

Medizinische Fakultät der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem
Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung)

Die Bedeutung des Telomerasepromotors in der Tumorgentherapie

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Andreas Julius Tulipan
aus Budapest / Ungarn
2004

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.- H. Jöckel
1. Gutachter: Priv.- Doz. Dr. rer. nat. L. Klein- Hitpaß
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. M. Pützer

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Februar 2005

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen des ersten Forschungstages am 13.06.2002 in Essen als Poster präsentiert.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1. EINLEITUNG	1
1.1 DAS CHROMOSOMENDREPLIKATIONSPROBLEM	2
1.2 DIE TELOMERE	3
1.3 TERMINALE RESTRIKTIONSFRAGMENTE (TRF)	4
1.4 TELOMER-ASSOZIIERTE SEQUENZEN (TAS)	5
1.5 TELOMERE ZUM SCHUTZ DER CHROMOSOME?	6
1.6 WEITERE WICHTIGE FUNKTIONEN DER TELOMERE	9
1.7 TELOMERE UND ALTERUNG	9
1.8 ALTERUNG UND TOD	10
1.9 FUNKTION UND AUFBAU DER TELOMERASE	12
1.9.1 Die RNA-Untereinheit der Telomerase	13
1.9.2 Die katalytische Untereinheit der Telomerase	15
1.9.3 Der hTERT Promotor	16
1.9.4 Die Regulation der Humanen Telomerase Reverse Transkriptase	17
1.10 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	19
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 MATERIAL	20
2.1.1 Zelllinien	20
2.1.2 Rekombinante Adenoviren	20
2.1.3 Die Promotoren	21
2.1.4 Versuchstiere	21
2.1.5 Oligonucleotide	22
2.2 ZELLKULTUR	22
2.2.1 Material für die Zellkultur	22
2.2.2 Zellkultivierung	23
2.2.3 Zellzahlbestimmung	24
2.2.4 In vivo-Zellkultivierung	24
2.3 TRANSFEKTIONSTECHNIKEN	24
2.3.1 Vorbereitung der Zelllinien zur Transfektion	24
2.3.2 Herstellung einer Virussuspension mit gewünschter Viruskonzentration	25
2.3.3 Transfektion von Zellen in Kultur	25
2.3.4 In vivo Transfektionen	26
2.4 ANALYSE VON RIBONUCLEINSÄUREN	26
2.4.1 Analyse von DNA	26
2.4.1.1 Präparation genomischer DNA	26
2.4.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung	27
2.4.1.3 DNA-Amplifikation mittels PCR-Technik	27
2.4.1.4 DNA-Amplifikation mittels nested-PCR-Technik	28
2.4.1.5 Radioaktive [γ - 32 P-ATP]-Markierung von DNA	29
2.4.1.6 Radioaktive [α - 32 P-dCTP]-Markierung von DNA	29

2.4.1.7	<i>Elektrophorese von Nukleinsäuren im Agarosegel</i>	29
2.4.2	<i>Analyse von RNA</i>	30
2.4.2.1	<i>Präparation zellulärer Gesamt-RNA</i>	30
2.4.2.2	<i>RNA-Konzentrationsbestimmung</i>	30
2.4.2.3	<i>Analyse der Genexpression durch RT-PCR</i>	30
2.5	ANALYSE VON PROTEINEN	32
2.5.1	<i>Herstellung von Zellextrakten, aus auf Kulturplatten kultivierten Zellen</i>	32
2.5.2	<i>Herstellung von Zellextrakten aus Mausgewebe</i>	32
2.5.3	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung</i>	33
2.5.4	<i>Luciferase-Assay</i>	33
2.5.5	<i>TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) Assay</i>	34
3.	ERGEBNISSE	36
3.1	<i>IN VITRO</i> VERSUCHE	36
3.1.1	<i>hTERT-Expression in den Tumorzelllinien</i>	36
3.1.2	<i>Telomeraseaktivität humaner Zelllinien</i>	37
3.1.3	<i>Dosis- Wirkungsabhängigkeit mit Ad-CMV-Luc und Ad-hTERT-Luc</i>	38
3.1.4	<i>Zeitkinetik</i>	39
3.1.5	<i>Telomerasepromotoraktivität in den Tumorzelllinien im Vergleich zum CMV-Promotor in vitro</i>	40
3.2	<i>IN VIVO</i> VERSUCHE	41
3.2.1	<i>Virusnachweis in den Organen</i>	42
3.2.2	<i>Vergleich der CMV- und Telomerasepromotoraktivität in gesunden Körperzellen und der H1299 Tumorzelllinie in vivo</i>	43
3.2.3	<i>Tabellarische Aufstellung der behandelten Nacktmäuse</i>	45
4.	DISKUSSION	46
4.1	<i>Gentherapie mit Hilfe des Telomerasepromotors</i>	47
4.2	<i>Untersuchung des humanen Telomerasepromotors auf Tumorspezifität</i>	48
4.3	<i>Was wurde bisher mit TERT- Promotoren im Hinblick auf Tumorspezifität erreicht</i>	49
4.4	<i>Warum kommt es zu einer hTERT-Aktivierung außerhalb von Tumorgewebe?</i>	49
4.5	<i>Beeinflussung durch virale Proteine</i>	50
4.6	<i>Möglichkeiten zur Erhöhung der Tumorspezifität</i>	51
5.	ZUSAMMENFASSUNG	52
6.	LITERATURVERZEICHNIS	53
7.	DANKSAGUNGEN	61
8.	LEBENS LAUF	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
cDNA	copy DNA
CMV	Cytomegalievirus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxyribocytosyl-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
E1A/E1B	early region 1A/1B
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
et al.	et alii
FCS	fetal calf serum
g (xg)	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($\sim 9.81 \text{ m/s}^2$)
G3PDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
<i>h</i> TERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
<i>h</i> TR	humane Telomerase RNA
<i>h</i> EST	humane ever shorter telomeres Gene
kb	kilo-Basenpaare
kD	kilo-Dalton
l	Liter

M	molar (mol/Liter)
min	Minuten
moi	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly Adenosin Diphosphat-Ribose Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Rb	Retinoblastoma-Gen bzw. -Protein
RLU	relative light units
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomal RNA
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit reverser Transkription
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Temperatur
Taq	Thermophilus aquaticus
TAS	Telomer-assoziierte Sequenzen
TPG	total product generated).
TRAP	telomeric repeat amplification protocol
TRF	terminale Restriktionsfragmente,
TRF1 u. 2	telomeric repeat factors
TS	Substrat Oligonucleotid
T _m	Schmelztemperatur
U	Units (Einheit der Enzymaktivität 1U = 1 mol/min)
u.	und
u.a.	unter anderem
V	Volumen oder Volt (bei Agarosegelelektrophorese)

v/v	volume / volume
wt	Wildtyp
w/v	weight / volume
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Die Lebensdauer der Organismen ist sehr unterschiedlich. Lebensform, exogene Einflüsse und weitere Faktoren vermögen die Zeit des Überlebens stark schwanken zu lassen. Das Maß der Vermehrungsgeschwindigkeit einfacher, einzelliger, wie auch komplexer Lebewesen hängt stark von deren Umgebung ab. Auch zellinterne Einflüsse wie z.B. die Apoptose, der programmierte Zelltod, spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Entwicklung höherer Organismen, aber auch bei der Beseitigung außer Kontrolle geratener Zellen. Sind Sicherheitsmechanismen der Zelle funktionsunfähig und gleichzeitig lebensverlängernde Mechanismen aktiviert, kann es zur unkontrollierten Teilung dieses defekten Zellklons kommen. Solche Zellpopulationen können bei ungehindertem Wachstum die Grundlage von Krebserkrankungen sein.

Ein Faktor, der lebensdauerbestimmend zu sein scheint, ist die Länge der DNA an den Chromosomenenden. Diese Abschnitte werden auch Telomere genannt. Bei jeder Zellteilung verliert die Zelle, hervorgerufen durch später genannte Gründe, ein Stück DNA der Telomere. Unterschreitet die Telomerlänge einen bestimmten Wert, verfällt die Zelle in eine Zellzyklussperre und/oder wird apoptotisch (Watanabe, 2002).

Bei über 85% der Tumorerkrankungen wird dieser Alterungsprozess durch eine unkontrollierte Verlängerung der Telomere außer Kraft gesetzt (Kim et al., 1994; Gu et al, 2000). Die DNA-Verlängerung wird mit Hilfe eines Proteins, der Telomerase, bewerkstelligt. Mit Hilfe der Telomerase können sich z.B. Stammzellen kontrolliert der Alterung und einem frühzeitigen Absterben entziehen.

Durch unkontrollierte Aktivierung des Telomerasepromotors, dem genetischen Schalter der Telomerase, kommt es durch Verlängerung der Telomere zu unnatürlich hohen Zellteilungszyklen. Der betroffene Zellklon kann sich ungehindert immer wieder teilen.

1.1 Das Chromosomendepunktionsproblem

Bei jeder Zellteilung werden die Erbinformationen kopiert und auf die zwei Zellen verteilt. Die DNA-Polymerase benötigt zum Replikationsbeginn einen Primer als Ansatzstelle. Der Primer ist eine kurze komplementäre einsträngige RNA-Sequenz, welche aus einigen Basen besteht und sich vor Replikation an die einsträngige DNA bindet. Dieser kurze RNA-DNA-Doppelstrang ist die Ansatzstelle für die DNA-Polymerase. Nach der Replikation werden die Primer durch RNAsen entfernt. Die an den sog. Okazaki-Stücken entstandenen Lücken werden durch Ligasen geschlossen (Okazaki et al., 1967). Da ein Auffüllen am 5'-Ende der DNA durch Ligasen nicht möglich ist (es gibt nichts zu ligieren) und kein Reparaturmechanismus für dieses Problem existiert, persistiert dieser Kopierfehler als Deletion. Es fehlt somit ein Stückchen DNA am 5' Ende der neu synthetisierten DNA. Die DNA bleibt an dieser Stelle einsträngig. Durch diesen Mechanismus entsteht bei der nächsten Replikation eine um mindestens 8 bis 12 Nucleotide verkürzte DNA-Kopie. Somit verliert der DNA-Strang aufgrund der semikonservativen Replikation (Okazaki et al., 1967) bei jedem Zellzyklus einige Nucleotide. Zudem entfernt eine vermutete 5'-3'-Exonuclease 100-200 Nucleotide der Cytosinreichen Sequenz der Telomere. Es entstehen somit lange einsträngige Vorsprünge an den Telomerenden (Makaroy, 1997).

Die folgende Abbildung veranschaulicht das Chromosomendepunktionsproblem:

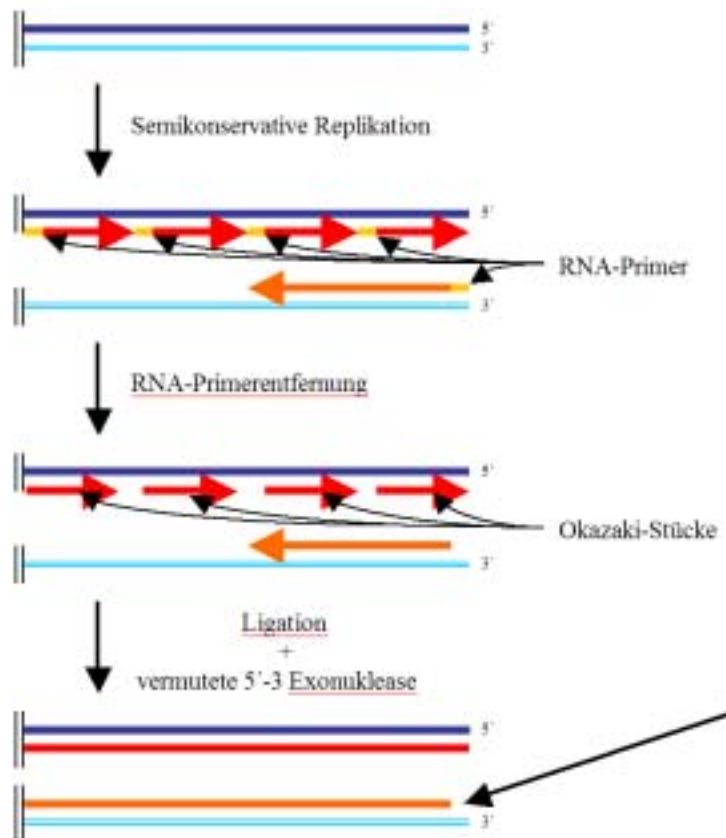


Abb. 1-1 Schematische Darstellung des Chromosomendepunktionsproblems. Die DNA-Polymerase benötigt kurze RNA-Primer für den DNA-Synthesestart. Nach Entfernung dieses Primers kann die entstandene Lücke am 5'-Ende nicht aufgefüllt werden und somit bleibt ein Stückchen DNA unrepliziert. Aufgrund der vermuteten Aktivität einer 5'-3' Exonuklease entstehen lange einsträngige 3'-DNA-Vorsprünge. Abbildung aus Makarov, V.L., Hirose, Y., Langmore, J.P., Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, 88 (1997): 657-66

1.2 Die Telomere

Alle Lebewesen besitzen in all ihren teilungsfähigen Zellen eine Kopie ihres eigenen Bauplans. Dieser Bauplan ist mit Hilfe der DNA-Bausteine Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin, kodiert in der Zelle abgelegt.

Die Erbinformation speichernden DNA- Doppelstränge sind bei höheren eukaryoten Lebewesen in Abschnitte aufgeteilt, die sich auf Histonproteine aufgewickelt, zu sogenannten Chromosomen organisieren (Martinson et al., 1979). Die Chromosomenenden, welche aus

einer repetitiven DNA-Sequenz unterschiedlicher Länge bestehen, werden Telomere genannt. Die Telomere enthalten typischerweise GT-reiche Sequenzen, welche bei den meisten Spezies aus einer repetitiven Sequenz von 6-8 Basenpaaren bestehen.

Die einzelligen Ciliaten *Tetrahymena* besitzen nur eine Hand voll repetitive Telomersequenzen der Sequenz $(TTGGGG)_n$ an einem Chromosom, jedoch besitzen sie sehr viele Chromosomen. Die verwandten Ciliate *Oxytricha* enthalten die Telomersequenz $(TTTTGGGG)_n$. Telomere der Säuger wiederum bestehen aus einer repetitiven Sequenz $(TTAGGG)_n$ von bis zu einigen tausend Basen. (Klobutcher et al., 1981; Kipling et al., 1990). Die Längen der repetitiven Telomersequenzen unterscheiden sich nicht nur bei verschiedenen Spezies, sondern auch zwischen verschiedenen Chromosomen ein und derselben Zelle. In Mauszellen ist die repetitive Telomersequenz bis zu 60 kb lang (Zijlmans et al., 1997), in menschlichen Zellen beträgt die Länge zwischen 500 und 2000 5'-TTAGGG-3'-Wiederholungen. Da es zurzeit nicht möglich ist, in Vertebratenzellen die Anzahl der terminalen TTAGGG-Sequenzen genau zu bestimmen, werden Telomerlängen mit Hilfe von terminalen Restriktionsfragmenten (TRF) geschätzt.

1.3 Terminale Restriktionsfragmente (TRF)

TRFs umfassen die Strecke von den terminalen Telomeranteilen bis zur ersten Restriktionsstelle (z.B.: *HinfI* oder *RsaI*) einschließlich den Telomer-assoziierten Sequenzen (s. 1.4). Die Längenbestimmung geschieht mit Hilfe von Gelelektrophorese und chromosomaler in situ Hybridisierung. Nach Restriktionsverdau mit Restriktionsenzymen, welche nicht innerhalb der repetitiven Telomersequenz schneiden, erfolgt die Auftrennung mit Hilfe der Gelelektrophorese. Nach radioaktiver Markierung mit $(TTAGGG)_n$ Oligonucleotiden erfolgt die Hybridisierung mit den Telomersequenzen. Die variable Länge der Telomere und die interzelluläre Variabilität der Telomerlängen erscheint als DNA-Schliere „smear“ auf dem Gel (Zijlmans et al., 1997).

1.4 Telomer-assoziierte Sequenzen (TAS)

Es existieren bemerkenswert stark konservierte Sequenzregionen an den Enden der Chromosome. Obwohl in dieser Region so gut wie keine Transkriptionsaktivität existiert, kann man diesen Bereich in drei deutliche Subregionen unterteilen:

1. Die 3' Überhänge
2. Die repetitive Telomersequenz
3. Die Telomer-assoziierte Sequenzen

Die TAS sind definiert als der DNA-Abschnitt, der zwischen der repetitiven Telomersequenz und dem ersten Einzelkopie- Gen (single copy gene) liegt. Die folgende Abbildung verdeutlicht die Komplexität dieser Region:

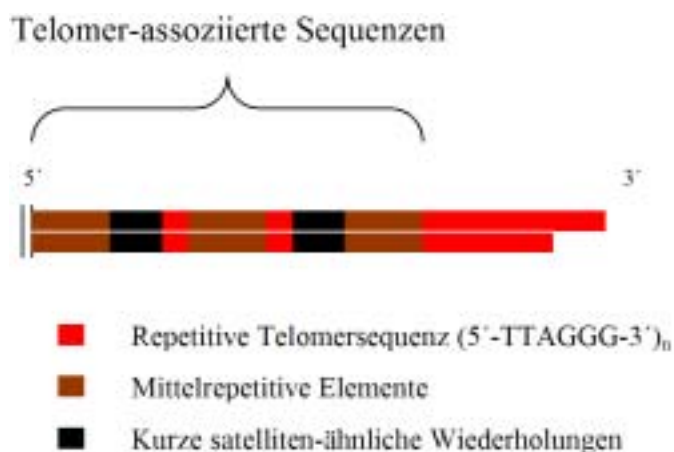


Abb. 1-2 Schematische Darstellung der Telomere, mit den Telomer-assoziierten Sequenzen. Eukaryote Telomere bestehen aus repetitiven Telomersequenzen. Die Enden der Telomere bestehen aus einsträngigen 3'- Überhängen. Subtelomere Regionen enthalten einige kurze satelliten-ähnliche Wiederholungen und mittelrepetitive Elemente, mit eingestreuten repetitiven Telomersequenzen. Abbildung aus Cerni, C., *Telomeres, telomerase, and myc. An update. Mutat Res.*, 462 (2000): 31-47

Die Länge der TAS unterscheidet sich, wie auch bei den Telomeren, sowohl zwischen verschiedenen Spezies, als auch zwischen verschiedenen Chromosomen ein und derselben Zelle. Humane TAS bestehen aus einigen bis einigen hundert Kilobasen (Wilkie et al., 1991). Die relativ komplexen mittelrepetitiven Elemente bestehen aus einigen bis einigen hundert Basenpaaren. Die kurzen satelliten-ähnlichen Wiederholungen bestehen wiederum aus 20 bis 1000 Basenpaaren und sind zwischen bzw. in die mittelrepetitiven Elemente eingestreut. Es besteht eine sehr hohe Variabilität zwischen den TAS. Sowohl das Verteilungsmuster, als auch die Anzahl der einzelnen Elemente unterscheiden sich stark. Für die Komplexität der einzelnen TAS Regionen ist wahrscheinlich die hohe Frequenz des Rearrangements dieser Region verantwortlich. Es wird vermutet, dass die TAS eine Pufferzone zwischen den Telomerenenden und dem transkriptionell aktiven Euchromatin bilden. Bemerkenswert ist, dass im Gegensatz zur konstanten Telomersequenz die TAS eine sehr hohe Variabilität aufweisen (Klobutcher et al., 1981; Kipling et al., 1990).

1.5 Telomere zum Schutz der Chromosome?

Wie unterscheiden die Zellen zwischen zufälligen DNA-Brüchen und den natürlichen Chromosomenenden? Es existieren drei Theorien zur Beantwortung dieser Frage:

- Ein spezielles Protein schützt die 3'-Enden der Chromosome vor der Missinterpretation, ein offener DNA-Strang zu sein.
- Eine spezielle Struktur „verknotet“ die 3'-Enden der Telomere.
- Spezielle Proteine binden an den DNA-Doppelstrang und schützen den DNA-Einzelstrang am Ende des Telomers

Ein Beispiel für die erste Theorie bietet das alpha/beta heterodimer Protein vom Ciliaten *Oxytricha*, für Säuger ist ein Korrelat dieses Proteins bisher nicht identifiziert worden (Fang et al., 1995).

Auch die zweite theoretische Möglichkeit von G-G quadruplex Strukturen an den 3'-Enden der Telomere konnte bisher nicht gezeigt werden (Wellinger et al., 1997).

Die dritte Theorie scheint die richtige zu sein. Es wurden die Faktoren TRF1 und TRF2 (Telomeric Repeat Factors) isoliert.

TRF1 bindet als Homodimer an den repetitiven TTAGGG-Doppelstrang der Telomere. Überexpression von TRF1 verursacht die Verkürzung der Telomere um 3 bis 12 bp pro Zellteilung. Der Verlust von TRF1 wiederum ermöglicht der Telomerase die Verlängerung der Telomere um ca. 35bp pro Zellteilung. Somit ist TRF1 ein negativer Regulator der Telomerase (Van Steensel et al., 1997).

TRF2 ist in der Interphase und während der Mitose mit TRF1 kolokalisiert und hat die Aufgabe, die 3'-Überhänge der Telomere zu schützen. Das Fehlen von TRF2 verursacht numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen. Es entstehen nach wenigen Zellteilungen End zu End Fusionen zwischen den Chromosomen. Die Zellen altern überschnell oder werden apoptotisch (Van Steensel et al., 1998; Karlseder et al., 1999). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Säugertelomeren zeigen große Schleifen an den Telomerenden. Die 3'-Überhänge werden mit Hilfe von TRF1 und TRF2 in diesen Schleifen eingeschlossen (Greider, 1999; Griffith et al., 1999).

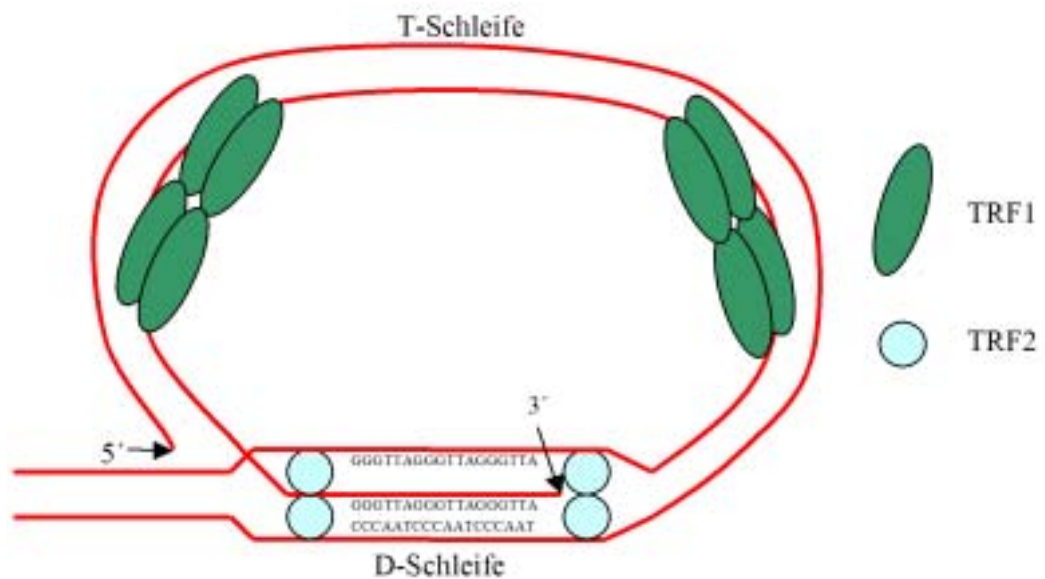


Abb. 1-3 Schematisches Modell der Telomerschleife. Der einsträngige 3'-Überhang des Telomers dringt in den weiter zurückliegenden Telomer-Doppelstrang ein und hybridisiert mit komplementären Telomersequenzen, nach Auftrennung des Doppelstranges. Es entsteht die D- (Displacement) Schleife. TRF2 scheint diese Struktur zu stabilisieren. Die Entstehung der D-Schleife führt zur Bildung der großen T-Schleife, welche vermutlich von TRF1 stabilisiert wird. Abbildung aus Cerni, C., *Telomeres, telomerase, and myc. An update. Mutat Res.*, 462 (2000): 31-47

Während die D-Schleife lediglich wenige hundert Basen des einzelsträngigen 3'-Überhangs enthält, ist die T-Schleife wesentlich größer. Es wird vermutet, dass sie das ganze Telomer umspannt. Die Durchschnittsgröße der T-Schleifen korreliert mit der unterschiedlichen Telomerlänge bei verschiedenen Spezies. Aus Maus-Zellen wurden entsprechend längerer Telomere große T-Schleifen isoliert. Humane Zellen wiederum enthalten kleinere T-Schleifen und haben auch kürzere Telomere (Greider, 1999; Griffith et al., 1999).

1.6 Weitere wichtige Funktionen der Telomere

Neben den bereits beschriebenen essentiellen Schutzfunktionen zur Erhöhung der Stabilität der Chromosome scheinen Telomere auch weitere, wichtige Funktionen zu erfüllen. Untersuchungen zeigen, dass Telomere Fusionen und Rekombinationen der Chromosome untereinander verhindern. Außerdem verankern sie die Chromosomen im Zellkern und sind bei der Replikation von DNA beteiligt (Greider, 1996). Bei der Mitose scheinen Telomere ebenfalls eine wichtige Rolle zu haben. Sequenzmutationen von Telomer-DNA bewirken in Keimzelllinien eine starke Beeinflussung der Proliferationseigenschaften. Die Zellteilung ist stark verlangsamt oder sogar in der Anaphase blockiert. Die mutierten Chromatiden trennen sich im mittleren Bereich nicht komplett und werden auf ihre doppelte Normallänge gedehnt. Diese Ergebnisse deuten auf eine physikalische Blockierung durch mutierte Telomere hin (Kirk et al., 1997).

1.7 Telomere und Alterung

Bereits 1961 beschrieben L. Hayflick et al. die begrenzte Teilungsfähigkeit reifer Zellen. Die maximale Anzahl von etwa 50 Zellteilungen scheinen embryonale Fibroblasten zu haben. Differenzierte Zellen teilen sich bereits nach wenigen Passagen nicht mehr. Dieses maximale Teilungsvermögen wird auch Hayflick-Limit bezeichnet (Hayflick, 1961). Die Hypothese, dass Telomere eine Rolle bei der Alterung spielen könnten, postulierte Olovnikov bereits vor etwa 30 Jahren (Olovnikov, 1973). Den ersten Beweis erbrachten Harley et al. durch wiederholte Passagierung humaner Fibroblasten *in vitro* (Harley, 1990). Es wird vermutet, dass nicht die Durchschnittslänge aller Telomere der Zelle, sondern die kürzeste Telomerlänge ab einer kritischen Schwelle proliferationslimitierend und somit altersbestimmend ist (Harley et al., 1990; Levy et al., 1992; Allsopp et al., 1995). Untersuchungen zeigen, dass bereits der Verlust eines einzigen Telomers eine Zellzyklussperre induzieren kann (Zakian, 1996). Alternde Zellen weisen vermehrt Chromosomenaberrationen, wie Dizenomere, Translokationen, Brüche, Insertionen, Verluste, numerische Aberrationen usw. auf (Harley et al., 1995; Allsopp et al., 1995; Van Steensel et al., 1998; Karlseder et al., 1999;). Die TRFs (s. 1.3) humaner Neugeborenenzellen bestehen aus etwa 7-11 kb. Hierin sind ca. 4-6 kb repetitive Telomersequenz und 3-5 kb TAS

(s. 1.4) enthalten (Allsopp et al., 1992). Im Laufe des Lebens nimmt die durchschnittliche TRF-Länge humaner Fibroblasten um etwa 1,5 kb ab. Dies ist ca. ein Drittel der Geburtstelomerlänge (Allsopp et al., 1992). Untersuchungen von Fibroblasten unterschiedlich alter Individuen zeigen, dass eine enge Korrelation zwischen Telomerlänge und *in vitro* Proliferationskapazität existiert (Wright et al., 1996). Das Alter des Individuums scheint hierbei weniger von Bedeutung zu sein (Allsopp et al., 1992). In einem Individuum koexistieren wahrscheinlich entwicklungsbedingt Zellen mit unterschiedlichen Telomerlängen und somit auch unterschiedlichen Proliferationskapazitäten (Zeichner et al., 1999). Berechnungen aus *in vivo* und *in vitro* Daten zeigen eine durchschnittliche TRF-Verkürzung von 50-75 bp pro Zellzyklus (Allsopp et al., 1992; Faragher et al., 1998; Holt et al., 1999).

1.8 Alterung und Tod

Wright et al. beschrieben 1989 ein zwei-Stufen Mortalitätsmodell humaner somatischer Zellen (Wright et al., 1989). Zellen mit einer kritischen Telomerlänge werden bei Eintritt der ersten Mortalitätsstufe (M1) pRB- und / oder p53-vermittelt an der weiteren Proliferation gehindert, akkumulieren in der G1-Phase und sterben bald. Diese Stufe wird auch replikative Alterung genannt (Kiyono et al., 1998).

Die Stufe (M1) kann durch virale Onkoproteine, wie z.B. das T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) oder durch die E6 und E7-Proteine von Hochrisikopapillomviren (HPV-16), außer Kraft gesetzt werden. In diesem Fall treten die Zellen in die zweite Mortalitätsstufe (M2) ein. Bei Eintritt in diese Stufe verlieren die Zellen weiter Telomersequenzen, chromosomale Aberrationen akkumulieren und es folgt der Tod der Zelle nach 20-30 Zellteilungen.

Eine sehr geringe Anzahl von etwa 10^{-7} Zellen entkommen aus dieser äußerst kritischen Phase und überleben weiter (Wright et al., 1989). Diese immortalen Zellen besitzen nun stabile Telomere durch Reaktivierung des Enzyms Telomerase. Telomerase vermag Telomere zu stabilisieren und zu verlängern (Hastie et al., 1990; Bryan et al., 1997; Bryan et Cech, 1999;). Mit Hilfe dieses Mechanismus wird die M2-Stufe inaktiviert. Die Inaktivierung der M2-Stufe geschieht wahrscheinlich durch Mutation und ist von der Expression viraler Onkoproteine unabhängig bzw. nur indirekt abhängig.

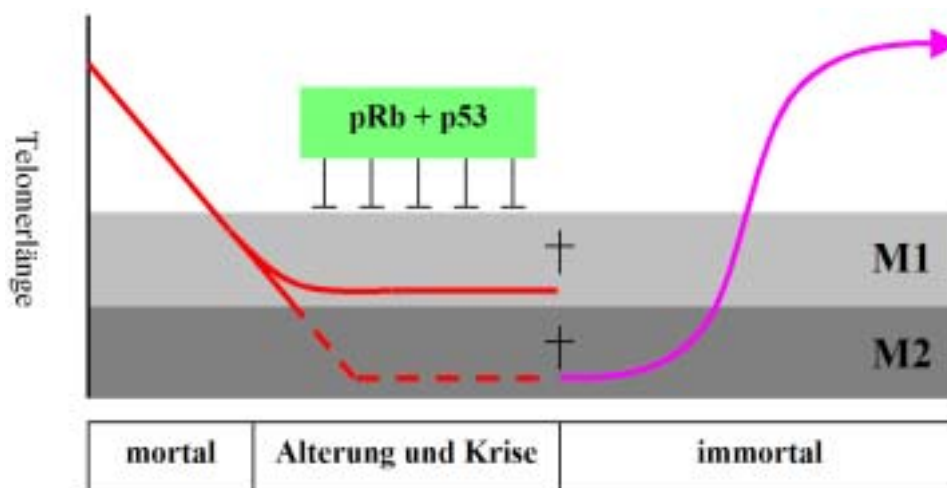


Abb. 1-4 Schematische Darstellung des zwei-Stufen Mortalitätsmodells. Die Telomerlänge nimmt bei kontinuierlicher Replikation somatischer Zellen wegen des Chromosomendepunktionsproblems (s. 1.1) zunehmend ab. Bei Erreichen einer kritischen Telomerlänge tritt die Zelle pRb- und/oder p53-vermittelt in die M1-Phase und stirbt schließlich. Durch virale Onkoproteine kann der Einfluss von pRb und p53 inaktiviert werden. In solch einem Fall tritt die Zelle in die M2-Phase ein. Durch weiteren Telomerverlust akkumulieren nun chromosomale Aberrationen und die Zelle stirbt nach 20-30 Replikationen. Eine geringe Anzahl der Zellen entkommen aus dieser Krise und werden immortal. Diese Immortalisierung geschieht durch Stabilisierung der Telomere mit Hilfe der Telomerase. Abbildung aus Cerni C., Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat Res.*, 462 (2000): 31-47

Bei Wegfall der onkogenen Wirkung der beschriebenen viralen Onkoproteine folgen ein bis zwei Zellteilungen, und die zuvor immortalen Zellen akkumulieren in der G1-Phase (Wright et al. 1989). Dieses Szenario wurde bereits bei vielen verschiedenen Zelltypen mehrfach beobachtet und unterstützt die Hypothese, dass Alterung mit der Stabilität der Telomere zusammenhängt.

Im Gegensatz zur beschriebenen Alterung sterblicher somatischer Zellen stehen Keimzellen, welche diesem Alterungsprozess nicht unterworfen sind. In diesen immortalen Zellen werden die Telomere lebenslang durch die Aktivität der Telomerase stabilisiert (Allsopp et al., 1992). Untersuchungen zeigen, dass der Verlust von Telomersequenzen ab einer bestimmten Schwelle die p53-vermittelte Zellzyklussperre auslöst. Bei Zellen ohne funktionelles p53, wie z.B. die Saos-2 Tumorzelllinie, erhöht sich die Lebensspanne bzw. Proliferationsfähigkeit. Diese Lebensverlängerung wird jedoch mit einem höheren Mutationsrisiko erkauft. (Chin et al., 1999).

1.9 Funktion und Aufbau der Telomerase

Wie bereits angedeutet existiert ein Enzym, das Telomer-DNA- *de novo* Synthese ermöglicht. Dieses Enzym wird Telomerase genannt. Erst 1985 gelang der Nachweis der Telomeraseaktivität durch Greider und Blackburn in *Tetrahymena* Zellextrakten (Greider et Blackburn, 1985). Greider und Blackburn wiesen nach, dass dieses Enzym sowohl aus Protein, als auch aus RNA besteht. Hierbei bilden die katalytisch aktive Reverse Transkriptase (RT)-Untereinheit und die Telomerase-RNA einen Komplex. Die Verlängerung der DNA erfolgt mit Hilfe der „eingebauten“ RNA-Vorlage, durch Reverse Transkription (Greider et Blackburn, 1987, 1989). Die humane Telomerase Reverse Transkriptase synthetisiert eine repetitive (TTAGGG)_n-Sequenz und ermöglicht hiermit die Verlängerung der Telomere (Morin, 1989).

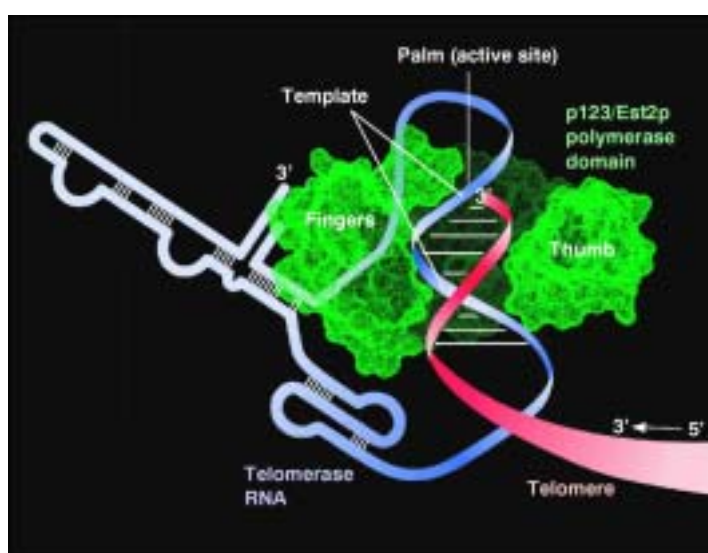


Abb. 1-5 Modell der Telomerase reverse Transkriptase, mit der reverse Transkriptase- und der RNA- Untereinheit. Abbildung aus Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., Cech, T.R., Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, 276 (1997): 561-567

1.9.1 Die RNA-Untereinheit der Telomerase

Für die Aktivität der Telomerase ist die Existenz der RNA-Untereinheit essentiell. Zwischen den einzelnen Spezies zeigt sich eine hohe RNA-Untereinheit-Längenvariabilität. Bei Ciliaten beträgt die Länge 147-191 Nucleotide (Greider et Blackburn, 1989), die humane und murine Telomerase-RNA ist einige hundert Nucleotide lang (Blasco et al., 1995; Feng et al., 1995). *Saccharomyces cerevisiae* wiederum enthalten bis zu 1,3 kb lange Telomerase-RNA (Singer et Gottschling 1994). Das für die humane Telomerase RNA (*hTR*) kodierende Gen befindet sich auf dem Chromosom 3q26.3 (Soder et al., 1997). Die Promotorregion von *hTR* umfasst etwa 1,7 kb und enthält wie auch der Promotor der katalytischen Untereinheit (*hTERT*) C-G reiche Sequenzen (Zhao et al., 1998).

Eine große Gemeinsamkeit der Telomerase-RNAs ist eine Sequenz, welche zu der Länge von etwa 1,5 Telomerasequenzen (ca. 9 Basen) komplementär ist. Diese Region wird auch Template-Region genannt. Mutationen in diesem Bereich führen zu vorhersagbaren Veränderungen in der neu synthetisierten Telomerasequenz (Yu et al, 1990). Die Template-Region ist komplementär zur humanen Telomerasequenz $(TTAGGG)_n$ und umfasst 11 Nucleotide (5'-CUAACCCUAAC). Diese Region wird in zwei funktionell unterschiedliche Bereiche eingeteilt (Feng et al., 1995). Ein Teil dieser Sequenz ist für die Anlagerung an die letzten 3-5 Basen der Telomere verantwortlich. Der zweite, unmittelbar daneben befindliche Abschnitt dient als Vorlage für die RT-Untereinheit zur Verlängerung des Telomers. Wiederholte Translokationen auf das jeweils frisch synthetisierte 3'-Ende ermöglichen eine fortlaufende Verlängerung der Telomere.

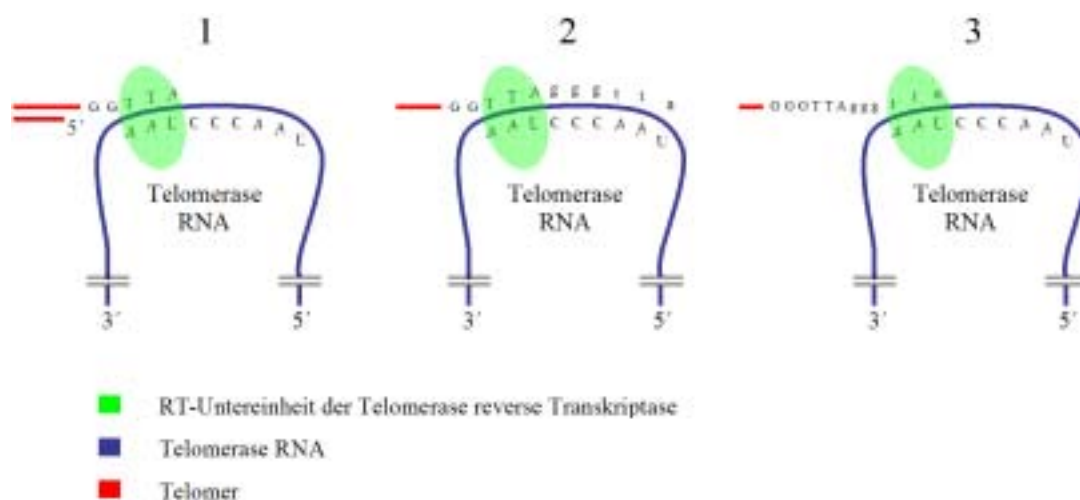


Abb. 1-6 Schematisches Modell der Telomereelongation. Im ersten Schritt hybridisieren drei hTR Nucleotide an das 3' Ende des Telomers. Es erfolgt nun im zweiten Schritt die Verlängerung durch Reverse Transkription, mit Hilfe der RT Untereinheit. Durch wiederholte Translokation und Reverse Transkription (Schritt drei) kommt es zur Telomerverlängerung. Die kleinen Buchstaben symbolisieren den neu synthetisierten Telomerstrang. Abbildung modifiziert aus Cerni, C., Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat Res.*, 462 (2000): 31-47

Obwohl die genaue dreidimensionale Struktur der Telomerase-RNA bisher nicht bekannt ist, weiß man, dass sie nicht linear ist, sondern die Tertiärstruktur u.a. helikale und pseudoknotenartige Strukturen enthält. Man nimmt an, dass die Telomerase-RNA aus zwei Domänen besteht. Die erste Domäne ist für die Verankerung in der katalytischen Proteinuntereinheit verantwortlich. Die zweite, flexible Domäne enthält unter anderem die Template-Region und ist für die katalytische Funktion mitverantwortlich (Bhattacharyya et Blackburn, 1994).

Trotz der hoch spezialisierten Funktion der Telomerase-RNA existiert eine starke Sequenzvariabilität zwischen den einzelnen Spezies. Beispielweise zeigen humane und murine RNA-Untereinheiten lediglich 65% Sequenzhomologien (BLASCO et al., 1995; FENG et al, 1995). Trotz dieser Unterschiede in der Primärstruktur sind die Tertiärstrukturen sehr ähnlich organisiert. Experimente zeigen, dass Telomerasen, welche aus Untereinheiten unterschiedlicher Spezies bestehen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aktiv sind (Bhattacharyya et Blackburn, 1997; Beattie et al., 1998; Martin-Rivera et al., 1998).

Interessanterweise ist die RNA-Untereinheit in den meisten embryonalen und adulten humanen Geweben vorhanden (Feng et al, 1995). Die aktive katalytische Untereinheit dagegen ist in den meisten somatischen Zellen nicht nachweisbar. Werden Telomerase negative Zellen mit der aktiven Form der katalytischen Untereinheit transfiziert, kommt es zu einer Verlängerung der Lebensdauer dieser Zellklone, und die Aktivität der Telomerase wird messbar (Bodnar et al., 1998; Vaziri et Benchimol, 1998). In humanem Embryonalgewebe wiederum wurde die katalytische Untereinheit nachgewiesen, jedoch in einer alternativ gespleißten, inaktiven Form. (Ulaner et al, 1998).

Diese Daten sind Hinweise für die Aktivitätsbestimmung durch regulierte Anwesenheit der katalytisch aktiven *hTERT* Untereinheit (Kilian et al., 1997; Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997).

1.9.2 Die katalytische Untereinheit der Telomerase

Eine mögliche katalytische Untereinheit der Telomerase wurde 1995 von Collins et al. isoliert. Es wurden zwei Proteine, 80 und 95 kDa, mit Telomeraseaktivität zusammen mit der zuvor entdeckten *Tetrahymena*-Telomerase-RNA aufgereinigt und co-immunpräzipitiert (Collins et al., 1995). Ein Jahr später gelang Lingner et Cech die Isolierung von zwei Proteinen, 43 und 123 kDa, aus dem Ciliat *Euplotes aediculatus*. Diese Proteine sind ebenfalls mit der Telomeraseaktivität assoziiert und sind auch als p43 und p123 bekannt. Diese beiden Proteinfragmente sind als die katalytische Untereinheit der Telomerase identifiziert worden (Lingner et Cech 1996). Die zweifelsfreie Identifizierung gelang mit Hilfe von Sequenzvergleichen des p123 mit dem *hEST2* Gen. *hEST2* ist eines von vier EST- (ever shorter telomeres) Genen, welche eine wichtige Funktion für die Telomere besitzen. Mutationen von EST- Genen induzieren alternde Phänotypen bei *Saccharomyces cerevisiae* (Lendvay et al., 1996). Aminosäuresequenzen von p123 enthalten Muster, die in allen Reversen Transkriptasen zu finden sind (Nakamura et al., 1997).

Die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase reverse Transkriptase (*hTERT*) wird von dem *hTERT*-Gen kodiert. Dieses Gen befindet sich auf Chromosom 5p15.33. und ist ein Einzelkopie (single copy) Gen mit mehr als 37 kb (Kilian et al., 1997; Meyerson et al., 1997). Vergleiche von genomischer *hTERT*- Sequenz und cDNA-Sequenzen haben enthüllt, dass das *hTERT*-Gen in 16 Exons und 15 Introns unterteilt werden kann (Nakamura et al., 1997).

Es wurden sieben verschiedene Spleißvarianten mit Variationen in der RT-Domäne und in der C-terminalen Region beschrieben. Die Aufgaben der meist Reverse Transkriptase inaktiven Spleißvarianten sind bisher unklar. Sie könnten z.B. Telomerasemodulierende Funktionen haben (Kilian et al., 1997; Wick et al., 1999). Wie auch andere Reverse Transkriptasen enthält das *hTERT* Gen sieben hoch konservierte RT-Muster (Lingner et al., 1997).

Es wird vermutet, dass die Telomerase Reverse Transkriptase ein grosser Komplex aus mehreren Proteinen ist (Beattie et al., 2001). Dieser Komplex könnte außer der RNA-Komponente mit der katalytisch aktiven *hTERT* Komponente auch noch weitere Proteine enthalten. Hinweise auf diese Hypothese sind in Ciliaten gefundene Telomer-assoziierte Proteine, wie das p80 (Collins et al., 1995) und die humane Variante, das *hTPL1* (Nakayama et al., 1997).

Die Aktivität der Telomerase wird mit Hilfe des TRAP-Assays bestimmt (s. 2.5.5).

1.9.3 Der *hTERT* Promotor

Die Promotorregion des *hTERT* Gens umfasst etwa 4 kb, wobei die meisten potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen innerhalb der ersten 900 bp liegen. Eine Besonderheit dieser Promotorregion ist u.a. der hohe Anteil der Basen Cytosin und Guanin. Stellenweise beträgt der C-G-Gehalt mehr als 70%. Normale genomische DNA enthält etwa 40% der Basen C-G. Ferner sind in der vermuteten Transkriptionsstartregion keine TATA-ähnlichen Sequenzen, im Sinne eines Transkriptionsstartpunktes, zu finden. Die Promotorregion enthält zahlreiche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Dies sind innerhalb der ersten 900 bp fünf Sp1, eine c-Myc, eine AP-2 Bindungsstelle und eine CCAC-Box. Zusätzlich besitzt das Gen 1788 bp und 3993 bp stromaufwärts vom Startcodon eine CCAAT-Box und eine zweite c-Myc Bindungsstelle (Wick et al., 1999).

1.9.4 Die Regulation der Humanen Telomerase Reverse Transkriptase

Hinweise erhärten die Hypothese, dass hauptsächlich die kontrollierte Expression der katalytischen Untereinheit bestimmend für die Aktivität der Telomerase ist. Die katalytische Untereinheit wird von dem *hTERT*-Gen kodiert (s. 1.9.2). Die genauen Kontrollmechanismen dieses Gens sind bisher nicht vollständig geklärt, sind jedoch vermutlich sehr komplex und Gegenstand intensiver Forschung. Höchstwahrscheinlich existieren zahlreiche Induktoren und Suppressoren dieses Gens.

Ein Induktor von *hTERT* ist beispielsweise das E6- Protein des humanen Papillomvirus Typ16 (HPV-16). Dieses Protein aktiviert das *hTERT*- Gen p53 unabhängig (Klingelhutz et al., 1996).

In zahlreichen Arbeiten wurde die zentrale und umfassende Rolle der *Myc*-Protoonkogenfamilie beschrieben. Hierbei handelt es sich z.B. um Schlüsselrollen bei der Zellzyklusregulation, Zelldifferenzierung, Metabolismus, Hämatopoese, Tumorigenese und weitere. Die exprimierten Proteine des *Myc* Protoonkogens sind Teil eines weiten Netzwerks von Transkriptionsregulatoren. Speziell der Transkriptionsfaktor *c-Myc* scheint einen großen Einfluss auf die Expression von *hTERT* zu haben (Grandori et Eisenman, 1997; Dang, 1999; Hoffman et al., 2002).

Der Telomerasepromotor ist ein direktes Ziel von *c-Myc*. Bei *c-Myc* Überexpression wird auch die *hTERT*-Expression hochreguliert (Greenberg et al., 1998; Wu et al., 1999). Untersuchungen mit transformierten Zellen zeigen eine auffallende Korrelation zwischen *Myc*- und *hTERT*-Expression (Greenberg et al., 1998; Hiyama et al., 1995). Umgekehrt zeigen Versuche mit Antisense *c-Myc* Oligonucleotiden gegen *c-Myc*- mRNA eine Abnahme der Telomeraseaktivität in Leukämiezellen (Fujimoto et Takahashi, 1997).

Erhöhte *Myc* Expression ist auch in gesunden, proliferierenden Zellen wie Epidermisbasalzellen (Härle-Bachor et Boukamp, 1996), Endometriumzellen während der Proliferationsphase (Kyo et al., 1997), Blasenepithelzellen (Belair et al., 1997) und weiteren nachweisbar. In diesen Zellen ist die Telomerase ebenfalls aktiv.

Die Aktivität von *hTERT* wird von Sequenzen weiter stromaufwärts im Bereich der Telomerregion stark beeinflusst. Hier kommt es zu einer deutlichen Induktion der katalytischen Aktivität der Telomerase. Diese Eigenschaft erhöht die Spezifität der Telomerase für die Telomerenden (Lee et Blackburn, 1993; Melek et al., 1996).

Eine weitere Regulationsmöglichkeit, ist die Bildung von alternativ gespleißten *hTERT* Transkripten. Diese können z.B. Deletionen in für die Reverse Transkription wichtigen Abschnitten enthalten und so inaktiviert sein (Ulaner et al., 1998).

Mindestens zwei *hTERT*-Gensuppressoren sind auf dem Chromosom 3p (3p21.2-3p14.2 und 3p24.3-3p24.1) identifiziert worden. Der Verlust dieser Chromosomenabschnitte führt zur Expression von *hTERT* und somit zur Aktivierung der Telomerase. Ob die von diesen Genloci kodierten Proteine direkt die Telomerase beeinflussen oder für andere an der Alterung beteiligte Proteine kodieren, ist nicht bekannt (Mehle et al., 1998).

Das TRF1-Protein (s. 1.5) scheint ein weiterer negativer Regulator der Telomeraseaktivität zu sein. TRF1 bindet als Homodimer an den repetitiven TTAGGG-Doppelstrang der Telomere und behindert die Aktivität der Telomerase. Überexpression von TRF1 verursacht die Verkürzung der Telomere um 3 bis 12 bp pro Zellteilung. Der Verlust von TRF1 wiederum ermöglicht der Telomerase die Verlängerung der Telomere um ca. 35bp pro Zellteilung (Van Steensel et al., 1997).

Ein Regulator von TRF1 scheint wiederum das Enzym Tankyrase zu sein.

Tankyrase ist ein Protein mit Ähnlichkeiten zu Ankyrinen und der katalytischen Domäne von PARP (Poly Adenosin Diphosphat-Ribose Polymerase). ADP-Ribosylierung führt gewöhnlich zur Inaktivierung von Proteinen (Oei et al., 1998). TRF1 wird von Tankyrase ADP-ribosyliert und somit inaktiviert. Dies führt zur Inhibition der Telomer-DNA Bindung durch TRF1. Möglicherweise beeinflusst die Tankyrase auch andere telomerassoziierte Faktoren, wobei eine Aktivierung durch ADP-Ribosylierung ebenfalls möglich erscheint (Smith et al., 1998).

Typisch für Promotoren ohne TATA-Box sind Regionen mit einem hohen Gehalt an C-G-Dinukleotiden. Es wird vermutet, dass solche Regionen den Transkriptionsstartpunkt darstellen. Sowohl der *hTERT*- als auch der *hTR*-Promotor enthalten solche C-G reichen Regionen. Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass die Expression dieser beiden Telomerase-Schlüsselkomponenten auch gemeinsam regulativ beeinflusst wird. Die mögliche Beeinflussung dieser C-G reichen Regionen durch Methylierung im Rahmen normaler Entwicklung, Differenzierung und Tumorigenese wurde bereits mehrfach beschrieben (Jones et al., 1983; Laird et Jaenisch, 1996; Zhao et al., 1998).

1.10 Problemstellung und Zielsetzung

Die oben beschriebenen Beobachtungen bezüglich Telomeraseaktivierung in Tumoren und Erkenntnisse über Regulationsmechanismen legen die Entwicklung einer tumorselektiven Gentherapie nahe. Es wurde gezeigt, dass die Expression von *hTERT* mit der Aktivität des *hTERT* Promotors korreliert. Telomeraseaktivität in Tumoren wird auf Reaktivierung des *hTERT* Promotors zurückgeführt.

Ziel ist die Etablierung eines Gentherapieverfahrens zur gezielten Behandlung von telomerasepositiven Tumoren. Zur Therapie könnte ein toxisches Transgen unter Kontrolle des Telomerasepromotors mit Hilfe eines adenoviralen Vektors in die Zelle geschleust werden. Bei exzessiver Aktivierung des Telomerasepromotors in Tumoren wird das eingeschleuste Transgen stark exprimiert, was zum Absterben dieser Zelle führt. Telomerasenegative gesunde, somatische Zellen müssten trotz Infektion mit dem Vektor verschont bleiben.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit soll nach Charakterisierung einiger Zelllinien auf Telomeraseaktivität die Telomerasepromotoraktivität untersucht werden.

Außerdem soll das adenovirale Konstrukt bzw. der *hTERT* Promotor auf Tumorzellspezifität untersucht werden.

In den Experimenten werden Zellen mit adenoviralen Vektoren transfiziert. Als Transgen enthalten die Vektoren in der E1 deletierten Region das Luciferase Reportergen unter Kontrolle des Telomerasepromotors. Als Kontrolle befindet sich in einem zweiten Vektor das Luciferase Reportergen unter Kontrolle des starken CMV-Promotor. Durch Messung der in den transfizierten Zellen exprimierten Luciferasemenge und Vergleich der Werte bei den verschiedenen Zelllinien und Promotoren kann man Rückschlüsse auf die Promotoraktivität und die Tumorzellspezifität ziehen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Hela	Humane Zervix-Karzinomzelllinie (ATCC CCL2, Manassas, USA; Gey et al., 1952; Knowles et al., 1980)
Saos-2	Etablierte Zelllinie aus einem humanen Osteosarkom; ATCC HTB 85; Cell Lines Service (Heidelberg)
H1299	Etablierte Zelllinie aus einem humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom; zur Verfügung gestellt von B. Opalka (Innere Tumorklinik, Essen)
A549	Etablierte humane Zelllinie aus einem Lungenkarzinom (Giard et al., 1973); ATCC CL 185; ATCC (Rockville, USA)
293	Mit Ad5-E1A stabil transformierte menschliche embryonale Nierenzellen (Graham et al., 1977); Microbix Biosystems Inc. (Toronto, Canada)
MZA	Etablierte Zelllinie aus einem humanem Pankreas-Adenokarzinom; zur Verfügung gestellt von David E. Smith, Mayo Klin. Rochester USA
VH6	Humane Vorhaut-Fibroblastenzelllinie; zur Verfügung gestellt von Prof. M. Roggendorf, Institut für Virologie, Uni-Klinikum Essen

2.1.2 Rekombinante Adenoviren

Bei den in dieser Promotionsarbeit verwendeten Adenovirus-Vektoren handelt es sich um Erstgenerations-Adenovirus-Vektoren, bei denen die Transgen-Expressionskassette in der deletierten E1-Region integriert ist. Durch die E1 Deletion sind die Viren replikationsdefekt, wodurch u.a. die Anwendungssicherheit erhöht wird. Durch zusätzliche Deletionen in der E3-Region ist es möglich, Transgene bis ca. 8 kb in das Virusgenom einzufügen. Die Vermehrung dieser replikationsdefekten Adenoviren erfolgt in 293 Zellen. Diese Ad5-E1A stabil transformierten menschlichen embryonalen Nierenzellen (Graham et al., 1977)

enthalten die zur Replikation erforderliche E1-Region und ermöglichen somit die Virusreplikation (Roy-Chowdhury et al., 2002).

Bei den Experimenten zur Untersuchung der Telomerasepromotoraktivität wurden zwei unterschiedliche rekombinante adenovirale Vektoren verwendet. Beide Vektoren enthalten als Transgen das Luciferase Reportergen. Das Luciferase Reportergen wird in einem der beiden Viren durch den *hTERT*-Promotor (Ad-*hTERT*-Luc), im anderen (Kontrollvirus) durch den CMV-Promotor (Ad-CMV-Luc) reguliert.

Die genannten Ad-Vektoren wurden von M. Lowak im Rahmen seiner Promotionsarbeit, in der Arbeitsgruppe von B.M. Pützer, am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) des Essener Universitätsklinikums hergestellt.

2.1.3 Die Promotoren

Die Länge des Wildtyp-*hTERT*-Promotors beträgt etwa 4 kb.

Die in unseren Versuchen verwendeten adenoviralen Vektoren enthalten eine deletierte Version des Wildtyp-Promotors. Durch sukzessive Deletion auf eine Länge von 408 bp, wurde die Aktivität des Promotors sogar erhöht.

Die Abschnitte 1.9.3 u. 1.9.4 enthalten detaillierte Informationen zum *hTERT*-Promotor.

Bei dem CMV-Promotor handelt es sich um den Promotor des murinen Cytomegalievirus. Die Länge des Promotors beträgt 595bp. Bei den Untersuchungen zur Aktivität des Telomerasepromotors wird die Aktivität des CMV-Promotors als Kontrolle verwendet.

2.1.4 Versuchstiere

Nacktmausstamm: NMRI- Nude. Die Tiere stammen aus dem zentralen Tierlaboratorium (ZTL) des Universitätsklinikums Essen. Alle Tierexperimente wurden nach den Richtlinien des ZTL durchgeführt.

2.1.5 Oligonucleotide

Oligonucleotide für Polymerase-Kettenreaktionen wurden von der Firma Metabion, Martinsried, synthetisiert. Die Sequenzen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Bezeichnung	Sequenz
Ad5	5'- Dig-GAG AAG AAG GAC AGC CTA AC -3'
cPCR-23943-ad5-S	5'- CGA CAC GTC CTC CAT GGT TG -3'
cPCR-24214-ad5-AS	5'- CAA AAC CTG GGT CCT GCT CG -3'
Luc-S	5'- TGG AGA GCA ACT GCA TAA GG -3'
Luc-AS	5'- CTG AAA TCC CTG GTA ATC CG -3'
5'-GAPDH	5'- CAC AGT CCA TGC CAT CAC -3'
3'-GAPDH	5'- CACCAC CCT GTT GCT GTA -3'

2.2 Zellkultur

2.2.1 Material für die Zellkultur

<u>Lösungen:</u>	Trypsin-Lösung	0,6mM EDTA 2g/l Trypsin
	PBS	127 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 6,5 mM Na ₂ HPO ₄

Alle Lösungen wurden vor Verwendung sterilfiltriert.

<u>Medien und Seren:</u>	DMEM	Gibco BRL, Eggenstein
	Fetales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
	L-Glutamin	Merck, Darmstadt
	Nicht-essentielle AS (100x)	Gibco BRL, Eggenstein
	Penicillin G	Hoechst, Frankfurt a. M.
	Streptomycinsulfat	Sigma, Deisenhofen

Verbrauchsmaterialien:

Petrischalen für Zellkulturen	Greiner GmbH, Solingen
	Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Multiwell-Zellkulturplatten	Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf GmbH Wesseling-Berzdorf
Sterile Einmalkunststoffreagenzgläser	Sarstedt, Nümbrecht

Das fetale Kälberserum wurde vor Gebrauch für 30 min. bei 56°C inaktiviert. Die sterilfiltrierten Zellkulturmedien wurden eingesetzt mit 10% (v/v) FCS, 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin G und 100µg/ml Streptomycin.

2.2.2 Zellkultivierung

Die verschiedenen (adhärent wachsenden) Zelllinien wurden auf beschichteten Zellkulturschalen bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden in DMEM mit einem Zusatz an 10% fetalem Kälberserum (FCS) gehalten. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen. Ein Aliquot der durch kurzes Inkubieren mit Trypsin-Lösung abgelösten Zellen wurde auf neuen Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in einer Suspension wurde ein Aliquot derselben mit einem Haemocytometer (nach Neubauer) ausgezählt.

2.2.4 In vivo-Zellkultivierung

Nach Auswahl des geeigneten Zelltyps (H1299) wurden den Versuchstieren subkutane Tumore auf dem Rücken induziert. Durch diese Lokalisation werden die Versuchstiere am wenigsten negativ beeinflusst. Zur Tumorinduktion wurden H1299-Zellen von 21 dicht bewachsenen 15cm Zellkulturplatten nach Absaugen des Mediums und Spülung mit PBS trypsiniert. Die Zellen wurden mit 4°C kaltem PBS von den Zellkulturplatten gespült und in ein 50ml Falconröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 10Min. bei 1200rpm, 4°C und Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 4ml 4°C kalte DMEM ohne Zusätze resuspendiert. Die Zellen wurden mit einem Haemocytometer (nach Neubauer) ausgezählt und es wurde eine DMEM-Zellsuspension ohne Zusätze mit jeweils 10^7 Zellen pro 200µl hergestellt. Nach Äthernarkose wurden den Versuchstieren subkutane Zellsuspensionsdepots mit jeweils 200µl (10^7 Zellen) Zellsuspension durch eine Insulinspritze (Terumo, Frankfurt a.M.) injiziert. Nach etwa 30 Tagen sind sichtbare und tastbare Tumore einer Größe von 10mm entstanden, so dass die Versuche fortgesetzt werden konnten. Die Versuchstierpflege erfolgte durch das zentrale Tierlaboratorium der Universitätsklinik Essen.

2.3 Transfektionstechniken

2.3.1 Vorbereitung der Zelllinien zur Transfektion

Nach Auszählung der einzelnen Zelllinien mit einem Haemocytometer (nach Neubauer) wurden 2×10^4 Zellen auf eine 24-Well Zellkulturplatte (Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) ausgesät und über Nacht in DMEM mit 10% FCS bei 37°C kultiviert. Am

darauf folgenden Tag wurden die Zelllinien unter Annahme einer Zellzahlverdopplung mit Adenoviren transfiziert.

2.3.2 Herstellung einer Virussuspension mit gewünschter Viruskonzentration

Die konzentrierten Virussuspensionen werden bei -80°C in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) aufbewahrt. Zur Herstellung einer Suspension mit niedrigerer Viruskonzentration werden die Kryoröhrchen mit der enthaltenen Virussuspension auf Eis langsam aufgetaut. Solange die Virussuspensionen auftauen, wird nach Berechnung der entsprechend benötigten Mengen DMEM mit 0,5% FCS in sterile Einmalkunststoffreagenzgläser vorgelegt. Die aufgetaute, konzentrierte Virussuspension wird in das erste Reagenzglas pipettiert. Nach kurzem Vortexen wird durch Überpipettierung in weitere Reagenzgläser eine Verdünnungsreihe mit abnehmender Konzentration erzeugt. Bei jedem Verdünnungsschritt wird kurz gevortext.

2.3.3 Transfektion von Zellen in Kultur

Die Transfektionen wurden auf 24-Well Zellkulturplatten (Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heildelberg) durchgeführt.

Nach Absaugung des Kulturmediums wurden die Wells zur Spülung mit jeweils 500 μl warmem PBS bestückt, umgeschwenkt und wieder abgesaugt.

Nach Berechnung der moi (multiplicity of infection = Verhältnis zwischen infektiösen Virus Partikeln und Zellen) und Herstellung einer Virussuspension mit der gewünschten Viruskonzentration wurden Wells mit zu transfizierenden Zellen mit 200 μl Virussuspension in DMEM mit 0,5% FCS bestückt. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37°C . Nach der Inkubation wurde den Wells jeweils 300 μl 37°C warmes DMEM mit 10% FCS zugegeben. Die Kulturplatten wurden bis zur weiteren Untersuchung im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

2.3.4 *In vivo* Transfektionen

Die konzentrierten Virussuspensionen werden bei -80°C in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) aufbewahrt. Nach vorsichtigem Auftauen auf Eis wurde die benötigte Menge an Virussuspension direkt in eine Insulinspritze aufgezogen und teilweise auf $200\mu\text{l}$ mit 4°C kaltem PBS verdünnt. Da die höchste verwendete Viruskonzentration die Injektion von $200\mu\text{l}$ konzentrierter Virussuspension erforderlich machte, wurde eine Injektionsmenge von $200\mu\text{l}$ gewählt. Die Verabreichung der jeweils $200\mu\text{l}$ Virussuspension erfolgte durch Injektion in eine Schwanzvene, mit der feinen Nadel der Insulinspritze (Terumo, Frankfurt a.M.) nach Äthernarkose der Tiere.

2.4 Analyse von Ribonucleinsäuren

2.4.1 Analyse von DNA

2.4.1.1 Präparation genomischer DNA

Genomische DNA aus Mausgewebe und kultivierten Zellen wurde mit dem „DNeasy™ Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben präpariert. Die DNA-Präparation aus Mausgewebe wurde jedoch wie folgt modifiziert: Nach Präparation der Gewebe wurden linsengroße Gewebestücke in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mit Hilfe einer kleinen Schere gründlich zerkleinert. Die Schere wurde nach jedem Zerkleinerungsvorgang mit Aqua dest. und einer einmolaren NaOH-Lösung gespült. Die Spülung mit der NaOH-Lösung erfolgte, um eventuelle DNA-Reste, welche die Messungen verfälschen könnten, zu denaturieren. Eine weitere leichte Modifikation war die Behandlung der Proben mit $10\mu\text{l}$ (10mg/ml) RNase A statt $4\mu\text{l}$ ($100\text{mg}/\mu\text{l}$) und eine verlängerte Inkubationsdauer auf 5 Minuten, statt 2 Minuten. Die weitere Probenaufbereitung und -analyse geschah nach Herstellerangaben.

2.4.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur photometrischen Bestimmung der Menge an DNA wurde die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm, 280 nm und 320 nm mit dem DU[®]-64 Spectrophotometer der Firma Beckman bestimmt. Aus den Messwerten wurde die DNA-Menge mittels folgender Formel bestimmt, wobei die Werte für die Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) und 280 nm (OD_{280}) um die bei 320 nm gemessene Extinktion korrigiert wurden:

$$C = 62.9 \times OD_{260} - 36.0 \times OD_{280} \text{ [}\mu\text{g/ml]}$$

2.4.1.3 DNA-Amplifikation mittels PCR-Technik

Die „polymerase chain reaction“ (PCR) (MULLIS et al. 1986) ermöglicht die spezifische, exponentielle, automatisierte Vervielfältigung von DNA mit Hilfe von sequenzspezifischen Oligonucleotiden (Primer). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für den Nachweis von viraler DNA, der *hTERT*-Expression und für das TRAP-Assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol) eingesetzt.

Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass die Schmelztemperatur T_m höher als 50°C lag, wobei T_m wie folgt berechnet wurde:

$$T_m = 69.3^\circ\text{C} + 0.41 \times (\%GC) - 650/(\text{Länge in nt})$$

5'- und 3'-Primer sollten in ihrer Schmelztemperatur möglichst übereinstimmen. Stabile intra- und intermolekulare Sekundärstrukturen sowie höhergradige Sequenzhomologien zu bekannten Gensequenzen wurden anhand von Datenbankvergleichen (Genbank) ausgeschlossen. Bei manchen PCR wurde zur Auflockerung des DNA-Stranges und Erhöhung der Amplifikationsproduktmenge 10 Vol% DMSO zum Reaktionsansatz zugefügt. Die PCR wurden mit Hilfe eines Temperaturgradientes temperaturoptimiert und/oder mit MgCl in der Effizienz optimiert. Zur Amplifikation wurde der Thermocycler: Mastercycler Gradient von Eppendorf verwendet.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt pro Reaktionsgefäß:

18.2 µl	H ₂ O
3 µl	10x PCR-Puffer
1.8 µl	MgCl
0.6 µl	1.25 mM dNTPs
50 pmol	5'-Primer
50 pmol	3'-Primer
1 U	Taq DNA Polymerase (Promega)
5 ng	Template

Die Reaktionsbedingungen (exemplarisch) ausgehend von genomischer DNA waren wie folgt:

initiale Denaturierung	95°C, 120 Sec	
Denaturierung	95°C, 15 Sec	} 30 Zyklen
Primeranlagerung (annealing)	$T_m - 2^\circ\text{C}$, 30 Sec	
Elongation	72°C, 60 Sec	
terminale Elongation	72°C, 240 Sec	

Der Amplifikationserfolg wurde durch Nachweis einer singulären DNA-Bande der entsprechenden Größe in der Agarosegelelektrophorese überprüft. Bei problematischen PCR mit Amplifikation von unspezifischen Produkten wurde die annealing-Temperatur höher gewählt oder eine „touchdown“-PCR mit höheren (spezifischeren) annealing-Temperaturen in den weiteren Zyklen durchgeführt.

2.4.1.4 DNA-Amplifikation mittels nested-PCR-Technik

Beim Nachweis von Virus- DNA zeigte sich, dass die Anwendung dieser speziellen PCR-Methode zu besseren Ergebnissen führt. Die Besonderheit der nested-PCR ist die wiederholte Amplifikation eines PCR-Produktes, unter Verwendung innerhalb des ersten Amplifikationsproduktes bindender Primer und die Durchführung einer zweiten

Amplifikation. So können sehr geringe Mengen DNA noch per Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden.

2.4.1.5 Radioaktive [γ - ^{32}P -ATP]-Markierung von DNA

Zur Markierung von DNA im Rahmen des TRAP-Assays (s. 2.5.5), wurde γ - ^{32}P -ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml; Hartmann Analytic, Braunschweig) nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.1.6 Radioaktive [α - ^{32}P -dCTP]-Markierung von DNA

Zur Markierung von DNA im Rahmen der RT-PCR (s. 2.4.2.3) wurde α - ^{32}P -dCTP (3000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ / 540 μCi in 54 μl ; Hartmann Analytic, Braunschweig) verwendet.

2.4.1.7 Elektrophorese von Nukleinsäuren im Agarosegel

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen unter Einsatz von 1xTAE als Laufpuffer aufgetrennt. In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-2,5%ige Gele mit 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid verwendet und die Elektrophorese bei einer Spannung von 5-20 V/cm durchgeführt. Die DNA-Lösungen wurden zuvor mit einer entsprechenden Menge an 6x DNA-Probenpuffer versetzt.

50x TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat
	50 mM EDTA, pH 8,0
6x DNA-Probenpuffer	150 mM EDTA
	0,25% (w/v) Bromphenolblau
	0,25% (w/v) Xylencyanol FF
	50% (v/v) Glycerol

2.4.2 Analyse von RNA

Sämtliche Arbeiten mit RNA wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Zur Inaktivierung von RNasen wurde Aqua bidest. mit 1/1000 Volumina Diethylpyrocarbonat (DEPC) bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert. Lösungen wurden ausschließlich mit DEPC-behandeltem Aqua bidest. angesetzt. Glasgeräte (Schalen, Platten, Glaspipetten) wurden für 2 h bei 180°C gebacken und es wurden RNase freie Kunststoff-Geräte (Pipetten, Reaktionsgefäße) verwendet.

2.4.2.1 Präparation zellulärer Gesamt-RNA

Zelluläre gesamt-RNA wurde mit dem „RNeasy™ Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben präpariert.

2.4.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Quantifizierung der RNA-Konzentration wurden 5µl RNA-Lösung in 1 ml 1mM Na₂HPO₄-Lösung verdünnt. Es wurden die Extinktionen bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge mit dem DU[®]-64 Spectrophotometer der Firma Beckman bestimmt. Die RNA-Konzentration berechnet sich nach:

$$C(\mu\text{g/ml}) = OD_{260} / 0.025$$

2.4.2.3 Analyse der Genexpression durch RT-PCR

Ausgehend von zuvor aus Zellen isolierter Gesamt-RNA (s. 2.4.2.1) wurde mit dem Enzym Reverse Transkriptase (Superscript II, Gibco BRL, Eggenstein) cDNA synthetisiert. In der RT-Reaktion wurden 5 µg Gesamt-RNA und 2 pmol eines genspezifischen 3'-Primers

eingesetzt. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 12 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend 1 min auf Eis abgekühlt. Dann wurden

4 µl 5x First Strand Buffer
2 µl 0.1 M DDT
1 µl 10 mM dNTP-Mix

zugegeben und für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Superscript II (200U) wurde durch Inkubation bei 42°C für 50 min die cDNA-Synthese durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 min gestoppt. 2 µl der erhaltenen cDNA wurden nun in einer PCR mit genspezifischen Primern eingesetzt. Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, wurde im Falle einer RT-PCR die PCR als „hot start“-PCR durchgeführt. Hierfür wurde die Taq-Polymerase AmpliTaq Gold[®] (Perkin Elmer) verwendet, die in inaktiver Form vorliegt und erst durch die initiale Denaturation von 10 min bei 95°C aktiviert wird. Auf diese Weise konnte verhindert werden, dass bereits bei dem Ansetzen der PCR-Reaktion Primer unspezifisch anlagerten und so die Taq-Polymerase unspezifische Produkte amplifizierte. Die PCR wurde wie in Abschnitt 2.4.1.3 beschrieben durchgeführt. Um eine semi-quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurde die Anzahl der Zyklen auf 30 beschränkt. Für den Nachweis von gering bis mittelmäßig exprimierten Genen wird auf diese Weise nicht genügend DNA amplifiziert, um diese in einer Agarose-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid-Färbung sichtbar zu machen. Daher wurde pro PCR-Ansatz 0.1 µl α-³²P-dCTP (3000 µCi/mmol / 540µCi in 54µl; Hartmann Analytic, Braunschweig) eingesetzt. Durch Einbau dieser radioaktiv markierten Nucleotide in die DNA-Kette, ist es möglich, sehr geringe Mengen DNA nachzuweisen. Nach Auftrennung des PCR-Produktes mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde das Gel zunächst getrocknet. Die Detektion erfolgte durch Exposition gegen einen Röntgenfilm mit Verstärkerfolie (BioMAX-System, Kodak) bei -80°C über Nacht.

2.5 Analyse von Proteinen

2.5.1 Herstellung von Zellextrakten, aus auf Kulturplatten kultivierten Zellen

Die Zellen wurden auf 24-Well Zellkulturplatten (Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) kultiviert. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Wells mit jeweils 200µl 4°C kaltem PBS gespült. Nach Absaugen des PBS wurden 100µl Cell Culture Lysis Reagent 5x (Promega, Mannheim) pro well hinzugefügt. Die Lyse erfolgte 30 min lang auf einer Rüttelbank bei Raumtemperatur. Nach 30 min wurde das Lysat in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und zur Abtrennung unlöslicher Zelldebris zentrifugiert (14000rpm, 10 min, 4°C). Das Lysat wurde in frische Eppendorf Reaktionsgefäße unter Zurücklassen des Zelldebrispellets überführt und bei -20°C gelagert.

2.5.2 Herstellung von Zellextrakten aus Mausgewebe

Nach Präparation der Gewebe wurden linsengroße Gewebestücke in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mit Hilfe einer kleinen Schere gründlich zerkleinert. Die Schere wurde nach jedem Zerkleinerungsvorgang mit Aqua dest. und einer einmolarer NaOH-Lösung gespült. Die Spülung mit der NaOH-Lösung erfolgte zur Denaturierung eventueller Protein-Reste, welche die Messungen verfälschen könnten. Dem entstandenen Gewebebrei wurden 700µl Cell Culture Lysis Reagent 5x (Promega, Mannheim) zugefügt. Die Lyse erfolgte 30 min lang auf einer Rüttelbank bei Raumtemperatur. Nach 30 min wurde das Lysat zur Abtrennung unlöslicher Zelldebris und Gewebeanteile zentrifugiert (14000rpm, 10 min, 4°C). Das Lysat wurde unter Zurücklassen von Zelldebris und Gewebe in frische Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

2.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Ein typischer Meßansatz enthielt:

700 µl H₂O
 5 µl Zellextrakt in 100 µl PBS
 200 µl Bradford-Reagenz (BioRad)

Die Proteinlösung wurde mit PBS auf 100 µl verdünnt, es wurden 700 µl H₂O und unter gutem Mischen 200 µl Bradford-Reagenz zugefügt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm, mit dem Multi Plate Reader der Firma Biorad auf einer 96-Well-Platte (200µl pro Well), bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve, die mit verschiedenen BSA- (Bovine Serum Albumin) Konzentrationen erstellt wurde, errechnet.

2.5.4 Luciferase-Assay

Das Biolumineszenz-Enzym Luciferase ist ein 61kDa Proteinmonomer, welches mit Hilfe von ATP-Mg²⁺ und O₂ als Kosubstrat Luciferin (Promega, Mannheim) zu Oxyluciferin katalysiert. Bei dieser Reaktion entsteht unter anderem ein Lichtquant. Das folgende Reaktionsschema veranschaulicht die chemische Reaktion:

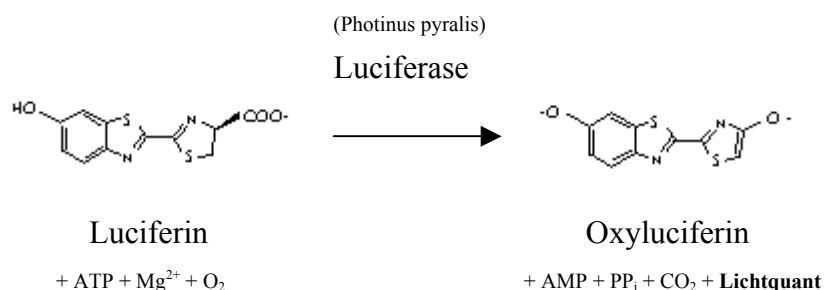


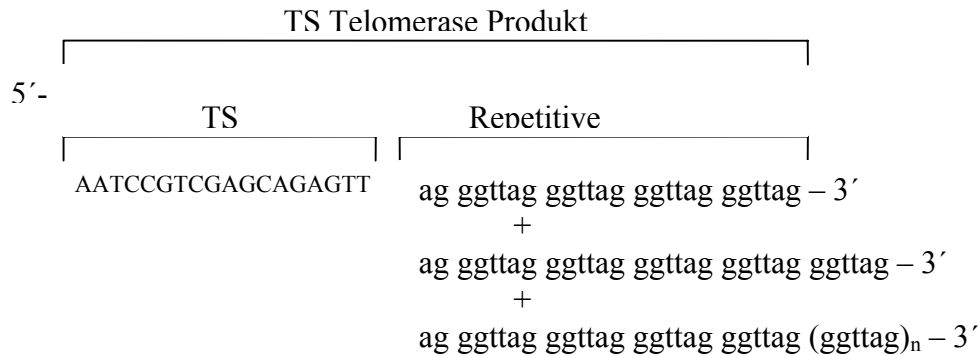
Abb. 2-1 Reaktionsschema der chemischen Reaktion im Luciferase-Assay

Die Nordamerikanische Feuerfliege *Photinus Pyralis* setzt zur Kommunikation mit Artgenossen Lichtsignale ein. Wir nutzen die Lichtsignale zur quantitativen Bestimmung von Promotoraktivitäten. Die verwendeten adenoviralen Vektoren enthalten als Insert den zu untersuchenden Promotor mit dem dahinter klonierten Luciferase Reportergen. Bei Aktivierung des Promotors wird das hinter dem Promotor befindliche Gen zu RNA und schließlich zu dem Genprodukt, dem Protein Luciferase, translatiert. Der Promotor ist das regulatorische Element, welches die Proteinexpression bestimmt. Die Proteinexpression korreliert also mit der Promotoraktivität, welche mit diesem Assay indirekt quantitativ bestimmt wird. Zur Aktivitätsbestimmung wurden jeweils 20µl Zellextrakt in ein Lumitube (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Die Messung erfolgt in einem Luminometer (Lumat LB 9501 Berthold, Bad Wildbad) unter Zugabe von 10µl Luciferin (Promega, Mannheim). Die Leuchtaktivität wird in RLU (Relative Light Units) angegeben. Nach Messung der Proteinkonzentration (s. 2.5.3) wurden die RLU pro µg Protein errechnet.

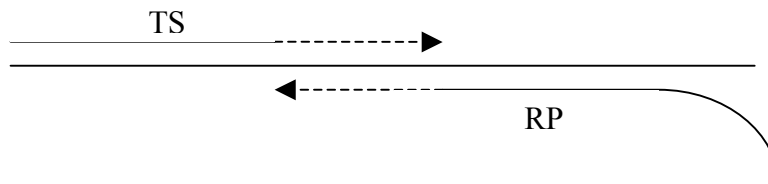
2.5.5 TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) Assay

Mit Hilfe des TRAP-Assays wurde im Rahmen dieser Arbeit die Telomeraseaktivität in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Die Telomeraseaktivitätsbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „TRAPeze[®] Telomerase Detection Kit“ (Intergen, U.S.A. jetzt Serologicals Corporation, Norcross, U.S.A.). Das verwendete Assay ist eine verbesserte Version der Originalmethode nach Kim et al. 1997 und beruht auf einem PCR-basierten Detektionssystem. Das hoch sensitive in vitro Assay System ist ein zwei-Enzym ein Puffer System. Bei dem ersten Schritt der Reaktion fügt Telomerase die Telomerasequenzen (GGTTAG) an das 3'-Ende eines Substrat Oligonucleotids (TS). Im zweiten Schritt werden die verlängerten Produkte mittels PCR (s. 2.4.1.3) amplifiziert. Für die PCR werden die im Kit enthaltenen Primer TS und RP (reverse) verwendet. Es entsteht ein mit 50 Nucleotiden beginnendes Bandenmuster, mit 6 Basen Bandenabstand: 50, 56, 62, 68 usw.

1. Schritt: Die Telomerase fügt repetitive Telomersequenzen zum TS-Primer hinzu



2. Schritt: PCR-Amplifikation des TS-Telomerase Produkts



3. Schritt: SDS-PAGE und Quantitation der Telomeraseaktivität

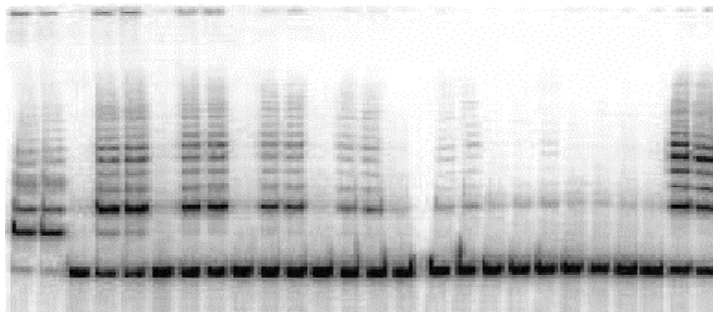


Abb. 2-2 Prinzip des TRAPEze[®] Telomerase Detection Kits

(Intergen, U.S.A., jetzt Serologicals Corporation, Norcross, U.S.A.)

Bei unserem Ansatz haben wir uns für die radioaktive Detektion entschieden. Hierzu wurde der TS-Primer mit γ -³²P-ATP nach Herstellerangaben markiert. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel wurde 10 min in 15% Essigsäure fixiert, für 2 Stunden bei 80°C getrocknet und bei -80 gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die anschließende quantitative Auswertung der Telomeraseaktivitäten erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers. Als Ergebnis erhielten wir die Telomeraseaktivitäten der jeweiligen Proben, angegeben in TPG-Einheiten (Total Product Generated).

3. Ergebnisse

3.1 *in vitro* Versuche

3.1.1 *hTERT*-Expression in den Tumorzelllinien

Um mit Hilfe des Telomerasepromotors Gentherapie betreiben zu können ist es zunächst notwendig, die *hTERT*- Promotoraktivität der verwendeten Zelllinien zu untersuchen. Durch Nachweis von *hTERT* mRNA kann man Rückschlüsse auf die Promotoraktivität von *hTERT* ziehen. Dies ist notwendig, weil wir mit Hilfe des Telomerasepromotors, der in den meisten Tumoren hochaktiv ist, einen gentherapeutischen Ansatz untersuchen wollen (Kim et al., 1994; Gu et al, 2000).

Für die Versuche verwendeten wir Telomerase-positive Tumorzelllinien. Als Negativkontrolle diente die Telomerasenegative VH6 Zelllinie.

Die Untersuchung der Zellen auf *hTERT*- mRNA-Expression wurde mit Hilfe der RT-PCR (s. 2.4.2.3) durchgeführt.

Der Nachweis deutlicher Banden mit dem *hTERT*- Primer beweist das Vorhandensein von *hTERT*- mRNA und zeigt uns indirekt, dass der *hTERT*- Promotor aktiviert ist.

Zum Ausschluss einer eventuellen *hTERT*- Promotoraktivierung durch Faktoren im Zellkulturmedium wurden normale VH6- Fibroblasten in der Negativkontrolle durch Zugabe von fötalem Kälberserum (FCS) zum Medium behandelt.

Die Verwendung des G3PDH-Primers dient zum Nachweis von Zellextrakt bei Telomerasenegativen Zellen und zum Vergleich der einzelnen Telomerasepositiven Zelllinien. Das Gen der Glucose 3 Phosphodehydrogenase ist ein Single-Copy-Gene. Die Expression korreliert mit der Anzahl der Zellkerne (Thellin et al., 1999).

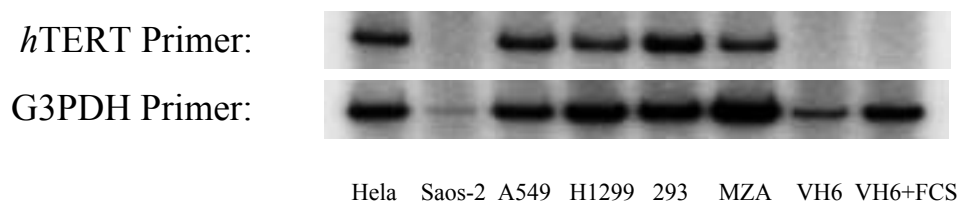


Abb. 3-1 **Untersuchung der *hTERT*-Expression mit Hilfe der RT-PCR:** Die photographische Abbildung eines belichteten Röntgenfilms zeigt DNA-Banden, welche nach der RT-PCR durch Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Exposition gegen einen Röntgenfilm sichtbar gemacht wurden. Banden mit dem *hTERT* Primer zeigen das Vorhandensein von *hTERT*- mRNA. Zur Negativkontrolle dient die Telomerasenegative VH6 Zelllinie. Der G3PDH- Primer dient zum Vergleich der Extraktmenge bei den einzelnen Zelllinien. Die Bandenstärken korrelieren mit der Anzahl der Zellkerne in den Extrakten bzw. der RT-PCR Amplifikationsproduktmenge.

3.1.2 Telomeraseaktivität humaner Zelllinien

Die Telomeraseaktivität in den einzelnen Zelllinien wurde mit Hilfe des TRAP-Assays (Telomeric Repeat Amplification Protocol) bestimmt.

Die verwendete Methode ist eine modifizierte Version der Originalmethode von (Kim et al., 1997). Mit dem TRAP-Assay wird die quantitative Messung der Telomeraseaktivität *in vitro* ermöglicht. Die Durchführung des Assays wird in Abschnitt 2.5.5 ausführlich beschrieben.

Das folgende Diagramm veranschaulicht die enzymatische Aktivität der Telomerase Reverse Transkriptase in den einzelnen Zelllinien. Die Telomeraseaktivität ist in TPG- Einheiten angegeben. Die Berechnung der angegebenen Werte erfolgte nach Durchführung des TRAP-Assays durch anschließende Messung mit einem Phosphorimager. Wie erwartet war bei der Telomerasenegativen VH6 Zelllinie keine Telomeraseaktivität nachweisbar. Die Tumorzelllinien jedoch wiesen eine deutliche Telomeraseaktivität auf.

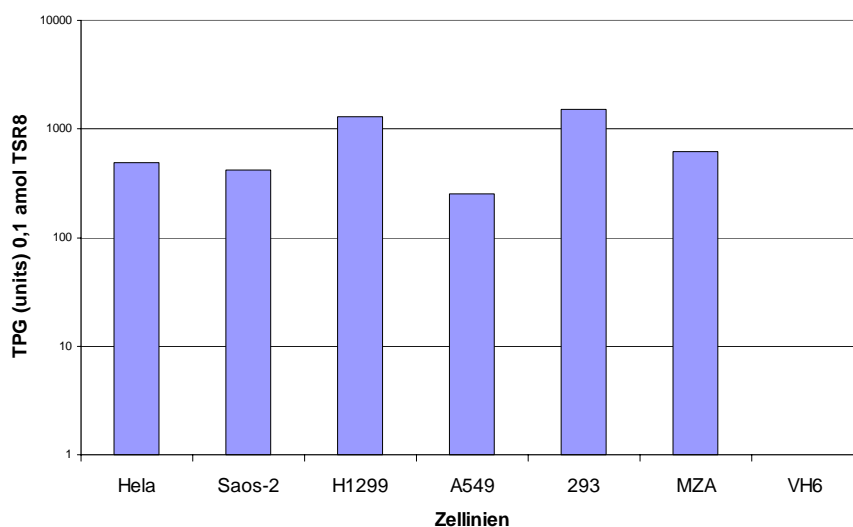


Abb. 3-2 **Untersuchung der Telomeraseaktivität humaner Zelllinien:** Das abgebildete Diagramm veranschaulicht die enzymatische Aktivität der Telomerase Reverse Transkriptase in den einzelnen Zelllinien. Die Telomeraseaktivität ist in TPG- Einheiten angegeben. Die Berechnung der angegebenen Werte erfolgte nach Durchführung des TRAP-Assays (Abschnitt. 2.5.5) durch anschließende Messung der Polyacrylamidgele mit einem Phosphorimager. Wie erwartet, ist bei der Telomerasenegativen VH6 Zelllinie keine Telomeraseaktivität nachweisbar. Bei den Tumorzelllinien dagegen ist eine deutliche Telomeraseaktivität nachweisbar.

3.1.3 Dosis- Wirkungsabhängigkeit mit Ad-CMV-Luc und Ad-*hTERT*-Luc

Für die *in vitro* Transfektionsexperimente war es zunächst nötig, die Dosis-Wirkungsabhängigkeit der rekombinanten Adenoviren auf die Zellen zu untersuchen. Dies war von hoher Bedeutung, da wir für die Experimente die optimale Viruskonzentration benötigten. Eine zu hohe Virusdosis kann zu Virustoxizität und zum Absterben der Zellen führen. Bei einer zu niedrigen Viruskonzentration dagegen werden nicht genügend Zellen infiziert. Nach Herstellung einer Virussuspensions- Verdünnungsreihe wurden VH6 Fibroblasten mit Ad-CMV-Luc und Ad-*hTERT*-Luc transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert, und es folgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität in den Zellextrakten (s. 2.5.4). Aus dem folgenden Diagramm ist zu entnehmen, dass die optimale Viruskonzentration bei 0,1 moi liegt. In diesem Bereich befinden sich beide Kurven in einem linearen Bereich, und es kommt auch zu einer genügend hohen Luciferaseexpression. Ad-CMV-Luc- Viruskonzentrationen ab 10 moi führen zu einem Abfallen der Aktivitätswerte.

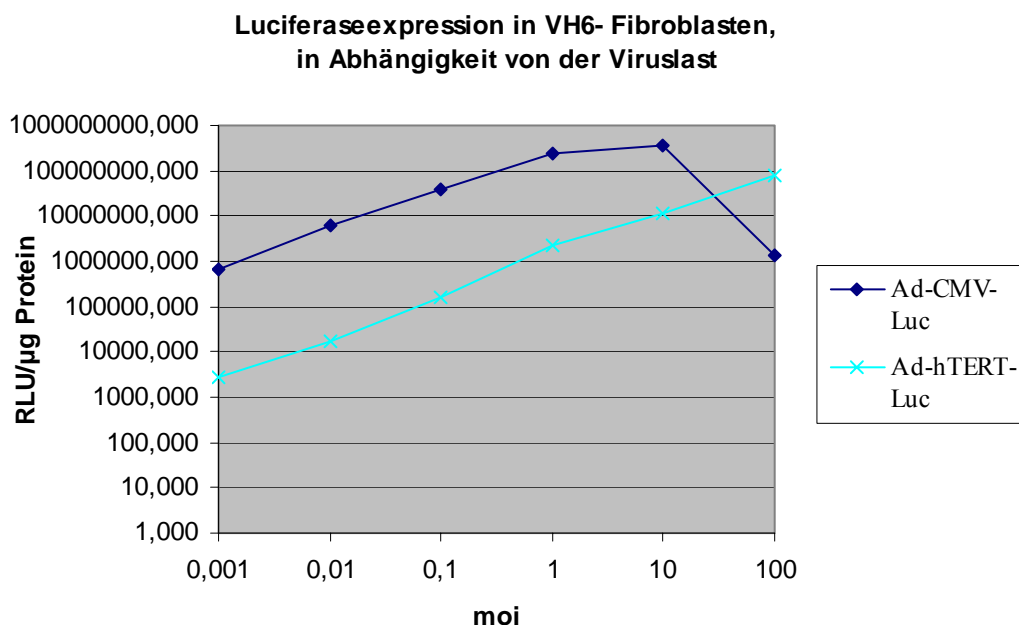


Abb. 3-3 **Dosis-Wirkungs Beziehungen von Viruslast und Luciferaseexpression:** Das Diagramm stellt die Beziehung zwischen der Virusmenge pro Zelle und der Expression von Luciferase dar. Die Luciferase- Aktivitätsmessung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Anhand der Kurve ist erkennbar, dass die optimale Viruskonzentration bei etwa 0,1 moi liegt. In diesem Bereich ist die Kurve relativ linear, und es kommt zu einer genügend starken Luciferaseexpression. Viruskonzentrationen ab 10 moi zeigen eine abnehmende Expression, wahrscheinlich durch Toxizitätseffekte.

3.1.4 Zeitkinetik

Nach Bestimmung der optimalen Viruskonzentration für die Infektionen (der Transduktionsexperimente) wurde auch der optimale Zeitpunkt zur Messung der Luciferaseaktivität ermittelt.

Nach Transduktion von H1299 Zellen mit jeweils 0,1 moi Ad-CMV-Luc und Ad-*hTERT*-Luc wurden in täglichem Abstand Zellextrakte angefertigt und bei -20°C eingefroren. Am siebten Tag erfolgte die Luciferaseaktivitätsbestimmung in allen Zellextrakten. Dem folgenden Diagramm ist zu entnehmen, dass der optimale Zeitpunkt zur Bestimmung der Luciferaseaktivität bei 72 Stunden liegt.

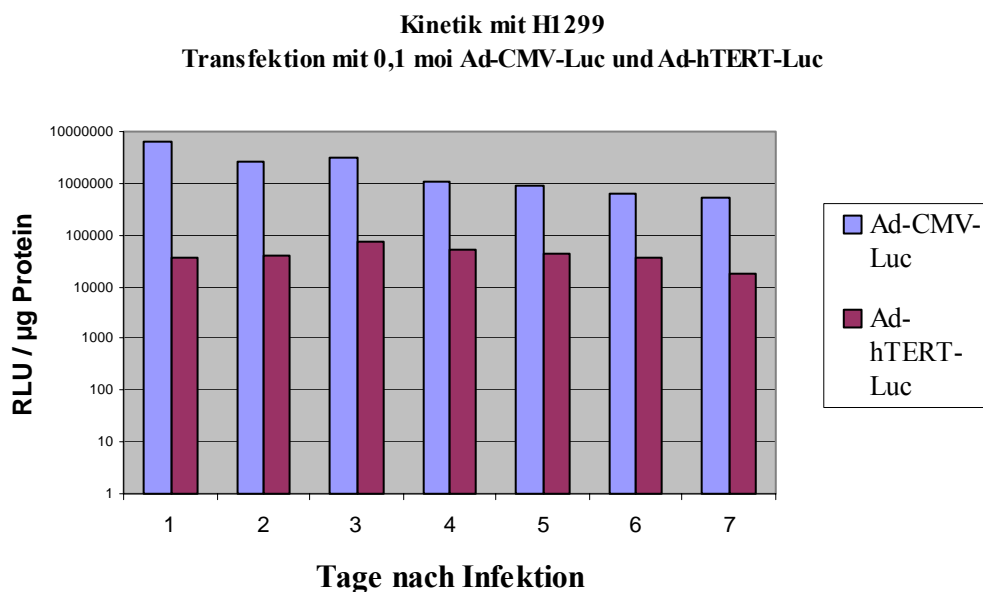


Abb. 3-4 **Untersuchung der Kinetik der verwendeten Vektoren:** Das abgebildete Diagramm zeigt die Luciferase- Reporterexpression in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Das Luciferasegen stand entweder unter Kontrolle des *hTERT*- Promotors oder zum Vergleich unter Kontrolle des CMV-Promotors. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass der optimale Zeitpunkt zur Messung der Genexpression bei 72 Stunden lag. Hier ist die Aktivität des *hTERT*- Promotors am höchsten. Die Werte wurden mit Hilfe von Luciferase-Assays ermittelt (Abschnitt 2.5.4).

3.1.5 Telomerasepromotoraktivität in den Tumorzelllinien im Vergleich zum CMV- Promotor *in vitro*

Zur weiteren Charakterisierung des *hTERT* Promotors wurden sechs unterschiedliche Tumorzelllinien mit jeweils 0,1 moi Ad-CMV-Luc und Ad-*hTERT*-Luc infiziert. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität erfolgte bei allen Zellen nach 72 Stunden Inkubationszeit. Wie erwartet wurde in allen Tumorzelllinien durch die Aktivierung des *hTERT*- Promotors Luciferase exprimiert. Über die Aktivität der Luciferase kann man indirekt Rückschlüsse auf die Aktivität des *hTERT* Promotors ziehen. Dies ist möglich, weil das Luciferasegen unter Kontrolle des *hTERT* Promotors stand. Der starke Cytomegalieviruspromotor in Ad-CMV-Luc diente als Kontrolle. Das folgende Diagramm veranschaulicht die Ergebnisse dieser Untersuchung.

Luciferaseaktivität bei 0,1 moi Viruslast

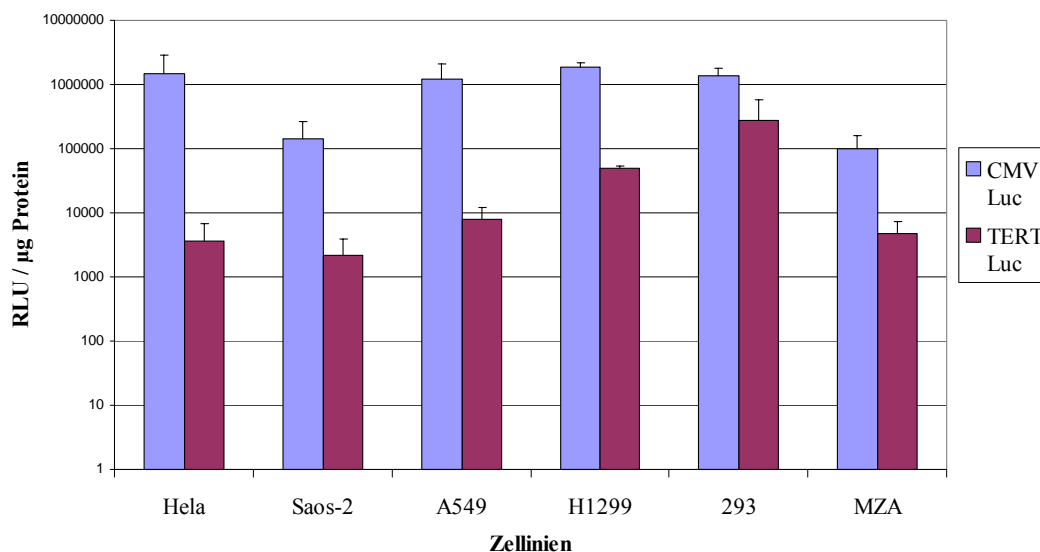


Abb. 3-5 **Aktivität des hTERT-Promotors im Vergleich zum CMV-Promotor:** Das Diagramm zeigt Luciferaseaktivitäten in den einzelnen Zelllinien. Es wurde jede Zelllinie zum Vergleich mit dem Ad-CMV-Luc- und dem Ad-hTERT-Luc Vektor transfiziert. Anhand des Diagramms ist die Aktivität des hTERT-Promotors und des CMV-Promotors in den einzelnen Zelllinien zu erkennen. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach 72 Stunden Inkubationszeit mit Hilfe von Luciferase-Assays (Abschnitt 2.5.4). Die unterschiedlich starken Luciferaseaktivitäten sind durch verschieden starke Telomerasepromotor- Aktivierungen in den einzelnen Zelllinien bedingt.

3.2 *in vivo* Versuche

Nach Messung starker hTERT-Expression in den Tumorzelllinien wurde die Tumorselektivität der Vektoren *in vivo* getestet. Die Versuche wurden mit NMRI- Nude Mäusen durchgeführt.

Für die *in vivo*- Versuche wählten wir die etablierte H1299- Zelllinie aus. Bei dieser Zelllinie handelte es sich um Zellen aus einem humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom. Wir wählten diese Zelllinie, weil sie in den *in vitro*- Versuchen die stärkste hTERT- Aktivität im Vergleich zu dem CMV- Promotor zeigte. Außerdem ist diese Zelllinie *in vivo* gut kultivierbar. Die Tumorinduktion erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, durch subkutane Injektion von Tumorzellen in die rechte Flanke der Versuchstiere. Nach etwa 30 Tagen waren die Tumore zu einer Größe von 10mm gewachsen, so dass die Versuche

fortgesetzt werden konnten. Nun wurde Ad-CMV-Luc- oder Ad-hTERT-Luc Vektorsuspension, wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben, in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Die Tiere wurden nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden in Äthernarkose getötet und es erfolgte die Präparation der Organe und unterschiedliche Gewebe. Nach der Organ- und Gewebepreparation wurden Proteine zur Messung der Luciferaseaktivität extrahiert (s. 2.5.2). Die Luciferaseaktivität korreliert mit den Promotoraktivitäten von Ad-CMV-Luc und Ad-hTERT-Luc. Außerdem wurde zum Nachweis von Virus-DNA genomische DNA, wie in Abschnitt 2.4.1.1 beschrieben, aus den Organen und Geweben präpariert.

Alle Tierexperimente wurden nach den Richtlinien der Tierversuchs-Kommission der Universitätsklinik durchgeführt.

3.2.1 Virusnachweis in den Organen

Um die Transfektionseffizienz zu evaluieren, haben wir die Gewebe mittels nested-PCR (s. 2.4.1.4) auf das Vorhandensein von Virus-DNA überprüft.

Bei den Untersuchungen wurde Virus-DNA in sämtlichen Gewebetypen nachgewiesen.

Die folgende Abbildung zeigt DNA-Banden, welche nach Präparation genomischer DNA aus transfiziertem Mausgewebe (s. 2.4.1.1) mit Hilfe der nested-PCR amplifiziert wurden. Die DNA-Banden wurden mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen.

Bei Vergleich des Bandenmusters ist die etwa gleich starke Transfektion sowohl mit Ad-CMV-Luc als auch mit Ad-hTERT-Luc zu erkennen. Als Referenz verwendeten wir den G3PDH-Primer.

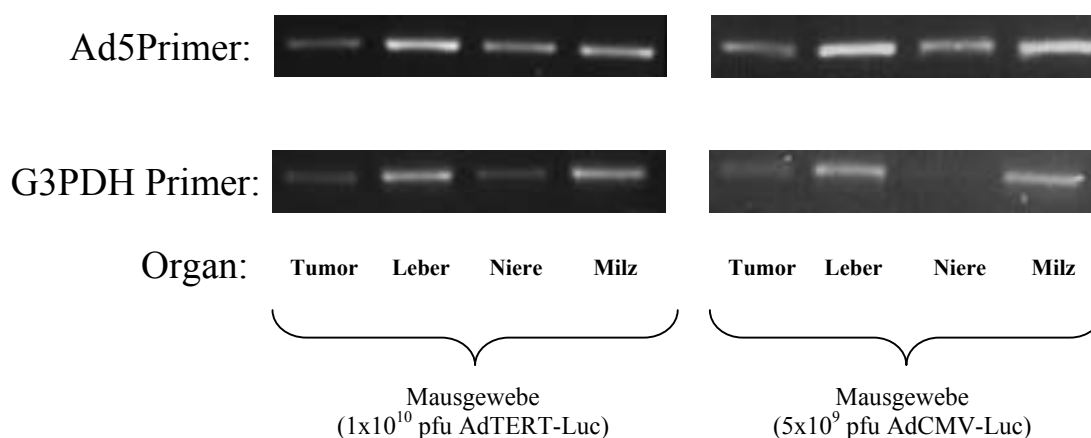


Abb. 3-6 **Virusnachweis in Mausgewebe:** Die Abbildung zeigt DNA-Banden, welche nach Präparation genomischer DNA aus transfiziertem Mausgewebe (Abschnitt 2.4.1.1) per nested-PCR amplifiziert wurden. Zu erkennen ist die etwa gleich starke Transfektion, sowohl mit Ad-CMV-Luc als auch mit Ad-*h*TERT-Luc. Als Referenz dient der Primer der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (G3PDH), welches ein (single copy) „Housekeeping“ Gen ist (Thellin et al., 1999).

3.2.2 Vergleich der CMV- und Telomerasepromotoraktivität in gesunden Körperzellen und der H1299 Tumorzelllinie *in vivo*

Nach Isolierung zellulärer Proteine aus den unterschiedlichen Mausgewebetypen (s. 2.5.2) wurde die Aktivität der Luciferase in den Extrakten bestimmt (s. 2.5.4). Das Luciferasegen steht bei Ad-CMV-Luc oder Ad-*h*TERT-Luc unter Kontrolle des CMV- bzw. *h*TERT Promotors (s. 2.1.3). Somit korreliert die Luciferaseexpression mit der Aktivität des jeweiligen Promotors. Zur Wahrung der Übersicht werden hier Auswertungen von lediglich vier Gewebeformen gezeigt. Abb. 3-6 zeigt die Telomerase- bzw. CMV Promotoraktivität in drei ausgewählten Mausgeweben und dem Tumorgewebe.

Da Adenoviren unterschiedlichste Gewebetypen infizieren können und der CMV Promotor ein starker viraler Promotor ist, wurde eine erfahrungsgemäss hohe Aktivität des CMV Promotors nachgewiesen (Legrand et al., 2002).

Entgegen unserer Erwartungen zeigte sich jedoch, dass die Luciferaseexpression unter Kontrolle des TERT- Promotors nicht nur auf Tumorgewebe beschränkt ist, sondern in

anderen Geweben ebenfalls nachweisbar war. Die Aktivität in der Leber war sogar höher als im Tumorgewebe. Wenn man die Tumor- Leber- Aktivitätsverhältnisse von Ad-*h*TERT-Luc und Ad-CMV-Luc vergleicht, erkennt man, dass die Aktivität in der Leber bei Ad-*h*TERT-Luc etwa das 50 fache und bei Ad-CMV-Luc das 100 fache beträgt. Die Aktivitäten in einigen anderen Geweben zeigten ebenfalls sehr hohe Werte. Die Aktivitätsmuster der beiden Konstrukte Ad-CMV-Luc und Ad-*h*TERT-Luc zeigten außer den unterschiedlichen Aktivitätsmaxima kaum Unterschiede. Insbesondere ist keine Tumorspezifität zu erkennen.

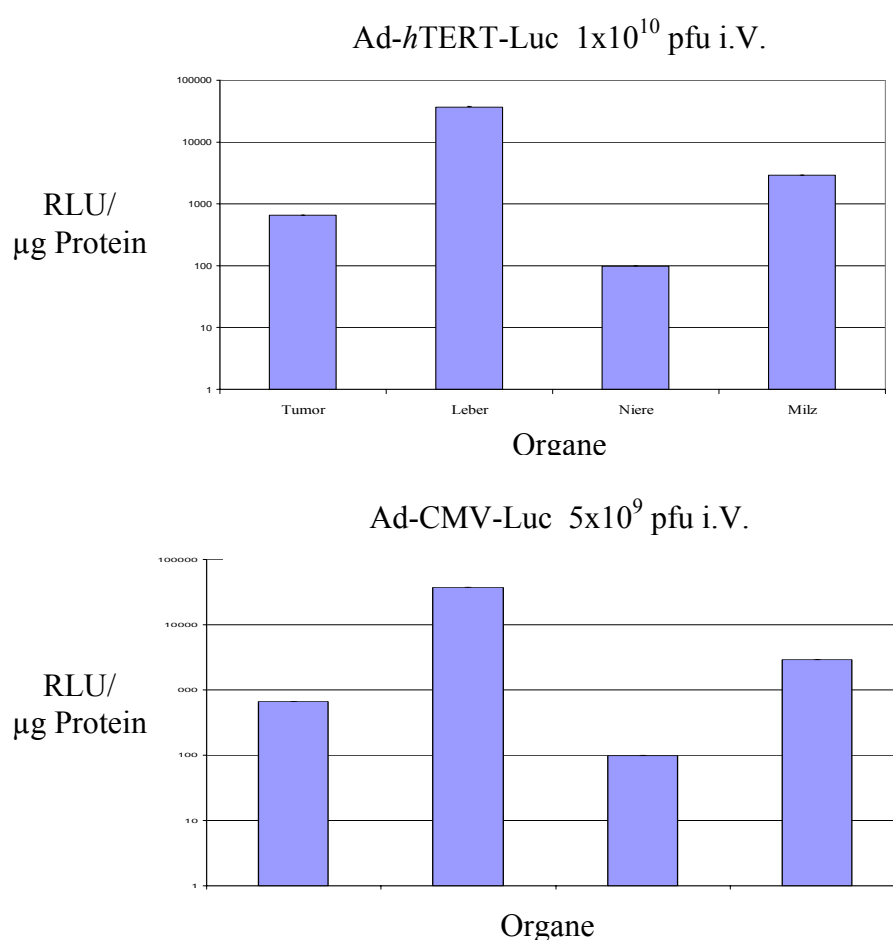


Abb. 3-7 **Promotoraktivitäten in Mausgewebe:** Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von Luciferaseassays nach Extraktion zellulärer Proteine, aus mit Ad-CMV-Luc und Ad-*h*TERT-Luc transfizierten Mausgewebe. Die Aktivitätsmuster der beiden Konstrukte Ad-CMV-Luc und Ad-*h*TERT-Luc zeigen außer den unterschiedlichen Aktivitätsmaxima kaum Unterschiede. Insbesondere ist keine Tumorspezifität zu erkennen.

3.2.3 Tabellarische Aufstellung der behandelten Nacktmäuse

Maus	Virus	Virusdosis (pfu)	Inkubationszeit	Injektion
1	Ad- <i>h</i> TERT-Luc	5×10^9	72 Stunden	i.V.
2	Ad-CMV-Luc	1×10^{10}	72 Stunden	i.V.

Abb. 3-8 **Tabellarische Aufstellung der behandelten Nacktmäuse:** Die Tabelle enthält Angaben über die exemplarisch gezeigten Tiere, die intravenös applizierte Virusmenge und die Virusinkubationszeit.

Die Ergebnisse der *in vivo* Versuche zeigen, dass sich der gewählte Ansatz, mit dem verwendeten Vektor, leider nicht für eine gezielte Tumorentherapie eignet.

4. Diskussion

Das biologische Leben ist ein hoch komplexer und fein regulierter Vorgang. Kontrollierte Proliferation, Differenzierung und Zelluntergang sind unerlässlicher Bestandteil des Lebens. Das empfindliche Zusammenspiel vieler Gene und Proteine ermöglicht die Entwicklung hochkomplexer Lebensformen.

Zum Schutz dieses empfindlichen Systems sind Sicherheitsmechanismen in den Zellen vorhanden. Bei außer Kontrolle geratenen Zellen treten Schutzmechanismen in Kraft und verhindern die unkontrollierte Proliferation defekter Zellklone. Solch eine Eskalation kann bei Versagen der Schutzmechanismen im Rahmen einer Tumorerkrankung den gesamten Organismus vernichten. Bei Entstehung von Tumorerkrankungen werden zelluläre Schutzmechanismen durch schädigende Faktoren außer Kraft gesetzt. Zahlreiche Arbeiten unterstützen die These, dass es sich bei solchen Schädigungen um DNA-Mutationen in kritischen Regionen des Genoms handelt (Watson et al., 1998; Root-Bernstein et Bernstein, 1999; Teixeira et al., 2002 u.v.m.). Da das System mehrfach gesichert ist müssen gleichzeitig mehrere Schutzmechanismen versagen, damit es zu einer manifesten Erkrankung kommen kann (Land et al., 1983). Bei eingetretener Erkrankung existieren je nach Zelltyp und Zellschaden unterschiedliche Krankheitsbilder und Verlaufsformen.

Ein möglicher Sicherheitsmechanismus zur Verhinderung ungehinderter Zellproliferation ist die Existenz der Telomere. Telomere sind spezielle DNA-Abschnitte an den Enden der Chromosomen. Humane Telomere bestehen aus einer repetitiven DNA-Sequenz (5'-TTAGGG-3')_n, sind bis zu einigen kb lang und haben eine von Chromosom zu Chromosom unterschiedliche Länge (s. 1.2). Bei jeder Teilung kommt es zu einer zunehmenden Verkürzung der Telomere (s. 1.1). Bei Erreichen einer kritischen Länge, hört die Zelle auf sich zu teilen und geht schließlich zu Grunde (Levy et al., 1992) (s. 1.7). Die Existenz des Enzyms Telomerase ermöglicht die Verlängerung der Telomere (Greider et Blackburn, 1985).

Die Humane Telomerase Reverse Transkriptase ist ein spezielles Enzym mit einem Proteinanteil und einem RNA-Anteil. Hierbei bilden die katalytisch aktive Reverse Transkriptase RT-Untereinheit und die Telomerase-RNA einen Komplex. Es unterliegt nur der Proteinanteil der genetischen Regulation, der RNA-Anteil ist ubiquitär vorhanden. Die

Verlängerung der DNA erfolgt wie in Abschnitt 1.9 beschrieben, mit Hilfe der „eingebauten“ RNA-Vorlage, durch Reverser Transkription (Greider et Blackburn, 1987, 1989).

Regulierte Telomeraseaktivität ist in einigen speziellen Zelltypen wie Epidermisbasalzellen und Endometriumzellen während der Proliferationsphase nachweisbar, sogar notwendig (Härle-Bachor et Boukamp, 1996; Kyo et al., 1997). In krankhaft veränderten Zellen kann dysregulierte Telomeraseaktivität oder die Reaktivierung der Telomerase die ungehinderte Teilung dieser Zellklone ermöglichen. Gesichert ist, dass in den meisten Tumoren die Telomerase aktiv ist (Kim et al., 1994; Gu et al., 2000). Da die Telomerase unter Kontrolle des Telomerasepromotors steht, ist in solch veränderten, telomerasepositiven Zellen, auch der Promotor aktiviert.

4.1 Genterapie mit Hilfe des Telomerasepromotors

In über 85% der Tumoren ist starke Telomeraseaktivität messbar. Daher liegt es nahe, mit Hilfe des Enzympromotors (*hTERT*) eine tumorselektive Genterapie zu entwickeln. Wenn man ein toxisches Transgen unter Kontrolle des *hTERT*-Promotors stellt und dieses Konstrukt in eine Zelle schleust, sollte bei Aktivierung des Promotors das Transgen exprimiert und die Zelle zerstört werden. Solche Transgene können z.B. Enzyme kodieren, welche direkt zur Zerstörung der Zelle beitragen und/oder sogenannte Prodrugs aktivieren (Glenn et Chatterjee, 2001; Pawlik et al., 2002). Diesen Ansatz haben wir mit Hilfe von rekombinanten adenoviralen Vektoren, welche als Transgen das Luciferase Reportergen unter dem *hTERT*-Promotor enthalten, überprüft. Ein Vorteil von Adenoviren ist, dass sie eine Vielzahl von Zelltypen transfizieren können (Sonobe, 1976; Csata et Kulcsar, 1991; Teramoto et al., 1997; Marini et al., 2002). So haben Adenoviren einen ausgeprägten Tropismus für Hepatozyten und Kuppferschen Sternzellen (Zinn et al., 1998, Wickham 2000). Diese Eigenschaft kann bei der systemischen Genterapie mit adenoviralen Vektoren von Nachteil sein, weil die Leber ähnlich einem first pass Effekt einen großen Anteil der für die Therapie notwendigen Viren abfangen kann. Die durch diese Eigenschaft entstehenden hohen Adenovirus-Konzentrationen können die Leber stark schädigen. Da normale, somatische Zellen keine *hTERT*-Aktivität besitzen, müssten diese Zellen trotz Transfektion durch den Vektor verschont bleiben.

Zur Überprüfung dieser theoretischen Überlegungen haben wir die Aktivität des *hTERT*-Promotors in verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro* und bei einer ausgewählten Zelllinie auch *in vivo* im Vergleich zum CMV-Promotor untersucht. Für diese Untersuchung wurden im Rahmen einer anderen Promotionsarbeit die beiden adenoviralen Vektoren Ad-CMV-Luc und Ad-*hTERT*-Luc hergestellt (M. Lowak).

4.2 Untersuchung des humanen Telomerasepromotors auf Tumorspezifität

Es zeigte sich, dass der *hTERT*-Promotor nicht nur in dem Tumorgewebe aktiv war. Vielmehr wurde in sämtlichen untersuchten Gewebetypen *hTERT*-Aktivität nachgewiesen, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung. Die Abbildung 3-7 zeigt Expressionswerte von Organgeweben mit besonders hohen Aktivitätswerten. Erwartet haben wir eine isolierte Aktivierung des *hTERT*-Promotors im Tumorgewebe. Die hohe Aktivität des CMV-Promotors hingegen entsprach unseren Erwartungen.

Wenn man die Abbildung 3-7 betrachtet, dann fällt auf, dass die Promotoraktivitäten der beiden Konstrukte Ad-CMV-Luc und Ad-*hTERT*-Luc in den unterschiedlichen Zelltypen außer den unterschiedlichen Aktivitätsmaxima kaum Unterschiede zeigen. Zudem erkennt man bei Betrachtung der Tumor-Leber-Aktivitätsverhältnisse von Ad-*hTERT*-Luc und Ad-CMV-Luc, dass die Aktivität in der Leber bei Ad-*hTERT*-Luc etwa das 50 fache und bei Ad-CMV-Luc das 100 fache von der Aktivität im Tumorgewebe beträgt. Die hohe Aktivität in der Leber könnte auf dem bereits erwähnten natürlichen Hepatotropismus der Adenoviren beruhen, wobei der *hTERT*-Promotor keine hohe Aktivität haben dürfte. Telomerasepromotoraktivitäten in anderen Gewebetypen weisen jedoch ebenfalls sehr hohe, teilweise höhere Werte als im Tumorgewebe auf.

Diese Ergebnisse weisen leider nicht auf eine tumorspezifische Aktivierung des *hTERT*-Promotors hin.

4.3 Was wurde bisher mit TERT- Promotoren im Hinblick auf Tumorspezifität erreicht

Da der Wildtyp *hTERT*- Promotor nicht immer die notwendig hohe Aktivität für eine Tumorgentherapie aufweist, ist es notwendig, nach weiteren Möglichkeiten zur Effektivitätssteigerung zu suchen. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete *hTERT*- Promotor ist bereits modifiziert worden. Durch sukzessive Deletion konnte eine Verkleinerung des Promotors bei gleichzeitiger Erhöhung der Aktivität erreicht werden (s. 2.1.3). Kim et al. konnten mit Hilfe eines modifizierten *hTERT*- Promotors (*m-hTERT*), durch Einfügen zusätzlicher Sp1 und c-Myc- Bindungsstellen, eine verstärkte Tumorspezifität und eine signifikante Promotoraktivitätserhöhung in Tumorzellen erreichen. In normalen somatischen Zellen kam es jedoch nicht zu einer Promotoraktivitätserhöhung (Kim et al, 2003). Eine zusätzliche Fokussierung auf Tumorzellen konnte unter Verwendung replikationskompetenter Adenoviren erreicht werden. Hierzu wurde ein Adenovirus generiert (Ad-*m-hTERT*-delta19), bei dem die für die virale Replikation essentielle E1A-Region unter Kontrolle des modifizierten *hTERT*-Promotors (*m-hTERT*) gestellt wurde. Somit wurden Tumorzellen verstärkt durch den zytopathischen Effekt replizierender Adenoviren geschädigt (Kim et al, 2003). Diese Ansätze zeigen, dass die Verwendung des Telomerasepromotors außer zur Regulation therapeutischer Transgene auch für weitere Methoden nützliche Dienste erweisen kann.

4.4 Warum kommt es zu einer hTERT-Aktivierung außerhalb von Tumorgewebe?

Außerhalb von telomeraseaktivem Tumorgewebe existieren somatische Zelltypen, welche auch bei gesunden Individuen eine physiologische Aktivität der Telomerase aufweisen. Diese sind z.B. gesunde, proliferierende Zellen wie Epidermisbasalzellen, Blasenepithelzellen und weitere (s. 1.9.4.). Solche Zelltypen könnten bei einer Tumorgentherapie mit Hilfe des Telomerasepromotors durch unspezifische Aktivierung ebenfalls geschädigt werden und eine unerwünschte Nebenwirkung dieser Therapie darstellen.

In sämtlichen in dieser Arbeit untersuchten Gewebetypen war eine gewisse, teilweise auch sehr hohe Telomeraseaktivität nachweisbar. Dieses Ergebnis war überraschend, da so hohe

Aktivitäten nicht etwa durch einzelne, physiologisch Telomerase-positiven Zellen wie z.B. Stammzellen zu erklären waren. Zahlreiche Arbeiten erhärten die Hypothese, dass die in dieser Arbeit nachgewiesene unspezifische Telomeraseaktivität wahrscheinlich auf Transaktivierung durch virale Sequenzen begründet ist. Im nächsten Abschnitt wird hierauf näher eingegangen.

4.5 Beeinflussung durch virale Proteine

Die Möglichkeit der Transaktivierung des *hTERT*-Promotors durch regulative adenovirale Elemente wurde bereits mehrfach diskutiert. Adenovirale Enhancer-sequenzen können den Promotor möglicherweise über weite Strecken beeinflussen (Schreiber et Schaffner, 1989). Steinwaerder und Lieber konnten bei einem Metall-induzierbaren Promotor starke Interferenzen zwischen Promotor und regulativen viralen Sequenzen im Bereich der Nucleotide 1-341 nachweisen. Diese Region enthält essentielle adenovirale Sequenzen, die in allen rekombinanten adenoviralen Vektoren präsent sind, einschließlich der Helfervirusabhängigen Vektoren.

Mit Hilfe von Sequenzen aus dem Hühner- γ Globulin (HS-4) ist es möglich, den Promotor von viralen Enhancern abzuschirmen. Eine optimale Isolation konnte durch beidseitige Flankierung der Expressionskassette mit HS-4 Elementen erreicht werden. Durch Anwendung dieser Isolatorsequenzen sank die Basalaktivität in der nicht induzierten Phase bis auf Detektionsgrenzniveau. Gleichzeitig wurde die Induktionsfähigkeit um den Faktor 40 *in vitro* und den Faktor 230 *in vivo* gesteigert. Ohne Isolatorsequenzen waren die Induktionsfaktoren um etwa 40-fach niedriger *in vitro* und 15-fach niedriger *in vivo* (Steinwaerder et Lieber, 2000). Ye et al. zeigten in einem *in vivo*- Mausmodell einen vielversprechenden Tumorgentherapieansatz zur Therapie von Hepatozellulären Karzinomen (HCC). α -Fetoprotein (AFP) wird bei einem Großteil der HCC exprimiert (Deutsch, 1991). Durch Verwendung von HS-4-Isolatorsequenzen aus dem Hühner- β -Globulin und dem AFP-Promotor zur Kontrolle eines Reportergens, konnte neben einer bemerkenswert hohen Tumorzellspezifität auch eine deutliche Steigerung der AFP-Promotoraktivität erreicht werden. Ohne HS-4-Isolatorsequenzen war die Promotoraktivität zwar tumorzellspezifisch, jedoch deutlich niedriger und nicht für einen gentherapeutischen Ansatz geeignet. Trotz der hohen Hepatoaffinität der Adenoviren war in gesunden Hepatozyten keine AFP-Aktivität

messbar. Es konnte hier gezeigt werden, dass der HS-4-Isolator die AFP-Promotoraktivität durch Abschirmung von viralen Sequenzen steigert, während die hohe Tumorzellspezifität nicht negativ beeinflusst wird (Ye et al. 2003).

Um eine Isolatorsequenz handelt es sich z.B. bei dem 250 bp langen Fragment des Hühner β -Globulins. Solche C-G-reichen Sequenzen ohne Promotoraktivität sind in der Lage, eine Promotortransaktivierung durch virale Enhancer zu verhindern (Chung et al., 1997). Isolatorsequenzen wurden bereits mehrfach zum Schutz von Promotoren vor Transaktivierung bzw. Inhibition verwendet (Schreiber et Schaffner, 1989; Raina et al., 1993; Chung et al., 1997).

4.6 Möglichkeiten zur Erhöhung der Tumorspezifität

Das Umdrehen der Transgenkassette innerhalb des Vektors könnte durch die veränderte dreidimensionale Konstellation eine Transaktivierung verhindern und eventuell die Tumorspezifität erhöhen. Zur Überprüfung dieser These müsste man sowohl die Vektoren neu herstellen als auch alle Versuche wiederholen.

Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Tumorspezifität ist neben der Verwendung tumorspezifischer Promotoren die Verwendung speziell modifizierter Vektoren. Gezielte Oberflächenmodifikation des Vektors kann die Spezifität für bestimmte Rezeptoren bzw. Membranmarkern auf der Zielzelle erhöhen bzw. vermindern (Wickham, 2000, Krasnykh et al., 2001; Li et al., 2003).

Weiterhin ist es möglich, modifizierte Vektoren in Kombination mit monoklonalen Antikörpern zu verwenden. Beschrieben wurde die Herstellung eines adenoviralen Vektors, welcher aus Staphylokokken stammende IgG bindende Proteine im Fiber-Protein enthält. Inkubation des Vektors mit monoklonalen Antikörpern ergibt Vektoren, welche eine spezifische Affinität gegen bestimmte Epitope entwickeln. Somit kann der Vektor durch Inkubation mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern universell eingesetzt werden (Volpers et al., 2003).

Die Entwicklung solcher gegen bestimmte Ziele gerichteten Vektoren ist Gegenstand intensiver Forschung.

5. Zusammenfassung

Die Intention der vorliegenden Promotionsarbeit war, mit Hilfe des Telomerase-Promotors (TERT) eine tumorselektive Gentherapie zu entwickeln. Wir wählten den Telomerasepromotor, weil die katalytische Untereinheit der Telomerase bei über 85% der Tumoren stark exprimiert ist. In gesunden differenzierten Zellen ist die Telomerase jedoch inaktiv. Lediglich in einigen speziellen Zellarten wie Keimzellen oder Stammzellen ist Telomeraseaktivität nachweisbar.

Nach Auswahl einiger Tumorzelllinien wurde zunächst die *hTERT*-Expression (humane Telomerase Reverse Transkriptase) der Tumorzellen mit Hilfe von RT-PCR untersucht. *hTERT* ist die enzymatisch aktive, der Regulation unterliegende Untereinheit der humanen Telomerase Reverse Transkriptase. Die *hTERT*-Expression korreliert mit der Aktivität des Telomerasepromotors. Als weitere Untereinheit benötigt die Telomerase die ubiquitär vorliegende, nicht der Telomerase-Regulation unterliegende Telomerase-RNA, welche als Vorlage für die Telomerverlängerung dient.

Die Telomeraseaktivität in den Zelllinien wurde mit Hilfe des TRAP-Assays (Telomeric Repeat Amplification Protocol) nachgewiesen. Nach Untersuchung der *hTERT*-Expression und der Telomeraseaktivität in den ausgewählten Tumorzelllinien wurden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Zelllinien durchgeführt.

Als DNA-Vektoren wurden zwei unterschiedliche adenovirale Konstrukte verwendet. Die Vektoren enthielten zum einen das Luciferase Reportergen unter Kontrolle des *hTERT*-Promotors (Ad-*hTERT*-Luc) und zum anderen das Reportergen unter Kontrolle des Cytomegalievirus-Promotors (Ad-CMV-Luc). Die Luciferaseexpression in den Zellen ist quantitativ messbar und korreliert mit der jeweiligen Promotoraktivität. Nach *in vitro*-Nachweis der *hTERT*-Expression in den Tumorzelllinien wurden die Vektoren *in vivo* im Hinblick auf die Tumorspezifität des Telomerasepromotors getestet. Die Versuche wurden mit NMRI- Nude Mäusen durchgeführt. Als Xenotransplantatmodell wählten wir die etablierte Zelllinie H1299 eines humanen kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Diese Tumorzelllinie zeigte bei den *in vitro*- Versuchen eine hohe Telomerasepromotoraktivität im Vergleich zum CMV- Promotor und ist zur Tumorinduktion *in vivo* gut geeignet. Nach Tumorinduktion wurde den Mäusen Virussuspension in die Schwanzvene injiziert. Nach 72 Stunden wurden Organe und Gewebe präpariert. Bei den Untersuchungen wurde Virus- DNA in sämtlichen Geweben in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen. Es zeigte sich jedoch, dass die durchaus hohe Telomerase- bzw. Luciferaseaktivität sich nicht nur auf Tumorgewebe beschränkte, sondern in anderen Geweben ebenfalls sehr hoch war. Die Aktivität in der Leber war sogar höher als im Tumorgewebe, was durch den natürlichen Hepatotropismus der Adenoviren begründet sein kann. Beim Vergleich der Tumor-Leber-Aktivitätsverhältnisse von Ad-*hTERT*-Luc und Ad-CMV-Luc konnte man erkennen, dass die Aktivität in der Leber bei Ad-*hTERT*-Luc etwa das 50 fache und bei Ad-CMV-Luc das 100 fache von der Aktivität im Tumorgewebe betrug. Die Aktivitäten in einigen anderen Geweben ergaben ebenfalls sehr hohe Werte. Die Aktivitätsmuster der beiden Konstrukte Ad-CMV-Luc und Ad-*hTERT*-Luc zeigten außer den unterschiedlichen Aktivitätsmaxima kaum Unterschiede, insbesondere war keine Tumorspezifität zu erkennen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit dem *hTERT* Promotor im gewählten Ansatz keine Tumorselektivität erzielt werden kann.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futeher, A.B., Greider, C.W., Harley, C.B. (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 10114-10118.
- [2] Allsopp, R.C., Harley, C.B. (1995): Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res.* 219, 130-6.
- [3] Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O., Harrington, L. (1998): Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol.* 8, 177-180.
- [4] Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O., Harrington, L. (2001): Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol.* 21, 6151-6160.
- [5] Belair, C.D., Yeager, T.R., Lopez, P.M., Reznikoff, C.A. (1997): Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94, 13677-13682.
- [6] Bhattacharyya, A., Blackburn, E.H. (1997): A functional telomerase RNA swap in vivo reveals the importance of nontemplate RNA domains. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 94, 2823-2827.
- [7] Blasco, M.A., Funk, W., Villeponteau, B., Greider, C.W. (1995): Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269, 1267-1270.
- [8] Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., Wright, W.E. (1998): Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
- [9] Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [10] Bryan, T.M., Cech, T.R. (1999): Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol.* 11, 318-324.
- [11] Bran, T.M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A., Reddel, R.R. (1997): Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med.* 3, 1271-1274.
- [12] Cerni, C. (2000): Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat Res.* 462, 31-47.

- [13] Chin, L., Artandi, S.E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S.L., Gottlieb, G.J., Greider, C.W., De Pinho, R.A. (1999): p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 97, 527-538.
- [14] Chung, J.H., Bell, A.C., Felsenfeld, G. (1997): Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 575-580.
- [15] Collins, K., Kobayashi, R., Greider, C.W. (1995): Purification of Tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell* 81, 677-686.
- [16] Csata, S., Kulcsar, G. (1991): Virus-host studies in human seminal and mouse testicular cells. *Acta Chir Hung.* 32, 83-90.
- [17] Dang, C.V. (1999): c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol.* 19, 1-11.
- [18] Deutsch, H. F. (1991): Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. *Cancer Res.* 56, 253-312.
- [19] Fang, G., Cech, T.R. Blackburn, E.H., Greider, C.W. (1995): Telomeres, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY* 69-105.
- [20] Faragher, R.G., Kipling, D. (1998): How might replicative senescence contribute to human ageing? *Bioessays* 20, 985-991.
- [21] Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., et al. (1995): The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236-1241.
- [22] Fujimoto, K., Takahashi, M. (1997): Telomerase activity in human leukemic cell lines is inhibited by antisense pentadecadeoxynucleotides targeted against c-myc mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 241, 775-781.
- [23] Glenn, G.M., Chatterjee, S. (2001): Generation of adenoviruses encoding the herpes simplex virus vhs gene: a novel strategy to generate adenoviruses expressing genes toxic to producer cells. *Cancer Gene Ther* 8, 566-572.
- [24] Grandori, C., Eisenman, R.N. (1997): Myc target genes. *Trends Biochem Sci.* 22, 177-181.
- [25] Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405-413.
- [26] Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1987): The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, 887-898.
- [27] Greider, C.W., Blackburn, E.H. (1989): A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331-337.
- [28] Greider, C.W. (1996): Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem.* 65, 337-365.

- [29] Greider, C.W. (1999): Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* 97, 419-422.
- [30] Greenberg, R.A., O'Hagan, R.C., Deng, H., Xiao, Q., Hann, S.R., Adams, R.R., Lichtsteiner, S., Chin, L., Morin, G.B., De Pinho, R.A. (1999): Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* 18, 1219-1226.
- [31] Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., De Lange, T. (1999): Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
- [32] Gu, J., Kagawa, S., Takakura, M., Kyo, S., Inoue, M., Roth, J.A., Fang, B. (2000): Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers. *Cancer Res.* 60, 5359-5364.
- [33] Härle-Bachor, C., Boukamp, P. (1996): Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 6476-6481.
- [34] Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W. (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-60.
- [35] Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K., Allshire, R.C. (1990): Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346, 866-868.
- [36] Hayflick, L., Moorhead, P.S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.* 25, 585-621.
- [37] Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., Matsuura, Y., Piatyszek, M.A., Shay, J.W. (1995): Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med.* 1, 249-255.
- [38] Hoffman, B., Amanullah, A., Shafarenko, M., Liebermann, D.A. (2002): The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene* 21, 3414-3421.
- [39] Holt, S.E., Shay, J.W. (1999): Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol* 180, 10-18.
- [40] Jones, P.A., Taylor, S.M., Wilson, V. (1983): DNA modification, differentiation, and transformation. *J Exp Zool.* 228, 287-295.
- [41] Karlsleder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., De Lange, T. (1999): p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321-1325.
- [42] Kilian, A., Bowtell, D.D., Abud, H.E., Hime, G.R., Venter, D.J., Keese, P.K., Duncan, E.L., Reddel, R.R., Jefferson, R.A. (1997): Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet.* 6, 2011-2019.

- [43] Kipling, D., Cooke, H.J. (1990): Hypervariable ultra-long telomeres in mice, *Nature* 347, 400-402.
- [44] Kirk, K.E., Harmon, B.P., Reichardt, I.K., Sedat, J.W., Blachburn, E.H. (1997): Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation, *Science* 275, 1478-81.
- [45] Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W. (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 266, 2011-2015.
- [46] Kim, N.W., Wu, F. (1997): Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res.* 25, 2595-2597.
- [47] Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., Mc Dougall, J.K., Galloway, D.A., Klingelutz, A.J. (1998): Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396, 84-88.
- [48] Klingelutz, A.J., Foster, S.A., Mc Dougall, J.K. (1996): Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380, 79-82.
- [49] Klobutcher, L.A., Swanton, M.T., Donini, P., Prescott, D.M. (1981): All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 78, 3015-3019.
- [50] Krasnykh, V., Belusova, N., Korokhov, N., Mikheeva, G., Curiel, D.T. (2001): Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibrin. *J Virol.* 75, 4176-4183.
- [51] Kyo, S., Takakura, M., Kohama, T., Inoue, M. (1997): Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res.* 57, 610-614.
- [52] Land, H., Parada, L.F., Weinberg, R.A. (1983): Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.
- [53] Laird, P.W., Jaenisch, R. (1996): The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet.* 30, 441-464.
- [54] Lee, M.S., Blackubrn, E.H. (1993): Sequence-specific DNA primer effects on telomerase polymerization activity. *Mol Cell Biol.* 13, 6586-6599.
- [55] Legrand, V., Leissner, P., Winter, A., Mehtai, M., Lusky, M. (2002): Transductional targeting with recombinant adenovirus vectors. *Curr Gene Ther* 2, 323-329.
- [56] Lendvay, T.S., Morris, D.K., Sah, J., Balasubramanian, B., Lundblad, V. (1996): Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* 144, 1399-1412.
- [57] Levy, M.Z., Allsopp, R.C., Futucher, A.B., Greider, C.W., Harley, C.B. (1992): Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol.* 225, 951-60.

- [58] Li, Y., Yao, X.M., Hong-Brown, L., Massa, S.M. (2003): Adaptable modification of adenoviral tropism using a bifunctional ligand protein. *Virus Res.* 91, 223-230.
- [59] Lingner, J., Cech, T.R. (1996): Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 93, 10712-10717.
- [60] Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., Cech, T.R. (1997): Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276, 561-567.
- [61] Makarov, V.L., Hirose, Y., Langmore, J.P. (1997): Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88, 657-666.
- [62] Marini, F.C., Shayakhmetov, D., Gharwan, H., Lieber, A., Andreeff, M. (2002): Advances in gene transfer into haematopoietic stem cells by adenoviral vectors. *Expert Opin Biol Ther.* 2, 847-856.
- [63] Martin-Rivera, L., Herrera, E., Albar, J.P., Blasco, M.A. (1998): Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 95, 10471-10476.
- [64] Martinson, H.G., True, R., Lau, C.K., Mehrabian, M. (1979): Histon-histone interactions within chromatin. Preliminary location of multiple contact sites between histones 2A, 2B, and 4. *Biochemistry.* 6, 1075-1082.
- [65] Mehle, C., Lindblom, A., Ljungberg, B., Stenling, R., Roos, G. (1998): Loss of heterozygosity at chromosome 3p correlates with telomerase activity in renal cell carcinoma. *Int J Oncol.* 13, 289-295.
- [66] Melek, M., Greene, E.C., Shippen, D.E. (1996): Processing of nontelomeric 3' ends by telomerase: default template alignment and endonucleolytic cleavage. *Mol Cell Biol.* 16 3437-3445.
- [67] Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D.A., Weinberg, R.A. (1997): hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.
- [68] Morin, G.B. (1989): The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59, 521-529.
- [69] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273.
- [70] Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B., Cech, T.R. (1997): Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959.

- [71] Nakayama, J., Saito, M., Nakamura, H., Matsuura, A., Ishikawa, F. (1997): TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* 88, 875-884.
- [72] Oei, S.L., Griesenbeck, J., Schweiger, M., Ziegler, M. (1998): Regulation of RNA polymerase II-dependent transcription by poly(ADP-ribosyl)ation of transcription factors. *J Biol Chem.* 273, 31644-31647.
- [73] Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K. (1967): Mechanism of DNA replication possible discontinuity of DNA chain growth. *Jpn J Med Sci Biol.* 3 255-260.
- [74] Olovnikov, A.M. (1973): A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol.* 41, 181-90.
- [75] Pawlik, T.M., Nakamura, H., Mullen, J.T., Kasuya, H., Yoon, S.S., Chandrasekhar, S., Chiocca, E.A., Tanabe, K.K. (2002): Prodrug bioactivation and oncolysis of diffuse liver metastases by a herpes simplex virus 1 mutant that expresses the CYP2B1 transgene. *Cancer* 95, 1171-1181.
- [76] Raina, R., Cook, D., Fedoroff, N. (1993): Maize Spm transposable element has an enhancer-insensitive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 6355-6359.
- [77] Root-Bernstein, R.S., Bernstein, M.I. (1999): A simple stochastic model of development and carcinogenesis. *Anticancer Res.* 19, 4869-4876.
- [78] Roy-Chowdhury, J., Horowitz, M.S. (2002): Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. *Mol Ther.* 5, 340-344.
- [79] Schreiber, E., Schaffner, W. (1989): Long-range activation of transcription by SV40 enhancer is affected by "inhibitory" or "permissive" DNA sequences between enhancer and promoter. *Somat Cell Mol Genet.* 15, 591-603.
- [80] Singer, M.S., Gottschling, D.E. (1994): TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266, 404-409.
- [81] Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A., De Lange, T. (1998): Tankyrase, a Poly(ADP-Ribose) Polymerase at Human Telomeres. *Science* 282, 1484-1487.
- [82] Soder, A.I., Hoare, S.F., Muir, S., Going, J.J., Parkinson, E.K., Keith, W.N. (1997): Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene* 14, 1013-1021.
- [83] Sonobe, H. (1976): Target cells of human adenovirus type 12 in subtentorial brain tissue of newborn mice. I. Cyto-histomorphologic and immunofluorescent microscopic studies. *Acta Med Okayama.* 30, 163-179.
- [84] Steinwaerder, D.S. And Lieber, A. (2000): Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Gene Therapy* 7, 556-557.

- [85] Teramoto, S., Matsuse, T., Ohga, E., Nagase, T., Fukuchi, Y., Ouchi, Y. (1997): Kinetics of adenovirus-mediated gene transfer to human lung fibroblasts. *Life Sci.* 61, 891-897.
- [86] Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.* 75, 291-295.
- [87] Teixeira, M.R., Pandis, N., Heim, S. (2002): Cytogenetic clues to breast carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* ;33, 1-16.
- [88] Ulaner, G.A., Hu, J.F., Vu, T.H., Giudice, L.C., Hoffman, A.R. (1998): Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res.* 58, 4168-4172.
- [89] Van Steensel, B., De Lange, T. (1997): Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385, 740-743.
- [90] Van Steensel, B., Smogorzewska, A., De Lange, T. (1998): TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 92, 401-413.
- [91] Vaziri, H., Benchimol, S. (1998): Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol.* 8, 279-282.
- [92] Volpers, C., Thirion, C., Biermann, V., Hussmann, S., Kewes, H., Dunant, P., Von der Mark, H., Herrmann, A., Kochanek, S., Lochmüller, H. (2003): Antibody-mediated targeting of an adenovirus vector modified to contain a synthetic immunoglobulin g-binding domain in the capsid. *J Virol.* 77, 2093-2104.
- [93] Watanabe, K., Morishita, J., Umezu, K., Shirahige, K., Maki, H. (2002): Involvement of RAD9-dependent damage checkpoint control in arrest of cell cycle, induction of cell death, and chromosome instability caused by defects in origin recognition complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2, 200-212.
- [94] Watson, R.H., Neville, P.J., Roy, W.J. Jr., Hitchcock, A., Campbell, I.G. (1998): Loss of heterozygosity on chromosomes 7p, 7q, 9p and 11q is an early event in ovarian tumorigenesis. *Oncogene* 17, 207-212.
- [95] Wellinger, R.J., Sen, D. (1997): The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer.* 33, 735-49.
- [96] Wick, M., Zubow, D., Hagen, G. (1999): Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene.* 232, 97-106.
- [97] Wickham, T.J. (2000): Targeting Adenovirus. *Gene Therapy* 7, 110-114.

- [98] Wilkie, A.O., Higgs, D.R., Rack, K.A., Buckle, V.J., Spurr, N.K., Fischel-Ghodsian, N., Ceccherini, I., Brown, W.R., Harris, P.C. (1991): Stable length polymorphism of up to 260 kb at the tip of the short arm of human chromosome 16. *Cell* 64, 595-606.
- [99] Wright, W.E., Pereira-Smith, O.M., Shay, J.W. (1989): Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 9, 3088-3092.
- [100] Wright, W.E., Brasiskyte, D., Piatyszek, M.A., Shay, J.W. (1996): Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal x normal cell hybrids. *EMBO* 15, 1734-1741.
- [101] Wu, K.J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J., Dalla-Favera, R. (1999): Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet.* 21, 220-224.
- [102] Ye, X., Liang, M., Meng, X., Ren, X.W., Chen, H.Z., Li, Z.L., Ni, S.H., Lieber, A., Hu, F. (2003): Insulation from viral transcriptional regulatory elements enables improvement to hepatoma-specific gene expression from adenovirus vectors. *Biochem Biophys Res Commun.* 307, 759-764.
- [103] Yoon, T.K., Shichinohe, T., Laquerre, S., Kasahara, N. (2001): Selectively replicating adenoviruses for oncolytic therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 1, 85-107.
- [104] Yu, G.L., Bradley, J.D., Attardi, L.D., Blackburn, E.H. (1990): In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* 344, 126-132.
- [105] Zakian, V.A. (1996): Structure, function, and replication of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Annu Rev Genet.* 30, 141-72.
- [106] Zeichner, S.L., Palumbo, P., Feng, Y., Xiao, X., Gee, D., Sleasman, J., Goodenow, M., Biggar, R., Dimitrov, D. (1999): Rapid telomere shortening in children. *Blood* 93, 2824-2830.
- [107] Zhao, J.Q., Hoare, S.F., McFarlane, R., Muir, S., Parkinson, E.K., Black, D.M., Keith, W.N. (1998): Cloning and characterization of human and mouse telomerase RNA gene promoter sequences. *Oncogene* 16, 1345-1350.
- [108] Zijlmans, J.M., Martens, U.M., Poon, S.S., Raap, A.K., Tanke, H.J., Ward, R.K., Lansdorp, P.M. (1997): Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 7423-7428.
- [109] Zinn, K.R., Douglas, J.T., Smyth, C.A., Liu, H.G., Wu, Q., Krasnykh, V.N., Mountz, J.D., Curiel, D.T., Mountz, J.M. (1998): Imaging and tissue biodistribution of ^{99m}Tc-labeled adenovirus knob (serotype 5). *Gene Ther* 6, 798-808.

7. Danksagungen

Herrn Prof. Esche danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können.

Frau Prof. Dr. Dr. B. M. Pützer möchte ich dafür danken, dass sie mir dieses interessante Thema in ihrer Arbeitsgruppe überlassen hat.

Danken möchte ich Frau Prof. Dr. Dr. Pützer und Herrn Dr. Thorsten Stiewe, die mich bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit sowie der Erstellung der Dissertationsschrift so ausgezeichnet betreuten und mir in allen fachlichen Fragen stets zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt für die Kollegen in der Arbeitsgruppe, die mich stets unterstützten. Danken möchte ich Miriam Böckmann, Dae In Chung, Dr. Matthias Drost, Gabi Hessler, Michael Lowak, Martin Peter, Dr. Florian Rödicker, Jens Stanelle, Achim Sternberg, Carmen Theseling und Sonja Zimmermann für die äußerst gute Atmosphäre, das freundschaftliche Miteinander und die netten Abende. Für die kritische Durchsicht der Arbeit möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. Pützer, Herrn Dr. Thorsten Stiewe und vor allem Herrn Dr. Florian Rödicker nochmals bedanken.

Danken möchte ich auch allen Angehörigen des Instituts für Molekularbiologie und des Instituts für Zellbiologie, für die Unterstützung.

Mein herzlichster Dank für die liebevolle Unterstützung gehört besonders meiner Frau Kirstin, meinen Eltern Anna und Ferenc Tulipan, meinem Bruder Michael, Ditta und Imre Csipko, Annette und Christian Pasch und meinen Freunden.

Schreiben ist die Hölle, aber geschrieben haben ist der Himmel. - Sybille Krause Burger -

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Andreas Julius Tulipan
Wohnort: Bodø, Norwegen
Geburtsdatum: 24.09.1974
Geburtsort: Budapest / Ungarn

Schulbildung:

1981- 1988 Allgemeinschule in Budapest
1989- 1995 Felix- Fechenbach- Gesamtschule Leopoldshöhe
23.06.1995 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1995- 1996 Zivildienst in dem Städtischen Krankenhaus Bielefeld Mitte

Hochschulausbildung:

1996- 1999 Studium der Humanmedizin in Bochum
06.04.1999 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
1999- 2003 Studium der Humanmedizin in Essen
12.04.2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
17.09.2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29.10.2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11.11.2003 Erlaubnis zur Ausübung des ärztlichen Berufs
nach §10 Abs. 4/5 BÄO

Promotion:

04.2000- 11.2000 Institut für Molekularbiologie des Universitätsklinikums Essen
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. B.M. Pützer