

**Evaluation telomeraseinhibitorischer  
Strategien als neues Therapieprinzip  
in der Behandlung der  
Chronischen Myeloischen Leukämie**

**Dissertation**

zur Erlangung  
des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Department für Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Ute Brassat**

Hamburg, den 03. Juni 2009

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. T. BRÜMMENDORF  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Priv.-Doz. Dr. R. LORBIECKE  
Tag der Disputation: 03. Juli 2009

Hamburg, den 18. Juni 2009



*J. Ganzhorn*

Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie

---

## I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	III
III.	Zusammenfassung	V
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Telomere und Telomerase	1
1.1.1	Historischer Überblick	1
1.1.2	Struktur und Funktion von Telomeren	3
1.1.3	End-Replikations-Problem und Telomer-Hypothese	5
1.1.4	Telomerproteine und Telomersignaltransduktion	8
1.1.5	Telomerase	10
1.2	Chronische myeloische Leukämie	13
1.2.1	Krankheitsverlauf	13
1.2.2	Philadelphiachromosom und das Onkogen <i>bcr-abl</i>	14
1.2.3	Therapie der CML	17
1.2	Telomer- und Telomerasebiologie in der CML	18
1.4	Telomeraseinhibition	19
1.4.1	Einsatz von Telomeraseinhibitoren	19
1.4.2	Strategien der Telomeraseinhibition	20
1.5	Fragestellung	22
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1	Material	23
2.1.1	Chemikalien	23
2.1.2	Geräte	24
2.1.3	Kits	25
2.1.4	Zellen	25
2.1.5	Bakterienstämme	26
2.1.6	Vektoren	26
2.1.7	Oligonukleotide	27
2.1.8	Medien, Puffer, Lösungen	27
2.1.9	Antikörper und Sonden	31
2.1.10	Protein und Nukleotid Leitern	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Zellkultur	32
2.2.1.1	Kultivierung von Zellen	32
2.2.1.2	Einfrieren von Zellen	32
2.2.1.3	Auftauen von Zellen	33
2.2.1.4	Kultivierung von K562 mit der Substanz BIBR1532	33
2.2.2	Proliferationsversuche	33
2.2.2.1	Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung mit Trypanblau	33
2.2.3	Telomerlängenbestimmung, Telomeraseaktivität und ALT	34
2.2.3.1	Bestimmung der Telomerlänge (FlowFISH)	34
2.2.3.2	Bestimmung der Telomeraseaktivität (TRAP)	36
2.2.3.3	Detektion von APBs	38
2.2.4	Molekularbiologie	39
2.2.4.1	Isolierung von RNA	39
2.2.4.2	RT- PCR	40
2.2.4.3	qPCR zur Detektion der DNhTERT-mRNA	41
2.2.5	Bakterien Arbeiten	43
2.2.5.1	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ oder Top10	43
2.2.5.2	Plasmid-Mini-Präparation	44
2.2.6	Proteinbiochemie	45

---

2.2.6.1	Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Protein	45
2.2.6.2	Western Blot	45
2.2.7	Stabile Integration	47
2.2.8	Zellzyklus und Apoptose	48
2.2.8.1	Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid (PI)	48
2.2.8.2	Detektion von AnnexinV (Frühe Apoptose)	49
2.2.8.3	Detektion von Caspase 3 (Späte Apoptose)	49
2.2.9	Chromosomale Instabilität und DNA-Reparatur	50
2.2.9.1	Präparation von Metaphasen	50
2.2.9.2	DNA-Reparatur	51
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
3.1	Einfluss des Telomeraseinhibitors BIBR1532 auf BCR-ABL <sup>+</sup> K562 Zellen	54
3.1.1	Telomeraseaktivität, Telomerlänge und Wachstumskinetik	54
3.1.2	Zellzyklusverteilung, Apoptose und DNA-Reparatur	55
3.1.3	Expression telomer-assoziiierter Kandidatengene	57
3.2	Nicht-Pharmakologische TI: Expression des Transgens DNhTERT	58
3.2.1	Telomeraseaktivität, Telomerlänge und Wachstumskinetik	59
3.2.2	DNhTERT-Expression und Nachweis von ALT	61
3.2.3	Zellzyklusverteilung und Apoptose	64
3.2.4	DNA-Reparatur und genomische Instabilität	67
3.3	Bedeutung von p53 für BCR-ABL <sup>+</sup> Zellen mit dysfunktionellen Telomeren	70
3.3.1	Expressionsanalysen von DNA-Reparatur Genen	70
3.3.2	Expression von p53 in BCR-ABL <sup>+</sup> Zellklonen mit dysfunktionellen Telomeren	72
3.3.3	Einfluss des Tumorsuppressors p53	73
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
<b>5.</b>	<b>Anhang</b>	<b>91</b>
5.1	Referenzen	91
5.2	Liste regulierter mRNAs	98
5.3	Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen	99

---

## II. Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
ACDU	<i>Automated Cell Diposition Unit</i>
ARF	<i>Alternate reading frame</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM and RAD3-related</i>
APS	Ammoniumpersulfat
<i>bcr</i>	<i>breakpoint cluster region</i>
BHQ1	<i>Black Hole Quencher1</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>c-abl</i>	<i>cellular abelson leukemia</i>
CDK4 und 6	<i>Cyclin-dependent kinase 4 und 6</i>
cDNA	<i>copyDNA</i>
Cy3 und 5	Cyanin3 und 5
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	<i>estrogen receptor</i> (Östrogenrezeptor)
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FAM	6-Carboxyfluoreszein
FCS	Fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gravitationskonstante oder Gramm
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HPV	Humaner Papillomavirus

---

INK4	<i>Inhibitor of CDK4</i>
IRES	Internal ribosomal entry site
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Ku86	<i>Ku antigene protein86</i>
hTERT	<i>human Telomerase Reverse Transcriptase</i>
hTR	<i>human Telomerase RNA</i>
kMESF	kilo molecules of equivalent soluble fluorochrome
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten ( <i>messenger</i> ) Ribonukleinsäure
mTR	<i>mouse Telomerase RNA</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Populationsverdopplung
PE	Phycoerythrin
PML	Promyelozytische Leukämie
PNA	Peptidnukleinsäure
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pRB	Retinoblastom
RNase	Ribonuklease
RPMI1640	<i>Roswell Park Memorial Institute1640</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SSC	<i>side scatter</i>
SV40	Simian virus 40
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TL	Telomerlänge
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-) Aminomethan
TritonX-100	Octylphenoldecaethylenglycoether
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u	<i>units</i>
V	Volt

---

### III. Zusammenfassung

Telomere sind an den Enden linearer Chromosomen angeordnet und bestehen in Vertebraten aus repetitiven Sequenzen der Einheit TTAGGG. Sie verkürzen sich mit jeder Teilung und bei Erreichen einer kritischen Länge erhält die normale somatische Zelle das Signal die Replikation einzustellen und entweder in einen postmitotischen Ruhezustand (Seneszenz) einzutreten oder den programmierten Zelltod (Apoptose) zu durchlaufen. Damit besitzen die Telomere eine Tumorsuppressorfunktion. Die große Mehrheit der malignen Tumorzellen umgeht diesen Mechanismus durch die Aktivierung des Enzyms Telomerase, welches in der Lage ist, Telomer-DNA *de novo* zu synthetisieren und damit die Telomerlänge zu stabilisieren. Dies macht die Inhibition der Telomerase zu einem attraktiven Ziel in der Tumorthherapie.

Die Chronische myeloische Leukämie (CML) stellt aufgrund ihres Verlaufs und ihrer gut definierten Pathophysiologie eine Modellerkrankung dar, um telomeraseinhibitorische Strategien zu evaluieren. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Strategien angewendet und untersucht: 1. die pharmakologische Hemmung mit dem *small molecule* Inhibitor BIBR1532 und 2. die kompetitive Inhibition der Enzymaktivität durch stabile Integration eines dominant-negativen Allels der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT (DNhTERT).

An CML-Blastenrisenzellen der Linie K562, deren Telomere durch Anwendung des pharmakologischen Inhibitors BIBR1532 auf eine kritische Telomerlänge verkürzt worden sind, wurden Analysen zum Proliferationsverhalten, zur Zellzyklusverteilung und Apoptose durchgeführt. Außerdem wurde die DNA-Reparaturkapazität und die mRNA-Expression telomer-assoziiierter Kandidatengene untersucht. Über die kritische Telomerverkürzung hinausgehende signifikante und funktionelle Unterschiede waren jedoch zwischen behandelten und unbehandelten Zellen nicht nachweisbar.

Daraufhin wurde in einem nicht-pharmakologischen Ansatz der Einfluss von DNhTERT auf K562 Zellen auf klonaler Ebene untersucht. In vier von sieben Klonen führte die Inhibition der Telomeraseaktivität durch DNhTERT zu einer kritischen Verkürzung der Telomere und einem deutlichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten bis hin zu einem Proliferationsarrest. Obwohl die Telomerverkürzung außerdem eine signifikant erhöhte Apoptoserate und zunehmende genomische Instabilität auslöste, entkamen Subklone diesem Krisenzustand durch Re-Aktivierung der Telomeraseaktivität. Es stellte sich die Frage, warum diese BCR-ABL<sup>+</sup> K562 Zellen trotz kritischer Telomerverkürzung und Proliferationsstop über einen Zeitraum von ca. 20 Tagen nicht vollständig eliminiert wurden. Die Vermutung, dass die induzierte Telomerdysfunktion aufgrund alterierter Signalwege nicht zu effektiver Apoptoseinduktion in den Zellen führte, wurde durch die

---

stabile Integration eines induzierbaren p53-Konstruktes in die sonst p53-negativen K562-Blastenrisenzellen überprüft. Bei diesem Tumorsuppressor handelt es sich um eine wichtige Komponente der Telomersignalgebung. In der Tat konnte die zentrale Rolle von p53 in den BCR-ABL<sup>+</sup> K562-Zellen bestätigt werden, da die Induktion von p53 in Zellen mit kritisch kurzen Telomeren zum vollständigen Absterben der Klone durch Apoptose führte. Die Daten zeigen, dass der Tumorsuppressor p53 in der Lage ist telomeraseinhibierte BCR-ABL<sup>+</sup> K562 Zellen mit kritisch kurzen Telomeren zu eradizieren und die Selektion von aggressiven Subklonen zu verhindern.

Da Zellen von CML-Patienten der chronischen Phase typischerweise p53-positiv sind, jedoch 30% der Patienten in der myeloischen Blastenkrise einen Verlust von p53 aufweisen, lassen die erhaltenen Ergebnisse darauf schließen, dass telomeraseinhibitorische Strategien präferenziell in der chronischen Phase der CML Anwendung finden sollten. Die vorliegenden Ergebnisse bieten die Grundlage für weiterführende präklinische und gegebenenfalls klinische Evaluation dieses Therapieprinzips zur Behandlung von Patienten mit CML. Darüber hinaus erklären die vorliegenden Daten die wichtige Rolle intakter pro-seneszenter und pro-apoptotischer Signalwege für eine erfolgreiche Anwendung telomeraseinhibitorischer Strategien.

# 1. Einleitung

## 1.1 Telomere und Telomerase

Telomere bilden die Enden linearer Chromosomen und schützen die codierende DNA vor Degradation und Verlust genetischer Information. Eng verknüpft mit den Telomeren ist das Enzym Telomerase, eine Reverse Transkriptase, die in der Lage ist Telomere zu verlängern.

Die Rolle der Telomere als limitierender Faktor der Proliferationskapazität einer Zelle und die der Telomerase als essentieller Faktor bei der Entstehung von Tumorzellen macht diese zellulären Strukturen zu einem attraktiven Forschungsgebiet für das Verständnis der Zusammenhänge zwischen biologischem Altern und Krebsentstehung.

### 1.1.1 Historischer Überblick

Der Name Telomere (telos=Ende und meros=Teil) wurde von Herrmann J. Müller geprägt, der die Strukturen 1938 zum ersten Mal in *Drosophila melanogaster* beobachtete<sup>1</sup>. Anfang der 1940er Jahre beschrieb dann Barbara McClintock in Studien an Mais (*Zea Mays*), dass Chromosomen, die ihre funktionellen Telomere verloren haben, miteinander fusionieren können und „Mega-Chromosomen“ mit zwei oder mehr Zentromeren bilden und so chromosomale Instabilität fördern<sup>2</sup>.

Dass Telomere die Teilungsfähigkeit von Zellen begrenzen wurde zwar erst wesentlich später entdeckt, aber die ersten Arbeiten von Leonard Hayflick und Paul S. Moorhead, die in den 1960er Jahren beobachteten, dass Fibroblasten nur eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen durchlaufen können und dann seneszent werden, ebneten den Weg für das Verständnis von zellulärer Alterung<sup>3</sup>.

Nach der Entdeckung der Struktur der DNA und vor dem Hintergrund der Arbeiten von Hayflick zur Proliferationskapazität von Zellen wurde von Alexey M. Olovnikov das sogenannte „End-Replikations-Problem“ erkannt. Er realisierte, dass die vollständige Replikation der DNA-Enden durch konventionelle Polymerasen, die einen Primer für die Initiierung der Replikation benötigen, nicht möglich ist und hielt seine Überlegungen in einer theoretischen Arbeit fest<sup>4</sup>. James D. Watson beschrieb 1972 unabhängig von Olovnikov ebenfalls dieses Problem<sup>5</sup>.

Die ersten molekularen Erkenntnisse über Telomere wurden erst Jahrzehnte später durch Elizabeth H. Blackburn und Joe Gall erzielt. Sie ermittelten die Telomersequenz des Ziliaten *Tetrahymena thermophilus*<sup>6</sup>.

Kurz nach der ersten Sequenzierung der Telomere wurde im Labor von Elizabeth Blackburn die Hypothese formuliert, dass es Organismen gibt, die ihre Telomere verlängern können<sup>7</sup>. Die Annahme, dass dies entweder enzymatisch oder durch Rekombination geschieht, konnte kurz danach bestätigt werden. Carol W. Greider und Elizabeth H. Blackburn entdeckten wiederum in *Tetrahymena thermophilus*, dass Telomersequenzen *de novo* synthetisiert werden können und nannten das verantwortliche Enzym Telomerase<sup>8</sup>. Auch die Annahme, dass Telomere durch Rekombination verlängert werden können, konnte einige Jahre später bestätigt werden<sup>9,10</sup>. Dieser Mechanismus wurde als Alternative zur Telomerase „*Alternative Lengthening of Telomeres (ALT)*“ bezeichnet.

Calvin B Harley stellte Anfang der 90er Jahre die „Telomerhypothese der zellulären Alterung“ auf<sup>11</sup>. Sie beschreibt, dass in den meisten Zellen die Telomeraseaktivität nicht ausreicht, um die Telomerlänge aufrechtzuerhalten<sup>12</sup> und progressive Telomerverkürzung die Basis von zellulärer Alterung darstellt. Die Hypothese, dass die Telomerlänge ein prädikativer Marker der replikativen Kapazität einer Zelle ist konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt werden<sup>13,14</sup>. Außerdem wurde gezeigt, dass sich auch die Telomere von Stammzellen mit dem Alter verkürzen<sup>15</sup>.

Der endgültige experimentelle Beweis dafür, dass Telomerverkürzung replikative Seneszenz hervorruft, konnte durch die (Re)-Integration der katalytischen Untereinheit der Telomerase TERT in verschiedene Zelllinien erbracht werden. Die Zellen umgingen damit Seneszenz und wurden immortal<sup>16</sup>. Die essentielle Rolle von Telomerase in der Entstehung von Tumorzellen konnte ein Jahr darauf *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell demonstriert werden<sup>17</sup>.

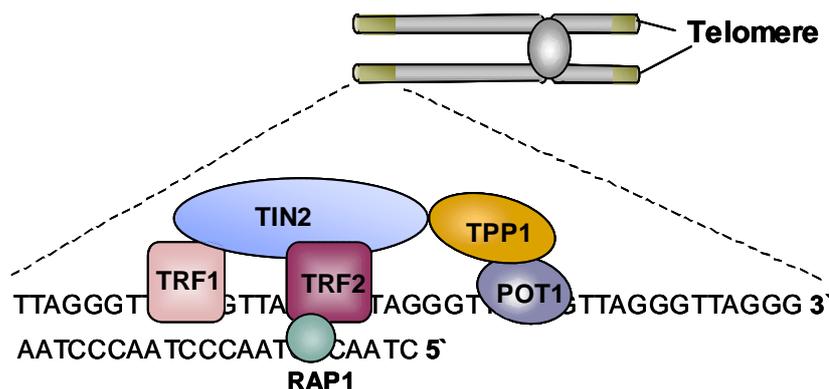
Die Generierung einer Telomerase Knockout-Maus (mTR<sup>-/-</sup>) durch Maria A. Blasco im Labor von Carol W. Greider trägt bis heute entscheidend zu unserem Wissen über den Zusammenhang von Telomerverkürzung, Telomeraseaktivität, Altern und Krebs bei<sup>18</sup>.

### 1.1.2 Struktur und Funktion von Telomeren

Telomere sind Nukleoproteinstrukturen, die die Enden der Chromosomen vor DNA-Reparatur und Degradation schützen<sup>19,20</sup>. Die Nukleinsäure der Telomere ist nicht gencodierend und in Vertebraten aus repetitiven Sequenzen mit der Basenabfolge (TTAGGG)<sub>n</sub> aufgebaut<sup>21</sup>. Im Gegensatz zu dieser konservierten Nukleotidsequenz variiert die Länge der Telomere stark. Menschen weisen je nach Zelltyp und Alter in somatischen Zellen durchschnittlich 5-15 kb auf. Mäuse und Katzen hingegen haben 10-15mal längere Telomere<sup>22,23</sup>. Außerdem variiert die Telomerlänge nicht nur von Zelltyp zu Zelltyp, sondern auch von Chromosom zu Chromosom<sup>24</sup>.

Im Generellen ist die Struktur der Telomere bis auf wenige Ausnahmen konserviert. Die Nukleotidsequenz ist doppelsträngig, reich an Guanin und endet 3' in einem einsträngigen Überhang (G-Strang Überhang)<sup>25</sup>.

An die telomerische DNA sind spezielle sich wiederholende Proteinkomplexe gebunden (Abb. 1). Diese Komplexe heißen Shelterin oder Telosom und spielen sowohl in der Regulation der Telomerlänge<sup>26,27</sup> als auch beim Schutz des Telomers eine entscheidende Rolle<sup>20,28</sup>. So hemmt beispielsweise viel Shelterin die Aktivität der Telomerase, und eine einwandfreie Funktion der Telomere als schützende Kappen der Chromosomen ist nur gewährleistet, wenn ein Minimum an telomerischen TTAGGG-Wiederholungen vorhanden und der Shelterin-Komplex funktionell ist<sup>20,29</sup>.

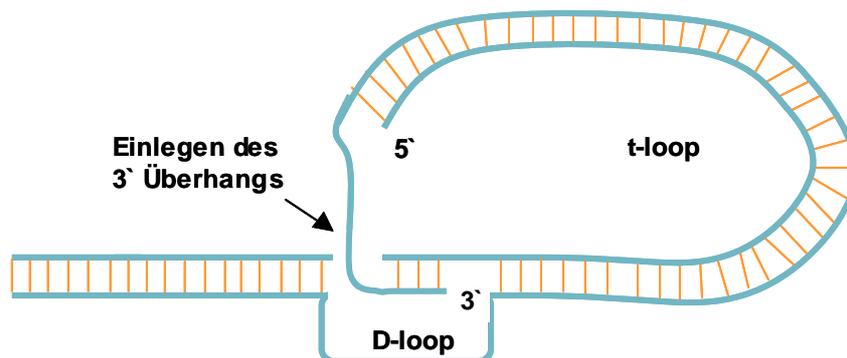


**Abb. 1: Telomerstruktur** Dargestellt ist modellhaft ein Ausschnitt der humanen Telomere. Neben den TTAGGG-Wiederholungen der telomerischen DNA sind die sechs Einheiten TRF1, TRF2, POT1, TPP1, TIN2 und RAP1 des Shelterin-Komplexes dargestellt (in Anlehnung an<sup>30</sup>).

Dessen sechs Einheiten sind TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1 und POT1. Diese bilden zusammen mit einer Vielzahl weiterer Komponenten den Proteinanteil der Telomere. Die Akkumulation des Shelterin-Komplex geschieht ausschließlich an den Telomeren, daher ist dessen Funktion auf die Telomere limitiert. Zudem ist Shelterin während aller Phasen des Zellzyklus mit der Telomer-DNA assoziiert<sup>20</sup>.

Der Komplex bindet telomerische DNA sehr spezifisch über die Proteine TRF1 und 2, die Homodimere bilden<sup>31-33</sup>, sowie über POT1<sup>34,35</sup>.

- **TRF1 und 2** (telomere repeat binding factor) gelten beide als Negativregulatoren der Telomerlänge, da sie Inhibitoren der Telomerase sind<sup>36,37</sup>. Sie scheinen aber unterschiedliche Rollen an den Telomeren zu erfüllen. So resultiert z.B. die Expression eines dominant-negativen Allels von TRF1 in Telomerverlängerung, wohingegen die Herunterregulation von TRF2 mittels einer dominant-negativen Version im Verlust des 3'-Überhangs resultiert. Die doppelsträngige DNA scheint zwar intakt zu bleiben, aber es kommt daraufhin zu chromosomaler Instabilität und *End-to-End*-Fusionen der Chromosomen<sup>38</sup>. Diese ungeschützten Telomerenden aktivieren die DNA-Reparatur-Maschinerie, was in der Induktion von Apoptose oder Seneszenz resultiert<sup>39</sup>. Intaktes TRF2 erkennt spezifisch ss/ds DNA Verbindungen und unterstützt so die Formierung des *t-loops* (t=Telomer)<sup>40</sup>. Diese Struktur bildet sich am äußersten Ende des Telomers. Dafür legt sich das freie einsträngige 3'-OH-Ende in die doppelsträngige DNA und bildet so einen dreisträngigen D-loop (D für *Displacement*)<sup>41</sup>. Somit ist das äußerste Chromosomenende vor Degradation geschützt (Abb. 2).



**Abb. 2: T-loop Formation** Schematische Darstellung der *t-loop* Bildung. Die doppelsträngige DNA „öffnet“ sich an einer Stelle und das einsträngige 3'-Ende legt sich zum Schutz vor Degradation in diesen *D-loop* (in Anlehnung an<sup>42</sup>).

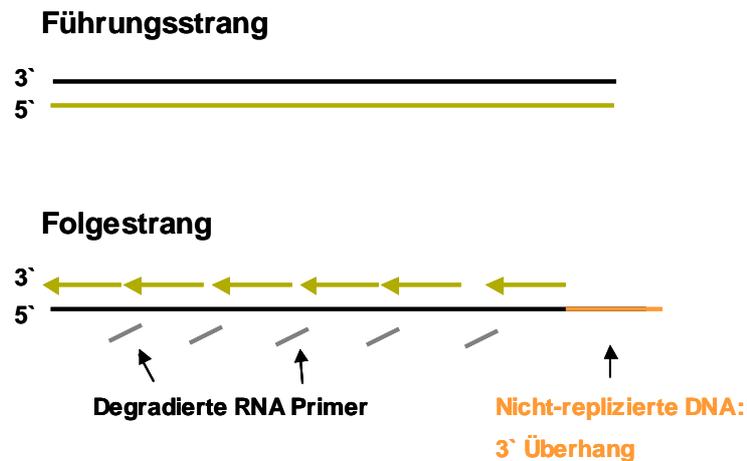
- **POT1** (*protection of telomeres1*) bindet die Telomer-DNA am 3'-Überhang. Herunterregulation des Proteins mit RNAi führt zum Verlust der einsträngigen Telomer-DNA und zur Verlängerung der Telomere.<sup>43</sup> In Mäusen konnten zwei POT1 Proteine (POT1a und b) identifiziert werden, wobei der Knockout beider zu verstärkter Bildung von telomerinduzierten Foci (TIFs) führt, die wichtig für die Signalgebung dysfunktioneller Telomere sind und so Zellzyklusarrest und Seneszenz auslösen<sup>44</sup>.
- **TPP1** (*tripeptidyl peptidase1*) interagiert mit POT1 und organisiert so dessen DNA-Bindung<sup>34</sup>. Über TPP1 können die beiden Komponenten TIN2 und POT1 miteinander assoziieren<sup>45</sup>. Neueste Studien ermittelten eine direkte Interaktion zwischen TPP1 und Telomerase, was bisher noch von keiner anderen Shelterin-Komponente gezeigt werden konnte<sup>46,47</sup>. Diese Arbeiten konnten TPP1 als direkten Regulator der Telomerase und als Mediator zwischen Shelterin und Telomerase identifizieren.
- **TIN2** (*TRF1 interacting nuclear factor2*) bindet TRF1. Der Verlust von TIN2 verlängert in telomerasepositiven Zellen die Telomere<sup>48</sup>.
- **RAP1** (*Repressor/activator protein1*) assoziiert mit TRF2<sup>49</sup> und besitzt in Säugetieren im Gegensatz zu seinem Homolog in Hefe keine telomerbindende Region. Sowohl in humanen Zellen als auch in Hefe konnte RAP1 als Negativregulator der Telomerlänge identifiziert werden<sup>50</sup>.

Neben dem Shelterin-Komplex gibt es eine Vielzahl von Proteinen (siehe Abschnitt 1.1.4), die mit dem Shelterin-Komplex interagieren, aber deren Wirkungsbereich nicht nur auf die Telomere beschränkt ist.

### 1.1.3 End-Replikations-Problem und Telomer-Hypothese

Für die Initialisierung der DNA-Synthese in 5'-3'-Richtung brauchen Polymerasen kurze RNA-Sequenzen von ca. 8-12 bp Länge. Diese sogenannten Primer werden im Anschluß an die Synthese wieder entfernt, und die Lücke wird durch DNA-Nukleotide aufgefüllt. Diese Nukleotide werden von einer Polymerase synthetisiert, die weiter 5' gestartet ist. Die Entfernung des äußersten Primers am 5'-Ende, führt somit zu einem Überhang des komplementären 3'-Endes und mit jeder neuen Replikationsrunde gehen daher Nukleotide verloren (Abb.3).

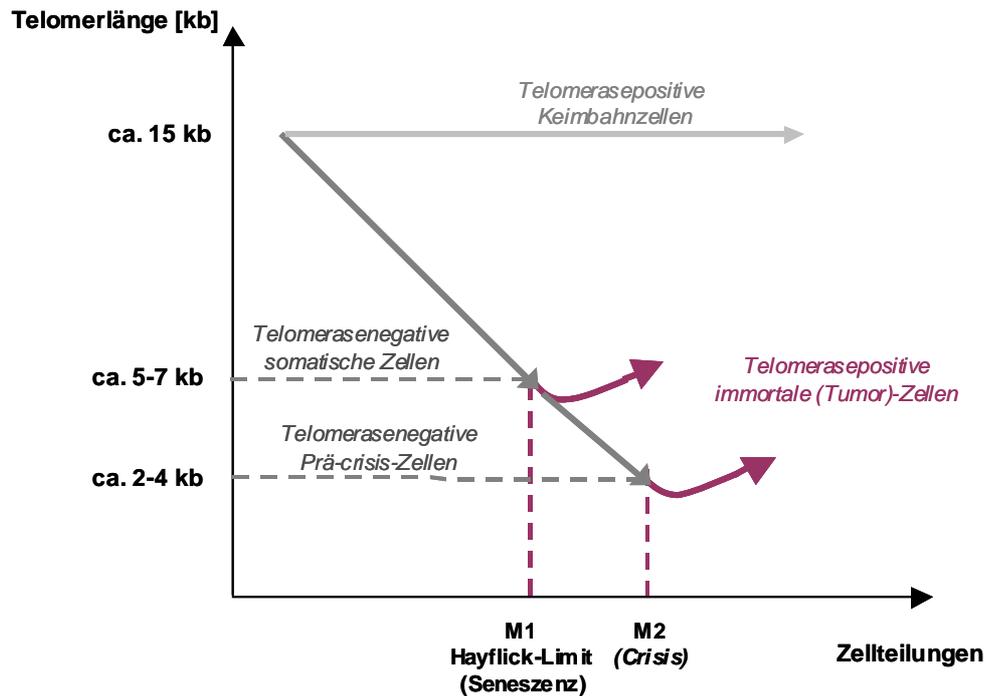
Dieses End-Replikations-Problem macht die wichtige Rolle der Telomere deutlich. Wäre die DNA am Ende der Chromosomen codierend, würde mit jeder Zellteilung genetische Information verloren gehen. Die nicht-codierende Telomerasequenz fungiert somit als Puffer zum Schutz der gencodierenden Sequenz.



**Abb. 3: End-Replikations-Problem** Vereinfachte Darstellung der Replikation der Telomer-DNA (nach <sup>51</sup>). Die Telomer-DNA am 3' Ende des Folgestrangs kann nicht repliziert werden, da die Polymerase keinen Primer zu ihrer Initialisierung hat. Deshalb gehen mit jeder Teilung Basenpaare verloren.

Somatische Zellen verlieren durch das End-Replikations-Problem mit jeder Zellteilung 50-200 bp an Telomer-DNA. Um die codierende DNA zu schützen wird deshalb typischerweise die Teilung bei einer kritischen Länge von 5-7 kb gestoppt und die Zellen arretiert im Zellzyklus (Abb. 4). Die Zelle hat damit das über die beiden Zellzyklusregulatoren p53 und pRB gesteuerte Mortalitätsstadium1 (M1) oder Hayflick-Limit erreicht und geht als Antwort in replikative Seneszenz. Hierbei ist das kürzeste Telomer einer Zelle als Signalgeber entscheidend („Schrittmacher-Telomer“). Die Telomere werden aus diesem Grund auch als „Mitotische Uhr“ bezeichnet, da ihre Länge die Kapazität der Zellteilungen determiniert.

Das Hayflick-Limit kann *in vitro* durch Expression von viralen Onkogenen wie SV40LargeT oder HPVE6 überwunden werden und kann *in vivo* bei der Bildung von Tumorzellen, z.B. durch die Inaktivierung von Tumorsuppressoren wie p53 und p16(INK4A) beobachtet werden<sup>52</sup>. Die Zelle teilt sich weiter bis zu einer Telomerlänge von ca. 2-4 kb und erreicht dann das Mortalitätsstadium 2 (M2/Crisis). Um diesen Zustand zu überwinden muss das Enzym Telomerase oder ein alternativer Mechanismus aktiviert werden. Nur so wird die Länge der Telomere aufrecht erhalten und die Zelle kann sich weiter teilen. Die Frequenz, mit der humane Fibroblasten das Hayflick-Limit unter Einfluss des SV40LargeT umgehen, konnte mit  $3 \times 10^{-7}$  festgelegt werden<sup>53</sup>.



**Abb. 4: Telomer-Hypothese der zellulären Alterung beim Menschen** Modell der mitotischen Uhr nach C. Harley<sup>11</sup>. Während telomerasepositive Keimbahnzellen ihre Telomerlänge aufrecht erhalten können, verlieren telomerasenegative somatische Zellen mit jeder Teilung an telomerischer DNA und durchlaufen bei einer kritischen Länge die replikative Seneszenz. Durch Aktivierung der Telomerase in somatischen Zellen können diese zu immortalen Tumorzellen transformieren.

Neben den zwei in diesem Modell dargestellten Kontrollpunkten (M1 und M2), gibt es einen weiteren telomerabhängigen Regulationspunkt, das „telomere uncapping“. Dieser Regulationspunkt ist unabhängig von der Telomerlänge und wird durch anormale Telomerstruktur wie Veränderungen in der Zusammensetzung der Telomerproteine und der DNA-Struktur induziert<sup>54,55</sup>.

Das Modell der Telomer-Hypothese erklärt, warum Telomere als Tumorsuppressoren in genetisch intakten Zellen funktionieren. Die Telomerlänge limitiert die Teilungsfähigkeit einer Zelle. So ist die Integrität der angrenzenden codierenden DNA, die aufgrund des End-Replikations-Problems bei weiteren Teilung verloren gehen würde, gewährleistet. Außerdem ist das replikative Alter einer Zelle limitiert, da sich mit jeder Replikation der DNA das Risiko erhöht, dass Fehler nicht detektiert und repariert werden, was die Mutationsgefahr größer werden lässt und somit maligne Erkrankungen fördert.

Die Inaktivierung von Tumorsuppressoren wie p53 und p16(INK4A) oder die Aktivierung von Onkogenen wie *myc*, *ras* und *bcr-abl* erlauben den Zellen zusätzliche

Teilungen und erhöhen somit deren genetische Instabilität. Eine weitere Konsequenz ist dann die Aktivierung der Telomeraseaktivität oder des alternativen Mechanismus „*Alternative lengthening of Telomeres*“ (ALT), um die Telomere zu verlängern oder die Länge aufrechtzuerhalten, um so die Zelle zu immortalisieren und letztendlich zu transformieren.

#### 1.1.4 Telomerproteine und Telomesignaltransduktion

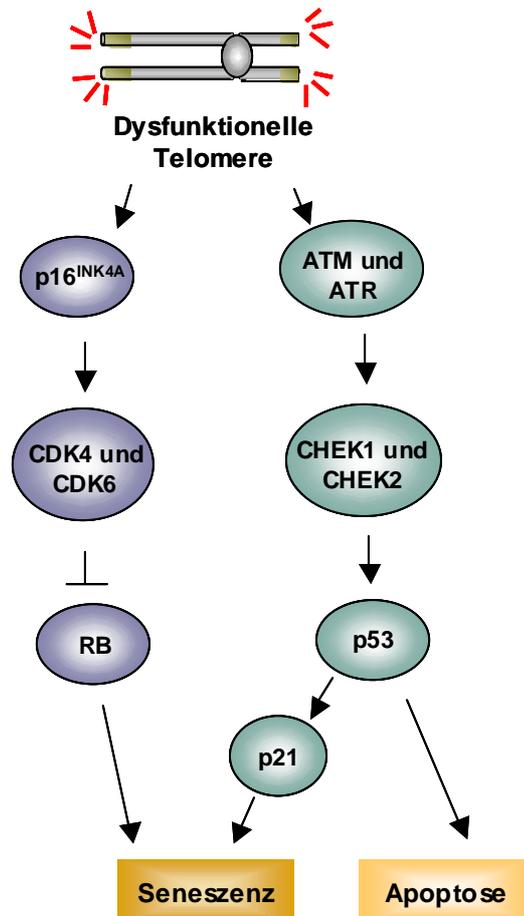
Außer den Komponenten des Shelterin-Komplexes sind noch weitere Proteine mit den Telomeren assoziiert und an deren Signalgebung beteiligt. Verkürzen sich die Telomere oder kommt es zur Zerstörung der Integrität des Telomers, weil essentielle Komponenten wie TRF2 fehlen<sup>39</sup>, dann wird dies über DNA-Reparatur-Wege signalisiert<sup>56,57</sup>. Dies resultiert in der Aktivierung von DNA-Reparatur-Kontrollpunkten, was im nächsten Schritt zum Zellzyklus-Arrest oder zur Apoptose führt. Zu erwähnen ist, dass sich die Telomere auch selbst „reparieren“ können, indem sie sogenannte *End-to-end-Fusionen* eingehen. Diese resultieren in sogenannten *Robertsonian-like Fusions* oder in dizentrischen Chromosomen und in der weiteren Folge in der Bildung von Anaphasen-Brücken. Diese führen im Rahmen der nächsten Mitose zu Brüchen in der Spindel oder in den Chromosomen selber, was Aneuploidie in der überlebenden Zelle verursachen kann<sup>18</sup>.

Man geht davon aus, dass drei Faktoren funktionelle Telomere kennzeichnen: (1) Eine minimale Telomerlänge, (2) die Integrität des 3'Überhangs und (3) funktionelle Telomer-bindende Proteine. Ist einer dieser Faktoren nicht gegeben, kommt es zur Aktivierung der DNA-Reparatur.

Sind Telomere dysfunktional kommt es außerdem zur Bildung von „Telomere-Induced Foci“ (TIFs). Diese sind aus Proteinen der DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur aufgebaut, wodurch erklärt ist, dass dysfunktionelle Telomere als DNA-DSBs erkannt werden. Die Foci bilden sich unter anderem aus durch Phosphorylierung aktivierten Reparaturmarkern wie  $\gamma$ H<sub>2</sub>AX, 53BP1, NBS1 und MDC<sup>58,59</sup>.

Die Dysfunktionalität des Telomers wird über zentrale Komponenten der DNA-DSB Reparaturmaschinerie wie ATM und ATR signalisiert<sup>60,61</sup>. Diese beiden Kinasen der PI3-Familie kontrollieren die Signalwege der Zellzyklus-Kontrollpunkte und sind verantwortlich für die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden und genomische Instabilität. Sie sind Regulatoren einer Vielzahl von Proteinen wie der Kontrollpunkt-Kinasen CHEK1 und 2 und dem Tumorsuppressor p53 (Abb. 5).

Sowohl die Signaltransduktion von replikativer Telomerverkürzung als auch von Telomerdysfunktion aufgrund des Fehlens essentieller Proteine wie TRF2 oder POT1 verläuft über den p53-Signalweg. Zusätzlich dazu kann in humanen Zellen die Induktion replikativer Seneszenz auch über den p16/pRB Signalweg erfolgen<sup>30,62,63</sup>. Der Tumorsuppressor p53 stellt also die zentrale Komponente der Telomersignalgebung dar, dessen Aktivierung führt zu Apoptose oder Seneszenz<sup>64,65</sup>.



**Abb. 5: Telomersignaltransduktion** Werden Telomere dysfunktionell, weil sie durch Replikation verkürzt oder essentielle Komponenten wie TRF2 oder POT1 fehlen, wird dies als DNA-DSB erkannt. Die Signalgebung erfolgt dann über klassische Wege der DNA-Reparatur an denen die Zellzyklusregulatoren p53 oder auch p16 beteiligt sind, und die Zelle durchläuft entweder die replikative Seneszenz oder Apoptose (in Anlehnung an<sup>30</sup>).

Weitere Proteine der DNA-DSB-Reparatur, die an der Signalgebung von Telomeren beteiligt sind, gehören dem „Nicht homologen *End-Joining*“ (NHEJ) an. Eine zentrale Komponente dieses Reparaturwegs ist Ku86, welches an den Telomeren lokalisiert ist und Apoptose durch dysfunktionelle Telomere vermittelt.<sup>66</sup> Außer dem NHEJ-Signalweg ist aber auch die Homologe Rekombination (HR) aktiv an der Telomer-Signalgebung

beteiligt und signalisiert über den sogenannte MRN-Komplex, der aus den Proteinen MRE11, NBS1 und RAD50 aufgebaut ist, Telomerdysfunktion. Zellen die negativ für NBS1 sind zeigen erhöhte genomische Instabilität, die sich z.B. in der Bildung von Anaphasen-Brücken ausdrückt<sup>67</sup>.

Außer diesen Komponenten der DNA-DSB Reparatur sind noch einer Reihe weiterer Proteine wie z.B. TANK1 und 2 mit den Telomeren assoziiert und unterstützen die Integrität des Telomers<sup>68</sup>.

### 1.1.5 Telomerase

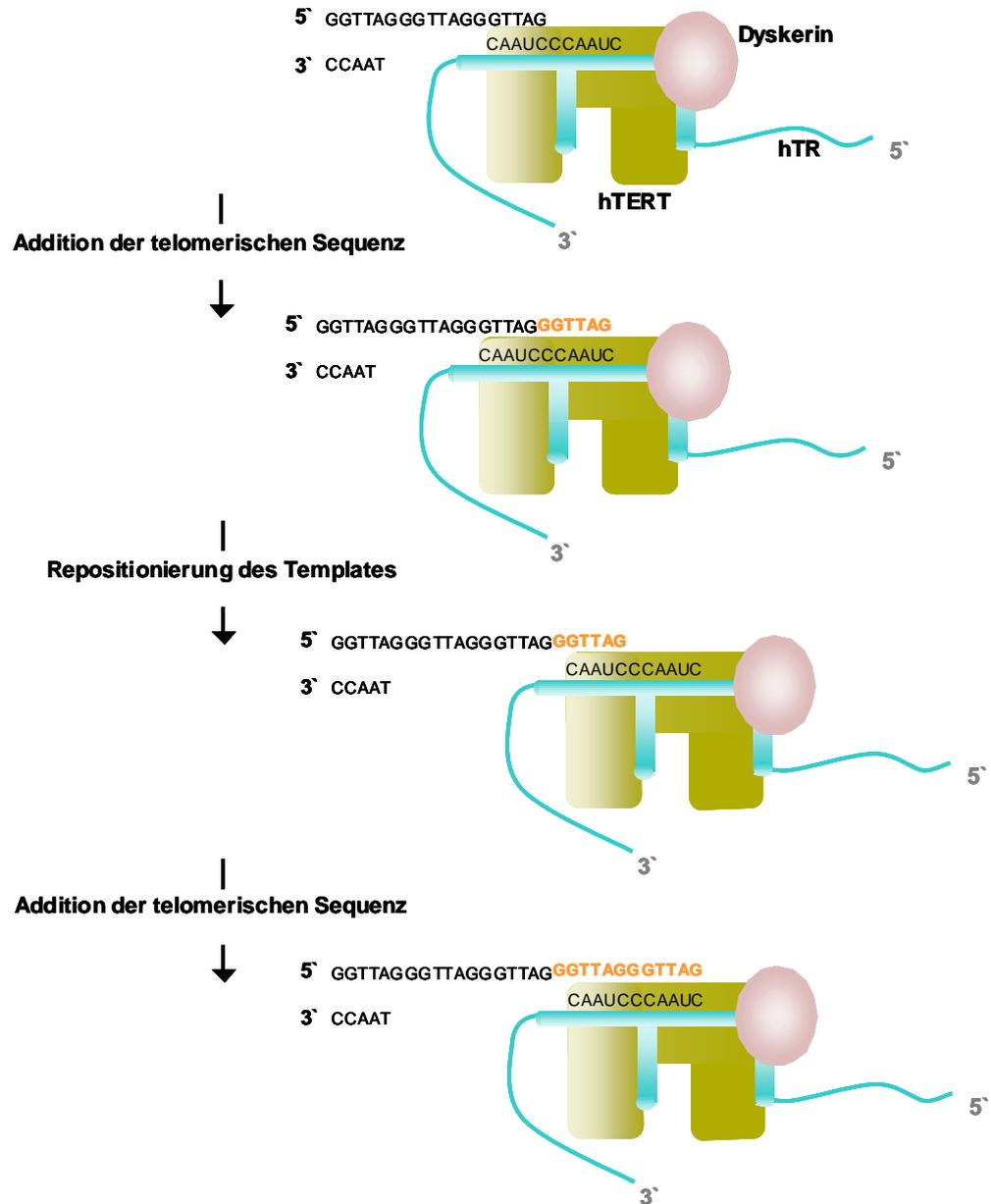
Bei dem Enzym Telomerase handelt es sich um einen Komplex, der aus mehreren Proteinen und einer RNA-Untereinheit aufgebaut ist. Die primäre Aufgabe der Telomerase ist die Katalyse der Bildung von Telomerwiederholungen *de novo*. Das außergewöhnliche an diesem Enzym ist, dass es sich um die einzige bislang bekannte Reverse Transkriptase in Eukaryonten handelt.

Die Struktur und genaue Wirkweise des Telomerasekomplexes ist noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung. *In vitro* konnte schon nachgewiesen werden, dass für die enzymatischen Synthese von Telomersequenzen die RNA-Untereinheit hTR („*Telomerase RNA*“) und die katalytische Untereinheit hTERT („*Telomerase Reverse Transcriptase*“) ausreichen<sup>69</sup>. Eine neuere Arbeit, die den aktiven Telomerase-Komplex in mehreren immortalen humanen Zelllinien massenspektrometrisch analysierte, hat gezeigt, dass drei Untereinheiten essentiell sind. Hierbei handelt es sich um hTERT und hTR sowie dem Protein Dyskerin, welches an der Stabilisierung von hTR beteiligt ist<sup>70</sup>.

Es wird angenommen, dass die drei Komponenten als Dimere vorliegen, da der isolierte Komplex mit 650-670 kDa etwa doppelt so groß ist wie die Summe der Monomere der Komponenten<sup>70-72</sup>. Insgesamt scheint aber ein Megakomplex von 1-2 MDa an der Rekrutierung zu den Telomeren und der Komplexanordnung beteiligt zu sein, denn eine ganze Reihe von Proteinen wurden schon als Interaktionspartner der Telomerase analysiert<sup>70</sup>.

Die Größe der humanen RNA-Untereinheit hTR beträgt 153 kDa und das Molekül hat 560 bp, die komplementär zur Telomer-DNA-Sequenz sind, wobei das Monomer der katalytische UE 127 kDa und das Protein Dyskerin 57 kDa aufweisen. Die RNA-Komponente ist ubiquitär in allen Zellen des Körpers exprimiert, wohingegen hTERT vor allem in Keimbahn- und Tumorzellen exprimiert ist<sup>73</sup> und somit die limitierende Komponente darstellt. Eine schwache Expression lässt sich außerdem sowohl in

hämatopoetischen Stammzellen als auch in Stammzellen anderer Gewebe und in Leukozyten nachweisen<sup>74,75</sup>.



**Abb. 6: Telomerase und ihre Funktion** Das Enzym Telomerase ist eine Reverse Transkriptase die in der Lage ist Telomerwiederholungen an ihrer RNA-UE hTR *de novo* zu synthetisieren. (in Anlehnung an<sup>51</sup>).

Für die Elongation der Telomere assoziiert die katalytische Untereinheit hTERT mit dem 3' Überhang des Telomers und nutzt die RNA-Komponente als Matrize. So können die Primer für die diskontinuierliche DNA-Synthese weiter außen am verlängerten Telomer binden und die Telomerlänge wird aufrecht erhalten (Abb.6).

Die Auswirkungen des Fehlens von Telomeraseaktivität *in vivo* konnte mit der homozygot depletierten mTR<sup>-/-</sup> Knockout-Maus gezeigt werden<sup>18</sup>. Die Telomerlänge der Tiere nimmt kontinuierlich bis zur Nachweisgrenze ab und es können vermehrt *End-to-end*-Fusionen der Chromosomen ermittelt werden. Bis Generation 6 (G6) sind die Mäuse zeugungsfähig, dann kommt es aber zur Anhäufung von Defekten in der Spermatogenese und zur Infertilität. Außerdem zeigt sich eine Abnahme der Knochenmarksreserve und zunehmende Tumorbildung. Die Generierung der mTR<sup>-/-</sup> Maus trägt einen essentiellen Beitrag zum Verständnis von Altern und der Entstehung von Krebs bei.

Zwar ist die Telomer- und Telomerasebiologie in Mäusen verschieden zum Mensch, aber sehr ähnliche Defekte lassen sich auch bei der Erbkrankheit Dyskeratosis congenita (DKC), die durch Mutationen in Telomerasekomponenten entsteht, beobachten. DKC kann in zwei verschiedenen Formen vererbt werden: Autosomal-dominant oder X-chromosomal. Die autosomale Variante entsteht durch Mutation in hTR<sup>76</sup>, die x-chromosomale Form durch Mutation im *dkc1*-Gen, das die Telomerasekomponente Dyskerin codiert<sup>77</sup>. Zudem konnte auch eine Mutation in hTERT schon mit DKC in Verbindung gebracht werden<sup>78</sup>. Die Negativeffekte der Krankheit zeigen sich besonders in hochregenerativen Geweben wie Haut und Knochenmark. Außerdem haben die Patienten verkürzte Telomere, die mit Aneuploidie und Chromosomentranslokationen verbunden sind<sup>79,80</sup>. In der DKC zeigt sich daher klinisch, wie sich die Herunterregulation der Telomeraseaktivität und Telomerverkürzung zellbiologisch im humanen System *in vivo* auswirkt.

Auch in der Aplastischen Anämie, einer sehr seltenen Form der Blutarmut, die sich durch eine Verminderung aller Zelltypen im peripheren Blut ausdrückt, finden sich sowohl in Dyskerin als auch in hTERT Polymorphismen. Zudem sind in hTERT auch Mutationen detektiert worden, die zur Telomerverkürzung und Reduktion der Telomeraseaktivität in Leukozyten führen<sup>81</sup>.

Die Aktivierung der Telomerase kann in ungefähr 90% aller Tumore nachgewiesen werden und ist damit wahrscheinlich das häufigste gemeinsame Ereignis maligner Gewebe<sup>82</sup>. Als Alternative zur Telomerase existiert in Tumorzellen noch ein weiterer Weg, um die Telomerlänge aufrechtzuerhalten, der Mechanismus „*Alternative Lengthening of Telomeres*“ (ALT)<sup>83,84</sup>. Der ALT-Mechanismus ist zwar noch nicht bis ins Detail verstanden, aber beruht nach heutigem Stand auf Rekombination. Nach der Replikation lagern sich die Schwesterchromatiden asymmetrisch aneinander und die Telomer-DNA wird dabei nicht-homolog ausgetauscht. Auf diese Weise sind beide Chromatiden verschieden lang und bei der nächsten Teilung entstehen zwei

Tochterzellen mit unterschiedlicher Telomerlänge. Ein Kennzeichen von ALT-Zellen sind „*ALT-associated PML bodies*“ (APBs). In diesen Körperchen findet man Telomerkomponenten wie DNA oder TRF2 assoziiert mit dem Protein PML<sup>85</sup>. Diese Körperchen sind spezifisch für Zellen, die ihre Telomerlänge über ALT aufrecht halten.

## 1.2 Chronische myeloische Leukämie

Die Entdeckung des sogenannten Philadelphia Chromosoms im Jahr 1960 als ursächliche chromosomale Veränderung für eine leukämische Erkrankung war ein Durchbruch in der Krebsforschung<sup>86</sup>. Erst 1973 wurde dann aber herausgefunden, dass es sich bei dieser chromosomalen Veränderung um die reziproke Translokation t(9;22) handelt<sup>87</sup>, und es vergingen weitere 10 Jahre, bis mit dem Protoonkogen *c-abl*<sup>88</sup> und dem Gen *bcr*<sup>89</sup> die Bruchstellen ausfindig gemacht wurden. Mit der Deregulation der Tyrosinkinase c-ABL im Fusionsprotein BCR-ABL konnte dann die Pathogenese der Krankheit aufgedeckt werden<sup>90</sup>. Ein weiterer Meilenstein war die Entwicklung und der Einsatz des selektiven Tyrosinkinaseinhibitors (TKI) Imatinib, mit dem erstmalig eine maligne Erkrankung durch spezifische Inhibition der molekularen Ursache erfolgreich d.h. molekular zielgerichtet therapiert werden konnte<sup>91,92</sup>.

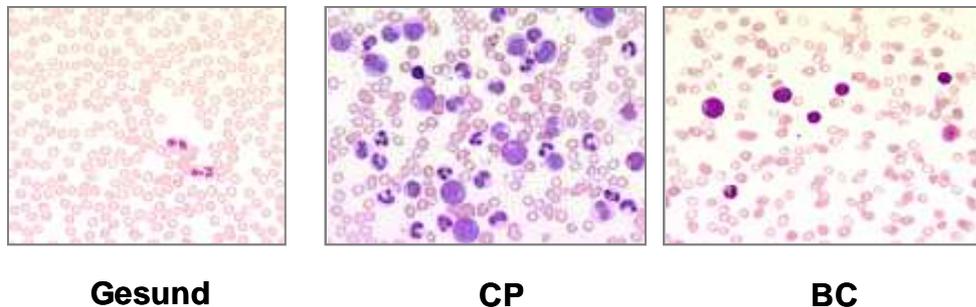
### 1.2.1 Krankheitsverlauf

Die CML ist eine klonale, myeloproliferative Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Rudolf Virchow prägt 1845 den Begriff Leukämie (= weißes Blut), denn die Krankheit manifestiert sich meist mit einer stark erhöhten Leukozytenzahl und dies wird durch weiße Färbung des peripheren Bluts sichtbar.

CML hat eine Inzidenz von 1,6 Fällen pro 100.000 Erwachsenen und das Verhältnis im Auftreten entspricht zwischen Mann und Frau 1,4 zu 1. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnose beträgt etwa 55 Jahre, wobei weniger als 10% der Patienten unter 20 Jahre sind<sup>93</sup>. Die CML macht ungefähr 20 % aller Leukämien aus<sup>94</sup>.

Die Krankheit verläuft in drei Phasen: einer chronischen Phase (CP), die unbehandelt ca. 4-5 Jahre anhält, einer Übergangsphase, der Akzelerationsphase (AP), der sich terminal die Blastenkrise (BP) anschließt, die im Median weniger als sechs Monate dauert<sup>93</sup>. 90% der Diagnosen werden bei Routinetests in asyptomischen Patienten in

der chronischen Phase gestellt<sup>95</sup>. In Abbildung 7 sind Blutausstriche von Patienten in unterschiedlichen Phase der CML gezeigt.



**Abb. 7: Blutbild in unterschiedlichen Phasen der CML** Blutausstrich eines gesunden Probanden und von Patienten in chronischer Phase (CP) und Blastenkrise (BC) der CML. (Quelle: Klinik für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinik Tübingen).

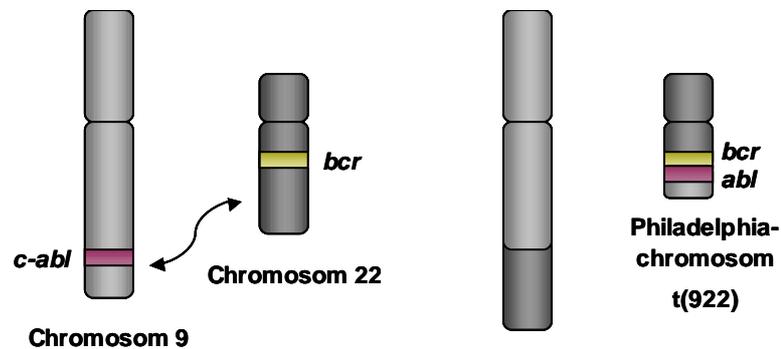
Die CML hat ihren Ursprung in einer hämatopoetischen Stammzelle mit der Bildung des Philadelphiachromosoms. Die Krankheit ist durch Vermehrung von Zellen aller Differenzierungsstufen der myeloischen Linie charakterisiert. Auch kommt es zu einer Beteiligung der B-lymphozytären Reihe, wohingegen die Beteiligung der T-Lymphozyten kontrovers diskutiert wird<sup>96</sup>.

Ausgehend von der CP, die durch eine Erhöhung der Zahl der funktionellen Leukozyten im peripheren Blut gekennzeichnet ist, schreitet die Krankheit typischerweise über die AP bis zur terminalen BC voran. In der AP erlangen die Zellen weitere genetische Veränderungen wie beispielsweise das Isochromosom 17 oder eine Trisomie 8 bzw. 18. Zusätzlich kommt es in der BC zum Differenzierungsblock und der Ausschwemmung einer massiven Zahl an unreifen Leukozyten, sogenannten Blasten ins periphere Blut. Außerdem werden weitere Veränderungen in Genen von Tumorsuppressoren und Onkogenen wie *tp53* und *ras* gefunden<sup>97</sup>. Der Eintritt in die späten Phasen der CML ändert die Krankheit von einer chronischen zu einer akuten Leukämie.

### 1.2.2 Philadelphiachromosom und das Onkogen *bcr-abl*

Gekennzeichnet ist die CML durch eine spezifische chromosomale Anomalität, das Philadelphiachromosom (benannt nach dem Ort seiner Entdeckung). Dies entsteht durch die Translokation der q-Arme der Chromosomen 9 und 22. Die Translokation bringt Abschnitte des Protoonkogens *c-abl* auf Chromosom 9 und des *bcr*-Gens auf

Chromosom 22 zueinander (Abb. 8). Diese Fusion führt zur Expression der konstitutiv aktiven onkogenen Tyrosinkinase BCR-ABL .



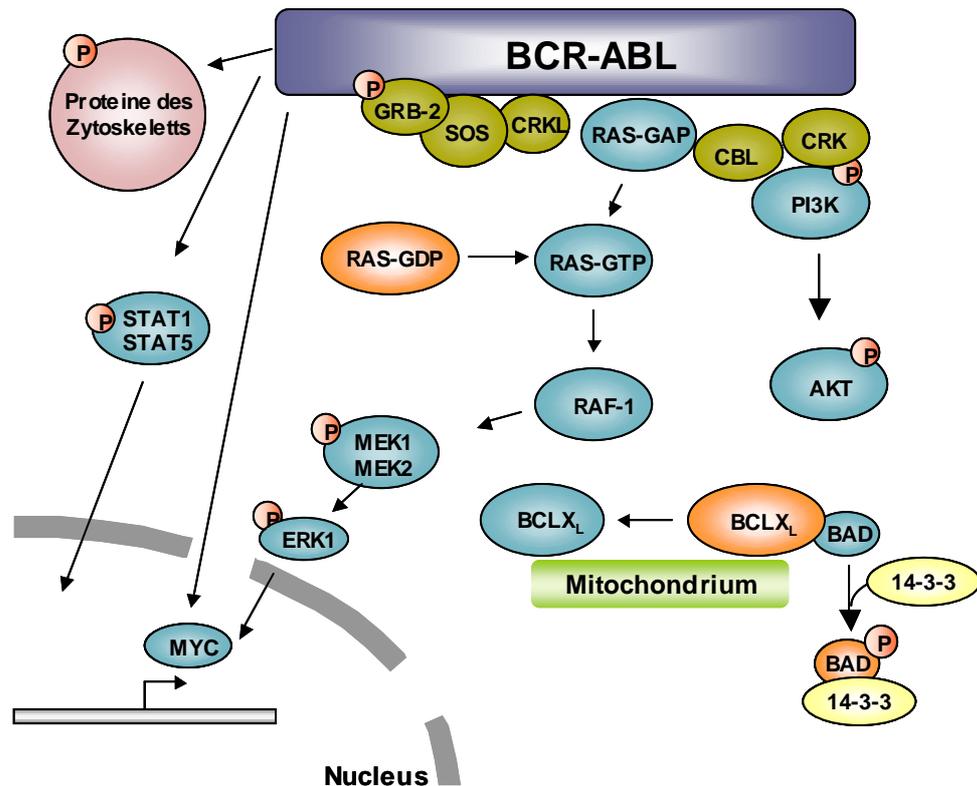
**Abb. 8: Philadelphiachromosom** Der gegenseitige Austausch von Material der Chromosomen 9 und 22 führt zur Bildung zweier aberranter Chromosomen. Auf dem Philadelphiachromosom werden dabei die Genabschnitte des Protoonkogens *c-abl* und von *bcr* zusammengebracht. Das führt zu Expression der onkogenen Tyrosinkinase BCR-ABL.

Zwar treten sehr unterschiedliche Bruch- und Rekombinationsstellen auf, aber unabhängig von deren exakten Lokationen führt das *Splicen* der prä-mRNA zu einem mRNA Molekül, indem die Sequenz von *bcr* mit dem Exon a2 von *c-abl* fusioniert. Im Gegensatz dazu gibt es aber drei verschiedene Regionen innerhalb des *bcr* Gens, die dann mit *c-abl* fusionieren können. Aus diesem Grund können drei unterschiedliche BCR-ABL Proteine entstehen.

Bei den meisten Patienten mit CML und ungefähr einem Drittel der Patienten mit Philadelphiachromosom positiver (Ph<sup>+</sup>) Akuter lymphatischer Leukämie (ALL) kommt es zur Expression der 210 kD großen Variante des Proteins. Hierbei wird der Bruchpunkt in *bcr major breakpoint cluster region* (M-*bcr*) genannt. Kommt es zur Bildung der 190 kD großen Variante der Tyrosinkinase, die in den anderen 60-70% der Ph<sup>+</sup> ALLs vorkommt heißt der Bruchpunkt m-*bcr* (*minor*) und  $\mu$ -*bcr* bei der 230 kD großen BCR-ABL-Tyrosinkinase. Diese Isoform ist assoziiert mit der sehr seltenen Untergruppe von CML-Patienten, die eine Ph<sup>+</sup> chronische neutrophile Leukämie entwickeln<sup>98</sup>.

Die Tyrosinkinase BCR-ABL spielt die wesentliche Rolle in der Entstehung der CML, da sie durch ihre konstitutive Aktivität die Proliferation der Ph<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark stimuliert. Dies konnte *in vivo* durch Transplantation von von BCR-ABL<sup>+</sup> murinen Zellen demonstriert werden<sup>99</sup>.

Die Fusion von ABL mit BCR führt zu einer konstitutiv aktivierten SH1 Domäne von ABL und damit zu unkontrollierter Signaltransduktion, die unter anderem eine Steigerung der Proliferationsrate und einen anti-apoptotischen Effekt vermittelt. Außerdem ist die Adhäsion der BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen gegenüber dem Knochenmarkstroma verändert, was die stark erhöhte Zahl an unreifen myeloischen Zellen in Blut und Knochenmark der Patienten erklärt<sup>100</sup>. BCR-ABL ist im Vergleich zu cABL nicht mehr in der Lage, in den Kern zu pendeln, sondern verbleibt im Zytosol<sup>101</sup>.



**Abb. 9: Signaltransduktion der Tyrosinkinase BCR-ABL** Darstellung einiger Signalwege, die von der zytosolständigen, onkogenen Tyrosinkinase BCR-ABL moduliert werden. Vor allem werden Apoptosesignalwege, die Zellproliferation und auch das Zytoskelett beeinflusst (nach <sup>102</sup>).

Eine Vielzahl von Interaktionspartnern leiten die onkogenen Signale weiter, wodurch BCR-ABL z.B. die Organisation des Zytoskeletts oder die mitochondriale Prozessierung von apoptotischen Signalen kontrolliert (Abb. 9).

Die wichtigsten involvierten Signalwege sind RAS/MAP-Kinase, JAK, STAT sowie PI3K. Ein Großteil der Interaktionen geschieht über Tyrosinphosphorylierungen, wofür BCR-ABL die Bindung mit Adaptorproteinen wie u.a. CRKL und GRB-2 benötigt<sup>102</sup>.

Außerdem phosphoryliert BCR-ABL Adhäsionsmoleküle wie FAK und Paxillin und sorgt so direkt für die Freisetzung von Zellen ins Blut<sup>103,104</sup>.

### 1.2.3 Therapie der CML

Das hauptsächliche Ziel in der Therapie der CML ist die Stabilisierung der Blutbildung, was über verschiedene Parameter gemessen wird. Es wird zwischen dem sogenannten hämatopoetischen, zytogenetischen und molekularen Ansprechen (Remission) unterschieden. Das **hämatopoetische Ansprechen** drückt sich in der Normalisierung der Leukozytenzahlen und damit der Eliminierung der unreifen Blasten sowie der Normalisierung der Milzgröße und einem Verschwinden von Krankheitssymptomen aus.

Die Verminderung der Ph<sup>+</sup> Zellen wird je nach Erfolg in mehrere Ebenen eingeteilt wobei die Unterdrückung unter die Nachweisgrenze der konventionellen Zytogenetik oder der Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) zum sogenannten kompletten **zytogenetischen Ansprechen** führt. Durch Nachweis der mRNA von BCR-ABL mittels PCR wird das **molekulare Ansprechen** überprüft.

Die einzige kurative Behandlung der CML ist die allogene Stammzelltransplantation. Zur zytoreduktiven Behandlung werden Substanzen wie Hydroxyurea (HU) oder Interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) angewandt.

Revolutionär war die Einführung von Imatinib im Jahr 2001<sup>105</sup>. Bei dieser Substanz handelt es sich um einen selektiven Tyrosinkinaseinhibitor (TKI), der kompetitiv die ATP-Bindungsstelle von BCR-ABL blockiert.

Imatinib ist heute der Standard in der CML-Therapie und 5 Jahre nach Studienbeginn konnte gezeigt werden, dass 89% der behandelten Patienten in kompletter zytogenetischer Remission waren und die Krankheit bei nur 7% der Patienten zur Akzelerierten Phase oder Blastenkrise fortgeschritten war<sup>92</sup>.

Imatinib ist zwar gut verträglich, aber es kommt in ca. 2 % der Patienten in der CP pro Jahr zur Resistenzbildung gegenüber der Substanz. Zum einen ist eine klonale Selektion von Blasten mit Amplifikation des *bcr-abl* Genabschnitts, zum anderen Mutationen in der ATP-Bindungsstelle die zu deren Konformationsänderung führen, ursächlich beschrieben<sup>106</sup>. Inzwischen sind die erste Zweitgenerationssubstanzen, z.B. Dasatinib und Nilotinib, zugelassen. Diese hemmen zwar BCR-ABL potenter als Imatinib, aber keines der Moleküle wirkt gegen die Mutation T315 in der ATP-

Bindungsstelle von ABL. Zur Zeit sind aus diesem Grund schon erste klinische Studien mit Substanzen angelaufen, die gegen diese Resistenz wirksam sind, sogenannte Drittgenerations-TKIs wie der Aurorakinaseinhibitor PHA-739358<sup>107</sup>.

Das langfristige Ziel ist, Kombinationstherapien mit TKIs und z.B. sogenannten *Multi Target*-Substanzen oder anderen spezifischen Wirkstoffen zu etablieren, um so durch den Angriff an verschiedenen zellulären Zielstrukturen die Resistenzbildung in den Griff zu bekommen<sup>108</sup>.

## 1.2 Telomer- und Telomerasebiologie in der CML

Die CML stellt eine Modellkrankheit für die Rolle der Telomere zur Prognose und auch Progression hämatopoetischer Malignome dar<sup>109</sup>.

Im Verlauf der CML kommt es zur Verkürzung der Telomere der leukämischen Stammzellen gegenüber den gesunden Hämatopoese. Verantwortlich dafür ist vermutlich die erhöhte Proliferationsrate der leukämischen Zellen, die durch die Aktivität der onkogenen Tyrosinkinase BCR-ABL ausgelöst wird. Dies spiegelt sich in einer signifikanten Telomerverkürzung der peripheren, myeloischen Ph<sup>+</sup>-Blutzellen gegenüber den Ph<sup>-</sup>-T-Lymphozyten wider<sup>96</sup>. Vergleichende Analysen der Telomerlänge zwischen Zellen der CP und der AP/BC ergaben eine weitere Verkürzung mit Progression der Krankheit<sup>96,110</sup>.

Übereinstimmend mit diesen Daten ist das zytogenetische und molekulare Ansprechen auf die Therapie mit Imatinib mit einer Verlängerung der Telomere im peripheren Blut assoziiert<sup>111,112</sup>. Dies spiegelt letztlich eine quantitative Zunahme der Ph<sup>-</sup>, gesunden Hämatopoese gegenüber der leukämischen Ph<sup>+</sup> im peripheren Blut wider. Demgegenüber wird Telomerverkürzung in Ph<sup>+</sup>-Zellen mit einer schlechten Prognose in Einklang gebracht, da die Telomere von Hochrisiko-Patienten gegenüber Niedrigrisiko-Patienten deutlich verkürzt sind<sup>113</sup>. Dies ist ebenso der Fall, wenn die Erkrankung von der chronischen Phase (CP) in die Blastenkrise (BC) übergeht<sup>96</sup>.

CD34<sup>+</sup> Stamm- und Progenitorzellen von Patienten in CP einer CML weisen leichte (2-5 fache) Erhöhung der Telomeraseaktivität gegenüber gesunden Zellen auf, während sich die Aktivität in der BP auf das 10-50fache steigert<sup>114</sup>. Außerdem konnte eine starke Erhöhung der Telomeraseaktivität mit zusätzlichen genetischen Aberrationen und auch Mikrosatelliten-Instabilität in Verbindung gebracht werden<sup>115</sup>. Die Erhöhung der Telomeraseaktivität tritt also in Assoziation mit genetischer Instabilität auf. Zudem wurde gezeigt, dass hohe Telomeraseaktivität prognostischen Einfluss hat und mit einem kürzeren Überleben der Patienten korreliert<sup>114,116</sup>.

In Abbildung 10 ist ein von Brümmendorf et al. veröffentlichtes Modell dargestellt, welches die oben ausgeführte Telomerdynamik im Verlauf der CML illustriert<sup>96</sup>.

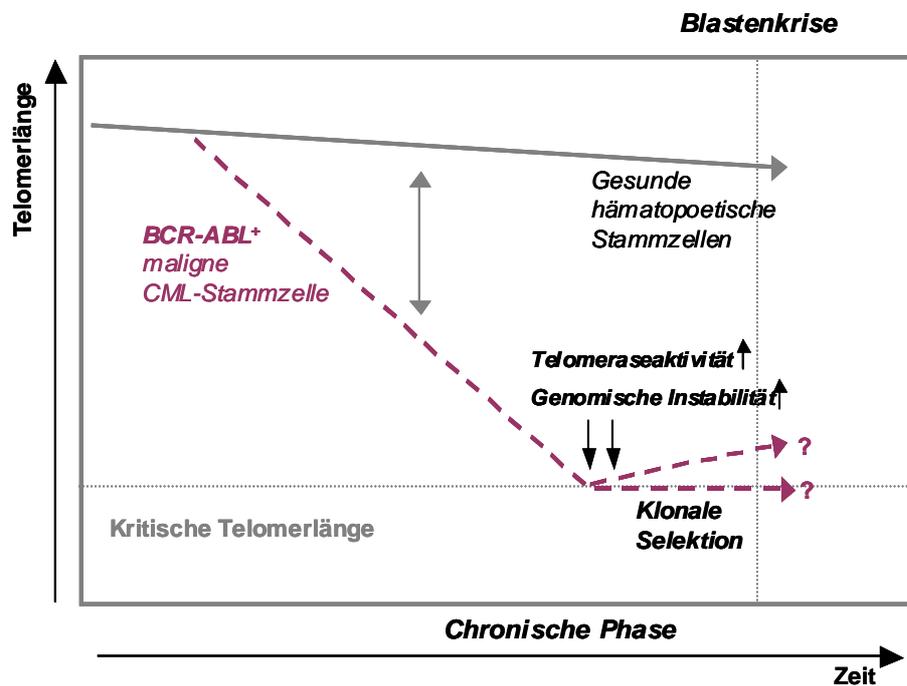


Abb. 10: Modell der Telomerbiologie in der CML ( in Anlehnung an<sup>96</sup> ).

## 1.4 Telomeraseinhibition

### 1.4.1 Einsatz von Telomeraseinhibitoren

Der Einsatz von telomeraseinhibitorischen Strategien erfordert verschiedene Voraussetzungen, um einen Therapieerfolg zu gewährleisten. Die hohen Proliferationsraten von Tumorzellen und deren initial verkürzten Telomere gegenüber dem umliegenden gesunden Gewebe bieten sehr gute Bedingungen für die erfolgreiche Anwendung dieser Strategien<sup>117</sup>.

Allerdings benötigen Therapien, die auf Telomerverkürzung abzielen Zeit, denn sie müssen mit jeder Zellteilung zu einer progressiven Verkürzung der Telomere führen und dürfen nicht toxisch für gesunde Zellen sein, um selektiv die malignen Zellen in einen telomervermittelten Wachstumsarrest oder Apoptose zu treiben<sup>51</sup>.

Aus diesen Gründen bieten sich telomeraseinhibitorische Therapien vor allem in chronischen Erkrankungsstadien bzw. Situationen einer sogenannten „minimalen

Resterkrankung“, wie z.B. im adjuvanten Stadium oder in Kombination mit anderen gezielten Anti-Tumortherapien an.

Solche Kombinationstherapien mit verschiedenen Angriffspunkten in der Tumorzelle könnten die konventionelle Chemotherapie ablösen. White et. al. schlagen z.B. eine Kombination von Telomeraseinhibition mit anti-angiogenetischen Therapien vor, da bei alleiniger Telomerasehemmung die Gefahr sehr hoch erscheint, dass die Tumorlast zu schnell zu groß wird und die alleinige Gabe von Angiogeneseinhibitoren nur das Wachstum des Tumors hemmt, die malignen Zellen aber überleben und metastasieren können. Parallele Telomeraseinhibition würde mit der Teilung der Zellen die Telomere kritisch verkürzen und die Zellen würden arretieren<sup>51</sup>.

#### 1.4.2 Strategien der Telomeraseinhibition

Innerhalb der letzten Jahre sind viele verschiedene Ansätze entwickelt worden, die auf unterschiedliche Weise entweder das Enzym Telomerase hemmen oder aber dessen spezifische Expression im Tumorgewebe nutzen. Auch Substanzen, die die Telomerintegrität direkt angreifen, werden untersucht.

In einer vor kurzem erschienenen Übersichtsarbeit wurden diese unterschiedlichen Ansätze in Gruppen eingeteilt<sup>117</sup>:

**Telomeraseinhibitoren:** Hemmen direkt die Telomerase-Untereinheit hTERT oder hTR (z.B. BIBR1532 (siehe unten) und GRN163L).

**hTERT-Immunotherapie:** Stimuliert das Immunsystem der Patienten zum Angriff auf telomerasepositive Zellen.

**Telomerzerstörende Agenzien:** Verändern die Telomerstruktur, so dass z.B. die Telomerase nicht mehr ansetzen kann (z.B. BRACO19).

**TERT-Promotor-getriebene Getherapien:** Expression von zelltoxischen Genen (Selbstmordgenen) unter Kontrolle des TERT-Promotors. Dabei soll ausgenutzt werden, dass der TERT-Promotor nur in Tumorzellen durch spezifische Transkriptionsfaktoren zur Genexpression aktiviert werden kann.

**Inhibition der Telomerase-Expression:** Greifen in die Expression und die Prozessierung der Telomerase zum aktiven Enzym ein.

Zur Zeit werden eine Reihe dieser Ansätze intensiv präklinisch und in Einzelfällen auch klinisch (wie z.B. GRN163L) erforscht und entwickelt. Vielversprechende Ideen scheitern aber oft daran, dass sie klinisch nicht einsetzbar sind, weil dafür eine gute Verträglichkeit und Spezifität gewährleistet sein muss.

Durch *Screening* verschiedener Substanzen versucht man z.B. heute Moleküle zu identifizieren, die theoretische Anforderungen erfüllen und evaluiert deren Nutzen *in vivo* und *in vitro*.

In einem solchen Screening verschiedener „*small molecules*“ an telomerasehaltigen Kernextrakten wurde das Molekül **BIBR1532** (2-[(E)-3naphtalen-2-yl-but-2-enoylamino]-benzeosäure) als sehr vielversprechend erkannt<sup>118</sup>. Die Substanz ist nicht-nukleosidisch und wirkt reversibel als spezifischer Inhibitor der Telomeraseaktivität, während andere Polymerasen erst in sehr hohen Dosen gehemmt werden. Die Behandlung verschiedener Tumorzelllinien mit BIBR1532 führte zu stark verkürzten Telomeren, bis die Zellen schließlich seneszent wurden. Auch konnte in einem Maus-Xenograft-Modell eine Reduktion der Tumorlast nach BIBR1532-Gabe beobachtet werden. Ein weiterer Vorteil dieser Substanz ist die orale Bioverfügbarkeit.

Einen weiteren experimentellen Ansatz stellt die stabile Expression eines **dominant-negativen Allels der Telomerase-Untereinheit hTERT (DNhTERT)** dar<sup>119</sup>. Aufgrund der hohen Effektivität eignet sie sich hervorragend, um Prinzipien und Einflüsse der Inhibition von Telomerase auf Zellen im Sinne eines „*proof of principle*“ *in vitro* zu untersuchen.

In diesem Genprodukt wurden die Aminosäuren Valin und Asparaginsäure gegen Alanin und Isoleucin ausgetauscht, was zu einem katalytisch nicht wirksamen Protein führt. Deshalb hemmt die Überexpression kompetitiv die zellintrinsische katalytische UE hTERT und damit sehr potent die Telomeraseaktivität. Mit dem Einsatz dieses Konstruktes konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Hemmung der Telomeraseaktivität in Tumorzellen Apoptose auslöst<sup>119</sup>.

## 1.5 Fragestellung

Der Einsatz von telomeraseinhibitorischen Strategien in der Tumorthherapie gilt als sehr attraktiv, da das Enzym in 90% der malignen Tumorzellen aktiv und essentiell für die Immortalität der Zellen und damit für das kontinuierliche Teilungsvermögen des Tumors ist. Demgegenüber haben gesunde somatische Zellen keine Telomeraseaktivität. Allerdings müssen gewisse Voraussetzungen gegeben sein, damit telomeraseinhibitorische Strategien sinnvoll eingesetzt werden können. Hierfür ist die CML aus verschiedenen Gründen eine gut charakterisierte Modellerkrankung. Zum einen verläuft die Krankheit in der ersten Phase über mehrere Jahre chronisch und bietet daher ein ausreichendes zeitliches therapeutisches Fenster. Zum anderen sind die Telomere der malignen Zellen in Abhängigkeit der verschiedenen Krankheitsstadien substantiell verkürzt, wobei die Verkürzung kontinuierlich aufgrund der gesteigerten Teilungsrate der BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen zunimmt. Trotzdem ist die Telomeraseaktivität in der CML stadienabhängig von CP zu AP/BC zunehmend erhöht. Da Telomerverkürzung bei gleichzeitiger Telomeraseaktivität möglicherweise die Progression der Krankheit in die akuten Stadien AP/BC fördert, könnte Telomeraseinhibition das Fortschreiten potentiell verhindern. Darüber hinaus führt die aktuell sehr erfolgreich eingesetzte Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren nicht zur Heilung, sondern es liegt die Situation einer minimalen Resterkrankung vor ohne das residuelle BCR-ABL<sup>+</sup> Stammzellen vollständig eliminiert werden. Darüberhinaus ist der molekulare Hintergrund der unterschiedlichen Krankheitsphasen gut charakterisiert. Da diese Aspekte die CML für den Einsatz von Telomeraseinhibitoren prädestinieren, soll in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung unterschiedlicher telomeraseinhibitorischer Strategien auf BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen der Linie K562 evaluiert werden.

In einem Ansatz wird der Einfluss der Hemmung der Telomeraseaktivität durch stabile Integration eines dominant-negativen Allels der katalytischen Untereinheit hTERT (DNhTERT) im Langzeitversuch evaluiert. Darüberhinaus wurde der spezifische Telomeraseinhibitor BIBR1532, der aufgrund von *in vitro* Daten an Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten als sehr vielversprechend für den Einsatz als Therapeutikum angesehen werden kann in BCR-ABL<sup>+</sup> K562 Zellen untersucht.

Die folgenden Fragestellungen sind in der vorliegenden Arbeit adressiert worden:

1. Welche zellbiologischen Konsequenzen hat die Inhibition der Telomerase in BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen?
2. Lässt sich dieses Therapieprinzip auch in den fortgeschrittenen Erkrankungsstadien AP und BC erfolgreich einsetzen?
3. Welche Rolle spielt intaktes p53 in BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen für die Signalgebung dysfunktioneller Telomere?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalie/Reagenz/Puffer	Hersteller
7-AAD	BD Pharmingen
Aceton	J.T.Baker
Acrylamid-Bis, 30 %	Merck
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Sigma
Antifade	Invitrogen
AnnexinV-PE	BD Pharmingen
BIBR1532	Böhringer Ingelheim
Blocking Reagent	Applied Biosystems
Bradfordreagenz	Bio-Rad
BSA	Merck
Bromphenolblau	Roth
CHAPS	GE Healthcare
Chloroform	Sigma
Chloroquin-Diphosphat	Sigma
DAPI	Sigma
DEPC-Wasser	Invitrogen
DMEM+GlutaMAX	Gibco
DMSO	Sigma
DTT	Roth
dNTP Mix	Invitrogen
EDTA	Sigma
Essigsäure (Eisessig)	J.T. Baker
Ethanol (EtOH)	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
FCS	Gibco
Formamid, deionisiert	Sigma
Formamid	Merck
Giemsa	Sigma
Glukose	Sigma
Glycin	Roth
Glycerin	Roth
Hepes-Puffer	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kolzemid Karyomax	Gibco
LB-Agar	Roth
LB-Medium	Roth
LDS751	Molecular Probes
Magermilchpulver	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol (MeOH)	J.T. Baker
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	J.T. Baker
Natriumhydroxid	J.T. Baker
Natriumpyruvat	Gibco
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco
Oligo d(T) Primer	Invitrogen
Paraformdehyd	Sigma

PBS	Lonza
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Pharmalyte	GE Healthcare
Pierce ECL Western Blot Detecting	Thermo
Propanol	Fluka
Propidiumiodid	Sigma
Puromycin	Sigma
Red Taq Ready Mix	Sigma
RNase A	Roth
RNaseOUT	Invitrogen
RPMI1640+GlutaMAX, 25 mM Hepes	Gibco
Salzsäure (HCl)	Merck
SDS	Roth
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT)	Sigma
Taq ManUniversal PCR Master Mix	Roche
TEMED	Amersham
Tris Base	Sigma
Tris-HCl	Sigma
TRIzol	Invitrogen
Trypanblau	Biochrom
TritonX-100	Sigma
0,5 %Trypsin 0,5 + EDTA	Gibco
Trypsin	Sigma
Tween20	Sigma
Urea	Sigma

### 2.1.2 Geräte

Alle nicht gelisteten Geräte und Materialien zählen zur Standard-Laboraausstattung.

Geräte	Hersteller
Densitometer, GS800	Bio-Rad
ELISA-Reader	Tecan
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad
FACSCalibur	Beckman-Coulter
FACSAria	Beckman-Coulter
Gel-Dokumentation, Cabinet Eagle Eye II	Stratagene
Kamera Kompakt Digital	Canon
Mikroskop Zellkultur Axiovert 40C	Zeiss
Mikroskop, Fluoreszenz Axioplan 2	Zeiss
Mikroskop, konfokal LSM 510 META	Zeiss
Millipore Wasserbereiter	Millipore
„Mr. Frosty“	Nalgene
Multi-Pipettor	Eppendorf
Nanodrop, ND 1000	Peqlab
PCR Thermocycler, iCycler	Bio-Rad
Power Supply, PowerPac	Bio-Rad
Röntgengerät Isovolt 320	Rich. Seifert & Co
Spectrophotometer, DU 530	Beckmann
Taqman	Applied biosystem
TransBlot SemiDry	Bio-Rad
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Zentrifuge 5415C	Eppendorf
Materialien	Hersteller
384-Loch-Platte	Nunc
Amersham Hyperfilm™	GE Healthcare
Cryovial	Simpport

Flat cap stripes PCR tube strips	Bio-Rad
Immobilon PVDF Membran	Millipore
ProteanXL Size ExtraThick Blot Paper	Bio-Rad
Shandon Cryoträger	Thermo
Shandon Filter Cards	Thermo
X-Ray Kassette	Rego
Zellkulturflaschen, verschiedene Größen	Sarstedt
Zellkulturschalen und Platten	Sarstedt

### 2.1.3 Kits

Kit	Komponenten	Firma
<u>TRAP</u> „TeloTAGGG Telomerase“ PCR ELISA <sup>PLUS</sup>	Lysis Reagenz 2x Reaktions-Mix Interner Standard (IS) Kontroll-Template, low Kontroll-Template, high H <sub>2</sub> O, nukleasefrei Denaturierungs Reagenz Hybridisierungspuffer T Hybridisierungspuffer IS 10x Waschpuffer Anti-DIG-HRP Konjugatverdünnungspuffer TMB Substrat-Lösung Stop Reagenz Beschichtete Mikrotiterplatte Abdeckfolie	Roche
<u>Reverse Transkription</u> „Superscript II“	<i>5x first strand buffer</i> 0,1 M DTT Superscript II RT	Invitrogen
<u>DNA-Verdau</u> „DNase I“	10x Reaktionspuffer DNase I Stop-Lösung	Sigma
<u>Kalziumphosphat Transfektion</u> “Caphos”	2,5 M Kalziumchlorid 2x HBS H <sub>2</sub> O <sub>steril</sub>	Sigma

### 2.1.4 Zellen

Die Zelllinien K562 und Saos-2 wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellen (DSMZ), die Phoenix-Zellen bei American type culture collection (ATCC) gekauft.

Die Zellen der Linie **K562** entstammen einer 53jährigen Frau und sind während der Blastenkrise aus dem Pleuraerguß entnommen worden. Seit 1970 sind sie in Kultur etabliert. K562 Zellen haben die Translokation t(9;22) und tragen das BCR-ABL b3-a2 Fusionsgen.

**Phoenix** sind ein Derivat der Zelllinie 293T, die ein auf dem MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) basierendes retrovirales Expressionssystem (gag/pol,env) tragen. Es wurden amphotrophe Phoenix Zellen verwendet, welche die Fähigkeit besitzen die meisten sich teilenden Säugetierzellen, auch humane, zu transduzieren ([www.stanford.edu/group/nolan/retroviral\\_systems/phx.html](http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html)).

**Saos-2** Zellen wurden 1973 einem Mädchen (11 Jahre) mit einem Osteosarkom entnommen und als Zelllinie etabliert.

Da diese Zelllinie keine enzymatisch aktive Telomerase besitzt, sondern ALT positiv sind, wurde sie als Negativkontrolle der Telomeraseaktivität verwendet.

### Rinderthymozyten (fixiert)

Zur Herstellung der Zellen wurde frischer Rinder-Thymus zerkleinert und zu einer Einzelzell-Suspension verarbeitet. Nach 10-minütiger Fixierung der Thymozyten in 3,7% Formaldehyd wurden die Zellen zwei mal mit RPMI1640 gewaschen und anschließend als Aliquotes bei -80°C in Einfriermedium eingefroren. Die Telomerlänge der Zellen wurde mittels der Telomer Restriktions Fragment Analyse (TRF) bestimmt und als interner Standard für die Telomerlängenmessungen mit FlowFISH verwendet.

### 2.1.5 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E.coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
<i>E.coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139 Δ(ara-leu)7697 galJ</i> <i>galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

### 2.1.6 Vektoren

Plasmidvektor	Plasmidrückgrat	Insert	Hersteller
pOS-DNhTERT-IRES-GFP	pOS	DNhTERT	publiziert in <sup>120</sup>
pOS-IRES-GFP	pOS		
pBABE-Puro-p53ER	pBABE	p53ER	Clontech
pBAE-Puro-ER	pBABE	ER	

Die pOS-Vektoren wurden freundlicherweise von U. Martens, Heilbronn und die pBABE-Vektoren von T. Littlewood, Cambridge, zur Verfügung gestellt

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die Primer für RT-PCRs wurden mithilfe der Primer3-Software, die Primer/Sonden der qPCR mit der Software Primer Express 2.0 generiert.

- RT-PCR:

Oligo	forward	reverse
TIN2	5`-gggactctcaagagcctgtg-3`	5`- cattcctgaaccctctgaa-3`
RAP1	5`-ggctcgcaaaaagtcatcat-3`	5`-ccaccacaggaaagtccatt-3`
TANK1	5`-tctgacccctccatcatctc-3`	5`-aagtgaagggcgtggaatg-3`
TANK2	5`-caaatgggctttcacacctt-3`	5`-gcttctcacaccattgagca-3`
RAD50	5`-ctggatatgaggagacgat-3`	5`-ccagaagctggaagtacgc-3`
NBS1	5`-ttggttgcagctcttcttg-3`	5`- ggctgcttctggactcaac-3`
MRE11	5`-cccagaggagcttgactgac-3`	5`-ttcatttctgggcaagtc-3`
POT1	5`-ccttacgtgttggcatct-3`	5`-ttttagccgatggatgta-3`
PINX1	5`-agaacgaaaccacgacaacc-3`	5`-ggccttaggctggaggaac-3`
Ku86	5`-ccccaattcagcagcatatt-3`	5`-ccttcagccagactggagac-3`
p53ER	5`-gttccgagagctgaatgagg-3`	5`-atagatcatggcggttcag-3`
RPLP0	5`- ttgtttcaccaaggaggac-3`	5`-gactcttctggcttcaac-3`
GAPDH	5`-tgcaccaccaactgctta-3`	5`-gatgcagggatgatgttc-3`

- qPCR (*Realtime*):

Oligo	Sequenz und Fluochrom
DNhTERT-IRES for	5`-ttcaagaccatcctggactgagt-3`
DNhTERT-IRES rev	5`-ctggcggccgttactagt-3`
DNhTERT-IRES sonde	5`FAM-cgttgagcggccaattcagtgga-3`BHQ1
GAPDH for	5`-agggctgctttaactctggtaa-3`
GAPDH rev	5`-catgggtggaatcatattggaac-3`
GAPDH Sonde	5`FAM-tgttgccatcaatgacccttcattg-3`BHQ1

### 2.1.8 Medien, Puffer, Lösungen

Wenn nicht anders angegeben wurde H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> zum Ansetzen verwendet und die Lösungen bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

#### Zellkultur

##### **Kulturmedium RPMI**

RPMI1640 Basalmedium  
 10% FBS  
 1 mM Nicht-essentielle Aminosäuren  
 1 mM Natriumpyruvat  
 50 U Penicillin/ 50 µg/ml Streptomycin  
 Lagerung bei 4°C

<b>Kulturmedium DMEM</b>	500 ml DMEM Basalmedium 10% FBS 50 U Penicillin/ 50 µg/ml Streptomycin Lagerung bei 4°C
<b>Kryomedium</b>	FBS 10% DMSO Lagerung bei 4°C
<b>BIBR1532 Stammlösung</b>	100 mM in DMSO Lagerung bei -20°C
<b>BIBR1532 Gebrauchslösung</b>	1 mM in RPMI1640 Basalmedium Lagerung bis zu 1 Woche bei 4°C
<u>Proliferationsversuche</u>	
<b>Trypanblau 4-OHT-Lösung</b>	Trypanblau 1:5 in PBS 10 mg/ml MeOH
<u>Telomerlängenbestimmung</u>	
<b>Aufnahmepuffer</b>	0,1% BSA 10 mM Hepes-Puffer 5% Glukose ad x ml Lagerung bei 4°C
<b>Hybmix unst und tel</b>	20 mM Tris-Base 20 mM NaCl 1% BSA 75% Deionisiertes Formamid 0,3 µg/ml Telo-PNA-FITC (nur in tel) H <sub>2</sub> O ad x ml frisch ansetzen
<b>Waschpuffer 1</b>	75% Formamid 20 mM Tris-Base 1% BSA 1% Tween20 H <sub>2</sub> O ad x ml frisch ansetzen
<b>Waschpuffer 2</b>	1% BSA 1% Tween20 10 mM Hepes 5% Glukose ad x ml frisch ansetzen
<b>LDS-Lösung</b>	0,1 µg/ml LDS751 10 µg/ml RNaseA 0,1% BSA PBS ad x ml frisch ansetzen
<u>Detektion von APBs (ALT)</u>	
<b>Hybridisierungslösung</b>	70% Formamid 0,3 µg/ml Telo-PNA-Cy3 0,5% Blocking Reagent 10mM Tris-HCL, pH7,5 frisch ansetzen

<b>Waschlösung</b>	70% Formamid 10mM Tris-HCL, pH 7,5 0,1% BSA Lagerung bei 4°C
 <u>Molekularbiologie</u>	
<b>50x TAE</b>	242 g Tris-Base 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
 <u>Bakterien Arbeiten</u>	
<b>LB-(Luria-Bertani)-Ampicillin-Medium</b>	LB-Medium 50 µg/ml Ampicillin frisch ansetzen
<b>LB-Ampicillin-Platten</b>	LB-Agar 50 µg/ml Ampicillin Lagerung bei 4°C
<b>Sol I</b>	50 mM Glukose 25 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 Lagerung bei 4°C
<b>Sol II</b>	0,2 N NaOH 0,5% SDS frisch ansetzen
<b>Sol III</b>	25% 5M KAc 15% HCl H <sub>2</sub> O ad x ml Lagerung bei 4°C
<b>TE-Puffer</b>	0,1 mM EDTA 10 mM Tris pH 7,5 H <sub>2</sub> O ad x ml
 <u>Proteinbiochemie</u>	
<b>9M Urea-Puffer</b>	9 M Urea 4% CHAPS 1 %Pharmalyte 1% DTT 10 µg/ml Bromphenolblau H <sub>2</sub> O ad x ml Lagerung bei -80°C
<b>0,5 M Tris, pH 6,8</b>	6 g Tris-Base 60 ml H <sub>2</sub> O pH auf 6,8 einstellen H <sub>2</sub> O ad 100 ml
<b>1,5 M Tris-HCl, pH 8,8</b>	27,23 g Tris-Base 80 ml H <sub>2</sub> O pH auf 8,8 einstellen H <sub>2</sub> O ad 100 ml

<b>5x SDS-Laufpuffer</b>	360 g Glycin 75 g Tris-Base 25 g SDS H <sub>2</sub> O ad 5000 ml
<b>5x Ladepuffer</b>	15 % β-Mercaptoethanol 15% SDS 1,5% Bromphenolblau 50% Glycerin H <sub>2</sub> O ad x ml Lagerung bei -20°C
<b>Semi-Dry Blottingpuffer</b>	5,82 g Tris-Base 2,93 g Glycin 1,90 ml 20% SDS 200 ml MeOH H <sub>2</sub> O ad 1000 ml Lagerung bei 4°C
<u>Stabile Integration</u>	
<b>Transfektionsmedium</b>	DMEM mit Glutamin 10 % FBS 1 % Natriumpyruvat 50 U Penicillin/ 50 µg/ml Streptomycin 20 mM Hepes Lagerung bei 4°C
<b>100 mM Chloroquin</b>	0,516 g Chloroquin Diphosphat PBS ad 10 ml filtrieren mit 0,2 µm Poren Lagerung bei -20°C
<u>Zellzyklus und Apoptose</u>	
<b>PI-Lösung</b>	10 µg/ml Propidiumiodid (PI) 100 µg/ml RNase A PBS ad x ml
<b>Inkubationspuffer</b>	0,5% BSA PBS ad x ml
<u>Chromosomale Instabilität</u>	
<b>Fixativ</b>	MeOH/Eisessig (3:1) frisch ansetzen
<b>Giensa-Lösung</b>	5% Giensa-Konzentrat H <sub>2</sub> O ad x ml filtrieren, frisch ansetzen
<b>Trypsin-Lösung</b>	0,015 g Trypsin PBS ad 100 ml Lagerung bis zu 1 Woche bei 4°C
<u>DNA-Reparatur</u>	
<b>Permeabilisierungslösung</b>	0,2% Triton X-100 1% BSA PBS ad x ml frischen ansetzen

<b>Tween20-BSA-Lösung</b>	0,5% Tween20 1% BSA PBS ad x ml frisch ansetzen
<b>Tween20-PBS-Lösung</b>	0,5% Tween20 PBS ad x ml frisch ansetzen
<b>DAPI-Antifade-Lösung</b>	0,1 µg DAPI/ 1 ml Antifade

### 2.1.9 Antikörper und Sonden

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Sonde Telo-PNA-FITC	Panagene
Sonde Telo-PNA-Cy3	Panagene
p21, clone 12D1	Cell Signaling
Anti-rabbit-HRP-linked	Cell Signaling
GAPDH, clone MAB374	Chemicon International
Anti-mouse-Ig, HRP-linked	Cell Signaling
PML Santa Cruz sc-966 mouse monoclonal α PML	Santa Cruz
Alexa donkey anti-mouse Cy5	Santa Cruz
Phospho Histon H2AX (Ser139)	Upstate
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes

### 2.1.10 Protein und Nukleotid Leitern

<u>Leiter</u>	<u>Hersteller</u>
Rainbow-Marker (Protein-Standard)	GE Healthcare
SmartLadder SF (DNA Standard)	Eurogenetech
SmartLadder (DNA Standard)	Eurogenetech

## 2.2 Methoden

Puffer, Lösungen und Medien sind im Abschnitt 2.1 gelistet. Wenn nicht anders angegeben wurde H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> zur Herstellung verwendet.

### 2.2.1 Zellkultur

Alle Puffer, Lösungen und Plastikmaterial wurden steril verwendet. Die Zellen wurden in regelmäßigem Abstand (ca. 8 Wochen) auf Mycoplasmen getestet und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Um die Zellen zu pelletieren wurden sie mit 450g für 5 min zentrifugiert. Die Kulturmedien wurden, bevor sie mit den Zellen in Berührung kamen, auf 37°C erwärmt.

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

##### Puffer, Lösungen und Material

- Zelllinien: K562, Phoenix, Saos-2
- Kulturmedien RPMI (K562) bzw. DMEM (Phoenix-Zellen, Saos-2)
- Trypsin/EDTA
- Zellkulturmikroskop

Die Zellen wurden in herkömmlichen Zellkulturflaschen oder -schalen kultiviert, wobei das Medium jeden zweiten bzw. dritten Tag gewechselt wurde. K562 Zellen (Suspension) wurden hierfür zentrifugiert und in frischem Kulturmedium (Zelldichte ca.  $1 \times 10^5$  Zellen/ml) ausgesät. Die adhärenenten Zelllinien (Phoenix, Saos-2) wurden mit Trypsin/EDTA vorsichtig abgelöst, mit Kulturmedium abgewaschen, zentrifugiert und ausgesät. Bei Konfluenz des Zellrasens wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 gesplittet.

#### 2.2.1.2 Einfrieren von Zellen

##### Puffer, Lösungen und Material

- Kryoröhrchen
- „Mister Frosty“
- Kryomedium
- Zellen

Für die Kryokonservierung der Zelllinien wurde die Zellsuspension zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml wurden in Kryomedium aufgenommen und 1 ml der Zellsuspension pro Kryoröhrchen im „Mr. Frosty“ bei -80°C eingefroren. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen innerhalb einer Woche in die Gasphase von flüssigem Stickstoff überführt.

### 2.2.1.3 Auftauen von Zellen

#### Puffer, Lösungen und Material

- Kulturmedium der jeweiligen Zelllinie
- Kryokonserven der Zellen
- Zellkulturflaschen

Es wurden in einem 15 ml-Röhrchen 8 ml vorgewärmtes Kulturmedium vorgelegt und die Zellen im Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut bis nur noch ein erbsengroßer Rest gefroren war. Dann wurde tröpfchenweise 1 ml angewärmtes Kulturmedium zu den Zellen gegeben und die Suspension tröpfchenweise in die vorgelegten 8 ml Kulturmedium überführt. Durch Zentrifugation wurde das DMSO-haltige Kryomedium entfernt und die Zellen in frischem Kulturmedium ausgesät.

### 2.2.1.4 Kultivierung von K562 mit der Substanz BIBR1532

#### Puffer, Lösungen und Material

- BIBR1532-Gebrauchslösung [1 mM]
- K562 Zellen

Der Telomeraseinhibitor BIBR1532 wurde dem Kulturmedium in einer Konzentration von 10 µM zugegeben. Die Zugabe von BIBR1532 erfolgte bei jedem Mediumwechsel (alle 2-3 Tage).

## 2.2.2 Proliferationsversuche

### 2.2.2.1 Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung mit Trypanblau

Der Anteil lebender Zellen wurde durch Färbung der Zellen mit dem Vitalitätsfarbstoff Trypanblau von den toten Zellen abgegrenzt, da Trypanblau in Zellen mit intakter Zellmembran nicht eindringen kann. Tote Zellen hingegen wurden blau angefärbt.

#### Puffer, Lösungen und Material

- K562-Zellen in Kultur
- Trypanblau (1:5 in PBS)
- Neubauerzählkammer
- Zellkulturmikroskop

Zur Viabilitätsbestimmung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 40 µl Trypanblau verdünnt (Verhältnis 1:5). Die Zellzählung erfolgte mit der Neubauerzählkammer. Es wurden immer vier Kleinquadrate ausgezählt und das arithmetische Mittel daraus berechnet. Zur Bestimmung des Zelltiters (Zellen/ml) bzw. der Gesamtzellzahl muss der Kammerfaktor der Neubauerzählkammer [ $10^4$ ] einberechnet werden:

Zelltiter: *Arithmetisches Mittel x Verdünnung Trypanblau  $\times 10^4$*

Gesamtzellzahl: *Zelltiter x Volumen gezählter Zellsuspension*

### Proliferationsbestimmung der DNhTERT-Klone (Langzeitproliferation)

Die Wachstumskinetik der DNhTERT exprimierenden K562 Zellklone und der Leervektorkontrollklone wurde mittels eines Proliferationsassays über einen Zeitraum von 90 Tagen überprüft. Hierfür wurden im Abstand von 2-3 Tagen  $1 \times 10^6$  Zellen/20 ml Medium ausgesät und die Populationsverdopplung der Kultur durch Ermittlung der Zellzahl mit Trypanblau bestimmt. Zur Berechnung der Populationsverdopplungen (PD) wurde folgende Formel herangezogen:

$$PD = [\text{LOG}(\text{Zellzahl})/\text{LOG}(2)] - [\text{LOG}(\text{Ausgangszellzahl (hier } 1 \times 10^6\text{)})/\text{LOG}(2)]$$

### Bestimmung der Proliferation unter 4-OHT (Kurzzeitproliferation)

#### **Puffer, Lösungen und Material**

- K562 Klone (DN4, DN7, C1)
- 4-OHT- Lösung [10 mg/ml]

Die 4-OHT-Lösung wurde für den Kurzzeitproliferationsversuch über 20 Tage in einer Konzentration von  $1,5 \mu\text{M}$  zu pBABE-p53ER exprimierenden Zellen und den Leervektorkontrollzellen gegeben. Beginnend mit Tag 0 wurde an jedem vierten Tag die Zellzahl mittels Trypanblau bestimmt und  $1,0 \times 10^5$  Zellen/5 ml in frischem Kulturmedium ausgesät. Die Bestimmungen wurden in Triplikaten durchgeführt, zur Kontrolle wurden die Zellen unter identischen Bedingungen mit dem Lösungsmittel Methanol (MeOH) behandelt.

## **2.2.3 Telomerlängenbestimmung, Telomeraseaktivität und ALT**

### **2.2.3.1 Bestimmung der Telomerlänge (FlowFISH)**

Die mittlere Telomerlänge der Zellen wurde mit der FlowFISH-Methode bestimmt. Das Prinzip dieser Methode ist die Hybridisierung einer Telomersequenz-komplementären PNA-Sonde  $(\text{CCCTAA})_3$ , die mit dem Fluoreszenzfarbstoff (FITC) gekoppelt ist, an die Telomere der Zellen. Die Stärke des Fluoreszenzsignals der Sonde ist dabei proportional zur Länge der telomerischen DNA. Da Zellen eine Eigenfluoreszenz besitzen wurden die identischen Zellen ohne Sonde gemessen und deren Signal subtrahiert.

Die Messung erfolgte an Interphase-Zellen, wobei die 2N-Population von der 4N-Population durch zusätzliche Färbung mit dem DNA-Farbstoff LDS751 abgegrenzt wurde. Zur Messung der Telomerlänge wurden nur Zellen mit 2N DNA-Gehalt einbezogen. Die Messung erfolgte dann mittels FACS, wobei das Fluoreszenzsignal von FITC in Fluoreszenzeinheiten (kMESF) innerhalb der 2N-Population ermittelt wurde.

Zur Bestimmung der absoluten mittleren Telomerlänge einer Zellpopulation wurde in jedem Reaktionsgefäß eine interne Kontrolle bestehend aus Rinderthymozyten mitgeführt. Diese eignen sich, da ihre Population im FACS gegen die meisten humanen und murinen Zellen aufgrund anderer Größe und Granularität klar abgrenzbar ist. Die Telomerlänge der Kontrollzellen wurde zuvor mit einer unabhängigen Methode der Telomerlängenbestimmung (Telomer Restriktions Fragment (TRF)) gemessen und lag hier bei 19,515 kb.

Setzt man das Fluoreszenzsignal dieser Kontrollpopulation mit dem der Zellen ins Verhältnis, kann die absolute mittlere Telomerlänge ermittelt werden.

#### **Puffer, Lösungen und Material**

- |                             |                        |
|-----------------------------|------------------------|
| - K562 Zellen               | - Hybmix, tel und unst |
| - Aufnahmepuffer            | - Waschpuffer1 und 2   |
| - Auftaumedium              | - FACSCalibur          |
| - Rinderthymozyten, fixiert | - LDS-Lösung           |

#### Vorbereitung der Zellen

K562 Zellen wurden geerntet und in Aufnahmepuffer resuspendiert. Die kryokonservierten fixierten Rinderthymozyten wurden wie viable Zellen aufgetaut, und ebenfalls in Aufnahmepuffer aufgenommen. Nach der Zellzählung wurden jeweils  $2 \times 10^5$  K562 Zellen und  $1 \times 10^5$  Rinderthymozyten pro Ansatz eingesetzt. Da alle Messungen in Triplikaten durchgeführt wurden, wurden immer drei Proben mit Sonde (= „tel“ für Telomere) und drei ohne Sonde (= „unst“ für nicht gefärbt) in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen vorbereitet.

#### Hybridisierung der PNA-FITC-Sonde

Die Zellen wurden 30 sek bei 20 000g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 300  $\mu$ l (= 100  $\mu$ l/ $1 \times 10^5$ ) Hybmix „tel“ bzw. „unst“ durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Dieser Mix enthält sowohl deionisiertes Formamid als auch die Sonde (nur in „tel“). Die DNA Denaturierung erfolgte im Wasserbad für exakt 15 min bei 87°C und zur Sonden-Hybridisierung wurden die Proben 1,5 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Zum Entfernen der überschüssigen Sonde wurden die Proben 4x mit 1 ml Waschpuffer1 gewaschen, wobei der Puffer im ersten Waschschrift ohne vorheriges Entfernen des Hybmixes zugegeben wurde. Nach Zugabe des Waschpuffers wurden die Zellen kräftig resuspendiert. Die Zentrifugation während der Waschungen erfolgte mit 2000g für 5 min bei 4°C. Der Überstand wurde bei den ersten drei Waschungen bis auf ca. 100  $\mu$ l abgesaugt und beim vierten Waschschrift bis auf ca. 80  $\mu$ l. Diesen Schritten folgte eine fünfte Waschung mit 1 ml Waschpuffer 2. Daraufhin erfolgte ein Zentrifugationsschritt mit 900g für 10 min bei 4°C und der Überstand wurde bis auf ca. 50  $\mu$ l abgesaugt.

Wenn die durchflusszytometrische Messung am folgenden Tag durchgeführt wurde, lagerten die Proben im Waschpuffer<sup>2</sup> über Nacht im Kühlschrank, erfolgte die Messung sofort, wurde direkt im Anschluss die DNA der Zellen gefärbt.

#### Färbung der DNA mit LDS751

Für die DNA-Markierung wurden die Zellen in 300 µl LDS-Lösung resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Bis zur Messung wurden die Proben auf Eis im Dunkeln gehalten.

#### Messung am Durchflusszytometer und Berechnung der absoluten Telomerlänge

Die Fluoreszenz von LDS571 erfolgte im FI3-Kanal des FACSCalibur, die Fluoreszenz von FITC wurde im FI1 ermittelt.

Die absolute mittlere Telomerlänge (TL) berechnete sich wie folgt:

$$TL [kb] = \frac{K562 \text{ „tel“} - K562 \text{ „unst“}}{Thy \text{ „tel“} - Thy \text{ „unst“}} \times 19,515 \text{ kb (= TL Thymozyten)}$$

### **2.2.3.2 Bestimmung der Telomeraseaktivität (TRAP)**

Das „*Telomerase Repeat Amplification Protocol*“ (TRAP) bietet die Möglichkeit die Aktivität des Enzyms Telomerase über das Anfügen von Telomerwiederholungen (TTAGGG) zu messen und diese relativ auszudrücken.

Es wurde das Kit „Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>Plus</sup> Assay“ von Roche verwendet. Im ersten Schritt wurden hierbei durch die Telomerase Telomer-Repeats an einen Primer addiert. Dieses Elongationsprodukt wurde über PCR amplifiziert und im zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte über einen ELISA detektiert und quantifiziert.

#### **Puffer, Lösungen und Material**

- K562 und Saos-2 Zellen
- Kit „Telo TAGGG Telomerase PCR ELISAPlus Assay“
- Thermocycler (PCR)
- ELISA-Reader

Die Bestimmung der Telomeraseaktivität erfolgte analog den Angaben des Herstellers. Als Kontrolle wurde die Telomeraseaktivität telomerasenegativen Saos-2 Zellen bestimmt.

#### **Aufarbeitung des Probenmaterials**

Ein Pellet aus  $2 \times 10^5$  Zellen wurde in 200 µl Lysepuffer resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und mit 20 000g bei 4°C für 20 min zentrifugiert. 175 µl des Überstandes wurden in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt weiterverwendet oder bei –80°C gelagert.

Elongation und Amplifikation über PCR

Die Elongation des Primer P1-TS-Biotin durch das Enzym Telomerase und die Amplifikation der Produkte wurden in einem PCR-Lauf durchgeführt. Jeder Ansatz hatte ein Volumen von 50 µl und folgende Zusammensetzung:

<u>Reagenz</u>	<u>Inhalt</u>	<u>Volumen</u>
Reaktions-Mix	Telomerase-Substrat (Primer P1-TS-Biotin), Anker Primer (P2), Taq-DNA-Polymerase, Nukleotide	25 µl
IS	Interner Standard, 216 bp	5 µl
H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)		17,5 µl
Zelllysat		2,5 µl

Von jeder Probe wurde eine Negativkontrolle durch 10 min Denaturierung des Proteins bei 85°C hergestellt. Außerdem lief je ein Ansatz mit 1 µl Kontroll-Template low bzw. high mit, der entweder 0,001 mol/µl oder 0,1 mol/µl einer 8 Telomerwiederholungen langen Kontroll-DNA enthielt. Zu diesen beiden Reaktionsgefäßen wurde noch 1,5 µl Lysepuffer und ein weiterer Ansatz, der nur Lysepuffer (2,5 µl) enthielt, pipettiert.

Es galten folgende Bedingungen:

	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen</u>
Elongation Primer P1-TS-Biotin	25°C	20 min	1
Amplifikation :			
Denaturierung	94°C	30 sek	25
Annealing	50°C	30 sek	25
Elongation	72°C	90 sek	25
Finale Elongation	72°C	10 min	1
Hold	4°C	∞	

Detektion

Für jede Probe wurden 2 Reaktionsgefäße mit 10 µl Denaturierungsreagenz (0,5% NaOH) vorbereitet und mit je 2,5 µl des Amplifikationsproduktes versetzt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde ein Reaktionsgefäß mit 100 µl Hybridisierungspuffer T (Detektions-Probe zum Telomerase-Amplifikationsprodukt) und das andere Tube mit 100 µl Hybridisierungspuffer IS (Detektions-Probe zum IS) versetzt und die Ansätze kräftig gemischt. Die Zubereitung der Negativkontrollen erfolgte auf die gleiche Weise mit Hybridisierungspuffer T. Nach Überführung von je 100 µl der einzelnen Ansätze auf eine Streptavidin-markierte Mikrotiterplatte inkubierten die Ansätze für 2 h bei 37°C unter ständigem Schütteln von 300 U/min. Danach wurde der Hybridisierungsmix

vollständig entfernt und jede Vertiefung 3x mit 250 µl 1xWaschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 100 µl einer Anti-DIG-HRP-Lösung hinzugegeben und für 30 min bei RT unter Schütteln (300 U/min) inkubiert. Die belegten Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden anschließend 5x mit 1xWaschpuffer gewaschen und die Ansätze dann mit je 100 µl TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Substrat 15 min bei RT unter Schütteln (300 U/min) inkubiert. Ohne Entfernung des Substrats wurden 100 µl Stoppreagenz (5% Schwefelsäure) zugegeben. Dies sorgt für einen Farbumschlag von blau zu gelb.

Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm am ELISA-Reader innerhalb von 30 min.

#### Auswertung

Negativkontrollen: Nur Kontrollen, deren Absorption unter 0,1 lag, gingen in die Berechnung ein, da sonst die Telomeraseinaktivierung nicht erfolgreich war.

Berechnung Kontroll-Template: 
$$\frac{(Absorption\ Kontroll\ Template - Absorption\ Lysepuffer)}{Absorption\ des\ Internen\ Standards\ (IS)\ des\ Kontroll\ Templates}$$

Der Quotient muss zwischen 0,2 und 0,5 (low) bzw. 2,0 und 4,0 (high) liegen.

Es wurde immer das Kontroll-Template „high“ für die Auswertung verwendet, da relativ hohe Telomeraseaktivitäten detektiert wurden.

Berechnung der relativen Telomeraseaktivität (RTA):

$$RTA = \frac{(A_{Probe} - A_{Negativ-Kontrolle}) / A_{Interner\ Standard\ der\ Probe}}{(A_{Kontroll-Template} - A_{Lysepuffer}) / A_{Interner\ Standard\ der\ Kontrolle}} \times 100$$

#### **2.2.3.3 Detektion von APBs**

Zellen, die ihre Telomerlänge über den ALT-Mechanismus (*alternative lengthening of telomeres*) aufrecht erhalten bilden APBs (ALT-associated PML bodies), in denen Komponenten der Telomere mit dem Protein PML assoziieren. Der Nachweis dieser Strukturen dient als Marker für ALT und wurde hier über die Co-Lokalisation von telomerischer DNA und PML nachgewiesen. Die ALT-positive Zelllinie Saos-2 wurde als Positivkontrolle verwendet.

#### **Puffer, Lösungen und Material**

- |  |                               |
|--|-------------------------------|
| - Zellen (K562 Klone DN4, DN6, DN7 Saos-2) | - Waschlösung                 |
| - Objektträger                             | - 0,1% PBS-T                  |
| - Deckgläschen                             | - PML-Antikörper              |
| - MeOH/Aceton (1:2)                        | - Alexa donkey anti-mouse Cy5 |
| - PBS                                      | - 0,1 µg/ml DAPI              |
| - Hybridisierungslösung                    | - Mowiol                      |
| - Wärmeblock                               | - Konfokales Lasermikroskop   |

Ca.  $1 \times 10^4$  viable Zellen in einem Volumen von 200  $\mu$ l PBS wurden durch einen Zytospin auf Objektträger gebracht und 1x mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit MeOH/Aceton (1:2) für 10 min, nach 1 min auf Eis wurden die Zellen an der Luft getrocknet. Danach wurden 50  $\mu$ l Hybridisierungslösung (enthält die telomerkomplementäre Cy3-gelinkte PNA-Sonde) auf die Zellen gegeben und mit einem Deckgläschen vorsichtig gedeckelt. Die Denaturierung der DNA erfolgte für 4 min bei 83°C auf einem Wärmeblock, die anschließende Hybridisierung für 2 h bei 37°C im Dunkeln in einer feuchten Kammer. Es folgten zwei Waschschriffe von 15 min mit Waschlösung und danach noch drei Waschschriffe mit 0,1% PBS-T für 1 min. Diesen Schritten schloss sich die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen PML (1:100 in PBS) für 1 h bei RT an. Die überschüssige Lösung wurde durch 3x Waschen mit 0,1% PBS-T entfernt und die Zellen mit dem Cy5-markierten Sekundärantikörper (1:500 in PBS) sowie DAPI (1:1000) für 30 min bei RT inkubiert. Nach drei Waschschriffen mit 0,1% PBS-T wurden die Zellen mit Mowiol eingebettet und die Fluoreszenz der Färbung mit einem konfokalen Lasermikroskop analysiert und dokumentiert.

Die Färbung wurde in der Abteilung Allgemeine Virologie, HPI Hamburg von Hüseyin Sirma durchgeführt.

#### **2.2.4 Molekularbiologie**

Für alle PCRs wurde, wenn nicht anders angegeben, cDNA als Template verwendet. Diese wurde durch eine Reverse Transkriptase (RT) unter Zuhilfenahme von Oligo d(T)-Primern aus Gesamtzell-RNA hergestellt. Auch die für die Hybridisierung Chips („Dual chip<sup>®</sup> human DNA damage and repair, Fa. Eppendorf“) verwendete cDNA wurde auf diese Weise hergestellt. Die Hybridisierung der Chips und deren Quantifizierung wurde von der Firma Eppendorf durchgeführt.

##### **2.2.4.1 Isolierung von RNA**

###### **Puffer, Lösungen und Material**

- |               |                         |
|---------------|-------------------------|
| - PBS         | - 70% EtOH              |
| - TRIzol      | - DEPC-H <sub>2</sub> O |
| - Chloroform  | - DNase-Kit             |
| - Isopropanol | - Nanodrop              |

Ca.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden 2x mit 1 ml PBS gewaschen, in 1 ml TRIzol homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert (nach diesem Schritt war es möglich die Lösung bei -80°C zu lagern). Danach erfolgte die Zugabe von 200  $\mu$ l Chloroform und die Reaktionsgefäße wurden für 15 sek geschüttelt. Um die Phasentrennung zu erreichen wurde die Lösung 15 min bei 15 000g und 4°C zentrifugiert. Die RNA-Phase (wässrig,

farblos) wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µl Isopropanol um die RNA zu präzipitieren. Nach einer Inkubation für 10 min bei RT ist die Lösung für 15 min bei 15 000g und 4°C zentrifugiert worden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2x in 1 ml 70% EtOH gewaschen. Die Zentrifugation zwischen den Waschschritten erfolgte dabei für 10 min bei 15 000g und 4°C. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Pellet an der Luft getrocknet bis die Farbe von weiß zu farblos wechselte. Das Pellet wurde dann in 16 µl DEPC-Wasser aufgenommen und zum Lösen für 10 min bei 55°C inkubiert.

Um Kontamination mit DNA vorzubeugen wurde die Lösung mit DNase behandelt. Hierfür wurden zu den 16 µl RNA-Lösung 2 µl 10x Reaktionspuffer und 2 µl DNase gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Um die Enzymaktivität zu beenden wurden anschließend 2 µl Stop-Solution (= 50 mM EDTA) hinzugegeben und 10 min bei 70°C inkubiert.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 2 µl der Lösung photometrisch (Nanodrop) bei 260 nm gemessen.

#### 2.2.4.2 RT- PCR

##### **Puffer, Lösungen und Material**

-dNTPs	- REDTaqReadyMix
-DEPC-H <sub>2</sub> O	- Spez. Primer
-Superscript II –Kit	- 1x TAE
-RNaseOUT	- Ethidiumbromid
-DTT	- Thermocycler (PCR)
-Heizblock	- Gelkammern, horizontal

##### RT-Reaktion

Die Synthese der cDNA wurde immer in einem Endvolumen von 20 µL durchgeführt. Im 1.Schritt wurde 1 µg RNA mit einem 1 µl Oligo(dT)-Primer (= 500µg/ml), 1 µl dNTPs (=10 mM/Nukleotid) gemischt und die Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt. Um Sekundärstrukturen der RNA zu eliminieren wurde diese Lösung dann 5 min bei 65°C erhitzt, danach direkt auf Eis inkubiert und 4 µl First strand buffer (5x) und 2 µl DTT (=0,1 M) sowie 1 µl RNaseOUT (=40 u) hinzugegeben. Der Ansatz wurde leicht mit der Pipette gemischt und 2 min auf 42°C temperiert. Anschließend wurde 1 µl (=200 u) der Reversen Transkriptase (SuperScript II) hinzugegeben. Die Umschreibung erfolgte 50 min bei 42°C im Heizblock. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte 15 min bei 70°C. Wenn nicht anders angegeben wurde 1 µl cDNA pro PCR verwendet (= 50 ng).

Da die PCRs z.T. nicht mit exonübergreifenden Primern durchgeführt wurden, wurde zur Kontrolle die cDNA-Herstellung wie im vorherigen Absatz beschrieben durchgeführt, jedoch ohne Zugabe von Reverser Trankriptase. Ein eventuelles Produkt in der PCR wäre somit von genomischer DNA amplifiziert worden.

## PCR

Die PCRs wurden wie folgt angesetzt und mit nachfolgendem Programm durchgeführt:

REDTaq ReadyMix	12,5 µl
cDNA	1 µl
Primermix f+r (10pmol je Primer)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	5 min	1
Denaturierung	94°C`	1 min	25-30
Annealing	primerabh.	30 sek	25-30
Elongation	72°C	1 min	25-30
Finale Elongation	72°C	5 min	1
Hold	4°C	∞	

## Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden über Agarosegele in einem elektrischen Feld nach Größe aufgetrennt und durch den interkalierenden DNA-Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Es wurden Gele mit einem Agaroseanteil von 1% und 10 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Als Laufpuffer diente TAE (1x). Die PCR-Produkte konnten ohne erneute Zusätze aufgetragen werden, da der verwendete REDTaqReadyMix Auftragspuffer enthält. Die Auftrennung wurde bei 100V durchgeführt und die Gele zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert.

### **2.2.4.3 qPCR zur Detektion der DNhTERT-mRNA**

Die Expression des Transgens DNhTERT wurde durch eine *Real-time*- oder auch quantitative PCR (qPCR) ermittelt. Die Primer hierfür wurden so gewählt, dass der *forward*-Primer komplementär zur DNhTERT-Sequenz und der *reverse*-Primer zur IRES-Sequenz ist, welche DNhTERT mit GFP verbindet. Da sich die Sequenz von DNhTERT zu hTERT nur über zwei Mutationen unterscheidet, wäre die DNhTERT-mRNA sonst nicht von der intrinsischen hTERT-Sequenz zu unterscheiden.

Zur Detektion der Amplifikationsprodukte wurde eine fluoreszenzmarkierte Sonde verwendet, die in der Mitte der Produktsequenz bindet. Die relative Expression von DNhTERT wurde im Verhältnis zur Expression des Gens der GAPDH dargestellt.

Des weiteren wurde die cDNA des Klons C1, der mit dem korrespondierenden Leervektor transduziert ist, als Negativkontrolle verwendet. Außerdem wurde zusätzlich immer eine Negativkontrolle ohne Template für jede Primerpaarung mitgeföhren und die Reaktionen in einem Volumen von 10 µl durchgeführt.

**Puffer, Lösungen und Material**

- 384-Loch-Platten
- cDNA/Plasmid-DNA
- Primer DNhTERT, Sonde
- Primer GAPDH,
- Taqman-Mix (2x)
- SYBRGreen Mastermix (2x)

**Primeroptimierung:**

Zur Ermittlung der optimalen Primermenge wurden beide Primer in den Konzentrationen 50, 300 und 900 nM in allen möglichen Kombinationen miteinander getestet. Als Template der PCR dienten hier 0,01 ng DNA des Vektors pOSDNhTERT-IRES-GFP. Diese PCR wurde mit dem Farbstoff SYBRGreen durchgeführt. Jeder Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

SYBRGreenMM (2x)	5 µl
Primer (for)	1 µl
Primer (rev)	1 µl
Template	1 µl
H <sub>2</sub> O	2 µl

Diese und alle weiteren qPCRs wurden mit folgendem Programm durchgeführt:

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1
Cycling	95°C	10 sek	40
	60°C	1min	40
Hold	4°C	∞	

Die Optimierungs-PCR ergab die beste Effizienz bei einer Konzentration von *forward*- und auch *reverse*-Primer von 300nM. Auch die Sonde wurde bei den folgenden PCRs mit einer Konzentration von 300 nM eingesetzt. Die GAPDH-Primer und die spezifische Sonde sind ebenfalls mit einer Konzentration von 300 nM eingesetzt worden.

**Ermittlung der PCR-Effizienz:**

In der Theorie wird angenommen, dass sich bei einer PCR die Template-Menge mit jedem Zyklus verdoppelt, also gilt:  $n^2$ . Dies trifft für die meisten Primerpaarungen in der Praxis nicht zu. Um Reaktionen mit unterschiedlichen Primerpaarungen miteinander vergleichen zu können oder die absolute Teilchenmenge eines PCR-Produktes zu bestimmen ist es wichtig, die genaue Effizienz der Reaktion zu kennen.

Durch Verdünnung der Template-Menge wurden hier die Effizienzen für die PCR der Primerpaarung DNhTERT und GAPDH bestimmt. Zur Ermittlung der Effizienz wurde die Steigung der Gerade, welche man erhält, wenn der log der DNA-Menge gegen den c(t)-WERT der Reaktion aufgetragen wird.

Folgende Template-Mengen wurden verwendet: 50; 25; 10; 5; 2,5; 0,5 0 ng und jeder Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Sonde	1 µl
Primer (for)	1 µl
Primer (rev)	1 µl
Template	1 µl
Taqman-Mix (2x)	5 µl
H <sub>2</sub> O	1 µl

Die Effizienz E wurde nach folgender Formel berechnet:  $E = 10^{(-1/Steigung)}$

Für die PCR DNhTERT ergab sich eine Effizienz von 1,82, was 91% der theoretischen Erwartung entspricht, wobei die Effizienz der GAPDH-PCR eine Effizienz von 1,86 aufwies und damit bei 93% des theoretischen Wertes lag.

#### DNhTERT qPCR und Bestimmung der relativen Expression

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes war identisch zu der im vorherigen Schritt. Die Template-Menge betrug 50 ng und für jede cDNA wurde eine PCR für die Primerpaarung DNhTERT sowie GAPDH durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

Die Berechnung der relativen Expression erfolgte im ersten Schritt über die Berechnung der Zahl der gebildeten Produktmoleküle, die sich über die Effizienz der Reaktion und den c(t)-WERT berechnet: und das Reziprok gebildet:

$$\text{Produktmoleküle} = E^{c(t)}, 1/\text{Produktmoleküle}$$

Im zweiten Schritt wurde dann die Anzahl der Produktmoleküle der Reaktion DNhTERT zur Reaktion GAPDH ins Verhältnis gesetzt:

$$\text{Relative Expression} = \frac{1/\text{Produktmoleküle PCR DNhTERT}}{1/\text{Produktmoleküle PCR GAPDH}}$$

## 2.2.5 Bakterien Arbeiten

### 2.2.5.1 Transformation von kompetenten *E.coli* DH5α oder Top10

#### Puffer, Lösungen und Material

- Plasmidvektoren
- DH5α (Transformation von pOS-IRES-GFP/pOS-DNhTERT-IRES-GFP)
- Top10 (Transformation von pBABE-Puro ER/BABE-Puro-p53ER)
- LB-Ampicillin-Medium
- LB-Ampicillin-Agar-Platten
- Nanodrop

Um die verwendeten Plasmidvektoren zu vervielfältigen wurden zunächst kompetente *E.coli* der Stämme DH5α bzw. Top10 mit der Plasmid-DNA transformiert. Hierfür wurde

zu 25 µl kompetenter Zellen, die vorsichtig auf Eis aufgetaut wurden, 1 µl Plasmid-DNA gegeben und diese 30 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Reaktionsgefäß mit den Bakterienzellen und der DNA für 20 sek bei 37°C im Wasserbad erhitzt und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. In das Reaktionsgefäß wurde 1 ml angewärmtes LB-Medium gegeben und die Suspension 1 h bei 37°C geschüttelt. Um die Zellen zu konzentrieren wurden diese 5 min mit 2500g zentrifugiert, 900 µl des Überstandes verworfen und das Pellet im restlichen Überstand resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 30 µl auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 2.2.5.2 Plasmid-Mini-Präparation

#### Puffer, Lösungen und Material

- LB-Ampicillin-Medium
- Sol I
- Sol II
- Sol III
- EtOH
- 70% EtOH
- TE-Puffer

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurden Klone mit einer sterilen Pipettenspitze von den LB-Platten gepickt und die Pipettenspitze in 2 ml LB-Medium Ampicillin über Nacht bei 37°C inkubiert. War der Klon im Selektionsmedium gewachsen (Trübung der Suspension und Schlierenbildung), wurde die Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde 1 min bei 20 000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Um die Bakterien zu lysieren wurden 100 µl eiskalte Sol I zum Pellet gegeben und kräftig gemischt. Danach wurden 200 µl der Sol II dazugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis, sind 150 µl eiskalte Sol III zur Suspension pipettiert worden und die Reaktionsgefäße wurden vorsichtig geschwenkt. Nach einer erneuten Inkubation auf Eis (5-30 min) wurde die Lösung 10 min bei 20 000g, 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde 1 ml EtOH zum Überstand gegeben und erneut geschwenkt. Die DNA wurde durch eine Zentrifugation von 10 min bei 20 000g, 4°C pelletiert und mit 1 ml 70% EtOH gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 20 000g, 10 min, 4°C, wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt.

## 2.2.6 Proteinbiochemie

### 2.2.6.1 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Protein

#### Isolierung des Proteins

##### **Puffer, Lösungen und Material**

- 9M Urea-Puffer
- PBS
- K562 Zellen

Zellen wurden geerntet, zentrifugiert und 3x mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde dann im ca. 5fachem Volumen Urea-Puffer aufgenommen und gut resuspendiert. Die Zellyse erfolgt bei RT für 15 min unter Schütteln. Dann wurden die Proben bei 20 000g für 20 min zentrifugiert und das Protein im Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Langzeitlagerung der Proteinlysate erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Proteinkonzentrationsbestimmung

##### **Puffer, Lösungen und Material**

- BSA [100 mg/ml]
- Bradford-Reagenz (1:5 in  $\text{H}_2\text{O}$ , filtriert)
- Proteinlysate
- Photometer
- Plastikküvetten

Die Proteinkonzentration wurde mit der Bradford-Methode bestimmt und erfolgte anhand eine BSA-Eichreihe für deren Erstellung Stammlösungen folgender Konzentrationen angesetzt wurden: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg BSA in Urea-Lysepuffer. 30  $\mu\text{l}$  dieser Stammlösung bzw. 30  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Probe wurde für die Messung mit 30  $\mu\text{l}$  0,1 M NaOH-Lösung und 240  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt. Von dieser Lösung wurden 25  $\mu\text{l}$  mit 975  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz gemischt, 5 min bei RT inkubiert und die Absorption der Standardkurve nach 5 min bei 595 nm gemessen. Lag  $r^2$  der Standardkurve annähernd bei 1, wurde die Kurve verwendet und die Proben gemessen.

### 2.2.6.2 Western Blot

##### **Puffer, Lösungen und Material**

- |                        |                               |
|------------------------|-------------------------------|
| - $\text{H}_2\text{O}$ | - anti-Maus-HRP-gelinkt       |
| - Acrylamidmix, 30%    | - anti-Kaninchen-HRP-gelinkt  |
| - 1,5 M Tris, pH8,8    | - 0,05% PBS-T                 |
| - SDS, 20%             | - 5% Magermilch               |
| - APS                  | - Luminollösung               |
| - TEMED                | - Semi-Dry-Blotting-Puffer    |
| - Isopropanol          | - Gel-Gießstand               |
| - 5xLadepuffer         | - Laufkammer                  |
| - 1x SDS-Laufpuffer    | - Semi-Dry-Blotting-Apparatur |
| - p21-Antikörper       | - Schüttler                   |
| - GAPDH-Antikörper     | - PVDF-Membran                |

### Präparation von SDS-Acrylamidgelen

Die Glasplatten wurden vor dem Gießen mit EtOH gereinigt und in den Gießstand eingesetzt. Es wurden 15% Trenngelle mit einer Dicke von 1,5 mm verwendet, die folgende Zusammensetzung hatten (10 ml; ausreichend für ein Gel):

H <sub>2</sub> O	2,35ml
30% Acrylamidmix	5,0ml
1,5M Tris, pH8,8	2,5ml
20% SDS	50 µl

Kurz vor dem Gießen wurden noch 50 µl APS und 10 µl TEMED dazugegeben, die Lösung vorsichtig gemischt um Luftblasen zu vermeiden und zwischen die Glasplatten gegossen. Anschließend wurde vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation (ca. 15 min) wurde das Isopropanol abgegossen und der Gelrand mit H<sub>2</sub>O abgespült. Während der Polymerisation wurde die Lösung für das 4% Sammelgel (5 ml) vorbereitet:

H <sub>2</sub> O	3,4 ml
Acrylamidmix, 30%	830 µl
0,5 M Tris, pH 6,8	630 µl
SDS, 20%	25 µl

Wiederum erfolgte die Zugabe von 25 µl APS und 5 µl TEMED kurz vor dem Gießen und nach vorsichtigem Mischen wurde die Lösung auf das Trenngel gegeben. Schnell wurde ein Kamm, der die Taschen formt, in die Lösung gesetzt und das Sammelgel 15 min polymerisiert.

### Vorbereitung der Proteinlysate

Es wurden immer 30 µg Proteinlysate aufgetragen und mit 5x Ladebuffer versetzt.

### Gellauf

Die Laufkammer wurde mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt und die vorbereiteten Gele eingebaut. Der Taschenkamm wurde erst entfernt, wenn die Gele im Puffer waren. Auf jedes Gel wurde neben den zu analysierenden Proben 5 µl eines Größenstandard aufgetragen. Der Probenlauf wurde bei 65 V gestartet, wenn die Lysate vom Sammelgel zum Trenngel übergelaufen wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Nach Beendigung des Laufs (Lauffront war annähernd aus dem Gel gelaufen), wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel zum Blotten verwendet.

### Semi-dry Blotten

Zum Blotten der aufgetrennten Proteine wurden ein dickes Whatmanpapier für jede Elektrode und eine Membran in Größe des Gels vorbereitet. Die Membran musste vor Verwendung mit folgenden Schritten aktiviert werden: 15 sek MeOH, 2 min H<sub>2</sub>O und Äquilibrieren in Semi-dry-Puffer für einige Minuten, wobei das Gel wurde auch in Semi-

dry-Puffer vor Austrocknung geschützt. Das „Blot-Sandwich“ wurde wie folgt zusammengestellt (von Kathode (oben) zu Anode (unten)):

Whatmanpapier äquilibriert in Semi-dry-Puffer  
 Aktivierte Membran  
 Sammelgel  
 Whatmanpapier äquilibriert in Semi-dry-Puffer

Luftblasen wurden ausgestrichen und die Proteine für 1 h bei  $1,2\text{mA}/\text{cm}^2$  auf die Membran übertragen. Im Anschluss an die Übertragung der Proteine wurde die Membran 1 min in MeOH inkubiert und vollständig getrocknet, bevor die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte.

#### Inkubation der Antikörper

Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte entweder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  (anti-p21<sup>waf1/cip1</sup> (1:1000 in 5% Magermilch in 0,05% PBS-T)) oder für 1h bei RT (anti-GAPDH (1: 10000 in 5% Magermilch in 0,05% PBS-T)). Die Inkubation mit den Zweitantikörpern (anti-Kaninchen-HRP-gelinkt und anti-Maus-HRP-gelinkt (beide 1:10 000 in 5% Magermilch in 0,05% PBS-T)) erfolgte für 1h bei RT. Zwischen der Inkubation mit Erst- und Zweitantikörper wurde die Membran 3x 5 min mit 0,05% PBS-T unter kräftigem Schütteln gewaschen.

Zur Detektion wurde die Membran mit der Luminollösung bedeckt und für 1 min im Dunkeln inkubiert. Danach ließ man das Luminol abtropfen und die Membran wurde mit einer Klarsichtfolie bedeckt in eine Kassette gelegt. Zur Visualisierung wurde ein Röntgenfilm durch die immunreaktiven Signale belichtet und der Film entwickelt.

### **2.2.7 Stabile Integration**

Um Vektoren stabil in das Genom von K562 Zellen zu integrieren, wurden die Zellen durch Retroviren transduziert. Dafür wurden die viralen Partikel in Phoenix Zellen generiert.

#### **Puffer, Lösungen und Material**

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
| - Kulturmedium DMEM (HEK293T)                | - Plasmidvektoren                  |
| - Kulturmedium RPMI (K562)                   | - Phoenix                          |
| - K562 Zellen, K562 Zellen Klon DN4, DN7, C1 | - Transfektionsmedium              |
| - 25 mM Chloroquin in PBS                    | - Filter (0,45 $\mu\text{M}$ Pore) |
| - Puromycin [5 mg/ml]                        | - Spritzen                         |
| - Kalziumphosphat Transfektion Kit „CAPHOS“  |                                    |

Am Abend des ersten Tag wurden  $5 \times 10^6$  Phoenix-Zellen pro 10 cm-Petrischale in Kulturmedium ausgesät. Am Abend des darauffolgenden Tag wurden die Zellen transfiziert. Dabei sollte ungefähr eine Konfluenz von 70 % erreicht worden sein. Der Transfektionsmix hat ein Gesamtvolumen von 500  $\mu\text{l}$  und wurde wie folgt pipettiert:

Spezifischer Vektor	5 $\mu\text{g}$ (DNhTERT) bzw. 10 $\mu\text{g}$ (p53ER)
CaCl <sub>2</sub>	50 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	ad 500 $\mu\text{l}$

Der Transfektionsansatz wurde in einem sterilen FACS-Röhrchen vorgelegt und unter „Luft-Blubbern“ mit einer Pasteurpipette wurden 500 µl HBS tröpfchenweise hinzugegeben. Die Transfektionsmix wurde ca. 20 min bei RT inkubiert und in dieser Zeit ein Mediumwechsel der Phoenix-Zellen vorgenommen: Das Kulturmedium wurde entfernt, der Zellrasen vorsichtig mit PBS gewaschen und 9 ml Transfektionsmedium auf die Zellen gegeben. Danach wurden 2,5 µl Chloroquin zugegeben und der Transfektionsmix tröpfchenweise zugefügt. Die Zellen wurden daraufhin ca. 12 h (über Nacht) im Brutschrank kultiviert und am nächsten Morgen wurde erneut ein Mediumwechsel mit 4 ml Kulturmedium RPMI (Medium der K562 Zellen, die transduziert werden) durchgeführt. 24 h später wurde der erste Überstand, der Viruspartikel enthält, gesammelt. Insgesamt wurden 3 Überstände im Abstand von 8-12 h (immer morgens und abends) gesammelt. Die Überstände wurden sterilfiltriert (0,45 µm Poren) und direkt zur Transduktion der K562 Zellen genutzt. In dem ersten filtrierten Überstand wurde ein Zellpellet von ca.  $3 \times 10^6$  K562 Zellen aufgenommen und in einer 10 cm-Petrischale ausgesät. Die anderen beiden Überstände wurden ebenfalls direkt auf diese K562 Zellen gegeben.

#### Selektion positiver Zellen

Vektor pOS-IRES-GFP: Transduzierte Zellen exprimieren nach ca. 48-72 h das fluoreszierende Protein GFP und wurden mit einem FACS-Sorter angereichert. Die Herstellung der Einzellklone erfolgte mit der ACDU-Einheit eines FACSAria. Dies wurde in der Abteilung Knochenmarktransplantation (KMT) am UKE durchgeführt.

Vektor pBABE-Puro: Transduzierte Zellen tragen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin. Zu den Zellen wurden ca. 48 h nach der letzten Transduktion 2,5 µg/ml Puromycin gegeben. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte K562 Zellen mit der identischen Konzentration Puromycin behandelt.

## 2.2.8 Zellzyklus und Apoptose

### 2.2.8.1 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid (PI)

Durch Färbung mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) kann die Verteilung der Zellen im Zellzyklus dargestellt werden.

#### Puffer, Lösungen und Material

- K562 Zellen
- 70% EtOH
- FACSCalibur
- PI-Lösung
- FACS-Röhrchen

$5 \times 10^5$  Zellen wurden geerntet, 2x mit PBS gewaschen bei 1000g zentrifugiert und in 70% EtOH mindestens 30 min permeabilisiert. Die DNA-Färbung erfolgte für 30 min auf Eis in 500  $\mu$ l PI-Lösung.

Die Analyse wurde im FACSCalibur durchgeführt und die PI-Fluoreszenz im linearen Modus des FI-3 detektiert.

### **2.2.8.2 Detektion von AnnexinV (Frühe Apoptose)**

Ein frühes Ereignis der Apoptose ist die Translokation des Membranphospholipids Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite der Plasmamembran zur Außenseite.

Die Konjugation des phospholipidbindenden Moleküls AnnexinV mit Fluorochromen wie PE ermöglicht die Detektion von PS auf vitalen Zellen und damit die Detektion von früher Apoptose. Da die Membran der Zellen intakt sein muss, um wirklich nur PS-Moleküle auf der Zelloberfläche zu detektieren, muss die Färbung gegen einen DNA-Farbstoff (7-AAD) erfolgen, der nur eindringen kann, wenn die Zellmembran permeabel ist. So lassen sich apoptotische Zellen (AnnexinV positiv) von nekrotischen Zellen (nur 7-AAD positiv) unterscheiden.

#### **Puffer, Lösungen und Material**

- K562 Zellen
- AnnexinV-PE
- 7-AAD
- Bindungspuffer (1x)
- FACS-Röhrchen
- FACSCalibur

$1 \times 10^5$  Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und in 100  $\mu$ l 1x Bindungspuffer resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 5  $\mu$ l AnnexinV-PE und DNA-Farbstoff 7-AAD (beide Verhältnis 1:20) hinzugefügt, die Zellen vorsichtig gemischt und 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Zur Detektion wurde die Suspension mit 400  $\mu$ l 1x Bindungspuffer verdünnt und innerhalb von 1 h im FACSCalibur gemessen. Dabei wurde die Fluoreszenz von AnnexinV-PE im FI-2 gegen die Fluoreszenz von 7-AAD (FI-3) ermittelt (Detektion erfolgte im logarithmischen Modus). In die Auswertung gingen nur Zellen ein, die ausschließlich AnnexinV positiv waren.

### **2.2.8.3 Detektion von Caspase 3 (Späte Apoptose)**

Der verwendete Antikörper detektiert nur aktive Caspase3 (17 kDa), die aus einer Procaspase (34 kDa) prozessiert wird. Dabei handelt es sich um ein sehr spätes Ereignis der Apoptose.

#### **Puffer, Lösungen und Material**

- K562 Zellen
- PBS
- 2% PFA
- FACSCalibur
- Caspase3-Antikörper/ Isotyp-Kontrolle-PE
- 90% MeOH in PBS, eiskalt
- Inkubationspuffer

Die Zellen wurden geerntet, 2x mit PBS gewaschen und in 2% PFA für 10 min bei RT fixiert. Diesem Schritt schloss sich eine Inkubation für 1 min auf Eis an. Anschließend

wurden die Zellen 5 min bei 1000g zentrifugiert und  $1 \times 10^5$  Zellen in eiskaltem 90% MeOH in PBS aufgenommen. Für die Permeabilisierung wurden die Zellen 30 min bei 4°C inkubiert, 2x mit Inkubationspuffer gewaschen und in 100 µl Inkubationspuffer aufgenommen. Dieser enthielt entweder 2 µl (1:50) Caspase3-PE Antikörper oder die Isotyp-Kontrolle mit PE-Konjugat. Die Zellen wurden für 45 min im Dunkeln bei RT inkubiert, 2x mit PBS gewaschen und für die Messung in 500 µl Inkubationspuffer resuspendiert.

Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch und die PE-Fluoreszenz wurde im FI-2 (logarithmische Skalierung) gemessen.

## 2.2.9 Chromosomale Instabilität und DNA-Reparatur

### 2.2.9.1 Präparation von Metaphasen

Werden Telomere dysfunktionell können sie miteinander interagieren. Dies drückt sich z.B. durch die Bildung von dizentrischen Chromosomen aus und ist ein Maß für genomische Instabilität. Durch die Präparation von Metaphase von Zellen mit kurzen Telomeren wurde dies evaluiert.

#### Puffer, Lösungen und Material

- |                      |                   |
|----------------------|-------------------|
| - Objektträger       | - 0,5% KCl-Lösung |
| - Deckgläschen       | - Fixativ         |
| - K562 Zellen        | - Giemsa-Lösung   |
| - Kolzemid [10mg/ml] | - Lichtmikroskop  |
| - Heizplatte         | - Trypsin-Lösung  |

Um die Zellen in der Metaphase zu arretieren wurde dem Medium von K562 Zellen (50 ml) unter Kulturbedingungen am Abend Kolzemid in einer Endkonzentration 10 µg/ml zugesetzt und die Zellen über Nacht kultiviert. Am Morgen wurde das Medium entfernt und auf das Zellpellet tröpfchenweise 10 ml vorgewärmte 0,5% KCl-Lösung mit 1 ml Fixativ gegeben. Die Suspension wurde gut gemischt, 20 min bei 37°C inkubiert und dann mit 400g für 10 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen erneut in 10 ml Fixativ resuspendiert und das Fixativ ein weiteres Mal durch Zentrifugation (400g, 10min, RT) entfernt und so lange wiederholt bis das Pellet leuchtend weiß war. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in 500 µl Fixativ resuspendiert und ein paar Tropfen der Suspension aus einer Höhe von ca. 50 cm auf einen Objektträger getropft, der im 30° Winkel auf einem Ständer über Wasserdampf stand. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet. Direkt vor der Färbung mit Giemsa (*G-banding*) wurden die Objektträger auf einer Heizplatte auf 100°C erhitzt und bei RT für 40 sek in Trypsin-Lösung inkubiert. Die Objektträger wurden 1x vorsichtig mit H<sub>2</sub>O abgespült und 30 sek in PBS geschwenkt. Anschließend erfolgte die Färbung der Chromosomen für 10 min in Giemsa-Lösung.

Die Metaphasen wurden am Lichtmikroskop ausgewertet und dokumentiert. Es wurden immer 25 Metaphasen auf dizentrische Chromosomen analysiert. Dies erfolgte in der Routineabteilung Zytogenetik der Onkologie am UKE.

### 2.2.9.2 DNA-Reparatur

Zur Überprüfung der DNA- Reparaturleistung wurden DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) durch ionisierende Bestrahlung in K562 Zellen induziert und anhand der Bildung von  $\gamma$ H2AX-Foci mit Immunfluoreszenz detektiert. Diese Foci bilden sich in Sekunden nach der Entstehung eines DSBs an der Bruchstelle und markieren diese. Es handelt sich hierbei um Ansammlungen der phosphorylierten Form des Proteins H2AX. Die Foci lösen sich auf, wenn der DSB repariert wird, deshalb lassen sich persistente DSBs noch 24 h nach Bestrahlung durch  $\gamma$ H2AX-Foci detektieren. Da diese nicht mehr repariert werden, kann über ihre quantitative Bestimmung eine Aussage zur DNA-DSB-Reparaturleistung einer Zelle gemacht werden.

#### **Puffer, Lösungen und Material**

- |                            |                                 |
|----------------------------|---------------------------------|
| - Objektträger             | - Deckgläschen                  |
| - K562 Zellen              | - Tween20-BSA-Lösung            |
| - Röntgenröhre             | - $\gamma$ H2AX-Antikörper      |
| - PBS                      | - feuchte Kammer                |
| - 2%PFA                    | - anti-Maus-Alexa594-konjugiert |
| - Permeabilisierungslösung | - DAPI-Antifade-Lösung          |
| - 3% BSA in PBS            | - Fluoreszenzmikroskop          |

#### Bestrahlung

Jeweils  $1,5 \times 10^6$  K562 Zellen wurden in Kulturmedium bei RT mit einer Röntgenröhre und einer Dosisleistung von 2 Gy/min bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte mit ansteigenden Dosen von 0-2,5 Gy. Anschließend wurden die Zellen für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Vorbereitung auf die Immunfluoreszenz wurden das Medium entfernt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und der Zelltiter mit PBS auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

#### Immunfluoreszenz

170  $\mu$ l der Zellsuspension wurde durch einen Zytospin auf einen Objektträger gebracht und mit 2% PFA für 15 min bei RT fixiert. Danach wurde das überschüssige Fixativ durch 3x 10 min Waschen mit PBS entfernt und die Zellen 5 min in kalter Permeabilisierungslösung inkubiert. Diesem Schritt schloss sich 1 h Inkubation in 3% BSA in PBS an. Die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen  $\gamma$ H<sub>2</sub>AX (1:1000 in 3% BSA in PBS) erfolgte dann durch Überschichtung der Zellen mit 60  $\mu$ l der Lösung in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT. Nach 3x 10 min Waschen mit einer Tween20-BSA-Lösung wurden 60  $\mu$ l des Alexa594-markierten Sekundärantikörpers (1:600 in 3% BSA in PBS) auf die Zellen pipettiert und es erfolgte eine weitere Inkubation für 1 h in einer feuchten Kammer bei RT im Dunkeln. Die Lösung wurde daraufhin 4x 10 min mit

Tween20-PBS-Lösung gewaschen und die Zellen anschließend mit 15  $\mu$ l DAPI-Antifade-Lösung eingedeckelt. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

#### Auswertung der $\gamma$ -H2AX Foci

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 1.000facher Vergrößerung. Pro Blickfeld wurden die Foci in den fünf am zentralsten gelegenen Zellkernen gezählt. Pro Zelllinie und Bestrahlungspunkt wurden insgesamt 100 Zellkerne bewertet und die Ergebnisse als durchschnittliche  $\gamma$ H2AX Foci/Zelle angegeben. Dies wurde in der Arbeitsgruppe von Kerstin Borgmann in der Abteilung Radioonkologie des UKE durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

Die Chronische myeloische Leukämie (CML) wird als Modellkrankheit für Studien zur Telomer- und Telomerasebiologie angesehen. Die mehrere Jahre dauernde chronische Phase und die signifikanten Unterschiede in der Telomerlänge von leukämischen Zellen zu gesunden bietet ausgezeichnete Voraussetzungen, um Telomeraseinhibition in der Therapie der CML einzusetzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei mögliche Wege der Inhibition des Enzyms Telomerase in den BCR-ABL<sup>+</sup> CML-Blastenkrisenzellen K562 untersucht und zelluläre Konsequenzen der Telomeraseinhibition auf die Zellen ermittelt (Abb. 11).

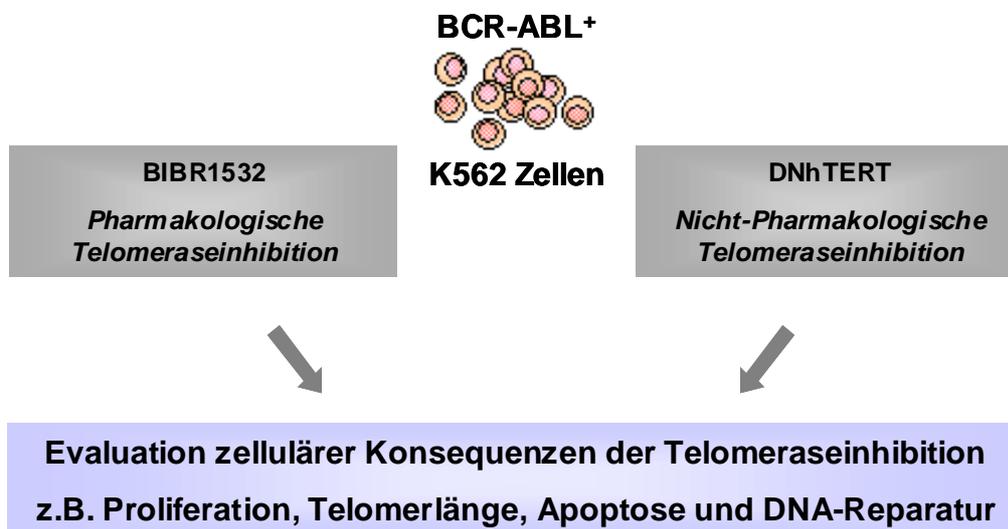


Abb. 11: Schematische Übersicht des Projekts.

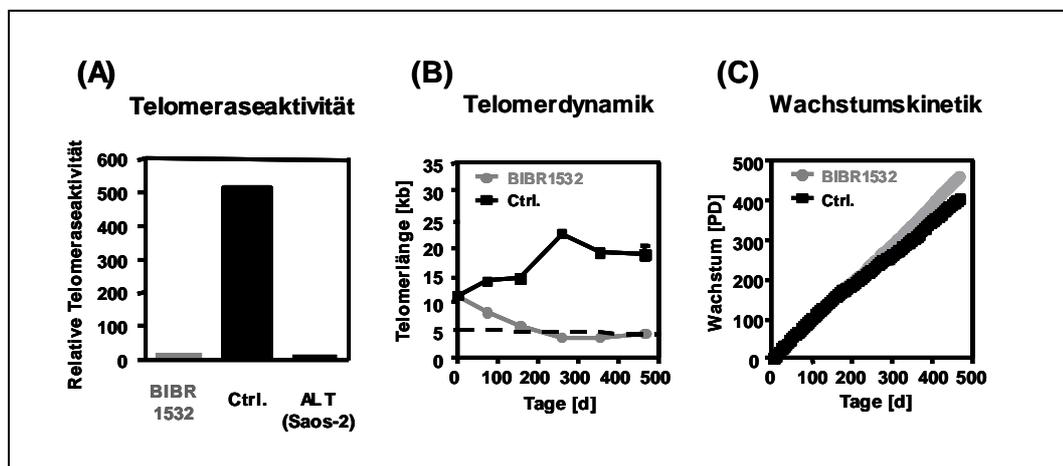
Im ersten Ansatz wurde der *small molecule* Inhibitor Telomeraseinhibitor BIBR1532 eingesetzt.

Der alternativ verwendete Ansatz ist gentechnologisch. Hierbei wurde ein dominant-negatives Allel der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (DNhTERT) stabil in das Genom der K562 Zellen integriert.

### 3.1 Einfluss des Telomeraseinhibitors BIBR1532 auf BCR-ABL<sup>+</sup> K562 Zellen

#### 3.1.1 Telomeraseaktivität, Telomerlänge und Wachstumskinetik

Der Einfluss des Telomeraseinhibitors BIBR1532 auf die Telomerlänge und das Wachstum von BCR-ABL<sup>+</sup> K562 Zellen wurde in einer vorangegangenen Dissertation (U.Hartmann, Universität Tübingen) in Langzeitkultur über 460 Tage ermittelt und sind hier zur besseren Erläuterung gezeigt<sup>121</sup>. In Abbildung 12 sind neben den Ergebnissen der Telomerlängenmessungen (12 B) und der Wachstumskinetik (12 C) auch die Telomeraseaktivität unter BIBR1532 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen dargestellt.



**Abb. 12: Telomeraseaktivität, Telomerdynamik und Wachstumskinetik der Langzeitkultur von K562 Zellen unter BIBR1532 Behandlung.** (A) Relative Telomeraseaktivität von K562 Zellen unter 10  $\mu$ M BIBR1532 und unbehandelten K562 Zellen (Ctrl.) sowie telomerasenegativen Saos-2 Zellen (ALT). (B) Telomerlängen und (C) Populationsverdopplungen [PD] über den Kulturzeitraum von 460 Tagen [d]. BIBR1532: graue Kreise; Ctrl.: schwarze Quadrate.

Die relative Telomeraseaktivität von BIBR1532 behandeltem K562 Proteinlysate liegt im Bereich von telomerasenegativen Saos-2 Zellen, während unbehandelte K562 Zellen eine hohe Telomeraseaktivität aufweisen (Abb. 12 A). Zellen der Linie Saos-2 halten ihre Telomerlänge mittels des Mechanismus „*Alternative lengthening of telomeres*“ (ALT) aufrecht und dienen hier als Negativkontrolle der Telomeraseaktivität.

Erwartungsgemäß verkürzte sich die mittlere Telomerlänge der K562 Zellen von ca. 11 kb auf unter 5 kb, was einer durchschnittlichen Telomerverkürzung von 14 bp/PD

entspricht. Eine Länge von 5-7 kb gilt als kritisch für die Zelle. Die Telomerlänge in unbehandelten K562 Zellen hingegen veränderte sich über den gesamten Kultivierungszeitraum ohne einheitliche Richtung (Abb. 12 B). Solche Schwankungen in der Telomerlänge von K562 Zellen in Langzeitkultur unter normalen Kulturbedingungen konnten schon in vorangegangenen Studien beobachtet werden (TH Brümmendorf und PM Lansdorp, unveröffentlichte Daten).

Trotz der starken Verkürzung der Telomere durch die Inhibition der Telomerase auf eine kritische Länge von 5 kb kam es zu keiner signifikanten Veränderung in der Proliferationsrate der BIBR1532 behandelten Zellen, insbesondere zu keiner Verlangsamung (Abb. 12 C).

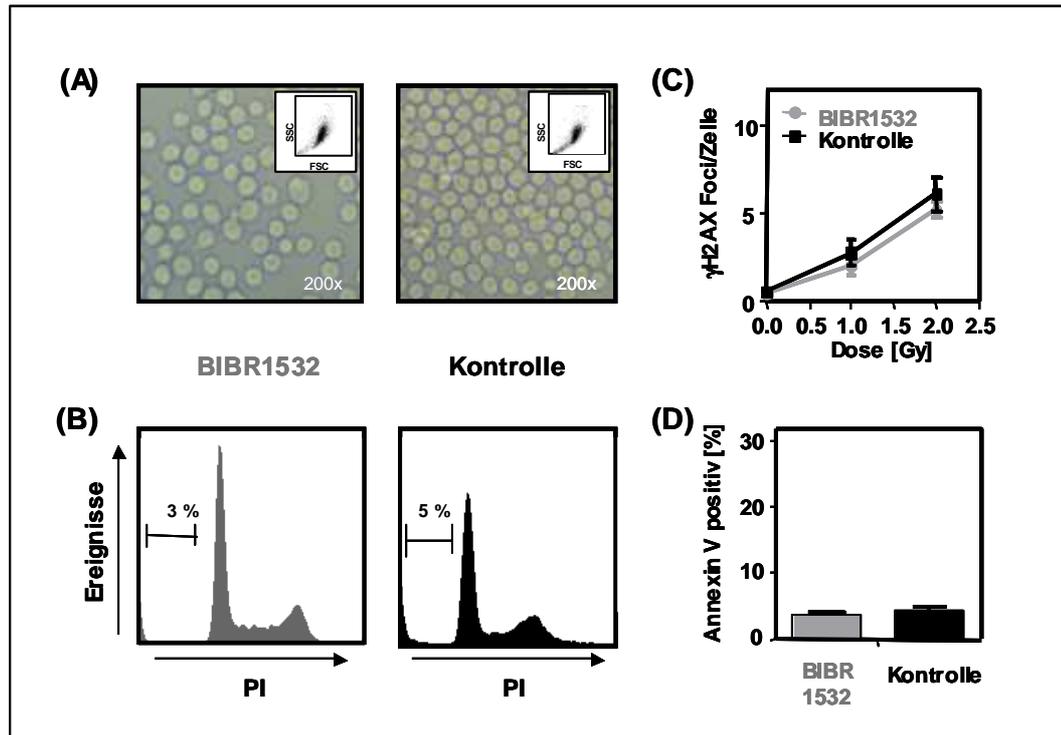
### **3.1.2 Zellzyklusverteilung, Apoptose und DNA-Reparatur**

Um Einflüsse des Telomeraseinhibitors bzw. der Telomerverkürzung zu ermitteln, wurden Zellen mit kritisch kurzen Telomeren auf weitere Konsequenzen untersucht. Diese waren ca. 380 Tage in Kultur und hatten eine mittlere Telomerlänge von 5 kb, wobei alle Untersuchungen parallel an unbehandelten Kontrollzellen ähnlicher Passagenzahl durchgeführt wurden (Abb. 13).

In der Morphologie ergaben sich keine lichtmikroskopisch detektierbaren Unterschiede zwischen BIBR1532-behandelten Zellen mit kritisch kurzen Telomeren (ca. 5 kb) und unbehandelten Kontrollzellen mit einer durchschnittlichen Telomerlänge von ca. 18 kb. Auch eine FACS-Analyse nach Größe und Granularität (FCS vs. SSC) zeigte keine Veränderung (Abb. 13 A).

Des Weiteren wurde untersucht, ob es zu einer Veränderung in der Zellzyklusverteilung nach Telomeraseinhibition mit BIBR1532 kam (Abb. 13 B). Weder eine Verschiebung der unterschiedlichen Phasen hinsichtlich ihres Anteils am Zellzyklus, noch eine Zunahme der Fraktion SubG0/G1 konnte im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden.

Auch die Detektion von Apoptose mittels des phosphatidylserinbindenden Moleküls AnnexinV bestätigte, dass es zu keiner Zunahme an apoptotischen Zellen nach der Behandlung mit BIBR1532 kam (Abb. 13 D).



**Abb. 13: Analysen von BIBR1532 behandelten Zellen mit kritisch kurzen Telomeren.** Untersuchung an Zellen der Langzeitkultur (Tag 380) mit einer Telomerlänge von ca. 5 kb (grau) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (schwarz) identischer Passage. (A) Lichtmikroskopische Analyse der Morphologie (Vergrößerung 200x). (A) Inlay: Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellpopulationen analysiert mittels FACS. (B) Zellzyklusverteilung nach Färbung mit Propidiumiodid (PI). (C) DNA-Reparatur 24 h nach ionisierender Bestrahlung. Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle wurde gegen die Bestrahlungsdosis von 0,0-2,5 Gy aufgetragen. (D) Detektion von Apoptose mit AnnexinV. Die Quantifizierung erfolgte im FACS gegen den DNA-Farbstoff 7-AAD. Dargestellt sind ausschließlich AnnexinV positive Zellen.

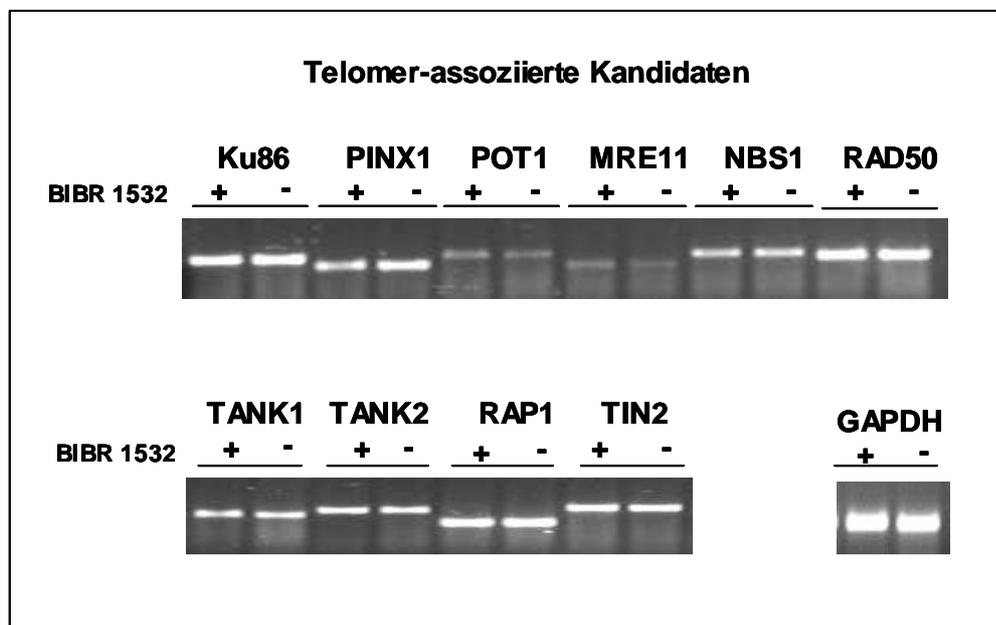
Da es Hinweise darauf gibt, dass die Verkürzung von Telomeren zu einer Verschlechterung der DNA-Reparatur nach Bestrahlung führt, wurden die Zellen mit ansteigenden Dosen ionisierender Strahlung behandelt und die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci 24 h nach Bestrahlung detektiert. Diese Foci markieren DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs): Lassen sie sich 24 h nach Bestrahlung noch detektieren handelt es sich um DNA-DSBs, die nicht mehr von der Zelle repariert werden können. Eine hohe Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci 24 h nach Bestrahlung lässt somit auf eine verminderte DNA-Reparatur schließen. Diese Versuche wurden in Kooperation mit Radioonkologie des UKE durchgeführt<sup>122</sup>.

In Abbildung 13 C wird ersichtlich, dass mit steigender Bestrahlungsdosis zwar die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci nach 24 h zunahm, aber kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen mit kritisch kurzen Telomeren und unbehandelten Kontrollzellen mit einer normalen Telomerlänge festgestellt werden konnte.

Somit war die Kapazität der Reparatur von DNA-DSBs in BIBR1532 behandelten K562 Zellen trotz Telomerverkürzung in einen kritischen Bereich nicht beeinträchtigt.

### 3.1.3 Expression telomer-assoziiierter Kandidatengene

Telomere stellen die Enden linearer Chromosomen dar. Sie sind aus der Telomer-DNA und assoziierten Proteinen aufgebaut, die für ihre Funktion als schützende Kappen der Chromosomen entscheidend sind. Um zu überprüfen ob die Verkürzung der Telomer-DNA oder die Behandlung mit der Substanz BIBR1532 einen Einfluss auf die mRNA-Expression telomer-bindender Proteine hat, wurde diese semiquantitativ untersucht.



**Abb. 14: Expression der mRNAs von telomer-assoziierten Kandidatengenen.** Die Expression der mRNA wurde mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt. Die Expression von GAPDH diente als Kontrolle.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR für einige telomer-assoziiierende Proteine dargestellt. Als qualitative und quantitative Kontrolle der isolierten mRNA diente die Expression des Gens GAPDH.

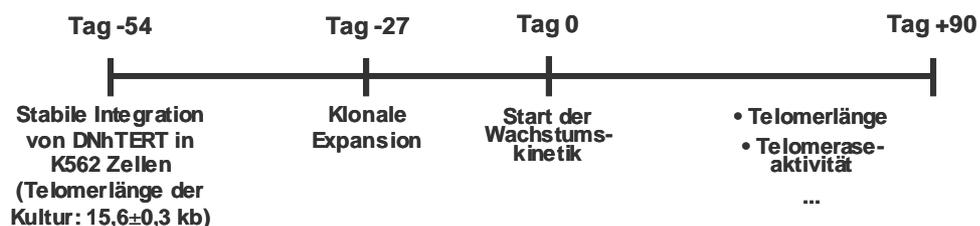
Die Analyse umfasste telomer-spezifische Proteine des Shelterin-Komplexes wie z.B. POT1 und Kandidaten, die in der Signaltransduktion von DNA-Doppelstrangbrüchen eine Rolle spielen wie der aus MRE11, Rad50 und NBS1 bestehende MRN-Komplex.

Die Quantität der Expression der mRNAs dieser Proteine war in BIBR1532-behandelten Zellen identisch mit der Expression in unbehandelten Kontrollzellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass außer einer signifikanten Telomerverkürzung in Zellen mit kritisch kurzen Telomeren keine Einflüsse der Telomeraseinhibition mit der Substanz BIBR1532 auf die BCR-ABL<sup>+</sup> Blastenkrisenzellen der Linie K562 zu ermitteln waren.

Um zu klären, ob diese Beobachtung durch die limitierte Effektivität des pharmakologischen Inhibitors BIBR1532 bedingt ist, wurde im Folgenden ein gentechnischer Ansatz zur Effektivität der Telomeraseinhibition im Sinne eines „*proof of principle*“ überprüft

### 3.2 Nicht-Pharmakologische TI: Expression des Transgens DNhTERT

In mehreren Tumorzellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine effektive Telomeraseinhibition durch Integration einer dominant-negativen Mutante der katalytischen Untereinheit der Telomerase (DNhTERT) erfolgen kann<sup>119</sup>. Daher wurden Zellen der BCR-ABL<sup>+</sup> Linie K562 mit dem für hämatopoetische Zellen optimierten Expressionsvektor pOS-DNhTERT-IRES-GFP oder dem korrespondierenden Leervektor pOS-IRES-GFP retroviral transduziert. Dieses Vektorkonstrukt ermöglicht es, die Expression des Transgens DNhTERT über die Detektion von koexprimiertem GFP nachzuweisen.



**Abb. 16: Übersicht zur Expansion und Analyse von DNhTERT exprimierenden K562 Klonen.**

In Abbildung 15 ist zur Veranschaulichung der Versuchsablauf dargestellt. Es wurden sieben DNhTERT exprimierende Klone (DN2,4,6,7,8,9,11) und zwei Kontrollklone (C1,C2) expandiert.

### 3.2.1 Telomeraseaktivität, Telomerlänge und Wachstumskinetik

Um die Effekte der Telomeraseinhibition zu analysieren wurden zuerst Telomerdynamik, Telomeraseaktivität und Wachstumskinetik der Langzeitkultur von DNhTERT-exprimierenden Klonen ermittelt.

Dafür wurden GFP-positive Zellen mit einer ACQUA-FACS-Einheit einzelsortiert. In Abbildung 16 ist zur besseren Übersicht nur ein repräsentativer Kontrollklon (C1) dargestellt. Die Expression des Reportergens GFP wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum durch FACS-Analysen überprüft, um die Expression des Transgens zu überwachen. Der Start der Beobachtung der Wachstumskinetik wurde als Tag 0 (d0) festgelegt. Jeden zweiten bzw. dritten Tag wurde die Populationsverdopplung der Klone mittels Trypanblau-Zählung ermittelt (Abb. 16 B,E) und parallel dazu im Abstand von 14 Tagen die mittlere Telomerlänge der Klone gemessen (Abb. 16 A,D). Zudem wurde in frühen (ca. d10) und späten (ca. d80) Passagen die Telomeraseaktivität in den Klonen ermittelt (Abb. 6 C,F).

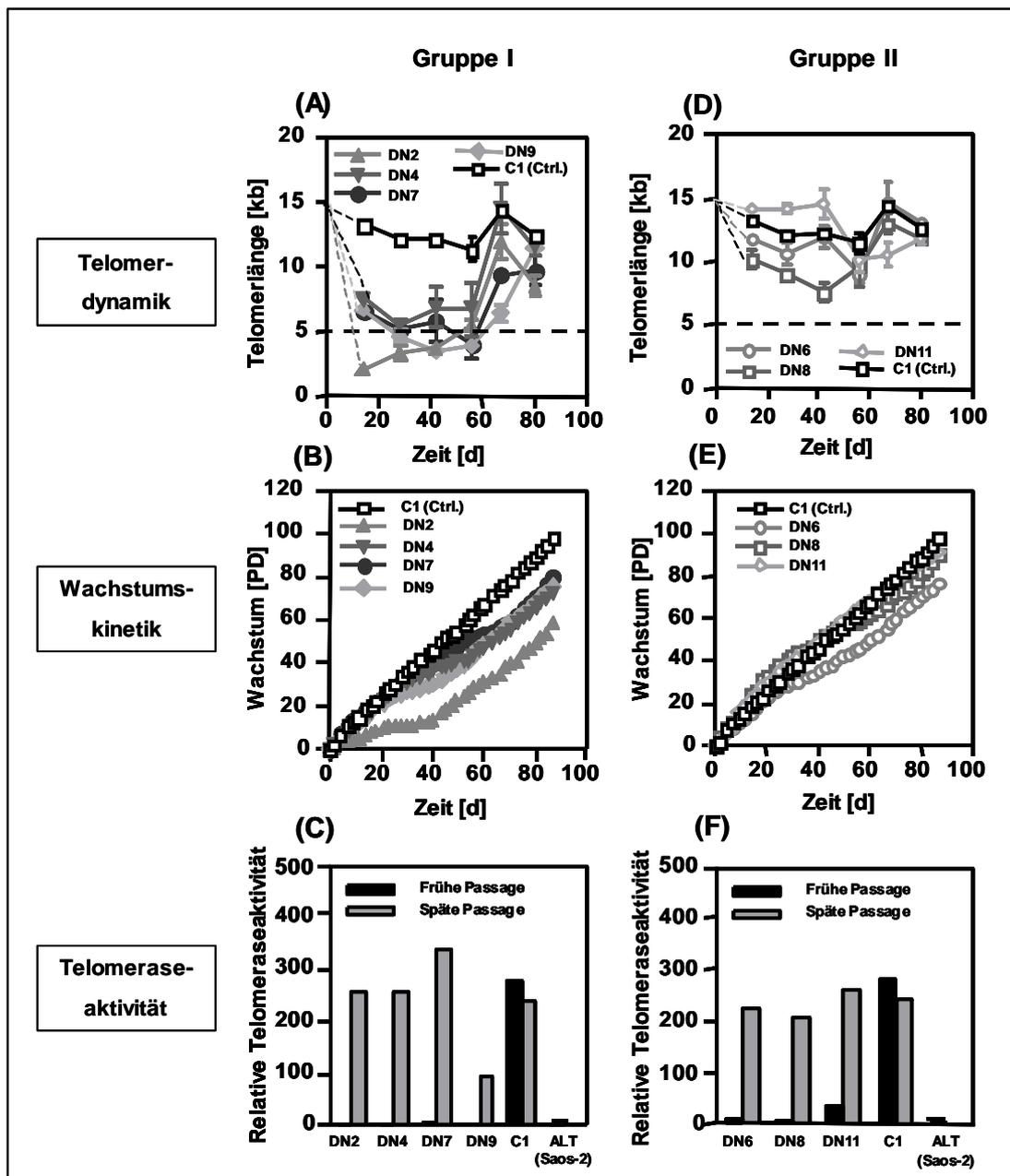
Ein deutlicher Effekt der Telomeraseinhibition war in vier der sieben DNhTERT exprimierenden K562 Klone zu beobachten (Gruppe I: DN2, DN4, DN7, DN9). Die Telomerlänge dieser Klone verkürzte sich drastisch bis auf einen kritischen Bereich von ungefähr 5 kb, nahm dann aber wieder zu und stabilisierte sich im Bereich der Telomerlänge der Kontrollklone. Die Telomerlänge der Kontrollklone C1 und C2 (hier nur C1 gezeigt) blieb über den gesamten Kulturzeitraum relativ konstant bei durchschnittlich ca. 12 kb und erreichte nicht annähernd einen kritischen Bereich (Abb.16 A).

Die Telomerdynamik der Klone aus Gruppe I spiegelte sich in der Wachstumsgeschwindigkeit wider. Mit Verkürzung der Telomere auf eine kritische Länge verlangsamte sich das Wachstum bis zur transienten Stagnation. Im Zusammenhang der Re-Elongation der Telomerlänge kam es jedoch ebenfalls wieder zu einer Zunahme der Proliferationsrate hin zum Ausgangsniveau (Abb. 16 B).

Die Ergebnisse der Telomeraseaktivitätsmessung stützen diese Resultate, da in allen vier Klonen zu Beginn der Analyse die Aktivität erfolgreich in den Bereich von telomerasenegativen Saos-2 Zellen inhibiert werden konnte, es aber in den späten Passagen zu einer Re-Aktivierung der Telomerase kam (Abb. 16 C).

Die Expression des Reporters GFP war bei zwei der vier Klone (DN7 und DN9) über den Kultivierungszeitraum relativ stabil, wohingegen bei den anderen beiden Klonen (DN2 und DN4) in den späten Passagen kein GFP mehr detektierbar war.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Klonen der Gruppe I erreichten die Telomere der Klone aus Gruppe II (DN6, DN8, DN11) nicht den kritischen Bereich (Abb. 16. D).



**Abb. 16: Analyse der Telomerdynamik, der Wachstumskinetik und der Telomeraseaktivität von DNhTERT exprimierenden K562 Einzelklonen.** Es wurden sieben Klone analysiert, die basierend auf folgenden Kriterien in die Gruppe I (A-C) und die Gruppe II (D-F) eingeteilt wurden: (1.) Einfluss der Telomeraseinhibition führte zu einer Verkürzung der Telomere in den kritischen Bereich von mindestens 5 kb und (2.) Es kam zu einer Reduktion der Wachstumsrate als Antwort auf die Telomerverkürzung. Die Ergebnisse der Untersuchungen zu den DNhTERT-IRES-GFP exprimierenden Klonen (DN2,4,6,7,8,9,11; Graphen in verschiedenen Grauschattierungen) wurden im Vergleich zu einem repräsentativen Kontrollklon (C1; schwarz) dargestellt. (A; D) Telomerlänge und (B; E) Populationsverdopplungen [PD] über den Kultivierungszeitraum von 90 Tagen [d]. (C, F) Telomeraseaktivität in frühen (ca. Tag 10, schwarze Balken) und späten Passagen (ca. Tag 80; graue Balken). Kontrolle der Telomeraseinhibition: Telomerasenegative Saos-2 Zellen (ALT).

Wie zu erwarten kam es dementsprechend auch nicht zu einer ausgeprägten Veränderung der Wachstumskinetiken (Abb. 16 E).

Allerdings war auch in den Klonen dieser Gruppe die Telomeraseaktivität in den frühen Passagen bis auf den Bereich von telomerasenegativen Saos-2 Zellen reduziert und wurde in späten Passagen reaktiviert (Abb. 16 F).

Im Gegensatz zu Klonen der Gruppe I war die GFP Expression in allen Klonen der Gruppe II relativ konstant vorhanden über den Kultivierungszeitraum.

Auch die Kontrollklone C1 und C2 exprimierten über den gesamten Kultivierungszeitraum hinweg GFP.

### **3.2.2 DNhTERT-Expression und Nachweis von ALT**

Die Überprüfung der GFP-Expression ergab in den Klonen der Gruppe II eine stabile Expression über den gesamten Kultivierungszeitraum. In der Gruppe I ging hingegen bei zwei Klonen (DN2 und DN4) die GFP-Expression mit der Verlängerung der Telomere und der Normalisierung der Wachstumsgeschwindigkeit verloren.

Da in allen expandierten Klonen (Gruppe I und II) nach anfänglicher erfolgreicher Inhibition der Telomerase in späten Passagen wieder Telomeraseaktivität detektiert werden konnte, wurde als Ergänzung der GFP-Messungen die Expression des Transgens DNhTERT mittels qPCR in frühen (ca. Tag 10) und späten (ca. Tag 80) Passagen bestimmt.

Zur Abgrenzung der Expression des Transgens DNhTERT gegenüber der intrinsischen Expression von hTERT wurde ein Primer komplementär zur Sequenz von (DN)hTERT gewählt und der zweite Primer komplementär zur IRES-Sequenz.

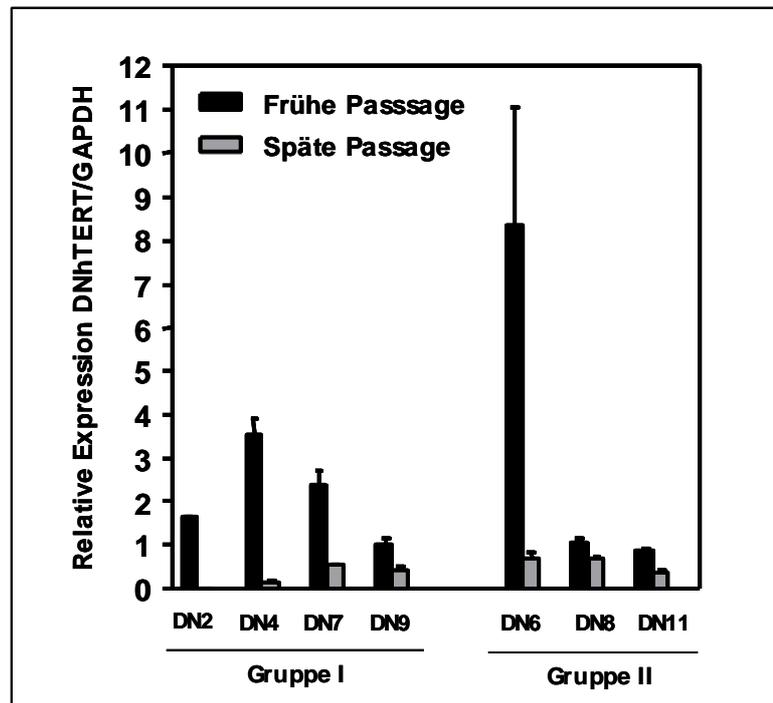
Die Ergebnisse wurden relativ zu der Expression von GAPDH in den Zellen dargestellt (Abb. 17).

Die in Abbildung 17 dargestellte quantitative Expression der DNhTERT mRNA verringerte sich in allen Klonen von der frühen zur späten Passage. Dieses Ergebnis entspricht der Telomeraseaktivitätsmessung (Abb. 16 C und F), da in allen Klonen zu Beginn der Kultivierung die Telomeraseaktivität erfolgreich inhibiert werden konnte, aber in späten Passagen in allen Klonen reaktiviert wurde.

Vor allem die Expression des Transgens DNhTERT in frühen Passagen war stark unterschiedlich in jedem Klon und korrelierte auch nicht innerhalb der Gruppe I („Effekt

der Telomeraseinhibition“) oder der Gruppe II („Kein Effekt“). Hier stach insbesondere die DNhTERT-Expression des Klons DN6 mit  $8,34 \pm 2,70$  stark hervor.

Außerdem war auffällig, dass die mRNA Expression des Transgens der Klone DN2 und DN4 in späten Passagen mit  $0,01 \pm 0,0$  bzw.  $0,15 \pm 0,06$ , verglichen mit der Expression in allen anderen Klonen (zwischen  $0,36 \pm 0,02$  und  $0,71 \pm 0,11$ ) besonders gering war. In diesen beiden Klonen konnte im Gegensatz den anderen Klonen in den späten Passagen keine GFP-Fluoreszenz mehr detektiert werden. Es ist zu vermuten, dass die Fluoreszenz der Klone DN2 und DN4 in den späten Passagen zu gering war, um sie per Durchflusszytometrie zu detektieren.

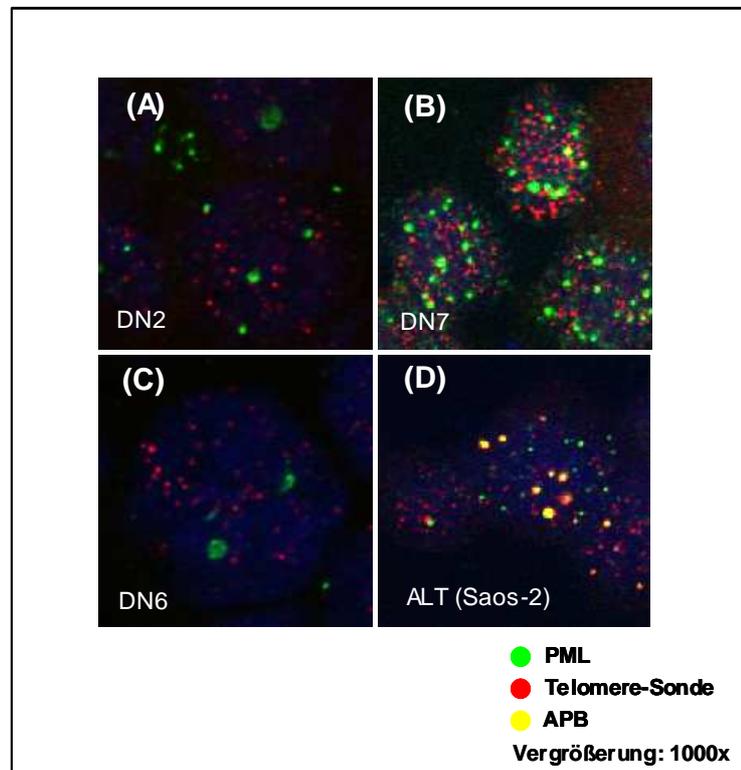


**Abb. 17: Expression des Transgens DNhTERT auf mRNA Ebene.** Die Expression in frühen Passagen (ca. Tag 10; schwarze Balken) und späten Passagen (ca. Tag 80; grau) wurde mit qPCRs ermittelt und relativ zur Expression von GAPDH dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass es in allen Klonen zu einer deutlichen Reduktion der Expression des Transgens zwischen frühen und späten Passagen kam. Die Expression des Transgens korrelierte somit invers mit der Telomeraseaktivität, da in allen Klonen nach anfänglicher erfolgreicher Inhibition der Aktivität eine Reaktivierung in späten Passagen zu beobachten war.

Um auszuschließen, dass an dem Entkommen der Klone von der Telomeraseinhibition der alternative Mechanismus der Telomerverlängerung „*Alternative lengthening of telomeres*“ (ALT) beteiligt war, wurden exemplarisch drei der sieben DNhTERT-

exprimierenden Klone (DN2, DN6, DN7) an d70 der Kultivierung auf das Vorkommen von ALT-assoziierten PML-Körperchen „*ALT-associated PML bodies*“ (APBs) untersucht. Bei APBs handelt es sich um PML-Körperchen, die mit Komponenten der Telomere wie z.B dem Protein TRF2 und telomerischer DNA, assoziiert sind und ein Marker für ALT sind.



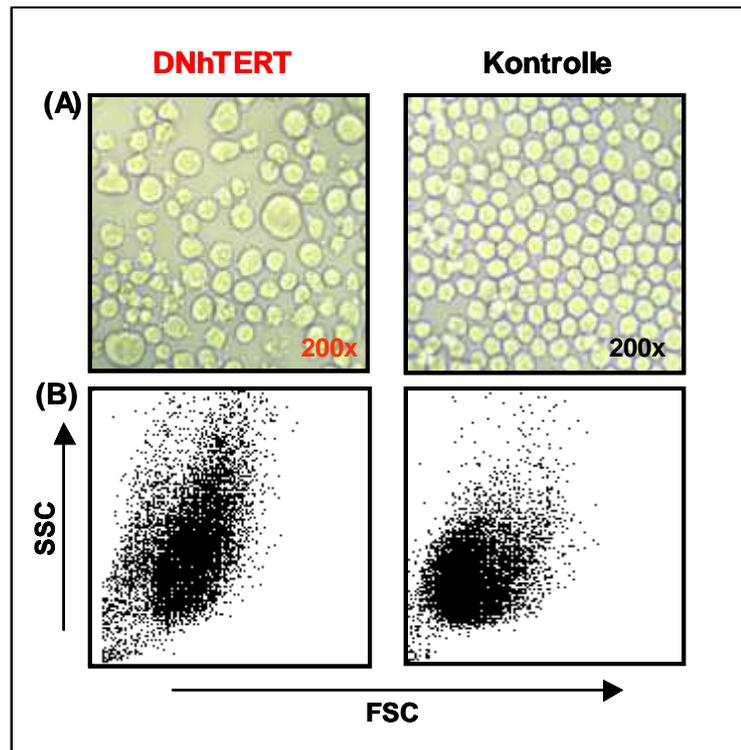
**Abb. 18: Detektion von APBs (ALT assoziierte PML Körperchen („bodies“)) in K562 Klonen, die der Telomeraseinhibition entkommen sind.** APBs wurden mittels eines PML Antikörpers (Cy5; grün) und einer Telomersonde (Cy3; rot) markiert. Die Ko-Lokalisation beider Komponenten (gelb) kennzeichnet einen APB. Dargestellt sind die Färbungen an den Klonen DN2 (A); DN7 (B) und DN6 (C) an Tag 70 der Langzeitkultur sowie der ALT positiven Zelllinie Saos-2 (D).

Ein Ko-Lokalisation von Telomerkomponenten und PML weist auf das Vorkommen von APBs hin. Als Kontrolle diente die Zelllinie Saos-2, die ihre Telomerlänge mittels des ALT-Mechanismus aufrecht erhält (Abb. 18 D). Die Markierung wurde von H. Sirma, Abteilung für Virologie, Heinrich Pette Institut, Hamburg durchgeführt.

In keinem der überprüften Klone konnten APBs nachgewiesen werden (Abb. 18 A-C). Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass an dem Entkommen von der Telomeraseinhibition der K562 Klone der ALT-Mechanismus nicht beteiligt war.

### 3.2.3 Zellzyklusverteilung und Apoptose

Um die Auswirkungen der Telomeraseinhibition mittels der Integration von DNhTERT genauer beschreiben zu können wurden an einem repräsentativen Klon aus Gruppe I (DN7) weitere Analysen durchgeführt. Bei Klonen dieser Gruppe war es neben der signifikanten Telomerverkürzung auch zu einer Verlangsamung der Wachstumsrate gekommen.

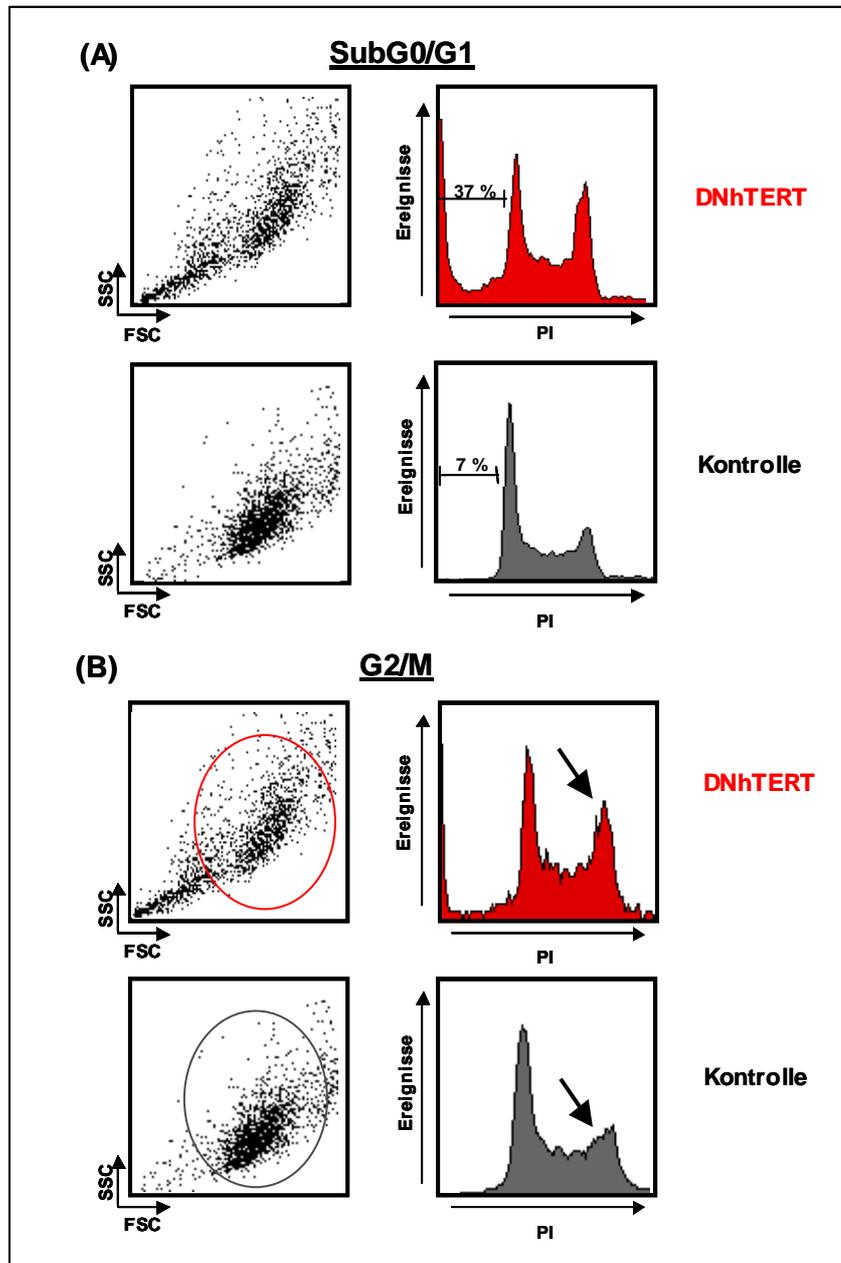


**Abb. 19: Morphologie der Zellen mit kritisch kurzen Telomeren.** (A) Lichtmikroskopische Untersuchung von Zellen des Klons DN7 (links, rot) mit einer Telomerlänge von 4 kb an Tag 50 der Langzeitkultur im Vergleich zu Zellen des Kontrollklons C1 identischer Passage (Vergrößerung 200x). (B) Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Populationen.

Es wurde die Morphologie, die Zellzyklusverteilung und die Apoptose in den Zellen bestimmt.

Betrachtete man die Morphologie der Zellen des Klons DN7 zum Zeitpunkt der stärksten Telomerverkürzung lichtmikroskopisch, waren neben einem hohen Anteil an Zelltrümmern auffallend große Zellen zu beobachten. Auch in den anderen Klonen der Gruppe I (DN2, 4, 9) konnte lichtmikroskopisch dieser Zustand beobachtet werden. Die Zellen des Kontrollklons C1 identischer Passage waren hingegen weiterhin gleichförmig und somit morphologisch unverändert seit Kulturbeginn (Abb. 19 A). Eine Analyse der Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellpopulation mittels

Durchflusszytometrie zeigte zusätzlich eine Verschiebung hinsichtlich der durchschnittlichen Größe der Zellen und eine erhöhte Granularität (Abb. 19 B).



**Abb. 20: Zellzyklusverteilung in Zellen mit kritisch kurzen Telomeren.** Für die Analyse des DNA-Gehalts wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Rot: Klon DN7; Grau: Kontrollklon C1. (A) Darstellung der gesamten Population. (B) Eingrenzung der im Zellzyklus befindlichen Zellen.

Diese Daten lassen vermuten, dass eine Subpopulation der Zellen des Klons DN7 als Antwort auf die kritische Telomerverkürzung in Apoptose oder replikative Seneszenz,

bzw. den Krisenzustand (*Crisis*, M2) übergegangen sind. Neben diesen morphologischen Daten sprach dafür auch die ermittelte Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit (Abb. 16 B).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zuerst die Zellzyklusverteilung der Zellen mit kritisch kurzen Telomeren im Vergleich zum Kontrollklon C1 analysiert (Abb. 20).

Es zeigte sich eine erhöhte SubG0/G1-Fraktion von  $36,6 \pm 1,4\%$  in den DNhTERT exprimierenden Zellen mit einer kritischen Telomerlänge von ca. 4 kb, wohingegen diese Fraktion in den Kontrollzellen einen Anteil von  $7,1 \pm 0,5\%$  aufwies (Abb. 20 A).

Außerdem war eine Verschiebung der im Zellzyklus befindlichen Zellen in Richtung G2/M Phase zu beobachten. Analysierte man nur diese Zellen ohne Berücksichtigung der SubG0/G1-Fraktion, konnten signifikant mehr Zellen des Klons DN7 mit kritisch kurzen Telomeren ( $32,4 \pm 1,8\%$ ) in G2/M detektiert werden als in der Population der Kontrollzellen ( $23,4 \pm 2,0\%$ ). Die Zellen in G0/G1 nahmen hingegen ab, wobei der Anteil der Zellen in S-Phase keinen signifikanten Unterschied zeigte (Abb. 20B und Tab.1).

**Tab. 1: Anteil der jeweiligen Zellzyklusphase ohne Berücksichtigung der SubG0/G1Fraktion.**

	G0/G1-Phase	S-Phase	G2/M-Phase
<b>DNhTERT</b>	<b>34,5+/-0,8%</b>	<b>19,4+/-1,2%</b>	<b>32,4+/-1,8%</b>
<b>Kontrolle</b>	<b>46,3+/-1,1%</b>	<b>23,5+2,9%</b>	<b>23,4+/-2,0%</b>

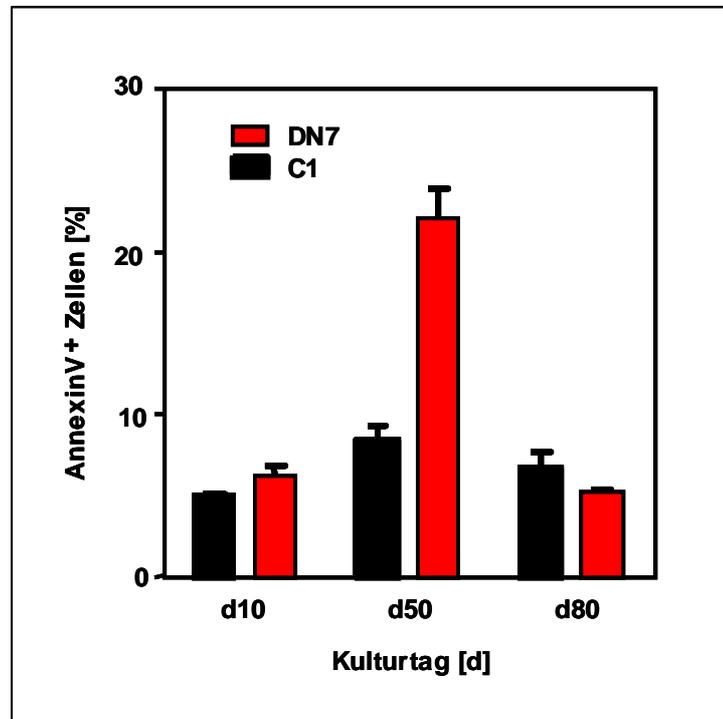
Aus den Daten zur Morphologie und den Zellzyklusanalysen lässt sich schließen, dass es durch die kritische Verkürzung der Telomere auf eine Länge von 4 kb zu Zelltod durch Apoptose bzw. Nekrose kam, und dass sich ein Teil der Zellen verlängert in der G2/M-Phase des Zellzyklus aufhielt, bzw. dort arretiert wurde. Diese Ergebnisse legen nahe, dass telomerabhängige Seneszenz, die sich neben anderer Merkmale in einem G1-Arrest manifestiert, nicht aufgetreten war.

Aufgrund der starken Zunahme der SubG0/G1-Fraktion wurde eine Analyse der apoptotischen Zellen durch Markierung mit AnnexinV durchgeführt und durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Markierung zeigte einen signifikanten Anstieg von  $8,4 \pm 1,6\%$  AnnexinV positiven Zellen auf  $22,2 \pm 1,8\%$  in den telomeraseinhibierten Zellen mit einer kritischen Telomerlänge von ca. 4 kb, während in DNhTERT positiven Zellen der frühen und

späten Passage der Anteil an AnnexinV positiven Zellen im Bereich der Kontrollzellen lag (Abb.21 A).

Dieses Ergebnis zeigt, dass es zur Induktion von Apoptose in K562 Zellen mit kritisch verkürzten Telomeren kam.



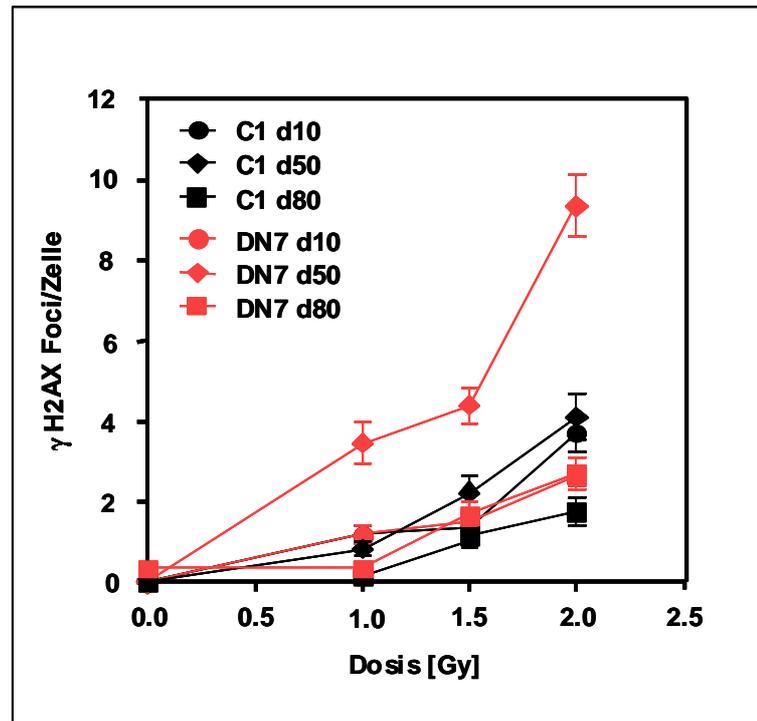
**Abb. 21: Detektion von Apoptose in Zellen mit kritisch kurzen Telomeren.** Zellen des Klons DN7 wurden an Tag 10, 50 und 80 der Langzeitkultur mit AnnexinV-PE und 7AAD markiert und gegen die Kontrolle C1 gemessen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte durchflusszytometrisch. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der ausschließlich AnnexinV positiven Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt.

### 3.2.4 DNA-Reparatur und genomische Instabilität

Die Zellzyklusanalyse der Zellen mit kritisch kurzen Telomeren ergab eine erhöhte G2/M-Phase des Zellzyklus (Abb. 20 B). Da dies auf eine verschlechterte DNA-Reparatur hinweisen kann wurde die Kapazität der DNA-Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) getestet.

Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Dosen  $\gamma$ -Bestrahlung behandelt und die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci 24 h nach Bestrahlung bestimmt. Diese Foci markieren DSBs, die nicht mehr repariert werden. Die Bestrahlungsversuche wurden in Kooperation mit K.Borgmann, Institut für Radioonkologie, UKE Hamburg durchgeführt.

Die Analyse der Daten ergab in Zellen mit kritisch kurzen Telomeren eine signifikant höhere Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci. Die Anzahl der Foci pro Zelle stieg bei einer Bestrahlungsdosis von 2,0 Gy bis auf durchschnittlich  $9,4 \pm 0,8$  an. In Zellen der frühen und späten Passage sowie in Kontrollzellen ließen sich hingegen nie mehr als durchschnittlich  $4,1 \pm 0,6$  Foci detektieren (Abb. 22).

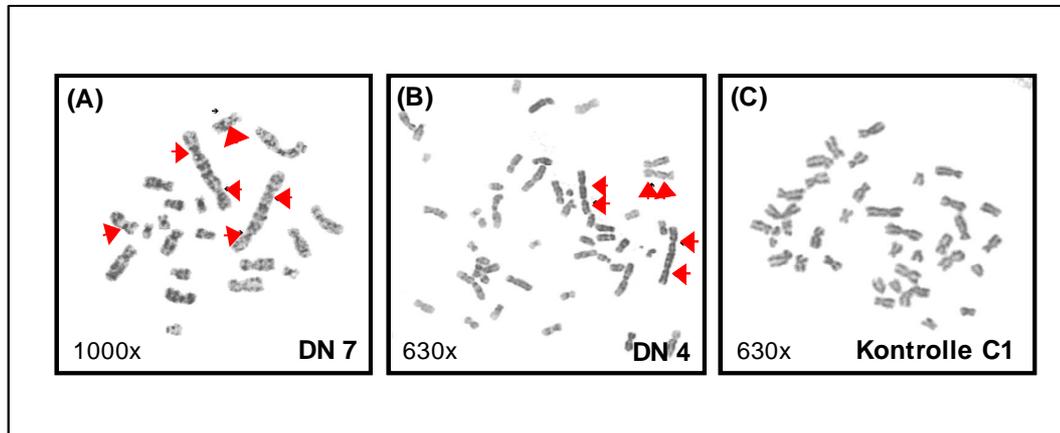


**Abb. 22:** Einfluss von ionisierender Bestrahlung auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Zellen mit kritisch kurzen Telomeren. Gezeigt ist die DNA-Reparatur Kapazität 24 h nach Bestrahlung. Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle wurden gegen die Bestrahlungsdosis von 0,0-2,5 Gy aufgetragen.

Da die Telomere verschiedener Chromosomen durch Verlust ihrer Funktion miteinander fusionieren können, ist es möglich dysfunktionellen Telomeren durch die Analyse von sogenannten *end-to-end-fusions* wie dizentrischen Chromosomen bzw. *Robertsonian-like Fusions* zu detektieren. Die Metaphasenchromosomen wurden in der Abteilung Zytogenetik der Hämatologie/Onkologie, UKE in Kooperation mit J.Dierlamm analysiert.

Das Vorkommen von dizentrischen Chromosomen wurde an Metaphasen der DNhTERT exprimierenden Klone DN4 und DN7 zum Zeitpunkt kritisch kurzer Telomere ermittelt und Kontrollzellen des Klons C1 gegenübergestellt. Nur in Zellen mit kritisch kurzen Telomeren wurden dizentrische Chromosomen beobachtet. Es konnte in 48% (Klon DN7) bzw. 28% (Klon DN4) der Metaphasen nach Auszählung von 25

Metaphasen dizentrische Chromosom detektiert werden, wohingegen in den Kontrollzellen in keiner der 25 analysierten Metaphasen ein dizentrisches Chromosom beobachtet wurde. In Abbildung 23 ist jeweils eine repräsentative Metaphase der Klone dargestellt.



**Abb. 23: Telomerdysfunktion in Zellen mit kritisch kurzen Telomeren.** Um Fusionen der Telomere unterschiedlicher Chromosomen zu ermitteln, wurden von den Klonen DN7 (A) und DN4 (B) mit kritisch kurzen Telomeren sowie dem Kontrollklon C1. (C) dizentrische Chromosomen in 25 Metaphasen ausgezählt. Jeweils eine repräsentative Metaphase ist dargestellt (Fotos D. Seeger, Zytogenetik, UKE).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression eines mutierten Allels der Telomerase-Untereinheit hTERT (DNhTERT) in allen sieben propagierten Klonen zur Inhibition der Telomeraseaktivität führte. In vier der sieben Klone (Gruppe I) verkürzte sich die Telomerlänge der Zellen in den kritischen Bereich für humane Zellen. Dies wurde durch eine Verminderung der Wachstumskapazität begleitet. Allerdings entkamen die Klone der Eradizierung durch die Verlängerung ihrer Telomerlänge, die durch die Reaktivierung der Telomerase verursacht wurde.

Analysierte man Zellen mit kritisch kurzen Telomeren (Klon DN7) wurde beobachtet, dass diese Zellen eine erhöhte Apoptoserate und eine verschlechterte DNA-Reparatur aufwiesen.

Zudem konnte in zwei Klonen mit kritisch kurzen Telomeren eine hohe Anzahl an Zellen (48% bzw. 28%) mit dizentrischen Chromosomen nachgewiesen werden. Die Bildung solcher Strukturen wird durch dysfunktionelle Telomere gefördert und erzeugt hohe genomische Instabilität.

Die ermittelten Effekte der Telomeraseinhibition an den Klonen DN4 und DN7 sind in Tabelle 2 noch einmal zusammengefasst dargestellt.

**Tabelle 2 Zusammenfassung der Einflüsse der Telomeraseinhibition (TI) mittels DNhTERT.**

Effekt der TI mit DNhTERT	
Telomerlänge	↓
Telomeraseaktivität	↓
Proliferation	↓
Apoptose	↑
DNA-Reparatur	↓
Genomische Instabilität	↑

Obwohl die Klone für einen Zeitraum von ca. 20 Tagen kritisch kurze Telomere aufwiesen und erhöhte Apoptoserate und genomische Instabilität zeigten, kam es nicht zum vollständigen Absterben der Klone und schließlich zur Re-Aktivierung der Telomerase. Deshalb stellt sich die Frage, ob für das Ausbleiben des kompletten Absterbens im Zusammenhang mit kritischer Telomerlänge das Fehlen eines intakten Signalwegs für Telomerdysfunktion in der Zelllinie K562, die einer Blastenkrise entstammt, verantwortlich ist. Zentrale bekannte Schalter dieser Signalgebung sind  $p16^{\text{INK4A}}$ /pRB und vor allem p53.

### 3.3 Bedeutung von p53 für BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen mit dysfunktionellen Telomeren

#### 3.3.1 Expressionsanalysen von DNA-Reparatur Genen

Wie zuvor beschrieben konnte in vier von sieben K562 Einzellklonen durch die Expression des Transgens DNhTERT zwar effektiv die Telomerase gehemmt und die Telomere bis auf eine kritische Schwelle verkürzt werden, aber alle analysierten Klone entkamen schließlich im weiteren Verlauf der Telomeraseinhibition. Da beobachtet werden konnte, dass die DNA-Reparatur in diesen Zellen zum Zeitpunkt der kritischen Telomerverkürzung gegenüber Zellen mit funktionellen Telomeren signifikant eingeschränkt war, wurde im Folgenden das Expressionsmuster der mRNAs von DNA-Reparatur-relevanten Genen untersucht. Diese Analyse wurde durchgeführt, um einen



Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass eine umfassende Dysregulation der DNA-Reparatur in K562 Zellen mit kritisch kurzen Telomeren vorlag. Dies lässt vermuten, dass der Reparatur übergeordnete Mechanismen/Signalwege beim Entkommen der Telomeraseinhibition eine Rolle spielen. Aus diesem Grund wurden die erhaltenen Daten mithilfe der Software MetaCore™ analysiert und zu einem Netzwerk angeordnet, welches weitere Proteine und Signalwege einschließt.

Abbildung 24 zeigt das mithilfe der Metacore™-Software generierte Netzwerk. Als zentrale Komponente aller dargestellten Signalwege erschien der Tumorsuppressor p53 sowie weitere an der Signalweiterleitung von kurzen Telomeren bekannte Komponenten wie RAD50 und MRE11.

Die verwendete Blastenkrisenzelllinie K562 ist negativ für funktionelles p53 und die Netzwerkanalyse unterstützt die Annahme, dieses Fehlen von p53 für das Ausbleiben einer suffizienten Induktion von Seneszenz bzw. Apoptose unter Telomeraseinhibition in BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen verantwortlich sein könnte.

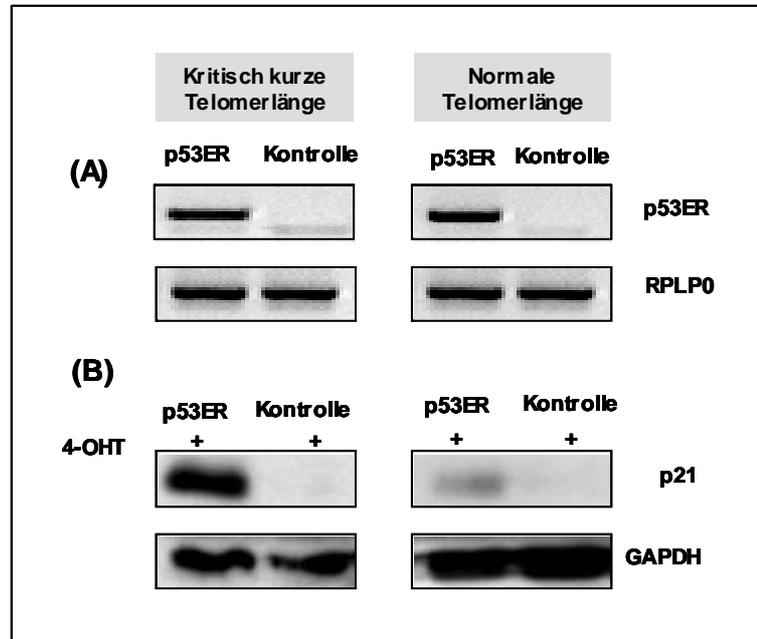
### **3.3.2 Expression von p53 in BCR-ABL<sup>+</sup> Zellklonen mit dysfunktionellen Telomeren**

Um die Vermutung zu überprüfen, dass der Tumorsuppressor p53 essentiell für die Eliminierung von BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen mit kritisch kurzen Telomeren ist, wurde das Protein stabil durch retroviralen Gentransfer in zwei DNhTERT exprimierende Klone der Gruppe I (DN4 und DN7) eingebracht.

Bei dem verwendeten Konstrukt handelt es sich um den Plasmidvektor pBABE-p53ER<sup>tam</sup>. p53 ist hier mit einer inaktiven Form des Östrogen-Rezeptors (ER) fusioniert. Das Fusionsprotein p53ER wird konstitutiv exprimiert, verbleibt aber aufgrund der ER-Komponente im Zytosol und kann nur durch entsprechende pharmakologische Induktion in den Nukleus gelangen. Durch Zugabe der Substanz 4-OHT (Tamoxifen) wird ER aktiviert in den Kern zu wandern und das fusionierte p53 kann als Transkriptionsfaktor fungieren.

p53 wurde, wie oben erwähnt in den Klonen DN4 und DN7 exprimiert und bei kritischer Telomerlänge induziert. Als Kontrolle dienten Zellen mit unverkürzten Telomeren (Kontrollklon C1). Außerdem wurde der korrespondierende Leervektor pBABE-ER<sup>tam</sup> („Kontrolle“) eingebracht.

Der erfolgreiche Einbau und die Expression des Konstrukts p53ER wurde durch eine semiquantitative RT-PCR überprüft und konnte in DNhTERT exprimierenden Zellen und Zellen mit einer normalen Telomerlänge nachgewiesen werden (Abb. 25 A).



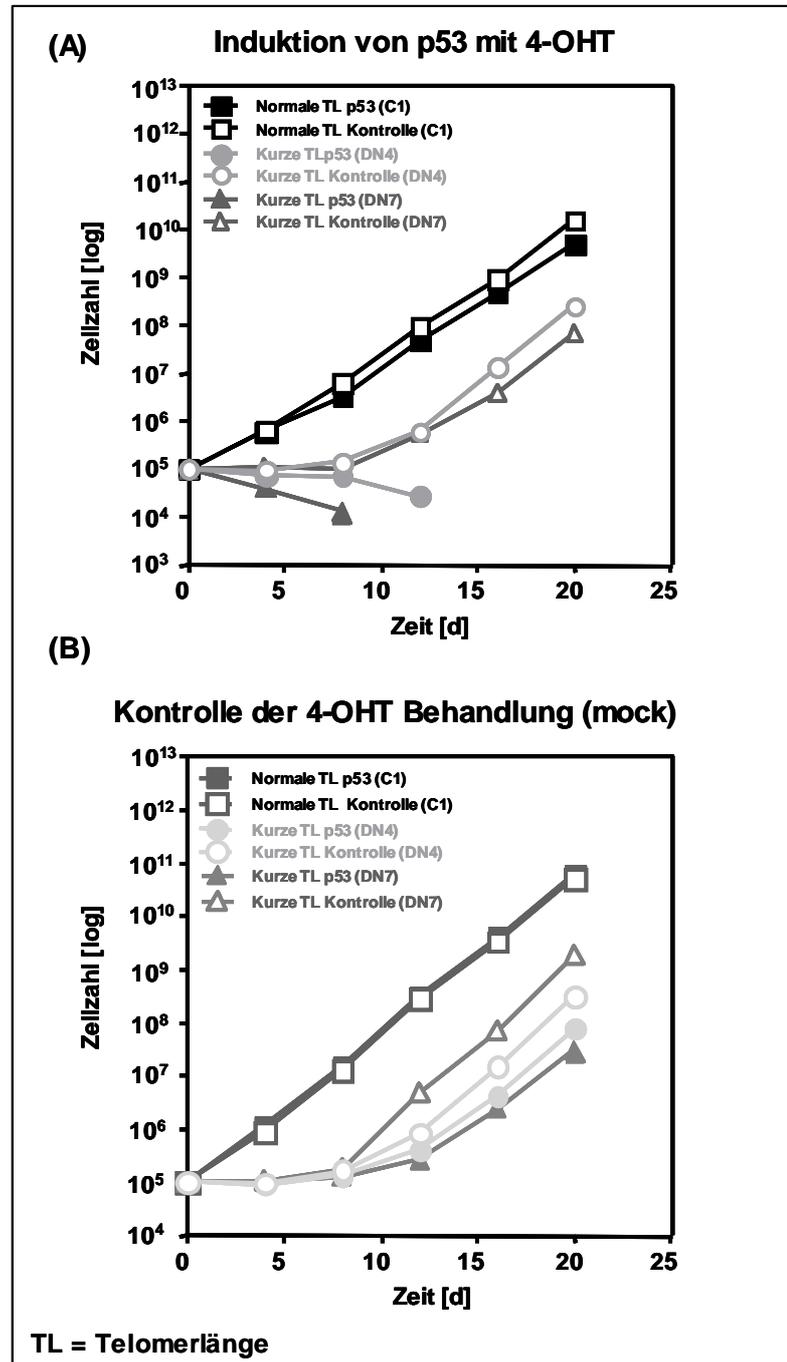
**Abb. 25: Expression von p53ER<sup>tam</sup> in K562 Zellen mit kritisch kurzen Telomeren und in Zellen mit normaler Telomerlänge.** Analyse der Expression des Vektors pBABE-p53ER<sup>tam</sup> in Klon DN4 (kritisch kurze Telomere) und des Klons C1 (normale Telomere). (A) RT-PCR der Integration des Vektors. Das Gen RPLP0 dient als Kontrolle. (B) Expression des p21 Proteins nach Behandlung mit 1,5 μM 4-OHT für vier Tage. GAPDH diente als Kontrolle.

Um die Funktion und Aktivität des integrierten Konstrukts zu überprüfen wurde die Proteinexpression des p53-Effektormoleküls p21, dessen Expression p53 als Transkriptionsfaktor steuert, ermittelt. (Abb. 25 B). In Zellen mit kritisch kurzen Telomere kam es zu einer sehr starken Erhöhung des Expressionslevels von p21 unter 4-OHT, wohingegen in Zellen mit normaler Telomerlänge (Klon C1) nur eine geringe Erhöhung der p21 Proteinexpression gegenüber der Leervektorkontrolle zu beobachten war.

### 3.3.3 Einfluss des Tumorsuppressors p53

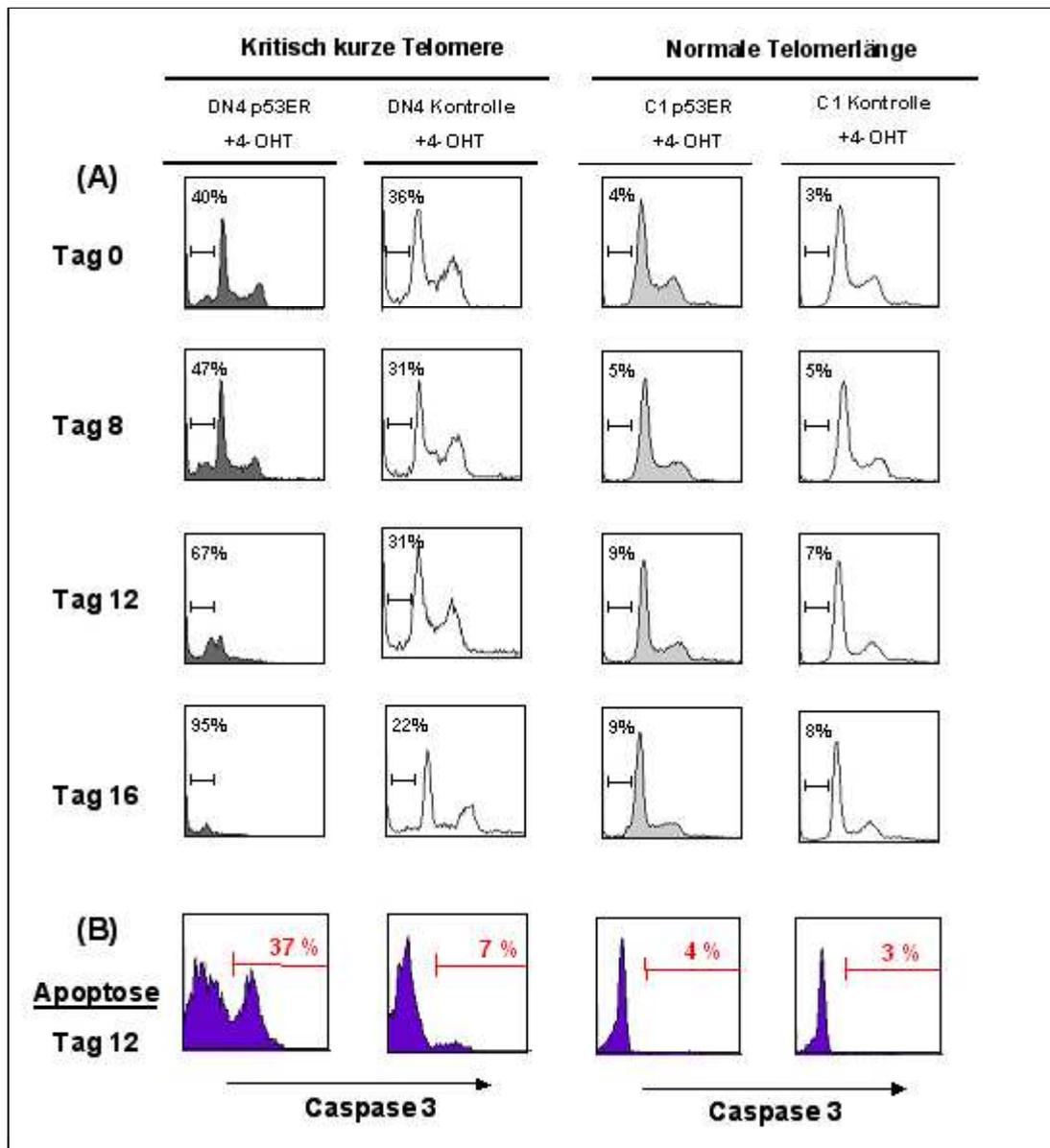
Nachdem die erfolgreiche Expression von p53 und seine Funktionalität als Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden konnte, wurde die Frage adressiert, ob es

durch die Anwesenheit von funktionellem p53 zur vollständigen Eradizierung der DNhTERT exprimierenden Klone mit kritisch kurzen Telomeren kommt.



**Abb. 26: Analyse der Proliferation von K562 Zellen mit kritisch kurzen und normalen Telomeren, die funktionelles p53 exprimieren.** Die Wachstumskapazität der Klone DN4, DN7 (kritisch kurze Telomere) und des Klons C1 (normale Telomerlänge) wurde in Kurzzeitkultur über 20 Tage ermittelt. (A) Induktion von p53ER mit 1,5  $\mu$ M 4-OHT. (B) Behandlung mit dem Lösungsmittel 100% MeOH (mock). Proliferation der Zellen wurde jeden 4. Tag bestimmt und als Logarithmus der Gesamtzellzahl gegen die Kultivierungszeit in Tagen [d] grafisch dargestellt.

Hierzu wurden sowohl die Klone DN4 und DN7 mit kritisch kurzen Telomeren als auch die Zellen mit normaler Telomerlänge (Klon C1) und die korrespondierenden Kontrollen über einen Zeitraum von 20 Tagen mit 4-OHT behandelt und die Zellzahl bestimmt (Abb. 15 A). Als Kontrolle wurden die gleichen Zellen mit dem Lösungsmittel Methanol behandelt (Abb. 15 B, „mock“).



**Abb. 27: Analyse des Zellzyklus und der Apoptose in K562 Zellen mit funktionellem p53.** (A) Analyse des Zellzyklus der Zellen des Klons DN4 (kritisch kurze Telomere) und des Klons C1 (normale Telomerlänge) erfolgte parallel zur Kurzzeitkultur alle vier Tage. Dargestellt sind nur die Tage 0, 8, 12 und 16. (B) Apoptose wurde durch Markierung mit einem Caspase3-PE Antikörper im FACS auch parallel jeden 4. Tag gemessen. Dargestellt ist nur Tag 12.

Während in Zellen mit einer normalen Telomerlänge kaum ein Einfluss des funktionellen p53 gegenüber dem Leervektor zu beobachten war, starben die Zellen der Klone DN4 und DN7 mit kritisch kurzen Telomeren, wenn sie funktionelles p53 exprimierten. Die korrespondierenden Leervektorkontrollen entkamen wie zuvor gezeigt (siehe Abb. 16 B) der Telomeraseinhibition durch DNhTERT (Abb. 26 A). Ohne Induktion des Konstrukts mit 4-OHT entkamen auch die p53ER exprimierenden Zellen der Klone DN4 und DN7 der Telomeraseinhibition (Abb. 26 B).

Parallel zur Wachstumskurve des Klons DN4 (kritisch kurze Telomere) und des Klons C1 (normale Telomerlänge) wurde eine Analyse des Zellzyklus durchgeführt und die Induktion von Apoptose durch Nachweis der Expression von Caspase 3 bestimmt (Abb. 27).

In Abbildung 27 A ist zu sehen, dass Zellen mit kritisch kurzen Telomeren des Klons DN4 an Tag 0 der Behandlung eine SubG0/G1-Fraktion von  $40,0 \pm 1,0\%$  (p53ER) bzw.  $36,0 \pm 0,3\%$  (Kontrolle) aufwiesen. Diese Fraktion nahm im Verlauf der Kultivierung in den p53-exprimierenden Zellen wie erwartet stark zu, bis kein Zellzyklusprofil mehr zu detektieren war. In der Leervektorkontrolle normalisierte sich hingegen die Verteilung, indem die SubG0/G1-Fraktion abnahm und sich dem Wert der Zellen mit normaler Telomerlänge näherte. Diese Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse des Kurzzeitproliferationsversuchs (Abb.26).

Mit Zunahme der SubG0/G1-Fraktion nahm in den Zellen des Klons DN4 auch die Expression von Caspase 3 zu. An Tag 12 der Behandlung mit 4-OHT waren  $36,4 \pm 1,2\%$  dieser Zellen positiv für Caspase 3, wohingegen die Caspase 3-Expression in den korrespondierenden Kontrollzellen mit  $6,4 \pm 0,5\%$  in der Größenordnung der Zellen des Kontroll-Klons C1 lag (Abb. 27 B).

Somit lässt sich festhalten, dass funktionelles p53 bewirkt, dass alle Zellen der beiden untersuchten K562 Klone DN4 und DN7 nach effektiver Telomeraseinhibition mit DNhTERT vollständig eliminiert werden konnten.

Dahingegen entkamen die Zellen ohne funktionelles p53 trotz nachweisbarem Einfluss der Telomeraseinhibition (Verkürzung der mittleren Telomerlänge in den kritischen Bereich, Reduktion der Proliferationskapazität, Veränderung der Morphologie, Erhöhung der Apoptoserate) der Eradizierung.

Demgegenüber führt die p53 Expression in K562 Kontrollzellen mit normaler Telomerlänge zu keinen zellbiologischen Einflüssen.

## 4. Diskussion

Zielgerichtete Therapienprinzipien (sog. „*molecular targeted therapy*“) stehen aktuell im Mittelpunkt der Krebsforschung.

Die Therapie der CML mit dem Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) Imatinib ist das herausragende Beispiel für den Erfolg solcher zielgerichteten Therapien. Seit der Einführung von Imatinib hat sich die Dauer der chronischen Phase signifikant verlängert, und sich damit auch die Progressionsrate der Krankheit in die akute Phase, die Blastenkrise deutlich reduziert. Allerdings kommt es in einer Subgruppe der Patienten zur Entstehung von Resistenzen gegenüber Imatinib und die Behandlung mit TKIs ist nicht kurativ, sondern führt zu einer sogenannten minimalen Resterkrankung.

Vielversprechende neue Ansätze sind daher Kombinationstherapien von TKIs mit Medikamenten, die alternative Signalwege der Krebszelle angreifen. Die Inhibition der Telomerase ist in diesem Zusammenhang ein hochattraktives Prinzip zur Behandlung maligner Tumore und die CML stellt hierbei eine Modellerkrankung für die Anwendung telomeraseinhibitorischer Strategien dar.

### **CML als Modellkrankheit für Telomeraseinhibition**

Der Einsatz von Telomeraseinhibitoren bedingt bestimmte Voraussetzungen in malignen Zellen, z.B. ist die initiale Telomerlänge entscheidend für die Zeit, bis die Zellen in telomerinduzierten Wachstumsarrest oder in Apoptose eintreten können. Je kürzer die Telomere sind, desto früher kann dies geschehen<sup>51</sup>. In der CML sind die Telomere der Zellen des malignen Ph<sup>+</sup> Klons in der chronischen Phase signifikant gegenüber der gesunden hämatopoetischen Zellen verkürzt und verkürzen sich weiter mit Progression der Krankheit<sup>96</sup>. Dies bietet sehr gute Voraussetzungen für die Anwendung von Telomeraseinhibitoren. Darüber hinaus benötigt die Therapie aber weiterhin Zeit, bis zum Erreichen eines zellbiologischen Effekts, da zusätzliche Zellteilungen durchlaufen werden müssen bis eine kritische Telomerlängenschwelle erreicht ist. Hier stellt die chronische Phase der CML mit ihrer langen Latenz ein ausreichend großes zeitliches therapeutisches Fenster.

Nicht nur in der CML, sondern auch in anderen Knochenmarkserkrankungen (sogenannten *bone marrow failures* (BMFs)), deren Gemeinsamkeit eine Funktionsstörung der hämatopoetischen Stammzelle ist, ist die Telomerbiologie stark mit dem Krankheitsverlauf korreliert. In der Aplastischen Anämie (AA) sind ebenfalls die Telomere der Granulozyten signifikant verkürzt<sup>123</sup> und die Verkürzung nimmt mit dem

Grad der Zytopenie, dem Kennzeichen der Erkrankung, zu<sup>124</sup>. Auch in der Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) deren Merkmal darin besteht, dass ein GPI-Anker negativer Klon einen Großteil der Hämatopoese übernimmt, ist zwischen gesunden (GPI-Anker positiven Zellen) und kranken Zellen eine signifikante Telomerverkürzung nachzuweisen<sup>125</sup>. Die Gemeinsamkeit dieser Erkrankungen scheint trotz völlig verschiedener Krankheitspathophysiologie (maligne Erkrankung vs. nicht maligner Erkrankung) ein Wachstumsvorteil der krankhaft veränderten Zelle zu sein, die sich in der Verkürzung der Telomere manifestiert und diese so von den gesunden Zellen abgrenzbar macht.

Auch ist die Telomeraseaktivität in CD34<sup>+</sup>-Zellen von Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS) und in Patienten mit Akuter myeloischer Leukämie (AML) sowie in der CML erhöht<sup>112,114</sup>, wobei es zur Rolle der Telomerase in der CML widersprüchliche Studien gibt. Betrachtet man isoliert die Aktivität des Enzyms so findet sich in CD34<sup>+</sup>-Stammzellen eine Erhöhung der Aktivität in der chronischen Phase um das 2-5fache und in Patienten der Blastenkrise sogar eine Erhöhung um das 10-50fache<sup>114</sup>. In Zellen des peripheren Bluts und Knochenmarks konnte ähnliches beobachtet werden, wobei die Enzymaktivität in Zellen der chronischen Phase in den meisten Fällen nicht relevant über der in Zellen von gesunden Spendern lag<sup>126</sup>. Zusätzlich konnte in einer weiteren detaillierten Untersuchung gezeigt werden, dass erhöhte Telomeraseaktivität aus der vermehrten Proliferation der BCR-ABL<sup>+</sup>-CD34<sup>+</sup>-Zellen resultiert, da diese mit der Zellzyklusaktivität korreliert<sup>127</sup>. Eine solche Korrelation wurde auch in soliden Tumoren mit dem gleichen Ergebnis gefunden<sup>128</sup>. Zudem wurde in der gleichen Arbeit gezeigt, dass die quantitative Expression der RNA-Untereinheit in Zellen der chronischen Phase um das fünffache reduziert ist. Zur Expression der hTERT mRNA konnte ähnliches beobachtet werden<sup>129</sup>. Diese letzteren Daten könnten die beobachtete signifikante Telomerverkürzung in BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen erklären.

Telomeraseaktivität in der CML ist außerdem mit erhöhter genomischer Instabilität verbunden<sup>115</sup>. Dieser Punkt unterstreicht zusätzlich, dass die Inhibition der Telomerase ein sehr vielversprechender Therapieansatz in der CML ist.

Diese theoretischen Voraussetzungen machen die CML hoch attraktiv für die Anwendung telomeraseinhibitorischer Prinzipien. Die Frage, welche molekularen Bedingungen erfüllt sein müssen, damit diese Strategien erfolgreich angewendet werden können, wird im Folgenden diskutiert.

### Limitationen des verwendeten Modells

Der Einsatz von neuen therapeutischen Substanzen in der Klinik muss zunächst *in vitro* und präklinisch *in vivo* getestet werden, um die theoretischen Merkmale zu überprüfen und erste Einschätzungen, z.B. zur Zytotoxizität machen zu können. Dabei ist die Wahl des geeigneten Systems entscheidend, um valide Ergebnisse zu erhalten.

Da weder der hier verwendete pharmakologische Ansatz der Telomeraseinhibition noch die Expression des dominant-negativen mutierten Allels von hTERT (DNhTERT) in BCR-ABL<sup>+</sup> K562 Zellen zunächst eine erfolgreiche Eliminierung bewirkte, stellt sich die Frage, inwiefern das angewandte Modellsystem einen Einfluss auf den fehlenden Erfolg der Telomeraseinhibition hat.

Die hier verwendeten K562 Zellen entstammen einer Patientin der Blastenkrise der CML. Dies lässt vermuten, dass zusätzliche genetische Veränderungen, die diese Zellen gegenüber der chronischen Phase erlangt haben, Einfluss auf deren biologisches Verhalten haben. Bisher wurden in allen Ansätzen Blastenkrisezellen für die Evaluation von telomeraseinhibitorischen und telomerasezerstörenden Strategien in der CML verwendet<sup>130-132</sup>, da es weder Zelllinien der chronischen Phase gibt noch CML Mausmodelle eine klar definierte chronische Phase entwickeln<sup>133</sup>.

Warum Zellen der Blastenkrise als Modell einer BCR-ABL<sup>+</sup> Leukämie von eingeschränktem Nutzen sind, wird deutlich, wenn man die Vielzahl an zytogenetischen Veränderungen betrachtet, die diese Zellen tragen. Diese entstehen durch die erhöhte Proliferation der leukämischen Stammzelle, die durch die onkogene Tyrosinkinase BCR-ABL hervorgerufen wird und nehmen mit der Progression der Krankheit von der chronischen Phase über die Akzelerationsphase zur Blastenkrise zu.

Die häufigsten genetischen Veränderungen sind eine Trisomie 8, Isochromosom 17q und eine Trisomie 19<sup>97,134</sup>. Eine weitere sehr häufige (30% der Patienten) molekulare Veränderung in der myeloischen Blastenkrise ist die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 durch Deletionen bzw. Mutationen<sup>135,136</sup>.

Die hier verwendete Zelllinie K562 hat noch eine weitere molekulare Veränderung, die sich auf die effektive Signalgebung von dysfunktionellen Telomere potentiell auswirken könnte und damit den Einsatz von Telomeraseinhibitoren einschränkt, denn auch der Tumorsuppressor p16<sup>INK4A</sup> ist hier inaktiv<sup>137</sup>. Diese Veränderung zählt im Gegensatz zu der Inaktivierung von p53 nicht zu einem häufigen Ereignis in der myeloischen Blastenkrise, tritt aber in 50% der lymphoiden CML Blastenkrise auf<sup>97</sup>. p16<sup>INK4A</sup> ist in seneszenten Zellen überexprimiert und hyperphosphoryliert pRB<sup>138</sup>. In TRF2-defizienten primären humanen diploiden Fibroblasten (HDFs), deren Phänotyp durch

dysfunktionelle Telomere gekennzeichnet ist, wurde gezeigt, dass durch die parallele Inhibition von p53 und p16<sup>INK4A</sup> die Fähigkeit Seneszenz auszulösen vollständig unterdrückt ist, wohingegen alleinige p53-Defizienz bei intaktem p16<sup>INK4A</sup> nur anteilig telomerinduzierte Seneszenz unterdrücken kann<sup>139</sup>. In TRF2 defizienten embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) hingegen spielt p16<sup>INK4A</sup> anscheinend keine essentielle Rolle<sup>63</sup>. Hier reicht der alleinige Verlust von p53, um Seneszenz vollständig zu verhindern.

Gerade die Inaktivierung der für die Induktion von Apoptose und zellulärer Seneszenz bedeutenden Tumorsuppressoren stellt vermutlich ein Problem für die effektive Telomeraseinhibition dar. Aber gerade weil diese Faktoren so wichtig sind um die Homöostase der Zelle zwischen Proliferation und Entwicklung von Krebs zu gewährleisten, ist ihre Unterdrückung ein Schritt bei der Entstehung der meisten Tumore.

Ein alternativer Ansatz zur pharmakologischen Telomeraseinhibition mit BIBR1532 wurde mit der Expression von DNhTERT verfolgt. Mit diesem Ansatz sollte evaluiert werden, welchen Einfluss potente nicht-pharmakologische Telomeraseinhibition auf BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen *in vitro* hat. Allerdings konnte nur in einem Teil der Zellen ein Einfluss des Transgens beobachtet werden, was u.a. in der verwendeten Methodik des retroviralen Gentransfers begründet sein könnte.

Die DNhTERT-exprimierenden Klone wurde in Anlehnung an andere Arbeiten<sup>119,130</sup> klonal propagiert. Auf Grundlage der Telomerlängendynamik und der Wachstumskinetik der expandierten Klone konnten zwei Gruppen mit spezifischem telomerbiologischem Verhalten charakterisiert werden. Eine Gruppe in der deutliche Einflüsse der Telomeraseinhibition zu beobachten waren (Gruppe I) und eine Gruppe (Gruppe II) in der sich trotz erfolgreicher Integration und Expression des Transgens kein Einfluss der Inhibition nachweisen ließ. Da der Locus der Integration von Retroviren ins Wirtsgenom variiert<sup>140</sup>, kann es zu einer Heterogenität zwischen den einzelnen Klonen im Hinblick auf die erfolgreiche Expression des Transgens kommen<sup>141</sup>.

Mit der Kultivierungszeit ist es sowohl reproduzierbar zur verminderten Expression des Transgens DNhTERT gekommen als auch vermutlich zur Hochregulation der intrinsischen hTERT-Expression, um so kompetitiv der Wirkung des dominant-negativen Allels zu begegnen. Die verminderte Expression des Transgens konnte zwar in den Klonen mittels qPCR detektiert werden, durchflusszytometrisch war eine stark verminderte GFP-Fluoreszenz jedoch nur in zwei Klonen zu beobachten. In diesen war die mRNA-Expression annähernd an der Nachweisgrenze.

Aus den Ergebnissen der qPCR lässt sich schließen, dass die Expression von DNhTERT nach einer Phase der effektiven Telomeraseinhibition bei kritischer Telomerverkürzung über ca. 20 PDs in den späten Passagen nicht mehr effizient genug war, um die intrinsische hTERT-Expression kompetitiv zu unterdrücken. Dies korreliert auch mit den Daten der Telomeraseaktivitätsmessung.

Zudem war in einigen Klonen die Transgenexpression in den frühen Passagen sehr stark, was für eine hohe Kopienzahl pro Zelle spricht. Die Integration folgt einer biologischen Verteilung, und während einige Zellen keine Kopie haben, integriert sich das Gen in anderen Zellen sehr häufig<sup>142</sup>. Da die Anzahl der Kopien die Wahrscheinlichkeit der Negativselektion erhöhen kann<sup>143</sup>, ist dies möglicherweise ein Grund für den nachlassenden Effekt in der späten Phase der *in vitro* Expansion.

Da die Inhibition der Telomerase als mögliche therapeutische Strategie in der CML hochattraktiv ist, wurde schon in einer früheren Arbeit ein DNhTERT-Konstrukt in K562 Zellen exprimiert und dessen Einflüsse untersucht<sup>130</sup>. Die Autoren konnten als Antwort auf die Telomeraseinhibition durch das dominant-negative Konstrukt Telomerverkürzung sowie erhöhte Apoptose und die Bildung von Anaphase-Brücken, die vermehrte genomische Instabilität vermitteln, nachweisen. Von insgesamt vier propagierten Klonen wurden zwei eradiziert, während die beiden anderen Klone teilweise zwar reduzierte Proliferationsgeschwindigkeit zeigten, aber letztendlich der Inhibition entkamen. Die Autoren erklären diesen Punkt damit, dass Telomeraseinhibition ein zu starker selektiver Nachteil für diese hochmalignen Zellen darstellt.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Gegensatz dazu keiner der DNhTERT exprimierenden Klone komplett eliminiert werden, sondern alle Klone entkamen schlussendlich der vollständigen Eradizierung. Dies geschah in vier von sieben Klonen unter dem Druck des Krisenzustands (*Crisis/M2*), der durch kritisch verkürzte Telomere verursacht wurde. Vermutlich liegt diesem Entkommen die Selektion von Subklonen, die in der Lage waren die Telomerase zu reaktivieren zugrunde. Das Entkommen von der Wirkung retroviral eingebrachter Genen konnte z.B. schon bei Suizidgenen in Tumorzellen beobachtet werden<sup>141</sup>. Als Gründe für das Entkommen von einem solchen Gentherapieansatz gelten genetische sowie epigenetische Instabilität, die mit dem Integrationslokus, aber auch mit der Biologie des Tumors verknüpft sind. Sicher hat auch das verwendete Vektorkonstrukt einen potentiellen Einfluss.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar der Einsatz von DNhTERT zur Telomeraseinhibition im Sinne eines „*proof of principle*“ Ansatzes zu sehen ist, dieser

aber gezeigt hat, dass es BCR-ABL<sup>+</sup> K562 Blastenkrisenzellen möglich war durch induzierte Telomerverkürzung in den Krisenzustand (*CrisisM2*) zu gelangen. Allerdings waren die Zellen in der Lage, diesem durch Selektion von Subklonen zu entkommen, da aufgrund der molekularen Defizite, wie dem Fehlen von funktionellem p53 oder auch p16<sup>INK4A</sup>, trotz immenser Telomerdysfunktion keine effiziente Apoptose oder Seneszenz in den Zellen ausgelöst werden konnte.

### **Rolle von p53 für Telomeraseinhibition**

In einer gesunden und genotypisch intakten Zelle führt kritische Telomerverkürzung und die damit verbundene Telomerdysfunktion zur Induktion von replikativer Seneszenz oder auch Apoptose, um die Bildung neoplastischer Zellen zu unterbinden. Das in dieser Arbeit gezeigte Entkommen der Klone aus dem Krisenzustand durch Reaktivierung der Telomerase in Subklonen spricht für ein starkes Maß an genomischer Instabilität. Die Zellen waren nicht in der Lage die kritische Telomerverkürzung zu erkennen und effizient Apoptose oder Seneszenz auszulösen. Da die dysfunktionellen Telomere nicht als solche erkannt werden, liegen möglicherweise Störungen in Signalwegen, bzw. deren Kontrollpunkten (*Checkpoints*), die DNA-Schäden vermitteln vor. Das Protein p53 spielt in dieser Signalgebung eine entscheidende Rolle und ist in K562 Zellen bekanntermaßen inaktiv.

Die Bedeutung von p53 für genetische Instabilität und die Signalgebung von dysfunktionellen Telomeren ist unter anderem in Mausmodellen sehr detailliert untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass Doppel-Knockout Mäuse für Telomerase und p53 anfälliger für die Bildung von Tumoren sind. Der Verlust von p53 in Telomerase-Knockout-Mäusen (*mTR*<sup>-/-</sup>) verursacht eine Akzeleration des Transformationsprozesses. Somit scheint intaktes p53 eine essentielle Rolle in der Prävention von genetischer Instabilität aufgrund von kritisch kurzen Telomeren zu spielen<sup>59,144</sup>.

In K562 Zellen, die ein Ansprechen auf die Telomeraseinhibition durch das Transgen DNhTERT gezeigt haben, konnte vermehrte Apoptose detektiert werden. Diese führte zwar nicht zur Eradizierung des Klons, zeigt aber, dass prinzipiell die Telomerverkürzung ab einer kritischen Länge Apoptose induzieren kann. Diese muss von p53 sein, da die Zellen kein funktionelles p53 besitzen. Die Betrachtung von Studien zur Telomeraseinhibition in humanen malignen Zellen macht deutlich, dass der p53-Signalweg nicht immer entscheidend für effektive Telomeraseinhibition sein muss.

So entkamen eine Reihe von Zellen, die für funktionelles p53 negativ sind, wie die Myelomonozyten Zelllinie U937 und die Megakaryozyten Linie Ut-7<sup>145</sup> sowie HEK293<sup>146</sup> Zellen nach anfänglichem Einfluss der Behandlung und erlangten ihre Telomeraseaktivität zurück. In der ebenfalls p53 negativen Prostatakarzinomzellen DU-145 wurde sowohl DNhTERT exprimiert als auch RNA-Untereinheit der Telomerase hTR gehemmt. In beiden Fällen kam es zwar zum Einfluss auf die Proliferation, aber es konnte kein Proliferationsarrest oder Apoptose im Beobachtungszeitraum detektiert werden<sup>147,148</sup>.

Da aber in einer Vielzahl p53 inkompetenter Zelllinien die Inhibition der Telomerase zur erfolgreichen Eradizierung der Zellen durch Apoptose oder zum Wachstumsarrest geführt hat<sup>118,148</sup> ist anzunehmen, dass p53-unabhängige Wege die Signalgebung von dysfunktionellen Telomeren übernehmen können<sup>149</sup>. Es wird diskutiert, dass in Zellen, die der Telomeraseinhibition entkommen sind, Komponenten dieser Signalwege ebenfalls nicht funktionell sind.

In K562 Zellen ist z.B. zusätzlich zu p53 der Tumorsuppressor p16<sup>INK4A</sup> deletiert. Da die Signalgebung über den p16<sup>INK4A</sup>/pRB-Signalweg in humanen Zellen für die replikative Seneszenz als Antwort auf kritisch kurze Telomere eingeschlagen werden kann<sup>63</sup>, könnte das Fehlen dieser Komponente einen Einfluss auf das Versagen der Telomeraseinhibition haben. Es gibt hierzu publizierte Daten, die besagen, dass humane Zellen mit kurzen Telomeren ohne p53 aber mit funktionellem p16<sup>INK4A</sup> in replikative Seneszenz gehen<sup>62,150</sup>.

Zur Beantwortung der Frage, warum die hier verwendeten K562 Zellklone trotz signifikanter Telomerverkürzung in einen kritischen Bereich der telomervermittelten Apoptose letztlich entkommen sind, wurde Wildtyp p53 in diesen Zellen exprimiert. Die Vermutung der wichtigen Rolle des Proteins wurde durch Netzwerkanalysen differentiell exprimierter DNA-Reparaturgene unterstützt.

In der Tat durchliefen K562 Zellen, die zuvor der Telomeraseinhibition entkommen waren, Apoptose, die zur vollständigen Eradizierung der Zellklone führte, während in K562 Zellen mit funktionellen Telomeren nur ein geringer Einfluss des Tumorsuppressors zu beobachten war<sup>151</sup>.

Dies zeigt deutlich, wie essentiell funktionelles p53 für erfolgreiche Telomeraseinhibition in BCR-ABL<sup>+</sup> K562 Zellen ist.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass in BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen der genetische Hintergrund sehr entscheidend für den Erfolg der Anwendung von Telomeraseinhibition ist. Die Analyse des Status von p53, der die zentrale Rolle in der

Signalgebung von DNA-Schäden und telomervermittelter Seneszenz bzw. Apoptose spielt, könnte in einer Vielzahl von Zelltypen eine entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung von telomeraseinhibitorischen bzw. telomerzerstörenden Substanzen sein.

### **Anwendung von Telomeraseinhibition**

Zwar bietet der Einsatz von telomerasehemmenden Strategien auf den ersten Blick einen universellen Ansatz für die Krebstherapie, aber die Anwendung solcher Substanzen erfordert eine Reihe an Voraussetzungen, die nur in wenigen Krankheiten gegeben sind<sup>152</sup>, wie z.B. eine lange stabile Krankheitsphase.

Obwohl Telomeraseinhibitoren in verschiedenen Tumorentitäten bereits in klinischen Studien erprobt werden<sup>152</sup>, ist man weiterhin auf der Suche nach vielversprechenden Strategien und dafür geeigneten Kandidaten<sup>51,117</sup>.

Entscheidend erscheint hierfür auch die Evaluation in verschiedenen Tumorentitäten, da zwar die Telomerase annähernd ubiquitär vorkommt, sich aber die Zellen im Grad ihrer Malignität und in ihrer molekularen Ausstattung unterscheiden. Es ist anzunehmen, dass diese Punkte Einfluss auf die Effizienz der Therapien haben können, da die Verkürzung und damit verbundene Dysfunktion der Telomere genomische Instabilität fördert und diese die Bildung von Resistenzen gegenüber dem Inhibitor, bzw. die Aktivierung alternativer Wege (ALT) unterstützen kann<sup>152,153</sup>.

Neben der Evaluation der Substanzen *in vitro* sind vor allem *in vivo* Daten zur Tumorsuppressivität wichtig. Der Telomeraseinhibitor BIBR1532 konnte nicht nur in der Lungenkrebszelllinie NCI-H460 Seneszenz induzieren, sondern auch erfolgreich die Bildung von Tumoren durch prä-seneszente Fibrosarkomzellen reduzieren. Dass die Substanz den Tieren oral verabreicht werden konnte ist ein weiterer wichtiger Vorteil<sup>118</sup>. Die Anwendung des Inhibitors an BCR-ABL<sup>+</sup> K562 Zellen war hingegen nicht erfolgreich. Obwohl eine deutliche Reduktion der Telomerlänge eintrat, konnte keine Veränderung der Proliferation oder Apoptose bzw. Seneszenz beobachtet werden. Aus der beobachteten Plateaubildung in der Telomerlänge könnte sich schließen lassen, dass Zellen ihre Telomerlänge durch den telomeraseunabhängigen Mechanismus ALT aufrechterhalten. Eine solche Adaption wird häufig als mögliche Resistenzbildung angeführt, konnte aber bisher nur vereinzelt in Zellen, die den Krisenzustand erreichten, beschrieben werden<sup>153</sup>. In der vorliegenden Arbeit fand sich kein Hinweis auf eine Rolle von ALT für die Resistenzentwicklung in BCR-ABL<sup>+</sup> K562

Zellen, da es auch nicht zu einer auffälligen Telomerverlängerung, die ein Kennzeichen von ALT-ausübenden Zellen ist, kam<sup>83</sup>.

Eher ist anzunehmen, dass in den Zellen residuelle Telomeraseaktivität vorhanden ist, da die durch BIBR1532 erzielte Telomerverkürzung mit 13 bp/PD sehr gering war und nicht annähernd der Situation in telomerasenegativen somatischen Zellen entspricht, die einen Telomerverlust von 50-200 bp/PD aufweisen. Durch Messungen der Kinetik der Substanz wurde an HeLa Zellextrakten beschrieben, dass 10 µM BIBR1532 zwar eine Verlängerung der Telomere unterbindet, aber die Telomerase nicht vollständig hemmt<sup>154</sup>. Da für die durchgeführte Telomeraseaktivitätsmessung aufgrund der Reversibilität der Hemmung die Substanz BIBR1532 direkt zum isolierten Protein der K562 Zellen gegeben wurde<sup>118,155</sup>, kann über die tatsächliche Aktivität des Enzyms unter Kulturbedingungen nur spekuliert werden.

Auch in Keimbahn- und Chondrosarkomzelllinien waren durch die Behandlung mit BIBR1523 keine Einflüsse, bzw. nur leichte und vorübergehende Veränderungen auf die Proliferation der Zellen zu beobachten<sup>156,157</sup>. Dies lässt vermuten, dass die Substanz in einer Vielzahl von Zelltypen ineffizient ist.

Im Vergleich zu der Substanz BIBR1532 gibt es aber mittlerweile Fortschritte in der Entwicklung von alternativen Telomeraseinhibitoren. Für weitere Analyse in der CML eignet sich sehr wahrscheinlich besonders gut die Substanz GRN163L<sup>158</sup>. Bei dem Molekül handelt es sich um ein Lipid-konjugiertes Oligonukleotid, das komplementär zur Telomerase-RNA (hTR) ist. Neben fünf weiteren klinischen Studien u.a. auch in soliden Tumoren wird die Substanz zur Zeit in der Chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) in Phase I und II Studien getestet (<http://www.cancer.gov>)<sup>159</sup>.

Die Gründe, aus denen die CLL für diese Studie gewählt wurde sind die Korrelation der Telomerlängenverkürzung mit anderen Markern für eine schlechte Prognose der Krankheit und hohe Telomeraseaktivität. Diese Kriterien erfüllt auch die CML. Die Korrelation von verkürzten Telomeren und schlechter Prognose konnte auch hier gezeigt werden<sup>113</sup>. Außerdem sind die Telomere der leukämischen Zellen signifikant kürzer als die der gesunden Zellen<sup>96</sup>, und die Zeit, in der die Krankheit von der chronischen Phase zur Blastenkrise übergeht, korreliert mit der Länge der Telomere<sup>111</sup>. Gegenüber der Anwendung in CLL-Patienten deren Erkrankung vor allem durch reduzierte Apoptose der leukämischen Zellen charakterisiert ist, scheint die gesteigerte Proliferationsrate in BCR-ABL<sup>+</sup> leukämischen Zellen einen Vorteil der CML für telomeraseinhibitorische Ansätze zu bieten.

Sehr interessant wäre es auch in BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen Strategien anzuwenden, die die spezifische Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT nutzen. Solche Vektor-basierenden gentherapeutische Ansätze integrieren z.B. pro-

apoptotische Transgene wie *bax*, die unter der Kontrolle des hTERT-Promotors stehen in das Genom und induzieren so spezifisch in Tumorzellen Apoptose. Diese Strategien sind schon in humanen und murinen Zelllinien erfolgreich getestet worden und auch *in vivo* konnte das Wachstum von Xenograft-Tumoren potent eingeschränkt werden. Zudem konnten die Autoren zeigen, dass die Integration des Vektors in CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Progenitorzellen keinen signifikanten Unterschied zu normalen telomerasenegativen Zellen zeigte<sup>160</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass die hTERT-Promotoraktivität in diesen Vorläuferzellen zu gering ist, um einen Effekt des Transgens hervorzurufen. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass gentherapeutische Telomerasepromotor-basierende Strategien sehr selektiv für Tumorzellen sind.

Es wäre vor allem interessant, die Integration dieser Vektoren in BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen der Blastenkrise zu evaluieren, um die hohe Telomeraseaktivität zu nutzen und z.B. p53-unabhängige Apoptose effektiv auszulösen.

Die CML bietet sich vor allem aufgrund der langen chronischen Phase, aber auch aufgrund der progredienten Telomerverkürzung für die Anwendung von telomerasehemmenden und telomerzerstörenden Substanzen an.

Allerdings werfen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse auch die Frage auf, ob nicht die induzierte Telomerverkürzung durch Telomeraseinhibition erst die Progression der Krankheit fördern könnte. Das Telomerverkürzung genomische Instabilität fördert ist ausreichend belegt<sup>161</sup>. Die Erkenntnis, dass p53 intakt sein muss um die BCR-ABL<sup>+</sup> Klone zu eradizieren zeigt, dass der molekulare Hintergrund für zelluläre Konsequenzen der Telomerverkürzung entscheidend ist. Hinzu kommt in der CML BCR-ABL als sehr potentes Onkogen, welches selbst chromosomale Instabilität verursacht<sup>162,163</sup>.

Da in Zellen mit kritisch kurzen Telomeren eine erhöhte G2/M Phase observiert wurde ist es auch denkbar, dass das Onkogen das Entkommen der Subklone direkt gefördert hat, denn BCR-ABL verleiht durch Verlängerung der G2/M-Phase die Eigenschaft DNA-Schäden, die ansonsten letal für die Zelle wären, zu reparieren. Allerdings verläuft die Reparatur nicht immer akkurat und somit unterstützt BCR-ABL die Erhöhung genetischer Instabilität<sup>150,164</sup>.

Zusammengefasst kann basierend auf diesen Ergebnissen postuliert werden, dass die Therapiestrategien, die zu Telomerdysfunktion führen, in einem genetisch möglichst

stabilen Hintergrund Anwendung finden sollten. Dazu bietet die chronische Phase der CML aufgrund der vorliegenden Daten theoretisch ein sehr attraktives Szenario.

### **Hypothetisches Modell zum Einsatz von Telomeraseinhibition in der CML**

Die Grundlage dieser Arbeit besteht in der Hypothese, dass sich die CML aufgrund ihrer Telomer- und Telomerasebiologie und durch ihren klinisch stabilen Verlauf sowie das Erreichen einer Situation der minimalen Resterkrankung unter der konventionellen Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) hervorragend für die Anwendung von Telomeraseinhibitoren eignet. Die hier gewonnenen Ergebnisse geben Aufschluss über den Zeitpunkt der Anwendung, da sie daraufhin weisen, dass der molekulare Hintergrund sehr entscheidend für den Erfolg der Therapie in BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen zu sein scheint. Bisher ist über die molekularen Voraussetzungen für erfolgreiche Telomeraseinhibition in malignen Erkrankungen wenig bekannt. Zwar gibt es v.a. aus Studien mit Telomerase-Knockout-Mäusen eindeutige Daten zur Signalgebung von kritisch kurzen und dadurch dysfunktionellen Telomeren, aber diese liefern nur bedingt Hinweise auf die Voraussetzungen, die eine erfolgreiche Telomeraseinhibition in malignen humanen Zellen benötigt. Dysfunktionelle Telomere werden in intakten Zellen als DNA-DSBs erkannt und die Signalweiterleitung erfolgt über den p53 und/oder den p16<sup>INK4A</sup>/pRB Tumorsuppressorsignalweg. Die zelluläre Antwort ist entweder der Eintritt der Zellen in den Wachstumsarrest oder aber p53-abhängig Apoptose<sup>64,165,166</sup>. Wann und warum welcher Mechanismus eingeschlagen wird ist bis heute nicht ausreichend bekannt (siehe Abb.5).

Der Verlust von funktionellem p53 führt zu unkontrollierter Proliferation und vermehrtem Überleben trotz erhöhter genetischer Instabilität und somit in letzter Konsequenz zur Progression von malignen Erkrankungen. Es fügt sich in die Datenlage ein, dass funktionelles p53, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, in der Lage ist die Entstehung von Subklonen und damit das Entkommen der generierten K562 Einzellklone von der Telomeraseinhibition zu verhindern.

In diesem Zusammenhang ist sehr interessant, dass in ca. 30 % der CML-Patienten der Verlust von funktionellem p53 mit der Progression der Krankheit in die akute Phase, die Blastenkrise, beobachtet wird<sup>97,167</sup>.

Durch die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 in der Blastenkrise können die Zellen nur eingeschränkt als Antwort auf dysfunktionelle Telomere in Apoptose gehen und einzelne Zellen finden Mechanismen, um die Telomerase zu reaktivieren und so dem Zustand der Krise (M2) zu entkommen. (Abb. 28 A). Ist der Tumorsuppressor p53 aktiv, wie es in den Zellen der chronischen Phase der CML der Fall ist, dann können

die Zellen als Reaktion auf kritisch kurze und somit dysfunktionelle Telomere effektive Apoptose durchlaufen und eine Selektion von aggressiven Subklonen wird unterbunden. Auch die Induktion von Seneszenz ist denkbar, v.a. da Zellen der chronischen Phase in der Regel auch positiv für p16<sup>INK4A</sup> sind (Abb. 28 B).

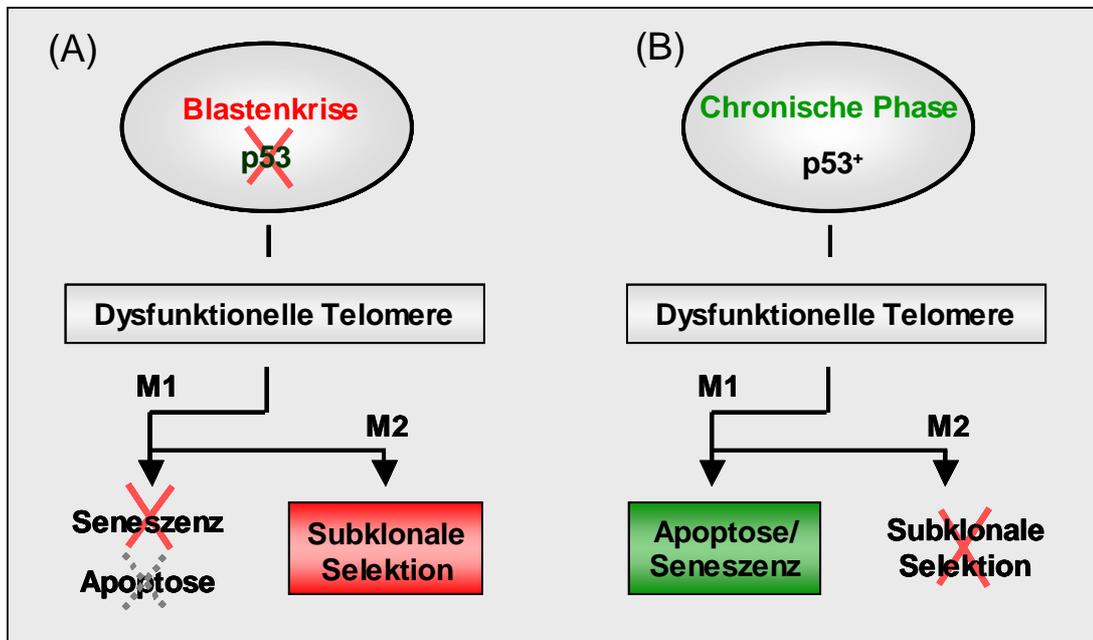


Abb. 28: Hypothetisches Modell zum Einsatz von telomeraseinhibitorischen Substanzen in der CML.

Basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen und früheren Daten kann postuliert werden, dass telomeraseinhibitorische und telomerasezerstörende Strategien nur in der genotypisch relativ stabilen chronischen Phase der CML angewendet werden sollten.

### Ausblick

In der Therapie der CML werden schon sehr spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) eingesetzt, aber es zeigt sich, dass gerade diese Spezifität die Selektion von z.T. hochaggressiven, resistenten Klonen auslösen kann. Außerdem ist die Behandlung der CML mit TKIs nicht kurativ, sondern führt zur Entstehung einer minimalen Resterkrankung bzw. zu persistenten, ruhenden BCR-ABL<sup>+</sup>-Stammzellen im Knochenmark. Kombinationstherapien von TKIs mit Substanzen, die andere molekulare Ziele der Zellen angreifen werden daher zukünftig verstärkt evaluiert.

Hier würden sich Kombinationen von telomeraseinhibitorischen, bzw. telomerzerstörenden Strategien mit TKIs anbieten, um die Selektion von resistenten Zellen zu unterbinden und die residuellen BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen zu eliminieren.

Es wurden schon eine Reihe von *in vitro* Studien an BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen durchgeführt, um die Kombination von TKIs mit Telomeraseinhibitoren zu testen. Die Behandlung von DNhTERT-exprimierenden Zellen früher Passage mit Imatinib ergab im Vergleich zu Wildtyp-hTERT-exprimierenden Zellen eine signifikant höhere Apoptoserate<sup>131</sup>.

Des Weiteren konnte durch die Kombinationsbehandlung von K562 Zellen mit verschiedenen Chemotherapeutika wie Daunorubicin und Telomestatin, einem G-Quadruplex stabilisierenden Wirkstoff, der die Interaktion der Telomerase mit den Telomeren verhindert, ebenfalls eine Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu monotherapierten Zellen erzielt werden<sup>132</sup>.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die zusätzliche Gabe von Telomeraseinhibitoren BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen prinzipiell gegenüber TKIs und Chemotherapeutika sensitivieren können.

Die Kombination von Telomeraseinhibitoren mit Chemotherapeutika wurde auch in anderen Tumorentitäten *in vitro* getestet und führt in vielen Fällen zu synergistischen Effekten und der vermehrten Induktion von Apoptose<sup>168</sup>.

Da die Tyrosinkinase c-ABL durch Phosphorylierung von hTERT in der Lage ist Telomeraseaktivität zu inhibieren, wird außerdem vermutet, dass die Hemmung von BCR-ABL<sup>+</sup> mit Imatinib einen direkten Effekt auf hTERT hat, der zur Telomerverlängerung führt<sup>169,170</sup>.

In diesem Zusammenhang wäre es in nachfolgenden Studien wichtig, die Einflüsse der vielversprechenden Kombinationstherapie an BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen in *in vivo* Mausmodellen zu testen.

Die erhaltenen Ergebnisse weisen daraufhin, dass ein genetisch stabiler Hintergrund essentiell für erfolgreiche Telomeraseinhibition in BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen ist. Eine Evaluation des Status wichtiger Signalmoleküle wie p53 oder auch p16<sup>INK4A</sup> könnte zum Therapieerfolg beitragen. Um dies mit Gewissheit zu sagen müssen allerdings noch weitere Studien durchgeführt werden. Da keine Zellkulturmodelle der chronischen Phase der CML existieren, könnten erste Studien an humanen Zellen mit intaktem genomischen Hintergrund erfolgen, die BCR-ABL stabil exprimieren. Die Evaluation unterschiedlicher Telomeraseinhibitoren an solchen Zellen könnte außerdem ermitteln, welchen Einfluss die sehr potente onkogene Tyrosinkinase BCR-ABL auf die Inhibition der Telomerase und auf die induzierte Verkürzung der Telomere hat.

Zu überprüfen wäre außerdem die Hypothese, inwiefern p16<sup>INK4A</sup> in BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen ausreicht, um unabhängig vom p53-Status Seneszenz als Antwort auf dysfunktionelle Telomere zu induzieren.

Die Telomer- und Telomerasebiologie sowie der Verlauf der CML bietet sehr gute Voraussetzungen, um Telomeraseinhibition als Therapeutikum einzusetzen. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit geben wichtige Hinweise auf die Rolle der pro-apoptischen und pro-seneszenten Signalwege und unterstützen die Annahme, dass Telomeraseinhibition in der chronischen Phase der CML weiter evaluiert werden sollte.

## 5. Anhang

### 5.1 Referenzen

1. Mueller H.J. The remaking of chromosomes. *The Collecting Net-Woods* **13**, 181-198 (1938).
2. McClintock, B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* **26**, 234-282 (1941).
3. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585-621 (1961).
4. Olovnikov, A. M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* **41**, 181-190 (1973).
5. Watson, J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.* **239**, 197-201 (1972).
6. Blackburn, E. H. & Gall, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J. Mol. Biol.* **120**, 33-53 (1978).
7. Shampay, J., Szostak, J. W. & Blackburn, E. H. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**, 154-157 (1984).
8. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405-413 (1985).
9. Dunham, M. A., Neumann, A. A., Fasching, C. L. & Reddel, R. R. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat. Genet.* **26**, 447-450 (2000).
10. Lundblad, V. & Blackburn, E. H. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* **73**, 347-360 (1993).
11. Harley, C. B., Vaziri, H., Counter, C. M. & Allsopp, R. C. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp. Gerontol.* **27**, 375-382 (1992).
12. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460 (1990).
13. Allsopp, R. C. *et al.* Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 10114-10118 (1992).
14. Cawthon, R. M., Smith, K. R., O'Brien, E., Sivatchenko, A. & Kerber, R. A. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* **361**, 393-395 (2003).
15. Vaziri, H. *et al.* Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 9857-9860 (1994).
16. Bodnar, A. G. *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-352 (1998).
17. Hahn, W. C. *et al.* Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**, 464-468 (1999).
18. Blasco, M. A. *et al.* Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**, 25-34 (1997).
19. Chan, S. W. & Blackburn, E. H. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* **21**, 553-563 (2002).
20. de, L. T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**, 2100-2110 (2005).
21. Moyzis, R. K. *et al.* A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 6622-6626 (1988).
22. Kipling, D. & Cooke, H. J. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* **347**, 400-402 (1990).
23. Brummendorf, T. H. *et al.* Longitudinal studies of telomere length in feline blood cells: implications for hematopoietic stem cell turnover in vivo. *Exp. Hematol.* **30**, 1147-1152 (2002).
24. Martens, U. M. *et al.* Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat. Genet.* **18**, 76-80 (1998).
25. Henderson, E. R. & Blackburn, E. H. An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell Biol.* **9**, 345-348 (1989).
26. Smogorzewska, A. & de, L. T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 177-208 (2004).

27. Hug, N. & Lingner, J. Telomere length homeostasis. *Chromosoma* **115**, 413-425 (2006).
28. Liu, D., O'Connor, M. S., Qin, J. & Songyang, Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 51338-51342 (2004).
29. Chan, S. W. & Blackburn, E. H. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* **21**, 553-563 (2002).
30. Deng, Y., Chan, S. S. & Chang, S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 450-458 (2008).
31. Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P. & de, L. T. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J.* **16**, 1785-1794 (1997).
32. Court, R., Chapman, L., Fairall, L. & Rhodes, D. How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. *EMBO Rep.* **6**, 39-45 (2005).
33. Hanaoka, S., Nagadoi, A. & Nishimura, Y. Comparison between TRF2 and TRF1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities. *Protein Sci.* **14**, 119-130 (2005).
34. Liu, D. *et al.* POT1 interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat. Cell Biol.* **6**, 673-680 (2004).
35. Loayza, D., Parsons, H., Donigian, J., Hoke, K. & de, L. T. DNA binding features of human POT1: a nonamer 5'-TAGGGTTAG-3' minimal binding site, sequence specificity, and internal binding to multimeric sites. *J. Biol. Chem.* **279**, 13241-13248 (2004).
36. Smogorzewska, A. *et al.* Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1659-1668 (2000).
37. van, S. B. & de, L. T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**, 740-743 (1997).
38. van, S. B., Smogorzewska, A. & de, L. T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**, 401-413 (1998).
39. Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. & de, L. T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* **283**, 1321-1325 (1999).
40. Stansel, R. M., de, L. T. & Griffith, J. D. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J.* **20**, 5532-5540 (2001).
41. Griffith, J. D. *et al.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503-514 (1999).
42. de, L. T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21**, 532-540 (2002).
43. Ye, J. Z. *et al.* POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev.* **18**, 1649-1654 (2004).
44. Hockemeyer, D., Daniels, J. P., Takai, H. & de, L. T. Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* **126**, 63-77 (2006).
45. Ye, J. Z. *et al.* POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev.* **18**, 1649-1654 (2004).
46. Wang, F. *et al.* The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* **445**, 506-510 (2007).
47. Xin, H. *et al.* TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* **445**, 559-562 (2007).
48. Kim, S. H., Kaminker, P. & Campisi, J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat. Genet.* **23**, 405-412 (1999).
49. Li, B., Oestreich, S. & de, L. T. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**, 471-483 (2000).
50. Li, B. & de, L. T. Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Mol. Biol. Cell* **14**, 5060-5068 (2003).
51. White, L. K., Wright, W. E. & Shay, J. W. Telomerase inhibitors. *Trends Biotechnol.* **19**, 114-120 (2001).
52. Levine, A. J. The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology* **384**, 285-293 (2009).
53. Shay, J. W. & Wright, W. E. Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. *Exp. Cell Res.* **184**, 109-118 (1989).
54. Gunaratnam, M. *et al.* Mechanism of acridine-based telomerase inhibition and telomere shortening. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 679-689 (2007).
55. Karlseder, J., Smogorzewska, A. & de, L. T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* **295**, 2446-2449 (2002).
56. Blackburn, E. H. Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**, 661-673 (2001).
57. Chan, S. W. & Blackburn, E. H. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* **21**, 553-563 (2002).

58. dda di, F. F. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-198 (2003).
59. Takai, H., Smogorzewska, A. & de, L. T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* **13**, 1549-1556 (2003).
60. Guo, X. *et al.* Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis. *EMBO J.* **26**, 4709-4719 (2007).
61. Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J. & Sedivy, J. M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* **14**, 501-513 (2004).
62. Beausejour, C. M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* **22**, 4212-4222 (2003).
63. Smogorzewska, A. & de, L. T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* **21**, 4338-4348 (2002).
64. Rudolph, K. L. *et al.* Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* **96**, 701-712 (1999).
65. Wright, W. E. & Shay, J. W. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp. Gerontol.* **27**, 383-389 (1992).
66. Espejel, S. *et al.* Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J.* **21**, 2207-2219 (2002).
67. Bai, Y. & Murnane, J. P. Telomere instability in a human tumor cell line expressing NBS1 with mutations at sites phosphorylated by ATM. *Mol. Cancer Res.* **1**, 1058-1069 (2003).
68. Blasco, M. A. Telomerase beyond telomeres. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 627-633 (2002).
69. Weinrich, S. L. *et al.* Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat. Genet.* **17**, 498-502 (1997).
70. Cohen, S. B. *et al.* Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* **315**, 1850-1853 (2007).
71. Wenz, C. *et al.* Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO J.* **20**, 3526-3534 (2001).
72. Arai, K. *et al.* Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase are important for its oligomerization and telomerase activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 8538-8544 (2002).
73. Feng, J. *et al.* The RNA component of human telomerase. *Science* **269**, 1236-1241 (1995).
74. Broccoli, D., Young, J. W. & de, L. T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 9082-9086 (1995).
75. Hiyama, K. *et al.* Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* **155**, 3711-3715 (1995).
76. Vulliamy, T. *et al.* The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* **413**, 432-435 (2001).
77. Mitchell, J. R., Wood, E. & Collins, K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402**, 551-555 (1999).
78. Armanios, M. *et al.* Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 15960-15964 (2005).
79. Dokal, I. Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br. J. Haematol.* **110**, 768-779 (2000).
80. Vulliamy, T. J., Knight, S. W., Mason, P. J. & Dokal, I. Very short telomeres in the peripheral blood of patients with X-linked and autosomal dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol. Dis.* **27**, 353-357 (2001).
81. Yamaguchi, H. *et al.* Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1413-1424 (2005).
82. Kim, N. W. *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011-2015 (1994).
83. Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S. & Reddel, R. R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* **14**, 4240-4248 (1995).
84. Muntoni, A. & Reddel, R. R. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum. Mol. Genet.* **14 Spec No. 2**, R191-R196 (2005).
85. Yeager, T. R. *et al.* Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.* **59**, 4175-4179 (1999).
86. Nowell P, H. D. A minute chromosome in human chronic granulocyte leukemia. *Science* **132**, 1497 (1960).

87. Rowley, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290-293 (1973).
88. Bartram, C. R. *et al.* Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306**, 277-280 (1983).
89. Groffen, J. *et al.* Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**, 93-99 (1984).
90. Lugo, T. G., Pendergast, A. M., Muller, A. J. & Witte, O. N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* **247**, 1079-1082 (1990).
91. Druker, B. J. *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* **2**, 561-566 (1996).
92. Druker, B. J. *et al.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2408-2417 (2006).
93. Schiffer, C. A. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* **357**, 258-265 (2007).
94. Lee, S. J. Chronic myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol.* **111**, 993-1009 (2000).
95. Quintas-Cardama, A. & Cortes, J. E. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin. Proc.* **81**, 973-988 (2006).
96. Brummendorf, T. H. *et al.* Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood* **95**, 1883-1890 (2000).
97. Calabretta, B. & Perrotti, D. The biology of CML blast crisis. *Blood* **103**, 4010-4022 (2004).
98. Pane, F. *et al.* Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* **88**, 2410-2414 (1996).
99. Daley, G. Q., Van Etten, R. A. & Baltimore, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* **247**, 824-830 (1990).
100. Deininger, M. W., Goldman, J. M. & Melo, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**, 3343-3356 (2000).
101. Vigneri, P. & Wang, J. Y. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat. Med.* **7**, 228-234 (2001).
102. Goldman, J. M. & Melo, J. V. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1451-1464 (2003).
103. Gotoh, A. *et al.* Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125FAK) by BCR-ABL oncoprotein. *Exp. Hematol.* **23**, 1153-1159 (1995).
104. Salgia, R. *et al.* Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *J. Biol. Chem.* **270**, 5039-5047 (1995).
105. Druker, B. J. *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1031-1037 (2001).
106. Shah, N. P. & Sawyers, C. L. Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* **22**, 7389-7395 (2003).
107. Gontarewicz, A. *et al.* Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood* **111**, 4355-4364 (2008).
108. Goldman, J. M. & Melo, J. V. BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia--how does it work? *Acta Haematol.* **119**, 212-217 (2008).
109. Drummond, M. W., Balabanov, S., Holyoake, T. L. & Brummendorf, T. H. Concise review: Telomere biology in normal and leukemic hematopoietic stem cells. *Stem Cells* **25**, 1853-1861 (2007).
110. Boultonwood, J. *et al.* Telomere length shortening is associated with disease evolution in chronic myelogenous leukemia. *Am. J. Hematol.* **61**, 5-9 (1999).
111. Brummendorf, T. H. *et al.* Normalization of previously shortened telomere length under treatment with imatinib argues against a preexisting telomere length deficit in normal hematopoietic stem cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **996**, 26-38 (2003).
112. Brummendorf, T. H. *et al.* Telomere length in peripheral blood granulocytes reflects response to treatment with imatinib in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* **101**, 375-376 (2003).
113. Drummond, M., Lennard, A., Brummendorf, T. & Holyoake, T. Telomere shortening correlates with prognostic score at diagnosis and proceeds rapidly during progression of chronic myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **45**, 1775-1781 (2004).

114. Engelhardt, M., Mackenzie, K., Drullinsky, P., Silver, R. T. & Moore, M. A. Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture. *Cancer Res.* **60**, 610-617 (2000).
115. Ohyashiki, K. *et al.* Telomere dynamics and genetic instability in disease progression of chronic myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **40**, 49-56 (2000).
116. Ohyashiki, J. H., Sashida, G., Tauchi, T. & Ohyashiki, K. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene* **21**, 680-687 (2002).
117. Harley, C. B. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 167-179 (2008).
118. Damm, K. *et al.* A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J.* **20**, 6958-6968 (2001).
119. Hahn, W. C. *et al.* Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat. Med.* **5**, 1164-1170 (1999).
120. Ketteler, R., Glaser, S., Sandra, O., Martens, U. M. & Klingmuller, U. Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther.* **9**, 477-487 (2002).
121. Hartmann, U. Telomerlänge und Telomeraseaktivität, sowie deren pharmakologische Modulation in myeloischen Leukämien. Dissertationsschrift Universität Tübingen. 2005. Ref Type: Thesis/Dissertation
122. Bali, D. Einfluss einer Telomerverkürzung auf die Strahlensensibilität von Tumorzellen. Dissertationsschrift Universität Hamburg. 2009. Ref Type: Thesis/Dissertation
123. Ball, S. E. *et al.* Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood* **91**, 3582-3592 (1998).
124. Brummendorf, T. H., Maciejewski, J. P., Mak, J., Young, N. S. & Lansdorp, P. M. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood* **97**, 895-900 (2001).
125. Beier, F. *et al.* Accelerated telomere shortening in glycosylphosphatidylinositol (GPI)-negative compared with GPI-positive granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) detected by proaerolysin flow-FISH. *Blood* **106**, 531-533 (2005).
126. Ohyashiki, K. *et al.* Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression. *Leukemia* **11**, 190-194 (1997).
127. Drummond, M. W. *et al.* Dysregulated expression of the major telomerase components in leukaemic stem cells. *Leukemia* **19**, 381-389 (2005).
128. Belair, C. D., Yeager, T. R., Lopez, P. M. & Reznikoff, C. A. Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 13677-13682 (1997).
129. Campbell, L. J. *et al.* hTERT, the catalytic component of telomerase, is downregulated in the haematopoietic stem cells of patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 671-679 (2006).
130. Roth, A., Vercauteren, S., Sutherland, H. J. & Lansdorp, P. M. Telomerase is limiting the growth of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* **17**, 2410-2417 (2003).
131. Tauchi, T. *et al.* Inhibition of human telomerase enhances the effect of the tyrosine kinase inhibitor, imatinib, in BCR-ABL-positive leukemia cells. *Clin. Cancer Res.* **8**, 3341-3347 (2002).
132. Tauchi, T. *et al.* Activity of a novel G-quadruplex-interactive telomerase inhibitor, telomestatin (SOT-095), against human leukemia cells: involvement of ATM-dependent DNA damage response pathways. *Oncogene* **22**, 5338-5347 (2003).
133. Pear, W. S. *et al.* Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* **92**, 3780-3792 (1998).
134. Penserga, E. T. & Skorski, T. Fusion tyrosine kinases: a result and cause of genomic instability. *Oncogene* **26**, 11-20 (2007).
135. Ahuja, H., Bar-Eli, M., Advani, S. H., Benchimol, S. & Cline, M. J. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 6783-6787 (1989).
136. Feinstein, E. *et al.* p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 6293-6297 (1991).
137. Gombart, A. F., Yang, R., Campbell, M. J., Berman, J. D. & Koeffler, H. P. Inhibition of growth of human leukemia cell lines by retrovirally expressed wild-type p16INK4A. *Leukemia* **11**, 1673-1680 (1997).
138. Kim, W. Y. & Sharpless, N. E. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* **127**, 265-275 (2006).

139. Jacobs, J. J. & de, L. T. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol.* **14**, 2302-2308 (2004).
140. Bushman, F. *et al.* Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 848-858 (2005).
141. Frank, O. *et al.* Tumor cells escape suicide gene therapy by genetic and epigenetic instability. *Blood* **104**, 3543-3549 (2004).
142. Fehse, B., Kustikova, O. S., Bubenheim, M. & Baum, C. Pois(s)on--it's a question of dose.. *Gene Ther.* **11**, 879-881 (2004).
143. Uckert, W. *et al.* Double suicide gene (cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells in vivo. *Hum. Gene Ther.* **9**, 855-865 (1998).
144. Chin, L. *et al.* p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* **97**, 527-538 (1999).
145. Delhommeau, F. *et al.* Telomere dysfunction and telomerase reactivation in human leukemia cell lines after telomerase inhibition by the expression of a dominant-negative hTERT mutant. *Oncogene* **21**, 8262-8271 (2002).
146. Zhang, X., Mar, V., Zhou, W., Harrington, L. & Robinson, M. O. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev.* **13**, 2388-2399 (1999).
147. Guo, C. *et al.* Inhibition of telomerase is related to the life span and tumorigenicity of human prostate cancer cells. *J. Urol.* **166**, 694-698 (2001).
148. Herbert, B. *et al.* Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 14276-14281 (1999).
149. Eller, M. S., Puri, N., Hadshiew, I. M., Venna, S. S. & Gilchrest, B. A. Induction of apoptosis by telomere 3' overhang-specific DNA. *Exp. Cell Res.* **276**, 185-193 (2002).
150. Skorski, T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene* **21**, 8591-8604 (2002).
151. Rui, H. B. & Su, J. Z. Co-transfection of p16(INK4a) and p53 genes into the K562 cell line inhibits cell proliferation. *Haematologica* **87**, 136-142 (2002).
152. Shay, J. W. & Wright, W. E. Hallmarks of telomeres in ageing research. *J. Pathol.* **211**, 114-123 (2007).
153. Bechter, O. E., Zou, Y., Walker, W., Wright, W. E. & Shay, J. W. Telomeric recombination in mismatch repair deficient human colon cancer cells after telomerase inhibition. *Cancer Res.* **64**, 3444-3451 (2004).
154. Pascolo, E. *et al.* Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *J. Biol. Chem.* **277**, 15566-15572 (2002).
155. Piotrowska, K. *et al.* Optimization of the TRAP assay to evaluate specificity of telomerase inhibitors. *Lab Invest* **85**, 1565-1569 (2005).
156. Mueller, S. *et al.* Targeting telomerase activity by BIBR1532 as a therapeutic approach in germ cell tumors. *Invest New Drugs* **25**, 519-524 (2007).
157. Parsch, D., Brassat, U., Brummendorf, T. H. & Fellenberg, J. Consequences of telomerase inhibition by BIBR1532 on proliferation and chemosensitivity of chondrosarcoma cell lines. *Cancer Invest* **26**, 590-596 (2008).
158. Herbert, B. S. *et al.* Lipid modification of GRN163, an N3'-->P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition. *Oncogene* **24**, 5262-5268 (2005).
159. Gryaznov, S. M. *et al.* Oligonucleotide conjugate GRN163L targeting human telomerase as potential anticancer and antimetastatic agent. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **26**, 1577-1579 (2007).
160. Gu, J., Andreeff, M., Roth, J. A. & Fang, B. hTERT promoter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity. *Gene Ther.* **9**, 30-37 (2002).
161. Baird, D. M. Mechanisms of telomeric instability. *Cytogenet. Genome Res.* **122**, 308-314 (2008).
162. Koptyra, M., Cramer, K., Slupianek, A., Richardson, C. & Skorski, T. BCR/ABL promotes accumulation of chromosomal aberrations induced by oxidative and genotoxic stress. *Leukemia* **22**, 1969-1972 (2008).
163. Stoklosa, T. *et al.* BCR/ABL inhibits mismatch repair to protect from apoptosis and induce point mutations. *Cancer Res.* **68**, 2576-2580 (2008).
164. Slupianek, A. *et al.* Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **22**, 4189-4201 (2002).

- 
165. Lee, H. W. *et al.* Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* **392**, 569-574 (1998).
  166. Rajaraman, S. *et al.* Telomere uncapping in progenitor cells with critical telomere shortening is coupled to S-phase progression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 17747-17752 (2007).
  167. Melo, J. V. & Barnes, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 441-453 (2007).
  168. Cunningham, A. P., Love, W. K., Zhang, R. W., Andrews, L. G. & Tollefsbol, T. O. Telomerase inhibition in cancer therapeutics: molecular-based approaches. *Curr. Med. Chem.* **13**, 2875-2888 (2006).
  169. Bakalova, R. *et al.* Cross-talk between Bcr-Abl tyrosine kinase, protein kinase C and telomerase-a potential reason for resistance to Glivec in chronic myelogenous leukaemia. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1879-1884 (2003).
  170. Kharbanda, S. *et al.* Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase. *Curr. Biol.* **10**, 568-575 (2000).

## 5.2 Liste regulierter mRNAs

„Dual chip® human DNA damage and repair“

(siehe Abschnitt 3.3.1)

Genbank	GenID	Norm. Ratio
NM_000034.1	ALDOA	-3,7
NM_014481.2	APEX2	2,2
NM_004993.3	ATXN3	2,6
NM_000465.1	BARD1	2,0
NM_000057.1	BLM	2,1
Y08864.1	BRCA1	2,2
NM_001005735.1	CHEK2	2,3
NM_001278.2	CHUK	2,2
NM_001948.3	DUT	2,3
NM_004901.1	ENTPD4	2,9
NM_000122.1	ERCC3	2,1
NM_000082.2	ERCC8	3,4
NM_000135.2	FANCA	3,2
NM_004957.4	FPGS	2,5
NM_002066.1	GML	3,8
NM_006877.2	GMPR	2,8
NM_016426.4	GTSE1	3,1
NM_054111.2	IHPK3	9,8
NM_001567.2	INPPL1	2,4
NM_002228.3	JUN	3,0
NM_002969.2	MAPK12	2,6
NM_032960.2	MAPKAPK2	2,8
NM_003925.1	MBD4	2,0
NM_002392.2	MDM2	2,3
NM_014381.1	MLH3	4,0
NM_002431.2	MNAT1	2,2
NM_002439.2	MSH3	2,1
NM_018177.2	N4BP2	2,5
NM_002485.4	NBN	2,0
NM_018248.1	NEIL3	3,0
NM_001161.3	NUDT2	3,3
M87284.1	OAS2	3,1
AF003595.1	OGG1	2,4
NM_007254.2	PNKP	2,0
NM_002690.1	POLB	2,0
NM_138338.2	POLR3H	2,3
AF042385.1	PPIE	4,4
NM_020165.2	RAD18	2,0
NM_133628.1	RAD51L3	2,0
NM_134434.1	RAD54B	2,1
L19067.1	RELA	2,6
NM_016316.1	REV1L	2,3
NM_002912.1	REV3L	2,7
NM_002913.3	RFC1	2,0
NM_014454.1	SESN1	2,3
NM_006306.2	SMC1L1	2,2
NM_014311.1	SMUG1	2,3
NM_007110.2	TEP1	3,3
NM_005652.2	TERF2	2,0
NM_012461.1	TINF2	2,1
NM_005427.1	TP73	3,3
NM_000367.2	TPMT	3,6
NM_033628.2	TREX1	3,9
AF267739.1	TREX2	2,8
NM_003337.2	UBE2B	2,2
NM_000553.2	WRN	2,4
NM_020196.2	XAB2	2,4
NM_000380.2	XPA	2,4
NM_006297.1	XRCC1	2,1
NM_005432.2	XRCC3	2,6
NM_133646.1	ZAK	3,7
NM_170783.1	ZNRD1	2,6

### 5.3 Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen

#### Publikationen

Brassat U, Balabanov S, Bali D, Dierlamm J, Braig M, Hartmann U, Sirma H, Wege H, Gontarewicz A, Dikomey E, Borgmann K, Brümmendorf TH  
Functional p53 is required for effective telomerase inhibition in BCR-ABL-positive CML cells

*In preparation*

Keller G, Brassat U, Braig M, Heim D, Wege H, Brümmendorf TH  
Telomeres and Telomerase in Chronic Myeloid Leukemia: Impact for Pathogenesis, Disease Progression and Targeted Therapy.

*Hematol Oncol, in press*

Gorjup E, Danner S, Rotter N, Habermann J, Brassat U, Brümmendorf TH, Wien S, Meyerhans A, Wollenberg B, Kruse C, von Briesen H.

Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations

*Eur J Cell Biol 2009, 88:409-421.*

Kuhn J, Brümmendorf TH, Brassat U, Lehnhardt FG, Chung BD, Harnier S, Bewermeyer H, Harzheim A, Assheuer J, Netzer C

Novel KRIT1 mutation and no molecular evidence of anticipation in a family with cerebral and spinal cavernous malformations

*Eur Neurol 2008, 61:154-158.*

Parsch D, Brassat U, Brümmendorf TH, Fellenberg J

Consequences of telomerase inhibition by BIBR1532 on proliferation and chemosensitivity of chondrosarcoma cell lines

*Cancer Invest 2008, 26:590-596.*

Balabanov S, Gontarewicz A, Ziegler P, Hartmann U, Kammer W, Copland M, Brassat U, Priemer M, Hauber I, Wilhelm T, Schwarz G, Kanz L, Bokemeyer C, Hauber J, Holyoake TL, Nordheim A, Brümmendorf TH

Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A): a novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach

*Blood 2007;109:1701-1711.*

#### Buchbeitrag

Balabanov S, Brassat U, Bernhard M, Kob V, Gontarewicz A, Brümmendorf TH

Telomere and stem cell biology in chronic myeloid leukemia

*Stem cell and their potential for clinical Application, Springer-Verlag 2008,*

*ISBN 978-1-40206468-5*

#### Präsentationen auf internationalen Kongressen

2008 ASH (American Society of Hematology)  
50<sup>th</sup> Annual Meeting in San Francisco, USA  
-Vortrag- *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008, 112: 572*

2008 4<sup>th</sup> European Workshop  
Role of Telomeres and Telomerase in Cancer and Aging in Ladenburg, Deutschland  
-Vortrag-

- 
- 2007 ASH (American Society of Hematology)  
49<sup>th</sup> Annual Meeting in Atlanta, USA  
-Poster- Blood (ASH Annual Meeting Abstracts); 110: 2935
- 2007 DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie)  
Jahrestagung in Basel, Schweiz  
-Poster-
- 2006 ASH (American Society of Hematology)  
48<sup>th</sup> Annual Meeting in Orlando, USA  
-Poster- Blood (ASH Annual Meeting Abstracts); 108: 2185
- 2006 BACR (British Association of Cancer)  
Telomerase & Cancer Stem Cells: Exploiting Cellular Immortality for  
Therapeutic Gain in York, Großbritannien  
-Poster-