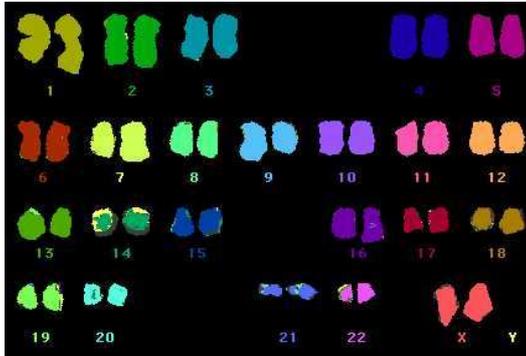
Abbildung III.2. Repräsentative Bilder von Analysen des Karyotyps nicht-immortalisierter und immortalisierter Hepatozyten: Zu sehen sind unveränderte Karyotypen von nicht-immortalisierten Hepatozyten (FHC) sowie vom immortalisiertem Klon FHA PD 50. Numerische Veränderungen des Karyotyps (Pfeile) finden sich u.a. in den immortalisierten Klonen FHA PD 40 (Monosomie X) und FHB PD 150 (Trisomie 7).

III. 2. b. Multicolor-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (M-FISH)

Zur Untersuchung weiterer struktureller chromosomaler Veränderungen, wie zum Beispiel Translokationen und Inversionen, wurden zusätzlich M-FISH Analysen durchgeführt. Nicht-immortalisierte humane fötale Hepatozyten (FHC PD 20) wurden als Kontrolle verwandt. Die untersuchten 31 Mitosen zeigten einen normalen weiblichen Karyotyp ohne strukturelle Veränderungen. Mittels M-FISH konnte ebenfalls eine Trisomie 7 in Langzeitkultur immortalisierter humaner Hepatozyten (FHB PD 100, 40 untersucht Mitosen) identifiziert werden, was die Ergebnisse der Karyogramme nochmals bestätigt. Es konnten keine zusätzlichen strukturellen

Veränderungen in Langzeitkultur immortalisierter Hepatozyten gefunden werden (Abbildung III.3.).

FHC PD 20 (46,XX)



FHB PD 150 (47,XX,+7)

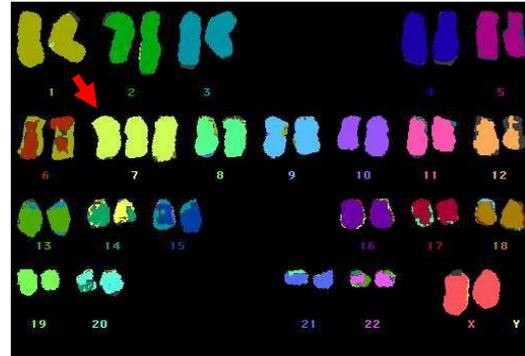


Abbildung III.3. Repräsentative M-FISH-Bilder von nicht-immortalisierten und immortalisierten Hepatozyten: Sowohl nicht-immortalisierte Hepatozyten (FHC PD 20) als auch immortalisierte Hepatozyten in Langzeitkultur (FHB PD 150) zeigen keine strukturellen chromosomalen Veränderungen. Die numerische Aberration (Trisomie 7) im Klon FHB PD 150 wurde schon in der Karyotypanalyse detektiert und konnte durch M-FISH bestätigt werden (roter Pfeil).

Zusammenfassend zeigen die zytogenetischen Untersuchungen die Entwicklung einer Aneuploidie (Trisomie 7) in Telomerase-immortalisierten humanen fötalen Hepatozyten in Langzeitkultur. Neben diesen numerischen Veränderungen wurden keine strukturellen Anomalien festgestellt.

III. 3. Softagarassay

Um eine potentielle Onkogenität der immortalisierten Hepatozyten (FHA, FHB), mit oder ohne Aneuploidie (Trisomie 7, Monosomie X), zu evaluieren, wurde das verankerungs-unabhängige Wachstum in Langzeitkultur untersucht. Das Wachstumsverhalten auf Softagar ist ein etablierter *in vitro*-Indikator für Malignität. Wie erwartet, zeigten immortalisierte Hepatozyten ohne numerische Veränderungen des Karyotyps keine Proliferationsfähigkeit auf Softagar (FHA PD 50, FHA PD 80, FHB PD 80). Für immortalisierte Hepatozyten mit numerischer Veränderung FHA PD 40 (Monosomie X) sowie FHB PD 150 und PD 250 (Trisomie 7) konnte ebenfalls keine Koloniebildung beobachtet werden. Da der Subklon FHB PD 100 mit Trisomie 8 nicht in Langzeitkultur expandierte, konnte er auch nicht im Softagarassay analysiert werden. Nicht-immortalisierte Hepatozyten (FHC PD 20) zeigten ebenfalls kein verankerungs-unabhängiges Wachstum. Als Positivkontrolle wurde die Koloniebildung von malignen HepG2 und HuH7 Zellen, welche mit der Anzahl der ausgesäten Zellen korreliert, ausgewertet (Tabelle III.2.).

	Anzahl ausgesäter Zellen		
	5000	500	50
Kontrollzellen			
HepG2	28 ± 5.7	6 ± 4.9	1 ± 1.0
HuH7	245 ± 2.5	38 ± 2.5	6 ± 1.0
FHC PD 20 (46,XX)	0	0	0
Normaler Karyotyp			
FHA PD 50 (46,XX)	0	0	0
FHA PD 80 (46,XX)	0	0	0
FHB PD 80 (46,XX)	0	0	0
Veränderter Karyotyp			
FHA PD 40 (45,X)	0	0	0
FHB PD 150 (47,XX+7)	0	0	0
FHB PD 250 (47,XX+7)	0	0	0

Tabelle III.2. Softagarassay: Nicht-immortalisierte Hepatozyten (FHC) und immortalisierte Hepatozyten (FHA, FHB), mit oder ohne Veränderungen des Karyotyps, weisen kein verankerungs-unabhängiges Wachstum, als Zeichen von Malignität, auf. Die Zellen wurden auf Softagar ausgesät und drei Wochen lang kultiviert. Maligne HepG2 und HuH7 Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet (Kolonieanzahl ± Standardabweichung).

III. 4. Nacktmausassay

Das *in vivo*-Wachstum von Zellen in immundefizienten Nacktmäusen ist ein weiterer Hinweis auf Onkogenität. Für diesen Test wurden immortalisierte FHB PD 80 Zellen (46,XX) subkutan in immundefiziente Nacktmäuse, welche keinen Thymus und keine T-Zellen besitzen, gespritzt. Auch nach mehreren Monaten konnte kein Zellwachstum als Kennzeichen von Onkogenität festgestellt werden. Als Positivkontrolle zeigten 4 von 5 (80%) mit malignen HEK-293 gespritzte Nacktmäuse nach 2 bis 3 Wochen eine Tumorbildung.

III. 5. p53-Expression

Es wurde die p53-Expression innerhalb eines Klons immortalisierter Hepatozyten (FHA, FHB) verglichen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem p53-Expressionsniveau von immortalisierten Hepatozyten, mit oder ohne numerische Veränderungen, festgestellt werden. Dies gilt sowohl für die immortalisierten Hepatozyten Klon FHA (FHA PD 40; Monosomie X versus FHA PD 50; unverändert), als auch für den immortalisierten Hepatozyten Klon FHB (FHB PD 150; Trisomie 7 versus FHB PD 80; unverändert). Das p53-Expressionsniveau in frisch isolierten, primären Hepatozyten war vergleichbar. Im Gegensatz dazu wurde in Leberkrebszellen (HuH7) eine dreifach höhere p53-Expression detektiert (Abbildung III.4.).

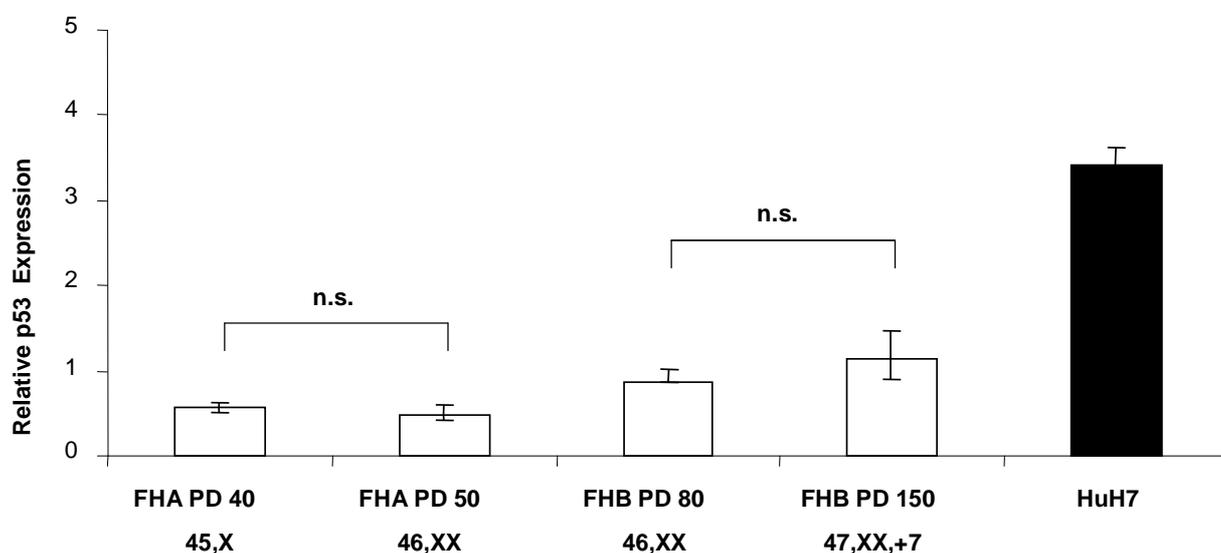


Abbildung III.4. Relatives Expressionsniveau von p53: Das relative p53-Expressionsniveau war, unabhängig von karyotypischen Veränderungen, für alle immortalisierte Hepatozyten (FHA, FHB) ähnlich. Es konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden. In Leberkrebszellen (HuH7) wurde hingegen eine dreifach höhere p53-Expression detektiert; (n.s.: nicht signifikant).

III. 6. p53-induzierter Zellzyklusarrestes nach DNA-Schädigung

III. 6. a. Immunoblot

Im Rahmen der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden wird p53 stabilisiert und induziert nachfolgend die p21-Expression. Die funktionelle Integrität dieser Signalübertragung wurde in nicht-immortalisierten (FHC) und immortalisierten Hepatozyten (FHA, FHB) mit normalem oder verändertem Karyotyp untersucht. Dabei wurden DNA-Doppelstrangbrüche mittels Gamma-Bestrahlung (10 Gray) induziert. Zusätzlich wurde in einer separaten Gruppe von Experimenten Camptothecin, ein reversibler Inhibitor der Topoisomerase I, welcher Strangbrüche an der Replikationsgabel hervorruft, eingesetzt. In nicht-immortalisierten Hepatozyten (FHC PD 20) kam es, wie erwartet, nach Bestrahlung oder Camptothecinbehandlung zu einem stabilen p53-Signal und einer vermehrten p21-Expression. Als zweite Kontrollgruppe wurden primäre humane Hepatozyten, die frisch aus einer adulten Leber isoliert worden waren, bestrahlt. Auch hier konnte nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen eine stabile p53-Expression im Immunoblot nachgewiesen werden.

Sowohl Gamma-Bestrahlung als auch Behandlung mit Camptothecin induzierte in immortalisierten Hepatozyten mit unveränderten Karyotyp (FHA PD 50 und FHB PD 80) eine Stabilisierung von p53 sowie eine vermehrte p21-Expression.

Des Weiteren wurden immortalisierte Hepatozyten mit erworbener Trisomie 7 nach 150 PD in Langzeitkultur evaluiert (FHB PD 150). Bestrahlung und Behandlung mit Camptothecin führten ebenfalls zu einer p53-Stabilisierung und zu vermehrter p21-Expression, die im Immunoblot gezeigt werden konnte. In dieser Hinsicht konnte

kein Unterschied zu immortalisierten Hepatozyten mit unverändertem Karyotyp (FHB PD 80) festgestellt werden (Abbildung III.5.).

Weiterhin wurden die Immunoblotergebnisse der p53-Expression mittels Densitometrie quantifiziert.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigten die Densitometrieergebnisse ebenfalls einen starken Anstieg der p53-Konzentration nach Behandlung mit Camptothecin. Die Erhöhung der p53-Konzentration war geringer, wenn die DNA mittels Bestrahlung geschädigt wurde. (Abbildung III.6.).

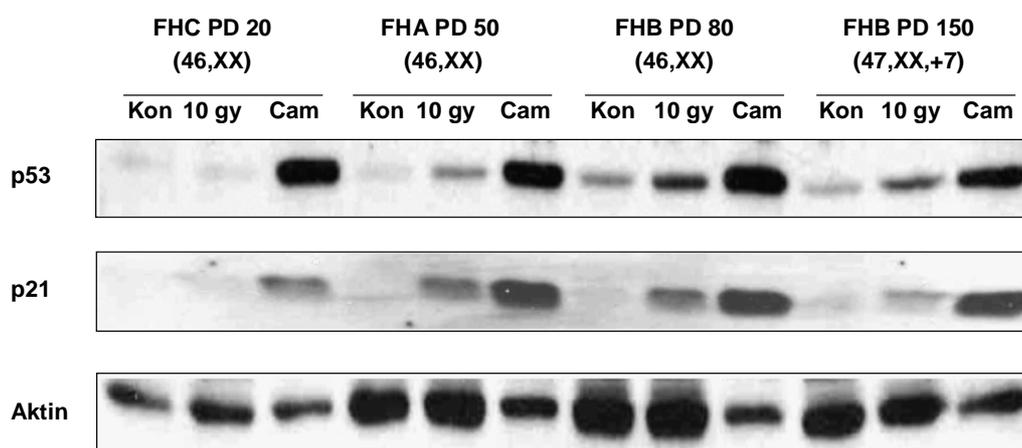


Abbildung III.5. Immunoblotergebnisse: Nicht-immortalisierte (FHC) und immortalisierte Hepatozyten (FHA, FHB) wurden bestrahlt oder mit Camptothecin behandelt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte ein starkes p53-Signal und eine erhöhte p21-Expression für alle mit Camptothecin behandelten Hepatozyten im Immunoblot detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse konnten auch nach Bestrahlung festgestellt werden; jedoch war die p53-Konzentration und die p21-Expression nicht so stark erhöht wie bei den mit Camptothecin behandelten Hepatozyten. Bezüglich der p53-Konzentration und der p21-Expression nach Bestrahlung oder Behandlung mit Camptothecin konnte kein Unterschied zwischen immortalisierten Hepatozyten mit oder ohne verändertem (Trisomie 7) Karyotyp festgestellt werden. (Kon: unbehandelte Kontrolle; Cam: Camptothecin behandelte; 10 gy: 10 Gray bestrahlt).

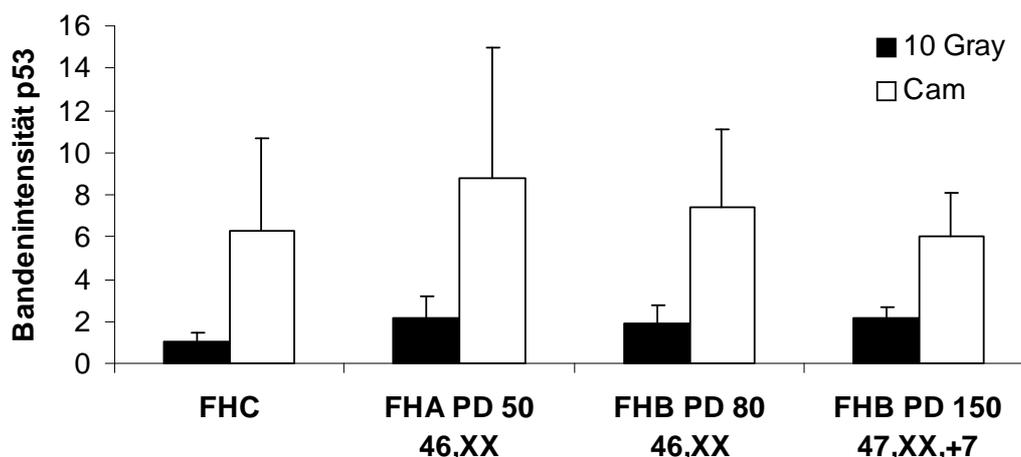


Abbildung III.6. Densitometrieanalyse der p53-Banden des Immunoblots: Die p53-Banden der bestrahlten (10 Gray) oder mit Camptothecin behandelten Proben (Cam) wurden mit den jeweiligen Aktinbanden ins Verhältnis gesetzt und mit den Banden der unbehandelten Kontrollen verglichen. Im Gegensatz zur Bestrahlung induzierte die Camptothecinbehandlung eine stärkere Stabilisierung von p53 im Rahmen der DNA-Reparaturantwort.

III. 6. b. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die funktionelle Intaktheit der nachgelagerten („downstream“) Ziele von p53 im Rahmen der Reparaturantwort überprüft. Dabei wurde Propidium Iodid als DNA-Färbemittel eingesetzt und die Zellzyklusprofile nach DNA-Schädigung durch Bestrahlung oder Camptothecinbehandlung analysiert (Abbildung III.7.).

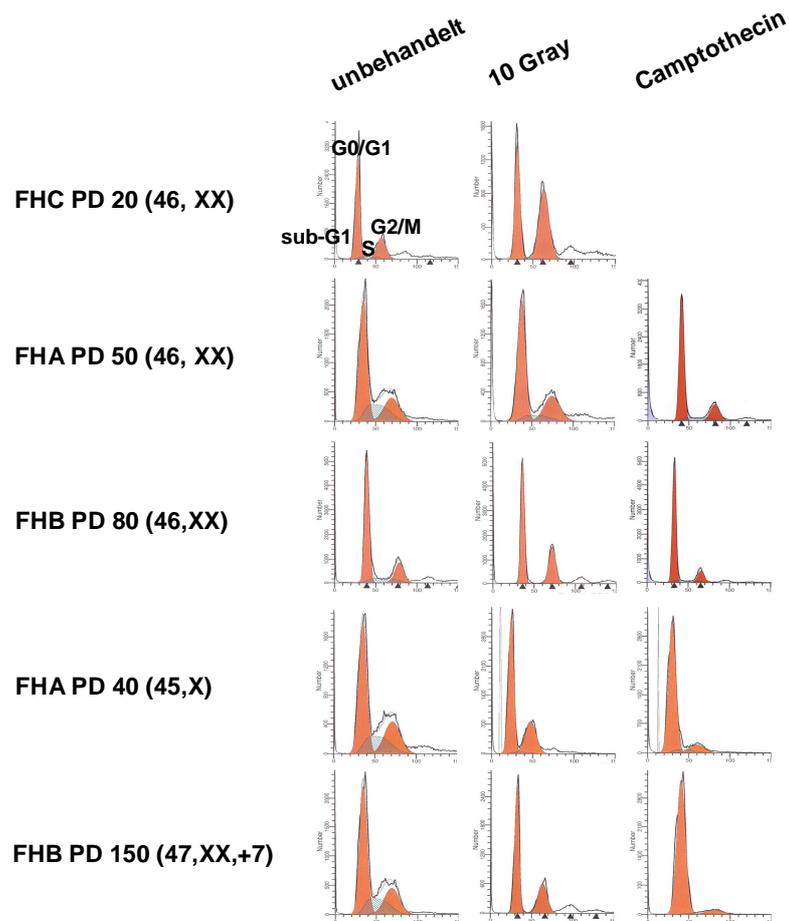


Abbildung III.7. Repräsentative Histogramme nach der Auswertung mit ModFit: *In nicht-immortalisierten (FHC) und immortalisierten Hepatozyten (FHA, FHB) wurden durch Bestrahlung (10 Gray) oder Camptothecinbehandlung (Camp) DNA-Doppelstrangbrüche induziert, welche im Rahmen der Reparaturantwort zu einem G1/S Zellzyklusarrest führten. Das Zellzyklusprofil einer unbehandelten Probe besteht aus der G0/G1 Zellfraktion, dem Anteil der S-Phase Zellen und der folgenden G2/M Zellfraktion (von links nach rechts). Apoptotische Zellen würden als so genannter sub G1-peak vor der G0/G1Zellfraktion im Zellzyklusprofil zu finden sein. In behandelten Proben befinden sich mehr Zellen in der G0/G1Phase und weniger Zellen in der S- und G2/M Phase. Dabei konnte kein Unterschied zwischen immortalisierten Hepatozyten mit unverändertem oder verändertem (Monosomie X, Trisomie 7) Karyotyp festgestellt werden.*

Es konnte ein Zellzyklusarrest mit reduzierter S-Phasen-Fraktion in immortalisierten Hepatozyten festgestellt werden. Dies betraf sowohl Zellen mit unverändertem Karyotyp (FHA PD 50 und FHB PD 80) als auch Zellen mit numerischen Veränderungen (FHA PD 40, Monosomie X; FHB PD 150, Trisomie 7) (Abbildung III.7.). Durch Analyse der Zellzyklus Histogramme mittels ModFit, wurde der prozentuale Anteil an Zellen in der S-Phase bestimmt. Nach Bestrahlung konnte eine signifikante Reduktion der immortalisierten Zellen ohne veränderten Karyotyp (FHA PD 50 und FHB PD 80) in der S-Phase gezeigt werden. Für immortalisierte Hepatozyten mit numerisch veränderten Karyotyp konnte eine vergleichbare Verringerung der Zellen in der S-Phase nach Bestrahlung festgestellt werden (FHA PD40, Monosomie X; FHB PD 150, Trisomie 7) (Abbildung III.8.).

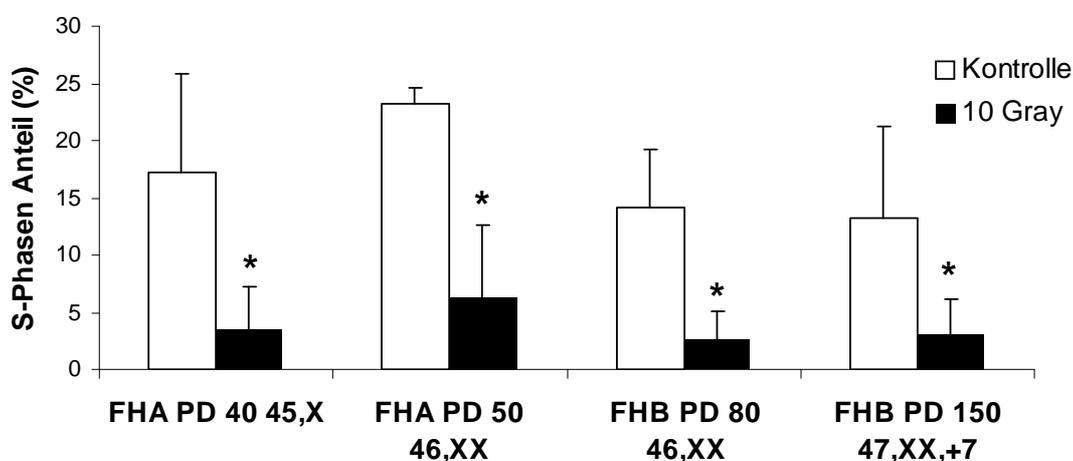


Abbildung III.8. Statistische Auswertung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach Bestrahlung: Die statistische Auswertung der ModFit-Daten zeigte eine signifikante Abnahme (* $p < 0,05$) der immortalisierten Hepatozyten (FHA, FHB) in der S-Phase nach Bestrahlung (10 Gray) im Vergleich mit unbestrahlten Zellen. Dies konnte für immortalisierte Hepatozyten mit numerischen Veränderungen des Karyotypes (FHA PD 40; Monosomie X; FHB PD 150; Trisomie 7) und ebenso für immortalisierte Hepatozyten ohne karyotypische Veränderungen (FHA PD 50; FHB PD 80) gezeigt werden.

Im Weiteren wurde überprüft, ob die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels Bestrahlung oder Camptothecinbehandlung proapoptotisch auf die Zellen wirkt. Sowohl im Rahmen des bax-vermittelten (mitochondrialer Weg) als auch im Verlauf des Fas/CD95 übertragenden Apoptosesignalweges wird die lysosomale Proteinase Caspase-3 als Effektorcaspase durch Spaltung aktiviert. Die gespaltene Form der Caspase-3 ist also ein Hinweis auf Apoptoseaktivität in den Zellen. Im Immunoblot von Zelllysaten bestrahlter und mit Camptothecin behandelte immortalisierter Hepatozyten (FHA, FHB) konnte keine gespaltene Form der Caspase-3 detektiert werden (Abbildung III.9.). Im Rahmen der Apoptose kommt es auch zur Kondensation der DNA, welche sich in der Durchflusszytometrie nach Färbung von fixierten und RNase-behandelten Zellen mit Propidium Iodid detektieren lässt. Der hohe, kondensierte DNA-Gehalt würde im Histogramm als sogenannter sub G1-peak kurz vor der G0/G1 Zellfraktion zu erkennen sein. In den Histogrammen der Durchflusszytometrie von bestrahlten oder mit Camptothecin behandelten immortalisierten Hepatozyten konnte kein sub G1-peak als Hinweis auf Apoptoseaktivität in immortalisierten Hepatozyten gefunden werden (Abbildung III.7.).

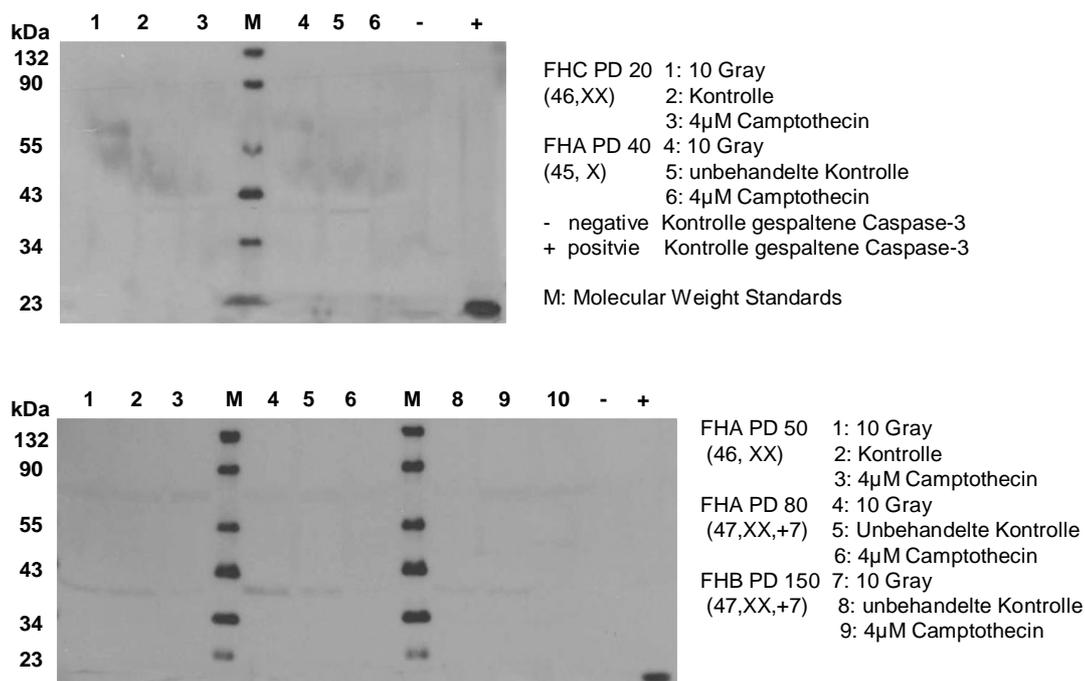


Abbildung III.9. Immunoblotergebnisse von nicht-immortalisierten Hepatozyten und immortalisierten Hepatozyten nach Bestrahlung oder Camptothecinbehandlung: *In bestrahlten (10 Gray) oder mit Camptothecin behandelten nicht-immortalisierten (FHC) und immortalisierten Hepatozyten (FHA, FHB) konnte keine aktive gespaltene Caspase-3 (ca. 14 bis 21 kDa) als Hinweis auf Apoptose nachgewiesen werden (kDa: Kilo Dalton).*

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Anschluss an die Bestrahlung oder Camptothecinbehandlung eine intakte DNA-Schadensantwort via p53 Stabilisierung und p21-Expression mit anschließendem Zellzyklusarrest in Telomerase-immortalisierten humanen fötalen Hepatozyten abläuft. Die ungestörte DNA-Schadensantwort konnte auch für immortalisierte Hepatozyten, die im Verlauf der Langzeitkultur (PD 150) den Karyotyp veränderten (Trisomie 7), gezeigt werden.

IV. Diskussion

IV. 1. Immortalisierung von Hepatozyten

Wie bereits demonstriert wurde, führt die Rekonstitution der Telomerase via Transduktion mit TERT zu einem unbegrenzten Teilungspotential menschlicher Zellen. Bodnar et al. zeigten 1998 als eine der ersten Gruppen, dass die Verlängerung der „Lebenserwartung“ von humanen epithelialen Zellen durch Transduktion mit der katalytischen Untereinheit der Telomerase TERT möglich ist. Die Zellen überschritten die normale Teilungsrate um bis zu 20 Populationsverdoppelungen. Die Reaktivierung der Telomeraseaktivität hatte keine Veränderungen des Karyotypes innerhalb des untersuchten Zellkulturzeit zur Folge (Bodnar et al., 1998). In den darauf folgenden Jahren wurden mehrere humane Zellen durch die Reaktivierung der Telomeraseaktivität immortalisiert. Beispiele hierfür sind Fibroblasten (Morales et al., 1999; O'Hare et al., 2001; Taylor et al., 2004), endotheliale Zellen (Yang et al., 1999), Keratinozyten (Dickson et al., 2000), T-Zellen (Luiten et al., 2003), Skelettmuskelzellen (Wootton et al., 2003), und glatte Muskelzellen (Klinger et al., 2006), sowie mesenchymale Stammzellen (Serakinci et al., 2004).

Die in dieser Arbeit untersuchten humanen fötalen Hepatozyten wurden 2003 von Wege et al. durch retrovirale Transduktion mit TERT immortalisiert wurden (Wege et al., 2003c). Die immortalisierten Hepatozyten behalten während der Proliferation in Zellkultur typische Funktionen von Leberzellen, z.B. Synthese von Glykogen, Aktivität von Glucose-6-Phosphatase und Synthese von Albumin, bei (Wege et al., 2003c).

Im Gegensatz dazu nutzten Totsugawa et al. induzierbare Cre-Rekombinase, um primäre Hepatozyten konditionell zu immortalisieren (Totsugawa et al., 2007).

Hierfür wurde ein retroviraler Vektor mit TERT und loxP Sites verwendet, der EGFP als Marker besitzt. Somit konnte durch Zugabe von Tamoxifen die Cre/Rekombinase aktiviert und TERT sowie EGFP entfernt werden. Die so reversibel immortalisierten primären Hepatozyten proliferierten, im Gegensatz zu den immortalisierten fötalen Hepatozyten, nicht mehr und waren in der G0 Phase des Zellzyklus arretiert.

Nguyen et al. nutzten ebenfalls induzierbare Cre/Rekombinase, um primäre Hepatozyten konditionell zu immortalisieren. In diesem Fall wurde ein lentiviraler Vektor, welcher lox/P Sites, hTERT und SV40T Antigen besitzt, genutzt, um primäre Hepatozyten zu immortalisiert (Nguyen et al., 2005). Die immortalisierten primären Hepatozyten proliferierten über längere Zeit und zeigten, ebenso wie die hier untersuchten immortalisierten fötalen Hepatozyten, keine Anzeichen von Malignität.

Die in dieser Arbeit untersuchten immortalisierten humanen fötalen Hepatozyten wurden auch hinsichtlich der Stabilität ihrer TERT-Expression sowie der nachfolgenden Telomeraseaktivität und Telomerstabilisierung in Langzeitkultur überprüft. Als Kontrolle dienten maligne HepG2, HuH7 und HEK-293 Zellen, in denen TERT-Expression vorlag und Telomeraseaktivität vorhanden ist.

In immortalisierten Hepatozyten konnte eine relative TERT-Expression nachgewiesen werden, die um zwei Logstufen über der von TERT-positiven HepG2 und HuH7 Zellen liegt. Im Gegensatz dazu ist die relative Telomeraseaktivität der immortalisierten Hepatozyten aber nur vergleichbar mit bzw. geringer als die relative Telomeraseaktivität maligner HepG2 und HuH7 Zellen. Eine mögliche Erklärung hierfür, wäre die, dass neben der katalytischen Untereinheit auch noch andere Faktoren, wie z.B. die essentielle RNA-Komponente TERC, für die

Telomeraseaktivität notwendig sind. Es ist also denkbar, dass TERT relativ stark exprimiert wird, die Enzymaktivität aber aufgrund der geringeren Menge an TERC nicht so stark ist. Im Rahmen der Arbeit wurde dieser mögliche Zusammenhang nicht genauer untersucht.

Die Differenzen der Telomerlängen könnten ein Hinweis dafür sein, dass verschiedene Zellen unterschiedlich lange Telomere benötigen, um stabile Chromosomenenden aufrechterhalten zu können. In malignen HepG2 Zellen würden hierfür relativ kurze Telomere ausreichen (4.8 kb), während immortalisierte Hepatozyten FHB PD 50 (8,9 kb) sowie FHB PD 150 (8,1 kb) und besonders maligne HuH7 Zellen (19.2 kb) wesentlich längere Telomere für die Aufrechterhaltung stabiler Chromosomenenden benötigen würden.

IV.2. Telomerase und Krebs

Obwohl in vielen humanen Krebszellen TERT-Expression und Telomeraseaktivität nachgewiesen werden konnten (Shay and Bacchetti, 1997), wird die alleinige Wiederherstellung der Telomeraseaktivität nicht als ausreichend für einen onkogenen Entartungsprozess angesehen (Harley, 2002).

Verschiedene Gruppen haben beschrieben, dass TERT-immortalisierte Zellen, einschließlich Fibroblasten, endotheliale Zellen, Skelettmuskelzellen und glatte Muskelzellen, einen normalen Phänotyp besitzen und keine Wachstumseigenschaften von präneoplastischen oder neoplastischen Zellen entwickeln (Jiang et al., 1999; Morales et al., 1999). Andererseits gibt es zunehmend Hinweise dafür, dass durch eine TERT-vermittelte Immortalisierung und dem daraus folgenden unbegrenzten Teilungspotential sowie der anhaltenden Expansion in Zellkultur, Subklone mit malignem Potential auftreten können (Milyavsky et al., 2003; Mondello et al., 2003;

Noble et al., 2004; Serakinci et al., 2004). Überdies identifizierten einige Forscher die Aktivierung der Telomerase als ein frühes Ereignis innerhalb der Leberkrebsentstehung (Hytioglou et al., 1998; Oh et al., 2003).

Zur Abschätzung von zytogenetischen Veränderungen in Langzeitkultur sowie der Anfälligkeit für onkogene Transformation, wurden die in dieser Arbeit verwendeten, TERT-transduzierten humanen fötalen Hepatozyten, auf chromosomale Intaktheit und funktionelle Wachstumskontrolle als Antwort auf eine DNA-Schädigung in Langzeitkultur untersucht.

IV.3. Zytogenetische Veränderungen in immortalisierten Zellen

In Übereinstimmung mit Ergebnissen in Telomerase-immortalisierten humanen Fibroblasten (Morales et al., 1999) sowie Skelettmuskelzellen (Wootton et al., 2003) konnten in zytogenetischen Untersuchungen der hier untersuchten Telomerase-immortalisierten Hepatozyten ein stabiler Karyotyp (46,XX) in Zellkultur bis zu 50 PD festgestellt werden. Lediglich eine Subpopulation von Telomerase-immortalisierten Zellen wurde mit Monosomie X detektiert (FHA PD 40), zeigte aber kein verankerungs-unabhängiges Wachstum, als ein Zeichen von Malignität. Wie schon berichtet wurde, erfolgt der Verlust eines Geschlechtschromosoms regelmäßig in alternden Zellen (Leach et al., 2004). Daher könnte es sein, dass Monosomie X in den hier untersuchten Zellen nicht mit der Telomerstabilisierung in Zusammenhang steht. In einer neuen Studie wurden von acht älteren Patienten (47 bis 85 Jahre) glatte Gefäßmuskelzellen isoliert und Telomerase-immortalisiert. Es konnte festgestellt werden, dass der Verlust des Geschlechtschromosoms mit geringerer Häufigkeit in immortalisierten Zellen als in nicht-immortalisierten Zellen

auftrat (Klinger et al., 2006). Nach dem jetzigen Kenntnisstand spielt Monosomie X in der Entwicklung von Leberkrebs keine Rolle.

Zum späteren Zeitpunkt der Langzeitkultur (PD 80) wurde mittels G-Banding eine Trisomie 7 als führende karyotypische Veränderung in zwei unabhängig voneinander immortalisierten und untersuchten Klonen (FHA und FHB) gefunden. Diese Aberration konnte auch durch den Einsatz von M-FISH bestätigt werden. Weitere strukturelle Veränderungen konnten nicht festgestellt werden. Zusätzlich zur Trisomie 7 konnte Trisomie 8 in 4 von 31 untersuchten Mitosen zum Zeitpunkt PD100 festgestellt werden. Trisomie 8 war zu den späteren Zeitpunkten PD 150 und PD 250 nicht mehr detektierbar. Interessanterweise konnte eine Studie nachweisen, dass eine Verkürzung der Telomere in humanen Leberkrebszellen mit dem verstärkten Auftreten zusätzlicher Kopien des Chromosoms 8 korreliert (Plentz et al., 2005). Das Auftreten von karyotypischen Veränderungen in den untersuchten Telomerase-immortalisierten Hepatozyten während der Langzeitkultur konnte auch in anderen Telomerase-immortalisierten humanen Zellen gezeigt werden (Klinger et al., 2006; Mondello et al., 2003; Rao et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Stabilisierung der Telomere alleine noch nicht ausreicht, um zytogenetische Veränderungen im Verlauf einer Langzeitkultur zu verhindern. Trotzdem scheinen zytogenetische Veränderungen, im speziellen Aneuploidien, häufiger aufzutreten, wenn adulte Zellen mittels Telomeraseaktivierung immortalisiert werden. So wurden, z. B. humane epitheliale Brustdrüsenzellen von adulten Spendern mittels TERT-Transduktion immortalisiert und entwickelten später komplexe Veränderungen des Karyotypes, z.B. Trisomie 5, 20, 1q und 8q (Rao et al., 2006).

Des Weiteren wurde in einer Studie mit TERT-immortalisierten adulten Epithelzellen der Speiseröhre die Entwicklung komplexer struktureller Karyotypveränderungen im Verlaufe der Zellkultur beschrieben (Zhang et al., 2006). Ferner wurde bei TERT-immortalisierten Fibroblasten von Hundertjährigen die Entstehung von numerischen und anschließenden strukturellen Veränderungen des Karyotypes sowie das Auftreten von verankerungs-unabhängigem Wachstum, einem Kennzeichen von Malignität, festgestellt (Mondello et al., 2003).

Wie bereits erwähnt, war die hauptsächliche Veränderung, welche in den immortalisierten Hepatozyten beobachtet wurde, die Entwicklung einer Trisomie 7. Obwohl der Zugewinn einer zusätzlichen Kopie des Chromosoms 7 in vielen epithelialen Tumorzellen beschrieben wurde, ist die Trisomie 7 als alleinige chromosomale Veränderung nicht ausreichend, um einen malignen Phänotyp hervorzubringen (Johansson et al., 1993).

In den durchgeführten Experimenten zeigten Zellen mit einer Trisomie 7 kein verankerungs-unabhängiges Wachstum, was ein Kennzeichen von Krebszellen wäre. Möglicherweise steht die Entwicklung der Trisomie 7 mit der ursprünglichen Primärkultur fötaler Hepatozyten in Zusammenhang oder ist auf eine zufällige spontane Entwicklung zurückzuführen. Die Ergebnisse deuten nicht auf einen direkten Zusammenhang zwischen erhöhter Telomeraseaktivität oder Stabilisierung der Telomere in immortalisierten Hepatozyten und den gefundenen zytogenetischen Veränderungen hin.

In der hier vorliegenden Arbeit endete der Untersuchungszeitraum bei 250 Populationsverdoppelungen. Gegenwärtig ist noch unklar, ob eine fortgesetzte Zellkultur, zu spontanen zytogenetischen Veränderungen mit maligner Proliferation führen kann.

IV.4. Das Tumorsuppressorgen p53

In vielen humanen Tumoren konnten Mutationen in Allelen des Tumorsuppressorgens p53 nachgewiesen werden (Harris, 1996). Dies führt häufig zum Verlust der tumorsuppressiven Eigenschaft, welcher unter anderem auch in Lebertumoren (Laurent-Puig and Zucman-Rossi, 2006) belegt werden konnte. Die Tumor hemmende Wirkung von p53 lässt sich auf seine Funktion als Transkriptionsfaktor zurückführen. p53 reguliert u. a. die Expression von Genen, welche in die Zellzykluskontrolle, Apoptose und in die Reparatur von DNA-Schäden involviert sind. Innerhalb des Zellzykluses agiert p53 als „Wächter“ am G1/S-Übergangspunkt. Das relative p53-Expressionsniveau von immortalisierten fötalen Hepatozyten, mit oder ohne Veränderungen des Karyotyps, war mit dem p53-Expressionsniveau von frisch isolierten, primären Hepatozyten vergleichbar. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die retrovirale TERT-Transduktion und die damit einhergehende Telomeraseaktivierung, keinen Einfluss auf die p53-Expression haben. Demgegenüber wurde in Telomerase-positiven Leberkrebszellen (HuH7) eine dreifach höhere p53-Expression gemessen.

In den untersuchten fötalen Hepatozyten ging die Telomerase-vermittelte Immortalisierung, trotz des Auftretens chromosomaler Veränderungen, nicht mit Defekten des p53-vermittelten Zellzyklusarrestes einher. Die Aufrechterhaltung der intakten p53-Funktion während der Zellkulturexpansion von Telomerase-immortalisierten humanen Zellen wurde auch von anderen Gruppen beschrieben, zum Beispiel bei humanen Fibroblasten (Milyavsky et al., 2003; Taylor et al., 2004) und humanen Plattenepithelzellen der Speiseröhre (Morales et al., 2003). Es wurde aber auch über die Entwicklung von p53-Veränderungen in Telomerase-

immortalisierten Zellen berichtet. So proliferierten zum Beispiel TERT-immortalisierte humane Fibroblasten über einen Zeitraum von 70 Populationsverdoppelungen, obwohl die p53-Expression zunahm und dieses zum Verlust der Wildtypfunktion führt (Noble et al., 2004). Außerdem wurden p53-Mutationen mit Verlust der Funktion als Teil einer spontanen, schrittweise neoplastischen Transformation in Telomerase-immortalisierten humanen Fibroblasten identifiziert (Noble et al., 2004; Zongaro et al., 2005).

V. Zusammenfassung und Aussichten

Zusammenfassend betrachtet untermauern die Ergebnisse dieser Arbeit bereits gemachte Beobachtungen von Veränderungen des Karyotyps in Telomerase-immortalisierten humanen Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aufrechterhaltung der Telomere nicht ausreicht, um numerische Veränderungen des Karyotyps in Langzeitkultur zu verhindern.

Trotz allem führten diese zytogenetischen Veränderungen aber nicht zum verankerungs-unabhängigen Wachstum und/oder zur Unterbrechung der DNA-Schadensantwort, beides Merkmale einer malignen Transformation.

Auch im Nacktmausassay konnte kein Anzeichen für eine maligne Transformation der immortalisierten fötalen Hepatozyten gefunden werden.

Überdies besitzen die immortalisierten Hepatozyten eine intakte p53-vermittelte Reparaturantwort auf DNA-Doppestrangbrüche. Dies zeigt somit indirekt, dass die immortalisierten Hepatozyten keine mutierten Allele des Tumorsuppressorgens p53 enthalten.

Da die untersuchten Telomerase-immortalisierte fötale Hepatozyten ein unbegrenztes Teilungspotential besitzen, unkompliziert in Langzeitkultur gehalten werden können und keine maligne Transformation aufweisen, stellen sie ein geeignetes Zellkulturmodell zur Untersuchung der molekularen Veränderungen im Rahmen der Leberkrebsentstehung.

Die Entstehung von Leberkrebs läuft wahrscheinlich als mehrstufiger Entartungsvorgang ab, wobei die Aktivierung der Telomerase als ein wesentlicher

Schritt angesehen wird. Weiterhin wird angenommen, dass eine relativ kleine Anzahl an zusätzlichen genetischen Veränderungen notwendig ist, um proliferierende humane Hepatozyten maligne zu transformieren.

In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, zukünftig durch gezielte Veränderungen, z.B. retrovirale Insertionsmutagenese, Auslösung von oxidativen Stress, Manipulation von Signalwegen die an der Leberkrebsentstehung beteiligt sind, eine maligne Transformation zu induzieren. Durch zytogenetische und molekulare Charakterisierung der Zellen könnten dann neue Erkenntnisse zu den molekularen Grundlagen der Leberkrebsentstehung gewonnen werden.

VI. Literatur

1. **Allsopp,R.C., Chang,E., Kashafi-Aazam,M., Rogaev,E.I., Piatyszek,M.A., Shay,J.W., and Harley,C.B.** (1995). Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp. Cell Res.* **220**, 194-200.
2. **Armstrong,L., Saretzki,G., Peters,H., Wappler,I., Evans,J., Hole,N., von Zglinicki,T., and Lako,M.** (2005). Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. *Stem Cells* **23**, 516-529.
3. **Ausubel,F.M., Brent,R., Kingston,R.E., Moore,D.D., Seidman,J.G., Smith,J.A., and Struhl,K.** (2002). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley & Sons.Inc.
4. **Baerlocher,G.M., Mak,J., Tien,T., and Lansdorp,P.M.** (2002). Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: tips and pitfalls. *Cytometry* **47**, 89-99.
5. **Baumann,P. and Cech,T.R.** (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**, 1171-1175.
6. **Bilaud,T., Brun,C., Ancelin,K., Koering,C.E., Laroche,T., and Gilson,E.** (1997). Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat. Genet.* **17**, 236-239.
7. **Blackburn,E.H.** (2000). Telomere states and cell fates. *Nature* **408**, 53-56.
8. **Blackburn,E.H.** (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* **350**, 569-573.
9. **Blasco,M.A., Lee,H.W., Rizen,M., Hanahan,D., DePinho,R., and Greider,C.W.** (1997). Mouse models for the study of telomerase. *Ciba Found. Symp.* **211**, 160-170.

-
10. **Bodnar,A.G., Ouellette,M., Frolkis,M., Holt,S.E., Chiu,C.P., Morin,G.B., Harley,C.B., Shay,J.W., Lichtsteiner,S., and Wright,W.E.** (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-352.
 11. **Bosch,F.X., Ribes,J., Diaz,M., and Cleries,R.** (2004). Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* **127**, S5-S16.
 12. **Broccoli,D., Smogorzewska,A., Chong,L., and de Lange,T.** (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.* **17**, 231-235.
 13. **Cerni,C.** (2000). Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat. Res.* **462**, 31-47.
 14. **d'Adda di Fagagna,F., Reaper,P.M., Clay-Farrace,L., Fiegler,H., Carr,P., von Zglinicki,T., Saretzki,G., Carter,N.P., and Jackson,S.P.** (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-198.
 15. **Dandri,M., Burda,M.R., Torok,E., Pollok,J.M., Iwanska,A., Sommer,G., Rogiers,X., Rogler,C.E., Gupta,S., Will,H. et al.** (2001). Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* **33**, 981-988.
 16. **Dickson,M.A., Hahn,W.C., Ino,Y., Ronfard,V., Wu,J.Y., Weinberg,R.A., Louis,D.N., Li,F.P., and Rheinwald,J.G.** (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1436-1447.
 17. **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. et al.** (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* **269**, 1236-1241.

-
18. **Giles,R.H., van Es,J.H., and Clevers,H.** (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1653**, 1-24.
 19. **Greider,C.W.** (1996). Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 337-365.
 20. **Greider,C.W. and Blackburn,E.H.** (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405-413.
 21. **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.
 22. **Hackett,J.A. and Greider,C.W.** (2002). Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* **21**, 619-626.
 23. **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.
 24. **Hahn,W.C. and Weinberg,R.A.** (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 331-341.
 25. **Hanahan,D. and Weinberg,R.A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
 26. **Harley,C.B.** (2002). Telomerase is not an oncogene. *Oncogene* **21**, 494-502.
 27. **Harley,C.B., Futcher,A.B., and Greider,C.W.** (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460.
 28. **Harris,C.C.** (1996). p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* **17**, 1187-1198.

-
29. **Hytiroglou,P., Kotoula,V., Thung,S.N., Tsokos,M., Fiel,M.I., and Papadimitriou,C.S.** (1998). Telomerase activity in precancerous hepatic nodules. *Cancer* **82**, 1831-1838.
 30. **Jiang,X.R., Jimenez,G., Chang,E., Frolkis,M., Kusler,B., Sage,M., Beeche,M., Bodnar,A.G., Wahl,G.M., Tlsty,T.D. et al.** (1999). Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat. Genet.* **21**, 111-114.
 31. **Johansson,B., Heim,S., Mandahl,N., Mertens,F., and Mitelman,F.** (1993). Trisomy 7 in nonneoplastic cells. *Genes Chromosomes. Cancer* **6**, 199-205.
 32. **Karlseder,J., Broccoli,D., Dai,Y., Hardy,S., and de Lange,T.** (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* **283**, 1321-1325.
 33. **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.
 34. **Kim,N.W. and Wu,F.** (1997). Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res.* **25**, 2595-2597.
 35. **Klinger,R.Y., Blum,J.L., Hearn,B., Lebow,B., and Niklason,L.E.** (2006). Relevance and safety of telomerase for human tissue engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 2500-2505.
 36. **Kojima,H., Yokosuka,O., Imazeki,F., Saisho,H., and Omata,M.** (1997). Telomerase activity and telomere length in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Gastroenterology* **112**, 493-500.
 37. **Laurent-Puig,P. and Zucman-Rossi,J.** (2006). Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene* **25**, 3778-3786.

-
38. **Leach,N.T., Rehder,C., Jensen,K., Holt,S., and Jackson-Cook,C.** (2004). Human chromosomes with shorter telomeres and large heterochromatin regions have a higher frequency of acquired somatic cell aneuploidy. *Mech. Ageing Dev.* **125**, 563-573.
 39. **Lee,M.K., Hande,M.P., and Sabapathy,K.** (2005). Ectopic mTERT expression in mouse embryonic stem cells does not affect differentiation but confers resistance to differentiation- and stress-induced p53-dependent apoptosis. *J. Cell Sci.* **118**, 819-829.
 40. **Levy,M.Z., Allsopp,R.C., Futcher,A.B., Greider,C.W., and Harley,C.B.** (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* **225**, 951-960.
 41. **Liu,D., O'Connor,M.S., Qin,J., and Songyang,Z.** (2004). Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 51338-51342.
 42. **Luiten,R.M., Pene,J., Yssel,H., and Spits,H.** (2003). Ectopic hTERT expression extends the life span of human CD4+ helper and regulatory T-cell clones and confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis. *Blood* **101**, 4512-4519.
 43. **Martens,U.M., Zijlmans,J.M., Poon,S.S., Dragowska,W., Yui,J., Chavez,E.A., Ward,R.K., and Lansdorp,P.M.** (1998). Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat. Genet.* **18**, 76-80.
 44. **Milyavsky,M., Shats,I., Erez,N., Tang,X., Senderovich,S., Meerson,A., Tabach,Y., Goldfinger,N., Ginsberg,D., Harris,C.C. et al.** (2003). Prolonged culture of telomerase-immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype. *Cancer Res.* **63**, 7147-7157.

-
45. **Mondello,C., Chiesa,M., Rebuzzini,P., Zongaro,S., Verri,A., Colombo,T., Giulotto,E., D'Incalci,M., Franceschi,C., and Nuzzo,F.** (2003). Karyotype instability and anchorage-independent growth in telomerase-immortalized fibroblasts from two centenarian individuals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 914-921.
 46. **Moradpour,D. and Blum,H.E.** (2005). Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 477-483.
 47. **Morales,C.P., Gandia,K.G., Ramirez,R.D., Wright,W.E., Shay,J.W., and Spechler,S.J.** (2003). Characterisation of telomerase immortalised normal human oesophageal squamous cells. *Gut* **52**, 327-333.
 48. **Morales,C.P., Holt,S.E., Ouellette,M., Kaur,K.J., Yan,Y., Wilson,K.S., White,M.A., Wright,W.E., and Shay,J.W.** (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat. Genet.* **21**, 115-118.
 49. **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.
 50. **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.
 51. **Nguyen,T.H., Mai,G., Villiger,P., Oberholzer,J., Salmon,P., Morel,P., Buhler,L., and Trono,D.** (2005). Treatment of acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse with conditionally immortalized human hepatocytes. *J. Hepatol.* **43**, 1031-1037.

-
52. **Noble,J.R., Zhong,Z.H., Neumann,A.A., Melki,J.R., Clark,S.J., and Reddel,R.R.** (2004). Alterations in the p16(INK4a) and p53 tumor suppressor genes of hTERT-immortalized human fibroblasts. *Oncogene* **23**, 3116-3121.
 53. **O'Hare,M.J., Bond,J., Clarke,C., Takeuchi,Y., Atherton,A.J., Berry,C., Moody,J., Silver,A.R., Davies,D.C., Alsop,A.E. et al.** (2001). Conditional immortalization of freshly isolated human mammary fibroblasts and endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 646-651.
 54. **Oh,B.K., Jo,C.K., Park,C., Kim,K., Jung,L.W., Han,K.H., and Nyun,P.Y.** (2003). Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* **39**, 786-792.
 55. **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.
 56. **Plentz,R.R., Schlegelberger,B., Flemming,P., Gebel,M., Kreipe,H., Manns,M.P., Rudolph,K.L., and Wilkens,L.** (2005). Telomere shortening correlates with increasing aneuploidy of chromosome 8 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **42**, 522-526.
 57. **Rao,K., Alper,O., Opheim,K.E., Bonnet,G., Wolfe,K., Bryant,E., Larivee,S.O., Porter,P., and McDougall,J.K.** (2006). Cytogenetic characterization and H-ras associated transformation of immortalized human mammary epithelial cells. *Cancer Cell Int.* **6**, 15.
 58. **Roberts,L.R. and Gores,G.J.** (2005). Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin. Liver Dis.* **25**, 212-225.
 59. **Rogan,E.M., Bryan,T.M., Hukku,B., Maclean,K., Chang,A.C., Moy,E.L., Englezou,A., Warneford,S.G., Dalla-Pozza,L., and Reddel,R.R.** (1995). Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4745-4753.

-
60. **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.
 61. **Satyanarayana,A., Manns,M.P., and Rudolph,K.L.** (2004). Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **40**, 276-283.
 62. **Schaffer,L.G. and Tommerup,N.** (2005). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: Karger.
 63. **Serakinci,N., Guldberg,P., Burns,J.S., Abdallah,B., Schrodder,H., Jensen,T., and Kassem,M.** (2004). Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* **23**, 5095-5098.
 64. **Shay,J.W. and Bacchetti,S.** (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* **33**, 787-791.
 65. **Shay,J.W. and Wright,W.E.** (2006). Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 577-584.
 66. **Stewart,S.A.** (2005). Telomere maintenance and tumorigenesis: an "ALT"ernative road. *Curr. Mol. Med.* **5**, 253-257.
 67. **Takai,H., Smogorzewska,A., and de Lange,T.** (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* **13**, 1549-1556.
 68. **Takaishi,H., Kitamoto,M., Takahashi,S., Aikata,H., Kawakami,Y., Nakanishi,T., Nakamura,Y., Shimamoto,F., Kajiyama,G., and Ide,T.** (2000). Precancerous hepatic nodules had significant levels of telomerase activity determined by sensitive quantitation using a hybridization protection assay. *Cancer* **88**, 312-317.
 69. **Taylor,L.M., James,A., Schuller,C.E., Brce,J., Lock,R.B., and Mackenzie,K.L.** (2004). Inactivation of p16INK4a, with retention of pRB and p53/p21cip1 function, in human MRC5 fibroblasts that overcome a telomere-independent crisis during immortalization. *J. Biol. Chem.* **279**, 43634-43645.

-
70. **Totsugawa,T., Yong,C., Rivas-Carrillo,J.D., Soto-Gutierrez,A., Navarro-Alvarez,N., Noguchi,H., Okitsu,T., Westerman,K.A., Kohara,M., Reth,M. et al.** (2007). Survival of liver failure pigs by transplantation of reversibly immortalized human hepatocytes with Tamoxifen-mediated self-recombination. *J. Hepatol.*
 71. **Wege,H., Chui,M.S., Le,H.T., Strom,S.C., and Zern,M.A.** (2003a). In vitro expansion of human hepatocytes is restricted by telomere-dependent replicative aging. *Cell Transplant.* **12**, 897-906.
 72. **Wege,H., Chui,M.S., Le,H.T., Tran,J.M., and Zern,M.A.** (2003b). SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. *Nucleic Acids Res.* **31**, E3.
 73. **Wege,H., Le,H.T., Chui,M.S., Liu,L., Wu,J., Giri,R., Malhi,H., Sappal,B.S., Kumaran,V., Gupta,S. et al.** (2003c). Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* **124**, 432-444.
 74. **Wootton,M., Steeghs,K., Watt,D., Munro,J., Gordon,K., Ireland,H., Morrison,V., Behan,W., and Parkinson,E.K.** (2003). Telomerase alone extends the replicative life span of human skeletal muscle cells without compromising genomic stability. *Hum. Gene Ther.* **14**, 1473-1487.
 75. **Yang,J., Chang,E., Cherry,A.M., Bangs,C.D., Oei,Y., Bodnar,A., Bronstein,A., Chiu,C.P., and Herron,G.S.** (1999). Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 26141-26148.
 76. **Zakian,V.A.** (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* **270**, 1601-1607.
 77. **Zalzman,M., Gupta,S., Giri,R.K., Berkovich,I., Sappal,B.S., Karnieli,O., Zern,M.A., Fleischer,N., and Efrat,S.** (2003). Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 7253-7258.

-
78. **Zhang,H., Jin,Y., Chen,X., Jin,C., Law,S., Tsao,S.W., and Kwong,Y.L.** (2006). Cytogenetic aberrations in immortalization of esophageal epithelial cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* **165**, 25-35.
 79. **Zhong,Z., Shiue,L., Kaplan,S., and de Lange,T.** (1992). A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol. Cell Biol.* **12**, 4834-4843.
 80. **Zongaro,S., de Stanchina,E., Colombo,T., D'Incalci,M., Giulotto,E., and Mondello,C.** (2005). Stepwise neoplastic transformation of a telomerase immortalized fibroblast cell line. *Cancer Res.* **65**, 11411-11418.

VII. Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde an der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in Hamburg, in der Zeit vom 1.8.2004 bis zum 1.6.2007 angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein außerordentlicher Dank gebührt Herrn Dr. med. Henning Wege für die optimale wissenschaftliche Betreuung und praktische Anleitung, für die er trotz großer Arbeitsbelastung immer Zeit erübrigte.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Udo Wienand danke ich sehr für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit am Department für Biologie und seine freundliche Unterstützung. Für die Betreuung an der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik möchte ich mich sehr bei Herrn PD. Dr. med. Jörg Petersen bedanken.

Ebenso danke ich Frau Dr. rer. nat. Sigrid Fuchs, Institut für Humangenetik, für die Kooperation zur Analyse der Karyotypen. Herrn PD Dr. med. Tim Brümmendorf, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, gilt mein Dank für die Kooperation bei der Bestimmung der Telomerlänge. Weiterhin danke ich Frau PD. Dr. med. Judith Dierlamm, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, für die Kooperation bei der M-FISH Analyse. Für die Mitbenutzung des FACS Canto-Durchflusszytometers möchte ich mich bei Frau Dr. med. Ursula Gehling, Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie bedanken. Gabor Rohaly und Alejandro Mena-Nunez, Heinrich-Pette-Institut, danke ich für ihre Hilfe bei den Bestrahlungsexperimenten. Besonders danke ich Nadine Knuth für die praktische Hilfe und Unterstützung in den letzten drei Jahren. Desgleichen möchte ich mich bei Jörg Schrader, Marc Lütgehetmann, Tassilo Volz, Maura Dandri, Sebastian Diedrich, Marko Hilken, Katrin Presser sowie Jan Wolkenhauer bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse, Direktor der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik, möchte ich recht herzlich für die Unterstützung dieser Arbeit und die zur Verfügungstellung der Räumlichkeiten danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Oma.