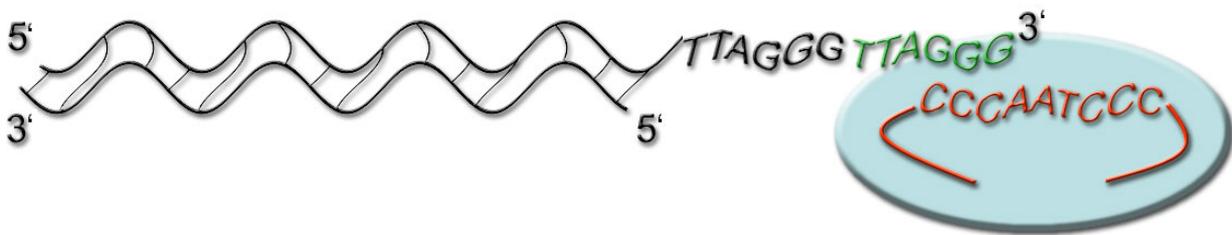


**Regulation der Telomerase in Mammakarzinomen  
eines bitransgenen Mausmodells  
[*Mus musculus* (Linnaeus, 1758)]**



**Dissertation**

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

vorgelegt von

Britta Wittek

Hamburg 2007

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. W. DEPERT  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH  
Tag der Disputation: 26. Oktober 2007

Hamburg, den 10. Oktober 2007



A handwritten signature in black ink, consisting of a large 'R' followed by a cursive 'L' and a horizontal line.

Professor Dr. Reinhard Lieberei  
Leiter des Departments Biologie

Das Titelbild wurde mit freundlicher Unterstützung von Wojciech Micka erstellt.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Aufbau und Bedeutung der Telomere	7
1.2 Der Telomerasekomplex: Komponenten und Funktion	8
1.3 Telomerase und Krebs	10
1.4 Regulation der Telomerase	13
1.5 Telomerase im Mausmodell	16
1.6 Das hTERTp- <i>lacZ</i> Mausmodell	18
1.7 Das WAP-T Mausmodell	19
1.8 Telomerase in Mammakarzinomen	22
1.9 Telomerase im Krankheitsbild Endometriose	24
1.10 Fragestellung	26
<b>2. Material &amp; Methoden</b>	<b>27</b>
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Chemikalien	28
2.1.3 Enzyme	29
2.1.4 Kits	29
2.1.5 Größenstandards	29
2.1.6 Antikörper	30
2.1.7 Primer	30
2.1.8 Plasmide	31
2.1.9 Mammalia	31
2.2 RNA-Isolierung	32
2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.4 Reverse Transkription	33
2.5 PCR	34
2.5.1 Primer und Primerdesign	35
2.6 Agarose-Gelelektrophorese	36
2.7 Herstellen von Proteinextrakten aus Geweben	37

2.8	Proteinbestimmung nach Bradford	38
2.9	TRAP-Assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol)	38
2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.11	Western Blot (WB)	41
2.12	Immunologisches Proteinnachweisverfahren mittels ECL (Enhanced Chemiluminescence)	41
2.12.1	Strippen der Membran	
2.13	Tierpräparation und Organentnahme	42
2.14	HE-Färbung	43
2.15	Immunhistochemie	44
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1.	Generierung einer bitransgenen Mauslinie: hTERTp- <i>lacZ</i> x WAP-T	45
3.1.1	Einkreuzung des hTERTp- <i>lacZ</i> Transgens in den BALB/c-Stamm	45
3.1.2	Die Transgene haben keinen Einfluss auf die endogene mTERT Expression	47
3.2	Hochregulation der endogenen Telomeraseaktivität in Mammatumoren der hTERTp- <i>lacZ</i> x WAP-T bitransgenen Mäuse	48
3.3	Aktivierung der humanen und murinen TERT Promotoren während der Tumorgenese in hTERTp- <i>lacZ</i> x WAP-T bitransgenen Mäusen	52
3.4	Korrelation der TERT Promotor Aktivitäten mit der Expression von typischen Tumormarker Genen	54
3.5	Das Expressionsmuster im Leiomyosarkom unterscheidet sich deutlich von dem des Karzinoms	59
3.6	Analyse von Expressionsprofilen durch Microarrays	62
3.7	Repression der Telomerase in ektopischen Geweben von Patienten mit Endometriose	68
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
4.1	Die Mausstämme C57BL/6J und BALB/c unterscheiden sich in der Grundexpression des hTERTp- <i>lacZ</i> Transgens jedoch nicht in ihrer endogenen Telomeraseaktivität	70

4.2	Die Hochregulation der endogenen Telomerase ist nicht abhängig von der Induktion der T-Ag Expression	71
4.3	Der humane TERT Promotor im Mausmodell wird in Mammatumoren aktiviert	73
4.4	Untersuchungen zur Korrelation verschiedener Faktoren in der Tumorentwicklung an hTERTp- <i>lacZ</i> x WAP-T bitransgenen Tieren	74
4.5	Repression der Telomeraseaktivität und hTERT Expression in ektopischem Endometrium von Patienten mit Endometriose	79
4.6	Ausblick	80
	<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
	<b>6. Abkürzungen</b>	<b>93</b>
	<b>7. Danksagung</b>	<b>96</b>

## **Zusammenfassung**

Die Telomerase ist ein Ribonukleoproteinkomplex, der für die vollständige Verdoppelung der chromosomalen Enden, der Telomer-DNA, verantwortlich ist. Somit wirkt die Telomerase der Verkürzung der Telomere-DNA bei der Replikation entgegen und verhindert dadurch genetische Instabilität. Die Regulation der Enzymaktivität ist in erster Linie abhängig von der Expression ihrer katalytischen Proteinuntereinheit TERT. Während der Embryonalentwicklung findet in den meisten humanen Zellen eine Repression der Transkription dieses Gens statt, doch in der Mehrheit menschlicher Tumore kann eine Reaktivierung der Telomeraseaktivität festgestellt werden. Diese verleiht den Tumorzellen Immortalität. In Mammakarzinomen findet man erhöhte Telomeraseaktivität in über 90 % der untersuchten Biopsien und es stellt sich die Frage, welche Mechanismen die Hochregulation bedingen und inwieweit die Regulation dieses Enzyms an der Tumorentstehung oder Progression beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese zentrale Frage mit Hilfe eines bitransgenen Mausmodells genauer untersucht. Es wurden monotransgene WAP-T Mäuse, welche die frühe Genregion des SV40 unter der Kontrolle des Mammaepithel-spezifischen WAP-Promotors tragen, verwendet. In diesem Modell lassen sich Mammakarzinome induzieren. Diese Mäuse wurden mit hTERTp-*lacZ* transgenen Mäusen im BALB/c Stamm verpaart. Hierbei kontrolliert ein 8 kb langes Fragment des humanen TERT Promotors das *lacZ*-Reportergen. So wurde zu verschiedenen Stadien der Mammatumorentwicklung die Aktivität des hTERT Promotors über die Expression der LacZ-Mengen untersucht. Parallel dazu wurde die Expression des murinen TERT Promotors beobachtet und mit der endogenen Telomeraseaktivität korreliert. Es konnte gezeigt werden, dass in 90 % aller untersuchten invasiven Mammakarzinome der Maus sowohl der humane als auch der murine TERT Promotor hohe Aktivität aufwiesen. Auch die endogene Enzymaktivität wurde spezifisch in den Tumoren hochreguliert. Um herauszufinden, welche Mechanismen hierfür verantwortlich sein könnten, wurden verschiedene Gene mittels RT-PCR auf ihre Expression untersucht. Es wurden sowohl bekannte Regulatoren der TERT Expression ausgewählt, als auch Gene, die in Mammakarzinomen des Menschen typischerweise überexprimiert sind. So konnte gezeigt werden, dass in invasiven Karzinomen des hTERTp-*lacZ* x WAP-T bitransgenen Mausmodells ein bestimmtes Expressionsmuster dieser Gene vorliegt, welches die Situation in humanen Tumoren gut reflektiert. Eine mögliche Regulation von TERT lässt sich den Resultaten zufolge nicht nur über den schon bekannten Aktivator c-myc vermuten sondern auch über den vom Her2 Rezeptor initiierten Signalweg. Zur weiteren Analyse wurden Expressionsprofile mit Hilfe der DNA-Mikroarray-Technik erstellt. Hier konnten weitere

## Zusammenfassung

schon bekannte TERT Regulatoren identifiziert werden, deren Expression sich spezifisch in den Karzinomen änderte. Genauere Untersuchungen müssen allerdings noch zeigen, inwiefern ein direkter oder indirekter Zusammenhang der verdächtigen Gene zur TERT Hochregulation besteht.

Da die Regulation der Telomerase auch in anderen Systemen von großer Bedeutung ist, wurden Analysen in dem humanen Krankheitsbild Endometriose durchgeführt. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass entgegen der Erwartungen in ektopisch wachsendem Endometrium sowohl die TERT Expression als auch die Telomeraseaktivität vollständig reprimiert vorliegt.

## 1.1 Aufbau und Bedeutung der Telomere

Telomere – vom griechischen Wort *telos*, „ein Ende“ - besitzen eine charakteristische DNA-Sequenz, die von dem Enzym Telomerase an die Enden der Chromosomen gehängt wird. 1938 beschrieb Hermann Müller seine Beobachtungen bei der Bestrahlung von Drosophilachromosomen und schlussfolgerte, dass die Enden der Chromosomen eine schützende Struktur besitzen müssen, die sie von gebrochenen Chromosomen unterscheidet (Müller, 1938). Er nannte diese Struktur: Telomer. Bei den meisten dieser Sequenzen, die man bisher kennt, handelt es sich um repetitive Oligomere mit einem hohen G-Anteil in dem Strang, der in 5'→3' Richtung zum Telomerende hin verläuft. Bei Hefen und Protozoen werden diese einfachen Sequenzen bis zu einer Gesamtlänge von einigen hundert Basenpaaren wiederholt. Die Wiederholungen der Telomersequenzen bei Vertebraten können sogar einige tausend Basenpaare betragen. Beim Menschen lautet die repetierte Sequenz TTAGGG. Das 3'-Ende des G-reichen Stranges ragt dabei 150-300 Nukleotide über das 5'-Ende des komplementären C-reichen Stranges hinaus und kann sich durch Rückfaltung in den Doppelstrang einführen und dort hybridisieren (Greider, 1999; Griffith et al., 1999).

Unter dem Elektronenmikroskop sind dann zwei Ringstrukturen erkennbar, der größere Ring wird als *T-loop*, der kleinere Ring als *D-loop* bezeichnet (Munoz-Jordan et al., 2001). Spezifische Bindungen von Telomer-Proteinen sind für die Funktion der Telomere und der Erhaltung der Ringstrukturen notwendig. So werden diese Bereiche vor einem Abbau durch Exonukleasen geschützt. Zu diesen Proteinen gehören z. B. TRF1 (TTAGGG repeat binding factor 1) (Chong et al., 1995; Broccoli et al., 1997; Shen et al., 1997) und TRF2 (TTAGGG repeat binding factor 2) (van Steensel et al., 1998), welche doppelsträngige Telomersequenzen stabilisieren, oder POT1 (protection of telomeres) (Baumann & Cech, 2001), welches am 3'-Überhang bindet.

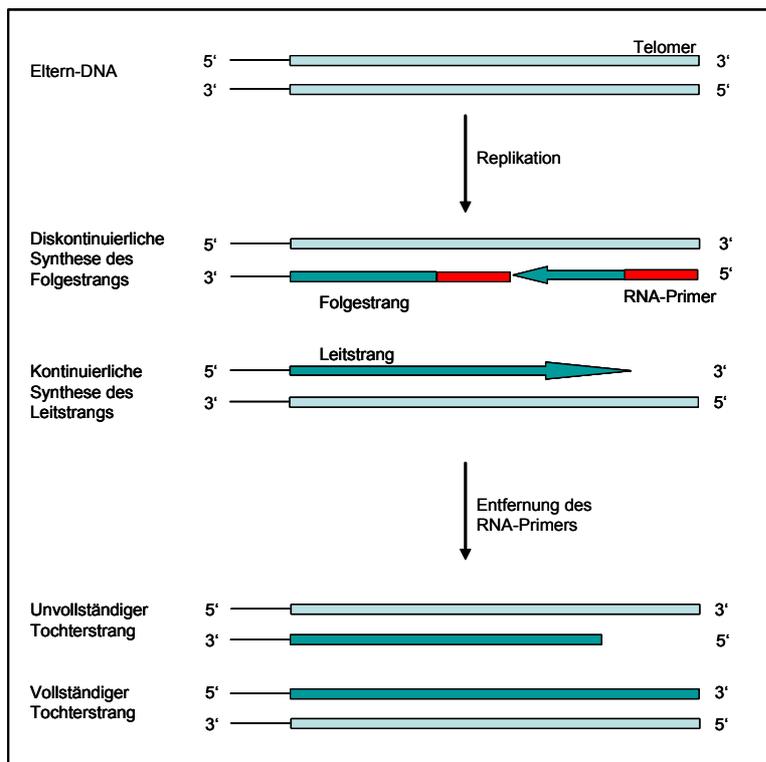
Wofür nun werden solch spezielle Chromosomenenden gebraucht?

Eukaryotische Chromosomen benötigen drei funktionelle Elemente, um repliziert und stabil vererbt zu werden.

- 1) Sequenzen für die Initiation der DNA-Replikation
- 2) Das Centromer für die Segregation von Schwesterchromatiden
- 3) Die beiden Chromosomenenden, die Telomere

## Einleitung

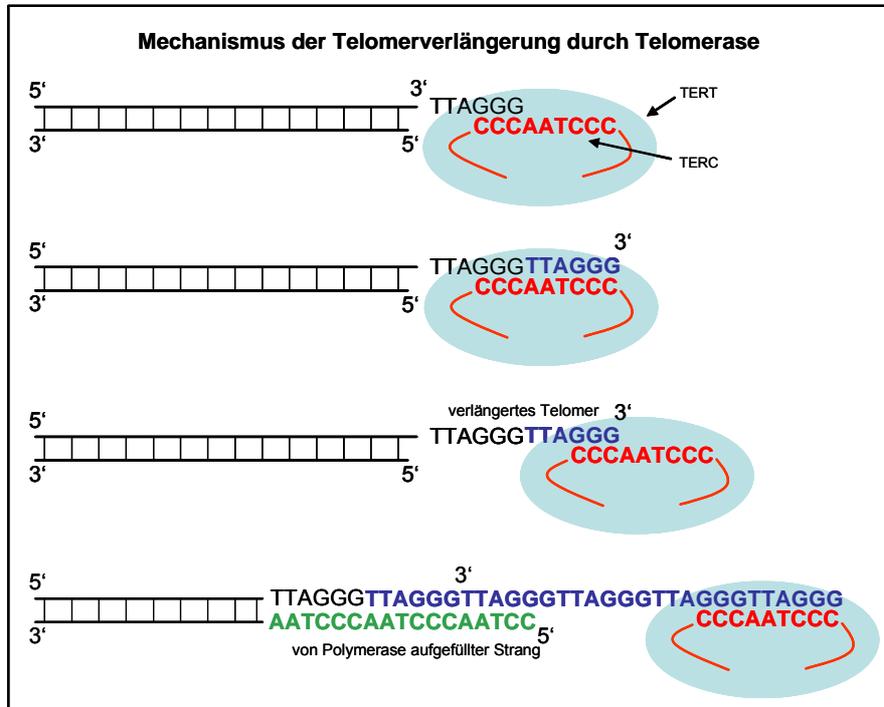
Durch die Linearität eukaryotischer Chromosomen ergibt sich ein Problem, das bei ringförmigen DNA-Molekülen, wie Prokaryoten sie besitzen, nicht auftritt: Das End-Replikations-Problem (Olovnikov, 1971; Watson, 1972; Olovnikov, 1973) (s. Abb.1.1). Grundsätzlich können DNA-Polymerasen nicht in 3'→5' Richtung synthetisieren oder Ketten *de novo* beginnen. Zur DNA-Replikation wird ein kurzes RNA-Stück als Primer benötigt, das von einer RNA-Polymerase, der Primase, synthetisiert wird. Die Primer-RNA wird zu einem späteren Zeitpunkt der Replikation herausgeschnitten. Damit bleibt nach Entfernung des RNA-Primers vom Folgestrang ein Tochter-DNA-Molekül mit einem unvollständigen 5'-Ende zurück. In Abwesenheit eines spezifischen Telomer-erhaltenden Mechanismus verkürzt sich der Tochterstrang nach jeder Replikationsrunde. Der Mensch verliert pro Zellteilung etwa 50-150 Basenpaare (Harley et al., 1990). Zusätzlich zu den Nukleotiden des RNA-Primers gehen noch weitere Nukleotide verloren, die wahrscheinlich während der Replikation von Exonukleasen abgebaut werden. Schutz vor dieser genetischen Katastrophe bieten die Telomere, die durch das Enzym Telomerase aufrechterhalten bzw. verlängert werden können.



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des End-Replikations-Problems. Die Entfernung des RNA-Primers (rot) erzeugt ein Tochter-DNA-Molekül, dessen Strang verkürzt ist. Adaptiert (Blackburn, 1991)

## 1.2 Der Telomerasekomplex: Komponenten und Funktion

Die Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, welches für die Verlängerung der chromosomalen 3'-Enden verantwortlich ist (Greider & Blackburn, 1985). Für die Aktivität des Enzyms sind *in vitro* zwei Komponenten notwendig: die katalytische Proteinuntereinheit TERT (telomerase reverse transcriptase) (Nakamura et al., 1997) und die RNA-Untereinheit TERC (telomerase RNA component) (Feng et al., 1995). Um das 3'-Ende der DNA zu verlängern, enthält die RNA-Komponente eine 11 bp lange Sequenz, welche zu dem einzelsträngigen Überhang der Telomere komplementär ist und TERT als Matrize für die Synthese von Telomer-DNA dient. Nach dem Anfügen von sechs Basen an das 3'-Ende, entsteht eine Pause, in der die TERC-Untereinheit für die Synthese weiterer sechs Basen neu positioniert wird. Somit wird das 3'-Ende um mehrere Wiederholungen der Telomer-Sequenz verlängert. Durch diese Verlängerung der chromosomalen 3'-Enden kann ein neuer RNA-Primer hybridieren und der DNA-Polymerase wird die Möglichkeit gegeben, den komplementären Strang aufzufüllen. Hierdurch kann das End-Replikations-Problem kompensiert werden, indem einem Nettoverlust der DNA-Enden bei der Replikation entgegengewirkt wird.



**Abbildung 1.2:** Mechanismus der Telomerverlängerung durch Telomerase

*In vivo* sind zusätzlich zu den beiden Hauptkomponenten TERT und TERC noch andere Proteine mit dem Telomerasekomplex assoziiert. In humanen Zellextrakten findet man

Interaktionen mit dem Protein EST1A (ever shorter telomere), welches direkt oder indirekt an der Elongation der Telomere beteiligt zu sein scheint (Reichenbach et al., 2003). Stellwagen und Kollegen konnten 2003 zeigen, dass die RNA-Komponente der Telomerase an ein Protein Namens Ku bindet (Stellwagen et al., 2003). Ku ist ein Heterodimer, welches an der DNA-Reparatur beteiligt ist. Bei der Interaktion mit dem Telomerasekomplex wird vermutet, dass Ku die *de novo* Synthese von Telomer-DNA an Chromosomenbrüchen unterstützt und somit hilft, die gebrochenen DNA-Enden vor Abbau zu schützen. An der Stabilisierung der TERC-Untereinheit ist das Protein Dyskerin beteiligt. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung wurde beschrieben, dass Dyskerin mit dem aktiven Telomerasekomplex interagiert. Bei einer Aufreinigung der Telomerase aus HEK-293 Zellen in großem Maßstab war es neben hTERT das einzige Protein, welches mit aufgereinigt werden konnte (Cohen et al., 2007). Bei der Krankheit Dyskeratosis congenita finden sich Mutationen in entweder der TERC-RNA oder dem Protein Dyskerin (Mitchell et al., 1999; Vulliamy et al., 2001). Für das Protein TEP1 (telomere associated protein 1) wurde gezeigt, dass es sowohl an TERC als auch an TERT binden und stets mit dem aktiven Telomerasekomplex aufgereinigt werden kann (Harrington et al., 1997a; Harrington et al., 1997b; Nakayama et al., 1997). Die Funktion von TEP1 ist nach wie vor unklar, doch konnte mittels Affinitätschromatographie und Immunpräzipitation in Extrakten humaner Brustkrebszellen gezeigt werden, dass TEP1 an den Tumorsuppressor p53 bindet und so die Telomeraseaktivität inhibiert (Li et al., 1999).

Die Funktion der Telomerase legt nahe, dass sie essentiell für das Überleben von Zellen ist. Deshalb ist es zuerst verwunderlich, dass die Enzymaktivität nur in bestimmten Zellen nachgewiesen werden kann. Zwar exprimieren alle Zellen konstitutiv die RNA-Untereinheit TERC (Avilion et al., 1996), jedoch ist die TERT-Expression gerade beim Menschen auf spezifische Zelltypen beschränkt und in normalen somatischen Zellen reprimiert. Findet jedoch TERT-Expression statt, so korreliert diese stets mit Telomeraseaktivität, so dass dies als limitierender Faktor der Enzymaktivität angesehen wird (Nakamura et al., 1997; Kolquist et al., 1998). So findet man in humanen embryonalen Stammzellen noch hohe Telomeraseaktivität, doch wird im Zuge der Entwicklung die TERT-Expression weitestgehend unterdrückt (Wright et al., 1996). In adultem Gewebe kann hohe Telomeraseaktivität noch in Keimbahnzellen der Hoden und Progenitorzellen gefunden werden. Die Stammzellen in der Basalschicht der Haut (Harle-Bachor & Boukamp, 1996) und putative Stammzellen in den Krypten der Darmschleimhaut (Hiyama et al., 2001), sowie bestimmte Zellen des Knochenmarks und Leukozyten des peripheren Bluts (Broccoli et al.,

1995; Counter et al., 1995) sind Telomerase-positiv. All diese Zelltypen brauchen Zeit ihres Lebens ein vollständig intaktes Genom, da aus ihnen stetig neue Zellen hervorgehen. Die Telomere dürfen sich also nicht auf eine kritische Länge verkürzen, bei der die genetische Stabilität gefährdet wäre. Die aus diesen Zellen hervorgehenden Zelltypen werden jedoch ausdifferenzieren und hierbei wird die Telomeraseaktivität herunterreguliert. Nun gehen bei jeder Teilung 50-150 bp verloren (Harley et al., 1990) und so ist ihre Teilungsaktivität begrenzt und wird schließlich eingestellt. Diese Zellen haben das so genannte „Hayflick-Limit“ erreicht und verharren in einem seneszenten Status (Hayflick & Moorhead, 1961). Dieses Phänomen lässt sich in Zellkulturen gut beobachten, doch ist unklar, ob es ebenso *in vivo* auftritt.

Nun gibt es Zellen, die den Zellzyklusarrest der Seneszenz überwinden und zu Tumorzellen werden. Hierbei gehen Funktionen von Tumorsuppressorgenen verloren und Onkogene werden aktiv. Im Zuge ihrer wiedererlangten Teilungsfähigkeit wird bei den meisten Tumorzellen auch die Reaktivierung der Telomerase beobachtet.

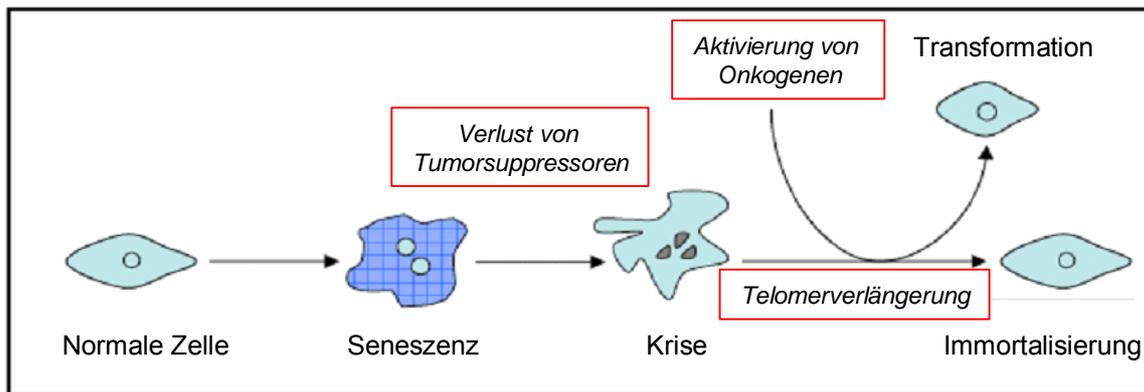
### **1.3 Telomerase und Krebs**

Krebs ist eine Krankheit des Erbguts, die meist im Laufe des Lebens erworben wird. Wissenschaftler unterscheiden Hunderte verschiedener Krebserkrankungen. Diese gehen jeweils aus einer bestimmten Zelle hervor, die sich aufgrund genetischer Veränderungen in eine unkontrolliert wachsende Tumorzelle umgewandelt hat.

Wir wissen aus der molekulargenetischen Forschung, dass Krebs durch nicht wieder zu reparierende Schäden in bestimmten Klassen von Genen entsteht. Vor allem drei Gruppen von Genen wurden in den letzten beiden Jahrzehnten aufgefunden, die bei Krebs häufig mutiert sind: so genannte Onkogene, Tumorsuppressor-Gene und Reparaturgene. Sowohl Onkogene als auch Tumorsuppressor-Gene kommen in allen gesunden Körperzellen vor und regulieren dort üblicherweise Proliferation und Differenzierung. Während Onkogene prinzipiell das Zellwachstum fördern, wird das Zellwachstum von Tumorsuppressor-Genen unterdrückt. Verliert dieses genetische Kontrollsystem seine Balance, entsteht über ein unkontrolliertes Wachstum ein Tumor. Die Aufgabenverteilung dieser beiden Gengruppen lässt sich gut mit der Funktionsweise eines Autos vergleichen: Die Onkogene sind in diesem Bild das Gaspedal, die Tumorsuppressorgene die Bremse. Wird das Gaspedal zu fest gedrückt

(z.B. durch Mutation eines Onkogens) oder versagen die Bremsen (z.B. durch Mutation eines Tumorsuppressorgens), gerät der Wagen (die Zelle) außer Kontrolle. Für das stete Vorankommen des Wagens kommen nun die Telomere und die Telomerase ins Spiel. So kann die Telomerlänge in diesem Bild den vorhandenen Treibstoff darstellen, der durch das Enzym Telomerase aufgefüllt werden kann.

Normale somatische Zellen besitzen eine begrenzte Teilungskapazität. Dies ist kein neues Phänomen, wird aber seit Veröffentlichung der Untersuchungen von Hayflick und Moorhead 1961 experimentell belegt (Hayflick & Moorhead, 1961). Sie zeigten, dass primäre humane Fibroblasten *in vitro* eine endliche Teilungsrate aufweisen. Diese Lebensspanne wird seither auch als „Hayflick-Limit“ bezeichnet. Später konnte gezeigt werden, dass sich die Telomere bei jeder Zellteilung aufgrund fehlender Telomeraseaktivität in somatischen Zellen verkürzen. In normalen humanen Zellen ist dies ein limitierender Faktor ihrer proliferativen Kapazität und endet in einem Wachstumsarrest, der als replikative Seneszenz bezeichnet wird (Harley et al., 1990; Harley et al., 1992). Der Verlust von Tumorsuppressoren wie p53 oder pRb kann zu diesem Zeitpunkt die Proliferation wieder einleiten und so den Arrest aufheben. Solche Zellen können sich einige Male teilen, bis die Telomere so kurz werden, dass die genomische Stabilität gefährdet ist. Die meisten Zellen sterben dann durch Apoptose aufgrund von erheblichem DNA-Verlust an den Telomeren. Man spricht von einer Krise. Nur wenige Zellen sind in der Lage diese Krise zu überleben, indem sie einen Telomer-Erhaltungs-Mechanismus aktivieren. Dies kann durch Reaktivierung der Telomerase oder den so genannten ALT-Mechanismus (ALT = alternative lengthening of telomeres) (Bryan et al., 1997; Muntoni & Reddel, 2005) geschehen. In 90 % aller humanen Tumore ist die Telomeraseaktivität erhöht und die Zellen erlangen hierdurch Immortalität (Kim et al., 1994). Für die Transformation der Zellen sind jedoch noch weitere Veränderungen notwendig, welche meist in der Aktivierung von Onkogenen bestehen. Dadurch bekommen immortale Zellen einen transformierten Phänotyp, der sie zu Krebszellen macht. Die Telomerase per se wird nicht als Onkogen angesehen (Harley, 2002). So ist zwar die Repression der Telomerase in somatischen Zellen ein Schutzmechanismus gegen die Tumorentstehung (Counter, 1996), ihre Aktivierung kann jedoch allein noch keine Zelle zu einer Krebszelle transformieren.



**Abbildung 1.3:** Telomer-Hypothese zellulärer Seneszenz und Tumorentstehung. Adaptiert (Neumann & Reddel, 2002).

Da die Reaktivierung der Telomerase einen entscheidenden Schritt in der Tumorgenese darstellt, indem sie Zellen eine unendliche Proliferationskapazität verleiht, wird vermehrt daran gearbeitet, sie als Angriffspunkt in der Krebstherapie zu nutzen. Hierbei gibt es verschiedene Ansätze, die Telomerase zu blockieren (siehe Übersichtsartikel: (Weise & Günes, 2006). Durch bestimmte chemische Stoffe, die direkt mit der TERT-Untereinheit interagieren, wird die Aktivität gehemmt und in der Mehrheit werden Tumorzellen mit hoher Telomeraseaktivität erreicht. Es wird auch versucht, die Telomere selbst zum Ziel zu machen. Krebszellen haben in der Regel kurze Telomere und eine Schädigung der Telomer-DNA und ihrer Struktur kann die Zelle in Seneszenz oder Apoptose treiben. Ein weiterer Ansatz ist die zielgerichtete Gentherapie, bei der der TERT Promotor, welcher vornehmlich in Krebszellen aktiv ist, für die Expression von Genen genutzt wird, die zum Tod der Zelle führen. Außerdem wird ein immuntherapeutischer Ansatz untersucht, wobei die Vakzination mit TERT-Peptiden zu einer Immunantwort von cytotoxischen T-Zellen auf TERT exprimierende Krebszellen führt. Bei jedem Versuch, Tumorzellen anzugreifen, muss immer bedacht werden, dass dies nicht ausschließlich möglich ist. So trifft man mit jedem der vorgestellten Therapieansätze auch andere Körperzellen und es muss sehr genau zwischen Nutzen und Schaden abgewogen werden. Je mehr jedoch über die Funktion und Regulation der Telomerase bekannt ist, desto gezielter kann gegen die Immortalisierung von Tumorzellen vorgegangen werden.

## 1.4 Regulation der Telomerase

Prinzipiell ist die Regulation eines Enzyms, welches aus mehreren Komponenten besteht, von einem komplexen Zusammenspiel vieler Faktoren abhängig. So kann jede Untereinheit auf mehreren Ebenen ihrer Entstehung reguliert werden. Zu Beginn ist hier die epigenetische Kontrolle wichtig, bei der der Zustand des Chromatins bzw. die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle spielt. Die meisten eukaryotischen Gene werden in erster Linie jedoch durch die Initiation der Transkription reguliert. Doch auch posttranskriptionelle Modifikationen sowie solche, die nach der Translation vorgenommen werden, entscheiden über die Funktionalität eines Proteins. Bei einem Enzymkomplex kann auch die Zusammenlagerung der Untereinheiten einer Steuerung unterliegen, und schließlich spielt die subzelluläre Lokalisation eine Rolle für die jeweilige Aktivität.

Im Falle der Telomerase konnte gezeigt werden, dass für ihre Aktivität *in vitro* nur die beiden Komponenten TERC und TERT essentiell sind (Weinrich et al., 1997; Beattie et al., 1998). Da die RNA-Untereinheit TERC in allen Zellen konstitutiv exprimiert wird (Avilion et al., 1996) und die Enzymaktivität nachweislich gut mit der Expression von TERT korreliert (Nakamura et al., 1997; Kolquist et al., 1998), kann man schließen, dass dies der limitierende Faktor ist. Der folgende Abschnitt soll sich deshalb auf die transkriptionelle Kontrolle von TERT beschränken.

Die Promotoren eukaryotischer Gene können verschiedene regulatorische Sequenzen enthalten. Dem Promotor des humanen TERT Gens fehlen zwar TATA- und CAAT-Boxen, doch findet man stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts CG-reiche Sequenzen (Cong et al., 1999; Wick et al., 1999). Besitzen Promotoren nur die so genannten CpG-Inseln, werden deren Gene im Allgemeinen mit geringer Rate transkribiert. Man interessierte sich zuerst für Faktoren, welche TERT-Expression aktivieren. Wang et al. konnten 1998 zeigen, dass das Onkoprotein c-Myc als aktivierender Transkriptionsfaktor der TERT-Expression agiert (Wang et al., 1998). Myc bindet zusammen mit Max als Heterodimer die spezifische Sequenz CACGTG, die als E-Box bezeichnet wird. Beide Proteine gehören zu einer Genfamilie, welche durch eine N-terminale Aktivierungsdomäne und einen am C-Terminus lokalisierten basischen Helix-loop-Helix-Zipper gekennzeichnet sind. Über letzteren erfolgt die Bindung an E-Boxen verschiedener Promotoren. Nachdem gezeigt wurde, dass es eine Kern-Promotor-Sequenz gibt, welche die 181 bp vor dem Transkriptionsstart umfasst, die für die Expression von TERT essentiell ist (Takakura et al., 1999), konnte ein weiterer Transkriptionsfaktor als TERT-Aktivator identifiziert werden. Kyo et al. Beschrieben im Jahr 2000 SP1, welches an

CG-Boxen bindet, mit Myc kooperiert und die TERT-Expression aktiviert (Kyo et al., 2000). So führt die Überexpression von Myc und Max zu einer erhöhten TERT-Expression, die durch SP1-Bindung an CG-Boxen weiter unterstützt wird. Durch Mutationsanalysen der jeweiligen Sequenzen kommt es zu einer Reduktion der Promotoraktivität. Untersuchungen an immortalisierten oder transformierten Zellen mit erhöhter Telomeraseaktivität zeigen dementsprechend hohe Level von Myc, Max und SP1.

Ebenfalls im Jahr 2000 wurde ein Mechanismus der TERT-Repression von Güneş et al. beschrieben, der das Heterodimer Mad1/Max als Gegenspieler zu Myc/Max identifiziert. Hier konnte gezeigt werden, dass Mad1/Max während der Differenzierung von Zellen *in vitro* induziert wird und die TERT-Expression inhibiert (Günes et al., 2000). Beide Heterodimere konkurrieren um die Bindung an dieselbe Sequenz und so kann Max je nach Interaktionspartner zur Aktivierung oder Repression von TERT beitragen. Da die Promotorregion des TERT Gens mehrere E-Boxen enthält, wurde von einer weiteren Arbeitsgruppe untersucht, ob die Proteine USF1 und USF2 (upstream stimulatory factors), welche an E-Box-Sequenzen binden, ebenfalls an der TERT Regulation beteiligt sind. Es zeigte sich, dass sowohl in Telomerase-negativen als auch in Telomerase-positiven Zellen USF1 und USF2 als Heterodimere mit dem TERT Promotor assoziiert sind und in Kombination mit dem Protein p300 in bereits immortalisierten Zellen eine Aktivierung bewirken (Goueli & Janknecht, 2003). Diese Autoren konnten kurz danach einen weiteren Mechanismus der TERT Aktivierung aufzeigen. Die Onkoproteine Her2, Ras und Raf können die TERT Expression stimulieren, indem sie die Phosphorylierung eines spezifischen Transkriptionsfaktors über den ERK MAP-Kinase (mitogen-aktiviertes Protein) Signalweg initiieren (Goueli & Janknecht, 2004). Der Transkriptionsfaktor ist ER81 und gehört zu der Familie der ETS Transkriptionsfaktoren. Dieser Mechanismus der Telomeraseregulation ist vor allem in Bezug auf Brustkrebs interessant, da der Transmembranrezeptor Her2 in 20-30 % aller Brusttumore überexprimiert vorliegt und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Her2 ist jedoch nicht nur ein Marker für bösartige Formen des Brustkrebs sondern selbst auch Angriffspunkt einer Therapie durch den Antikörper Herceptin. Aus der Familie der ETS Transkriptionsfaktoren kennt man das Protein, welches ebenfalls durch Her2 reguliert wird und mit humanen Brusttumoren in Verbindung steht (Chang et al., 1997; Eckel et al., 2003). Da das TERT Gen in normalen somatischen Zellen nicht exprimiert wird, sind für die Aufklärung der Regulation natürlich nicht nur Aktivatoren interessant, sondern auch die reprimierenden Mechanismen. Hierbei spielt offenbar nicht nur der Promotor sondern auch die proximale Genregion eine Rolle. Die ersten beiden Exons des TERT Gens enthalten

Elemente, die Repression ermöglichen (Renaud et al., 2003). Der CCCTC-bindende Faktor CTCF ist in Telomerase-negativen Zellen an diese Region gebunden. Wird CTCF mittels siRNA herunterreguliert, führt dies zu einer Derepression des TERT Gens (Renaud et al., 2005). CTCF wird als Kandidat für die Tumorsuppression in Brustkrebs angesehen, da der Genlocus, der für CTCF kodiert, auf dem langen Arm des Chromosoms 16 liegt. In Mammakarzinomen ist diese Region oft von LOH (loss of heterozygosity) betroffen (van Wezel et al., 2005). Ein weiterer Mechanismus der TERT Repression wurde von He Li und seinen Kollegen beschrieben. Sie konnten zeigen, dass das durch den Wachstumsfaktor TGF-beta aktivierte Smad3 Protein mit Myc am TERT Promotor interagiert und so dessen aktivierende Wirkung inhibiert (Li et al., 2006). Neben Smad3 kann über den TGF-beta Signalweg auch das Protein TAK1 (TGF-beta activated kinase1) an der Repression von TERT teilnehmen. Wird TAK1 durch TGF-beta aktiviert, rekrutiert es Histondeacetylasen zu SP1 an den TERT Promotor und führt so zu einer Hemmung der Transkription (Fujiki et al., 2007). Die Liste aller Faktoren, die einen Einfluss auf die TERT Expression haben, lässt sich beliebig verlängern, so sollen hier nur einige noch zusammengefasst genannt sein: Hif1 (Hypoxia-inducible factor 1) (Nishi et al., 2004; Yatabe et al., 2004), MZF2 (myeloid – specific zink finger protein 2) (Fujimoto et al., 2000), E2F-1 (Crowe et al., 2001), WT1 (Wilms' Tumor 1) (Oh et al., 1999), p53 (Kusumoto et al., 1999; Kanaya et al., 2000; Xu et al., 2000).

Die Tatsache, dass der TERT Promotor mehrere CpG-Inseln im Bereich des ATG-Startkodons enthält (Cong et al., 1999; Wick et al., 1999), legt nahe, dass die Regulation von TERT durch Methylierung beeinflusst werden kann. Generell geht man davon aus, dass methylierte DNA-Bereiche stillgelegt sind (Robertson & Jones, 2000), doch für den TERT Promotor konnten gegenteilige Beobachtungen gemacht werden. In Telomerase-positiven Tumorzellen fand man den Promotor hypermethyliert, wohingegen er in normalen Geweben mit fehlender Telomeraseaktivität hypomethyliert vorlag (Devereux et al., 1999; Dessain et al., 2000; Guilleret et al., 2002). In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung wurde die Rolle der TERT Promotor Methylierung genauer untersucht und man kam zu dem Ergebnis, dass eine vollständige Methylierung des Promotors mit einer transkriptionellen Repression von TERT einherging. In Telomerase-positiven Zellen jedoch waren nicht alle CpG-Inseln des Promotors methyliert und es konnte gezeigt werden, dass eine gezielte, partielle Hypomethylierung im Bereich des Kernpromotors für die TERT Expression notwendig ist (Renaud et al., 2007).

## 1.5 Telomerase im Mausmodell

Mäuse (*Mus musculus*) sind ein beliebtes Modellobjekt der Forschung. Sie sind dem Menschen in biologischer und genetischer Hinsicht sehr ähnlich, so dass sich viele an Mäusen gewonnene Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen. Am Mausmodell lassen sich viele Fragestellungen der Forschung einfacher untersuchen, da sie einen schnellen Generationswechsel besitzen. Bestimmte Untersuchungen von menschlichem Material gestalten sich praktisch schwierig und sind auch ethisch bedenklich. Genetisch veränderte Mäuse sind daher zu einer wichtigen Quelle neuer Erkenntnisse geworden.

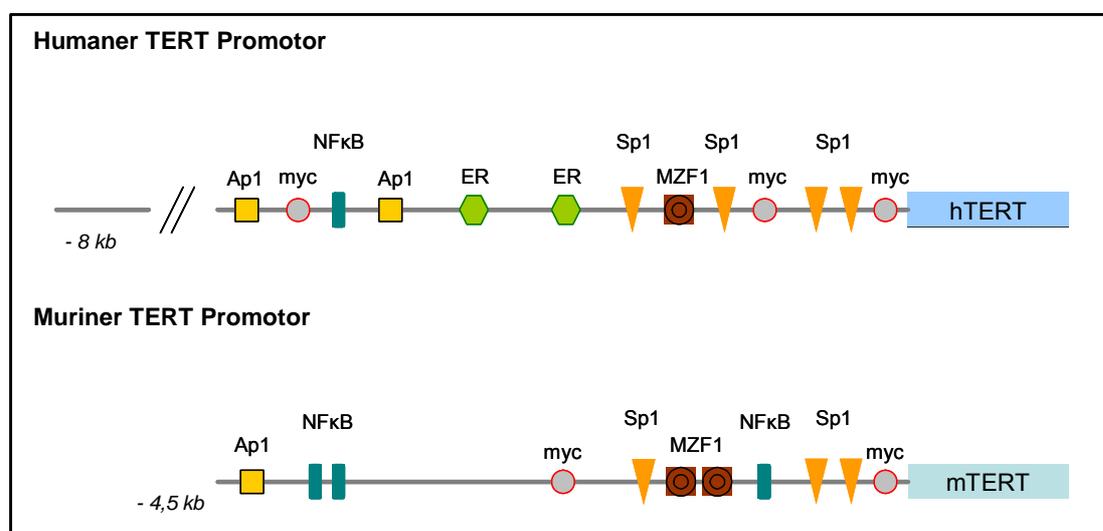
Zum Repertoire genetischer Veränderungen an Mäusen gehört seit einiger Zeit die Generierung von *knock-out* Tieren. Hierbei wird ein Gen praktisch ausgeschaltet um beobachten zu können, welche Auswirkungen dem folgen.

Die erste Telomerase *knock-out* Maus wurde 1997 von Blasco beschrieben. Das ausgeschaltete Gen war dabei die RNA-Komponente der Telomerase mTERC (Blasco et al., 1997). Überraschenderweise waren die Mäuse lebensfähig und entwickelten sich phänotypisch normal. Man hatte doch aber angenommen, dass die Telomerase essentiell für die korrekte Replikation von Zellen ist? Eine Erklärung fand man in der Tatsache, dass Mäuse verglichen mit anderen Tieren relativ lange Telomere besitzen (Kipling & Cooke, 1990). Die Telomerlänge des Menschen beträgt etwa 10-15 kb (de Lange et al., 1990; Harley et al., 1990), bei Mäusen jedoch mindestens 40 kb (Zijlmans et al., 1997). So wurde also spekuliert, dass die Mäuse nicht sofort unter Konsequenzen von Telomerverkürzung zu leiden hätten und man verpaarte homozygote mTERC *knock-out* Mäuse für mehrere Generationen untereinander. Die sukzessive Verkürzung der Telomere von Generation zu Generation brachte schließlich einen Phänotyp zu Tage, der speziell in stark proliferativ aktiven Organen Defekte aufwies (Lee et al., 1998). Ab der sechsten Generation sind männliche Mäuse infertil und es konnte beobachtet werden dass hämatopoetische Zellen des Knochenmarks und der Milz in ihrer Proliferation eingeschränkt waren. Durch die stetige Telomerverkürzung kommt es wie erwartet zu Chromosomenfusionen und einem Ungleichgewicht der Chromosomenanzahlen (Blasco et al., 1997). Auch wenn die homozygoten mTERC *knock-out* Mäuse der späteren Generationen durchaus lebensfähig waren, zeigten sie im Vergleich zu Wildtypmäusen generell eine geringere Lebenserwartung, eine verminderte Stressantwort und Anzeichen von Alterung wie eine langsamere Wundheilung und Graufärbung des Fells. Zusätzlich wurde beobachtet, dass spontan Tumore auftraten, obwohl die Mäuse keine funktionelle Telomerase bilden konnten (Rudolph et al., 1999). Die

Telomererhaltung oder –verlängerung, die Tumorzellen das Überleben sichert, konnte wahrscheinlich über den ALT-Mechanismus erreicht werden (Niida et al., 2000; Chang et al., 2003). In ALT-positiven Zellen werden DNA-Sequenzen von einem Telomer zum anderen kopiert, was vermutlich auf homologer Rekombination beruht (Dunham et al., 2000).

Im Jahr 1999 beschrieb eine japanische Arbeitsgruppe erstmals eine TERT knock-out Maus. In ihren Geweben konnte keinerlei Telomeraseaktivität nachgewiesen werden und sie besaß in den ersten zwei Generationen ebenfalls keine makroskopisch oder mikroskopisch sichtbaren Auffälligkeiten (Yuan et al., 1999). Wurden TERT-defiziente Mäuse aber für mehrere Generationen miteinander verpaart, so trat ab der vierten Generation häufig Infertilität auf und die Größe der geborenen Mäuse nahm stetig ab, bis es in der achten Generation keine Nachkommen mehr gab. In späten Generationen der TERT *knock out* Mäuse konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden wie bei TERC-Defizienz (Erdmann et al., 2004). *Knock-out* Mäuse sind also ein wichtiges Werkzeug, um zu verstehen, wie Telomere funktionieren und welche Rolle die Telomerase bei Prozessen wie Alterung und Krebsentstehung spielt. Die beschriebenen Beispiele verdeutlichen die *in vivo* Relevanz der Telomere und der Telomerase.

Will man nun Studien zur Telomerase an Mäusen durchführen, so muss man zuerst untersuchen, wie die endogene Telomerase der Maus reguliert wird. Bei der Maus ist die Expression der TERT-Untereinheit einer weniger stringenten Kontrolle unterworfen als beim Menschen. In den meisten Geweben der Maus lässt sich deshalb Telomeraseaktivität nachweisen (Prowse & Greider, 1995).



**Abbildung 1.4:** Vergleichende Darstellung des humanen und murinen TERT Promotors. Schematisch und nicht maßstabsgetreu

Im Hinblick auf die Promotoren der TERT Gene gibt es zwar Gemeinsamkeiten zwischen Mensch und Maus, jedoch auch bedeutende Unterschiede. Es besteht nur eine geringe Sequenzhomologie der Promotoren zwischen den Spezies, die für die unterschiedliche Regulation der TERT Gene verantwortlich gemacht wird. Diese Annahme wird unterstützt durch die Entdeckung einer nicht konservierten CG-Box, die im humanen Promotor an der Repression beteiligt ist, dem mTERT Promotor jedoch fehlt (Horikawa et al., 2005).

Da die Signalwege der Regulation und die daran beteiligten Übermittler wie Transkriptionsfaktoren zwischen den Spezies in der Regel hoch konserviert sind, wird eine differentielle Expression oft über Sequenzunterschiede der Promotoren erreicht.

### **1.6 Das hTERTp-*lacZ* Mausmodell**

Wie sich in den letzten Jahren intensiver Forschung herausstellte, ist die Funktion der Telomere und der Telomerase zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert. Es zeigt sich auch, dass die Signalmechanismen trotz unterschiedlicher Telomerlängen erhalten sind. Zwischen Mensch und Maus wurden Unterschiede hinsichtlich Telomerlängenregulation und Expression der TERT-Untereinheit der Telomerase gefunden. Deshalb lassen sich Untersuchungen an Mäusen in Bezug auf Telomerase nicht einfach auf den Menschen übertragen.

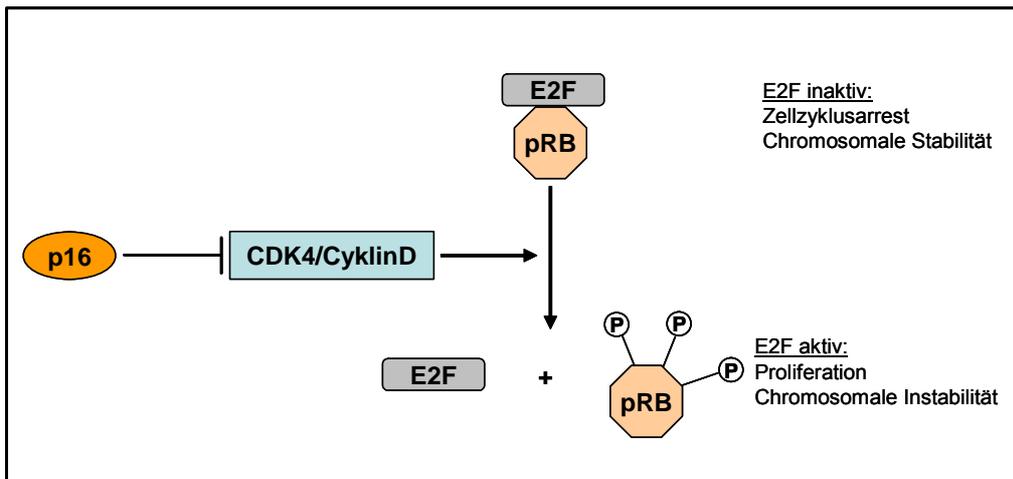
In unserer Arbeitsgruppe wurde von Dr. Çağatay Güneş (Heinrich-Pette-Institut) ein neues transgenes Mausmodell generiert, welches zur Aufklärung der Regulation des humanen TERT Promotors beitragen kann. Hierbei wurde das bakterielle *lacZ* Gen als Reporter hinter ein 8 kb langes Fragment des humanen TERT Promotors fusioniert und als Transgen in Mäuse eingebracht. Die ersten Untersuchungen bezüglich der humanen Promotorregulation zeigten, dass dieser eher human-ähnliche Aktivität aufwies (Ritz et al., 2005). So war die LacZ Expression, welche in diesem Modell die Aktivität des humanen TERT Promotors widerspiegelt, in den meisten Organen der Maus schwach oder nicht vorhanden. In Hoden jedoch, die auch beim Menschen eine hohe Telomeraseaktivität besitzen, konnten große Mengen von LacZ – also eine hohe hTERT Promotoraktivität nachgewiesen werden. Die Expression des Reportergens wurde auch auf ihre Zelltypspezifität untersucht und es konnte gezeigt werden, dass sie sich in den Hoden auf die Spermatogonien und Spermatozyten beschränkte. Parallel zum LacZ-Reporter konnte die endogene mTERT Expression bestimmt und mit der Telomeraseaktivität korreliert werden. Wie schon erwartet, fand man die Maus-Telomerase weniger stringent reguliert.

Dieses Modell bietet sich also an, den humanen TERT Promotor unter physiologischen Bedingungen *in vivo* zu analysieren. Im Vergleich zu Zellkulturexperimenten befinden sich die Zellen hier in ihrem natürlichen Gewebeverband. Nachdem festgestellt wurde, dass der humane TERT Promotor in gesunden Mäusen human-ähnlich reguliert wurde, sollte seine Aktivität auch während der Tumorentstehung beobachtet werden. In dieser Arbeit wurden hTERTp-*lacZ* transgene Mäuse in den BALB/c Hintergrund eingekreuzt und mit WAP-T transgenen Tieren, die Mammakarzinome entwickeln, verpaart. Diese bitransgenen Mäuse hatten den Vorteil, dass sich Mammatumore induzieren ließen und zu verschiedenen Zeitpunkten die Aktivität des humanen und auch murinen TERT Promotors analysiert werden konnte.

### 1.7 Das WAP-T Mausmodell

Einige Viren der Papovavirusgruppe haben die interessante Eigenschaft, in Tieren Tumore zu induzieren. Eines dieser DNA-Tumorviren wurde zuerst aus Affen isoliert und daher Simian Virus 40 oder kurz SV 40 genannt. Die Replikation dieser Viren lässt sich in zwei getrennte Stadien einteilen: *früh* und *spät*. Während des *frühen* Stadiums wird die *frühe Region* der viralen DNA transkribiert. Da in dem WAP-T Mausmodell nur die Gene der *frühen Region* exprimiert werden, sind sie hier kurz beschrieben. Die RNA kodiert für drei verschiedene Proteine, die durch alternatives Spleißen entstehen: das große T-Antigen (T-Ag), das kleine T-Antigen (st) und das 17 kT Protein. Für die Tumorgenese ist allein die Expression des T-Ag relevant (Thomas et al., 2002). Es wird als Onkogen eingestuft, da es in der Lage ist, Kulturzellen zu transformieren und *in vivo* Tumorwachstum zu induzieren (Butel & Lednický, 1999). Die Transformation erreicht das T-Ag, indem es an zelluläre Proteine bindet und deren Funktion inaktiviert. Zu diesen Proteinen gehören die Tumorsuppressoren pRb und p53. In seiner normalen Funktion hemmt pRb die E2F-abhängige Transkription zahlreicher Gene (Bartek et al., 1997), deren Produkte zur DNA-Synthese benötigt werden. Wenn im Verlauf der G1-Phase des Zellzyklus pRb phosphoryliert wird, dissoziiert es von E2F und die Zelle wird irreversibel auf den Start der DNA-Synthese festgelegt (Fanning, 1998). Die Phosphorylierung von pRb wird durch den aktiven Cdk4-Cyclin-D-Komplex gestartet (s. Abb. 1.5) und durch weitere Cyclin-abhängige Kinasen zu Ende geführt. Das Protein p53 ist entscheidend an der Regulation desjenigen Kontrollpunkts beteiligt, der das Wachstum von Zellen mit geschädigter DNA in der G1-Phase arretiert. Wenn der durch p53 gesteuerte Kontrollpunkt nicht ordnungsgemäß den Zellzyklus anhält, kann sich geschädigte DNA

verdoppeln, wodurch Mutationen entstehen und DNA-Rearrangements erfolgen. Als DNA-bindender sequenz-spezifischer Transkriptionsfaktor aktiviert p53 verschiedene Gruppen von Zielgenen, um das Schicksal einer geschädigten Zelle festzulegen. Zu diesen Genen gehören Zellzyklusinhibitoren, DNA-Reparatur assoziierte Gene und Apoptose-Induktoren. Sind nun pRb und p53 durch T-Ag funktionell inhibiert, tritt die Zelle unweigerlich in die S-Phase ein. Zellzyklusarrest und Apoptose sind blockiert und eine hohe Proliferation ist die Folge.



**Abbildung 1.5:** Kontrolle des Zellzyklus durch p16. Die Bildung des CDK4/CyklinD-Komplex wird durch p16 gehemmt. Die Zelle verharrt in der G1-Phase des Zellzyklus, da pRb den Transkriptionsfaktor E2F blockiert.

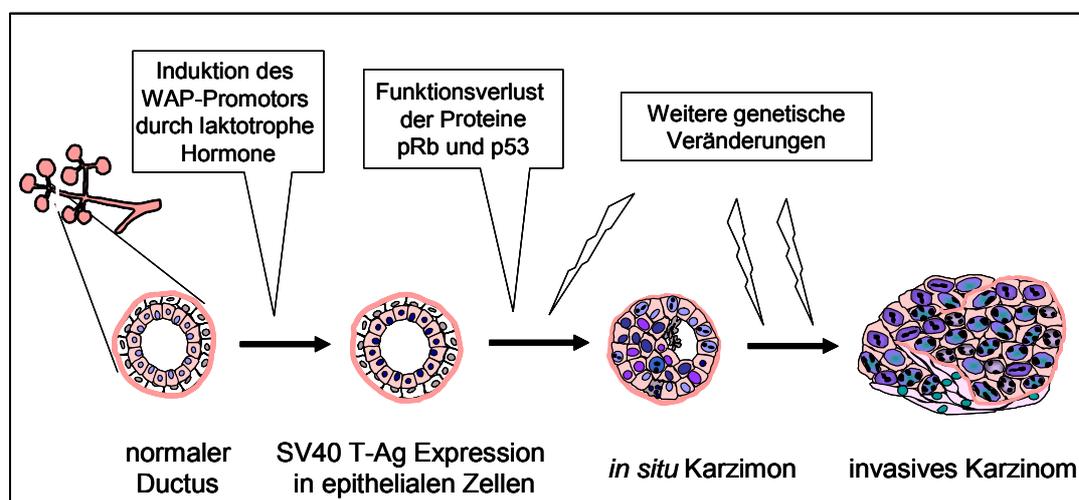
Im WAP-T Mausmodell ist die *frühe Region* des SV 40 Genoms unter der Kontrolle des murinen WAP-Promotors (whey acidic protein) als Transgen vorhanden (Schulze-Garg et al., 2000). Der WAP-Promotor wird in Mammaepithelzellen durch laktotrophe Hormone wie Prolaktin und Östrogen, aber auch durch Hydrocortison und Insulin aktiviert (Burdon et al., 1991). So wird die Expression des T-Ag induziert, indem die Mäuse verpaart werden. Zum Ende der Schwangerschaft und während der Laktation wird das Transgen spezifisch in Epithelzellen des Brustdrüsengewebes exprimiert (Pittius et al., 1988). Nach der Involution des Mammagewebes wird die Expression des T-Ag in den meisten Zellen eingestellt, doch verbleiben einige lobulo-acinäre Einheiten, deren Expression hormon-unabhängig weitergeführt wird. Die transformierende Aktivität des T-Ag trägt hier zur Entstehung von Dysplasien und intraepithelialen Neoplasien sowie zur Entwicklung von duktalem *in situ* Karzinomen bei.

Das WAP-T Mausmodell wurde in Mäusen des BALB/c Inzuchtstamms etabliert, da diese eine Prädisposition für Mammakarzinome tragen (Kuperwasser et al., 2000; Sherr, 2001). Der *Cdkn2a*-Lokus ist hier von einer Punktmutation betroffen, die sich auf zwei Gene mit

überlagerten Leserastern auswirkt. Von zwei unterschiedlichen Promotoren gesteuert (Quelle et al., 1995), befinden sich an diesem Locus die Gene für p16 (INK4a, Inhibitor von CDK4) und ARF (alternative reading frame, p19). Das Protein p16 agiert in seiner normalen Funktion als Tumorsuppressor, indem es die Cyclin-abhängige Kinase CDK4 inhibiert und somit die Phosphorylierung des pRb Proteins unterbindet. Dies führt zu einem Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase. Punktmutiertes p16 hat hierbei eine reduzierte Aktivität (Zhang et al., 1998).

Die Funktion des ARF-Proteins ist durch die Mutation nicht beeinträchtigt. Zu einem höheren Tumorrisiko der BALB/c Tiere tragen zwei weitere Punktmutationen im *Prkdc*-Locus bei. Das betroffene Protein ist an der Reparatur von DNA-Doppelsträngen beteiligt und sein Verlust führt zu erhöhter genomischer Instabilität (Yu et al., 2001).

Die Kombination der BALB/c Prädisposition mit der Expression des WAP-T Transgens führt durch die Begünstigung weiterer genetischer Alterationen zur Entstehung von *in situ* Karzinomen in den duktalem und acinären Epithelzellen des Mammagewebes (s. Abb. 1.6). Diese Tumore weisen in ihrer Morphologie große Ähnlichkeit mit dem humanen DCIS (ductal carcinoma *in situ*) auf (Schulze-Garg et al., 2000). In der Maus wird hierfür die Bezeichnung *in situ* Karzinom verwendet.



**Abbildung 1.6:** Entstehung von Mammakarzinomen im WAP-T Mausmodell: Laktotrophe Hormone induzieren den WAP-Promotor in Epithelzellen des Mammagewebes und T-Ag wird exprimiert. Es bindet und inaktiviert die Tumorsuppressor-Proteine p53 und pRB. Der Kontrollpunkt der G1-Phase des Zellzyklus kann ungehemmt überschritten werden. Nach Entstehung initialer Dysplasien entwickeln sich durch zusätzliche genetische Alterationen im weiteren Verlauf Hyperplasien, duktalem *in situ* Karzinome und schließlich duktalem, invasivem Mammakarzinome.

Die Analyse menschlicher Biopsien gestaltet sich aus verschiedenen Gründen als schwierig. Es besteht nicht nur ein Problem in der geringen Verfügbarkeit von Material für molekularbiologische Untersuchungen sondern auch in der Qualität des bei Operationen gewonnenen Gewebes. Ebenso ist die genetische Variabilität der Spender ein Hindernis bei der Auswertung und Analysen von humanem Tumormaterial stellen nur einzelne Momentaufnahmen der gesamten Entwicklung dar.

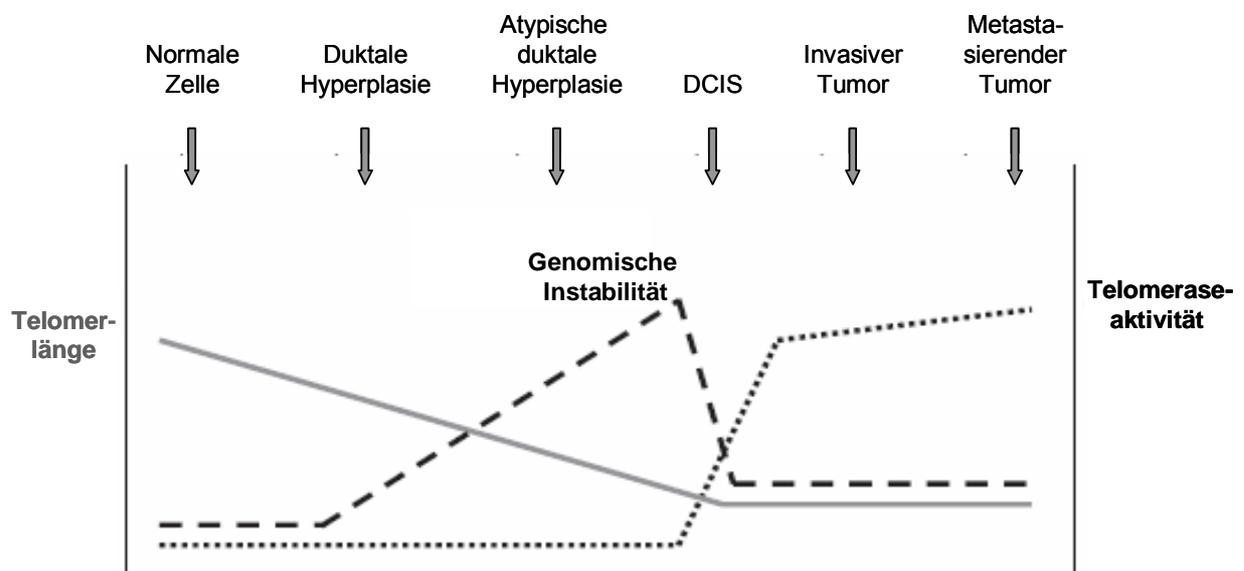
Dieses transgene Mausmodell eignet sich also zur Untersuchung von human-ähnlichen Mammakarzinomen. Die Vorteile bestehen in der Induzierbarkeit der Tumore und der Möglichkeit, verschiedene Stadien der Tumorprogression vor einem genetisch homogenen Hintergrund zu untersuchen.

### **1.8 Telomerase in Mammakarzinomen**

Unter dem Sammelbegriff Mammakarzinom werden maligne Tumore zusammengefasst, die von Brustdrüsenepithelien ausgehen und Merkmale von Milchgängen (duktale Karzinome) oder von lobulären Drüsenläppchen (lobuläre Karzinome) besitzen. In 85 % der Fälle sind dies duktale Karzinome. Es handelt sich beim menschlichen DCIS (ductal carcinoma *in situ*) um entartete Zellen, die jedoch die Grenze des Milchgangs, die Basalmembran noch nicht durchbrochen haben („am Ort“, *in situ*). Ein solches Frühkarzinom ist immer heilbar, da es keine Tochterzellen austreut. Wenn der Tumor jedoch die Barriere in die Nachbarschaft durchbricht, nennt man das Wachstum *invasiv*. Eine genauere Einschätzung des Risikos für die Patientin kann der Van-Nuys-Prognoseindex liefern, der feingewebliche Eigenschaften, Größe und den Sicherheitsabstand bei der operativen Entfernung berücksichtigt. DCIS entsteht fast immer an einer Stelle in der Brust, breitet sich aber oft nicht kontinuierlich aus, so dass der Eindruck entsteht, es sei an verschiedenen Stellen gleichzeitig entstanden. Ein Problem bei der Diagnose DCIS ist, dass selbst bei sorgfältiger Aufarbeitung des entfernten Gewebes durch den Pathologen nie absolut sicher auszuschließen ist, dass doch an irgendeiner Stelle Krebszellen die Wand eines Milchganges durchbrochen haben und damit aus einer "Krebsvorstufe" ein invasives "richtiges" Karzinom geworden ist. Je größer das DCIS ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer nicht sichtbaren Invasion.

Bisher konnte Telomeraseaktivität in etwa 80-90 % der menschlichen DCIS Biopsien nachgewiesen werden, während über 90 % der invasiven Brustkarzinome Telomeraseaktivität aufwiesen (Shay & Bacchetti, 1997). Eine Hypothese der Telomerasereaktivierung während

der Krebsentstehung basiert auf der zunehmenden Verkürzung der Telomere bei jeder Zellteilung bis hin zu einer kritischen Telomerlänge (s. Abb. 1.3). Dementsprechend wird die Telomerase wieder aktiv, um den Verlust genetischen Materials zu verhindern. In fortschreitenden Brusttumoren wurde zusätzlich durch CGH-Analysen festgestellt, dass die chromosomale Instabilität während der frühen Stadien stark zunimmt und damit auch Aneuploidie einhergeht (Aubele et al., 2000; Gong et al., 2001). Es kann also angenommen werden, dass die Reaktivierung der Telomerase einen Rettungsversuch darstellt, um die normale Telomerfunktion wiederherzustellen.

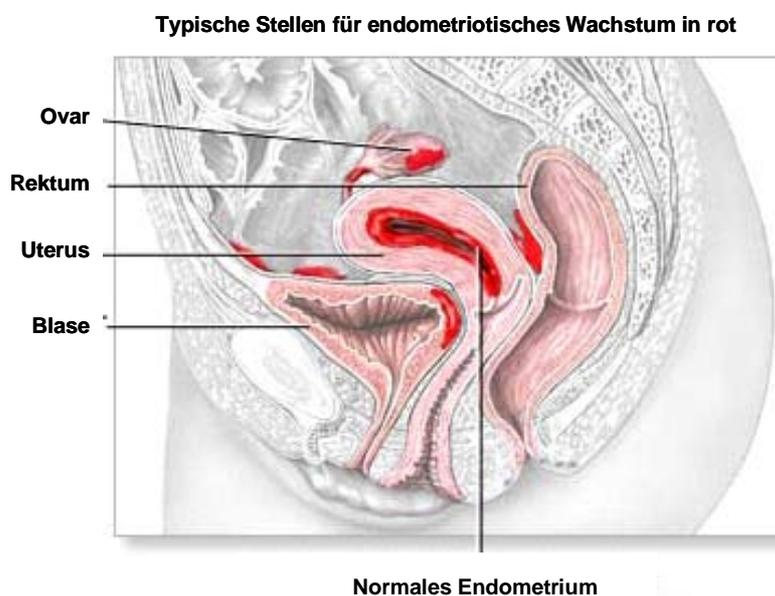


**Abbildung 1.7:** Modell der Dynamik von Telomerlänge und Telomeraseaktivität während der Entwicklung von Brustkrebs. Adaptiert (Artandi et al., 2002)

Über den genauen Zeitpunkt der Reaktivierung von Telomerase können noch keine Aussagen gemacht werden. Ein Problem hierbei stellen die Untersuchungsmethoden dar. Je nachdem, ob die Proben mit RT-PCR auf TERT mRNA Expression, mittels TRAP-Assay auf Enzymaktivität oder durch immunhistochemische Färbung auf das TERT Protein untersucht wurden, stellen die Autoren ihre Ergebnisse unterschiedlich dar. Die Tatsache, dass die jeweils benutzten Proben nicht einheitlich behandelt und begutachtet wurden, zudem genetisch stark variieren, macht es fast unmöglich, die bisherigen Veröffentlichungen miteinander in Einklang zu bringen.

## 1.9 Telomerase im Krankheitsbild Endometriose

Die Bezeichnung "Endometriose" leitet sich von dem medizinischen Begriff für die Gebärmutter Schleimhaut (Endometrium) ab. Die Endometriose ist eine Erkrankung, bei der sich Gewebe, das der Gebärmutter Schleimhaut in Aufbau und Funktion sehr ähnlich ist, außerhalb der Gebärmutter ansiedelt. Am häufigsten betroffen sind die Bereiche im Unterbauch wie Eierstöcke, Eileiter, Harnblase, Bauchfell oder Darm (s. Abb. 1.8). Sehr selten kann es aber auch Endometrioseherde an der Lunge oder am Brustfell geben. Endometriose ist eine chronische Erkrankung, die ohne Behandlung häufig eine fortschreitende Entwicklung hat. Die entstehenden Zysten und Verwachsungen sind gutartig. Das Risiko einer bösartigen Entartung besteht, doch ist nicht ausreichend belegt, ob dieses tatsächlich mit der Endometriose assoziiert ist. (Somigliana et al., 2006). Bisher gilt Endometriose als nicht vollständig heilbar, weil immer wieder Rezidive auftreten können. Zwar können die Beschwerden durch eine gezielte Behandlung vollständig verschwinden und die Fruchtbarkeit der betroffenen Frauen verbessert werden, doch die Krankheit kann wieder ausbrechen.



adaptiert **ADAM.**

**Abbildung 1.8:** Anatomischer Querschnitt eines weiblichen Unterleibs mit rot markierten Stellen für das Wachstum des Endometriums. Den Uterus kleidet normale Schleimhaut aus, wohingegen sich bei der Endometriose ektopisches Endometrium außerhalb des Uterus ausbreitet.

Endometriose ist eine sehr häufig auftretende Erkrankung. Man geht davon aus, dass ungefähr 5 bis 15 % aller Frauen in der hormonell aktiven Phase davon betroffen sind. Etwa 35 bis

50 % der Betroffenen haben, obwohl die Krankheit bei ihnen nachgewiesen werden kann, keinerlei Beschwerden. Bei etwa 60 bis 80 % jener Frauen, die unter stark unterschiedlichen Beschwerden leiden, kann Endometriose diagnostiziert werden.

Zur Entstehung der Endometriose gibt es verschiedene Theorien (Vinatier et al., 2001). So wurde vor allem diskutiert, dass sich Endometrioseherde durch Umwandlung aus anderen Gewebearten bilden (Metaplasie). Andere Theorien gehen von einer Verschleppung von Endometriumzellen aus der Gebärmutter durch Blut- und Lymphgefäße aus (Donnez et al., 2002). Als ein wesentlicher Faktor für das ektopische Wachstum des Endometriums wird hierbei die so genannte retrograde Menstruation gesehen (Ueki, 1991). Dabei wird angenommen, dass durch die Regelblutung Endometriumzellen aus der Gebärmutter z.B. in die Eileiter verschleppt werden. Entscheidend für die Anlagerung von Endometriumzellen außerhalb der Gebärmutter scheinen vor allem immunologische Prozesse zu sein (Siristatidis et al., 2006). Es wird angenommen, dass die verschleppten Zellen nur dann in anderen Organen einwachsen können, wenn das Immunsystem überfordert ist oder nicht ausreichend arbeitet. Die genauen Prozesse bei der Entstehung von Endometriose sind jedoch noch unbekannt.

Das Wachstum von Endometriumzellen außerhalb der Gebärmutter kann als spannendes Modellsystem für verschiedene Fragestellungen dienen. Es wird z.B. untersucht, ob hier eine Art Metastasierung stattfindet und welche Veränderungen die Zellen unterlaufen, um an anderen Orten überleben zu können. Doch sind diese Zellen Krebszellen wirklich so ähnlich? Ein bekannter Mechanismus, wie Zellen ihre Lebensspanne deutlich erhöhen können, ist die Reaktivierung der Telomerase. Im normalen Endometrium ist sie nur in der proliferativen Phase nachweisbar (Kyo et al., 1999). In Karzinomen, die sich aus der Gebärmutter Schleimhaut entwickeln, konnte - wie in vielen menschlichen Krebsarten - erhöhte Telomeraseaktivität gefunden werden (Zhou et al., 2006). Bislang wurde nicht untersucht, inwieweit das Enzym Telomerase für Endometriose eine Rolle spielt. Möglicherweise trägt eine dauerhafte Aktivierung zum Überleben der Zellen bei.

### 1.10 Fragestellung

In dieser Arbeit sollte die Regulation des humanen TERT Promotors während der Entstehung und Progression von Brusttumoren in der Maus analysiert werden. Das *TERT* Gen kodiert für die katalytische Untereinheit des Enzyms Telomerase. Dessen Aktivität wird vorwiegend auf transkriptioneller Ebene reguliert, indem TERT fein gesteuert exprimiert wird. Daher sind die TERT Promotoren der verschiedenen Spezies eine wichtige Regulationseinheit. Die Telomerase ist für die unbegrenzte Proliferation von Zellen notwendig, doch ist sie in den meisten humanen Zellen inaktiv – diese Zellen altern. Stammzellen jedoch nutzen die Telomerase, um ihre Teilungsfähigkeit zu erhalten. Eine wesentliche Eigenschaft von Tumorzellen ist ihre unbegrenzte Proliferationskapazität. Daher verwundert es nicht, dass im Gegensatz zu normalen Zellen in der Mehrheit menschlicher Tumore Telomeraseaktivität gefunden wird. Die Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass die Repression der Telomerase während der Embryonalentwicklung beim Menschen einen Schutzmechanismus gegen die Tumorentstehung darstellt. Die Telomerase könnte daher nicht nur als diagnostischer bzw. prognostischer Marker dienen, sondern auch selbst als Angriffspunkt einer gezielten Krebstherapie genutzt werden. Dazu ist es notwendig aufzuklären, welche Mechanismen der Reaktivierung dieses Enzyms zugrunde liegen? Auch in Mammakarzinomen findet man erhöhte Telomeraseaktivität in über 90 % der untersuchten Biopsien und es stellt sich die Frage, inwieweit dieses Enzym an der Tumorentstehung oder Progression beteiligt ist. Um die Regulation des humanen TERT Promotors während der Entstehung und Progression von Mammatumoren zu analysieren, wurden hTERTp-*lacZ* transgene Tiere mit WAP-T Mäusen im BALB/c Hintergrund verpaart. Diese tragen die frühe Genregion des SV40 als induzierbares Transgen und entwickeln durch Expression des Transgens Mammakarzinome. Im Fokus standen zum einen die Frage, ob bzw. zu welchem Zeitpunkt eine Reaktivierung der Promotoraktivität während der Tumorgenese stattfindet und zum anderen, welche Korrelation zwischen putativen Regulatoren und der TERT Expression während der Tumorgenese besteht. Weiterhin sollten die murinen Tumore mittels Analysen von typischen Tumormarkern genetisch charakterisiert werden, um zu prüfen, inwieweit sie humanen Tumoren gleichen.

Die Regulation der Telomerase wurde zusätzlich in einem humanen Krankheitsbild betrachtet. Es wurden Proben von Patientinnen, die an Endometriose litten, auf TERT Expression und Telomeraseaktivität hin untersucht. Bisher war nicht bekannt, ob zwischen normalem oder krankhaft wachsendem Endometrium eine Veränderung in der Telomeraseregulation besteht.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Material

2.1.1 Geräte	Typ/Model	Hersteller
Brutschrank	B6060	HERAEUS Instruments, Düsseldorf
Eismaschine	AF 30	Scotsman, Vernon Hills IL, USA
Entwicklermaschine	Classic E.O.S.	AGFA, Köln
Feinwaage	H54AR	Mettler Toledo, Gießen
Fettstift		DakoCytomation, Glostrup, DK
Filterpapier	Whatman 3MM	Schleicher&Schüll, Dassel
Gamma-Zähler	LS 6500	Beckman Coulter, Fullerton CA, USA
Gefrierschrank	-80°C	HERAEUS Instruments, Düsseldorf
Gefriertruhe	-80°C	HERAEUS Instruments, Düsseldorf
Geldokumentation	BioDocAnalyze	Whatman Biometra, Göttingen
Gelkammer	Model 40-0911	Peqlab, Erlangen
Gelkammer	Horizon 11.14	Whatman Inc., Dassel
Gelkammer	Prot. Resolve Maxi DC	Phase, Lübeck
Geltrockner	G2000	Fröbel Labortechnik, Lindau
Handschuhe	Latex, Nitril	Kimberly-Clark, Zaventem, B
Heizblock	Techne Dri-Block DB 2A	Thermo-Dux, Wertheim
Homogenisator	Fast Prep FP120	Q-Biogene, Heidelberg
Homogenisator- Röhrchen	Fast Prep Tubes	Q-Biogene, Heidelberg
Imaging Plate	Bas-IP MP2040P	Fuji Magnetic, Kleve
Inkubationsschüttler	Multitron 2	Infors AG, Bottmingen-Basel, CH
Kühlfalle	RT100A	Savant
Kühlschrank	4-8°C	Liebherr, Biberach
Magnetrührer	COMBIMAG NEO	IKA, Staufen
Magnetrührer	MR2002	Heidolph, Schwabach
Membran- Vakuumpumpe	MZ2C/1,7	Vakuubrand, Wertheim
Mikroskop	CK40	Olympus, Hamburg
Mikroskop	IMT-2	Olympus, Hamburg
Mikrotom	HM 350 SV	Microm, Walldorf
Mikrowelle		Panasonic
Mikrowelle	NN3256	Panasonic
Mini-Transilluminator		BioRad, München
Orbitalschwenker	Polymax 2040	Heidolph, Schwabach
Paraffingießstation	AP 280	Microm, Walldorf
PCR Gefäße	0,2ml	Biozym, Hess. Oldendorf
PCR Maschine	PTC-200	MJ Research, Watertown MA, USA
pH-Meter	PHM82 Standard	Radiometer, Kopenhagen, DK
Phosphoimager	Bas 2500	Fuji Magnetic, Kleve
Pipetten	20, 200, 1000µl	Gilson, Bad Camberg
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen	15 und 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	1,5 und 2ml	Eppendorf, Hamburg

## Material & Methoden

Reaktionsgefäße	0,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reinstwassersystem	Milli-Q® Academic	Millipore, Schwalbach
Röntgenfilme		CEA Deutschland GmbH, Hamburg
Schwenker	GFL3015	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Spectrophotometer	ND 1000	Peqlab, Erlangen
Spectrophotometer	Ultrosec 3000pro	Amersham pharmacia biotech, Piscataway NY, USA
Stereolupe	Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Sterilbank	HERA safe KS18	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Sterilbank	HERA safe KS12	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Stromversorgungsgerät	EPS 2A 200	Hoefer, San Francisco CA, USA
Stromversorgungsgerät	Power Pac 300	BioRad, München
Stromversorgungsgerät	Power Pac 3000	BioRad, München
Stromversorgungsgerät	Electrophoresis Powersupply	Renner GmbH, Dannstadt
Superfrost-Objektträger		Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Thermomixer	Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank	-20°C	Liebherr, Biberach
Vakuum Gewebeinfiltrationsautomat	ASP 3000	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Vibratom	VT 1000 S	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Vortexer	Vortex-Genie	Bender&Hobein AG, Zürich, CH
Waage	PM460	Mettler Toledo, Gießen
Waage	PE360	Mettler Toledo, Gießen
Waage	PB3001-S/FACT	Mettler Toledo, Gießen
Wasserbad	GFL1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zellkulturschalen		Nunc
Zentrifuge	RC50 Plus	Sorvall, Bad Homburg
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Biofuge pico	HERAEUS Instruments, Düsseldorf
Zentrifuge	Rotana 96	Hettrich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge	Omnifuge 2.0RS	HERAEUS Instruments, Düsseldorf
Zentrifuge 4°C	5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 4°C	5415 D	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.2 Chemikalien

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

Chemikalien	Hersteller
[alpha-P32]dCTP	Hartmann Analytics, Braunschweig
Acrylamid (40%) 19:1	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	USB Corporation, Cleveland USA
ChemMate™ Antibody Diluent	DakoCytomation, Glostrup, DK

## Material & Methoden

ChemMate™ DAB-Chromogen (50 x)	DakoCytomation, Glostrup, DK
ChemMate™ Peroxidase-Blocking	DakoCytomation, Glostrup, DK
ChemMate™ Protein Block	DakoCytomation, Glostrup, DK
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DMEM	Gibco (Invitrogen GmbH), Karlsruhe
DMSO	Calbiochem, San Diego, USA
dNTPs	Fermentas München
Eosin Y solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Eukitt	Kindler GmbH & Co, Freiburg
Formaldehydlösung, min. 37 % säurefrei	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, A
Magermilchpulver Frema Reform	Neuform, Lüneburg
Natrium-Pyruvat-Lösung	PAA Laboratories, Pasching, A
Nonidet®P40	Fluka Chemie, Buchs, CH
Penicillin/Streptomycin	Biochrom Ag, Berlin
peqGOLD dNTP-Set (je 25 µmol)	Peqlab, Erlangen
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tween® 20	Fluka Chemie, Buchs, CH
X-Gal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

### 2.1.3 Enzyme

#### Hersteller

DNase	Ambion
M-MLV-RT	Gibco (Invitrogen GmbH), Karlsruhe
Poteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg
Trypsin 200E/mg	E.Merck, Darmstadt

### 2.1.4 Kits

#### Hersteller

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

### 2.1.5 Größenstandards

#### Hersteller

Gene Ruler™ 100bp DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler™ 1kb DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
SDS-7B Prestained Mixture	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

### 2.1.6 Antikörper

	Bezeichnung	Hersteller	Katalogn-Nr.	Quelle	Kreuzreaktion mit	Verdünnung
<b>1.AK</b>	ErbB2	abcam	ab2428	Hase polycl.	Mensch, Ratte, Maus	WB 1:200
	HSC 70	Santa Cruz	sc-1059	Ziege polycl.	Mensch, Ratte, Maus	WB 1:250
	R15 $\alpha$ -SDS T-Ag	Deppert & Pates	1979	Hase polycl.		IHC 1:10000
<b>2.AK</b>	anti-rabbit IgG	Dianova	711-035-152	Esel		1:12000
	anti-goat IgG	Dianova	705-035-147	Esel		1:10000

### 2.1.7 Primer

Gen	Richtung	Sequenz 5' → 3'	PCR-Produkt (bp)	Zyklen
hTERT	For	TCTGGATTTGCAGGTGAACAGCC	451	33
	Rev	GGGTGGCCATCAGTCCAGGATGG		
mTERT	For	ATGGCGTTCCTGAGTATGGGTGC	279	31
	Rev	ACTTCAACCGCAAGACCGAGAGG		
lac-Z	For	ATCAGCGATTTCCATGTTGCC	358	31
	Rev	AGACCATTTTCAATCCGCACC		
Her2	For	TGCGGGAGCTGCAGCTTCGAA	698	33
	Rev	CTTCTTGCAGCCAGCAAATC		
ER81	For	CAGTGCCTATGATCAGAAGC	453	33
	Rev	CAGCTAGGCACTTCTGAGTC		
ESX	For	AGCTCAGAAGACCCACCCTG	372	33
	Rev	CTCCAGCAGCTCGATGATCCA		
c-myc	For	GCTACGTCCTTCTCCCAA	1117	33
	Rev	TTCCAGTCCTCCTCGAGTTAGG		
Snf5	For	AGTTCTACATGATCGGCTCCG	317	33
	Rev	GCTGTTCTCTTGGCCTTCTG		
T-Ag	for	TATGTCAGCAGAGCCTGTAGAACCAAAC	766	35
	rev	GAGAAAGGTAGAAGACCCCAAG		
Tusc5	for	GAAACCCAAAGCCAGAGTCAAC	570	33
	rev	TGCCTCTGCTAGAAACAGCTC		
GAPDH	for	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452	23
	rev	TCCACCACCCTGTTGCTGTA		
36B4	for	GTG GGA GCA GAC AAT GTG GGC TCC	730	18 (radioaktiv)
	rev	ATG GAT CAG CCA AGA AGG CCT TGA C		
18SrRNA	for	GTT GCA AAG CTG AAA CTT AAA GG	576	20 (radioaktiv)
	rev	CCG ATC CGA GGG CCT CAC TAA ACC		

### 2.1.8 Plasmide

pBABE Puro- <i>hTERT</i>	WT-hTERT cDNA (Robert Weinberg)
pGRN190- <i>mTERT</i>	mTERT cDNA (Geron Corporation)
pSKT-hTERTp- <i>lacZ</i>	8,0 kbp hTERT Promotor vor das <i>lacZ</i> Gen kloniert (Çağatay Güneş)
pSKT-NLS- <i>lacZ</i>	<i>lacZ</i> Gen mit NLS am N-Terminus (Shahragim Tajbakhsh)
pWAP-T	frühe Genregion des SV40 unter Kontrolle von murinem (WAP)-Promotor; kloniert in pUC18 (Tzeng et al., 1993).

### 2.1.9 Mammalia

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

- C57BL/6J (Jackson Tierhaltung, USA)
- BALB/c (Jackson Tierhaltung, USA )
- 6340.3 / C57BL/6J: pSKT-hTERTp-*lacZ* (Çağatay Güneş)
- 6340.3 / BALB/c: pSKT-hTERTp-*lacZ* (Çağatay Güneş)
- WAP-T-NP8/ BALB/c: intermediäre T-Antigen Expression, d. h. ca. 50-60% der Epithelzellen exprimieren das Transgen (C. Schulze-Garg)

Gegenstand dieser Arbeit war hauptsächlich diese bitransgene Mauslinie, die im Folgenden nur hTERTp-*lacZ* x WAP-T genannt wird:

- 6340.3 hTERTp-*lacZ* / WAP-T-NP8 / BALB/c

Für die Untersuchung des humanen *TERT* Promotors *in vivo* wurde ein transgenes Mausmodell von Dr. Çağatay Güneş (Heinrich-Pette-Institut) im C57BL/6J Stamm generiert, welches das *lacZ* Reporter gen unter der Kontrolle eines 8,0 kb langen hTERT Promotorfragments (hTERTp-*lacZ*) enthält. Diese Mäuse wurden in den BALB/c Stamm eingekreuzt. Der BALB/c Inzucht-Mausstamm trägt eine genetische Prädisposition zur spontanen Mammakarzinom Entwicklung. Die in dieser Arbeit verwendete WAP-T transgene Linie exprimiert in spezifischer Form das Transgen während der Laktation in Epithelzellen der Mammagewebe. Hierdurch wird die Entstehung von Tumoren induziert. Durch die

Herstellung hTERTp-*lacZ* x WAP-T bitransgener Tiere sollte der humane TERT Promotor während der Entwicklung von Mammakarzinomen untersucht werden.

### 2.2 RNA-Isolierung

20-50 mg in Stickstoff gefrorenes Gewebe wurden zu 1 ml peqGOLD RNA PURE (peqLAB) in Lysing Matrix D Röhrchen (MP Biomedicals) gegeben, mit Hilfe eines FastPrep-Homogenisators ca. 20 sec homogenisiert und 10 min bei RT belassen. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben 15 sec lang kräftig geschüttelt, nochmals ca. 3 min bei RT stehen gelassen und dann 10 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde anschließend in einem neuen Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol versetzt, gemixt und 10 min bei RT inkubiert. Durch erneute Zentrifugation für 10 min bei 12000 x g bei 4 °C wurde die RNA sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde zweimal mit 1 ml 70% EtOH (mit 0,1 % (v/v) DEPC-H<sub>2</sub>O) gewaschen und jeweils zentrifugiert (10 min, 12000 x g, 4 °C). Das RNA-Pellet wurde nach Abkippen des Ethanols bei RT getrocknet und je nach Pellet-Größe in 25-50 µl 0,1 % (v/v) DEPC-H<sub>2</sub>O unter Schütteln bei 55 °C für 10 min gelöst. Eventuell noch vorhandene DNA wurde mit Hilfe des „Turbo DNA-free™ Kit“ (Ambion) nach Herstellerangaben verdaut.

Ein zusätzlicher Aufreinigungs- und Konzentrierungs-Schritt über Säulchen (RNeasy MinElute™ Cleanup, Qiagen) fand bei jener RNA statt, die für die RNA-Microarrays von Affymetrix (Gene Chip Mouse Genome 430 2.0) eingesetzt wurde (in Kooperation mit Dr. Streichert, Institut für Klinische Chemie, UKE, Hamburg). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die RNA für die Microarrays sollte eine Konzentration > 2 µg/µl haben. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch im NanoDrop bestimmt. Um die Qualität der RNA genauer zu bestimmen, wurde ein 1 % Agarose-Gel in 0,5 x TBE vorbereitet.

1 x TBE:      89 mM Tris  
                 89 mM Borsäure  
                 2 mM EDTA, pH 8,0

RNA-Sekundärstrukturen wurden durch Erhitzen von 200-400 ng RNA auf 65 °C für 5 min in 10 µl 1 x RNA-Ladepuffer gelöst.

## Material & Methoden

5 x RNA- Ladepuffer:	50 % Glycerol 50 % H <sub>2</sub> O 1 Spatelspitze Bromphenolblau Lagerung bei -20 °C
1 x Gebrauchslösung:	3 µl 5 x RNA-Ladepuffer 12 µl Formamid

Die RNA wurde im Gel 30 min bei 100 V aufgetrennt. Das Agarosegel sollte nach Auftrennung zwei distinkte Banden der ribosomalen RNA (28S:18S) mit einer Ratio von 2:1 zeigen, was für intakte RNA hoher Qualität spricht.

### 2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der isolierten DNA oder RNA wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 einer Konzentration von 40 µg RNA/ml bzw. ssDNA und 50 µg dsDNA/ml.

Um Kontaminationen mit Proteinen auszuschließen, wurde jeweils das Verhältnis der Extinktionen E<sub>260</sub>/E<sub>280</sub> bestimmt. In proteinfreien Proben sollte es für pure DNA bei 1,8 und für pure RNA etwa bei 2.0 liegen.

Berechnung der Konzentration nach erhaltener Extinktion:

$$\begin{aligned} \text{DNA: } c &= 50 \times E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor } [\mu\text{g/ml}] \\ \text{RNA: } c &= 40 \times E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor } [\mu\text{g/ml}] \end{aligned}$$

### 2.4 Reverse Transkription

Die RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst wird RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA übersetzt. Da mRNA nur aus Exons besteht, unterscheidet sich die bei dieser Prozedur entstehende DNA von der im Genom des Organismus, aus dem die RNA isoliert wurde. Man nennt die entstandene DNA cDNA, wobei das c für „complementary“ steht. Der zweite Schritt ist die Amplifikation eines Bereichs der cDNA mit spezifischen Primern.

Die RT-Reaktion wurde mit dem Enzym M-MLV-Reverse-Transkriptase der Firma Gibco weitestgehend nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Als Primer für die RT dient ein Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primer der Firma Invitrogen, damit nur mRNAs (besitzen einen Poly(A)-Schwanz) als Template verwendet werden.

Pipettierschema einer RT-Reaktion (20 µl-Ansatz): 1 µg RNA (max. 10 µl)

1 µl Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primer (100 ng/µl)

1 µl 10mM dNTP Mix

auf 12 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen

Dieser Ansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert und dann 10 min bei 72 °C inkubiert.

Danach wurde der RT-Ansatz wie folgt komplettiert:

4 µl 5x First-Strand Buffer

2 µl 0,1 M DTT

1 µl RNase Inhibitor (Eppendorf)

0,5 µl M-MLV-RT (200 U/µl)

0,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde durch auf- und abpipettieren gut gemischt und dann 52 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen, 15 min auf 70 °C gestoppt. Schließlich kann die cDNA bei 4 °C einige Tage oder für längere Lagerung bei -20 °C aufbewahrt werden.

## 2.5 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Technik, mit der man selektiv DNA-Sequenzen vervielfältigen kann. Sie basiert auf der Tatsache, dass ein DNA-Doppelstrang bei Erhitzung „schmilzt“, d.h. sich in zwei Einzelstränge zerlegt. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase lassen sich die entstandenen Einzelstränge verdoppeln. Hierfür benötigt die Polymerase Primer, die die Zielsequenz umrahmen. Man braucht also zumindest Kenntnis über Teile der Sequenz oder aber ähnliche Sequenzen, aus der sich die erforderlichen Primer ableiten lassen.

### 2.5.1 Primer und Primerdesign

Der Erfolg einer PCR hängt sehr stark von den verwendeten Primern ab, die ein paar bestimmte Eigenschaften besitzen sollten. Sie sollten nicht mit sich selbst oder dem anderen Primer hybridisieren können, sie sollten keine Schleifen bilden können und, wenn möglich, sollte ihre komplementäre Sequenz nur einmal auf der eingesetzten DNA vorkommen. Außerdem sollten die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der beiden verwendeten Primer etwa gleich hoch sein und der G/C-Gehalt ihrer Sequenzen zwischen 40 und 60 % liegen. Die Schmelztemperatur gibt an, bei wieviel Grad sich der Primer vom Template-Strang ablöst. So kann die Hybridisierungstemperatur ( $T_H$ ) für das Annealing bei der PCR mit folgender Formel berechnet werden (Suggs et al., 1981):

$$T_H [^{\circ}\text{C}] = T_m - 5 = [4 \times (\text{G} + \text{C}) + 2 \times (\text{A} + \text{T})] - 5$$

Durch Zugabe von 10 % DMSO kann die Annealing-Temperatur gesenkt werden. Für alle hier verwendeten Primer wurde eine Annealing-Temperatur von 55 °C gewählt.

Durchführung der PCR (polymerase chain reaction):

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Taq-Polymerase (Eppendorf) verwendet.

Pipettierschema (50 µl-PCR-Ansatz):	bis zu 10 ng Plasmid-DNA oder 2 µl cDNA
	2,5 µl 10x Reaction Buffer (Eppendorf)
	2,5 µl DMSO
	0,5 µl dNTP Mix 10 mM
	0,5 µl Forward-Primer (10 pmol/µl)
	0,5 µl Reverse-Primer (10 pmol/µl)
	1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
	auf 25 µl mit H <sub>2</sub> O bidest. auffüllen

Für die radioaktive PCR wurde zusätzlich 0,1 MBq [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP zugegeben.

Der Ansatz wurde gut vermischt und im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

initiale Denaturierung	1 min, 95 °C	} 23-33 Zyklen
Denaturierung	1 min, 95 °C	
Primer-Annealing	30 sec, 55 °C	
Elongation	30 sec-1 min, 72 °C	
finale Elongation	5 min, 72 °C	
Kühlung	4 °C	

Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Als Richtwert für die Elongationszeit gilt: 1000 bp/min für Taq-Polymerasen.

Die Zyklenanzahl wurde so gewählt, dass die Amplifizierung stets im linearen Bereich bleibt.

Die Analyse der PCR-Reaktion erfolgte in einem geeigneten Agarosegel. Produkte aus radioaktiven PCRs wurden auf 4 % Polyacrylamidgele geladen.

4 % Polyacrylamidgel:

- 7 ml PAA (40 %)
- 3,5 ml 10 x TBE
- 58,8 ml H<sub>2</sub>O
- 175 µl APS (40 %)
- 35 µl TEMED

Die Detektion der Signale konnte hier über einen Röntgenfilm erfolgen oder mit einer Imaging Plate im Phosphoimager gelesen werden. Der Vorteil der radioaktiven PCR ist nicht nur ihre erhöhte Sensitivität sondern auch die leichte Quantifizierbarkeit. Mit dem Programm AIDA (Raytest, Straubenhard) konnten die Expressionsmengen eines Gens auf Haushaltsgene wie z.B. GAPDH bezogen und normalisiert werden.

### 2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren besitzen wegen ihrer Phosphatgruppen eine negative Nettoladung. Bringt man sie in ein elektrisch geladenes Feld, so wandern sie zur positiv geladenen Anode. Als Matrix für diese Wanderung wird im Allgemeinen ein Agarosegel verwendet, durch welches kleinere Nukleinsäure-Fragmente schneller wandern als größere. Die Trennschärfe hängt von der Agarose-Konzentration im Gel ab (vergl. Tab. 2.1). Diese sollte dem Größenbereich der erwarteten Fragmente angepasst werden. Um die Nukleinsäuren sichtbar zu machen, wird 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in die noch flüssige Agarose gegeben. Ethidiumbromid ist in der

Lage, in Nukleinsäuren zu interkalieren, wodurch nach Anregung mit UV-Licht eine rosafarbene Fluoreszenz detektiert werden kann.

% Agarose	0,3	0,6	0,7	0,9	1,2	1,5	2,0
Optimaler Trennbereich	5-60 kb	1-20 kb	0,8-10 kb	0,5-7 kb	0,4-6 kb	0,2-3 kb	0,1-2 kb

**Tabelle 2.1:** Trennbereiche von Agarosegelen

Benötigte Lösungen:

10 x TAE-Laufpuffer:        400 mM Tris/Acetat (pH 8)  
                                      10 mM EDTA

6 x DNA-Probenpuffer:    0,25 % Bromphenolblau  
                                      0,25 % Xylencyanol  
                                      30 % Glycerin  
                                      → Aliquots bei 4 °C lagern

• EtBr:                        10 mg/ml EtBr Stocklösung

In jedem Gel wurde eine Tasche mit einem DNA-Größen-Marker (Fermentas) beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V für ca. 1 h.

### **2.7 Herstellen von Proteinextrakten aus Geweben**

Für die Lyse von Gewebezellen mussten die Gewebe zunächst homogenisiert werden. Dafür wurden Lysing Matrix D-Röhrchen (MP Biomedicals) verwendet, die zum Teil mit kleinen Kügelchen gefüllt waren. In die Röhrchen wurde 300 µl CHAPS-Lysispuffer vorgelegt und gefrorene Gewebestückchen von ca. 20-40 mg zugegeben. Anschließend wurden die Gewebe im FastPrep-Homogenisator ca. 20 sec homogenisiert und 20 min auf Eis inkubiert. Die Proteinlösung wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um den Zelldebris zu pellettieren. Der Überstand wurde abgenommen und sofort zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet. Schließlich wurden die Proteinextrakte bei -80 °C gelagert.

CHAPS:        10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
                  1 mM MgCl<sub>2</sub>  
                  1 mM EGTA  
                  0,1 mM Benzamidine  
                  5 mM β-Mercaptoethanol  
                  0,5 % CHAPS  
                  10 % Glycerol

## **2.8 Proteinbestimmung nach Bradford**

In eine Einmalküvette wurden je 2 µl Proteinextrakt mit 798 µl H<sub>2</sub>O und 200 µl Bradford-Reagenz gegeben und vermischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm gegen eine Referenz, die nur Lysispuffer und keine Proteine enthält, gemessen. Die Proteinkonzentration konnte dann anhand einer zuvor erstellten BSA-Eichgerade bestimmt werden (Bradford, 1976).

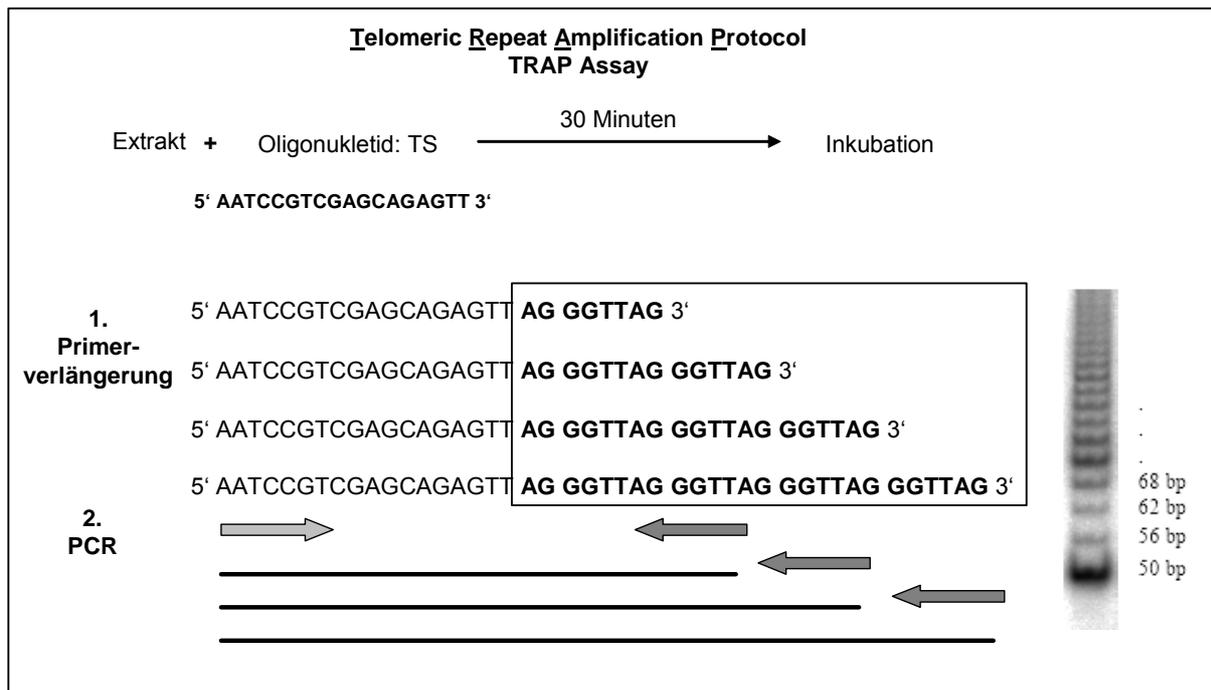
## **2.9 TRAP-Assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol)**

Mit dieser Methode kann die Enzymaktivität der Telomerase in Zell- und Gewebeextrakten nachgewiesen werden. Ursprünglich wurde das Protokoll von Kim et al. 1994 beschrieben (Kim et al., 1994), in dieser Arbeit wurde jedoch das „TRAPeze Telomerase Detection Kit“ der Firma Q-Biogene verwendet. Die verwendeten Extrakte wurden wie in 2.7 beschrieben hergestellt und für die Reaktion wurden 200 ng bis 1 µg Gesamtprotein eingesetzt. Den Extrakten wurden folgende Reagenzien zugesetzt:

1 x MM:        5 µl    10x TRAP Puffer  
                  1 µl    50x dNTPs  
                  1 µl    TS Primer  
                  1 µl    TRAP Primer Mix  
                  0,25 µl alpha-<sup>32</sup>P-dCTP (3,7MBq/µl)  
                  0,4 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)  
                  auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen

Im ersten Schritt erfolgte eine Inkubation der Proben bei 30 °C für 30 min, in der die im Extrakt vorhandene Telomerase den TS Primer verlängern kann. Die Produkte der Reaktion wurden dann in einem zweiten Schritt mittels PCR amplifiziert.

27 Zyklen: 94 °C 30 sec  
59 °C 30 sec



**Abbildung. 2.1:** Funktionsweise eines TRAP-Assay, schematische Darstellung

Die PCR-Produkte haben unterschiedliche Größen, je nachdem wie oft die Telomerase die Nukleotidfolge TTAGGG an den TS Primer angefügt hat. Die Produkte wurden nun in einem 10 % PAA-Gel in 0,5 x TBE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und durch den Einbau von radioaktivem dCTP konnten die markierten PCR-Produkte durch Phosphoimaging oder auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden. Wurde der TRAP-Assay nicht-radioaktiv durchgeführt, so wurde das PAA-Gel 30 min in SYBR-Gold® (Molecular Probes) 1:20000 in 0,5 x TBE gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

## 2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese Methode dient zur Auftrennung verschiedenster Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Zuerst werden die Proteine durch das stark negative Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgefaltet. Eine Zurückfaltung wird dadurch verhindert, dass die SDS-Moleküle an die hydrophoben Regionen des Proteins binden. Außerdem wird als

Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben, um Disulfidbrücken zu spalten. Die SDS-Moleküle kompensieren durch ihre negativen Ladungen die positiven Ladungen der Proteine, wodurch beim Anlegen eines elektrischen Feldes alle Proteine in Richtung Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig vom Molekulargewicht, so dass die großen Proteine hinter den kleinen im Polyacrylamidnetz zurück bleiben. Zur Schärfung der Proteinbanden wird das Gel in Sammelgel und Trenngel unterteilt. Zuerst läuft die Proteinlösung durch das Sammelgel (pH = 6,8). Glycin ist ein Zwitterion, das bei diesem pH eine negative und eine positive Ladung trägt ( $^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-CO}_2^-$ ), insgesamt also ungeladen ist. Die Proteine laufen im Sammelgel im Feldstärkegradienten zwischen  $\text{Cl}^-$  und Glycin und werden so durch diesen Käfigeffekt konzentriert. Beim Übergang ins Trenngel (pH = 8,8) wird das Glycin deprotoniert, ist somit negativ geladen ( $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2^-$ ), und eilt mit dem  $\text{Cl}^-$  voraus. Die Proteine laufen in Abhängigkeit ihrer Masse unterschiedlich schnell.

Durchführung:

Die mit 6 x SDS-Probenpuffer versetzten Proteine wurden zunächst 5-10 Minuten bei 95 °C im Heizblock denaturiert, auf Eis abgekühlt und dann in die Taschen des Gels geladen. Zusätzlich zu den Proben wurde als Größenstandard stets ein Marker (SDS7B, Sigma) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer Hoefer-Minigel-Apparatur zwischen 8 x 10 cm großen Glasplatten mit 1 mm breiten Abstandhaltern (Spacern) bei 200 V für ca. 1 h durchgeführt.

Gelzusammensetzung eines 10 % Acrylamid-Gels:

Lösungen	Sammelgel	Trenngel
1,5 M Tris, pH 8,8; 0,4 % SDS	-	3 ml
1,5 M Tris, pH 6,8; 0,4 % SDS	1 ml	-
AA/ Bis-AA(30 : 0,8)	500 $\mu\text{l}$	4 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,5 ml	5 ml
40 % APS	8 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
TEMED	8 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$

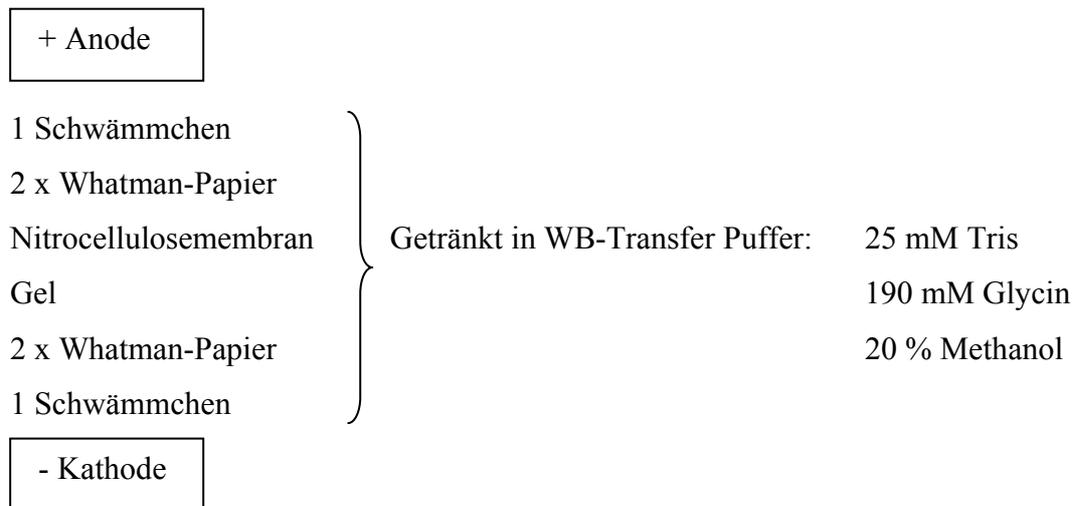
**Tabelle. 2.2:** Zusammensetzung eines 10 % Acrylamidgels

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet.

## 2.11 Western Blot (WB)

Die Methode des Western Blots ermöglicht es, Proteine auf eine Membran zu transferieren, damit sie dort immobilisiert verbleiben und für immunologische Nachweise zur Verfügung stehen. Der Blot wurde in einer Bio-Rad-Blotting-Apparatur nach dem wet-Prinzip in WB-Transfer Puffer bei 100 V für 1 h durchgeführt, wobei die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell) übertragen wurden.

### Aufbau des Blots:



### Färben der Membran mit Ponceau S

Zur Überprüfung des Transfers der Proteine auf Nitrocellulose können diese mit Ponceau S angefärbt werden. Hierbei können Unregelmäßigkeiten im Laufverhalten oder Störungen durch Luftblasen detektiert werden. Die Ponceau S-Färbung ist reversibel. Durch Abwaschen der Membran mit Wasser entfärbt sich der Blot, wobei die Proteinbanden sichtbar bleiben. Abwaschen mit TBST entfärbt auch diese Banden.

## 2.12 Immunologisches Proteinnachweisverfahren mittels ECL (Enhanced Chemiluminescence)

Diese Methode beruht auf der Fähigkeit von Antikörpern, spezifische Proteine zu erkennen. Man verwendet hierbei einen primären Antikörper, der sein Epitop im gesuchten Protein erkennt und einen sekundären Antikörper, der gegen eine konstante Region des primären Antikörpers gerichtet ist. Außerdem ist der sekundäre Antikörper kovalent mit einem leicht

detektierbaren Makromolekül verbunden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Antikörper verwendet, die an das Enzym Peroxidase gekoppelt waren.

Die Membran wurde 1 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C in 5 % Magermilch in TBST geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper auf der Membran zu vermeiden. Danach folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper ü.N. bei 4 °C. Nach dreimaligem 10-minütigen Waschen der Membran in 0,1 % TBST folgte bei RT eine einstündige Inkubation mit einem geeigneten Zweitantikörper. Der Blot wurde danach wiederum dreimal 10 min in TBST gewaschen und anschließend in einer ECL-Reaktion mit den beiden Entwicklungs-Lösungen A (1 ml Luminol + 90 mM Para-Cumarsäure) und B (1 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,8 + 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entwickelt. Die Peroxidase des Zweitantikörpers katalysiert zusammen mit Wasserstoffperoxid die Reaktion von Luminol zu einem aktivierten Zwischenprodukt, Stickstoff und Licht. Das emittierte Licht kann auf dem aufgelegten Röntgenfilm als Schwärzung festgehalten werden. Die Expositionsdauer ist abhängig von der Signalstärke, beträgt aber meist zwischen 1-10 min.

### **2.12.1 Strippen der Membran:**

Zur Entfernung der Antikörper von der Membran wurde diese erst 5 min in Wasser gewaschen, dann 5-10 min in 0,2 M NaOH inkubiert und schließlich wieder 5 min mit Wasser gewaschen. Vor der Zugabe eines anderen Erstantikörpers wurde die Membran erneut mit 5 % Magermilch blockiert.

### **2.13 Tierpräparation und Organentnahme**

Die Versuchstiere wurden bei sichtbaren Tumoren von mind. 0,5 cm Durchmesser präpariert. Das Versuchstier wurde vor der Präparation mit Diethylether getötet. Anschließend erfolgte die makroskopische Beurteilung der Mammagewebe, sowie die Organentnahme in folgender Reihenfolge: Mammagewebe bzw. -tumore, Milz, Leber, Lunge.

Die Gewebeproben wurden schnell je zur Hälfte in flüssigem Stickstoff und in 4 % Formalin ü.N. bei RT fixiert. Am nächsten Tag wurden die fixierten Gewebe mind. 2 h gewässert und anschließend ü.N. in einen Gewebeeinfiltrationsautomaten gegeben.

Programm: Organe 1

Ethanol 70 % 1 h

Ethanol 80 % 1 h

Ethanol 90 % 1 h

Ethanol 95 % 1 h

I Ethanol 100 % 1 h

II Ethanol 100 % 1,5 h

I Xylol 1 h

II Xylol 1 h

I Paraffin Typ 3 58 °C 1 h

II Paraffin Typ 3 58 °C 1 h

III Paraffin Typ 3 58 °C 1 h

Bei diesem Programm wurden die Gewebe durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Xylol verdrängt anschließend den Alkohol und das Gewebe kann mit Paraffin durchsetzt werden. Anschließend wurden die Gewebe an einer Gießstation mit warmem Paraffin in Blockformen gegossen. Nach dem Aushärten bei 4 °C ü.N. wurden am Mikrotom Schnitte von 3-5 µm angefertigt und im warmen Wasserbad gestreckt. Die Schnitte wurden auf Superfrost-Objektträger aufgenommen und über Nacht bei 40 °C getrocknet. Bevor Färbungen an den Gewebeschnitten vorgenommen wurden, wurde das Paraffin in Xylol entfernt und das Gewebe über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert.

## **2.14 HE-Färbung**

In dieser Färbung werden saure Moleküle im Schnitt durch das Hämatoxilin dargestellt, so dass die Kerne, aber auch saure Schleimsubstanzen, Bakterien und Kalk blau erscheinen. Das Zytoplasma der Zellen, Kollagen und proteinhaltige Lösungen werden nuanciert rot angefärbt. Hierfür wurden die Schnitte für 6 min in Mayers Hämalaunlösung getaucht, kurz in Ethanol mit 3 % HCl geschwenkt und anschließend unter fließendem Leitungswasser 2 min gebläut. Daraufhin erfolgte eine Inkubation für 3 min in alkoholischem Eosin. Die Färbung wurde in deionisiertem H<sub>2</sub>O gestoppt, und die Gewebeschnitte wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe mit einer abschließenden Inkubation in Xylol entwässert und in Eukitt eingedeckelt.

## 2.15 Immunhistochemie

Um die Zielproteine besser für ihre Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Gewebeschnitte für 25 min in der Mikrowelle in Citratpuffer-Puffer gekocht und für 20 min zum Abkühlen stehen gelassen. Anschließend wurde dreimal 5 min mit 1 x TBST (0,1%) gewaschen.

10 x TBST: 0,2 M Tris-HCl, pH 7,4  
1,37 M NaCl  
pH 7,6 einstellen  
1 % (v/v) Tween 20

Die Schnitte wurden 5 min mit „ChemMate™ Peroxidase-Blocking“ behandelt, um die endogene Peroxidaseaktivität zu inhibieren. Es wurde erneut dreimal mit TBST gewaschen. Anschließend wurde der erste Antikörper auf die Schnitte gegeben und bei 4 °C ü.N. inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal 15 min mit TBST gewaschen und hiernach 15 min bei RT mit einem Zweitantikörper aus dem „ChemMate™ DAKO Envision™ Detection Kit“ inkubiert. Dabei handelt es sich um ein Peroxidase-konjugiertes Polymer, an das Ziege-anti-Kaninchen und -anti-Maus Sekundärantikörper gekoppelt sind. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBST wurde die frisch angesetzte DAB-Lösung als Substrat für die Peroxidase zugegeben. Innerhalb von 10 min findet an der Stelle des Antigens eine Reaktion statt, bei der DAB sich braun verfärbt. Die Farbreaktion wurde dann mit deionisiertem H<sub>2</sub>O abgestoppt. Die Schnitte wurden zur Gegenfärbung für 1 sec in Mayers Hämalanlösung getaucht, kurz in H<sub>2</sub>O dest. gespült und sofort für 2 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Dann wurde, angefangen mit deionisiertem H<sub>2</sub>O, die aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt, welche die Gewebe wieder entwässert. Abschließend wurden die Schnitte 2x 10 min in Xylol getaucht und schließlich in Eukitt eingedeckelt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Generierung einer bitransgenen Mauslinie: hTERTp-*lacZ* x WAP-T

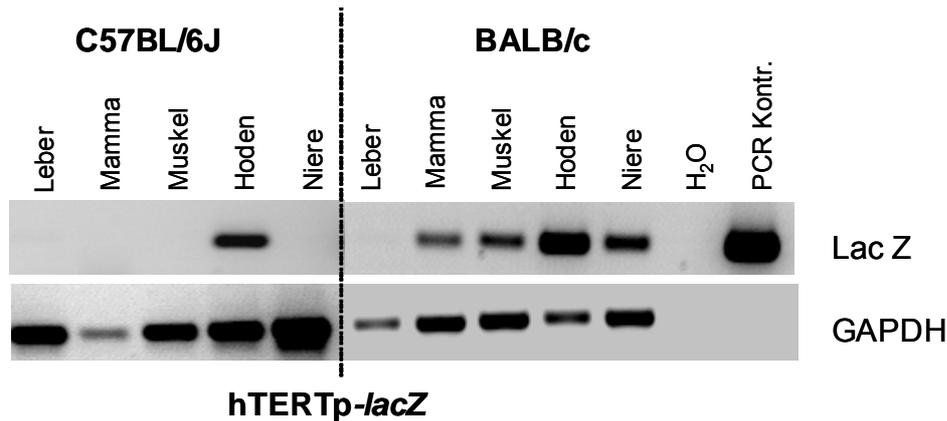
##### 3.1.1 Einkreuzung des hTERTp-*lacZ* Transgens in den BALB/c-Stamm

In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation des humanen TERT Promotors während der Tumorgenese von Mammakarzinomen untersucht werden. Hierfür mussten zwei monotransgene Mausmodelle miteinander kombiniert werden. Die Transgene befanden sich zunächst noch in verschiedenen Mausstämmen.

Für die WAP-T Mäuse, welche durch induzierbare Expression des SV40 T-Ag in Mammaepithelzellen Tumore entwickeln, spielt der genetische Hintergrund eine entscheidende Rolle (s. Einleitung: 1.7). Der verwendete Mausstamm BALB/c zeichnet sich durch zwei Punktmutationen in verschiedenen Genloci aus, was zu einer Prädisposition für Mammakarzinome führt und die Tumorzinzidenz im WAP-T Modell erhöht. Das hTERTp-*lacZ* Modell wurde im C57BL/6J-Stamm generiert und so war es für die Herstellung bitransgener Tiere notwendig, einen gemeinsamen genetischen Hintergrund zu schaffen. Das hTERTp-*lacZ* Konstrukt wurde also in den BALB/c-Stamm eingekreuzt. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren die Rückkreuzungen schon begonnen und wurden von mir ab der sechsten Generation für inzwischen mehr als zehn Generationen weitergeführt.

Die ersten Untersuchungen des hTERTp-*lacZ* Transgens wurden in Mäusen des C57BL/6J-Stammes begonnen. Es konnte schon experimentell gezeigt werden, dass der humane Promotor in der Maus auch humanähnlich reguliert wird (Ritz et al., 2005). Dabei wurde festgestellt, dass in den meisten Organen der Maus der humane *TERT* Genpromotor reprimiert blieb und so die menschliche Regulation widerspiegelte.

Nun war es notwendig, zu prüfen, ob das hTERTp-*lacZ* Konstrukt im BALB/c Hintergrund ebenfalls human-ähnlich reguliert wurde. Dafür wurden BALB/c hTERTp-*lacZ* Tiere mittels RT-PCR auf die Expression des *lacZ*-Reportergens untersucht.

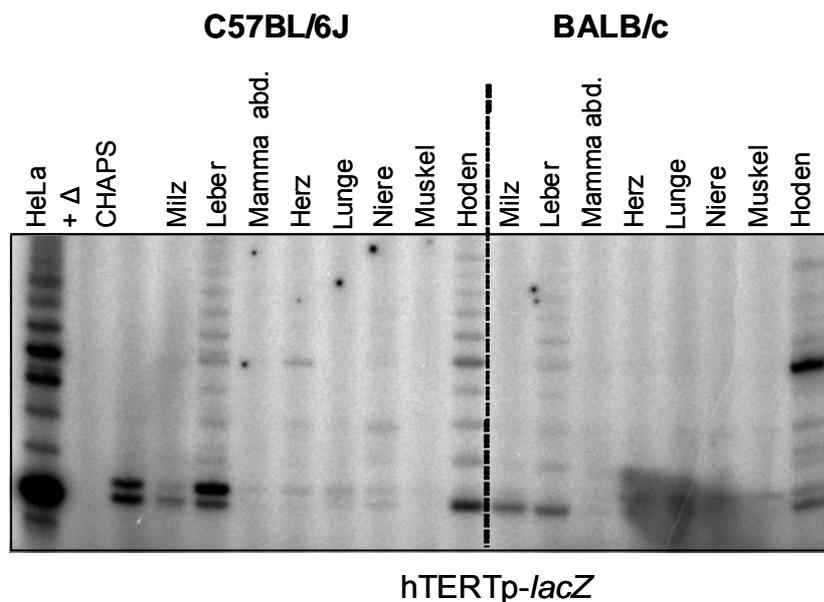


**Abbildung 3.1:** Mausstämme C57BL/6J und BALB/c im Vergleich der Basisexpression von LacZ mittels RT-PCR. GAPDH dient als Ladekontrolle

Bisherige Analysen aus unserer Arbeitsgruppe sowie anderen Gruppen zeigten, dass sich die Expression von humanem und murinem TERT in manchen Organen gleichen, bzw. es Organe gibt, in denen dies nicht der Fall ist. Im Menschen findet man starke TERT Expression ausschließlich in den Hoden, so auch im transgenen Mausmodell mit C57BL/6J Hintergrund. Die hTERTp-lacZ Tiere des BALB/c Stammes zeigen hier ebenfalls die höchste lacZ Expression in den Hoden. Die TERT Expression in der Leber unterscheidet sich aber zwischen den Spezies. Bei der Maus findet man stets TERT Expression und folglich auch Telomeraseaktivität in der Leber, beim Menschen jedoch ist sie reprimiert. Auch diese Tatsache spiegelt sich in dem oben gezeigten Experiment wider, denn in den Lebern beider Tiere ist keine LacZ Expression nachweisbar.

Im BALB/c Hintergrund scheint eine höhere Basisaktivität des hTERT Promotors vorzuliegen, als in C57BL/6J. Die fehlende Aktivität des humanen TERT Promotors in der Leber und die stärkste Aktivität in den Hoden der BALB/c Mäuse zeigen jedoch, dass trotzdem davon ausgegangen werden kann, dass die Kontrolle des humanen *TERT* Genpromotors humanähnlich erfolgt. Im BALB/c Stamm unterliegt der humane TERT Promotor offenbar einer nicht so stringenten Repression. Die Mutationen, die BALB/c von anderen Inzuchtstämmen unterscheidet, können hierbei durchaus eine Rolle spielen. Dies soll später genauer diskutiert werden.

Hinsichtlich ihrer endogenen Telomeraseaktivität unterschieden sich diese beiden Mausstämme jedoch nicht. In Abbildung 3.2 ist die Aktivität der Telomerase mittels TRAP-Assay dargestellt. Aus den Geweben wurden Proteinextrakte hergestellt und die Proteinmenge nach Bradford bestimmt. Von jedem Extrakt wurden 400 ng mit einem Primer inkubiert, welcher Telomerasequenzen enthält und so ein Template für die im Extrakt enthaltene Telomerase darstellt. Die Telomerase kann nun den Primer jeweils um  $(TTAGGG)_n$  verlängern. Anschließend wurden die Produkte mittels PCR amplifiziert und in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Aktivität des Enzyms kann also in Form einer DNA-Leiter sichtbar gemacht und verglichen werden. Wie schon beschrieben, findet man das aktive Enzym bei der Maus in der Leber und vor allem in den Hoden.

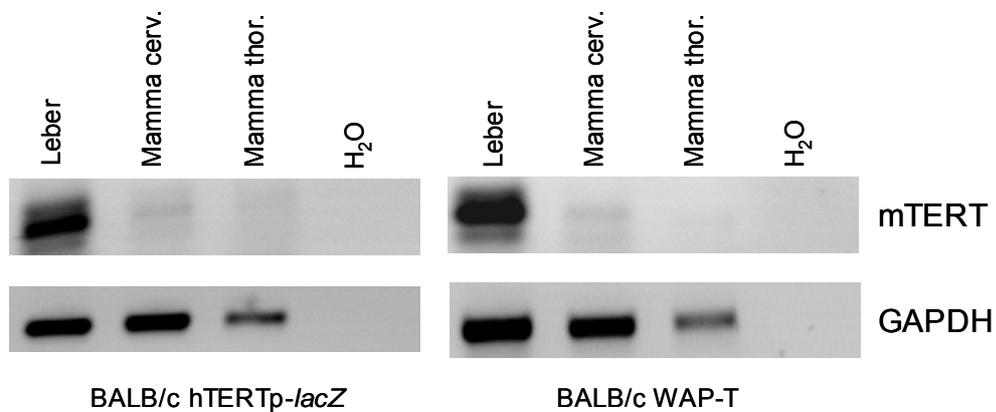


**Abbildung 3.2:** Bestimmung der Telomeraseaktivität mittels TRAP-Assay in hTERTp-lacZ transgenen Mäusen der Stämme C57BL/6J und BALB/c. HeLa-Zellen sind Telomerase-positiv und wurden als Kontrolle benutzt. Ein Hitze-inaktivierter HeLa-Extrakt (+Δ) dient als negativ Kontrolle.

### 3.1.2 Die Transgene haben keinen Einfluss auf die endogene mTERT Expression

Zur Herstellung der bitransgenen Tiere sollten also die hTERTp-lacZ und die WAP-T Mäuse im BALB/c Hintergrund miteinander verpaart werden. Um auszuschließen, dass die beiden

Transgene jeweils die murine TERT Expression beeinflussten, wurde vorher noch mittels RT-PCR dessen Expression überprüft.



**Abbildung 3.3:** Vergleich der beiden Mauslinien hTERTp-lacZ und WAP-T im BALB/c Hintergrund hinsichtlich ihrer endogenen mTERT Expression mittels RT-PCR. GAPDH dient als Ladekontrolle

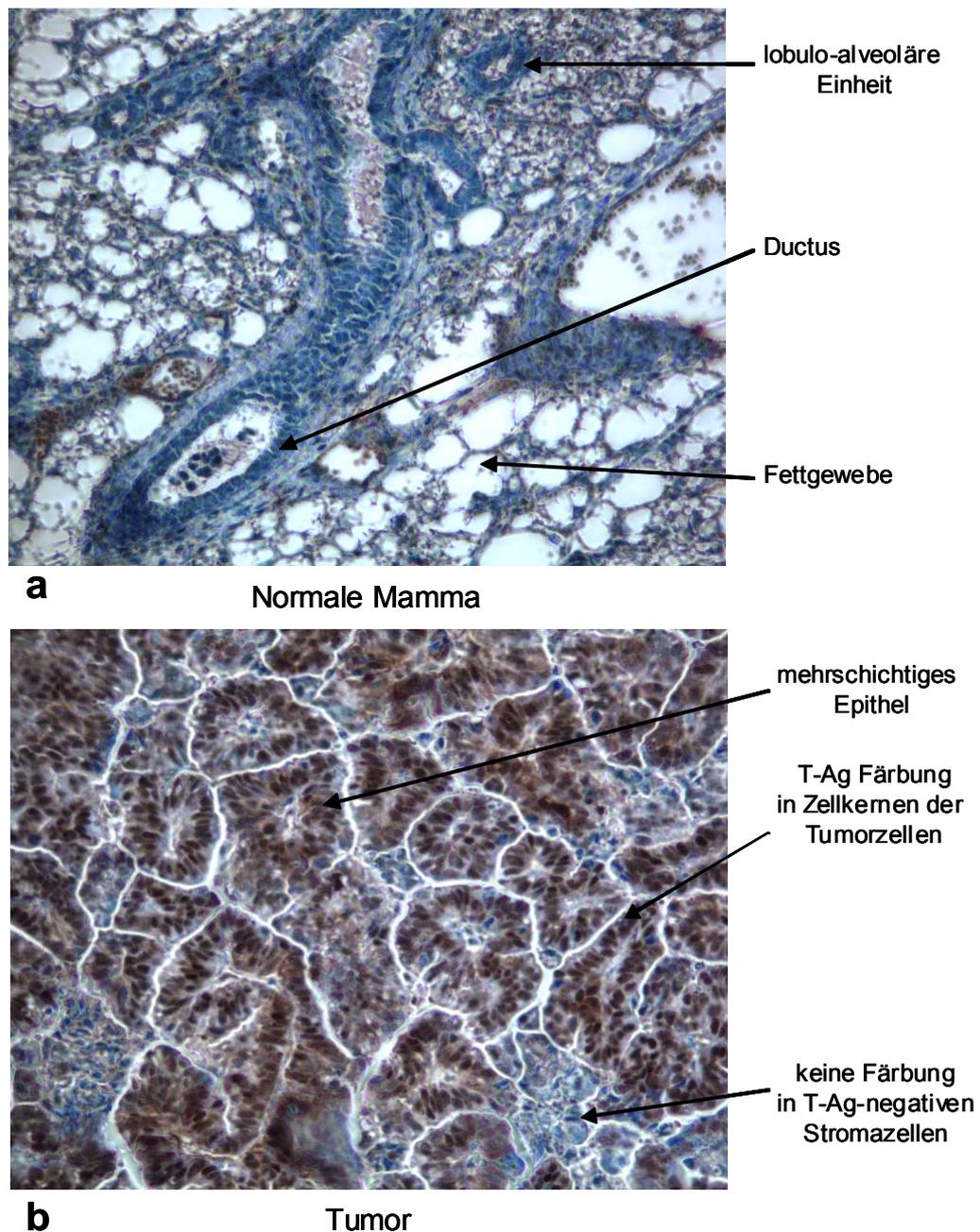
Wie schon zuvor im erwähnt, ist in der Mausleber stets TERT Expression nachweisbar. Hierin unterscheiden sich die beiden Mauslinien nicht voneinander. Dieses Resultat zeigt schon, was später noch genauer betrachtet wird, nämlich dass die Expression von TERT gut mit der Telomeraseaktivität korreliert (s. TRAP-Assay Abb. 3.2). Im normalen Mammagewebe hingegen ist keine mTERT Expression nachweisbar. Die beiden Mäuse sind also auch hinsichtlich der endogenen mTERT Expression im Mammagewebe vergleichbar.

Bei den nun folgenden Untersuchungen wurden anhand von bitransgenen hTERTp-lacZ x WAP-T Mäusen die Veränderungen der humanen und murinen TERT Promotoraktivität und Telomeraseaktivität während der Entwicklung von Mammatumoren analysiert.

### 3.2 Hochregulation der endogenen Telomeraseaktivität in Mammatumoren der hTERTp-lacZ x WAP-T bitransgenen Mäuse

In dem hier untersuchten bitransgenen Mausmodell werden die Tumore durch die Expression des T-Ag während der Schwangerschaft induziert (s. Einleitung Abb. 1.6). Deshalb wurden die Tiere nach ihrer Verpaarung unter Beobachtung gehalten, bis sie sichtbare Tumore aufwiesen. Ein Beispiel für die Induktion ist in folgender Abbildung zu sehen. Sie stellt

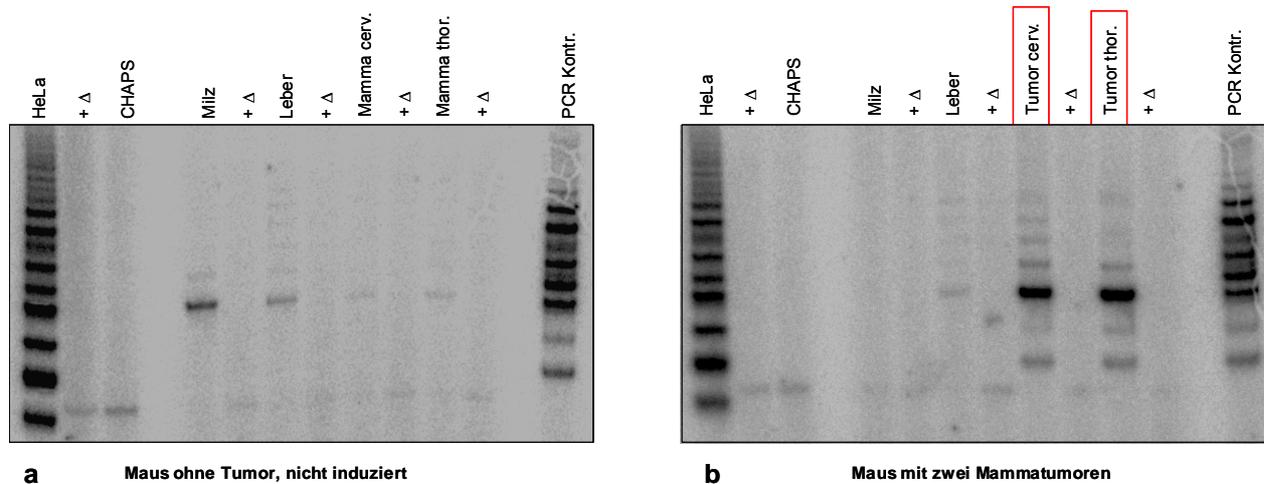
immunhistochemische Färbungen gegen T-Ag an Mikrotomschnitten von Mammagewebe dar. Die braune Kernfärbung der Zellen zeigt die Proteinexpression des T-Ag in Epithelzellen des Brustdrüsengewebes an. Als Kontrolle wurde normales Mammagewebe von nicht induzierten weiblichen Tieren eingesetzt. Es folgen histologische Analysen, sowie Untersuchungen der Telomeraseaktivität und Genexpression dieser Gewebe.



**Abbildung 3.4:** Immunhistochemische T-Ag-Färbung hTERTp-lacZ x WAP-T von **a)** nicht induziertem, normalen Mammagewebe mit querschnittener lobulo-alveolärer Einheit und längs angeschnittenem Ductus und **b)** einem Mammatumor mit T-Ag positiven, epithelialen Tumorzellen

## Ergebnisse

In den meisten menschlichen Brusttumoren, sowie auch den Tumoren der Maus findet man erhöhte Telomeraseaktivität. In normalem Mammagewebe dagegen ist die Aktivität des Enzyms sehr gering oder liegt sogar unter der Nachweisgrenze. Um diese Tatsache in dem bitransgenen hTERTp-*lacZ* x WAP-T Modell zu prüfen, wurden TRAP-Assays durchgeführt. Da die Telomerase ein Temperatur-sensitives Enzym ist, kann ihre Aktivität durch Hitze zerstört werden. Deshalb wurde als Negativkontrolle zusätzlich immer ein Extrakt mit Hitze behandelt (+  $\Delta$ ).

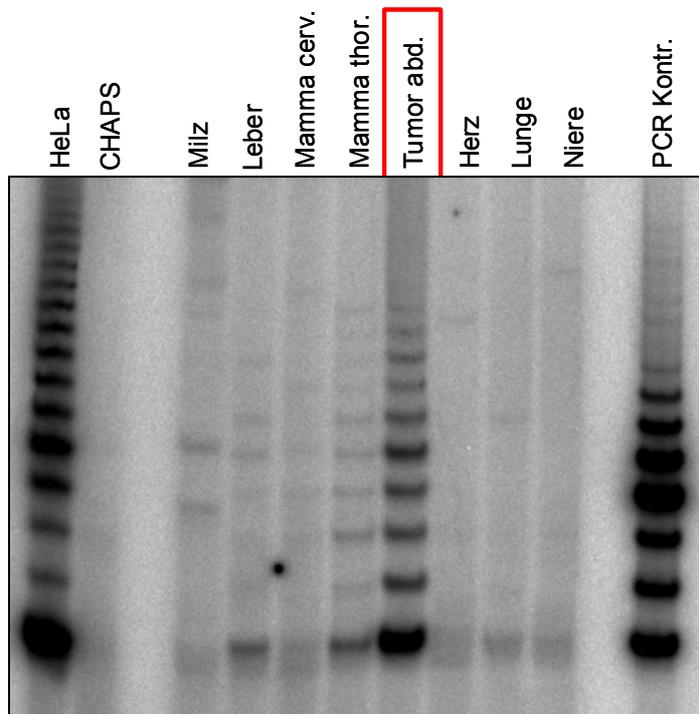


**Abbildung 3.5:** Analyse von endogener Telomeraseaktivität mittels TRAP-Assay in hTERTp-*lacZ* x WAP-T bitransgenen Mäusen. **a)** nicht induziert; **b)** Tumor

Wie erwartet, zeigt Abbildung 3.5 einen deutlichen Unterschied in der Intensität der Banden zwischen nicht induziertem, also normalem Mammagewebe und den Mammatumoren. Die Steigerung der Aktivität ist spezifisch in den Extrakten der Tumore, jedoch nicht in anderen Geweben desselben Tiers zu erkennen. In den Hitze-behandelten Kontrollen ist das Enzym nicht mehr funktionell und daher keine Telomeraseaktivität mehr vorhanden. Weiterhin dienten andere Organe der Tumor- bzw. nicht-Tumor Mäuse als Kontrollen. In der Leber der Maus findet man stets geringe aber nachweisbare Telomeraseaktivität (s. auch Abb. 3.2). Die geringen Unterschiede in den Bandenintensitäten von Leber und Milz sind experimentell bedingt, was auch anhand der nächsten Abbildung (s. Abb. 3.6) verdeutlicht werden kann.

## Ergebnisse

Hier kann gezeigt werden, dass allein die Tumorentwicklung die Aktivität der Telomerase beeinflusst. Man kann deutlich den Unterschied in der Telomeraseaktivität zwischen den beiden normalen Mammageweben und dem Tumorgewebe in einem Organismus erkennen. Zwar ist diese Maus induziert worden, doch hat sich erst in einer Mamma ein Karzinom ausgebildet, wohingegen die anderen Mammagewebe bei der Präparation unauffällig waren. Als Kontrolle wurden hier weitere Gewebe derselben Maus untersucht, die keinerlei Veränderungen durch die Induktion oder Mammatumor-Entstehung hinsichtlich der Telomeraseaktivität aufwiesen. Es besteht ein Unterschied zwischen der Intensität der DNA-Leiter der cervikalen und der thorakalen Mamma. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass obwohl beide Gewebe noch keine sichtbaren Veränderungen aufwiesen, im thorakalen Mammagewebe durch die Induktion schon erste Schritte zum Start der Tumorprogression eingesetzt haben könnten. Dieses Resultat zeigt klar auf, dass die Telomerase nicht durch die Induktion aktiviert wird, sondern erst während der Tumorgenese eine Hochregulation erfährt. Die Hochregulation der Telomeraseaktivität ist also keine Folge der Expression des T-Ag und damit einhergehenden Inaktivierung von p53 und pRb.

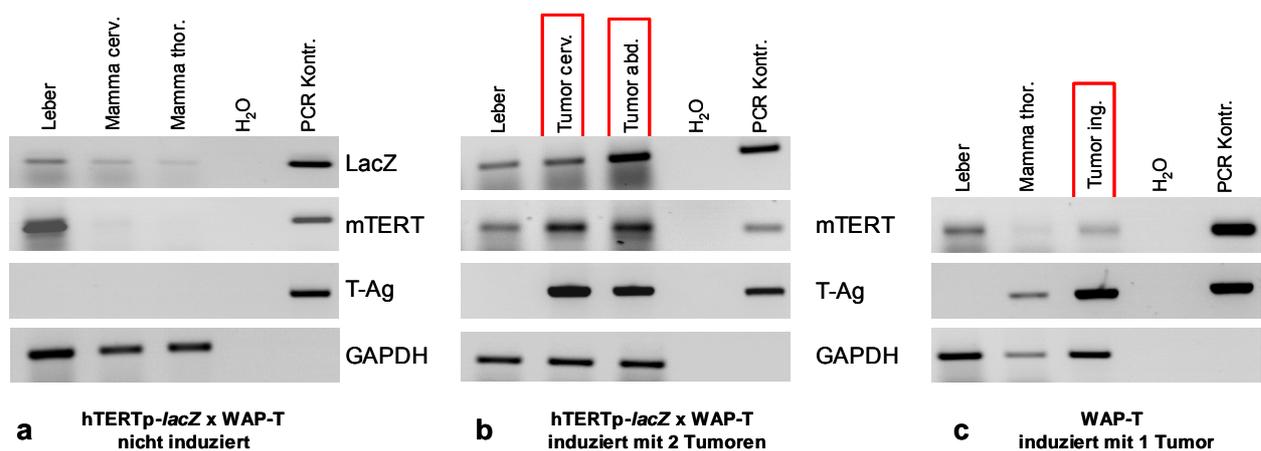


hTERTp-*lacZ* x WAP-T

**Abbildung 3.6:** Analyse der Telomeraseaktivität mittels TRAP-Assay von verschiedenen Geweben einer hTERTp-*lacZ* x WAP-T bitransgenen Maus mit normalem und tumorigenem Mammagewebe.

### 3.3 Aktivierung der humanen und murinen TERT Promotoren während der Tumorgenese in hTERTp-lacZ x WAP-T bitransgenen Mäusen

Da die Aktivität der Telomerase sehr gut mit der Expression ihrer katalytischen Untereinheit TERT korreliert, wurde in einem nächsten Schritt geprüft, ob auch in diesen Tumoren eine erhöhte Menge an mTERT RNA vorliegt. Hierzu wurde nach der Isolierung der Gesamt-RNA aus tiefgefrorenem Gewebe diese revers transkribiert (RT) und so cDNA synthetisiert. Mit der RT-PCR lassen sich Veränderungen in der mRNA Menge zwischen zwei oder mehreren Proben feststellen. Dies gilt in diesem Fall als Maß der Transkription bzw. Expression eines Gens. So konnte auch die Expression des Reportergens LacZ bestimmt werden, um die Aktivität des humanen TERT Promotors zu bestimmen.



**Abbildung 3.7:** a) + b) Expressionsanalyse von LacZ, mTERT und T-Ag mittels RT-PCR in hTERTp-lacZ x WAP-T bitransgenen Mäusen. c) Expressionsanalyse von mTERT und T-Ag mittels RT-PCR in WAP-T monotransgenen Mäusen. GAPDH dient als Ladekontrolle.

Wie eingangs erwähnt, konnte in Vorexperimenten in unserer Gruppe gezeigt werden, dass die LacZ mRNA-Menge die Aktivität des humanen TERT Promotors widerspiegelt. Daher kann auch hier die LacZ mRNA-Menge mit der mTERT mRNA-Menge verglichen werden und als Maß für die Promotoraktivitäten genutzt werden.

Sowohl für die LacZ als auch für die mTERT Expression lässt sich feststellen, dass sie in Tumorgeweben deutlich erhöht ist. Der humane TERT Promotor scheint zwar eine nicht ganz reprimierte Grundaktivität zu haben, was zu Beginn für den Stamm BALB/c schon gezeigt wurde (s. Abb. 3.1), doch kann man ganz klar eine Steigerung der LacZ Expression in den

Tumoren erkennen. Zusätzlich ist hier auch der Unterschied zwischen den induzierten und normalen Geweben in der T-Ag RT-PCR dargestellt. Die Expression des T-Ag unter dem WAP-Promotor wird während der Schwangerschaft hormonabhängig induziert, doch in den Tumorzellen der Mammakarzinome hormon-unabhängig weitergeführt. Die Aktivität der endogenen Telomerase (s. Abb. 3.5) korreliert auch mit der Menge an mTERT RNA, die man in beiden Tieren in der Leber und den beiden Tumoren nachweisen kann. Abbildung 3.7 zeigt hier exemplarisch, was während dieser Arbeit in mehreren Tumoren gefunden wurde. In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse von RT-PCRs für mTERT und LacZ in bitransgenen hTERTp-lacZ x WAP-T Tieren zusammengefasst. In monotransgenen WAP-T Mäusen konnte der mTERT Expressionsanstieg in Tumoren ebenfalls festgestellt werden, wie Abb. 3.7 c) verdeutlicht. In monotrasgenen hTERTp-lacZ Tieren, die auch nach der Schwangerschaft keine Tumore ausbilden, wurde keine erhöhte LacZ bzw. mTERT Expression gefunden (Daten nicht gezeigt).

Induktion	Tumor	Hohe Expression von	
		LacZ	mTERT
1 x	6	5	6
2 x	6	6	5
3 x	1	1	1
<b>total</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>12</b>
	<b>= 100 %</b>	<b>= 92 %</b>	<b>= 92 %</b>

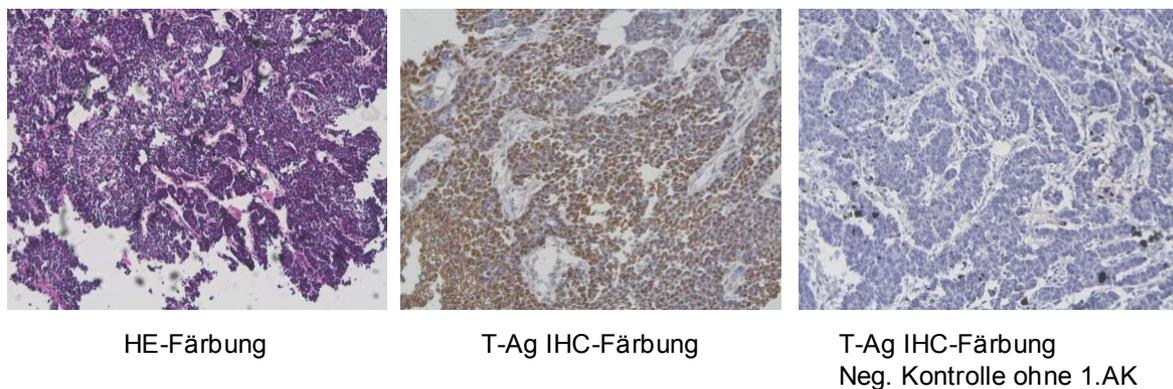
**Tabelle 3.1:** Zusammengefasste Auswertung von RT-PCR Ergebnissen von bitransgenen hTERTp-lacZ x WAP-T Mäusen

Es kann also festgestellt werden, dass sich in 13 untersuchten Tumoren von bitransgenen Tieren insgesamt 12 Tumore befanden, in denen sich erhöhte LacZ Expression nachweisen ließ und entsprechend 12 Tumore mit erhöhter mTERT Expression. Dieses Modell spiegelt also in Bezug auf die Hochregulation der Telomerase die Situation in menschlichen Mammakarzinomen wider, bei denen in ca. 90 % der Fälle eine hohe Telomeraseaktivität nachgewiesen werden kann.

### 3.4 Korrelation der TERT Promotor Aktivitäten mit der Expression von typischen Tumormarker Genen

Inwiefern die Telomerase allein als diagnostischer bzw. prognostischer Marker verwendet werden kann, ist viel diskutiert. Wir vermuten, dass Telomerase in Kombination mit anderen Faktoren betrachtet besser geeignet ist. Daher haben wir zunächst weitere Analysen angestrebt, um zu beobachten, ob Veränderungen in Expressionsmustern Tumor-relevanter Gene in diesem Modell humanähnlich ausfallen.

In folgender Abbildung ist ein Tumor exemplarisch dargestellt, der sich 14 Wochen nach Induktion im abdominalen Mammagewebe rechts entwickelte. Zur Charakterisierung wurden Gewebeschnitte der HE-Färbung und IHC-Färbung gegen T-Ag unterzogen.



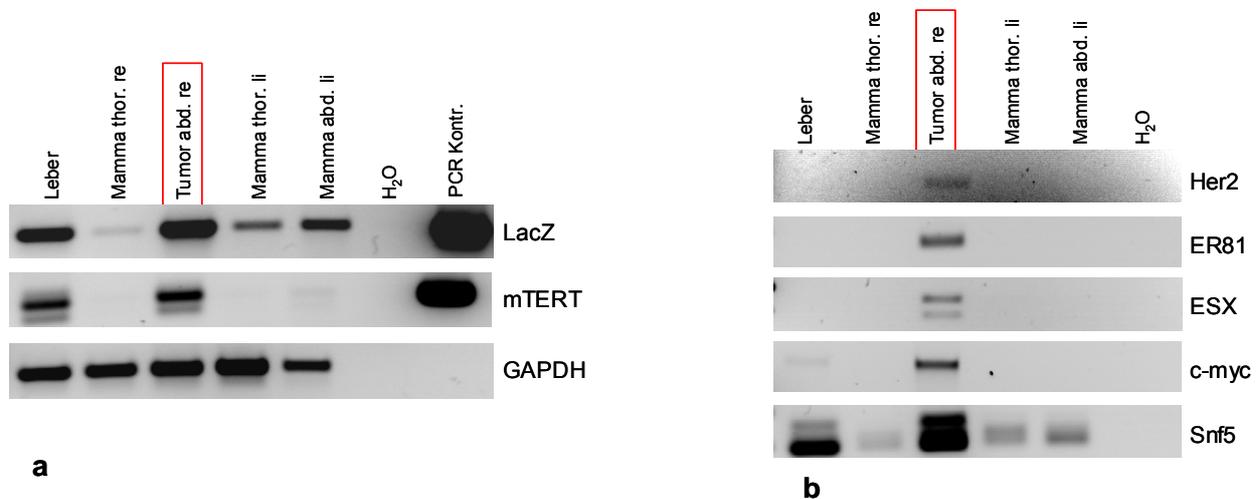
**Abbildung 3.8:** HE-Färbung und T-Ag-IHC an einem Mikrotomschnitt eines Mammakarzinoms von hTERTp-*lacZ* x WAP-T. Präparation der Maus erfolgte 14 Wochen nach Induktion.

Der Tumor konnte anhand der HE-Färbung als invasives Karzinom klassifiziert werden. Die Tumorzellen sind positiv für T-Ag, was zeigt, dass hier die Kontrolle des WAP-Promotors hormon-unabhängig geworden ist. Dies ist typisch für die Karzinome dieses Mausmodells.

Nun sollen hier die molekularbiologischen Analysen folgen. Es wurden RT-PCRs für verschiedene Gene durchgeführt, die mit Mammatumoren assoziiert sind. In Abbildung 3.9 a) konnte mit Hilfe der RT-PCR gezeigt werden, dass sowohl der humane TERT Promotor als auch der endogene mTERT Promotor aktiv sind, denn die Menge an LacZ, bzw. mTERT sind stark erhöht. Im Teil 3.9 b) wurden ausgewählte Faktoren analysiert, die bei humanen Mammakarzinomen hochreguliert sind. Her2 ist ein Transmembranrezeptor, dessen Status in menschlichen Brusttumoren zur Erstellung einer Prognose herangezogen wird. Er steht im Zusammenhang mit den Transkriptionsfaktoren ER81 und ESX, welche in dergleichen

## Ergebnisse

Signalkaskade agieren. C-myc ist ein bekannter Aktivator der TERT Expression und interagiert mit Snf5. Die Relevanz und die Beziehungen der Faktoren soll später noch eingehender diskutiert werden.



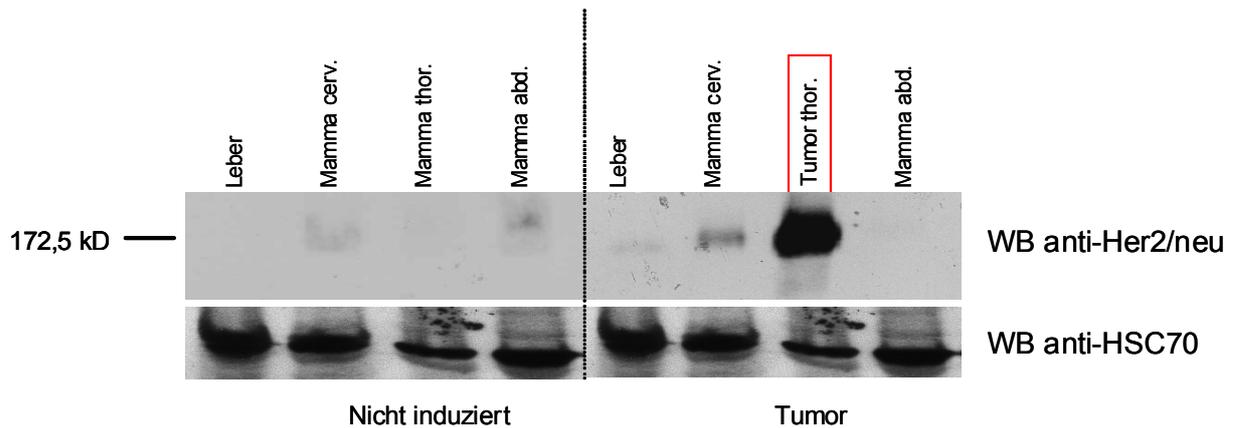
**Abbildung 3.9:** Expressionsanalysen in bitransgenen hTERTp-lacZ x WAP-T von a) LacZ, mTERT und T-Ag und b) den Tumormarkern Her2, ER81, c-myc, Snf5 und ESX mittels RT-PCR. GAPDH dient als Ladekontrolle

Her2 ist nur sehr schwach im Tumor exprimiert. Man findet aber ER81, ESX, c-myc und Snf5 deutlich hochreguliert im Tumor.

Offensichtlich sind in Mammakarzinomen dieses Mausmodells Faktoren hochreguliert, die auch in menschlichen Tumoren auffällig stark exprimiert werden.

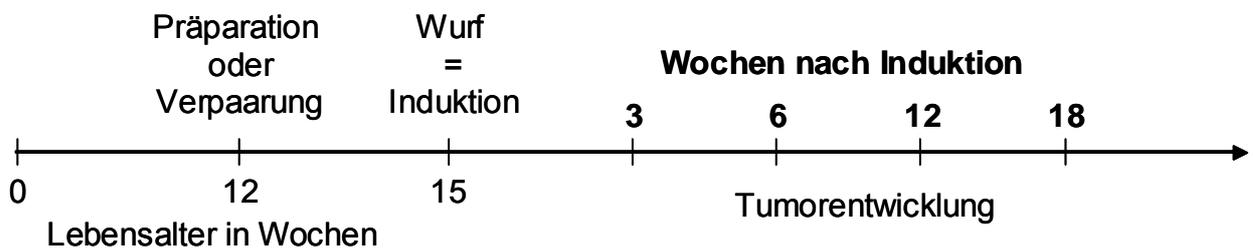
Für Her2 konnte auch mittels Western Blot gezeigt werden, dass dieses Protein speziell im Tumor in großer Menge vorliegt. Hier wurden zwei Mäuse untersucht, eine nicht induzierte, mit normalem Mammagewebe und eine induzierte Maus mit normalem- und Tumormammagewebe. Bei letzterer kann man die Her2-Mengen innerhalb eines Organismus in verschiedenen Stadien vergleichen. Es wurden Proteinlysate hergestellt und jeweils 50 µg Gesamtprotein auf das Gel geladen. Anschließend wurde ein Western Blot auf Nitrocellulose durchgeführt und mit polyklonalen Antikörpern gegen Her2 inkubiert.

Abbildung 3.10 zeigt, dass in Mammagewebe nicht induzierter Mäuse sich nur sehr geringe Mengen des Her2 Proteins befinden, die auch nur bei langer Exposition detektierbar sind. Im Tumor jedoch ist die Proteinmenge um ein Vielfaches erhöht. Dies ist nicht auf eine erhöhte Gesamtproteinkonzentration zurückzuführen, wie die Ladekontrolle mit dem Antikörper gegen HSC70 zeigt. Die Signalstärke des cervikalen Mammagewebes der induzierten Maus liegt etwas höher als die der nicht induzierten Gewebe, was vermutlich schon auf leichte Veränderungen hinweist, die jedoch bei der Präparation nicht detektierbar waren.



**Abbildung 3.10:** WB anti Her2 an normalen und Tumor-Mammagewebe von hTERTp-*lacZ* x WAP-T. HSC70 dient als Ladekontrolle.

Nun kann man hier nur einen Ausschnitt der Tumorentwicklung betrachten, aber keine zeitlichen Beobachtungen machen. Um zu untersuchen, ob diese oder andere Faktoren mit der Aktivierung der Telomerase assoziiert sind, musste die Tumorprogression zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet werden. Zunächst wurde eine Zeitreihe angelegt, bei der hTERTp-*lacZ* x WAP-T bitransgene Mäuse in verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung präpariert wurden. Nicht induzierte Mäuse wurden im Alter von ca. 12 Wochen präpariert. Die anderen Mäuse wurden mit 12 Wochen verpaart und nach ihrem Wurf, was gleichzeitig den Zeitpunkt der Induktion darstellt, unter Beobachtung gehalten.



**Abbildung 3.11:** Schematische Darstellung des Zeitablaufs von der Verpaarung der Maus bis zur Tumorentwicklung

Drei, sechs, zwölf, bzw. 18 Wochen nach Induktion wurden die Mäuse präpariert. Die Mäuse, die während der Beobachtungszeit sichtbare Tumore entwickelten, wurden präpariert, sobald

die Tumore einen Durchmesser von ca. 1 cm hatten oder der Allgemeinzustand der Maus sich verschlechterte. Die Mammagewebe wurden je zur Hälfte in flüssigem Stickstoff gefroren, bzw. in Formalin fixiert. Anschließend wurden RT-PCR Untersuchungen und TRAP-Assays durchgeführt, die dann mit der histologischen Begutachtung zusammengefasst in folgender Tabelle (s. Tab. 3.2) dargestellt sind.

Insgesamt kann man für alle untersuchten Faktoren sagen, dass ihre Expression im Karzinom erheblich ansteigt. Es besteht also eine Korrelation zwischen der Aktivitätssteigerung der TERT Promotoren und dem Expressionsanstieg der anderen untersuchten Gene. Man findet jenes Expressionsmuster nicht in Mäusen, die nach ihrer Induktion in bis zu 18 Wochen keine Tumore ausbildeten. Diese Gewebe besitzen teilweise intraepitheliale Neoplasien und duktale Dysplasien bis zu kleinen *in situ* Karzinomen (Tumorvorstufen). Allerdings konnte nur bei den Tumoren, die als undifferenzierte Karzinome eingestuft wurden, eine verstärkte Expression von LacZ und mTERT zusammen mit den anderen Genen gefunden werden.

	normal	Schwanger Tag 13,5	Vorstufen von Tumoren				Mammakarzinome			
			3 Wo n.I.	6 Wo n.I.	12 Wo n.I.	18 Wo n. I.	10 Wo n. I.	14 Wo n.I.	16 Wo n.I.	18 Wo* n. I.
LacZ	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	++	+	+/-
mTERT	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	++
Tel. Akt. (TRAP)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++	+	+	++
T-Ag (RT-PCR+IHC)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Her2/neu	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+	+/-	+
ER81	-	-	+/-	+/-	-	-	+	+	-	+
ESX	-	+	+/-	+/-	k.D.	k.D.	+	+	+	+
c-myc	-	k.D.	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+
Snf5	k.D.	k.D.	+	+/-	+/-	-	+	++	+/-	+

**Tabelle 3.2:** Zusammenfassung von RT-PCR Daten für LacZ, mTERT, T-Ag, Her2, ER81, ESX, c-myc, Snf5. IHC wurde für T-Ag Proteinlokalisierung durchgeführt. Telomeraseaktivität wurde mittels TRAP-Assay bestimmt.

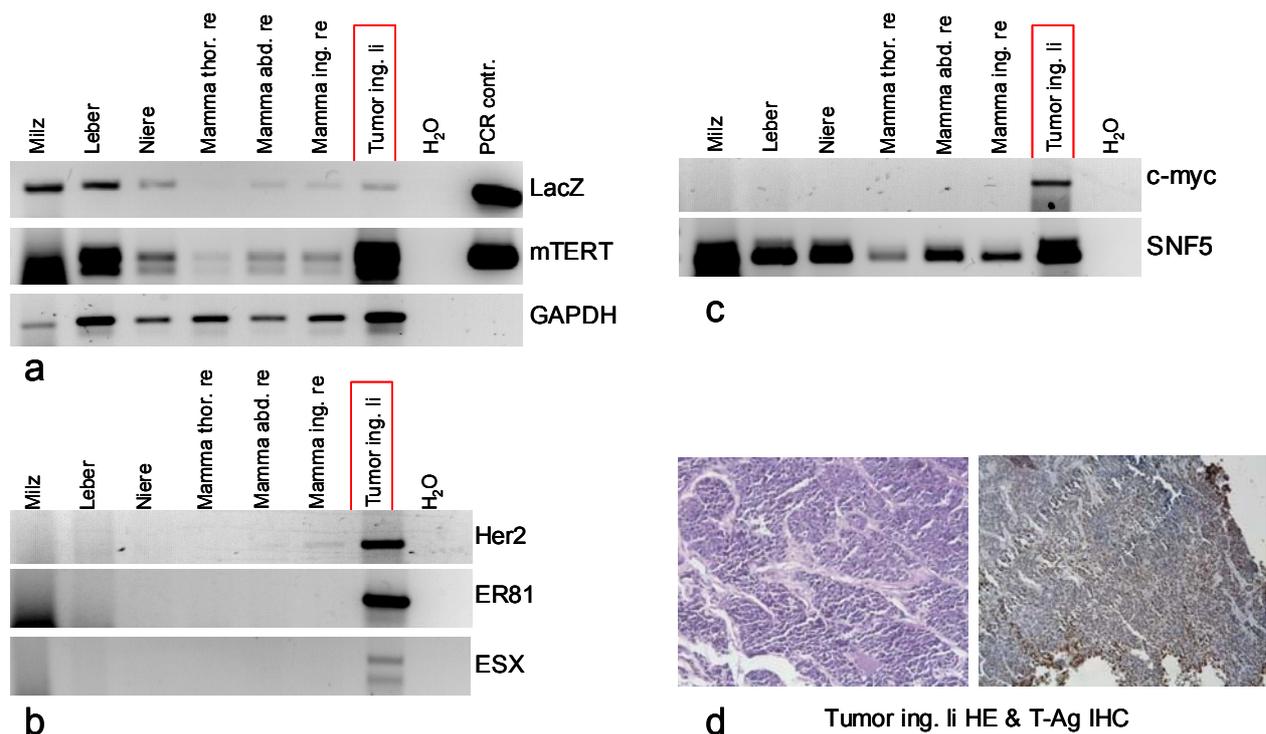
Die Daten stammen von 14 hTERTp-lacZ x WAP-T Tieren, je 1 x induziert. Es wurden pro Zeitpunkt mehrere Gewebeproben untersucht. (\*nur eine Probe verfügbar), **n.I.** (nach Induktion)

++ (stark erhöhte Expression), + (erhöhte Expression), +/- (schwache Expression oder nicht einheitlich), - (nicht exprimiert), **k.D.** (keine Daten vorhanden)

Nach dem Motto „keine Regel ohne Ausnahme“ ließ sich in zwei Ausnahmefällen zeigen, dass die beiden TERT Promotoren nicht immer gleich reguliert wurden. Der Tumor in

## Ergebnisse

Abbildung 3.12 a), der auch in Tab. 2 18 Wo\* n.I. erfasst ist, zeigt keine erhöhte LacZ Expression, aber einen starken Expressionsanstieg in Bezug auf mTERT. Nun stellte sich die Frage, ob unter den bisher untersuchten Faktoren ein Unterschied in der Expression vorlag. Abbildung b) und c) deuten jedoch darauf hin, dass diese Gene im Tumor alle hochreguliert waren, also keine Ausnahme zu den anderen, bisher untersuchten Tumoren bildeten. In Teil d) der Abbildung ist der Ausschnitt einer HE-Färbung gezeigt, nach welcher dieser Tumor als undifferenziertes Karzinom mit Anaplasien eingestuft wurde. Für ein Karzinom spricht ebenfalls, dass die Tumorzellen in der T-Ag IHC-Färbung positiv erscheinen. So könnte man vermuten, dass die Faktoren Her2, ER81, ESX, c-myc und Snf5 zwar die Aktivierung des murinen Promotors bedingen, den hTERT Promotor jedoch nicht beeinflussen. Da diese Beobachtung nur in einem Fall gemacht wurde, spricht sie nicht gegen die bisher gezogenen Schlüsse, sondern zeigt auf, dass die Promotoren *in vivo* durchaus differentiell reguliert werden können. Ein weiteres Ausnahmebeispiel soll in folgendem Abschnitt erläutert werden.

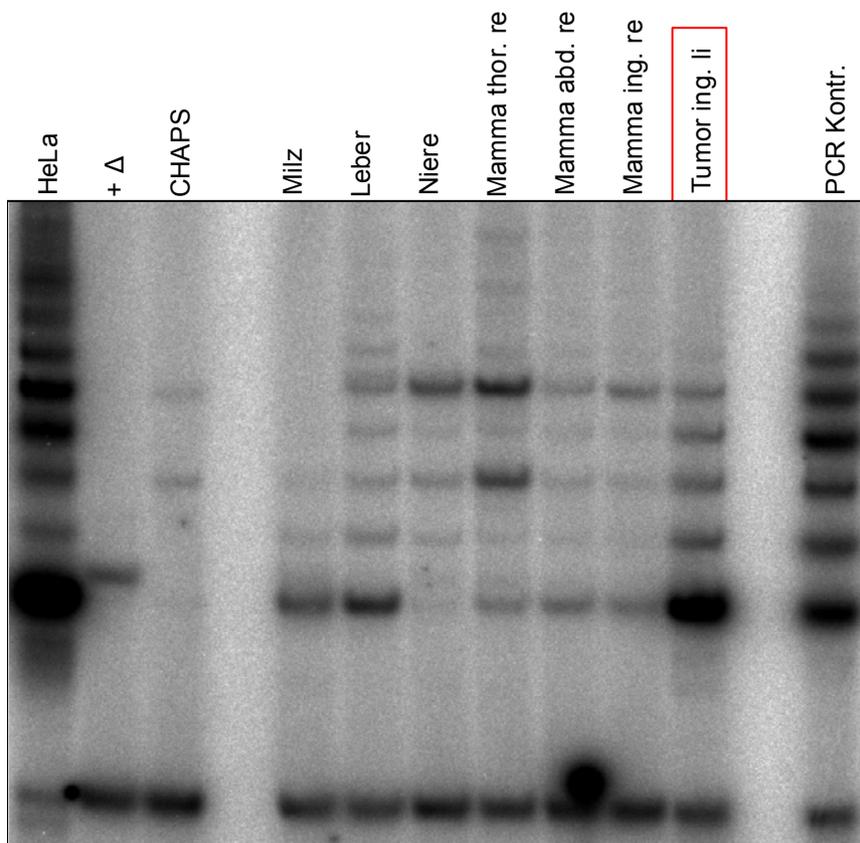


**Abbildung 3.12:** Expressionsanalysen von hTERTp-lacZ x WAP-T 18 Wochen nach Induktion mittels RT-PCR a) LacZ, mTERT, GAPDH als Ladekontrolle b) Her2, ER81, ESX c) c-myc und Snf5 d) HE- und T-Ag IHC-Färbungen an Gewebeschnitten des Tumors inguinal links

Zur Sicherheit sollte hier noch überprüft werden, ob die große Menge an mTERT RNA tatsächlich auch die Telomeraseaktivität steigerte. So konnte im TRAP-Assay (s. Abb. 3.13)

## Ergebnisse

gezeigt werden, dass dieser Tumor stark erhöhte Enzymaktivität aufwies. Die Korrelation von mTERT Expression und endogener Telomeraseaktivität kann hier nochmals bestätigt werden. Die schwachen DNA-Leitern in den nicht tumorigenen Mammageweeben sind hier experimentell bedingt.



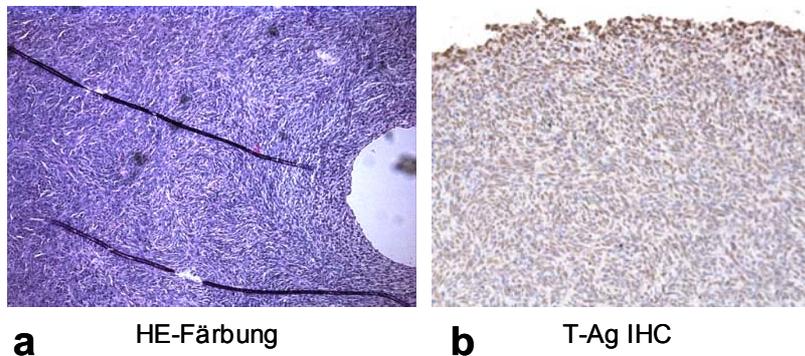
**Abbildung 3.13:** Bestimmung der Telomeraseaktivität von hTERTp-lacZ x WAP-T 18 Wochen nach Induktion mittels TRAP-Assay. Eingesetzt wurden je 400 ng Proteinextrakt.

### 3.5 Das Expressionsmuster im Leiomyosarkom unterscheidet sich deutlich von dem des Karzinoms

In der Regel entwickeln BALB/c Mäuse, die das T-Antigen des Simian Virus 40 unter der Kontrolle des WAP-Promotors tragen, nach Induktion durch Verpaarung Mammakarzinome. Doch in seltenen Fällen können sich andere Tumorarten entwickeln. Der BALB/c Hintergrund prädispositioniert die Tiere zwar für Mammatumore, es können aber durchaus auch Lymphome oder Sarkome auftreten. So ist während der Tumorprogressionsstudie ein Leiomyosarkom in einer hTERTp-lacZ x WAP-T bitransgenen Maus gefunden worden,

## Ergebnisse

welches 7 Wochen nach der Induktion auftrat. Das Leiomyosarkom ist ein maligner, mesenchymaler, von der glatten Muskulatur abgeleiteter Weichgewebstumor, der vor allem im Gastrointestinaltrakt und im Myometrium vorkommt. In folgender Abbildung sind Ausschnitte der HE- und T-Ag IHC-Färbungen dargestellt, welche zur histologischen Charakterisierung des Tumors herangezogen wurden. Für Karzinome ist die Expression von T-Ag im Tumorgewebe typisch. Es unterscheidet sie auch von z.B. Lymphomen. Doch auch in Leiomyosarkomen, die in diesem Mausmodell jedoch äußerst selten auftreten, wird das T-Ag erfahrungsgemäß exprimiert. Hier konnte dieser Tumor ebenfalls als positiv für T-Ag identifiziert werden.

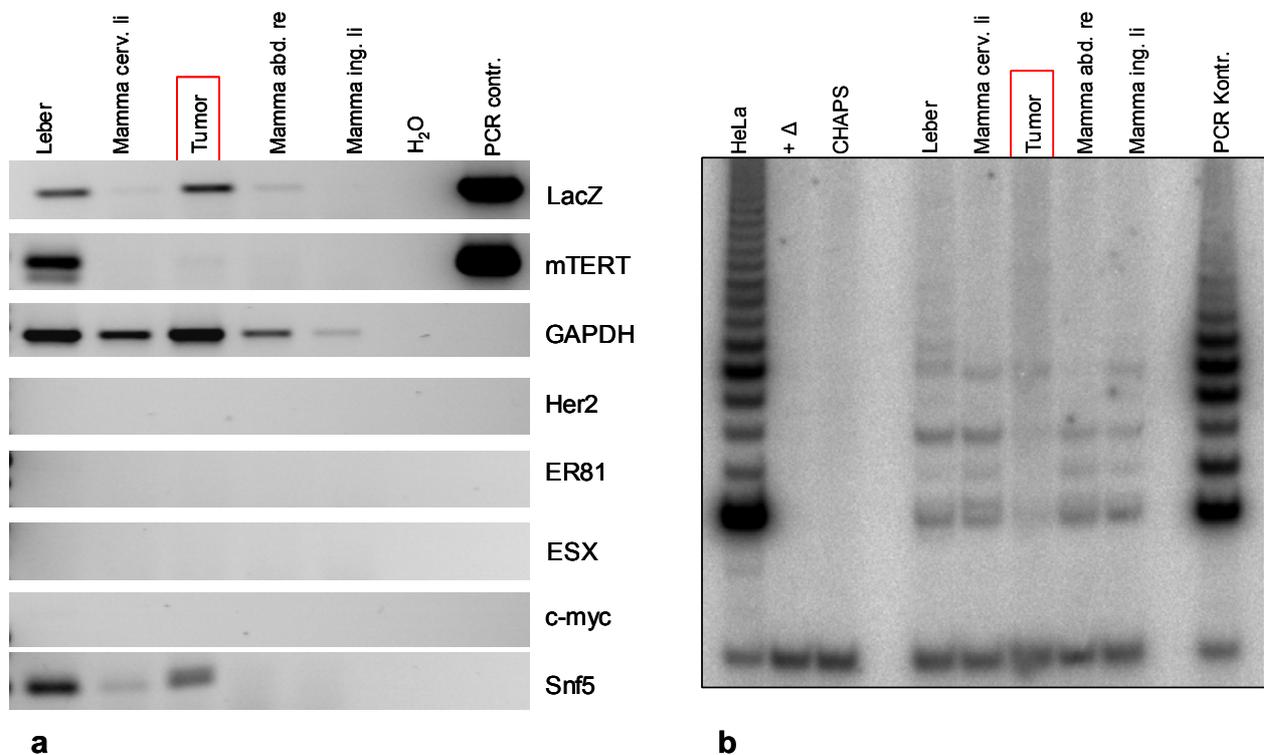


**Abbildung 3.14:** Färbungen an Gewebeschnitten des Leiomyosarkoms in hTERTp-*lacZ* x WAP-T  
a) HE-Färbung b) T-Ag IHC

Über den Telomerase-Status in Sarkomen ist bisher bekannt, dass sie zu einem geringeren Prozentsatz Telomerase-positiv sind als Karzinome, von denen ca. 90 % Telomeraseaktivität enthalten. Fasst man sechs Studien zusammen, zeigten von den insgesamt 210 analysierten Sarkomen 56 % keine Telomeraseaktivität (Schneider-Stock et al., 1999; Yan et al., 1999; Aogi et al., 2000; Yoo & Robinson, 2000; Bovee et al., 2001; Scheel et al., 2001).

Nun hatten wir die Möglichkeit, zu prüfen, ob hier ebenfalls die beiden TERT Promotoren reaktiviert werden. Zusätzlich sollten natürlich auch die anderen bisher untersuchten Faktoren hinsichtlich ihrer Expression überprüft werden. In Abbildung 3.15 a) sind die verschiedenen RT-PCRs zu sehen. Hier ist auffällig, dass offenbar der humane Promotor eine Reaktivierung erfährt, was man am Anstieg des LacZ erkennt. Die murine TERT RNA jedoch ist zwar wie üblich in der Leber, nicht aber im Tumor nachweisbar. Das spiegelt sich auch im Teil b) der Abbildung wider, denn im Proteinextrakt des Tumors konnte mittels TRAP-Assay keinerlei Enzymaktivität nachgewiesen werden. Man kann auch hier die Unterschiede der beiden

Promotoren in der Regulation aufzeigen. Im Unterschied zu den vorher beschriebenen Mammakarzinomen weist dieser Tumor keine Expression von Her2, ER81, ESX und c-myc auf. Snf5 ist hier nur sehr schwach exprimiert, jedoch auf keinen Fall erhöht wie zuvor für Karzinome gezeigt. So kann festgestellt werden, dass die parallele Aktivierung beider TERT Promotoren nicht generell an die Entstehung eines Tumors gekoppelt ist. In Abbildung 3.12 konnte in einem Mammakarzinom gezeigt werden, dass nur das murine TERT exprimiert wurde und der humane TERT Promotor nicht aktiviert wurde. In dem oben beschriebenen Fall ließen sich die für Mammakarzinome typischen Marker ebenfalls hochreguliert nachweisen. Im Leiomyosarkom jedoch scheint spezifisch der humane TERT Promotor aktiv zu sein. Dieser wird hier offenbar durch andere Regulatoren beeinflusst.



**Abbildung 3.15:** Untersuchungen zum Leiomyosarkom einer hTERTp-lacZ xWAP-T Maus 7 Wochen nach Induktion **a)** Expressionsanalyse von LacZ, mTERT, Her2, ER81, ESX, c-myc und Snf5 mittels RT-PCR. GAPDH dient als Ladekontrolle. **b)** Bestimmung der Telomeraseaktivität mittels TRAP-Assay. Eingesetzt wurden je 400 µg Proteinextrakt.

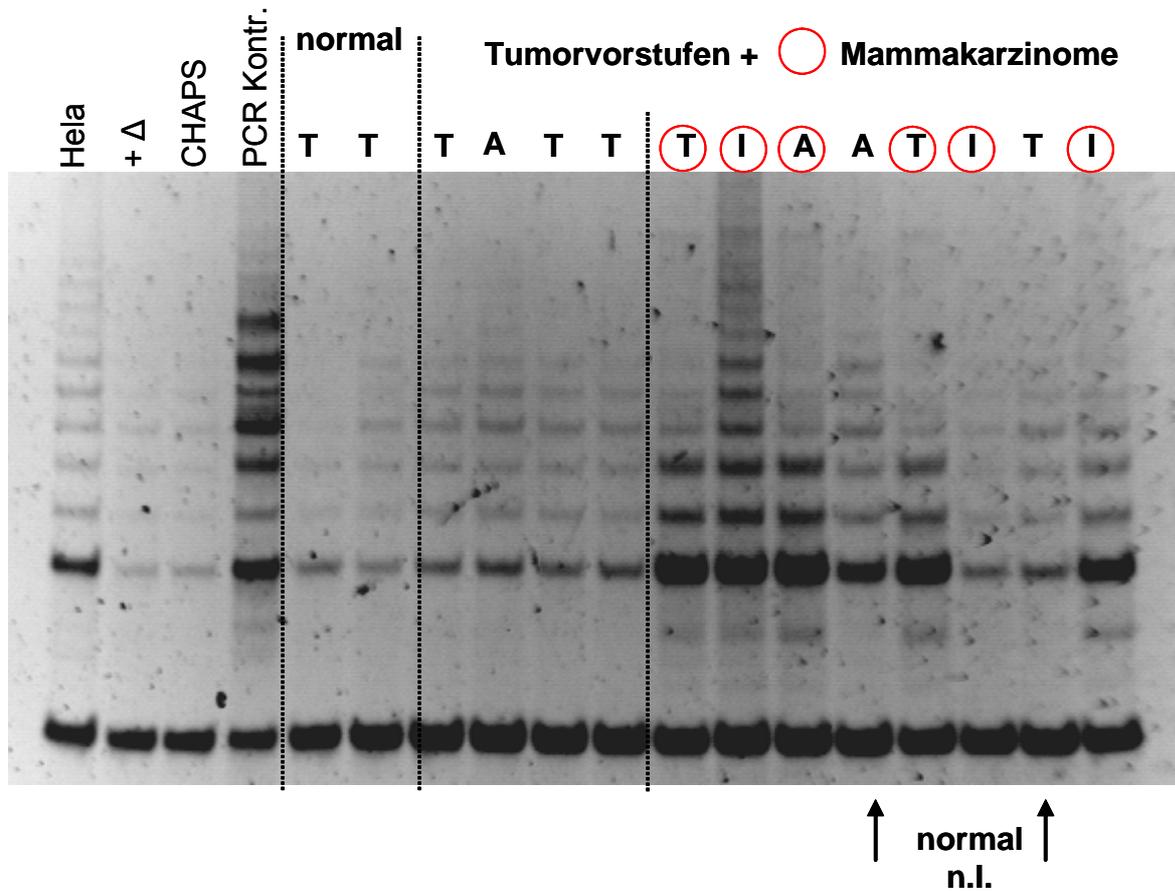
### 3.6 Analyse von Expressionsprofilen durch Microarrays

Mit Hilfe der bisher gezeigten Techniken wie z.B. der RT-PCR lassen sich nur einzelne Gene auf ihre Expression hin untersuchen. Doch um eine Korrelation zwischen der TERT Hochregulation und damit einhergehenden Faktoren herzustellen, bietet sich die Erstellung eines Expressionsprofils an. Die Suche nach geeigneten Kandidaten und neuen Transkriptionsfaktoren kann so über das gesamte Transkriptom ausgeweitet werden.

DNA-Microarrays finden zunehmend Anwendung in der Genomanalyse, der Diagnostik und bei Untersuchungen in der differentiellen Genexpression. DNA-Microarrays dienen dazu, die RNA-Menge bestimmter Gene nachzuweisen und so ein Expressionsprofil der Probe darzustellen. In den hier verwendeten Chips von Affymetrix dienen Oligonukleotide als Sonden, die an definierte Positionen eines Rasters im Chip liegen. Zunächst wurde RNA aus den zu untersuchenden Geweben isoliert. Die weitere Behandlung des Materials, Übersetzung in cDNA und Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen wurde von Dr. Thomas Streichert und Kristin Reek durchgeführt (Institut für klinische Chemie, UKE Hamburg). Diese cDNA wurde dann mit den DNA-Microarrays hybridisiert. Hierbei binden markierte cDNA Stücke an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array. Nach der Abwaschung der nicht gebundenen cDNA Stücke wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays mittels eines Lasers ausgelesen. Diese reine Intensität wird üblicherweise noch normalisiert um Abbaueffekte, verschieden gute Extraktionen und andere Effekte mit einzurechnen.

In diesem Versuch wurden verschiedene Mammagewebe von hTERTp-*lacZ* x WAP-T Mäusen untersucht, je nach Status der Tumorentwicklung. Nicht induzierte Mäuse wurden als Kontrollgruppe verwendet, Gewebe von Mäusen sechs Wochen nach Induktion stellten Tumorstadien dar. Nach histologischer Beurteilung kann bei diesen Stadien davon ausgegangen werden, dass die Gewebe einen einheitlichen Entwicklungsstand besitzen. Die dritte zu untersuchende Gewebegruppe stellten Mammarkarzinome dar, die allesamt invasive Karzinome waren. In einer vierten Gruppe wurden Gewebe zusammengefasst, die von induzierten Mäusen stammten, aber phänotypisch völlig normal wirkten (nicht abgebildet in Abb. 3.17). Insgesamt wurden 12 Gewebeproben für den Versuch eingesetzt, wobei jeweils 2-5 Gewebe pro Gruppe untersucht und zusammengefasst wurden.

Zuerst wurde mittels TRAP-Assay der Status der Telomeraseaktivität bestimmt.

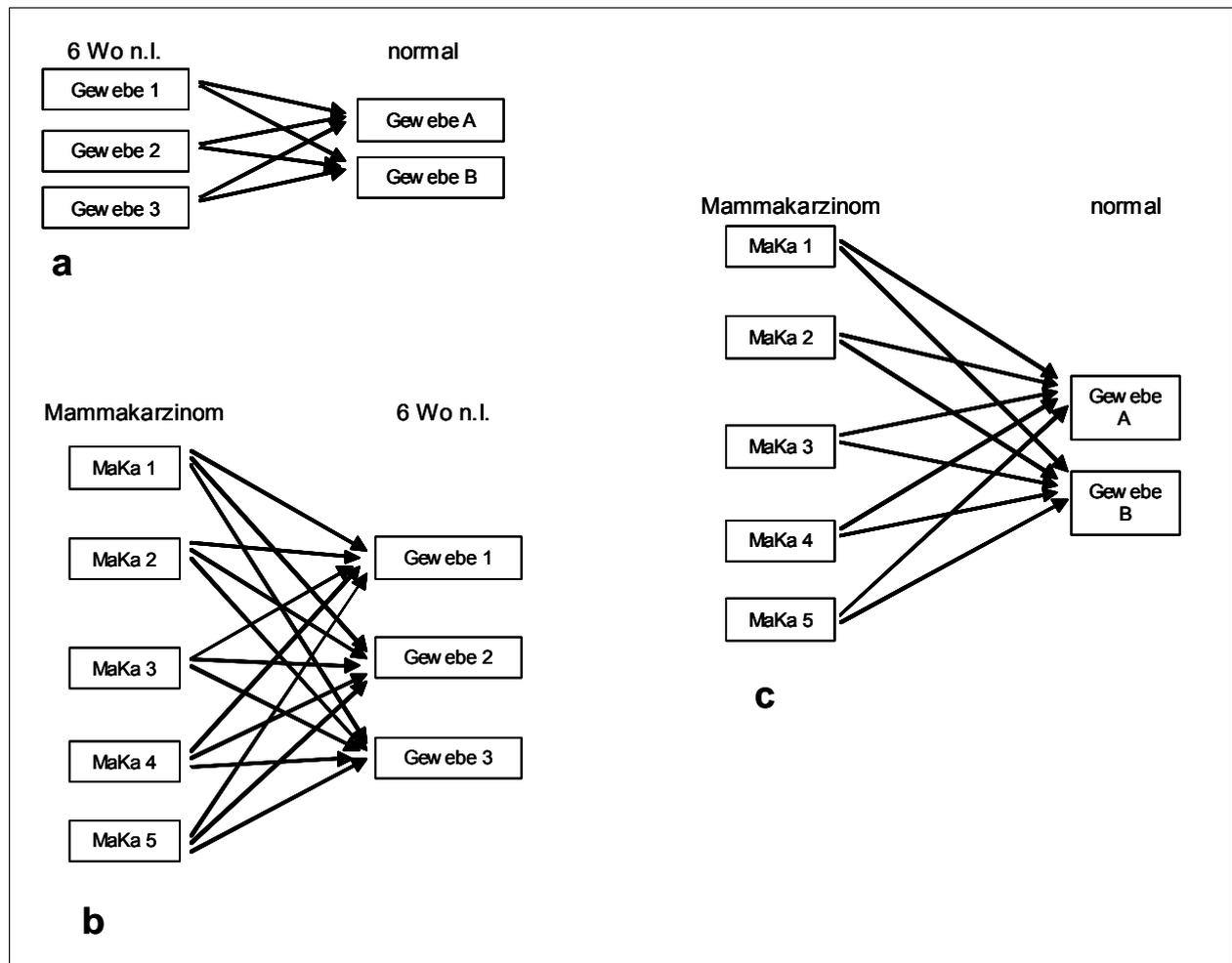


**Abbildung 3.16:** TRAP-Assay von Mammageweben, die für Microarrays eingesetzt wurden

Abbildung 3.16 zeigt, dass die Mammakarzinome allesamt eine erhöhte Telomeraseaktivität aufweisen. Die Tumorvorstufen zeigen im Vergleich zu den normalen Geweben nur einen äußerst geringen Anstieg der Enzymaktivität.

Die Expressionsprofile der verschiedenen Gruppen wurden nun gegeneinander verglichen. Abbildung 3.17 zeigt die gezogenen Vergleiche zwischen den Gewebegruppen.

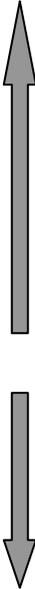
Aus den ermittelten Signalintensitäten lässt sich nicht nur auf die Anzahl der Gene schließen, die ihre Expression ändern, sondern man kann sie auch einzeln betrachten. Hierbei wird meist angegeben, um ein wieviel Faches sich die Expression bei den verglichenen Gruppen zueinander erhöht oder erniedrigt.



**Abbildung 3.17:** Darstellung der Vergleiche zwischen je zwei Gruppen **a)** 6 Vergleiche: 6 Wochen nach Induktion vs normal **b)** 15 Vergleiche: Mammakarzinome vs 6 Wochen nach Induktion **c)** 10 Vergleiche: Mammakarzinome vs normal

Aus den gewonnenen Daten wollen wir nun bekannte und *in vitro* beschriebene TERT Regulatoren herausfiltern und deren Expressionsstatus in Mammakarzinomen bestimmen. Zusätzlich könnten hier bestimmte Mammakarzinom-spezifische Faktoren als neue Regulatoren für TERT identifiziert und anschließend getestet werden. Des Weiteren besteht natürlich auch ein großes Interesse neue Gene ausfindig zu machen, die in der Tumorentwicklung und Progression eine Rolle spielen. In nachfolgender Tabelle 3.3 seien nur einige erste Beispiele genannt.

<b>Mammakarzinom vs normal</b>		
	Vergleiche	x-fach Regulation
<b>Her2/neu</b>	6 von 10	2-111 x
<b>ER81</b>	8 von 10	3-27 x
<b>SP1</b>	10 von 10	3,5-11 x
<b>Snf5</b>	7 von 10	1,2-4 x
<b>STAT3</b>	10 von 10	2-10 x
<b>CTCF</b>	9 von 10	2-6 x
<b>CEBP beta</b>	8 von 10	1,3-3 x
<b>CEBP alpha</b>	10 von 10	4-52 x
<b>Caveolin</b>	10 von 10	10-45 x
<b>Pparg</b>	10 von 10	97-550 x
<b>Tusc5</b>	10 von 10	4,9-59 x



**Tabelle 3.3:** Eine Auswahl regulierter Gene aus Mikroarray-Daten. Änderung der Expressionsstärke in 10 Vergleichen zwischen Mammakarzinomen und normalem Mammagewebe von hTERTp-lacZ x WAP-T

Zur Validierung der erhaltenen Daten wurden nun von denselben Geweben, die für den Array eingesetzt wurden RT-PCRs durchgeführt (s. Abb. 3.18). So ließ sich zeigen, dass die murine TERT Expression in Karzinomen stark hochreguliert wurde. Damit einhergehend wurde auch die endogene Telomeraseaktivität in den Karzinomen verstärkt nachgewiesen, wie der TRAP-Assay in Abbildung 3.16 darstellt. Leider ließen sich die Werte für die Regulation des murinen TERT Gens nicht auswerten. Von den beiden Oligonukleotiden, die der Genchip enthält, liegt eines außerhalb des transkribierten Genbereichs und ist somit auf der mRNA nicht vorhanden. Da in den Zellen nur wenige Kopien der TERT mRNA vorliegen und diese auch nur eine kurze Halbwertszeit besitzen, kann die Hybridisierung und Signalauswertung eines einzigen Oligonukleotids auf dem Chip schwierig sein. Der Affymetrix Chip 430 2.0 scheint also nicht geeignet für die Untersuchung des murinen TERT Gens.

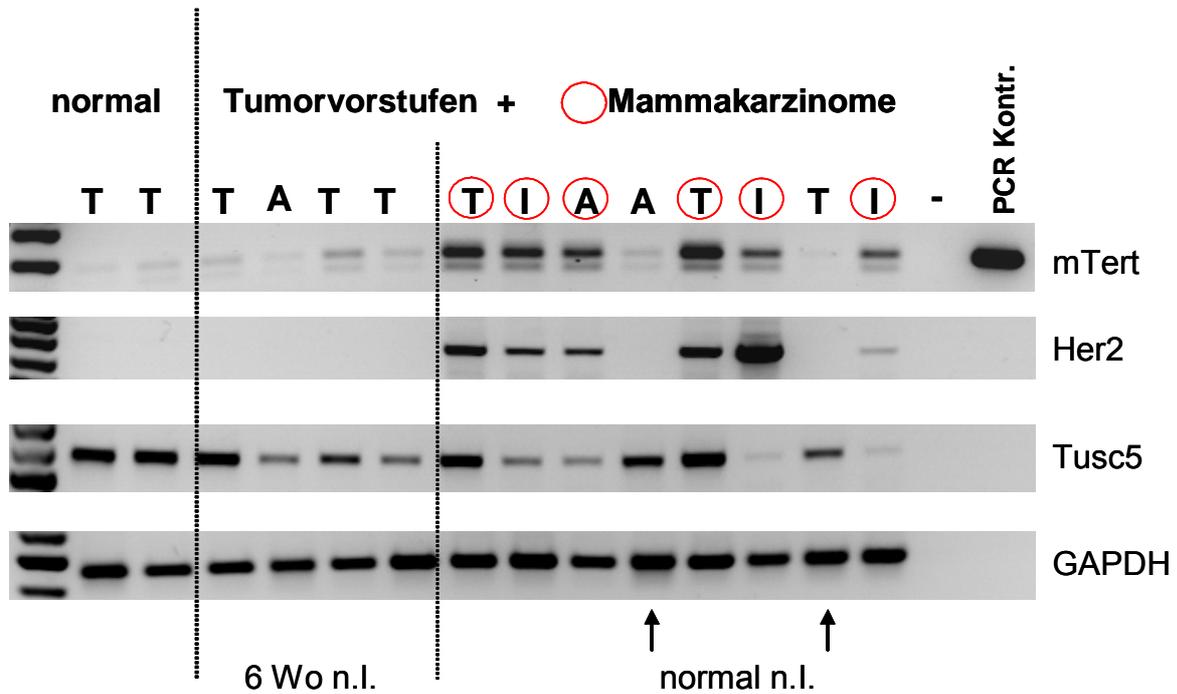
Auch für Her2 bestätigte sich durch die RT-PCR der Expressionsanstieg in Karzinomen. In normalen Geweben oder den Tumorstufen ließ sich noch keine RNA dieses Gens nachweisen.

Für die Gene Her2, ER81 und Snf5 konnte ein Anstieg der Expression in Mammakarzinomen auch durch die Microarray-Technik gemessen werden, wie Tabelle 3.3 zeigt. In 6 von 10 Vergleichen wurde Her2 in Karzinomen bis zu 111-fach stärker exprimiert als in den normalen Mammageweben. Auch für den bekannten TERT Aktivator SP1 wurde in allen Vergleichen ein Expressionsanstieg gemessen, wobei dieser zwischen 3,5-11-fach lag. Ein weiterer Regulator der TERT Expression, STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) wurde in Karzinomen hochreguliert gefunden. STAT3 ist in vielen humanen Tumoren überexprimiert und trägt durch Aktivierung von hTERT zum Überleben der Tumore bei. Durch Inhibition von STAT3 kann das Wachstum bestimmter Tumore verringert und Apoptose eingeleitet werden (Konnikova et al., 2005). Der als TERT-Repressor beschriebener Faktor CTCF (s. Einleitung 1.4) ist ebenfalls in den untersuchten Mammakarzinomen erhöht exprimiert. Inwieweit die TERT-Repressorfunktion jedoch vorhanden ist, kann durch diesen Versuch nicht geklärt werden.

Die beiden CEBP Transkriptionsfaktoren alpha und beta wurden, wie auch in humanen Karzinomen unterschiedlich reguliert (Milde-Langosch et al., 2003). Während CEBP beta eine Hochregulation erfährt, wird CEBP alpha in Tumoren stark reprimiert. Ein häufig deletiertes Gen in humanen Brustkarzinomen ist das Caveolin1. In Mäusen führt der Verlust von funktionellem Caveolin1 zu Hyperplasien im Mammaepithelgewebe (Lee et al., 2002). Die enorme Herunterregulation der Caveolin1 mRNA in den Tumoren der untersuchten Mäuse impliziert auch hier einen Verlust der Expression.

Eine Möglichkeit der TERT Derepression ergibt sich aus der Absenkung der mRNA-Mengen von Pparg in Tumoren. Wird der Rezeptor Pparg (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) durch Ligandenbindung aktiviert, führt dies zu einer Repression der TERT Expression (Ogawa et al., 2006). So ist durch Fehlen des Rezeptors eine Derepression denkbar, doch muss dies erst über spezifische Experimente untersucht werden.

Interessanterweise zeigte ein spezielles Gen bei der Auswertung der Signalstärken eine hoch signifikante Repression in den untersuchten Mammakarzinomen. Es stellte sich heraus, dass dieses als Tusc5 (tumor suppressor candidate 5) benannte Gen zwar wenig beschrieben, doch als neuer putativer Tumorsuppressor gehandelt wird (Konishi et al., 2003). Daher wurde es hier genauer untersucht (s. Abb. 3.18).



**Abbildung 3.18:** RT-PCR für mTERT, Her2 und Tusc5 von Mammageweben, die für Microarrays eingesetzt wurden. GAPDH dient als Ladekontrolle.

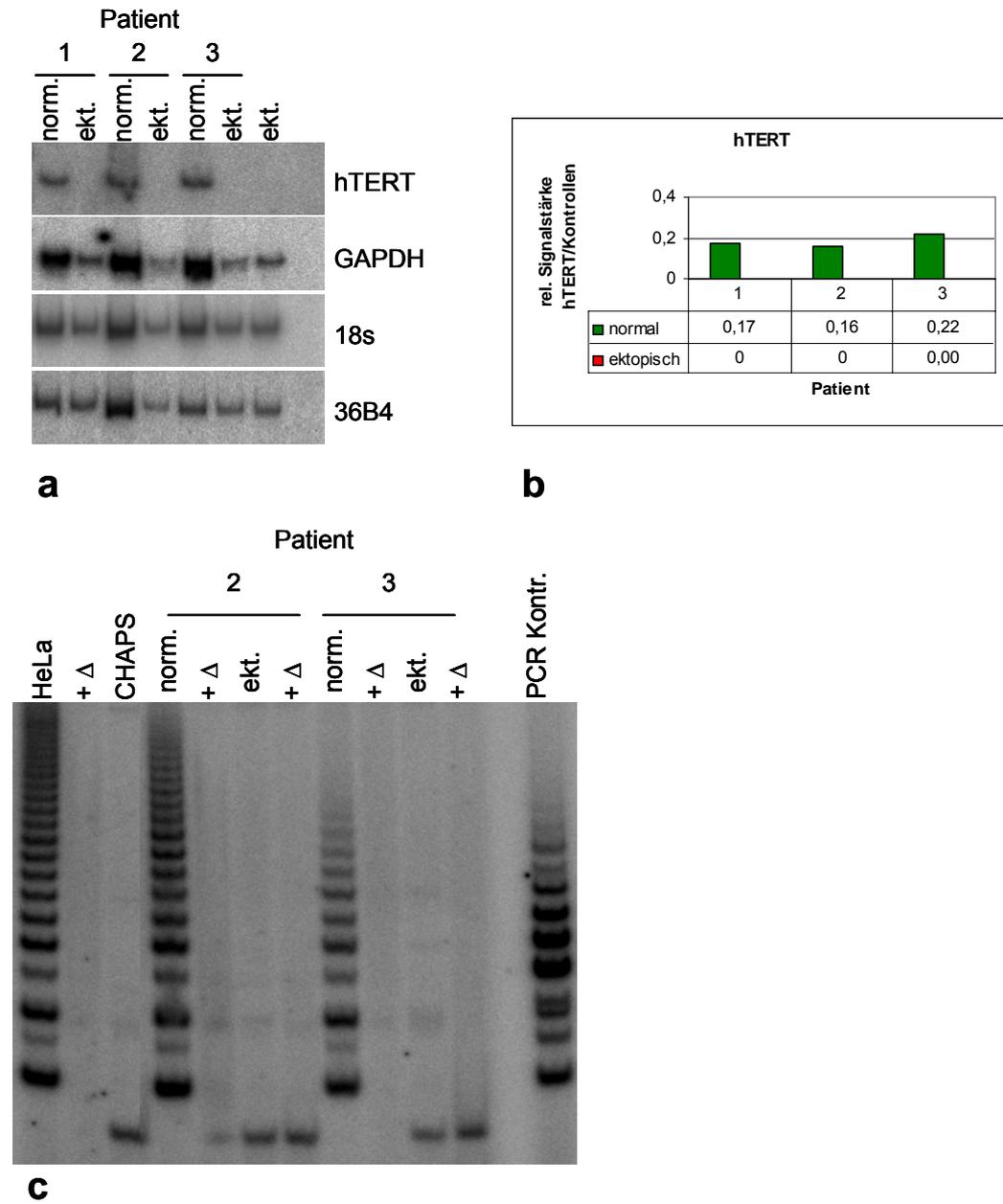
Die Regulation des *Tusc5* Gens zeigt sich in der hier abgebildeten RT-PCR als nicht so stark reprimiert, wie aus den Microarray Daten zu entnehmen, doch ist auch hier zu sehen, dass die Tumore eine geringere Expression von *Tusc5* aufweisen, als normale Mammagewebe. Auffällig ist, dass die Expression dieses Gens bereits teilweise in den Tumorstufen herunterreguliert ist.

### 3.7 Repression der Telomerase in ektopischen Geweben von Patienten mit Endometriose

In normalem Endometrium konnte Telomeraseaktivität assoziiert werden mit verschiedenen Phasen des Menstruationszyklus. In der proliferativen Phase konnten sowohl TERT mRNA als auch Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. In sekretorischem Endometrium hingegen war dies nicht der Fall (Kyo et al., 1999). In malignem Endometrium konnte ebenfalls hohe Telomeraseaktivität nachgewiesen werden, die mit der Expression von TERT mRNA korrelierte. Über das ektopische Gewebe von Patientinnen mit Endometriose waren bislang in Bezug auf Telomerase keinerlei Daten veröffentlicht. So bot sich hier die Gelegenheit, dies an Proben von Patientinnen zu untersuchen, denen ektopisches Endometrium entfernt wurde. Zum Vergleich wurde auch eine Probe der normalen Gebärmutter Schleimhaut jeder Patientin entnommen. Die Operation fand 4-10 Tage nach der letzten Menstruation statt, in der sich die Schleimhaut in der proliferativen Phase befindet. Die Gewebeprobe wurden freundlicherweise von Dr. Menelaos Zafrakas (Department of Obstetrics and Gynecology, Aristotle University of Thessaloniki) zur Verfügung gestellt.

In Abbildung 3.19 a) ist die Expression des humanen TERT Gens mittels radioaktiver RT-PCR dargestellt. In normalem Endometrium aller drei Patientinnen konnte die Expression von TERT wie erwartet, gezeigt werden. In Endometrium, welches außerhalb der Gebärmutter wuchs, also ektopischem Gewebe war überraschenderweise keine TERT mRNA nachweisbar. Es wurden zwar für die RT-PCR jeweils gleiche Mengen an RNA eingesetzt, doch findet man in der Kontroll-PCR für GAPDH deutliche Variationen in der Menge der Expression. Aus diesem Grund wurden zwei weitere konstitutiv exprimierte Gene untersucht. Die 18S RNA ist ein Bestandteil der Ribosomen und 36B4 codiert für das ribosomale Phosphoprotein P0. Hier sind die Mengenunterschiede nicht so deutlich ausgefallen. Nun wurden alle drei Kontrollgene zusammengefasst und zur Normalisierung der hTERT Expression herangezogen. Bei der dargestellten Quantifizierung der Signale (s. Abb. 3.19 b) wird deutlich, dass auch bei Anwendung dieser Technik zur Auswertung die TERT Expression in ektopischem Gewebe nicht nachweisbar ist. Nun korreliert die Aktivität der Telomerase mit der Expression der katalytischen Untereinheit TERT und es war von Interesse, ob sich in ektopischem Endometrium Enzymaktivität nachweisen ließ. Es wurden Proteinextrakte hergestellt und jeweils 1 µg Gesamtprotein für den TRAP-Assay eingesetzt. In Abbildung 3.19 c) kann gezeigt werden, dass normales Endometrium im Gegensatz zu ektopisch wachsendem Gewebe positiv für Telomeraseaktivität ist. Dieses Ergebnis unterstützt die RT-PCR Daten. Der radioaktive TRAP-Assay, wie er hier angewendet wurde, ist höchst

sensitiv. Eine Enzymaktivität lässt sich noch bei nur 200 eingesetzten Telomerase-positiven Zellen nachweisen.



**Abbildung 3.19:** a) Expressionsanalyse von hTERT in normalem und ektoischem Gewebe dreier Patientinnen durch radioaktive RT-PCR. GAPDH, 18S und 36B4 dienen als Kontrollen, b) Quantifizierung der RT-PCR Signale, c) Bestimmung der Telomeraseaktivität mittels TRAP-Assay in normalen und ektoischen Geweben von 2 Patientinnen. Eingesetzt wurde je 1 µg Gesamtprotein.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Mausstämme C57BL/6J und BALB/c unterscheiden sich in der Grundexpression des hTERTp-lacZ Transgens jedoch nicht in ihrer endogenen Telomeraseaktivität

In dieser Arbeit sollte die Regulation des humanen TERT Promotors während der Tumorentwicklung untersucht werden. Hierzu war es notwendig zwei transgene Mausmodelle zu vereinen: (i) Ein gut untersuchtes Mausmodell für die Analyse der Mammakarzinogenese stellt das WAP-T Modell dar. Hierbei entwickeln diese Mäuse nach einer gezielten Induktion Mammatumore mit einer definierten Latenzzeit (Schulze-Garg et al., 2000). Die Entstehung der Tumore wird einerseits begünstigt durch die genetische Prädisposition des BALB/c Stamms, in welchem das WAP-T Modell generiert wurde und andererseits unterstützt durch die Expression des Transgens. Die frühe Genregion der SV40 steht hier unter der Kontrolle des WAP-Promotors (whey acidic protein), welcher während der Laktation hormonabhängig aktiviert wird. Das als Onkoprotein agierende T-Ag führt nun in Epithelzellen des Drüsengewebes zu Entstehung von Karzinomen. Aufgrund der genetischen Disposition für die Entstehung von Mammatumoren wurden für das WAP-T Mausmodell Tiere des BALB/c Stammes verwendet. (ii) Das hTERTp-lacZ Mausmodell zur Untersuchung des humanen TERT Promotors *in vivo* wurde in unserer Arbeitsgruppe im C57BL/6J-Mausstamm generiert. In diesem genetischen Hintergrund konnte gezeigt werden, dass sich der humane TERT Promotor durchaus human-ähnlich verhielt (Ritz et al., 2005). Für die Fragestellung dieser Arbeit wurde zunächst das hTERTp-lacZ Konstrukt für mehrere Generationen in den BALB/c Stamm eingekreuzt. Diese Tiere wurden mit WAP-T-Mäusen verpaart. Hier war es notwendig zu überprüfen, inwieweit sich die Expression des hTERTp-lacZ Transgens auch im BALB/c Mausstamm human-ähnlich verhielt.

Die Analysen zeigten, dass während sich die Expression des *lacZ*-Reportergens im C57BL/6J Stamm spezifisch auf die Hoden beschränkte, im BALB/c Stamm eine Grundexpression auch in Mammagewebe, dem Muskel und der Niere detektierbar war. Was unterscheidet nun die beiden Mausstämme?

Die Prädisposition des BALB/c Inzuchtstammes für Mammatumore beruht auf zwei Punktmutationen, die sich auf die Gene für das Protein p16 und ein DNA-Reparaturprotein auswirken (s. auch Einleitung 1.7). Diese sind durch die Mutationen nur reduziert funktionsfähig. Das p16 Protein ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus und in dieser

Funktion auch ein Tumorsuppressor. Die Aktivität von E2F-Transkriptionsfaktoren und somit die Progression des Zellzyklus, werden über das Retinoblastomprotein, pRb, durch p16 reguliert. So kann die Einschränkung der p16 Funktion diesen Signalweg beeinträchtigen. In normalen humanen Fibroblasten wurde gezeigt, dass die Überexpression von E2F-Transkriptionsfaktoren E2F-1, -2 und -3 in der Lage ist den hTERT Promotor zu aktivieren (Won et al., 2002). In Tumorzellen führt die Überexpression von E2F-1 jedoch zu Repression von hTERT (Crowe et al., 2001). Je nach zellulärem Kontext können diese Faktoren auch einen Komplex zusammen mit Pocket-Proteinen (pRb, Rb2) und Histondeacetylasen bilden und die Repression von hTERT vermitteln (Won et al., 2004). Wird die Zusammenlagerung des Komplexes verhindert, ist eine Derepression der hTERT Expression und der Telomeraseaktivität zu beobachten. In BALB/c Mäusen ist dieser Signalweg durch die Punktmutation im *p16* Gen gestört und die E2F-Faktoren sind nicht komplexiert und können somit ihre Targetgene aktivieren. Dies kann in dem Stamm BALB/c dazu führen, dass der hTERT Promotor nicht so stark reprimiert vorliegt wie in C57BL/6J Mäusen.

Eine andere mögliche Erklärung für die höhere Grundexpression des Transgens im BALB/c Mausstamm könnte allerdings auch durch Veränderung der Kopienzahl oder der Integrationsorte bedingt sein. Beim Einkreuzen des hTERTp-*lacZ* Konstrukts in den BALB/c Hintergrund wurden stets diejenigen Tiere zur weiteren Verpaarung eingesetzt, die bei der Genotypisierung starke LacZ Signale aufwiesen. Es kann also sein, dass unabsichtlich diejenigen Tiere bevorzugt wurden, die mehr Integrationen besaßen als im C57BL/6J Mausstamm. Darüber hinaus könnte das Transgen auch durch eine Veränderung des Integrationsorts in die Nähe eines Enhancers gelangen, wodurch die Transkription des LacZ-Reporters begünstigt würde. Über die Expression von Transgenen wie LacZ oder GFP ist jedoch auch bekannt, daß ihre Expression sogar in isogenen Individuen variieren kann, abhängig vom Ausmaß epigenetischer Modifikationen (Robertson et al., 1995; Sutherland et al., 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Problematik nicht geklärt werden. Weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe werden derzeit unternommen, um diese Beobachtungen klären.

Der Vergleich der beiden Mausstämmen hinsichtlich ihrer endogenen Telomeraseaktivität zeigt hingegen, dass man hier von gleichen Voraussetzungen ausgehen kann. Wie für Mäuse schon beschrieben unterliegt die Regulation ihrer Telomerase einer nicht so stringenten Repression wie beim Menschen. Der auffälligste Unterschied zwischen den Spezies zeigt sich in der Leber, die bei Mäusen stets Telomerase-positiv ist (Greenberg et al., 1998; Martin-Rivera et

al., 1998; Ritz et al., 2005), beim Menschen jedoch keine Aktivität aufweist (Tahara et al., 1995; Wright et al., 1996). In den Hoden der Mäuse ist ebenfalls Telomeraseaktivität in gleichem Maße detektierbar. Der genetische Hintergrund scheint also für die Regulation der endogenen Telomerase keine Rolle zu spielen.

### **4.2 Die Hochregulation der endogenen Telomerase ist nicht abhängig von der Induktion der T-Ag Expression**

In den Mammatumoren, die durch die Expression des T-Ag in BALB/c WAP-T Mäusen entstehen, konnte eine starke Zunahme der Telomeraseaktivität beobachtet werden. Verglichen mit nicht induzierten Mäusen stieg die Aktivität um ein Vielfaches an. Von menschlichen Mammakarzinomen wissen wir, dass sie in ca. 90 % der untersuchten Biopsien erhöhte Telomeraseaktivität aufweisen. Wir können annehmen, dass die Telomerase in beiden Spezies abhängig vom Tumorwachstum reguliert wird. Doch welchen Einfluss hat die Expression des T-Ag auf die Telomerase? Zum Ende der Schwangerschaft beginnt in den WAP-T Mäusen die Expression des T-Ag, da der WAP-Promotor durch laktotrophe Hormone aktiviert wird. Nach der Laktation bildet sich das Brustdrüsengewebe der Maus wieder zurück, was als Involution bezeichnet wird. In den meisten Zellen wird die T-Ag Expression abgeschaltet, doch verbleiben einige Epithelzellen, in denen die Expression des T-Ag hormonunabhängig geworden ist. Hier herrscht weiterhin eine Situation in der pRb und p53 an T-Ag gebunden und somit funktionslos sind. Beide Proteine stehen im Verdacht, an der Telomeraseregulation beteiligt zu sein. Es wurde beschrieben, dass p53 *in vitro* über das Protein TEP1 mit dem Telomerasekomplex assoziiert (Li et al., 1999) und möglicherweise an der TERT Repression beteiligt ist (Kanaya et al., 2000). Über pRb wurde geschrieben, dass es zur Inhibition der TERT Aktivierung durch E2F1 beiträgt (Crowe et al., 2001).

In dem hier verwendeten Mausmodell konnte allerdings gezeigt werden, dass die Inaktivierung beider Proteine sich nicht nachweisbar auf die Telomeraseaktivität *in vivo* auswirkt. Eine erhöhte Telomeraseaktivität wurde ausschließlich im Tumorgewebe gefunden. In normalem Mammagewebe induzierter Mäuse konnte kein Anstieg der Telomeraseaktivität beobachtet werden. Daraus kann man schließen, dass die Hochregulation der endogenen Telomerase nicht durch die Expression des T-Ag bedingt ist, sondern mit der Tumorentwicklung einhergeht. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit *in vitro* Untersuchungen, in denen nachgewiesen wurde, dass das SV40 T-Ag nicht für die

Aktivierung von Telomerase verantwortlich ist (Counter et al., 1992; Shay et al., 1993a; Shay et al., 1993b). Auch neuere Untersuchungen mit humanen Brust- und Lungen-Epithelzellen bzw. Fibroblasten unterstützen diese frühen Befunde, dass die Expression der frühen SV40 Genregion keinen Einfluss auf die Expression des TERT Gens und die Aktivität der Telomerase hat (Hahn et al., 1999a; Hahn et al., 1999b; Elenbaas et al., 2001; Hahn et al., 2002). In all diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, die Expression der SV40-frühen Genregion zu einer verlängerten, doch noch immer begrenzten Lebensspanne der Zellen beitrug. Diese Zellen besaßen noch keine erhöhte Telomeraseaktivität und stellten ihr Wachstum in einem als Krise bezeichneten Status ein (s. Einleitung 1.3). Einige Zellen der transfizierten Population immortalisierten spontan und erst diese wiesen erhöhte Telomeraseaktivität auf.

### **4.3 Der humane TERT Promotor im Mausmodell wird in Mammatumoren aktiviert**

Die Tatsache, dass das hTERTp-*lacZ* Mausmodell ein geeignetes System zur Analyse der humanen TERT Promotoraktivität darstellt, konnte schon in vorhergehenden Arbeiten bewiesen werden (Ritz et al., 2005). Nicht nur in unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass der humane Promotor in der Maus einer human-ähnlichen Regulation unterliegt: Unabhängig von unseren Studien, arbeiteten Horikawa et al. mit einem ähnlichen transgenen Mausmodell, welches den gesamten TERT Genlokus, bestehend aus 11 kb 5'-UTR, dem gesamten Intron-Exon Bereich, sowie 1.2 kb des 3'-UTR enthielt (Horikawa et al., 2005). Die Resultate bezüglich der humanen TERT Promotoraktivität unterstützen und bestätigen einander. Die Untersuchung bestätigt insbesondere, dass der von uns eingesetzte 8 kb lange Promotorbereich für die Regulation in den meisten Organen vollkommen ausreichend ist. Es ist nämlich auch beschrieben, daß die proximale Exonregion des humanen *TERT* Gens an seiner Regulation beteiligt ist, indem z.B. die Bindung von CTCF im Exon 1 die Expression von hTERT in Telomerase-negativen Zellen reprimiert (Renaud et al., 2005). Die Tatsache, dass die Ergebnisse von Horikawa und Kollegen, die eine wesentlich längere Promotorregion mitsamt der hTERT Intron-Exon-Struktur für ihre Analysen verwendeten, mit unseren konform gehen, zeigt, dass in dem 8 kb langen Fragment scheinbar alle elementaren Regulationseinheiten präsent sind.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der TERT Regulation in einem Mausmodell für Mammakarzinome. Hierfür wurden hTERTp-*lacZ* Tiere mit WAP-T transgenen Tieren im

BALB/c Hintergrund verpaart (s. auch 4.1). Die in diesen Tieren entstehenden Tumore sind dem menschlichen DCIS, der häufigsten Brustkrebskrankung, histologisch sehr ähnlich (Schulze-Garg et al., 2000).

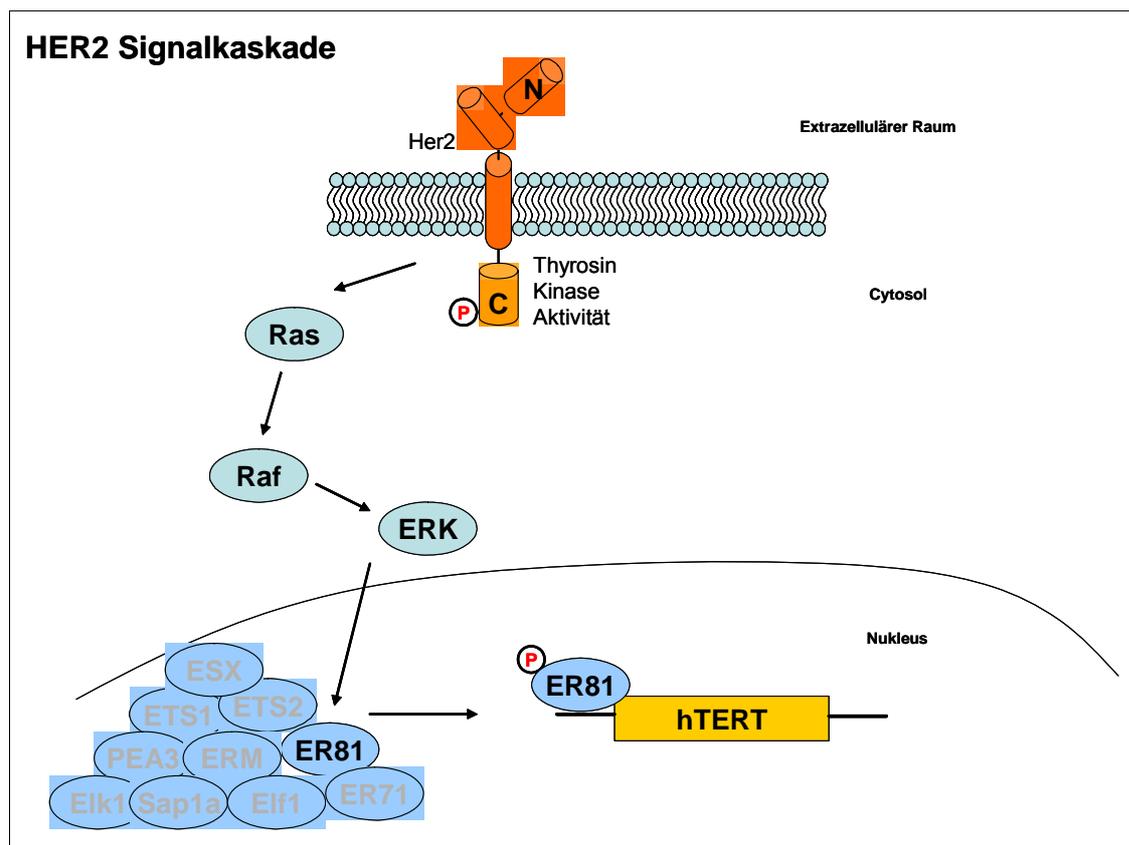
Durch die Verknüpfung der beiden beschriebenen Mausmodelle konnte in der vorliegenden Arbeit verdeutlicht werden, dass auch die TERT Regulation in Mammatumoren der menschlichen Situation ähnlich ist. Man findet in etwa 80-90 % der menschlichen DCIS Biopsien und in über 90 % der invasiven Brustkarzinome erhöhte Telomeraseaktivität (Shay & Bacchetti, 1997).

Die bitransgenen Mäuse entwickelten durchschnittlich 15 Wochen nach Induktion der T-Ag Expression Mammakarzinome, die dann mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von TERT Promotoraktivität untersucht wurden. Die in Tumoren, verglichen mit normalen Mammageweben erhöhten Mengen an LacZ bzw. mTERT RNA verdeutlichen die gesteigerte TERT Promotoraktivität. Hierbei werden nicht nur der humane und murine Promotor gleich reguliert, sondern es geht auch eine Erhöhung der endogenen Telomeraseaktivität damit einher. Dieses Resultat konnte in über 90 % der untersuchten Mammatumore bestätigt werden und spiegelt somit sehr gut die Situation in menschlichen Karzinomen wider.

#### **4.4 Untersuchungen zur Korrelation verschiedener Faktoren in der Tumorentwicklung an hTERTp-lacZ x WAP-T bitransgenen Tieren**

Um zu erfahren, welche Mechanismen für die Aktivierung der TERT Promotoren in der Tumorentwicklung verantwortlich sein könnten, musste zuerst eine Auswahl getroffen werden. Diejenigen Faktoren, die in humanen Mammatumoren auffällig hochreguliert waren und mit der TERT Regulation schon in Zusammenhang gebracht wurden erschienen geeignete Kandidaten für die Untersuchung in diesem *in vivo* Modell. Einer dieser interessanten Kandidaten ist der Transmembranrezeptor Her2. In humanen Brusttumoren liegt das *Her2* Gen in 20-30 % der Fälle amplifiziert vor und man findet Überexpression des Proteins. Dieser Status konnte beim Menschen mit einer schlechten Prognose korreliert werden (Hynes & Stern, 1994; Yarden, 2001). Dank intensiver Forschung ist es aber gelungen einen monoklonalen anti-Her2 Antikörper zu entwickeln, der nun unter der Bezeichnung Herceptin in der Therapie verwendet wird (McKeage & Perry, 2002). Her2 wird mittlerweile als Onkogen bezeichnet, denn genetisch veränderte Mäuse, die Her2 überexprimieren,

entwickeln leicht Brusttumore (Hutchinson & Muller, 2000). Die Signalkaskade, die durch Her2 in Gang gesetzt wird (s. Abb. 4.1), kann sich positiv auf die TERT Expression auswirken. Einer der stromabwärts gelegenen Effektoren dieser Kaskade ist das Protein ER81, welches zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren gehört. In einer Arbeit von Goueli und Janknecht wurde über Luziferase-Reporter-Gen-Assays gezeigt, dass ER81 nach Her2 Stimulation an bestimmte ETS-Bindestellen des humanen TERT Promotors bindet und diesen aktiviert. Die Signale werden vom Rezeptor über die Onkogene Ras und Raf an ERK MAP Kinasen geleitet, welche für die Aktivierung von ER81 sorgen. Sogar in Telomerase-negativen Zellen führt die konstitutive Expression von Her2 oder den stromabwärts gelegenen Komponenten Ras und Raf nur in Anwesenheit von ER81 zur Transkription von hTERT und wiederhergestellter Telomeraseaktivität (Goueli & Janknecht, 2004).



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der hTERT Aktivierung durch Her2 Signalübertragung

Auch die Entdeckung, dass ER81 in humanen, metastasierenden Mammatumoren überexprimiert wird (Baert et al., 1997; Shepherd & Hassell, 2001; Shepherd et al., 2001),

machte dies zu einem interessanten Kandidaten zur Untersuchung in dieser Arbeit. In hTERTp-*lacZ* x WAP-T bitransgenen Mäusen wurden nun normale Mammagewebe, sowie Mammatumore auf die Expression von Her2- und ER81-RNA getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Tumore, die sowohl hohe LacZ, als auch mTERT Expression aufwiesen ebenfalls positiv für Her2 und ER81 waren. Normale Mammagewebe hingegen zeigten keine Expression der beiden Faktoren. Da bekannt war, dass in menschlichen Tumoren auch die Her2 Proteinmenge stark erhöht ist, wurden Western Blots an Proteinlysaten der Mausgewebe durchgeführt. Es konnte bestätigt werden, dass das Her2 Protein spezifisch in den Tumoren dieses Mausmodells angereichert vorlag. Ob die TERT Aktivierung tatsächlich über diesen Mechanismus abläuft, lässt sich an diesem *in vivo* Modell nicht genau bestimmen, es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die Überexpression von Her2 zur Aktivierung der Telomerase in den meisten untersuchten Tumoren beiträgt.

Es konnten während dieser Arbeit auch 2 Tumore untersucht werden, die einen gewissen Ausnahmestatus einnehmen. In Abbildung 3.12 des Ergebnisteils ist ein Mammakarzinom dargestellt, welches keine Aktivierung des humanen TERT Promotors zeigt. Murines TERT jedoch ist in großer Menge vorhanden. Auch alle anderen untersuchten Faktoren, wie Her2, ER81, ESX, c-myc und Snf5, die wir typischerweise hochreguliert gefunden haben, werden hier stark exprimiert. Bei der Annahme, dass durch die Aktivierung des Her2-Rezeptors eine TERT Promotoraktivierung erfolgt, kann hier nur die Korrelation mit dem murinen TERT festgestellt werden. Da es in Tumoren jedoch eine Vielzahl genetischer Veränderungen gibt, welche z.B. die Funktion von Signaltransduktoren betreffen kann, ist hier nicht auszuschließen, dass ein spezifisch humaner TERT Aktivator durch eine Mutation inhibiert ist. Auf der anderen Seite ist die Aktivierung des humanen TERT Promotors natürlich nicht generell abhängig von der Signalübertragung durch Her2 und kann auch auf anderen Wegen erreicht werden. Her2 liegt beim Menschen nur in 20-30 % aller Mammatumore erhöht vor und hohe Telomeraseaktivität kann man in etwa 90 % nachweisen. So kann die Aktivierung des humanen Promotors vielleicht auch über Her2 erfolgen, jedoch ist dies keine Bedingung. Im Falle des eben beschriebenen Karzinoms erfüllt offenbar auch der bekannte TERT Regulator c-myc keine aktivierende Funktion.

An einem weiteren Ausnahmetumor kann noch verdeutlicht werden, dass die Regulation des humanen TERT Promotors sich von der des murinen unterscheidet. Das in Abbildung 3.15 abgebildete Leiomyosarkom repräsentiert einen völlig anderen Tumortyp und weist keine Expression der für Karzinome typischen Marker auf. Auch die murine TERT Expression ist im Tumor nicht nachweisbar und korreliert mit der kaum nachweisbaren Telomeraseaktivität

(s. Abb. 3.15 b). Dennoch findet man in diesem Tumor eine deutliche Aktivierung des humanen TERT Promotors. Das beweist einmal mehr, dass die Regulation der TERT Promotoren zwischen Maus und Mensch in bestimmten Fällen variieren kann und dass die Aktivierung in verschiedenen Tumoren über mehrere Signalwege verlaufen kann. Es gilt also immer, mehr als einen möglichen Signalweg zu bedenken.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der in den Fokus der Untersuchungen rückte, ist ESX (epithelium-specific ETS transcription factor). Wie ER81 gehört auch ESX zur Gruppe der ETS-Transkriptionsfaktoren, hat also putative Bindestellen auf dem humanen TERT Promotor. Der Faktor wurde 1997 in einer ETS Datenbank identifiziert und ist nicht nur in die normale Entwicklung von Mammagewebe involviert, sondern auch in Tumoren der Brust überexprimiert. Ein wesentliches Merkmal ist das ESX-Expressionsmuster, was sich nur auf epitheliale Zellen beschränkt (Chang et al., 1997; Tymms et al., 1997). Auch ESX Promotoraktivität ist durch Her2-Signale aktivierbar, wie 2002 an primären Brustkrebszelllinien durch Luziferase-Reporter-Gen-Assays gezeigt werden konnte (Neve et al., 1998). In unseren Experimenten an murinen Mammakarzinomen konnten wir feststellen, dass ESX auch hier auf der Ebene der Transkription hochreguliert wird. Spezifisch in Mammatumoren, jedoch nicht im normalen Brustdrüsengewebe ließ sich ESX RNA nachweisen. Leider konnte noch kein direkter Einfluss von ESX auf die TERT Expression oder Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. Eine Studie an den bereits immortalisierten Mammaepithelzellen MCF-12A zeigte, dass die Überexpression von ESX ausreichte, um diesen Zellen einen transformierten und *in vitro* metastatischen Phänotyp zu verleihen (Schedin et al., 2004). So ist durchaus denkbar, dass die Aktivierung der Telomerase in der Tumorentwicklung ein zeitlich früheres Ereignis darstellt, woraufhin ESX die Progression fördern kann. In dieser Arbeit konnte trotz der Untersuchung unterschiedlicher Tumorstadien keine zeitliche Korrelation gefunden werden. Einen direkten Zusammenhang zwischen ESX und der TERT Regulation könnten Luziferase-Reporter-Gen-Assays genauer aufklären.

Wie bereits beschrieben, ist das c-Myc Protein ein wichtiger Regulator der TERT Transkription. Zusammen mit Max kann c-Myc an E-Boxen auf dem TERT Promotor binden und diesen aktivieren (Wang et al., 1998). In Kombination mit Mad1 übt c-Myc eine reprimierende Funktion auf TERT aus (Günes et al., 2000). Myc und seine Interaktionspartner spielen eine zentrale Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Henriksson & Luscher, 1996; Facchini & Penn, 1998).

Die Transkription von Genen ist nicht nur abhängig von der Bindung reprimierender oder aktivierender Faktoren, sondern wird auch über die Reorganisation der Chromatinstruktur erreicht. Die Repression von E-Box enthaltenden Promotoren wird vermutlich über Chromatinkondensation durch HDACs (Histondeacetylasen) erreicht (Alland et al., 1997; Laherty et al., 1997). Zur Transaktivierung dieser Gene wird dann ein Komplex aus mehreren Proteinen rekrutiert, der die Chromatinstruktur wieder auflockern kann. Eine essentielle Komponente eines solchen Komplexes, das Snf5 Protein, konnte als c-Myc Interaktionspartner identifiziert werden. Dies macht es zu einem interessanten Untersuchungsobjekt, da über c-myc entscheidend die TERT Expression beeinflusst werden kann. Es wurde gezeigt, dass bestimmte Domänen der beiden Proteine für die Interaktion notwendig sind. Die Transaktivierung von c-Myc Zielgenen findet nur statt, wenn mit Hilfe von Snf5 ein intakter Komplex zur Chromatin Reorganisation gebildet werden kann (Cheng et al., 1999). Snf5 ist nicht nur in Bezug auf die Feinabstimmung der c-Myc Genregulation ein interessantes Protein. Es steht selber im Verdacht ein Tumorsuppressor zu sein. Man findet bei Kindern mit MRT (malignant rhabdoid tumors) Mutationen im *Snf5* Gen (Versteeg et al., 1998). *Snf5 knock-out* Mäuse in denen beide Allele defekt sind, sterben noch als Embryonen vor der Implantation. Bei einem noch funktionellen Allel durchlaufen die Tiere eine normale Entwicklung, entwickeln aber zu 5-35 % hoch aggressive und metastatische Tumore (Klochender-Yeivin et al., 2000; Roberts et al., 2000; Guidi et al., 2001).

In den durchgeführten Experimenten dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die c-Myc als auch die Snf5 Transkription spezifisch in den Mammakarzinomen stark erhöht war. Es kann also vermutet werden, dass die Aktivierung des TERT Promotors durch hohe Mengen an c-Myc auch größere Mengen an Snf5 erfordert. Die Tatsache, dass Snf5 in Brusttumoren der hTERTp-*lacZ* x WAP-T Mäuse eine Hochregulation erfährt, gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen. Die Genregion, welche für Snf5 kodiert, wurde in sporadischen Brusttumoren mit einem LOH (loss of heterozygosity) in Verbindung gebracht (Allione et al., 1998). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte jedoch an verschiedenen Brustkrebszelllinien zeigen, dass das Snf5 Protein stets vorhanden ist (Decristofaro et al., 2001). Diese und die vorliegenden Resultate schließen eine Mutation im Gen jedoch nicht aus. So bleibt zur weiteren Untersuchung, ob und inwiefern Snf5 zur Tumorentstehung oder Progression einen Beitrag leistet.

Während dieser Arbeit wurden Analysen der Expressionsprofile verschiedener Tumorstadien der bitransgenen hTERTp-*lacZ* x WAP-T Mäuse erstellt. Bislang konnten einige Gene herausgestellt werden, die einer starken Expressionsveränderung unterliegen (s. Tab. 3.3).

Zwei interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen sind die beiden CEBP-Transkriptionsfaktoren alpha und beta, die während der Tumorgenese gegenläufig reguliert werden (Milde-Langosch et al., 2003). Sie besitzen auf dem humanen TERT Promotor putative Bindestellen, was sie zu potentiellen Regulatoren der hTERT Expression macht. Aus den gewonnenen Microarray-Daten konnten allerdings auch Faktoren herausgefiltert werden, die bislang mit TERT oder der Telomerase in keinem Zusammenhang stehen, aber einer differentiellen Regulation in der Tumorentwicklung unterliegen. Ein spannender neuer Faktor ist hier das Tusc5 (tumor suppressor candidate 5), welches in den Tumorstadien zum Teil und in den invasiven Karzinomen stark reprimiert vorliegt. Die Untersuchung eines noch wenig bekannten Tumorsuppressors eröffnet vielerlei Möglichkeiten.

### **4.5 Repression der Telomeraseaktivität und hTERT Expression in ektopischem Endometrium von Patienten mit Endometriose**

Das humane Endometrium unterscheidet sich von allen anderen Gewebetypen des Körpers, da es in einem Rhythmus von ca. 28 Tagen mehrere Phasen durchläuft. Auf die erste Phase, die durch hohe Proliferation gekennzeichnet ist, folgt die sekretorische Phase und schließlich wird das Gewebe abgestoßen. Bei der Regulation dieser komplexen Vorgänge spielt auch die Telomerase eine wichtige Rolle. So findet man in diesem Gewebe Telomeraseaktivität und hTERT Expression nur in der proliferativen Phase. Auch hier ist TERT der limitierende Faktor der Telomeraseaktivität, denn die RNA-Untereinheit der Telomerase wird konstitutiv exprimiert (Kyo et al., 1999). Im Jahr 2004 wurde veröffentlicht, dass sich die Expression von hTERT während der proliferativen Phase auf Epithelzellen beschränkt. Obwohl auch die Stromazellen proliferierten, konnte TERT hier nicht nachgewiesen werden (Oshita et al., 2004).

Wie verhält es sich jedoch mit Endometrium, welche bei der Endometriose an anderen Stellen in der Bauchhöhle gefunden wird (ektopisches Endometrium)? Da dieses Gewebe ebenfalls vom Menstruationszyklus beeinflusst wird, liegt die Annahme nahe, dass auch hier in der Proliferationsphase Telomerase aktiv ist. Wir konnten jedoch zeigen, dass dies nicht der Fall ist. Während in normalem Endometrium TERT exprimiert wurde, ließ sich dies im ektopischen Gewebe derselben Patientinnen nicht nachweisen. Zur Normalisierung wurden die Signalstärken von drei Haushaltsgenen gemittelt und eine Quantifizierung der TERT Signale vorgenommen. Von den Proben zweier Patientinnen wurde ein TRAP-Assay

durchgeführt, dessen Ergebnis mit der TERT RT-PCR gut korreliert. In normalem Endometrium ist starke Telomeraseaktivität nachweisbar, in ektopischem Gewebe jedoch fehlt sie völlig. Es wurde vermutet, dass ektopisch wachsende Epithelzellen Eigenschaften von Krebszellen besitzen und als Modell für Metastasierung dienen könnten (Zeitvogel et al., 2001). Die Tatsache allerdings, dass in Krebsarten, die aus dem Endometrium hervorgehen zu einem großen Teil Telomerase-positiv sind zusammen mit den dargestellten Resultaten widerspricht dieser Hypothese. Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Menelaos Zafrakas wurden auch Microarrays zur Analyse der Expressionsprofile angefertigt (Daten nicht gezeigt), welche zeigen, dass in ektopischem Gewebe (putative) Tumorsuppressoren wie z.B. RARRES1 und RARRES2 hochreguliert vorlagen. Dies konnte auch über RT-PCR Experimente nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zellzyklus fördernde Gene hingegen wurden oft reprimiert gefunden. Da die zwei unterschiedlichen Endometriumpuben jeweils von derselben Spenderin stammten kann bei den Microarray-Vergleichen der Faktor der genetischen Heterogenität vernachlässigt werden. Zudem befanden sich alle entnommenen Gewebe in der proliferativen Phase.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass bei der Endometriose eher ein hoher Grad an Differenzierung erreicht wird, als eine Wandlung hin zur Krebszelle.

### **Ausblick**

Die Regulation des Enzyms Telomerase spielt bei vielen Prozessen unterschiedlicher Organismen eine wichtige Rolle. Ihre katalytische Protein-Untereinheit TERT und dessen Expression scheint hierbei der entscheidende Faktor zu sein. Beim Menschen wird die Expression des TERT Gens während der Emryonalentwicklung sukzessive abgeschaltet, aber dennoch in Stammzellen, wie den Keimbahnzellen beibehalten, um ihre genetische Stabilität zu gewährleisten. Die Repression der Telomerase könnte sich beim Menschen als Schutzmechanismus gegen das Tumorwachstum entwickelt haben.

Da Tumorzellen jedoch offenbar in der Lage sind die Telomerase zu reaktivieren, um ihr unbegrenztes Wachstum fortzusetzen, ist dieses Enzym seit einiger Zeit Gegenstand intensiver Forschung. In dem hier untersuchten Mausmodell wurde gezeigt, dass sich der humane TERT Promotor in der Maus ähnlich verhält wie im Menschen. In den meisten Situationen lässt sich die Regulation des humanen auch gut mit dem murinen Promotor vergleichen. So können in diesem bitransgenen Mammakarzinom-Modell weitere mögliche Regulatoren der TERT Expression während der Tumorprogression identifiziert werden.

Hierfür stellt die Luziferase-Reportergen-Technik einen Ansatz dar. Sie erlaubt gezielte Studien von Promotorkonstrukten, die vor das Luziferasegen kloniert werden. Für den humanen TERT Promotor stehen in unserer Arbeitsgruppe Konstrukte unterschiedlicher Länge zur Verfügung, an denen man die Wirkung ausgesuchter Faktoren testen kann, indem man diese zusammen mit den Reportergen-Konstrukten in Zellen transfiziert. Mögliche Kandidaten für diese und andere Experimente können mit Hilfe der erstellten Microarrays ausgesucht werden. Durch Vergleiche mit menschlichen Tumoren und *in vitro* Experimenten kann ihre Relevanz getestet werden und so neue Ansätze für die Tumorthherapie bieten.

Ein weiteres Anliegen ist es, ausgesuchte Tumor-relevante Faktoren oder potentielle TERT-Regulatoren wie CEBP alpha/-beta auf Einzelzellebene nachzuweisen. Zur Lokalisation der Proteinen können Immunhistochemische Färbungen angewandt werden und so bestimmte Zelltypen auf das gemeinsame Vorhandensein verschiedener Faktoren geprüft werden.

Die im WAP-T Mausmodell induzierten Mammakarzinome sind den menschlichen Tumoren nicht nur histologisch sehr ähnlich sondern weisen auch im Hinblick auf typische Karzinom-Markergene ein ähnliches Expressionsmuster auf, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Daher kann dieses Modellsystem genutzt werden, um Wirkstoffe zu testen, welche die Telomeraseaktivität inhibieren. Es ist nun ein spannender Ansatz, diese Mäuse mit dem Telomerase-Inhibitor zu behandeln, um zu prüfen inwieweit dieser hier seine Wirksamkeit entfaltet, bzw. ob die Inhibition des Enzyms sich auf das Tumorstadium auswirkt. Die Firma Geron entwickelte zu diesem Zweck einen Telomerase-Inhibitor, GRN 163L, welcher bisher mit viel versprechender Wirksamkeit an *in vitro* Systemen und Xenograft Modellen getestet wurde (Herbert et al., 2005). Das Molekül GRN 163L, ein lipid-kojugiertes thio-phosphoramidate (N3'-P5') 13-mer Oligonukleotid, bindet hochspezifisch an den komplementären Strang der RNA Untereinheit der Telomerase, hTERC, und blockiert somit die Erkennung der Telomer-DNA. Es konnte in mehreren humanen Karzinom-Zelllinien gezeigt werden, dass dies die Verkürzung der Telomere und letztendlich einen Wachstumsstopp der Zellen bewirkte (Dikmen et al., 2005; Djojotubroto et al., 2005; Herbert et al., 2005). In unserer Arbeitsgruppe wurden einige Experimente schon begonnen. Die ersten Ergebnisse sowohl auf der Ebene der Zellkultur, als auch die Behandlung von WAP-T Mäusen erscheinen widersprüchlich und müssen noch abgeschlossen werden.

Da der Telomerase-Status allein bisher nicht zu einer verbesserten Diagnose oder Prognose von Tumoren herangezogen werden konnte, ist es notwendig, die Mechanismen der Regulation genauer zu erforschen. Mit Kenntnis über reprimierende Faktoren sowie

## Diskussion

Aktivatoren der TERT Expression lässt sich möglicherweise in Zukunft die Enzymaktivität therapeutisch beeinflussen. Die Krebstherapie hätte von der Inhibition einen großen Nutzen. Bezüglich der Regeneration von Geweben, wie z.B. bei der Wundheilung könnte eine fördernde Wirkung durch die Aktivierung der Telomeraseaktivität eintreten. Eine Begleiterscheinung mag vermutlich das besondere Interesse von Pharma- und Kosmetikindustrie sein, welche die Telomerase als viel versprechendes Ziel der „Anti-Ageing“-Bewegung im Fokus haben.

## 5. Literaturverzeichnis

- Alland L, Muhle R, Hou H, Jr., Potes J, Chin L, Schreiber-Agus N&DePinho RA. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature*, 387, 49-55.
- Allione F, Eisinger F, Parc P, Noguchi T, Sobol H&Birnbaum D. (1998). Loss of heterozygosity at loci from chromosome arm 22Q in human sporadic breast carcinomas. *Int J Cancer*, 75, 181-6.
- Aogi K, Woodman A, Urquidi V, Mangham DC, Tarin D&Goodison S. (2000). Telomerase activity in soft-tissue and bone sarcomas. *Clin Cancer Res*, 6, 4776-81.
- Artandi SE, Alson S, Tietze MK, Sharpless NE, Ye S, Greenberg RA, Castrillon DH, Horner JW, Weiler SR, Carrasco RD&DePinho RA. (2002). Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8191-6.
- Aubele MM, Cummings MC, Mattis AE, Zitzelsberger HF, Walch AK, Kremer M, Hofler H&Werner M. (2000). Accumulation of chromosomal imbalances from intraductal proliferative lesions to adjacent in situ and invasive ductal breast cancer. *Diagn Mol Pathol*, 9, 14-9.
- Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta J, Shay JW, Bacchetti S&Greider CW. (1996). Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res*, 56, 645-50.
- Baert JL, Monte D, Musgrove EA, Albagli O, Sutherland RL&de Launoit Y. (1997). Expression of the PEA3 group of ETS-related transcription factors in human breast-cancer cells. *Int J Cancer*, 70, 590-7.
- Bartek J, Bartkova J&Lukas J. (1997). The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp Cell Res*, 237, 1-6.
- Baumann P&Cech TR. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*, 292, 1171-5.
- Beattie TL, Zhou W, Robinson MO&Harrington L. (1998). Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol*, 8, 177-80.
- Blackburn EH. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, 350, 569-73.
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA&Greider CW. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 91, 25-34.
- Bovee JV, van Den Broek LJ, Cleton-Jansen AM&Hogendoorn PC. (2001). Chondrosarcoma is not characterized by detectable telomerase activity. *J Pathol*, 193, 354-60.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L&de Lange T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet*, 17, 231-5.
- Broccoli D, Young JW&de Lange T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9082-6.
- Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA&Reddel RR. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*, 3, 1271-4.
- Burdon T, Sankaran L, Wall RJ, Spencer M&Hennighausen L. (1991). Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development. Evidence for different mechanisms of regulation during pregnancy and lactation. *J Biol Chem*, 266, 6909-14.

- Butel JS&Lednický JA. (1999). Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst*, 91, 119-34.
- Chang CH, Scott GK, Kuo WL, Xiong X, Suzdaltseva Y, Park JW, Sayre P, Erny K, Collins C, Gray JW&Benz CC. (1997). ESX: a structurally unique Ets overexpressed early during human breast tumorigenesis. *Oncogene*, 14, 1617-22.
- Chang S, Khoo CM, Naylor ML, Maser RS&DePinho RA. (2003). Telomere-based crisis: functional differences between telomerase activation and ALT in tumor progression. *Genes Dev*, 17, 88-100.
- Cheng SW, Davies KP, Yung E, Beltran RJ, Yu J&Kalpana GV. (1999). c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet*, 22, 102-5.
- Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P&de Lange T. (1995). A human telomeric protein. *Science*, 270, 1663-7.
- Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ&Reddel RR. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*, 315, 1850-3.
- Cong YS, Wen J&Bacchetti S. (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet*, 8, 137-42.
- Counter CM. (1996). The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat Res*, 366, 45-63.
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB&Bacchetti S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J*, 11, 1921-9.
- Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B&Bacchetti S. (1995). Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood*, 85, 2315-20.
- Crowe DL, Nguyen DC, Tsang KJ&Kyo S. (2001). E2F-1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Nucleic Acids Res*, 29, 2789-94.
- de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM&Varmus HE. (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol*, 10, 518-27.
- Decristofaro MF, Betz BL, Rorie CJ, Reisman DN, Wang W&Weissman BE. (2001). Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies. *J Cell Physiol*, 186, 136-45.
- Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beijersbergen RL&Weinberg RA. (2000). Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res*, 60, 537-41.
- Devereux TR, Horikawa I, Anna CH, Annab LA, Afshari CA&Barrett JC. (1999). DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res*, 59, 6087-90.
- Dikmen ZG, Gellert GC, Jackson S, Gryaznov S, Tressler R, Dogan P, Wright WE&Shay JW. (2005). In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: a novel human telomerase inhibitor. *Cancer Res*, 65, 7866-73.
- Djojotubroto MW, Chin AC, Go N, Schaetzlein S, Manns MP, Gryaznov S, Harley CB&Rudolph KL. (2005). Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma. *Hepatology*, 42, 1127-36.
- Donnez J, Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Van Gossom JP, Pirard C, Jadoul P, Squifflet J&Smets M. (2002). Current thinking on the pathogenesis of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*, 54 Suppl 1, 52-8; discussion 59-62.
- Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL&Reddel RR. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet*, 26, 447-50.

- Eckel KL, Tentler JJ, Cappetta GJ, Diamond SE&Gutierrez-Hartmann A. (2003). The epithelial-specific ETS transcription factor ESX/ESE-1/Elf-3 modulates breast cancer-associated gene expression. *DNA Cell Biol*, 22, 79-94.
- Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC&Weinberg RA. (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev*, 15, 50-65.
- Erdmann N, Liu Y&Harrington L. (2004). Distinct dosage requirements for the maintenance of long and short telomeres in mTert heterozygous mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 6080-5.
- Facchini LM&Penn LZ. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *Faseb J*, 12, 633-51.
- Fanning E. (1998). Introduction to simian virus 40: getting by with more than a little help from its host cell. *Dev Biol Stand*, 94, 3-8.
- Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J&et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science*, 269, 1236-41.
- Fujiki T, Miura T, Maura M, Shiraishi H, Nishimura S, Imada Y, Uehara N, Tashiro K, Shirahata S&Katakura Y. (2007). TAK1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene*.
- Fujimoto K, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Kitagawa Y, Itoh H, Takahashi M&Inoue M. (2000). Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT. *Nucleic Acids Res*, 28, 2557-62.
- Gong G, DeVries S, Chew KL, Cha I, Ljung BM&Waldman FM. (2001). Genetic changes in paired atypical and usual ductal hyperplasia of the breast by comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res*, 7, 2410-4.
- Goueli BS&Janknecht R. (2003). Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor. *Oncogene*, 22, 8042-7.
- Goueli BS&Janknecht R. (2004). Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol Cell Biol*, 24, 25-35.
- Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, Morin GB&DePinho RA. (1998). Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*, 16, 1723-30.
- Greider CW. (1999). Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell*, 97, 419-22.
- Greider CW&Blackburn EH. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, 43, 405-13.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H&de Lange T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97, 503-14.
- Guidi CJ, Sands AT, Zambrowicz BP, Turner TK, Demers DA, Webster W, Smith TW, Imbalzano AN&Jones SN. (2001). Disruption of *Ini1* leads to peri-implantation lethality and tumorigenesis in mice. *Mol Cell Biol*, 21, 3598-603.
- Guilleret I, Yan P, Grange F, Braunschweig R, Bosman FT&Benhattar J. (2002). Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int J Cancer*, 101, 335-41.
- Günes C, Lichtsteiner S, Vasserot AP&Englert C. (2000). Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Res*, 60, 2116-21.

- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW & Weinberg RA. (1999a). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400, 464-8.
- Hahn WC, Dessain SK, Brooks MW, King JE, Elenbaas B, Sabatini DM, DeCaprio JA & Weinberg RA. (2002). Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol Cell Biol*, 22, 2111-23.
- Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M & Weinberg RA. (1999b). Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med*, 5, 1164-70.
- Harle-Bachor C & Boukamp P. (1996). Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6476-81.
- Harley CB. (2002). Telomerase is not an oncogene. *Oncogene*, 21, 494-502.
- Harley CB, Futcher AB & Greider CW. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345, 458-60.
- Harley CB, Vaziri H, Counter CM & Allsopp RC. (1992). The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol*, 27, 375-82.
- Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I & Robinson MO. (1997a). A mammalian telomerase-associated protein. *Science*, 275, 973-7.
- Harrington L, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Yeung DS, Mar V, Bass MB & Robinson MO. (1997b). Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev*, 11, 3109-15.
- Hayflick L & Moorhead PS. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.
- Henriksson M & Luscher B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*, 68, 109-82.
- Herbert BS, Gellert GC, Hochreiter A, Pongracz K, Wright WE, Zielinska D, Chin AC, Harley CB, Shay JW & Gryaznov SM. (2005). Lipid modification of GRN163, an N3'-->P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition. *Oncogene*, 24, 5262-8.
- Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T & Shay JW. (2001). Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia*, 3, 17-26.
- Horikawa I, Chiang YJ, Patterson T, Feigenbaum L, Leem SH, Michishita E, Larionov V, Hodes RJ & Barrett JC. (2005). Differential cis-regulation of human versus mouse TERT gene expression in vivo: identification of a human-specific repressive element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18437-42.
- Hutchinson JN & Muller WJ. (2000). Transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncogene*, 19, 6130-7.
- Hynes NE & Stern DF. (1994). The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1198, 165-84.
- Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H & Inoue M. (2000). Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res*, 6, 1239-47.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL & Shay JW. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266, 2011-5.
- Kipling D & Cooke HJ. (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*, 347, 400-2.

- Klochender-Yeivin A, Fiette L, Barra J, Muchardt C, Babinet C & Yaniv M. (2000). The murine SNF5/INI1 chromatin remodeling factor is essential for embryonic development and tumor suppression. *EMBO Rep*, 1, 500-6.
- Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, Meyerson M, Tan LK, Weinberg RA, Haber DA & Gerald WL. (1998). Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nat Genet*, 19, 182-6.
- Konishi H, Sugiyama M, Mizuno K, Saito H, Yatabe Y, Takahashi T, Osada H & Takahashi T. (2003). Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at distal 17p13.3 in human lung cancer. *Oncogene*, 22, 1892-905.
- Konnikova L, Simeone MC, Kruger MM, Kotecki M & Cochran BH. (2005). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res*, 65, 6516-20.
- Kuperwasser C, Hurlbut GD, Kittrell FS, Dickinson ES, Laucirica R, Medina D, Naber SP & Jerry DJ. (2000). Development of spontaneous mammary tumors in BALB/c p53 heterozygous mice. A model for Li-Fraumeni syndrome. *Am J Pathol*, 157, 2151-9.
- Kusumoto M, Ogawa T, Mizumoto K, Ueno H, Niiyama H, Sato N, Nakamura M & Tanaka M. (1999). Adenovirus-mediated p53 gene transduction inhibits telomerase activity independent of its effects on cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*, 5, 2140-7.
- Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Tanaka M & Inoue M. (1999). Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int J Cancer*, 80, 60-3.
- Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, Ariga H & Inoue M. (2000). Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res*, 28, 669-77.
- Laherty CD, Yang WM, Sun JM, Davie JR, Seto E & Eisenman RN. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell*, 89, 349-56.
- Lee H, Park DS, Razani B, Russell RG, Pestell RG & Lisanti MP. (2002). Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am J Pathol*, 161, 1357-69.
- Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW, 2nd, Greider CW & DePinho RA. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*, 392, 569-74.
- Li H, Cao Y, Berndt MC, Funder JW & Liu JP. (1999). Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene*, 18, 6785-94.
- Li H, Xu D, Li J, Berndt MC & Liu JP. (2006). Transforming growth factor beta suppresses human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by Smad3 interactions with c-Myc and the hTERT gene. *J Biol Chem*, 281, 25588-600.
- Martin-Rivera L, Herrera E, Albar JP & Blasco MA. (1998). Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10471-6.
- McKeage K & Perry CM. (2002). Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs*, 62, 209-43.
- Milde-Langosch K, Loning T & Bamberger AM. (2003). Expression of the CCAAT/enhancer-binding proteins C/EBPalpha, C/EBPbeta and C/EBPdelta in

- breast cancer: correlations with clinicopathologic parameters and cell-cycle regulatory proteins. *Breast Cancer Res Treat*, 79, 175-85.
- Mitchell JR, Wood E&Collins K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, 402, 551-5.
- Müller HJ. (1938). The remaking of chromosomes. *Collect Net*, 13, 181-98.
- Munoz-Jordan JL, Cross GA, de Lange T&Griffith JD. (2001). t-loops at trypanosome telomeres. *Embo J*, 20, 579-88.
- Muntoni A&Reddel RR. (2005). The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet*, 14, R191-6.
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB&Cech TR. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, 277, 955-9.
- Nakayama J, Saito M, Nakamura H, Matsuura A&Ishikawa F. (1997). TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell*, 88, 875-84.
- Neumann AA&Reddel RR. (2002). Telomere maintenance and cancer -- look, no telomerase. *Nat Rev Cancer*, 2, 879-84.
- Neve R, Chang CH, Scott GK, Wong A, Friis RR, Hynes NE&Benz CC. (1998). The epithelium-specific ets transcription factor ESX is associated with mammary gland development and involution. *Faseb J*, 12, 1541-50.
- Niida H, Shinkai Y, Hande MP, Matsumoto T, Takehara S, Tachibana M, Oshimura M, Lansdorp PM&Furuichi Y. (2000). Telomere maintenance in telomerase-deficient mouse embryonic stem cells: characterization of an amplified telomeric DNA. *Mol Cell Biol*, 20, 4115-27.
- Nishi H, Nakada T, Kyo S, Inoue M, Shay JW&Isaka K. (2004). Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol Cell Biol*, 24, 6076-83.
- Ogawa D, Nomiyama T, Nakamachi T, Heywood EB, Stone JF, Berger JP, Law RE&Bruemmer D. (2006). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses telomerase activity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 98, e50-9.
- Oh S, Song Y, Yim J&Kim TK. (1999). The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J Biol Chem*, 274, 37473-8.
- Olovnikov AM. (1971). Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 201, 1496-9.
- Olovnikov AM. (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, 181-90.
- Oshita T, Nagai N, Mukai K, Shigemasa K, Hiura M&Ohama K. (2004). Telomerase activation in endometrial epithelial cells by paracrine effectors from stromal cells in primary cultured human endometrium. *Int J Mol Med*, 13, 425-30.
- Pittius CW, Hennighausen L, Lee E, Westphal H, Nicols E, Vitale J&Gordon K. (1988). A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 5874-8.
- Prowse KR&Greider CW. (1995). Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4818-22.
- Quelle DE, Ashmun RA, Hannon GJ, Rehberger PA, Trono D, Richter KH, Walker C, Beach D, Sherr CJ&Serrano M. (1995). Cloning and characterization of murine p16INK4a and p15INK4b genes. *Oncogene*, 11, 635-45.

- Reichenbach P, Hoss M, Azzalin CM, Nabholz M, Bucher P & Lingner J. (2003). A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Curr Biol*, 13, 568-74.
- Renaud S, Bosman FT & Benhattar J. (2003). Implication of the exon region in the regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 300, 47-54.
- Renaud S, Loukinov D, Abdullaev Z, Guilleret I, Bosman FT, Lobanenkov V & Benhattar J. (2007). Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucleic Acids Res*, 35, 1245-56.
- Renaud S, Loukinov D, Bosman FT, Lobanenkov V & Benhattar J. (2005). CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucleic Acids Res*, 33, 6850-60.
- Ritz JM, Kuhle O, Riethdorf S, Sipos B, Deppert W, Englert C & Günes C. (2005). A novel transgenic mouse model reveals humanlike regulation of an 8-kbp human TERT gene promoter fragment in normal and tumor tissues. *Cancer Res*, 65, 1187-96.
- Roberts CW, Galusha SA, McMenamin ME, Fletcher CD & Orkin SH. (2000). Haploinsufficiency of Snf5 (integrase interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13796-800.
- Robertson G, Garrick D, Wu W, Kearns M, Martin D & Whitelaw E. (1995). Position-dependent variegation of globin transgene expression in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5371-5.
- Robertson KD & Jones PA. (2000). DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21, 461-7.
- Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C & DePinho RA. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell*, 96, 701-12.
- Schedin PJ, Eckel-Mahan KL, McDaniel SM, Prescott JD, Brodsky KS, Tentler JJ & Gutierrez-Hartmann A. (2004). ESX induces transformation and functional epithelial to mesenchymal transition in MCF-12A mammary epithelial cells. *Oncogene*, 23, 1766-79.
- Scheel C, Schaefer KL, Jauch A, Keller M, Wai D, Brinkschmidt C, van Valen F, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B & Poremba C. (2001). Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas. *Oncogene*, 20, 3835-44.
- Schneider-Stock R, Rys J, Jaeger V, Niezabitowski A, Kruczak A, Sokolowski A & Roessner A. (1999). Prognostic significance of telomerase activity in soft tissue sarcomas. *Int J Oncol*, 15, 775-80.
- Schulze-Garg C, Lohler J, Gocht A & Deppert W. (2000). A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland. *Oncogene*, 19, 1028-37.
- Shay JW & Bacchetti S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 33, 787-91.
- Shay JW, Van Der Haegen BA, Ying Y & Wright WE. (1993a). The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res*, 209, 45-52.
- Shay JW, Wright WE, Brasiskyte D & Van der Haegen BA. (1993b). E6 of human papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene*, 8, 1407-13.

- Shen M, Haggblom C, Vogt M, Hunter T & Lu KP. (1997). Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and TRF1 suggest a role in mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 13618-23.
- Shepherd T & Hassell JA. (2001). Role of Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 6, 129-40.
- Shepherd TG, Kockeritz L, Szrajber MR, Muller WJ & Hassell JA. (2001). The pea3 subfamily ets genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis. *Curr Biol*, 11, 1739-48.
- Sherr CJ. (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 731-7.
- Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelias C, Iacovidou H & Salamalekis E. (2006). Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res*, 32, 162-70.
- Somigliana E, Vigano P, Parazzini F, Stoppelli S, Giambattista E & Vercellini P. (2006). Association between endometriosis and cancer: a comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiological evidence. *Gynecol Oncol*, 101, 331-41.
- Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR & Gottschling DE. (2003). Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev*, 17, 2384-95.
- Sutherland HG, Martin DI & Whitelaw E. (1997). A globin enhancer acts by increasing the proportion of erythrocytes expressing a linked transgene. *Mol Cell Biol*, 17, 1607-14.
- Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, Nakashio R, Shay JW, Tahara E, Kajiyama G & Ide T. (1995). Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*, 55, 2734-6.
- Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M & Inoue M. (1999). Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res*, 59, 551-7.
- Thomas M, Suwa T, Yang L, Zhao L, Hawks CL & Hornsby PJ. (2002). Cooperation of hTERT, SV40 T antigen and oncogenic Ras in tumorigenesis: a cell transplantation model using bovine adrenocortical cells. *Neoplasia*, 4, 493-500.
- Tymms MJ, Ng AY, Thomas RS, Schutte BC, Zhou J, Eyre HJ, Sutherland GR, Seth A, Rosenberg M, Papas T, Debouck C & Kola I. (1997). A novel epithelial-expressed ETS gene, ELF3: human and murine cDNA sequences, murine genomic organization, human mapping to 1q32.2 and expression in tissues and cancer. *Oncogene*, 15, 2449-62.
- Ueki M. (1991). Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus. *Am J Obstet Gynecol*, 165, 201-9.
- van Steensel B, Smogorzewska A & de Lange T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*, 92, 401-13.
- van Wezel T, Lombaerts M, van Roon EH, Philippo K, Baelde HJ, Szuhai K, Cornelisse CJ & Cleton-Jansen AM. (2005). Expression analysis of candidate breast tumour suppressor genes on chromosome 16q. *Breast Cancer Res*, 7, R998-1004.
- Versteeg I, Sevenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, Aurias A & Delattre O. (1998). Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*, 394, 203-6.
- Vinatier D, Orazi G, Cosson M & Dufour P. (2001). Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 96, 21-34.

- Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ & Dokal I. (2001). The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*, 413, 432-5.
- Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D & Hannon GJ. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev*, 12, 1769-74.
- Watson JD. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*, 239, 197-201.
- Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB & Morin GB. (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet*, 17, 498-502.
- Weise JM & Günes C. (2006). Telomeres and telomerase. A survey about methods and recent advances in cancer diagnostic and therapy. *Histol Histopathol*, 21, 1249-61.
- Wick M, Zubov D & Hagen G. (1999). Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene*, 232, 97-106.
- Won J, Chang S, Oh S & Kim TK. (2004). Small-molecule-based identification of dynamic assembly of E2F-pocket protein-histone deacetylase complex for telomerase regulation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11328-33.
- Won J, Yim J & Kim TK. (2002). Opposing regulatory roles of E2F in human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in human tumor and normal somatic cells. *Faseb J*, 16, 1943-5.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W & Shay JW. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*, 18, 173-9.
- Xu D, Wang Q, Gruber A, Bjorkholm M, Chen Z, Zaid A, Selivanova G, Peterson C, Wiman KG & Pisa P. (2000). Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene*, 19, 5123-33.
- Yan P, Coindre JM, Benhattar J, Bosman FT & Guillou L. (1999). Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in soft tissue tumors: correlation with grade, histology, and proliferative activity. *Cancer Res*, 59, 3166-70.
- Yarden Y. (2001). Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*, 61 Suppl 2, 1-13.
- Yatabe N, Kyo S, Maida Y, Nishi H, Nakamura M, Kanaya T, Tanaka M, Isaka K, Ogawa S & Inoue M. (2004). HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene*, 23, 3708-15.
- Yoo J & Robinson RA. (2000). Expression of telomerase activity and telomerase RNA in human soft tissue sarcomas. *Arch Pathol Lab Med*, 124, 393-7.
- Yu Y, Okayasu R, Weil MM, Silver A, McCarthy M, Zabriskie R, Long S, Cox R & Ullrich RL. (2001). Elevated breast cancer risk in irradiated BALB/c mice associates with unique functional polymorphism of the Prkdc (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) gene. *Cancer Res*, 61, 1820-4.
- Yuan X, Ishibashi S, Hatakeyama S, Saito M, Nakayama J, Nikaido R, Haruyama T, Watanabe Y, Iwata H, Iida M, Sugimura H, Yamada N & Ishikawa F. (1999). Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice. *Genes Cells*, 4, 563-72.
- Zeitvogel A, Baumann R & Starzinski-Powitz A. (2001). Identification of an invasive, N-cadherin-expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model. *Am J Pathol*, 159, 1839-52.

- Zhang S, Ramsay ES&Mock BA. (1998). Cdkn2a, the cyclin-dependent kinase inhibitor encoding p16INK4a and p19ARF, is a candidate for the plasmacytoma susceptibility locus, Pctr1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2429-34.**
- Zhou C, Bae-Jump VL, Whang YE, Gehrig PA&Boggess JF. (2006). The PTEN tumor suppressor inhibits telomerase activity in endometrial cancer cells by decreasing hTERT mRNA levels. *Gynecol Oncol*, 101, 305-10.**
- Zijlmans JM, Martens UM, Poon SS, Raap AK, Tanke HJ, Ward RK&Lansdorp PM. (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7423-8.**

## 6. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
17 kT	17 k Tumor-Antigen
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ALT	alternative lengthening of telomeres
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
bHLHZ	basische „Helix-loop-Helix-Zipper“
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	Karzinom
Cdk4	engl. Zyklin-abhängige Proteinkinase 4
cDNA	copy-Deoxyribonukleinsäure
CHAPS	[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propansulfonat
cm, mm, µm, nm	Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCIS	ductal carcinoma in situ
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. Deoxyribonukleinsäure
DNaseI	Deoxyribonuklease I
dNTP	Deoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
G	Guanin
g, mg, µg, ng, pg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm, Pikogramm
G0-Phase	gap 0-Phase
G1-Phase	gap 1-Phase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gen.	genomisch
h	engl. Stunde
h	human
H&E	Hämatoxylin-Eosin
h.i.	Hitze inaktiviert
HDAC	Histon-Deacetylase
HeLa-Zellen	Tumorzellen eines Zervixkarzinoms von Frau Henrietta Lacks
Her2	human epidermal growth factor receptor 2
ICH	Immunhistochemie
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LOH	loss of heterozygosity
LTR	long terminal repeats
m	murin
M, mM, µM, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar

## Abkürzungen

MaCa	Mammakarzinom
mad1	Max-Dimerisierungsfaktor 1
max	max Myc-assoziiertes X-Faktor
min	Minute
mol, mmol, $\mu$ mol	Mol, Millimol, Mikromol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NLS	engl. Kernlokalisierungssignal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	engl. Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
Pot1	protection of telomeres
pRb	Retinoblastom Protein
Prkdc	protein kinase DNA dependent, catalytic subunit
RNA	engl. Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	engl. Sekunde
Sp1	specificity protein 1
S-Phase	Synthese-Phase
st	kleines Tumor-Antigen
SV40	Simian Virus 40
t	engl. Zeit
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T-Ag	large T antigen
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris / EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEP1	telomerase-associated protein 1
TERC	engl. Telomerase RNA Komponente (auch TR oder TER)
TERT	Telomerase reverse Transkriptase (auch TRT)
TGF beta	transforming growth factor beta
TH	Hybridisierungstemperatur
Tm	Schmelztemperatur
TRAP	telomeric repeat amplification protocol
TRF1 bzw. 2	TTAGGG repeat binding factor 1 bzw. 2
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
ü/N	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
w/v	engl. Gewicht pro Volumen

## Abkürzungen

WAP  
WT  
z. B.  
β-Gal

whey acidic protein  
Wildtyp  
zum Beispiel  
β-Galaktosidase

## 7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert danke ich für seine Unterstützung und die Möglichkeit, die Doktorarbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Bei Herrn Dr. habil. Çağatay Güneş möchte ich mich ganz besonders für die stets geduldige und gute Betreuung bedanken. Seine ausdauernde Diskussionsbereitschaft war mir eine große Hilfe.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der Abteilung Tumorstudiologie für die Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit. Bei den Kollegen der Güneş-Gruppe, Dr. Julia Weise, Julia Schröder, Kamila Iwanski, Nicole Simon und Jarob Saker möchte ich mich für Rat und Tat bedanken. TEAMARBEIT wird hier grossgeschrieben!

Herrn Dr. Jürgen Löhler (ehem. Heinrich-Pette-Institut) möchte ich Dank sagen für seine Hilfe bei histologischen Techniken und der pathologischen Auswertung. Das „Ich-sehe-was-was-Du-nicht-siehst“ im Mikroskop hat mich immer wieder verblüfft!

Spezieller Dank gebührt Dr. Rudolph Reimer, der jegliche Technik bezwingt.

Bei Dr. Menelaos Zafrakas (1st Department of Obstetrics and Gynecology, Aristotle University of Thessaloniki) möchte ich mich für eine interessante Zusammenarbeit bedanken.

Dr. Thomas Streichert und Kristin Reeck (Institut für klinische Chemie, UKE Hamburg) danke ich für die Hilfe bei Durchführung und Interpretation der Microarray-Datenflut.

Dank gilt auch den Mitarbeitern der Tierhaltung, Hasso Münd, Beate Miksche, Anke Dorendorf und Matthias Timmermann, für die professionelle Pflege der Versuchstiere.

Von Herzen danke ich meinen Eltern und Geschwistern, die mir – ob nah oder fern – der größte Rückhalt sind. Meinem Freund Christopher danke ich sehr für die Ruhe und Zuversicht, mit der er mich über die Zeit begleitet hat.

Ihr habt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen - Danke!