

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
-Pädiatrische Hämatologie und Onkologie-
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Heribert Jürgens -

Telomerasehemmung und Chemotherapie – präklinische Evaluation eines
möglichen therapeutischen Konzeptes beim Neuroblastom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Duran Seuberth, Ines
aus Bamberg

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Boos

2. Berichterstatter: PD Dr. S. Könemann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.09

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

- Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Heribert Jürgens -

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Boos

Koreferent: PD Dr. S. Könemann

ZUSAMMENFASSUNG

Telomerasehemmung und Chemotherapie – präklinische Evaluation eines möglichen therapeutischen Konzeptes beim Neuroblastom

Duran Seuberth, Ines

Das Enzym Telomerase ist ein Ribonukleoproteinkomplex, der telomere Wiederholungseinheiten synthetisiert und in mehr als 80% aller menschlichen Tumoren exprimiert wird, während es in den meisten somatischen Zellen inaktiviert ist. Aufgrund der Reaktivierung während der malignen Transformation korreliert es eng mit Wachstumspotential und Malignität. Neuere Daten zeigen, dass die Kombination aus Telomerasehemmung und Chemotherapie eine raschere Suppression des Tumorwachstums bewirken könnte und somit möglicherweise eine spezifischere und effektivere Kombinationstherapie möglich wäre.

In dieser Arbeit wurden die Effekte einer Anti-Telomerase Strategie durch die Expression einer dominant-negativen (hTDN) Mutante in Neuroblastomzelllinien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der hTDN-Mutante bei der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH nach längerem Kultivieren der Zellen zu Wachstumshemmung und Zelltod führte. Jedoch konnte eine Telomerverkürzung bei nicht nachweisbarer Telomeraseaktivität nicht eindeutig gezeigt werden. Hinsichtlich der Chemosensitivität führte die hTDN-Mutante bei SK-N-SH zu einer Sensibilisierung für Ifosfamid während für die Zytostatika Doxorubicin, Etoposid und Cisplatin eine Resistenzzunahme nachgewiesen werden konnte. Für die ektope Expression von Telomerase in der Telomerasenegativen Zelllinie CHLA-90 konnten vermehrte Proliferation, Telomerverlängerung und Telomeraseaktivität beobachtet werden während ein Einfluß auf die Chemosensitivität von Doxorubicin, Etoposid, Cisplatin und Ifosfamid durch hTERT für CHLA-90 Zellen nicht beobachtet werden konnte.

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.09

Für Pauline.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Telomere und Telomerase	1
1.1.1	Geschichte der Telomere und der Telomerase	1
1.1.2	DNA-Struktur und Funktion von Telomeren	2
1.1.3	Struktur und Funktion des Enzyms Telomerase.....	3
1.1.4	Regulierung der Telomeraseaktivität.....	5
1.2	Bedeutung der Telomere und der Telomerase	7
1.2.1	Bedeutung der Telomere	7
1.2.2	Funktion des Enzyms Telomerase.....	8
1.2.3	Zelluläre Seneszenz, Krise und Immortalisierung.....	10
1.2.4	Telomeraseaktivierung während der Karzinogenese.....	12
1.2.5	Telomeraseaktivierung in malignen Tumoren.....	13
1.2.6	Telomeraseaktivierung beim Neuroblastom.....	14
1.2.7	Telomeraseunabhängige Verlängerung der Telomere.....	15
1.3	Neuroblastom und Tumorbiologie	16
1.3.1	Biologisches Verhalten.....	16
1.3.2	Aktivierung des Onkogen c-myc (MYCN-Amplifikation)	18
1.3.3	Chromosom 1 p und 11q	18
1.3.4	Chromosomenverlängerung an 17 q.....	18
1.3.5	Neurotrophinrezeptor TrkA.....	19
1.4	Neuroblastom und Klinik	19
1.4.1	Epidemiologie.....	19
1.4.2	Pathologie	19
1.4.3	Histopathologische Einteilung.....	20
1.4.4	Stadieneinteilung	20
1.4.5	Klinik.....	21
1.4.6	Diagnose	23
1.4.7	Therapie	24
1.4.8	Topoisomerase-Hemmstoffe	24
1.4.9	Alkylierende Zytostatika	26
1.4.10	Anthracyclin-Antibiotika.....	28

1.4.11	Prognose	29
1.5	Fragestellung der Arbeit	30
2	Material und Methoden	33
2.1	Zellkultur	33
2.1.1	Mutterzelllinien und Vektortransfektion	33
2.1.2	Materialien	34
2.1.3	Passagieren der Zellen	35
2.1.4	Einfrieren der Zellen	35
2.1.5	Auftauen der Zellen	36
2.1.6	MTT-Test	36
2.2	Southern Blot: Telomerenlängen-Blot	37
2.2.1	DNA Isolierung	37
2.2.2	Restriktionsverdau	39
2.2.3	DNA-Gel	40
2.2.4	Transfer	41
2.2.5	Hybridisierung	42
2.2.6	Detektion	43
2.3	TRAP Assay	45
2.3.1	Proteinisolierung	45
2.3.2	Proteinquantifizierung	46
2.3.3	TRAP-Reaktion	47
2.3.4	Fragmentanalyse	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Zytotoxizitätstests	51
3.1.1	MTT-Test mit Ifosfamid an CHLA-90	51
3.1.2	MTT-Test mit Ifosfamid an SK-N-SH	55
3.1.3	MTT-Test mit Cisplatin an CHLA-90	58
3.1.4	MTT-Test mit Cisplatin an SK-N-SH	61
3.1.5	MTT-Test mit Doxorubicin an CHLA-90	64
3.1.6	MTT-Test mit Doxorubicin an SK-N-SH	67
3.1.7	MTT-Test mit Etoposid an CHLA-90	70
3.1.8	MTT-Test mit Etoposid an SK-N-SH	73

3.2	Zellproliferation und Chemosensitivität nach Transfektion	75
3.2.1	Zellproliferation nach Transfektion.....	75
3.2.2	Chemosensitivität der Zelllinien CHLA-90 und SK-N-SH.....	76
3.2.3	Chemosensitivität von transfizierten CHLA-90 Zellen.....	77
3.2.4	Chemosensitivität von transfizierten SK-N-SH-Zellen.....	80
3.3	Telomerenlängenbestimmung	85
3.3.1	Southern Blot 1	85
3.3.2	Southern Blot 2.....	87
3.3.3	Southern Blot 3	89
3.3.4	Southern Blot 4.....	91
3.4	Telomeraseaktivität.....	92
4	Diskussion	101
4.1	Telomeraseaktivität in Neuroblastomen	102
4.2	Telomeraseaktivität und Chemotherapie.....	104
4.3	Präklinische Evaluation für das Neuroblastom.....	107
4.4	Telomeraseinhibitoren: Risiken und Anforderungen	108
4.5	Möglichkeiten einer Anti-Telomerase-Therapie	109
4.6	Ausblick.....	110
5	Abkürzungen	112
6	Lebenslauf.....	115
7	Danksagung	118
8	Literatur.....	119

1 Einleitung

Die Erkrankung an Krebs spielt in unserem Gesundheitssystem eine bedeutende Rolle. Dabei ist es sowohl für das Verständnis von Erkrankungen im Allgemeinen, als auch für die Entwicklung von spezifischen Therapien wichtig, die molekularbiologischen Hintergründe nicht außer Acht zu lassen. Durch die Fortschritte in der Medizin ist es heute möglich verschiedene Tumorerkrankungen effektiver und spezifischer zu behandeln, bzw. deren Risikoprofil vor dem Hintergrund einer genetischen Veränderung besser einzustufen.

Das Enzym Telomerase nimmt im Rahmen der Tumorgenese von bösartigen Tumoren eine Schlüsselrolle ein und ist häufig in Tumorgewebe nachweisbar. Ein besseres Verständnis, hinsichtlich seines Beitrages zur Tumorprogression, würde einen bedeutenden Schritt in der selektiven Bekämpfung von Krebszellen unter Schonung des übrigen Organismus darstellen.

1.1 *Telomere und Telomerase*

Telomere sind aus repetitiven DNA-Sequenzen und Proteinen bestehende Strukturen am Ende von Chromosomen und sind für die Stabilität der Chromosomen erforderlich. Das Enzym Telomerase verlängert telomere DNA und kompensiert damit den physiologischen Prozess der zellteilungsabhängigen Verkürzung von Telomeren. Telomerase wird mit den Vorgängen der zellulären Alterung und Immortalisierung in Verbindung gebracht.

1.1.1 **Geschichte der Telomere und der Telomerase**

Der Begriff Telomer (griechisch: End-Teil) wurde durch Müller (133) und McClintock (121) geprägt, als sie die Bedeutung der Chromosomenenden für deren Stabilität erkannten. Bei der Replikation der doppelsträngigen DNA ist es der DNA-Polymerase nicht möglich, Chromosomen in vollständiger Länge zu replizieren, weshalb sich die Chromosomen kontinuierlich mit jedem Zellteilungsvorgang verkürzen (146). 1985 entdeckten Greider und Blackburn (56) bei dem Einzeller Tetrahymena das Enzym Telomerase, welches die Telomere durch Anfügen von $(TTGGGG)_n$ verlängert, und somit den teilungsbedingten Verlust telomerer Sequenzen kompensiert. Die RNA-Struktur der Telomerase entdeckten 1987 Greider und Blackburn (55) und 1994 wurde

erstmalig Telomeraseaktivität in menschlichem Tumorgewebe eines Ovarialkarzinoms nachgewiesen (34). Es folgte die Entwicklung des „Telomeric Repeat Amplification Protocol“ (TRAP-Assay) durch Kim et al (97) und ermöglichte so die rasche Analyse großer Gewebeserien. Im Jahr 1995 wurde ein erster telomerer Bindungsfaktor TRF1 (telomeric repeat binding factor) durch Chong et al (27) charakterisiert und zwei Jahre später das Gen einer Proteinuntereinheit hTERT (human telomerase associated protein) durch Harrington identifiziert (72). Das Interesse an dem Enzym Telomerase und Telomeren ist in den letzten Jahren enorm gestiegen und soll in dieser Arbeit erläutert werden.

1.1.2 DNA-Struktur und Funktion von Telomeren

Telomere sind spezialisierte Protein-DNA Strukturen an den Enden eukariotischer Zellen. Die DNA der Telomeren setzt sich aus repetitiven guaninreichen (G-reichen) Sequenzen zusammen und besteht aus ungefähr 4-14 kb (Kilobasen) `TTAGGG` Wiederholungsdoppelsequenzen und einem Überhang von 150-200 Basen Einzelstrang - DNA, welche in 5' - 3' Richtung endet (200). Dieser G - reiche DNA - Einzelstrang am 3'-Ende der Telomeren resultiert aus unvollständiger DNA-Replikation (145).

Zur Gesamtstruktur der Telomere zählen neben den repetitiven DNA- Sequenzen auch bestimmte Proteine wie die humanen Telomerbindungsproteine TRF1 und TRF2 (8, 17, 27). TRF1 und TRF2 interagieren miteinander. TRF 1 bindet als Homodimer an die doppelsträngige telomerische DNA (7). Man hat beobachten können, daß sich die DNA umfaltet, und dabei die sonst linearen Telomere große Telomerschleifen (*t-loops*) bilden (siehe Abb.1.1.2). TRF1 bewirkt bei diesem Vorgang die parallele Anordnung der Duplexstränge zueinander und induziert gleichzeitig die Bildung einer kleinen »Vertiefung« in diesen Duplexsträngen. TRF2 - ebenfalls als Homodimer gebunden an doppelsträngige Telomer-DNA (17) - befindet sich am Berührungspunkt zwischen Schleifenanfang und Telomerende (siehe Abb.1.1.2). An seiner Bindungsstelle bewirkt TRF2 eine kurzstreckige Entwindung der DNA-Doppelhelix und Auftrennung der komplementären Stränge. Dadurch kann der einsträngige G-reiche 3'-Überhang des Telomers an genau dieser Stelle in den Doppelstrang eintauchen und mit einem Strang hybridisieren. Dabei bildet sich, stabilisiert durch TRF2, der sogenannte „*Displacement Loop*“ (*d-loop*), über den die einsträngigen Telomerenden geschützt werden. Er enthält

bis zu 300 Nucleotide einsträngiger TTAGGG - Repeats. Die Bildung der Loops ist ein Mechanismus, der den Verlust von kodierenden Sequenzen durch End-zu-End-Fusion, Rekombination und Degradation durch Exonukleasen und Ligasen verhindert.

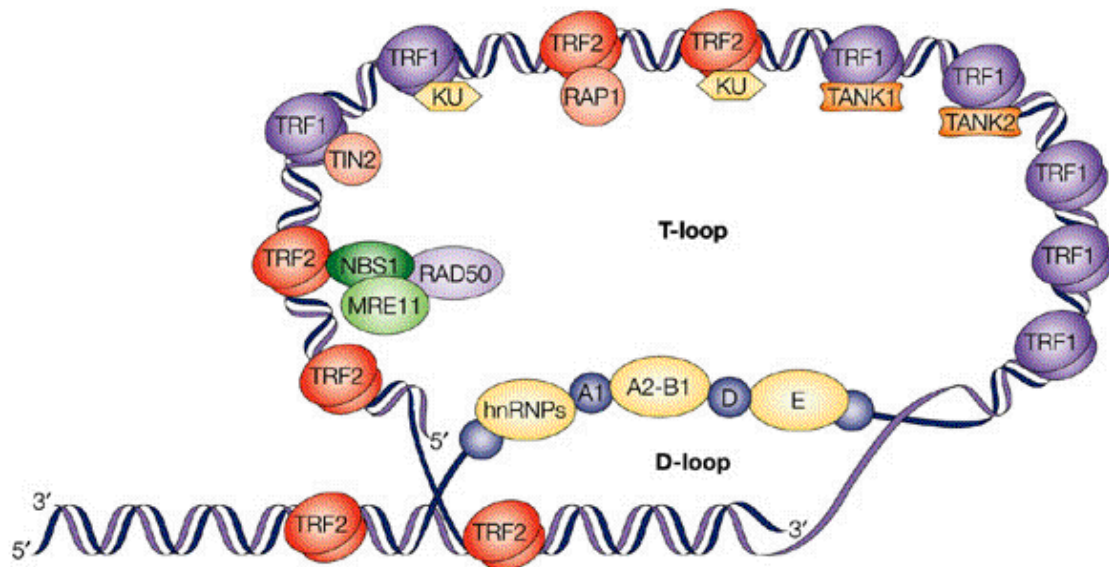


Abb.1.1.2: Telomeraspezifische Proteine in ihrer strukturellen Anordnung. Für den Erhalt der telomerspezifischen t-loop-D-loop-Struktur sind die TTAGGG-bindenden Faktoren TRF1 und TRF2 verantwortlich.

Die Größe der t-Loops korreliert stark mit der Telomerlänge (59). Ein Equilibrium aus Bindung von TRF1 und TRF2 und einer ausreichenden Länge von Telomer-Repeats spielt für die Ausbildung dieser Loops eine entscheidende Rolle. Bei Verlust von TRF2 kann, trotz intakter und ausreichend langer Telomere, die Funktion dieses Fusionsschutzes der Chromosomen nicht aufrecht erhalten werden (183). Die Bindung von TRF1 und TRF2 und die Ausbildung der t-Loops sind nur unter Vorliegen entsprechend langer, nicht aber bei kritisch verkürzten Telomeren, möglich (59).

1.1.3 Struktur und Funktion des Enzyms Telomerase

Der Enzym Telomerase ist ein Ribonukleoproteinkomplex, der eine eigene interne RNA-Komponente besitzt (Abb.1.1.3). Die Telomerase RNA besteht aus einer 560 bp (Basenpaare) langen RNA-Matrize (45) und wird für die Synthese von telomeren DNA-Sequenzen benutzt. Die als Schablone dienende Region der humanen Telomerase-RNA (hTR, human telomerase RNA oder auch hTERC) ist 11 Basen lang und komplementär

zum Telomerstrang aufgebaut (45, 132).

Die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT (human telomerase reverse transcriptase) wirkt als reverse Transkriptase (52) und ist für die Nukleotidaddition an den 3'-Enden der chromosomalen DNA verantwortlich (138). Während die RNA-Komponente hTR (45) ubiquitär exprimiert wird, ist die hTERT-Expression in telomerasenegativen Geweben nicht vorhanden (43). Des weiteren korreliert die Expression der hTERT mRNA, im Gegensatz zu hTR, mit der Telomeraseaktivität (42). In menschlichen Zellen ist hTERT der limitierende Faktor für einen funktionsfähigen aktiven Telomerase – Komplex, dessen Expression primär auf transkriptioneller Ebene reguliert wird (127, 138).

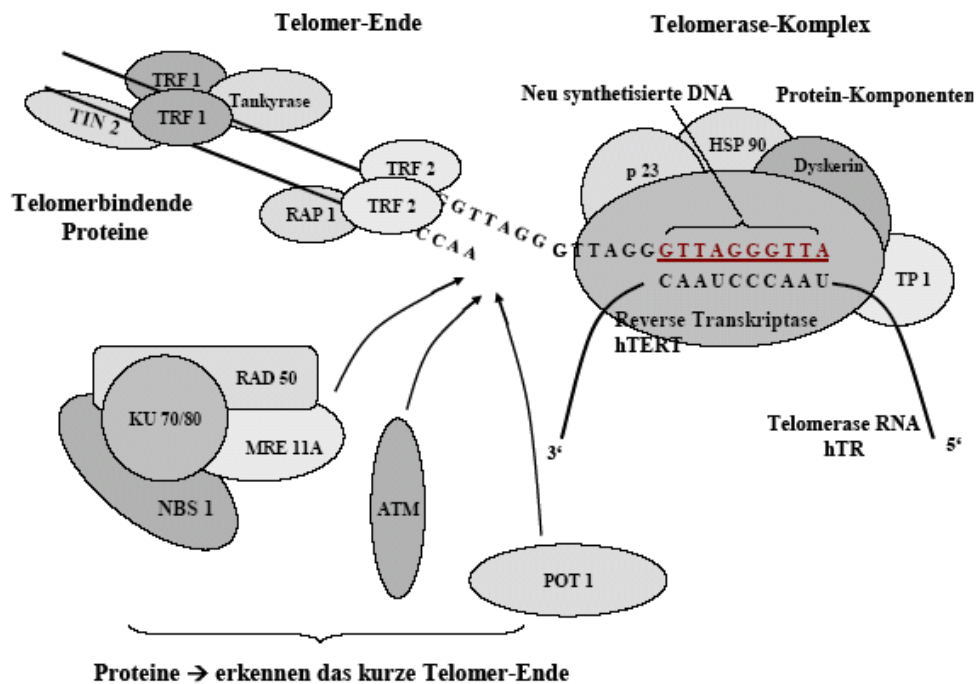


Abb.1.1.3: Telomere, Telomerase und Proteine, welche die Telomerasefunktion modulieren (aus Hartmann U. und Brümmendorf T.H., (76), modifiziert nach Keith et al. Expert Reviews 2002)

Die Telomerase ist mit einem Molekulargewicht von ca. 1000 kD (kilo-Dalton) ein relativ großes Molekül mit verschiedenen Proteinuntereinheiten, welche strukturelle und katalytische Funktionen haben. In Abb.1.1.3 sind einige telomerasebindende Proteine dargestellt, wie z.B. das TP1 (telomerase associated protein) des Telomerasekomplexes, dessen Anwesenheit für die Telomeraseaktivität in vitro jedoch nicht zwingend

erforderlich zu sein scheint (6, 74). Im Gegensatz dazu wurden den Proteinen p23 und hsp90 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine essentielle Funktion für die Telomeraseaktivität zugeschrieben (88). Ein weiteres Protein, das Dyskerin, ist ebenfalls in der Lage sowohl Aufbau als auch Aktivität des Enzyms zu modulieren (129).

1.1.4 Regulierung der Telomeraseaktivität

Die Telomerase ist ein reguliertes Enzym, aber die beteiligten Mechanismen sind noch nicht ausreichend bekannt. Die Regulation der hTERT – Expression ist komplex und es wurde bisher sowohl über mutmaßlich positive als auch negative Regulatoren berichtet. Es werden experimentell diverse Mechanismen der Telomeraseaktivierung diskutiert:

- Der hTERT- Promoter enthält Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren (29). Eine Beteiligung bei der Aktivierung der hTERT-Transkription durch Onkogene wie c-Myc (53, 187, 195) oder das E6-Protein des humanen Papillomavirus 16 (HPV 16) (99, 186) sind bekannt.
- Der Einfluss weiterer Onkogene wie pRb (Protein des Retinoblastomgens) (98), SV (simian virus)-40T-large Onkoprotein und H-ras (66) auf die Telomeraseaktivität wurde untersucht.
- In gleicher Weise induzieren unter bestimmten experimentellen Bedingungen der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (197), das Fusionsprotein EWS/ETS des Ewingsarkoms (177) und onkogene Bestandteile des RAS Signalweges (50) , Telomeraseaktivität.
- In epithelialen Brustzellen, welche einen Östrogenrezeptor exprimieren, aktivieren Östrogene sowohl direkt (über estrogenresponsible Elemente des hTERT –Promoters), als auch indirekt (c-MYC-Aktivierung) die Effekte am Promoter von hTERT (106, 128).
- Auch scheint die Signalwirkung von Androgenen die Expression von hTERT hochzuregulieren (13, 62).

Die Repressionsmechanismen der Telomerase und des hTERT-Gens sind ebenfalls wenig bekannt. Die Vorstellungen einiger Autoren werden hier dargestellt:

- Im Einklang mit der Telomeraseaktivierung durch das Onkogen c-MYC steht,

dass eine Überexpression von Mad 1, einem c-Myc Antagonist, die hTERT Expression supprimiert (61, 144).

- Es wird beschrieben, dass das Wilms Tumor Suppressor Gen WT 1 den Grad an hTERT mRNA in 293 Nierenzellen reduziert und ein direkter Repressor des hTERT-Gens ist (143).
- Die Expression von h-TERT als auch die Telomeraseaktivität von Tumorzellen kann durch den Transfer spezifischer humaner Chromosomen gehemmt werden (147). In Übereinstimmung damit findet man auf verschiedenen Chromosomen potentielle transkriptionelle Hemmer der hTERT. Untersuchungen zeigen, dass der Transfer von Chromosom 3 (36, 178) und auch Chromosom 10 (140) in der Lage ist die Expression von hTERT zu hemmen.
- Die Histon-Deacetylierung scheint in die Repression von hTERT involviert zu sein (28).

Eine weitere Ebene der transkriptionellen Regulation der Telomeraseaktivität bietet alternatives Spleißen der hTERT mRNA, welches zu Proteinen unterschiedlicher Länge führt. Bisher sind unterschiedliche Spleiß-Varianten der hTERT mRNA nicht nur während der embryonalen Entwicklung (95, 180), sondern auch im normalem Gewebe (180) und in Tumoren (102), beschrieben. Diese Spleiß-Varianten unterscheiden sich dabei in ihrer Fähigkeit, aktive Telomerase zu generieren. Ergebnisse aus in vitro und in vivo Untersuchungen zeigten, dass nur Transkripte der vollen Länge in der Lage sind funktionsfähige Telomerase zu bilden. Neben diesen „full-length“- Transkripten ($+\alpha+\beta$) wurden bisher sieben weitere Splicing-Varianten beschrieben (199).

Neben der transkriptionellen Regulation als Hauptmechanismus gibt es Untersuchungen, die auf posttranslationale Modifikationen als zusätzlichen Regulationsmechanismus der Telomeraseaktivität hinweisen und zeigen, dass die Telomerase auf Proteinebene mittels Phosphorylierung reguliert werden kann:

- Bekannt ist die Beteiligung unterschiedlicher Proteinkinase C (PKC) Isoformen an der Regulierung der Telomeraseaktivität verschiedener Zellarten (104, 112). Darüber hinaus wird sowohl die Steigerung der Telomeraseaktivität durch Aktivatoren der PKC, als auch deren Hemmung durch PKC-Inhibitoren (12), beschrieben.

- Neben der PKC ist auch die Proteinkinase B (PKB oder auch Akt Kinase genannt) in der Lage die enzymatische Untereinheit hTERT zu phosphorylieren und damit die Telomeraseaktivität zu stimulieren (90).

Die Tyrosinkinase c-abl kann hTERT in vitro und in vivo binden und die Telomeraseaktivität über eine Phosphorylierung von hTERT hemmen. Interessanterweise führt die Expression von c-Abl in hTERT positiven Zellen nicht nur zu einer Down-Regulation der Telomeraseaktivität sondern auch zu signifikant kürzeren Telomeren gegenüber c-Abl^{-/-} Zellen (94).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Komplexität der transkriptionellen sowie der darüber hinausgehenden Regulation von hTERT vielen verschiedenen Einflussfaktoren unterliegt und ein detaillierteres Verständnis Voraussetzung für die Entwicklung einer klinisch-therapeutischen Anwendung ist.

1.2 Bedeutung der Telomere und der Telomerase

1.2.1 Bedeutung der Telomere

Am Endstück der Chromosomen schützt der Telomerkomplex aus repetitiven TTAGGG-Sequenzen und Bindungsproteinen vor illegitimer Rekombination durch Fusionen, Translokationen und Rearrangements (9). Telomere erhalten die chromosomale Stabilität einer Zelle, indem sie lineare Chromosomen vor Basenverlust schützen (58), und durch Interaktionen mit Proteinen der Zellkernwand die Chromosomenenden vor degenerativen enzymatischen Prozessen abschirmen (38). Die Länge der Telomere in einer Zelle wird sowohl von der Zellteilung als auch von der Aktivität des Enzyms Telomerase beeinflusst. Telomere von Fibroblasten verlieren pro Verdopplung ihrer Zellpopulation in vitro ca. 50-200 bp ihrer ursprünglichen Telomerasequenzen (70). Die telomere DNA der meisten menschlichen somatischen Zellen verkürzt sich mit den aufeinanderfolgenden Zellteilungen, bis ab einer kritischen Telomerlänge von ca. 1500 bis 4000 bp keine Zellteilungen mehr stattfinden und die Zellen nicht mehr proliferieren können (54, 69).

Dieser Punkt wird nach seinem Entdecker als Hayflick-Limit bezeichnet und gibt das Signal zum Eintreten in die zelluläre Seneszenz, welche die limitierte proliferative Kapazität normaler Zellen in vivo und in vitro definiert (77). Somit besitzen Telomere neben Ihrer protektiven Funktion zusätzlich eine wichtige Rolle für die Regulation der

Lebensdauer einer Zelle (71). Auf Olovnikovs Theorie, dass der Verlust telomerer DNA zum Verlust essentieller Gene und damit zum Zelltod führt (146), geht die Idee - das Phänomen der zellulären Seneszenz mit dem Problem der Endreplikation (2, 111) in Zusammenhang zu bringen - zurück. In somatischen Zellen des Menschen sind die Telomere stets signifikant kürzer als in Keimbahnzellen und fetalen Zellen. Ihre Länge nimmt in den somatischen Zellen mit zunehmendem Alter ab. Die altersabhängige progressive Verkürzung von Telomeren bei der Replikation lässt sich auch in vivo, z.B. beim Vergleich hämatopoetischer Stammzellen fetaler und adulter Spender, beobachten (185). Junge Individuen besitzen in den meisten Fällen Zellen mit längeren Telomeren als ältere, was durch Bestimmung der mittleren Telomerlänge in peripheren Blutzellen gezeigt werden konnte (156). Bodnar et al. demonstrierten den kausalen Zusammenhang zwischen der Telomerlänge und der Lebensdauer der Zellen in vitro. Sie wiesen die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT in primären Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen nach, die verlängerte Telomere und reduzierte Seneszenzmarker (β -Galactosidase) zeigten (11).

1.2.2 Funktion des Enzyms Telomerase

Das Enzym Telomerase synthetisiert die Telomersequenzen, welche beim Menschen aus den repetitiven DNA-Einheiten `TTAGGG` (gelesen von 5`- in 3`-Richtung) bestehen, indem es seine eigene RNA Komponente (5`-CUAACCCUAAC)_n, welche komplementär zur humanen Telomer-Sequenz ist, als Matrize benutzt (76, 132). Diese Matrize besteht aus zwei verschiedenen Abschnitten, wobei der eine dafür zuständig ist an das Telomer-Ende zu binden, während der andere als Vorlage für die Reverse Transkriptase dient, welche die DNA-Synthese übernimmt. Diese erfolgt in drei Schritten. Nach der Anbindung des Enzymkomplexes an die chromosomale DNA (sog. „Alignement“) werden die Telomer-Repeats (TTAGGG) an das Telomer-Ende synthetisiert („Elongation“). Danach rückt der Enzymkomplex weiter („Translokation“), wodurch eine neue Runde der Telomersynthese eingeleitet wird.

Eine wichtige Kontrollinstanz der Elongation scheint dabei das telomerbindende Protein TRF1 zu sein. Wird TRF1 in einer Tumorzell-Linie überexprimiert, erfolgt eine kontinuierliche Verkürzung der Telomere. Mutiertes TRF1, welches nicht mehr zur Telomerbindung fähig ist, führt dagegen zur unkontrollierten Telomerverlängerung

Erklärung ist die Ausbildung der t-Loop-Struktur, welche die Bindung der Telomerase verhindern kann. Ein weiteres Sequenz-spezifisches telomerbindendes Protein, TRF2 (183), ist für die Ausbildung der sogenannten t-loops, und damit für den Schutz der freien Telomerenden, mitverantwortlich (59). Der Verlust an TRF2 führt zur chromosomalen Veränderungen und zum Zellzyklus-Arrest (183). Dagegen wird bei der Überexpression von TRF2 in vitro der Zeitpunkt bis zum Eintreten der zellulären Seneszenz über eine Reduktion der kritischen Telomerlängenschwelle verzögert (91).

In Untersuchungen lässt sich aktive Telomerase in embryonalen Zellen, in Keimgewebe, gelegentlich in Stammzellen und häufig in Tumorzellen nachweisen. In den meisten normalen somatischen Zellen ist die Telomerase nicht exprimiert (69, 153). Ausnahmen bilden die basalen Kompartimente der Stammzellen von hochregenerativen Geweben, wie des Immunsystems, der Haut und des Intestinaltraktes. So ließ sich Telomeraseaktivität sowohl in Leukozyten von peripherem Blut, Nabelschnurblut und Knochenmark (18, 33, 85) nachweisen, als auch in stimulierten Lymphozyten (12, 85), in den multipotenten Basalzellen der Epidermis (68) und im Epithel lichtexponierter normaler Haut (179). Hsiao et al. konnten zeigen, dass proliferierende Endothelzellen Telomeraseaktivität besitzen (89). In einer Studie am gesunden Endometrium fanden Kyo et al. die höchste Telomeraseaktivität in der späten Proliferationsphase, gefolgt von einem drastischen Abfall in der Sekretionsphase (107). Eine weitere Untersuchung zu einer positiven Telomeraseaktivität in regenerativen Geweben gibt es an Haarfollikeln (149). Auch in benignen Tumorgewebe lässt sich eine Telomeraseaktivierung nachweisen, so z.B. in Fibroadenomen der Mamma (80), in tubulären Adenomen des Gastrointestinaltraktes (176) und in benignen Prostata-Adenomen (170).

1.2.3 Zelluläre Seneszenz, Krise und Immortalisierung

Die unbegrenzte Proliferationsfähigkeit von malignen Tumorzellen führte zu der Hypothese, dass die meisten Tumorzellen die Fähigkeit besitzen während der Tumorgenese das Enzym Telomerase vor Erreichen einer kritischen Telomer Verkürzung zu reaktivieren, und somit dem Eingang in die Seneszenz und letztlich der Apoptose entkommen (76). Es ist erwiesen, dass das Enzym Telomerase zu 80-90 % in menschlichen Tumorzellen exprimiert (97, 166) wird, während die Expression in den

meisten menschlichen somatischen Zellen unterdrückt ist (67).

Ein Stufenmodell beschreibt, wie die Zellen durch Umgehung der zellulären Seneszenz eine unbeschränkte Teilungskapazität, die sog. Immortalisierung, erreichen können (193). Nach ca. 20 Zellverdopplungen tritt ein initialer Wachstumsstopp auf. Dieser Zustand wird als M 0-Stadium (M für mortality) bezeichnet (98). Der Punkt, an dem eine kritische Telomerlänge erreicht wird, wird als HayflickLimit bezeichnet und triggert den Eintritt in das Mortalitätsstadium M 1, auch replikative (zelluläre) Seneszenz genannt (77). Dabei konnte durch Inhibition des Enzyms Telomerase in ursprünglich telomerasepositiven immortalen Zellen gezeigt werden, dass die Zeitspanne bis zum Erreichen der Seneszenz mit der Telomerlänge der Zellen vor der Mutation korreliert. Das bedeutet, dass die Telomerreserve der Zellen vor dem Abschalten der Telomerase, die Anzahl der noch möglichen Zellteilungen limitiert (79) und diese nach einer individuell definierten Anzahl von Zellteilungen das Stadium der Seneszenz erreichen.

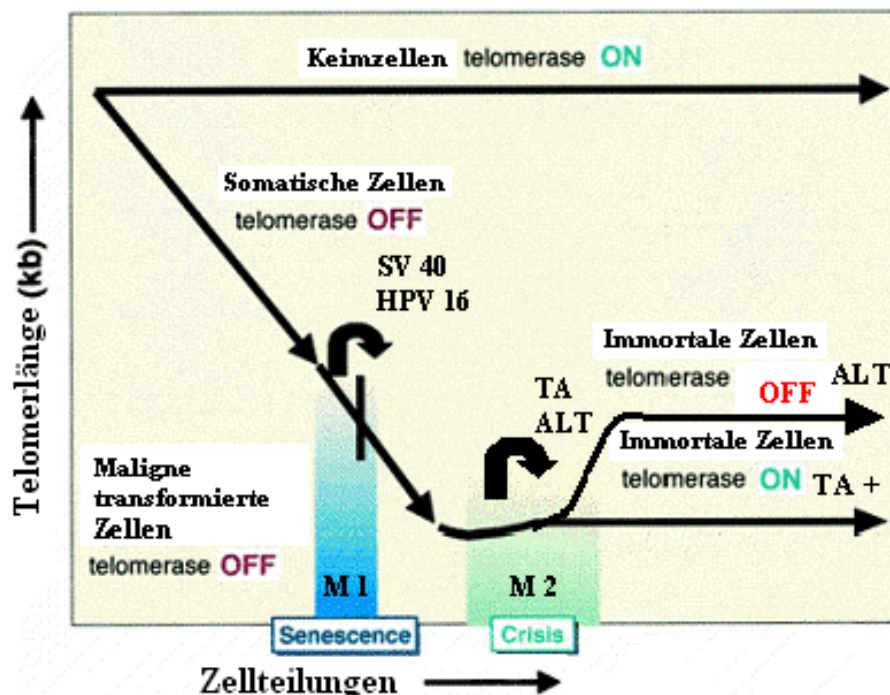


Abb.1.2.3: Telomere und Immortalisierung. Zwei Mortalitätsstadien werden auf dem Weg zur Immortalisierung durchlaufen. Die antiproliferative Stufe der Seneszenz tritt unter dem Diktat der Telomererosion ein und kann durch Ausschaltung der Tumorsuppressorgene p53 und Rb überwunden werden. Weitere Zellteilungen führen zu maximaler genetischer Instabilität, welche das Stadium der Krise kennzeichnen. Nur durch den Erwerb von Telomer-Maintenance-Mechanismen (TMM) – Telomeraseaktivierung oder ALT – kann der immortale, telomerenstabilisierende Status erreicht werden (modifiziert nach (126)).

Dieses Stadium M1 ist gekennzeichnet durch Zellzyklusarretierung, Proliferationsstopp, genetischer Instabilität und Zelltod. Auf molekularer Ebene finden sich im Stadium der Seneszenz eine gestörte Telomerstruktur und veränderte subtelomerische DNA-Sequenzen (193). Hierdurch werden Tumorsuppressorgene wie p53 und die GADD-Kaskade aktiviert und antiproliferative Signale gesetzt (24) sowie durch Interaktionen zwischen den Tumorsuppressorproteinen p53 und pRb der Zellzyklus in der ersten gap-Phase (G1) angehalten (192).

Zellen können ihre Lebensspanne verlängern, wenn onkovirale Infektionen (z.B. Humanes Papilloma Virus HPV 16 assoziierte Proteine E6/E7 oder SV-40 Large T-Antigen) durch Mutationen in der DNA weitere Zellteilungen ermöglichen. Damit können die transformierten Zellen, unter Umgehung des natürlichen Proliferationsstopp, ab einer kritischen Telomerlänge das zweite Mortalitätsstadium M2, auch genannt die „Krise“, erreichen (167, 193). Das Stadium M 2 ist durch eine maximale Chromosomeninstabilität (dizentrische Chromosomen, Aneuploidität, Verlust genetischer Information) mit konsekutivem Zelltod gekennzeichnet.

Es wird angenommen, dass durch Aktivierung der Telomerase oder eines alternativen Mechanismus zur Telomerverlängerung (ALT) die Chromosomenenden auf konstantem Niveau stabilisiert werden können, und somit das Apoptoseprogramm (M2 Krise) umgangen werden kann (32, 184). Die transformierten Zellen können sich dann ungebremst weiter teilen und erreichen einen potenziell immortalen Zustand (192). Bei immortalisierten Zellen in vitro (31) und in Tumorzellen in vivo (39) finden sich dann auch kurze, aber teilungsunabhängige stabile Telomere.

Fazit: Mutationen, die Telomerase reaktivieren, kooperieren demzufolge mit anderen Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen bei der schrittweisen malignen Transformation einer Tumorzelle (67).

1.2.4 Telomeraseaktivierung während der Karzinogenese

Nach der Entwicklung ihres TRAP-Assays untersuchten Kim et al. erstmals Gewebeproben von 12 verschiedenen Tumoren. Dabei wiesen sie aktive Telomerase in 90 von 101 Biopsien (89 %) verschiedener Tumoren, jedoch in keinen der untersuchten 50 normalen somatischen Gewebeproben nach (97). Die Aktivierung des Enzyms ermöglicht die unbegrenzte Proliferation, verhindert die Alterung dieser Zellen und

führt zur Immortalisierung (11, 98). Trotzdem reicht eine Immortalisierung von Zellen durch Telomerase *per se* nicht aus, um bei diesen Zellen auch eine maligne Transformation zu bewirken (131). Hierzu sind zusätzliche genetische Veränderungen, wie zum Beispiel die Ausschaltung der Tumorsuppressorgene *RB* und *p53* als auch die Aktivierung des Onkogens *ras*, unerlässlich (66). Obwohl Telomeraseaktivität in 90 % der untersuchten menschlichen malignen Tumoren nachgewiesen werden konnte (160) und man aus diesem Grund die Aktivierung von Telomerase stark mit Malignität assoziiert, so muß doch bedacht werden, daß Telomerase weder ein Onkogen ist noch Krebs hervorruft (131). Allerdings kann das Wachstum von Tumorzellen durch Inhibition von Telomerase aufgehalten werden, da Telomerasehemmung in Tumorzellen Apoptose induziert. Die Aktivität von Telomerase ist also für das Überleben von Tumorzellen von großer Bedeutung (67, 79). Das Vorhandensein von kurzen Telomeren bei nachweisbarer Telomeraseaktivität scheint auf die Aktivierung des Enzyms Telomerase als spätes Ereignis in der Karzinogenese hinzuweisen (4).

1.2.5 Telomeraseaktivierung in malignen Tumoren

In Tabelle 1.2.5 werden aus der Literatur Arbeiten über den Telomerasenachweis in malignen Tumoren nach Shay und Bacchetti (163) sowie nach Dhaene et al (41) zusammengefasst.

LOKALISATION MALIGNER TUMOREN	TELOMERASEAKTIVITÄT (POSITIVE/ UNTERSUCHTE PROBEN)	LITERATURQUELLE
Mammakarzinome	93 % (130/ 140)	(80)
Ovarialkarzinome	86 % (18/ 21)	(105)
Endometriumkarzinome	92 % (12/ 13)	(105)
Bronchialkarzinome	80 % (109/ 136)	(86)
Kolorektumkarzinome	80 % (40/ 50)	(113)
Hepatozelluläre Karzinome	85 % (22/ 26)	(100)
Magenkarzinome	85 % (56/ 66)	(84)
Nierenzellkarzinome	71 % (40/ 56)	(124)
Prostatakarzinome	84 % (21/ 25)	(170)

Melanome	86 % (6/ 7)	(179)
Basalzellkarzinome	95 % (73/ 77)	(179)
Mittelwert:	85 % (527/ 617)	

Tab.1.2.5: Telomeraseaktivität bei verschiedenen malignen Tumoren (168), (43)

Bei Mammakarzinomen konnte eine starke Assoziation zwischen der Stadienklassifikation und der Telomeraseaktivität gefunden werden (80), während für Nierenzellkarzinome kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis der Telomeraseaktivität und klinisch-pathologischen Parametern wie dem Differenzierungsgrad, der Stadieneinteilung und klinischem Verlauf, festgestellt werden konnte (124). Magentumoren zeigten in 85 % eine Telomeraseaktivierung an, auch bei frühen Karzinomen. Die meisten der telomerasepositiven Tumoren waren in einem fortgeschrittenen Stadium und metastasiert. Die Überlebensrate der Patienten mit nachweisbarer Telomeraseaktivität im Tumorgewebe war signifikant geringer, als die der Patienten mit telomerasenegativem Tumorgewebe (84). In Untersuchungen zu Telomeraseaktivitäten in Lungentumoren fand sich in allen Proben von kleinzelligen Bronchialkarzinomen und deren Metastasen eine hohe Telomeraseaktivität, während in Proben von nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen der Nachweis der Telomeraseaktivität sowohl negativ als auch positiv ausfallen konnte (86). In der Mehrzahl von hepatozellulären Karzinomen (141), Nierenzellkarzinomen (124) und gynäkologischen Tumoren (105) wurde eine Telomeraseaktivität nachgewiesen.

1.2.6 Telomeraseaktivierung beim Neuroblastom

Die ersten Daten über Telomeraseaktivität in Neuroblastomen stammen von Hiyama et al. aus dem Jahr 1995. Mittels der TRAP-Methode untersuchten sie 79 unbehandelte Neuroblastome und konnten hierbei in 76 Fällen Telomeraseaktivität nachweisen, was einer Häufigkeit von 96% entspricht (83). Dabei konnte für Neuroblastome mit hoher Telomeraseaktivität ein Zusammenhang mit genetischen Veränderungen wie einer N-MYC Amplifikation und ungünstiger Prognose festgestellt werden, während bei Neuroblastomen mit geringer Telomeraseaktivität, keine genetischen Alterationen zu finden waren und diese mit einer günstigen Prognose einhergingen.

1997 erhöhten sie in einer zweiten Untersuchung die Gesamtzahl der getesteten

Tumoren auf 105 und konnten auch hier Telomeraseaktivität in 96% der Tumoren nachweisen und damit ihre Ergebnisse bestätigen. Lediglich in fünf Neuroblastomen konnte keine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden (81). Betrachtet man ihre Einteilung der positiven Telomeraseaktivität in eine hohe und eine niedrige Aktivität, so ergibt sich ein großer Anteil an Tumoren mit niedriger (78/105), gegenüber einem weitaus kleineren (23/105) Anteil mit hochpositiver Telomeraseaktivität. Beide Studien beschreiben einen Anteil von hochpositiven telomeraseexprimierenden Zellen von 20% bzw. 22%. Es besteht ein deutlicher Prognoseunterschied für die Patienten in der Gruppe mit einem hochpositiv telomeraseexprimierendem Neuroblastom, von denen 57%, gegenüber 2% aus der Gruppe derer mit einem niedrig telomeraseexprimierendem Tumor, versterben.

Eine dritte Studie von Hiyama et al. von 1999 befaßt sich mit der Messung der mRNA Expression von hTERT, der katalytischen Untereinheit der Telomerase. Untersucht wurden 35 Neuroblastome: 13 Tumore mit hoher Telomeraseaktivität wiesen gleichzeitig hTERT-Expression auf. Bei 22 Tumoren mit niedriger (n=20) oder fehlender (n=2) Telomeraseaktivität konnte nur in 5 Fällen hTERT-Expression festgestellt werden. Es zeigt sich in dieser Studie eine sehr strenge Korrelation zwischen den Tumoren mit Expression von hTERT und den hochpositiven telomeraseexprimierenden Neuroblastomen, während in der Gruppe der niedrigpositiven Tumoren keine Korrelation nachgewiesen werden konnte (82).

1.2.7 Telomeraseunabhängige Verlängerung der Telomere

Während 90% der Tumoren telomerasepositiv sind, stabilisieren / verlängern die restlichen 10% ihre Telomere auf andere Art und Weise. Es muss also von einem weiteren Mechanismus der Telomerverlängerung ausgegangen werden. Dieser weitere, telomerase-unabhängige Mechanismus wurde erstmalig 1995 von Reddel et al. beschrieben (22, 151) und als „ALT (alternative lengthening of telomeres) pathway“ oder „ASP-pathway“ (alternative senescence pathway) bezeichnet. Untersuchungen an immortalen Zellen ohne Telomeraseaktivität hatten untereinander ein sehr ähnliches und typisches Muster an TRFs (terminal restriction fragments) gezeigt. Mit einer TRF-Länge von ca. 20-25 kb unterscheiden sie sich deutlich von den telomerasepositiven Zellen, welche zwar stabile, aber kürzere TRFs aufweisen. ALT ist also ebenfalls in der

Lage, die Telomerlänge zu erhalten und unter bestimmten Umständen zu verlängern. Ferner konnte in Hefen nachgewiesen werden, dass blanke, d.h. telomer-freie, Chromosomenenden durch Rekombination über einen RAD52-induzierten Prozess zu zusätzlichen Telomer-Repeats gelangen können (194).

Untersuchungen zur Hypermethylierung der hTR und hTERT Promotoren zeigten eine hohe Methylierungsfrequenz in den untersuchten ALT Zelllinien (87). Diese Hypermethylierung kann den Verlust der Telomeraseaktivität nach sich ziehen oder der Verlust der Telomeraseaktivität führt sekundär zur Hypermethylierung der Promotoren. Weitere Arbeiten beschrieben in Interphasekernen von ALT Zelllinien, jedoch nicht in telomerasepositiven immortalen oder telomerasenegativen mortalen Zellen, sogenannte „promyelocytic leukemia bodies“ – PML-Körper, deren Funktion noch unbekannt ist. Die ALT-assoziierten PML-Körper enthielten ein PML-Protein, Telomer-DNA und telomerbindende Proteine wie TRF1 und TRF2 sowie Proteine, die bei der DNA-Synthese und Rekombination beteiligt sind (198). Kass-Eisler und Greider vermuteten, dass ähnlich wie in der Hefe alle TMM – „telomere maintenance mechanisms“ – zusammen auftreten, jedoch die Telomerase der dominierende Weg zur Erhaltung der Telomere ist. Unter bestimmten Umständen kommt es dann zur Selektion des einen oder anderen Mechanismus (92). Dem ALT Mechanismus scheint nach gegenwärtigem Stand der Forschung bei Säugetieren allerdings gegenüber der Telomerase eine weitaus geringere Bedeutung zuzukommen.

1.3 Neuroblastom und Tumorbilogie

1.3.1 Biologisches Verhalten

Hinsichtlich des Krankheitsverlaufs zeigen Neuroblastome bei einheitlichem histologischen Bild biologisch grundsätzlich unterschiedliche Verhaltensweisen. Rasche und unaufhaltsame Progression, Ausdifferenzierung zu reifen Ganglioneuromen oder die spontane Regression des Tumors sind bekannte Phänomene und haben dazu beigetragen, dass der klinische Verlauf oftmals als unvorhersehbar bezeichnet wurde (190). Diesem vielfältigen klinischen Verlaufsmuster liegen unterschiedliche molekularbiologische Veränderungen zu Grunde und gerade das Neuroblastom stellt ein Paradigma für genetische Veränderungen dar, die sich in unterschiedlichen klinischen Verläufen niederschlagen (14, 118).

Die Abbildung 1.3.1 zeigt die Ergebnisse zytogenetischer Untersuchungen der Arbeitsgruppe von R. Spitz, Kinderonkologie, Universität zu Köln. Mittels Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) wurden im Rahmen der Neuroblastomstudie NB90-97 440 Patienten auf Veränderungen der Marker MYCN, 1p und 11q untersucht. Die roten Bereiche geben den Anteil an Patienten des jeweiligen Stadiums mit einer Aberration in mindestens einer dieser drei Regionen an (142). Es kann gezeigt werden, dass eine Häufung molekularbiologischer Veränderung bei Patienten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium besteht.

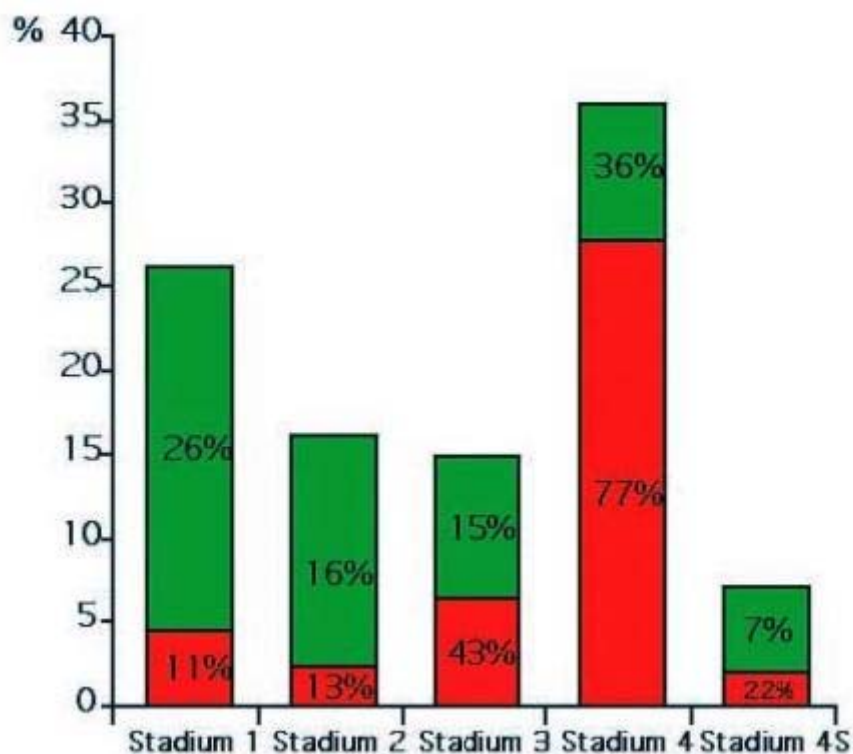


Abb.1.3.1: Stadienverteilung nach INNS (grün) sowie Anteil an Patienten des jeweiligen Stadiums mit genetischen Aberrationen (MYCN-Amplifikation, 1p-Deletion oder 11 q-Deletion) bei 440 Kindern mit Neuroblastom der Studien NB 90-97).(aus (142))

Auch wenn noch keine eindeutige Zuordnung von klinischem Verlauf und molekularer Veränderung getroffen werden kann, verdeutlicht dieser Zusammenhang die Notwendigkeit, genetische Veränderungen sowohl bei der Risikostratifizierung als auch bei der Einschätzung der Prognose zu berücksichtigen.

Im Folgenden sollen einige der bisher bekannten genetischen Veränderungen beim Neuroblastom sowie Veränderungen der Genexpression erläutert werden.

1.3.2 Aktivierung des Onkogen c-myc (MYCN-Amplifikation)

Die Amplifikation des MYCN-Onkogens ist die bisher am besten untersuchte genetische Abberation des Neuroblastoms und gilt seit seiner ersten Beschreibung 1983 (159) als spezifisch für das Neuroblastom. Die Amplifikation wird üblicherweise als mindestens fünffache Vervielfältigung des MYCN-Gens (142) definiert, ist mit einer sehr ungünstigen Prognose für die Patienten verbunden und wird heutzutage zur Risikostratifizierung eingesetzt (173).

1.3.3 Chromosom 1 p und 11q

Der Verlust der Heterozygotie (LOH = loss of heterozygosity) für den kurzen Arm von Chromosom 1 (1p) und den langen Arm von Chromosom 11 (11q) liegt beim Neuroblastom häufig vor (63, 115, 117, 172). Der Verlust der Heterozygotie für die Region des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p36) ist oft mit einer MYCN-Amplifikation assoziiert, wohingegen dies für die Region des langen Arms von Chromosom 11 (11q 23) nur selten beobachtet werden konnte (63, 116). Studien haben vorgeschlagen, dass es eine Assoziation zwischen dem Verlust der Heterozygotie des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p36) oder dem langen Arm von Chromosom 11 (11q23) und Merkmalen eines Hochrisikoprofils beim Neuroblastom gibt (23, 63, 115-117, 172).

1.3.4 Chromosomenverlängerung an 17 q

Die Chromosomenverlängerung am langen Arm von Chromosom 17 (17q) ist die häufigste genetische Veränderung beim Neuroblastom (108). Eine unbalancierte Translokation ist die häufigste Ursache für diese Chromosomenverlängerung. Diese geht mit genetischem Verlust eines Partnerchromosoms einher, wobei es sich in den meisten Fällen um Chromosom 1p handelt (15), und demnach die 1p-Deletion und 17q-Verlängerung in unmittelbarem Zusammenhang stehen. Eine unbalancierte, partielle Chromosomenverlängerung an 17q ist sowohl mit fortgeschrittenem Tumorstadium als auch 1p-Deletion und MYCN-Amplifizierung assoziiert (15), so dass sie einen wichtigen Prognosefaktor für Neuroblastompatienten darstellt. Tatsächlich findet sich kein Tumor mit MYCN-Amplifizierung ohne mit einhergehender 17q-Verlängerung, 1p-Deletion oder beiden Veränderungen. Vermutlich ist die MYCN-Amplifizierung ein

späteres Ereignis in der Abfolge genetischer Veränderungen beim Neuroblastom (15).

1.3.5 Neurotrophinrezeptor TrkA

Die Neurotrophinrezeptoren (TrkA, TrkB und TrkC) spielen in der physiologischen Entwicklung des sympathischen Nervensystems eine wichtige Rolle (119), indem sie Apoptose als auch Ausdifferenzierung unreifer sympathischer Nervenzellen vermitteln. Sie sind hinsichtlich der Prognose beim Neuroblastom zu erwähnen, da eine Veränderung der Expression von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (TRK), welche neurotrophische Faktoren aus der Familie des „nerve growth factors“ (NGF) binden, Einfluss auf die Prognose einer Neuroblastomerkkrankung zu haben scheint. Von Bedeutung sind dabei die TRK-Subtypen TRK-A, TRK-B und TRK-C (5). So korreliert eine hohe TrkA-Expression streng mit einer günstigen Prognose, bzw. ist eine fehlende TrkA-Expression in Neuroblastomen ohne MYCN-Amplifikation mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (44, 136).

1.4 Neuroblastom und Klinik

1.4.1 Epidemiologie

Das Neuroblastom ist eine maligne Erkrankung des sympathischen Nervensystems und im Kindesalter der häufigste extrakranielle solide Tumor (205). Nach den Leukämien stellt es die zweithäufigste maligne Erkrankung im Kindesalter dar. Die Inzidenz beträgt ca. 11/1.000.000 Kinder unter 15 Jahren (171) und nimmt mit ansteigendem Alter ab. Das mittlere Alter bei der Diagnosestellung beträgt 24 Monate, in 90% der Fälle wird die Diagnose in den ersten 5 Lebensjahren gestellt (123).

1.4.2 Pathologie

Beim Neuroblastom handelt es sich um einen malignen embryonalen Tumor, der aus Zellen der Neuralleiste entsteht. Die Neuralleiste ist Ursprungsort für Ganglien des sympathischen Nervensystems und des Nebennierenmarks, weshalb man das Neuroblastom entlang des Grenzstrangs (zervikal, thorakal, abdominal) und in der Nebenniere findet (168, 171).

1.4.3 Histopathologische Einteilung

Die histologische Einteilung ("Grading") des Neuroblastoms erfolgt nach Hughes in drei Malignitätsgrade. In 50 % liegt Grad 3 vor (168). Histologisch bestehen Neuroblastome aus unreifen Neuroblasten und –je nach Grad der Differenzierung – aus teilweise oder komplett ausgereiften Ganglienzellen und Schwann-Zellen.

MALIGNITÄTSGRAD	BEFUND
Grad 1	Mischbild aus undifferenzierten Zellen und reifen Ganglienzellen
Grad 2	Unreife Zellen und einige ausreifende Ganglienzellen
Grad 3	Undifferenzierte, „kleine, blaue Zellen“, manchmal Rosettenbildung

Tab 1.4.3: Histopathologische Einteilung nach Hughes

Die Neuroblasten ähneln lichtmikroskopisch den Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems und werden als „kleine, blaue, runde“ Zellen mit dichtem Kern und spärlichem Zytoplasma beschrieben. Beginnende Differenzierung zeigt sich in der Ausbildung von sog. Homer-Wright-Pseudorosetten sowie Bildung einer feinfibrillären Matrix und einzelner Ganglienzellen (1). Eine Abgrenzung von anderen klein-, rund- und blauzelligen Tumoren (Rhabdomyosarkom, Ewing-Sarkom, Non-Hodgkin Lymphom) kann dabei nur durch immunhistochemische Zusatzuntersuchungen erfolgen (10).

1.4.4 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Neuroblastoms erfolgt nach dem System INSS (International Neuroblastoma Staging System) in vier Stadien. Dabei fließt die Ausbreitung des Tumors zusammen mit der Resektabilität in die Internationale Stadieneinteilung des Neuroblastoms (International Neuroblastoma Staging System, INSS) ein, die in Deutschland seit 1990 angewendet wird. Es unterscheiden sich lokalisierte Tumoren im Stadium 1-3 von Tumoren im Stadium 4, welche durch eine Aussaat ins Knochenmark, Skelett, in entfernte Lymphknoten, in die Leber und die Haut und / oder andere Organe gekennzeichnet sind. Davon zu unterscheiden ist das Stadium 4 S, das bei Säuglingen

vorliegt, wenn zu einem lokalisierten Primärtumor Metastasen in Haut, Leber und/ oder Knochenmark hinzukommen (20).

International Neuroblastoma Staging System (Brodeur et al., 1993):

- Stadium 1: Lokalisierter Tumor mit makroskopisch kompletter Entfernung, mit oder ohne mikroskopischem Resttumor; repräsentative ipsi- und kontralaterale Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall. Am Tumor adhärenente, chirurgisch entfernte Lymphknoten dürfen positiv sein.
- Stadium 2a: Unilateraler Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung, repräsentative ipsi - oder kontralaterale (nicht am Tumor adhärenente) Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall.
- Stadium 2b: Unilateraler Tumor; regionale, ipsilaterale, nicht adhärenente Lymphknoten zeigen Tumorbefall, kontralaterale Lymphknoten sind histologisch negativ.
- Stadium 3: Nicht resektabler unilateraler Tumor mit Überschreiten der Mittellinie mit oder ohne Lymphknotenbefall.
Oder nicht resektabler Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration oder durch Lymphknotenbefall.
Das Überschreiten der Mittellinie ist definiert durch infiltratives Erreichen/Überschreiten der Wirbelkante der Gegenseite.
- Stadium 4: Disseminierung des Tumors ins Knochenmark, in die Knochen, in entfernte Lymphknoten, Leber, Haut und/oder andere Organe.
- Stadium 4s: Lokalisierter Primärtumor wie bei Stadium 1, 2a oder 2b und Disseminierung nur in Leber, Haut und/oder Knochenmark. Dieses Stadium findet man nur bei Säuglingen im ersten Lebensjahr. Die Infiltration des Knochenmarks ist gering.

1.4.5 Klinik

Das Beschwerdebild des Neuroblastoms wird durch den Ort des Primärtumors oder der Metastasen bestimmt. Primärtumoren finden sich überwiegend im Retroperitoneum

entlang dem sympathischen Grenzstrang und im Nebennierenbereich (64). Lokalisierte Primärtumoren können symptomlos bleiben oder aber auch zu schwerwiegenden Folgen wie Dyspnoe und Husten bei intrathorakalem Sitz, Harnabflussstörung sowie Abdominal- und Rückenschmerzen bei intraabdomineller oder retroperitonealer Lage führen. Eine sich rasch entwickelnde Querschnittssymptomatik droht bei durch die Foramina intervertebralia nach intraspinal vor wachsende Tumore, welche man auch als Sanduhrumoren bezeichnet. Die Abbildung 1.4.5 zeigt die Verteilung der Lokalisation von Primärtumoren beim Neuroblastom.

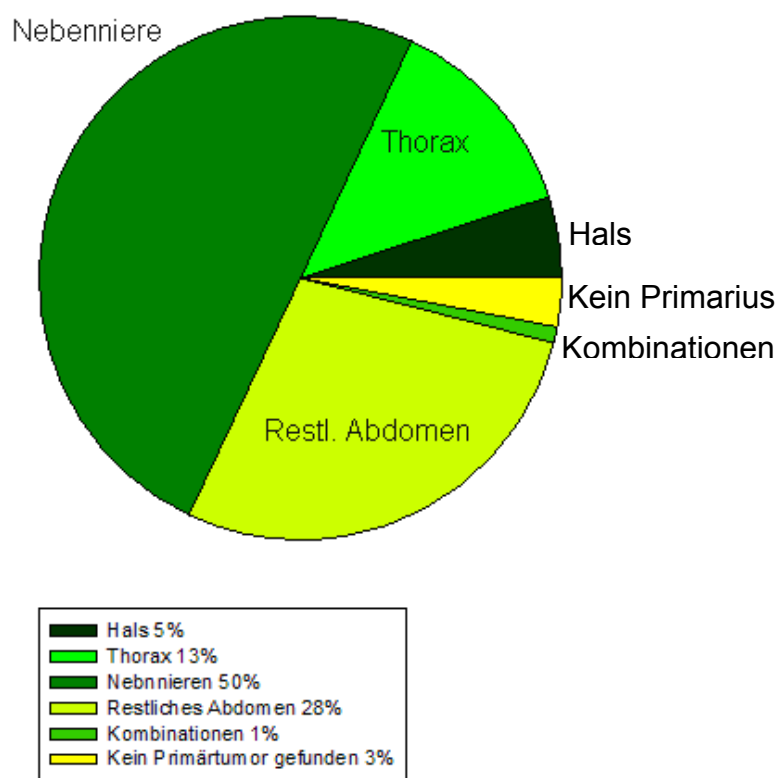


Abb.1.4.5: Lokalisation der Primärtumoren bei 779 Kindern mit Neuroblastom (aus Gutjahr, 1999 (64))

Eine Horner Symptomatik wird bei zervikalem Sitz durch Kompression des Ganglion stellatum verursacht während Brillenhämatome ein Hinweis auf ein retrobulbäres Neuroblastom sind. Metastasen verursachen Schmerzen, Blässe, Fieber, reduzierten Allgemeinzustand und Gewichtsabnahme. Symptome wie arterielle Hypertonie oder chronische Diarrhö können sich durch die hormonelle Aktivität des Tumors entwickeln (168, 171).

1.4.6 Diagnose

Neben der Sicherung der Diagnose muss das Ausmaß des Tumorbefalls bestimmt werden und eine Einschätzung der biologischen Eigenschaften des Tumors erfolgen. Bei Verdacht auf ein Neuroblastom erfolgt nach Anamnese und körperlicher Untersuchung eine Reihe diagnostischer Untersuchungen, die sowohl Laboruntersuchungen und bildgebende Verfahren als auch Knochenmarkuntersuchung und Gewebebiopsie umfassen.

Bezüglich der Laboruntersuchungen können beim Neuroblastom die Tumormarker Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure (Abbauprodukte der Katecholamin) in Serum und Urin sowie die neuronenspezifische Enolase (NSE) und LDH im Serum nachgewiesen werden. Finden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erhöhte Werte können diese zur Beurteilung des Therapieerfolges und zur Kontrolle des Krankheitsverlaufs herangezogen werden. Eine Urinuntersuchung auf die Katecholaminmetaboliten in Urin oder Serum fällt bei über 90% der Patienten mit Neuroblastom positiv aus (64).

Die Diagnose erfolgt in den Frühstadien meist zufällig mittels Ultraschall, Computertomografie oder Magnetresonanztomografie, die aus anderen Anlässen angefertigt wurden. In der Folge führen miBG-Szintigraphie (123 Jod-Metajodbenzylguanidin) zur Lokalisierung des Primärtumors und der eventuell schon vorhandenen Metastasen. Die Skelett-Szintigraphie mittels Technetium wird zur Unterscheidung zwischen Knochenmarks- und Knochenmetastasen herangezogen (1). Eine Knochenmarkspunktion muss manchmal zum Ausschluss von Knochenmarkmetastasen durchgeführt werden, da ein sehr geringer Befall alleine durch miBG-Szintigraphie nicht ausgeschlossen werden kann.

Die endgültige Diagnosesicherung ist durch eine histologische Untersuchung von Tumorgewebe möglich. Die Entnahme von Tumormaterial zur Untersuchung erfolgt in der Regel mit der Operation (168, 171).

Heutzutage werden üblicherweise auch molekulargenetische Untersuchungen (MYCN Amplifizierung und 1p Deletion) am Tumorgewebe durchgeführt, um eine risikoorientierte Einstufung in ein therapeutisches Konzept durchführen zu können (123). Die molekulargenetischen Besonderheiten des Neuroblastoms sind bereits im Kapitel 1.3 dargelegt worden, im Folgenden soll ihr Einfluss auf die Therapieplanung

sowie Prognose erläutert werden.

1.4.7 Therapie

Die Therapie des Neuroblastoms ist stadien- und altersabhängig.

Im Stadium 4 S ist eine individuelle Therapie notwendig. Bei Säuglingen mit lokoregionärem Befall wird bei fehlendem Nachweis von biologischen Hochrisikomerkmale meist auf eine weitergehende chirurgische Therapie und auf eine Chemotherapie verzichtet.

Bei älteren Kindern unterscheidet man Standard- und Hochrisikopatienten. Ein disseminierter Befall und/oder das Vorhandensein von biologischen Hochrisikoparametern sind Merkmale für eine Hochrisikokonstellation. Hochrisikopatienten erhalten eine sehr intensive Chemotherapie (Ifosfamid, Cisplatin, Adriamycin, Vincristin, Dacarbazin, Etoposid) unter Einschluss einer Hochdosistherapie.

Die in dieser Arbeit getesteten Chemotherapeutika Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin und Ifosfamid greifen alle in die DNA-Synthese ein und sollen an dieser Stelle kurz beschrieben werden

1.4.8 Topoisomerase-Hemmstoffe

Wichtige Voraussetzung für die Verpackung der DNA im Zellkern ist ihre Verdrillung. Für die Neusynthese der DNA im Rahmen der Zellteilung existieren sogenannte Topoisomerasen, Enzyme, welche DNA Stänge vorübergehend unterbrechen können, um sie nach erfolgreicher Replikation wieder zusammenzufügen. Sie können als reversible Nukleasen angesehen werden, die kovalent an eine Phosphatgruppe der DNA binden, die Esterbindung spalten und anschließend wieder verknüpfen.

Man unterscheidet zwei Formen: Topoisomerase I spaltet lediglich einen Strang der doppelsträngigen DNA und erlaubt damit eine freie Rotation des Gegenstranges um eine Phosphodiesterbindung, eine Voraussetzung für die Replikation. Topoisomerase II bindet kovalent an beide DNA-Stränge, spaltet sie temporär und ermöglicht dadurch die Rotation. Anschließend wird die Bruchstelle verschlossen und das Enzym dissoziiert von der DNA.

Etoposid ist ein Hemmstoff der Topoisomerase II und entfaltet somit seine Wirkung

über eine Hemmung der DNA-Replikation. Die Hemmung von Topoisomerase II durch Etoposid und insbesondere die Blockade der Dissoziation von der DNA führt dazu, dass der stabilisierte Komplex aus Topoisomerase und DNA zu einer Zunahme von DNA Doppelstrangbrüchen und Hemmung der DNA Reparatur führt und deswegen die Zelle verstirbt (134).

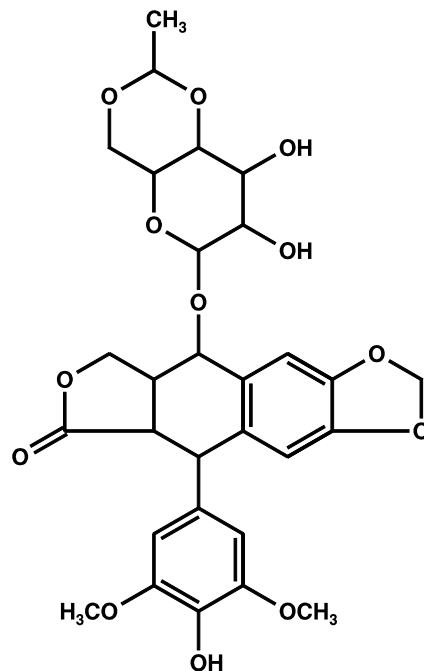


Abb.1.4.8: Strukturformal von Etoposid

Die Abbildung 1.4.8 zeigt die Strukturformel von Etoposid, das ein halbsynthetisches Derivat des Podophyllotoxins (Podophyllotoxin ist ein Mitosehemmstoff) ist.

Als Indikation für die Anwendung von Etoposid gelten folgende Malignome: kleinzellige Bronchialkarzinome, palliative Therapie des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms bei Patienten in gutem Allgemeinzustand, Morbus Hodgkin nach Versagen von Standardtherapie, Non-Hodgkin-Lymphome von intermediärem und hohem Malignitätsgrad, Remissionsinduktion bei akuter myeloischer Leukämie im Kindesalter, Reinduktionstherapie nach Versagen von Standardtherapie bei akuter myeloischer Leukämie im Erwachsenenalter, Hodentumoren, Chorionkarzinom der Frau mit mittlerem und hohem Risiko nach Prognoseschema der WHO sowie als Monotherapie zur palliativen systemischen Behandlung fortgeschrittener Ovarialkarzinome nach Versagen von platin-haltigen Standardtherapien.

An unerwünschten Nebenwirkungen sind neben Hypotension insbesondere eine Myelosuppression sowie das Begünstigen einer Entwicklung von Zweitumoren und Zweitleukämien zu erwähnen.

1.4.9 Alkylierende Zytostatika

Unter dem Begriff Alkylantien werden reaktionsfähige, meist bifunktionelle Zytostatika zusammengefasst, deren phasenunspezifische Wirkung vor allem auf der Alkylierung von Nukleinsäuren beruht. Nach Aktivierung zu Carbokationen reagieren diese Stoffe außer mit Proteinen unter anderem mit Guanin der Desoxyribonukleinsäuren und führen zu multiplen DNA - Veränderungen wie zum Beispiel der Vernetzung von DNA-Strängen (Cross-link-Bildung), abnormer Basenpaarung und Spaltung von DNA – Ketten. Dadurch wird die Nukleinsäure – Reduplikation und damit die Zellteilung beeinträchtigt. Zur Substanzgruppe der Alkylantien gehören Ifosfamid sowie Cisplatin.

Ifosfamid ist ein Cyclophosphamid – Isomer, dessen Bioaktivierung analog zu der von Cyclophosphamid ist, welche im im Folgenden beschrieben wird: Cyclophosphamid ist in vitro ein nahezu unwirksames Prodrug und wird im Organismus in die eigentliche Wirkform umgewandelt. In der Leber erfolgt mittels CYP2B6 die Hydroxylierung zu 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, das mit der ringoffenen Form, dem Aldophosphamid, im Gleichgewicht steht. Aus diesem entsteht nichtenzymatisch unter Abspaltung von Acrolein die am stärksten alkylierende Verbindung, das N, N-Bis (2-chlorethyl)-phosphorsäurediamid. Weitere Metaboliten sind 4-Oxo-Cyclophosphamid und Carboxyphosphamid, von denen nur Carboxyphosphamid noch eine geringe zytotoxische Aktivität besitzt. Die Bioaktivierung geht mit einer Autoinduktion von CYP2B6 einher, d.h. nach mehrfacher Gabe von Cyclophosphamid wird ein höherer Anteil der Dosis in die Wirkform überführt.

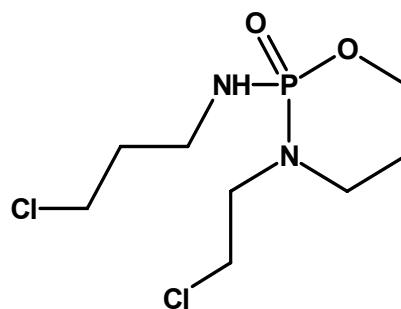


Abb.1.4.9.a: Strukturformel von Ifosfamid

Die Abbildung 1.4.9.a zeigt die Strukturformel von Ifosfamid.

An unerwünschten Nebenwirkungen tritt bei Ifosfamid im Vergleich zu Cyclophosphamid häufiger ZNS – Toxizität (Somnolenz, Konfusion, Halluzination, Krampfanfälle) auf, welche auf eine vermehrte Seitenkettenoxidation (CYP3A4-abhängige Bildung von Chloracetaldehyd) zurückgeführt wird.

Als Indikation gelten das Mamma-, Ovarial-, Lungen- und Hodenkarzinom sowie das Hypernephrom.

Cisplatin gehört zu den Platinderivaten, welche im weiteren Sinne ebenfalls zu den Alkylantien gerechnet werden. Es handelt sich bei Cisplatin um einen planaren cis-Diamin-Komplex mit zweiwertigem Platin als Zentralatom und zwei Chloridionen, die als Anionen dienen. Die eigentliche Wirkform der Platinverbindungen ist der elektrophile Aquakomplex, der vor allem intrazellulär entsteht. Er bewirkt –weitgehend phasenunspezifisch- Vernetzungen von DNA – Strängen, wobei bevorzugt Einzelstränge vernetzt werden, und hemmt auf diese Weise die Zellteilung.

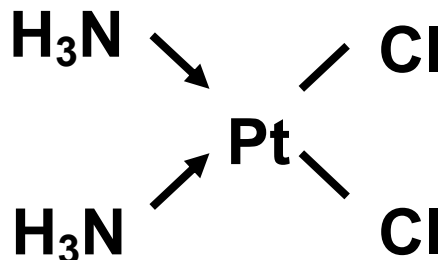


Abb.1.4.9.b: Strukturformel von Cisplatin

Die Abbildung 1.4.9.b zeigt die Strukturformel für Cisplatin.

Cisplatin ist indiziert bei Mono- bzw. Kombinationschemotherapien von Hodentumoren in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium und der jeweiligen Therapiesituation, beim Ovarial-, Zervix-, Endometrium-, Harnblasen-, Ösophagus-, bei klein- und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen und Karzinomen im Kopf- und Halsbereich sowie Osteosarkomen.

An unerwünschten Nebenwirkungen steht bei Cisplatin neben der Ototoxizität und starkem Erbrechen vor allem die schwere Nierenschädigung mit zum Teil irreversiblen Nierenversagen im Vordergrund.

1.4.10 Anthracyclin-Antibiotika

Doxorubicin gehört zur Gruppe der Anthracycline, deren zytotoxische Wirkung in der S-Phase am stärksten ausgeprägt ist. Die Zytotoxizität beruht auf folgenden Wirkmechanismen:

- Hemmung der Topoisomerase II: Induktion von Strangbrüchen
- Interkalation in die DNA: Hemmung der Nukleinsäuresynthese und Induktion von Strangbrüchen
- Interkalation mit RNA Polymerasen
- Bildung von Sauerstoffradikalen: Induktion von Doppelstrangbrüchen

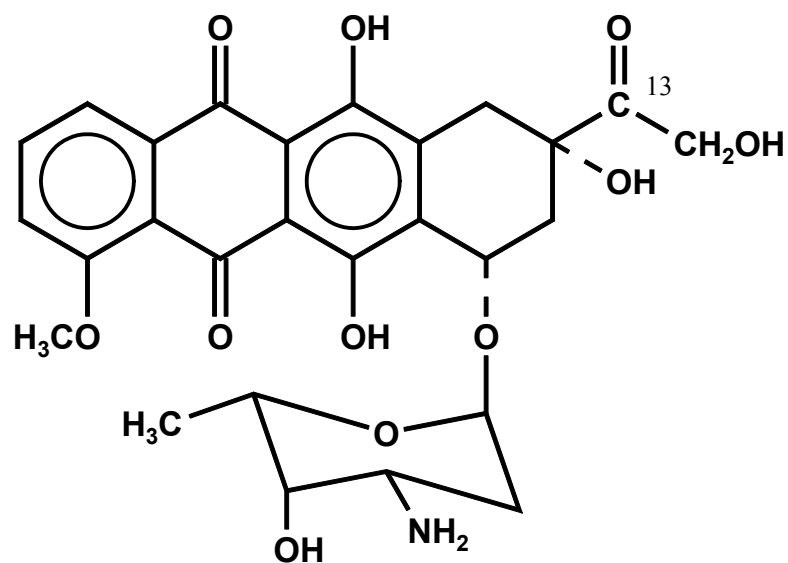


Abb.1.4.10: Strukturformel von Doxorubicin

Der Einsatz von Anthracyclinen wird allerdings durch die Kardiotoxizität eingeschränkt, die vermutlich im Wesentlichen auf der Bildung von Radikalen beruht. Sie korreliert mit der applizierten Gesamtdosis und ist häufig irreversibel.

Typische Indikationen sind das kleinzellige Bronchialkarzinom, das Mammakarzinom, das fortgeschrittene Ovarialkarzinom, der Einsatz zur intravesikalen Rezidivprophylaxe bei oberflächlichen Harnblasenkarzinomen sowie die systemische Behandlung lokal

fortgeschrittener oder metastasierter Harnblasenkarzinome, die neoadjuvante und adjuvante Therapie des Osteosarkoms, fortgeschrittene Weichteilsarkome des Erwachsenen, Ewing-Sarkome, das Frühstadium sowie fortgeschrittenes Non-Hodgkin-Lymphom, hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome, Remissionsinduktion bei akuter lymphatischer oder myeloischer Leukämie, fortgeschrittenes Multiples Myelom, fortgeschrittenes rezidiviertes Endometriumkarzinom, Wilms-Tumor, fortgeschrittenes papilläres/follikuläres Schilddrüsenkarzinom, anaplastisches Schilddrüsenkarzinom, fortgeschrittenes Neuroblastom und fortgeschrittenes Magenkarzinom.

Abschließend läßt sich sagen, dass Topoisomerasehemmstoffe zusammen mit Alkylantien synergistisch wirken und daher bei vielen Tumorerkrankungen in Kombination verwendet werden (134).

1.4.11 Prognose

Die Risikoeinteilung bis Anfang der 90er Jahre basierte noch allein auf klinischen Parametern und erfolgte im Studienprotokoll NB90 der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) aufgrund des Stadiums, der Resektabilität, des Alters des Patienten, des histologischen Gradings und der Bestimmung der LDH.

Brodeur et al. beschrieb 1997 Alter, Stadium, MYCN-Status und Deletion 1p als prognostisch wichtige Faktoren beim Neuroblastom (19).

INNS	1, 2, 4S	3,4	3,4
Alter des Patienten	< 1 Jahr	> 1 Jahr	1-5 Jahre
MYCN-Amplifizierung	keine	keine	ja
1p Deletion	< 5%	25-50%	80-90%

Tab.1.4.11.a: Prognostische Faktoren beim Neuroblastom (modifiziert nach (19))

Die zunehmende Bedeutung zytogenetischer Faktoren für die Prognose wird durch das Studienprotokoll der GPOH (NB 2004) unterstrichen. Dort werden erstmalig neben dem MYCN-Status, der seit 1995 in Deutschland als therapiestratifizierender Marker für

Säuglinge (NB95-S) eingeführt und kurz darauf auch für Kindern >1 Jahr übernommen (NB97) wurde, 1p Aberrationen als relevanter Risikomarker etabliert. Dieser qualifiziert im Stadium 2 oder 3 bei fehlender MYCN-Amplifikation unabhängig vom Alter für die mittlere Risikogruppe.

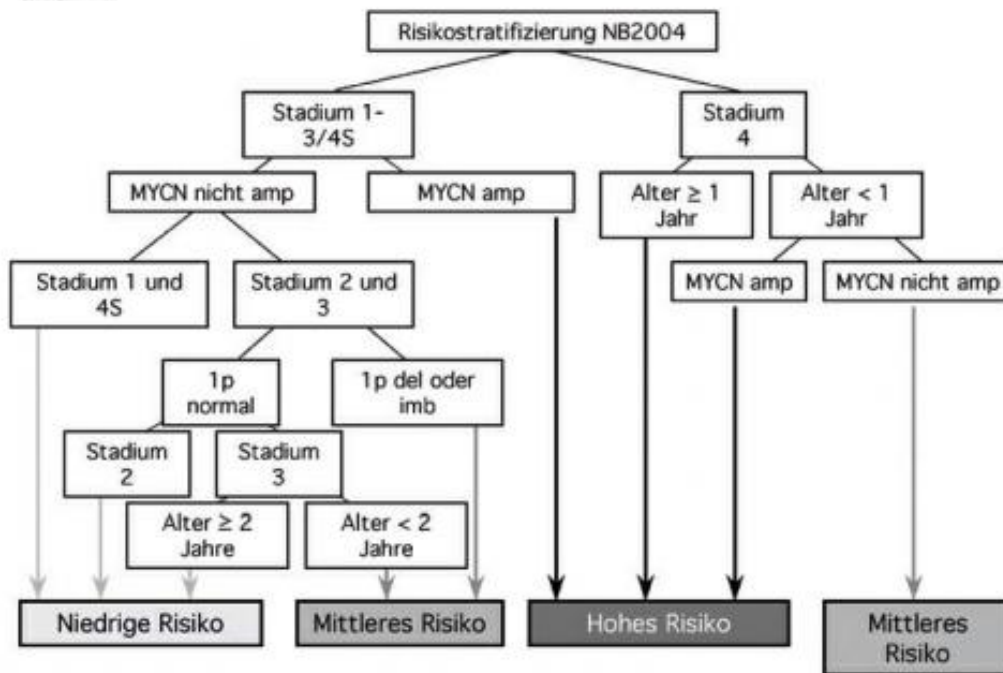


Abb.1.4.11.b: Übersicht der Risikostratifizierung der aktuellen Neuroblastomstudie NB 2004 der GPOH (aus (142))

Die für die Risikoabschätzung und Prognose der Erkrankung heute maßgeblichen vier Faktoren sind gegenwärtig Alter, Stadium, MYCN-Status und Deletion 1p (142). Das Neuroblastom ist somit ein Tumor, bei dem molekularbiologische Veränderungen als wichtige Prädiktoren für biologisches Veralten dienen und sich daraus sogar unmittelbare Auswirkungen auf klinisch-therapeutisches Verhalten ergeben. Somit ist die Überlegung Telomerase als mögliches Target gerade bei der Therapie des Neuroblastoms näher zu fokussieren und zukünftig womöglich sogar als prognostischen Marker zu berücksichtigen, durchaus gerechtfertigt.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Durch den Nachweis der Telomerase in ca. 90% aller Tumorzellen, stellt die Hemmung

dieses Enzyms einen möglichen Ansatzpunkt für ein neues Prinzip in der Tumorthherapie dar. Die Inhibition des Enzyms Telomerase könnte in Kombination mit konventioneller Therapie und innovativen Ansätzen wie Immuntherapie, Antiangiogenese oder Differenzierungsinduktion als ergänzende Therapieoption beim Neuroblastom Bedeutung gewinnen. Für diesen Ansatz spricht vor allem die häufige Resistenz fortgeschrittener Stadien gegenüber herkömmlicher Therapiestrategien bei gleichzeitiger Präsenz einer hohen Telomeraseaktivität (135).

Telomerasehemmung kann durch Gentransfer oder den Einsatz von Telomeraseinhibitoren erzielt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Telomeraseinhibition mittels retroviralen Gentransfers einer dominant-negativen Mutante von hTERT (DN-hTERT) ermöglicht. Um Folgeaktionen einer Telomeraseüberexpression studieren zu können, wurden Neuroblastomzellen mit WT-hTERT-Konstrukten gentransfiziert. Der Einsatz verschiedener Zelllinien mit unterschiedlichen Telomeraseexpressionsmustern und Chromosomenlängen soll der Heterogenität des Tumors gerecht werden. Die Zelllinie SKNSH ist eine telomerasepositive Zelllinie mit kurzen Telomeren im Bereich von 4 kb und 6 kb und erlaubt, die Wirkungen des Gentransfers von DN-hTERT in Abhängigkeit zur initialen Telomerlänge zu interpretieren. Die spezifische Wirkung von WT-hTERT soll anhand der telomerasenegativen Tumorzelllinie CHLA-90, welche sich durch lange Telomersequenzen (14 kb) auszeichnet, analysiert werden. Folgende Fragen gilt es im Rahmen dieser Arbeit zu erörtern.

- 1) Hat Telomeraseaktivität einen Einfluss auf die Zytotoxizität von unterschiedlichen Chemotherapeutika, die zur Behandlung des Neuroblastoms eingesetzt werden?
- 2) Unterscheiden sich die Effekte einer Telomerasehemmung hinsichtlich Zytostatikatoxizität bzw. proliferationshemmender Wirkung zwischen Telomerasepositiven Zellen und Zellen, die ihre Telomere über den ALT-Mechanismus verlängern (Telomerasenegativ)?
- 3) Wie verändert sich die Länge der Telomere in hTERT positiven Tumorzellen (WT-hTERT-Konstrukt) im Vergleich zu Tumorzellen, in denen die hTERT Expression durch Gentransfer eines DN-hTERT-Konstruktes ausgeschaltet ist?

4) Stellt die Hemmung von Telomerase-Aktivität eine mögliche Ergänzung der bisher bestehenden Chemotherapie beim Neuroblastom im Sinne einer Kombinationstherapie dar?

Zusammenfassend ist das Ziel der Arbeit die präklinische Evaluation eines möglichen therapeutischen Konzeptes beim Neuroblastom, welches Telomerasehemmung und Chemotherapie miteinander vereint. Hierbei sollen die Zusammenhänge zwischen Zytostatikatoxizität, Telomeraseaktivität und Telomerenlänge untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Mutterzelllinien und Vektortransfektion

Ausgangszelllinien für diese Arbeit waren die Neuroblastom Zelllinien SK-N-SH und CHLA-90. Es handelt sich ausschließlich um adhärenz wachsende Zellen. Die SK-N-SH-Zelllinie besitzt endogene Telomeraseaktivität, während die Zelllinie CHLA-90 als telomerasenegative Zelllinie, keine endogene hTERT - Expression aufweist.

Die Ausgangszelllinien sowie die Vektor - transfizierten Zellen für diese Arbeit wurden mit freundlicher Unterstützung durch die Universität Düsseldorf bereitgestellt. In Abbildung 2.1.1 soll der Vektor lediglich graphisch dargestellt werden und an dieser Stelle für ausführliche Informationen und Details bezüglich der Vektorklonierung auf die Dissertation von Yvonne Braun verwiesen werden (16).

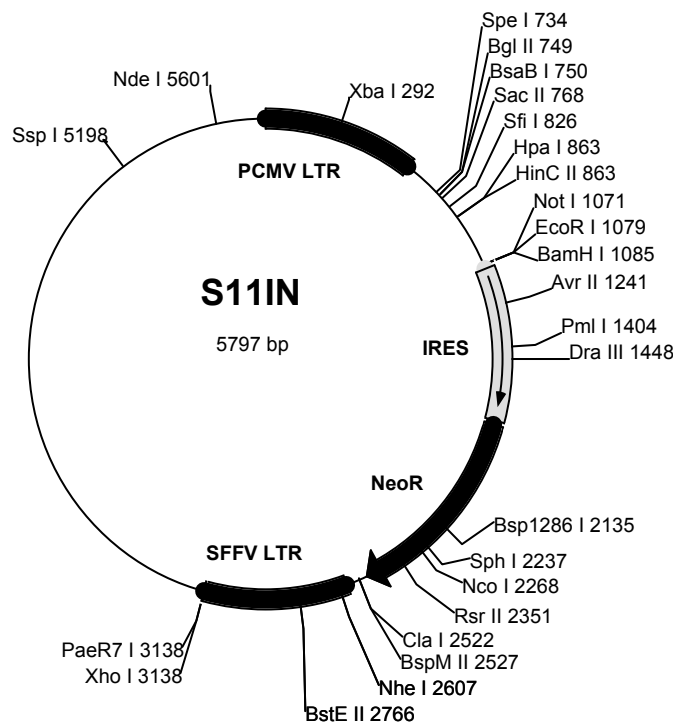


Abb.2.1.1: hTERT Vektor

N.J., U.S.A

- Zentrifugierröhrchen: Bibby Sterilin, Staffordshire, UK
- Kryoröhrchen: NUNC, Wiesbaden Deutschland
- Akkupipetter: pipetus-akku Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
- Zellkulturbank: Lamin Air HB 2472 Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
- Zellkulturbrutschrank: Sanyo Industries, Deutschland
Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf,
Deutschland
- Zentrifuge: Megafuge 1,0 R Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
- Mikroskop: Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Deutschland
- ELISA Reader: Multiskan Ascent Thermo Labsystems, Helsinki, Finnland
- Rüttler: Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH, Hechingen, Deutschland
- Einfriermedium: 2 ml RPMI
2 ml FCS
1 ml DMSO

Die Zellkultur erfolgte in unbeschichteten Kulturflaschen. Alle Zelllinien wurden in Suspensionskultur gehalten. Die Kultur erfolgte in Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂-Partialdruck in einem wasserdampfgesättigten Inkubator. Jedes Zellkulturmedium war mit 10% FCS versetzt. Den Vektortransfizierten Zelllinien wurde das Antibiotikum Genecitin (in jeder Zellkulturflasche 1 ml Genecitin) zugesetzt.

2.1.3 Passagieren der Zellen

Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen für 3 Minuten in Trypsin inkubiert. Die trypsinierten Zellen wurden in Nährmedium aufgenommen und je nach gewünschter Dichte auf neue Zellkulturgefäße verteilt.

2.1.4 Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden die bei 37°C mit PBS-EDTA Lösung (je 5 ml) abgelösten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach fünf-minütiger Zentrifugation bei einer Geschwindigkeit von 1200 Upm bei 21°C setzte sich ein Zell-Pellet ab. Nach Abnahme des Überstandes und einer weiteren drei - minütigen

Zentrifugation bei 21°C mit einer Geschwindigkeit von 2000 Upm wurde das Zellpellet in 500µl Kulturmedium aufgenommen. Nach Zugabe von 500 µl Einfriermedium wurde das Einfrierröhrchen rasch in einem Einfrierbehälter bei -80°C über Nacht eingefroren und anschließend für eine längerfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.1.5 Auftauen der Zellen

Das gefrorene Kryoröhrchen wurde im Wasserbad bei 37°C für 3 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde die aufgetaute Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen, welches mit 5 ml RPMI – 1640 Medium und 10% FCS vorgelegt war, überführt. Nach 5 -minütiger Zentrifugation bei 1200 Upm und 20°C wurde nach Abnahme des Überstandes das Zell-Pellet in Kulturmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt. Bei 37°C und einem CO² - Gehalt von 5 % wurden die Zellen in T25 Zellkulturflaschen kultiviert.

2.1.6 MTT-Test

Der MTT-Test stellt einen in-vitro Zytotoxizitätstest dar und dient der Bestimmung der Anzahl stoffwechselaktiver Zellen nach Zytostatikabehandlung. Die Bestimmung erfolgt photometrisch und wird im folgenden Versuchsaufbau erklärt.

Um sicher zu stellen, dass ausreichend stoffwechselaktive Zellen im Ansatz vorhanden waren, wurde für jede Versuchsreihe die Zellzahl pro Vertiefung festgelegt. Diese betrug stets 5.000 Zellen für SK-N-SH pro Vertiefung und 10.000 Zellen für CHLA-90 pro Vertiefung. Die Berechnung der für den jeweiligen Versuch benötigten Zellzahl des insgesamt benötigten Volumens sowie des nötigen Volumens an Zellsuspension erfolgte nach der Standardarbeitsanweisung „SOP-MTT.doc“ der Arbeitsgruppe „Klinische Pharmakologie“ von Prof. J. Boos Version 1-2001.

Die Zelllinien wurden auf unbeschichteten 96 Loch-Platten ausplattiert, wobei auf jeder Platte pro Zelllinie je vier Kontrollvertiefungen zur Verfügung standen. Jede Vertiefung der Platten wurde mit 100µl Zellsuspension belegt. Um eine ausreichende Adhäsion der Zellen zu ermöglichen, wurde die Prüfsubstanz (100 µl pro Vertiefung) jeweils erst 72 Stunden nach Aussiedlung der Zellen zugesetzt. Die Herstellung der Verdünnungsreihen der Zytostatika erfolgte ebenfalls nach obig genanntem Protokoll. Es wurde die Zytotoxizität von Doxorubicin, Ifosfamid, Etoposid und Cisplatin getestet. Die Loch-Platten wurden dann bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre, welche

5% CO² enthielt, inkubiert. Nach 72 h Inkubation sowie 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Substanzzugabe wurde zu den jeweiligen Messzeitpunkten in jede Vertiefung einer Platte 10 µl MTT-Lösung pipettiert. Anschließend wurden die Platten für weitere drei Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurde das MTT in die Zellen aufgenommen, dort in den Mitochondrien zum violetten Formazan umgesetzt, welches in den Zellen auskristallisiert. Der Überstand wurde nach drei Stunden mit einer sterilen Pasteurpipette mittels Unterdruck aus den Vertiefungen abgesaugt und anschließend in jede Vertiefung 100 µl Lyse-Reagenz pipettiert. Zur Auflösung der Zellmembranen und der Formazankristalle wurden die Platten auf einem Rüttler vorsichtig geschüttelt. Nach vollständiger Lösung der Formazankristalle wurde die Extinktion der Farbstofflösungen auf den Platten photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt. Die gemessene optische Dichte korreliert mit der Menge an gebildetem Formazan, welches wiederum direkt mit der Anzahl an stoffwechselaktiven Zellen korreliert.

2.2 Southern Blot: Telomerenlängen-Blot

Die Telomerenlänge wurde durch die Southern-Blot-Analyse der terminalen Restriktionsfragmente (TRF) mit Hilfe des TeloTAGG Telomerenlängen Untersuchungs-Kits (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) analysiert. Das Prinzip beruht auf der Fragmentierung genomischer DNA durch Restriktionsenzyme. Diese bestehen aus DNA, haben jedoch innerhalb der telomerischen und subtelomerischen Regionen keine Zielsequenzen, sodass diese Bereiche intakt bleiben und als Restriktionsfragmente identifiziert werden können. Mittels eines optimierten Mix aus ständig schneidenden Restriktionsenzymen wird so ausschließlich nicht - telomerische DNA zu niedermolekularen Fragmenten verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung werden die nun entstandenen DNA Fragmente (TRF) durch Southern-Blotting auf eine Nylon Membran transferiert. Die Bestimmung der durchschnittlichen Länge des terminalen Restriktionsfragmentes kann durch Vergleichen der Signale mit einem molekularen DNA Längenstandard erfolgen.

2.2.1 DNA Isolierung

a) Material/ Geräte

- Zellmaterial

- Lyse-Puffer: Dimethylformamid: Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- RNase A, GenScript Corporation, U.S.A
- Isopropanol 100 %: Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ethanol 70 %: Roth, Karlsruhe, Deutschland
- 1,5 ml Röhrchen: Saarestedt, Nümbrecht, Deutschland
- Brutschrank: Biotron Labortechnik GmbH, Hilden, Deutschland
- Zentrifuge: Megafuge 3,0 R Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
- Puregene DNA IsolierungsKit: Genra Systems, Mineapolis, U.S.A
- Photometer: Eppendorf Bio Photometer, Hamburg, Deutschland

b) Durchführung

Die DNA-Isolation erfolgte analog dem Protokoll des Puregene DNA Isolierungs Kit. Die gewonnenen Zell-Pellets wurden in 1,5 ml Röhrchen je mit 600 µl Lysepuffer lysiert und das Material homogenisiert. Anschließend wurde jede Probe mit 3µl RNase A-Lösung für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von je 200 µl Protein Präzipitationslösung zu jedem Zelllysat wurden die Proben für 20 Sekunden gevortext bis die Protein Precipitation Solution gut mit dem Zelllysat vermischt war. Nachfolgend wurde das Zelllysat bei Raumtemperatur für drei Minuten bei 13000-16000 g zentrifugiert und die ausgefällten Proteine als Zellpellet am Boden des 1,5 ml Röhrchens sichtbar. Der DNA - haltige Überstand wurde in ein sauberes 1,5 ml Röhrchen, in welchem 600 µl 100% Isopropanol vorgelegt waren, überführt und nach mehrmaligem Schwenken als weißer DNA-Faden sichtbar. Nach einminütiger Zentrifugation, unter sonst gleichen Bedingungen, wurde nach Abnahme des Überstandes das DNA-Pellet einmal mit 600 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde nach 15-minütiger Trocknung bei Raumtemperatur in DNA-Hydratation-Lösung (TE-Puffer) aufgenommen, so dass sich die DNA über Nacht bei Raumtemperatur lösen konnte. Anschliessend erfolgte die Lagerung der isolierten DNA bei 2-8°C.

2.2.2 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau mit den Enzymen Hinf 1 und Rsa 1 liefert die Grundlage für den telomerischen Southern Blot. Die beiden Restriktionsendonukleasen schneiden die genomische DNA in eine Vielzahl kleiner Fragmente, besitzen jedoch keine Zielsequenzen innerhalb der Telomeren und der subtelomerischen Regionen. Diese bleiben intakt und können als Restriktionsfragmente TRF identifiziert werden.

a) Material/ Geräte

- Telo TAGGG Telomere Length Assay: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany
- DNA-Proben
- Restriktionsenzyme: Hinf 1 (20 U/ μ l):Telo TAGGG-Kit
Rsa 1 (20 U/ μ l): Telo TAGGG Kit
- 10 x digestion buffer: Telo TAGGG Kit
- Ladepuffer: 1 x TAE Puffer:
0,04 M Tris: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
0,001 M EDTA: Sigma, Deisenhofen, Deutschland
(pH 8,0)
- 1,5 ml Rörchen: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Brutschrank: Biotron Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland

b) Durchführung

Die DNA-Proben wurden vor der weiteren Analyse mit den Restriktionsenzymen Hinf 1 und Rsa 1 verdaut. Jede Probe enthielt 2 μ g DNA und umfaßte ein Endvolumen von 17 μ l. Die Kontrollproben DNA high und DNA low setzten sich aus 10 μ l (=1 μ g) Kontroll DNA und 7 μ l Nuklease – freiem Wasser zusammen.

Folgender Ansatz wurde jeweils zur Probe DNA als auch zur Kontroll DNA gegeben, so dass sich ein Endvolumen von 20 μ l ergab:

Hinf 1 (20 U/ μ l)	0,5 μ l
Rsa1 (20 U/ μ l)	0,5 μ l
Digestion buffer	2 μ l
Total	3 μ l

Nach mehrmaligem Resuspendieren wurde die DNA für zwei Stunden bei 37°C verdaut. Das Verdauen der genomischen DNA wurde mit 4 μ l des Ladepuffers gestoppt.

2.2.3 DNA-Gel

Die DNA-Fragmente wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und können im folgenden Schritt vom Gel auf die Transfermembran geblottet werden.

a) Material/ Geräte

- 0,8 % Agarosegel
- Fragmentierte DNA Proben
- DIG-Längenmarker: Telo TAGGG-Kit
- 5 x Ladepuffer: Telo TAGGG-Kit
- 1 x TAE-Puffer: 0,04 M Tris + 0,001 M EDTA, pH 8,0
- Elektrophoresekammer: peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

b) Durchführung

Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurde zu jeder DNA Probe 2 μ l Bromophenol-Blau gegeben und mehrmals resuspendiert. Der molekulare DIG Längenmarker setzte sich aus folgendem Mix zusammen:

Molekularer DIG Längenmarker	4 μ l
Nukleasefreies Wasser	12 μ l
5 x Ladepuffer	4 μ l

Nach dem Auftragen von jeweils 20 μ l DNA-Probe und 20 μ l Längenstandard wurden

die chromosomalen DNA-Fragmente und die TRF nach ihrem Molekulargewicht auf einem 0,8 %-igen Agarose Gel bei 5 V/cm für 3 Stunden bei Raumtemperatur elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE Puffer verwendet.

2.2.4 Transfer

Nach 10-minütiger Depurination sowie darauf folgender Denaturierung für 2 x 15 Minuten und nachfolgender Neutralisation der DNA für 2 x 15 Minuten, erfolgte der Transfer mittels Unterdruckverfahren auf die positiv markierte Nylon Membran.

a) Material/ Geräte

- 0,8 % Agarosegel mit elektrophoretisch aufgetrennter DNA
- Transferlösungen (Telo TAGGG-Kit):
 - Depurinierungslösung: 0,25 M HCL
 - Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH + 1,5 M NaCl
 - Neutralisationslösung: 0,5 M Tris + 3 M NaCl, pH 7,5
 - Transferlösung 20 x SSC 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
- Blottingmaschine: Pharmacia Biotech Vacu Gene XL, Freiburg, Deutschland
- Nylonmembran: Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
- Whatmann Papier: Whatmann, Papier Serva, Heidelberg, Deutschland

b) Durchführung

Nach Vorbereitung der Blot-Kammer und Einlegen des Gels erfolgte das Blotting auf die Nylonmembran mit einem Druck von 55 mbar für 1,5 Stunden nach dem Prinzip des Unterdruckverfahrens. Dabei wurde 20 x SSC als Transfer-Puffer verwendet.

Um die Transferzeit für lange DNA-Fragmente zu verkürzen erfolgte die Depurinisierung mit 0,25 M HCL. Die Abspaltung der Purinbasen im sauren Milieu erleichtert den Transfer auf die Membran, da die entstehenden kleineren DNA-Fragmente leichter durch die Gelmatrix laufen.

Mittels 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl erfolgte die Denaturierung für 2 x 15 Minuten, sodass die gesamte DNA in Einzelstrangform vorlag. Dies war Voraussetzung für die später erfolgende Hybridisierung. Die Zugabe von 0,5 M Tris und 3 M NaCl für 2 x 15 Minuten neutralisierten das Gel. Am Ende wurden die Slots mit Bleistift markiert und die geblottete Membran wurde auf Whatman Papier für 2 Minuten bei 750 Watt in der Mikrowelle erhitzt, um die DNA auf der Membran zu fixieren. Durch die Hitzebehandlung kam es zu einer Fixierung der Phosphatreste an der Nitrozellulosemembran. Anschließend wurde die Membran mit 2 x SSC für eine Stunde gewaschen.

2.2.5 Hybridisierung

Die Reassoziaton der einzelsträngigen Nukleinsäuren mit einer DNA-Sonde zu einem basengepaarten Doppelstrang wird als Hybridisierung bezeichnet. Telomerspezifische Oligonukleotide der Sequenz TTAGGG/CCCUAA ermöglichen die Kennzeichnung der Telomerenlängen der zu untersuchenden DNA.

a) Material/Geräte

- Geblottete Membran
- Hybridisierungssonde: Digoxigenin (DIG)-markierte Hybridisierungsprobe
- Prähybridisierungslösung: DIG Easy Hyb Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- Hybridisierungslösung: 1 µl Telomere Probe/ 5ml DIG Easy Hyb Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- Hybridisierofen: Medizinische Einrichtung der Universität Münster, Anlagen-Nr. 9612250

b) Durchführung

Die Nylonmembran wurde in 18 ml DIG Easy Hyb Lösung für eine Stunde bei 42°C vorhybridisiert. Anschliessend wurde die Prähybridisierungslösung entfernt und durch

10 ml Hybridisierungslösung mit 2 µl DIG markierter Telomer-Hybridisierungssonde (Oligonukleotide, welche komplementär zur telomerischen Wiederholungssequenz sind) ersetzt. Die Sonde bildete Wasserstoffbrückenbindungen mit der komplementären Sequenz innerhalb der auf dem Filter festhaftenden denaturierten DNA- Fragmente. Die Hybridisierung erfolgte für 3 Stunden bei 42°C im rotierenden Hybridisierungsofen. Die Hybridisierungslösung wurde im Anschluss sofort entfernt.

2.2.6 Detektion

a) Material/ Geräte

- 10 % SDS: 5 g Natriumdodecylsulfat : Sigma, Deisenhofen, Deutschland
45 ml Aqua dest.
- 1 x Maleinsäure-Puffer:
0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
pH 7,5
- Waschpuffer:

Stringent wash buffer I:	2 x SSC, 0,1% SDS
Stringent wash buffer II:	0,2 x SSC, 0,1% SDS
1x washing buffer:	Telo TAGGG-Kit
1x blocking solution:	10 ml 10x Blocking buffer:Telo TAGGG-Kit
	90 ml 1x Maleinsäure: Telo TAGGG-Kit
- Anti-DIG-AP working solution:

10 µl Anti DIG AP:	Telo TAGGG-Kit
100 ml blocking solution:	Telo TAGGG-Kit
- 1x detection buffer: Telo TAGGG-Kit
- Substrate Solution: Telo TAGGG-Kit
- Röntgenfilm: Kodak, Biomax MS, Kodak AG, Stuttgart, Deutschland

b) Durchführung

Nach 3 stündiger Hybridisierung erfolgten die einzelnen Waschschriffe zur Entfernung nicht hybridisierter Sonde. Zuerst wurde die Membran zweimal für je fünf Minuten in Stringent-Waschpuffer I bei Raumtemperatur und nachfolgend zweimal je 20 Minuten in Stringent-Waschpuffer II bei 50°C gewaschen. Nach einem kurzen Waschgang bei Raumtemperatur mit 1 x Wasch-Puffer für fünf Minuten wird die Membran für 30 Minuten mit 1 x Blocking-Lösung inkubiert.

Nachfolgend wurde die Membran für 30 Minuten mit Anti-DIG-AP (polyklonale Antikörper von Schafen konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP)) bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den Telomerspezifischer Antikörper „Anti-DIG-Alkaline Phosphatase“, welcher CDP-Star, ein hoch sensitives Chemilumineszenz-Substrat, metabolisiert, wurden die Telomersonden detektiert

Hiernach schloßen sich ein 2-maliger Waschschriff für je 15 Minuten in 1 x Waschpuffer und die Inkubation für fünf Minuten in Detektionspuffer bei Raumtemperatur an. Der Detektionspuffer wurde entfernt und die Membran kurz auf Whatmannpapier gelegt, sie dann in eine neue Folie eingeschweißt und 3 ml Substratlösung auf die Membran gegeben. Die Membran wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, die Substratlösung anschliessend entfernt und die Membran für 20 Minuten in der Röntgenkassette exponiert. Nach enzymatischer Dephosphorylierung des Substrates erfolgte eine Lichtemission, welche auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

Die terminalen Restriktionsfragmente (TRF), die durch die Sonde detektiert wurden, erschienen als Schmier nach Belichtung auf dem Röntgenfilm. Zur Telomerenlängenbestimmung wurde die Mitte der Bandenlänge im Vergleich zum Längenstandard herangezogen. Die „Schmierer“ wurden densitometrisch mit dem Programm Telorun ausgewertet. Die mittlere Länge der terminalen Restriktionsfragmente wurde für jede Probe wie in dem Programm Telorun beschrieben (http://www4.utsouthwestern.edu/cellbio/shay-wright/research/sw_lab_methods.htm), berechnet.

2.3 TRAP Assay

Das Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) beruht auf einem in vitro – Nachweis von Telomeraseaktivität in einem Proteinextrakt der zu untersuchenden Zellen und wurde 1994 von Kim et al. beschrieben.

Die Grundlage des Telomeric Repeat Amplification Protocols bildet die Eigenschaft der Reversen Transkriptase Telomerase, welche einen DNA-Strang in wiederholten Zyklen am 3' Ende um 6 Nukleotide (TTAGGG) verlängert. Im ersten Schritt katalysiert das aus Zellproben isolierte Telomeraseprotein die Verlängerung eines Oligonukleotidsubstrates, wodurch abhängig von der enzymatischen Aktivität unterschiedlich lange Nukleotidketten entstehen. Im zweiten Reaktionsschritt können diese Nukleotidsequenzen mit einer Polymerase - Kettenreaktion amplifiziert werden, die PCR Produkte mittels Kapillarektrophorese aufgetrennt werden, die Peakflächen der Telomerenfragmente bestimmt werden und somit eine Aussage über die Telomeraseaktivität in der untersuchten Zelllinie getroffen werden.

2.3.1 Proteinisolierung

a) Material/Geräte

- Zellkulturproben
- CHAPS-Puffer: 1,5 ml 1x Chaps-Puffer, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- 11,3 µl RNase Inhibitor, New England, Biolabs, Inc., U.S.A
- 1,5 ml Röhren: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5417 R, Hamburg, Deutschland

b) Durchführung

Vor der Proteingewinnung wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und dann mit 1ml PBS von der Kulturgefäßoberfläche gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Röhren pipettiert und für 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zell - Pellet nochmals resuspendiert und anschliessend für 3

Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde abgenommen und das Zell-Pellet schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die aus der Zellkultur gewonnenen Zell - Pellets wurden in Chaps-Puffer aufgenommen und anschließend sofort für 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden die Proben für 30 Minuten bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Die im Überstand gelösten Proteine inklusive intakter Telomerase wurden sofort schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.3.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte mittels des kolorimetrischen Testverfahrens des RCDC Protein Assays (Bio Rad, München). Durch Reaktion des isolierten Proteins mit alkalischer Kupferlösung und nachfolgender Reduktion des Folinreagenzes entsteht abhängig von Proteingehalt und Aminosäurezusammensetzung ein charakteristischer blauer Farbstoff, der sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 750 nm besitzt.

a) Material/ Geräte

- RCDC Protein Assay Kit (Bio Rad, München, Deutschland)
- Proteinstandard: BSA (5 mg/ml), Serva, Heidelberg, Deutschland
 - 1 x CHAPS-Puffer, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- Leerwert: CHAPS-Puffer
- Probe: 5 µl Probe + 5 µl CHAPS-Puffer
- Standard:
 - 0,25 mg/ml: 2,5 µl BSA + 47,5 µl CHAPS-Puffer
 - 0,5 mg/ml: 5 µl BSA + 45 µl CHAPS-Puffer
 - 1,0 mg/ml: 10 µl BSA + 40 µl CHAPS-Puffer
 - 1,5 mg/ml: 15 µl BSA + 35 µl CHAPS-Puffer
- 1,5 ml Röhrchen: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Mikrotitrierplatte: BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
- Zentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
- ELISA-Reader: Multiskan Ascent Thermo Labsystems, Helsinki, Finnland

b) Durchführung

Zu je 5 µl Standard, Probe und Negativkontrolle wurden 25 µl Reagenz I des RCDC-Protein Assay Kits (Bio Rad) hinzugegeben, gevortext und anschliessend für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl Reagenz II und kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 13000 U/ min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat zur Farbstoffentwicklung in 25,4 µl Reagenz A` (alkalische Kupfertartratlösung) aufgenommen, gevortext und zur vollständigen Auflösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Kupferionen der alkalischen Tartratlösung reagierten mit den Aminosäuren. Zu jedem Ansatz wurden 200 µl Reagenz B (Folinreagenz) hinzupipettiert. 200 µl wurden in eine Mikrotiterplatte überführt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die komplexierten Proteine reduzierten - in erster Linie durch die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Cystin, Cystein und Histidin – das Folinreagenz, wodurch der blaue Farbstoff als Grundlage für die kolorimetrische Quantifizierung entstand.

Mittels des ELISA-Readers bestimmt man die Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 650- 750 nm.

2.3.3 TRAP-Reaktion

a) Material/ Geräte

- TRAPeze Telomerase Detection Kit: Intergen Company, Purchase, N.Y., U.S.A
- 1x CHAPS-Lysepuffer: Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- Rox Standard 1000: Gene Scan, Applied Biosystems, U.S.A.
- Taq Polymerase: Amersham Biosciences, Piscataway, N.J., U.S.A
- Thermocycler: Biometra, TRIO Thermoblock, Göttingen, Deutschland

b) Durchführung

Die TRAP-Reaktion erfolgte analog zum TRAPeze Telomerase Detection Kit. Die zu

analysierenden Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt (1:2, 1:3, 1:5, 1:10).

Als Negativkontrollen dienten CHAPS-Puffer und eine zweite Probe, die durch Hitzeinaktivierung (10 Minuten bei 85°C) hergestellt wurde. Hierdurch wurde das hitzelabile Telomeraseenzym denaturiert, wodurch es seine Enzymaktivität verlor.

Für die PCR-Reaktion wurde entsprechend dem TRAPeze Telomerase Detection Kit folgender Reaktionsansatz verwendet:

	Reagenz	µl pro Ansatz
„Mastermix“	10x TRAP Reaktionspuffer	2,5 µl
	DNTP's 2mM	2,5 µl
	FAM Primer Mix 15µM	0,25 µl
	TRAP Primer Mix	0,5 µl
	Taq Polymerase	0,2 µl
	Wasser (PCR-Qualität)	17,05 µl

Zu den pro Reaktionsgefäß vorgelegten 23 µl „Mastermix“ wurden je 2 µl der entsprechend verdünnten Probe hinzu pipettiert, so dass jeweils 0,0025 µg Protein eingesetzt wurden. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug somit 25,0 µl. Als „Negativkontrollen“ dienten in jeder PCR-Reaktion 2 µl CHAPS Lysepuffer sowie eine hitzedenaturierte Probe, um PCR-Artefakte und Kontamination auszuschliessen. 0,25 µl CHAPS-Lysepuffer und FAM-Primer wurden jeweils anstelle der Proben zum „Mastermix“ dazugegeben. Die nachfolgende Tabelle zeigt den Temperatur-Zeit-Verlauf der PCR.

Synthese von Telomerfragmenten durch Telomeraseaktivität:

Template Verlängerung

1. Aktivierung	37°C	3 min.
2. Synthese	30°C	30 min.
3. Denaturierung des Enzyms Telomerase	94°C	5 min.

Polymerasekettenreaktion

4. Denaturierung	94°C	30 s
5. Annealing	55°C	45 s
6. Elongation	72°C	45 s

Der Zyklus der Polymerasekettenreaktion wird insgesamt 36-mal durchlaufen.

DAS PRINZIP DER TELOMERASE-PCR:

Primerverlängerung:

Die Telomerase fügt an den FAM Primer die spezifische sechs Nukleotide umfassende Sequenz der Telomeren an. Je höher die Aktivität bzw. die Anzahl der Telomerase-Enzyme, desto größer die Anzahl der Wiederholungen.

Inaktivierung der Telomerase

Nach der Primer-Verlängerung wird die Telomerase mittels Hitzeeinwirkung denaturiert.

Amplifikation:

Ein zweiter Primer (TRAP Primer), der komplementär zu den telomerischen Sequenzen ist, hybridisiert mit den neu synthetisierten Abschnitten. Mit seiner Hilfe bildet die Taq-Polymerase einen komplementären Strang.

Während der PCR werden die neu-synthetisierten Doppelstränge immer wieder denaturiert, so dass die Primer erneut an die Einzelstränge binden können und die Polymerase diese wieder komplementiert. Somit dienen in der weiteren PCR beide Primer der Taq-Polymerase zur Amplifizierung der charakteristischen Sequenzen. Je größer die Ausgangssubstanz zu Beginn der PCR, desto größer die Ausbeute. Nach jedem Zyklus liegen so doppelt so viele Telomerase-spezifische Sequenzen vor wie zu Beginn des Zyklus.

2.3.4 Fragmentanalyse

Die Fragmentanalyse mit dem ABI PRISM 3700 DNA Analyzer wurde nach Probenvorbereitung freundlicherweise vom Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster übernommen.

Ausgangssubstanz für den ABI PRISM 3700 DNA Analyzer waren die PCR-Produkte, die als Doppelstränge in der Probe vorlagen. Der Nachweis der DNA Fragmente wurde mittels Kapillarelektrophorese durch Fluoreszenzmarker möglich, mit denen die DNA-Fragmente chemisch gekennzeichnet wurden. Das Standard-Set zur Fragmentanalyse mit dem ABI PRISM 3700 DNA Analyzer umfasst die Fluoreszenzmarker 6FAM, HEX, NED und ROX. Die Markierung erfolgte für unsere Proben mit Hilfe eines 6FAM markierten Oligonukleotids, das als Detektor diente. Dieses Oligonukleotid ist komplementär zur telomerase-spezifischen Sequenz. In jeder Fragmentanalyse wurde als Standard der ROX-Standard 1000 mitgeführt.

Während der Kapillarelektrophorese wandern kürzere Fragmente schneller als solche, die länger sind. Wenn die Fragmente das Ende ihrer Kapillare erreichen, wird durch einen Laserstrahl der Marker zum Fluoreszieren gebracht und mit Hilfe einer Kamera die Fluoreszenz in eine elektronische Information übersetzt. Zur Quantifizierung der Telomeraseaktivität wird die Extinktion der Probe gemessen und das Ergebnis anschließend in OD (optische Dichte) angegeben. Die Menge der Extinktion ist proportional zu der Menge von markiertem Oligonukleotid. Die angegebenen Werte können bereits als endgültig betrachtet werden, so dass ihre Bearbeitung und Verwertung direkt im Anschluß vorgenommen werden kann. Das sich daraus ergebende Elektropherogramm zeigt die relative Konzentration des Markers (y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse) aufgetragen. Jeder Peak innerhalb des Elektropherogramms spiegelt ein einzelnes Fragment wieder. Für den Rox-Standard ist festzuhalten, dass sich der Peak um die Basenpaaranzahl von ca. 30 bp befindet, während sich der Telomerase-Peak bei ca. 46 bp zeigt und Telomeraseaktivität dann als sogenannte Telomerenleiter sichtbar wird. Die graphische Darstellung und Errechnung der relativen Telomeraseaktivität erfolgt mit dem Programm Peak Scanner Software 1,0 von Applied Biosystems, welche unter folgendem Link verfügbar ist. www.appliedbiosystems.com/PeakScanner

3 Ergebnisse

3.1 Zytotoxizitätstests

Im Rahmen dieser Arbeit wurde an nativen und Vektor - transfizierten Neuroblastomzelllinien die Zytotoxizität der bei der Behandlung des Neuroblastoms angewandten Zytostatika getestet.

3.1.1 MTT-Test mit Ifosfamid an CHLA-90

Vergleicht man die Proliferationsraten der unbehandelten Kontrollen zur Stunde 0, so lassen sich in Abhängigkeit von der Vektortransfektion Unterschiede bezüglich der Stärke des Wachstumsverhaltens feststellen.

Gemeinsam war allen unbehandelten Kontrollen, dass bis zum fünften Tag ein stetiges Zellwachstum stattfand und nach 96 Stunden noch keine der Kontrollen eine Sättigungsphase erreichte. Im Vergleich zum Ausgangswert von 100% erreichte die Ausgangszelllinie CHLA-90 nach 96 Stunden einen Wert von 201,8 %. Betrachtet man das Proliferationsverhalten von Zellen mit ektopter hTERT-Expression, so konnte eine deutliche Zunahme der Wachstumsrate nach 96h auf fast das Dreifache zum Ausgangswert mit einem Wert von 296,7 % gemessen werden

Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen

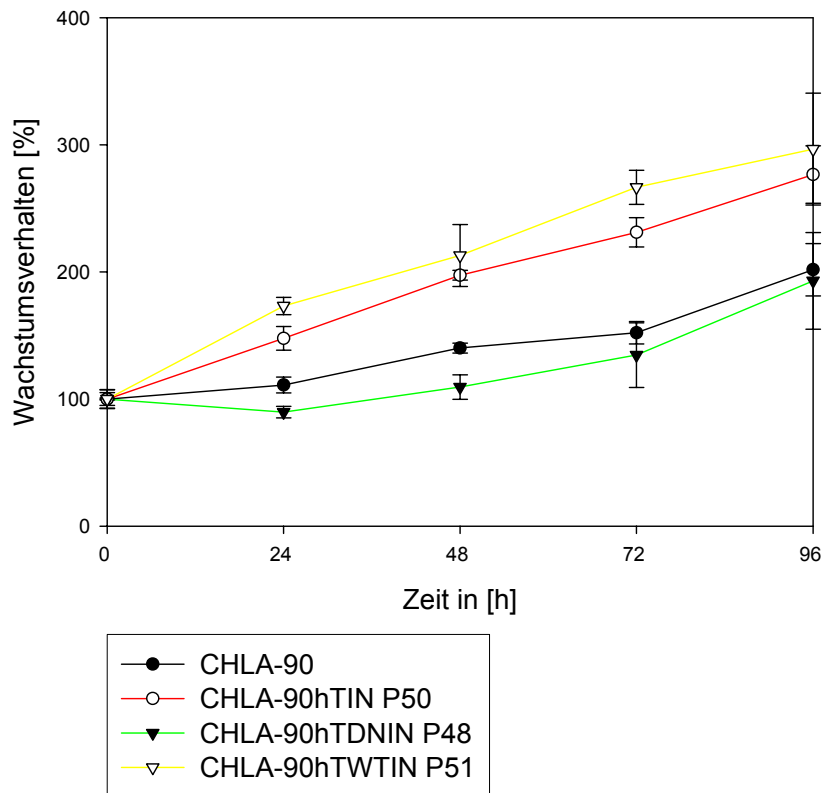


Abb.3.1.1.a: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen zur Stunde 0 für CHLA-90, CHLA-90hTIN P 50, CHLA-90hTDNIN P48 und CHLA-90hTWTIN P51

Dahingegen zeigten Zellen, die mit dem Vektor DNhTERT transfiziert wurden im Vergleich zur Ausgangszelllinie bis auf einen leichten Rückgang in der Proliferationsrate keine signifikante Abweichung in ihrem Wachstumsverhalten und erreichten nach 96 Stunden einen Wert von 193,03 %.

Unter Inkubation mit Ifosfamid in den Konzentrationen 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM konnte in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubationszeit und der Zytostatikakonzentration ein deutlicher Rückgang der Zellzahl beobachtet werden. Die Zytotoxizität von Ifosfamid nach 96 Stunden ist in Abb. 3.1.1.b graphisch dargestellt.

Zytotoxizität nach 96 h

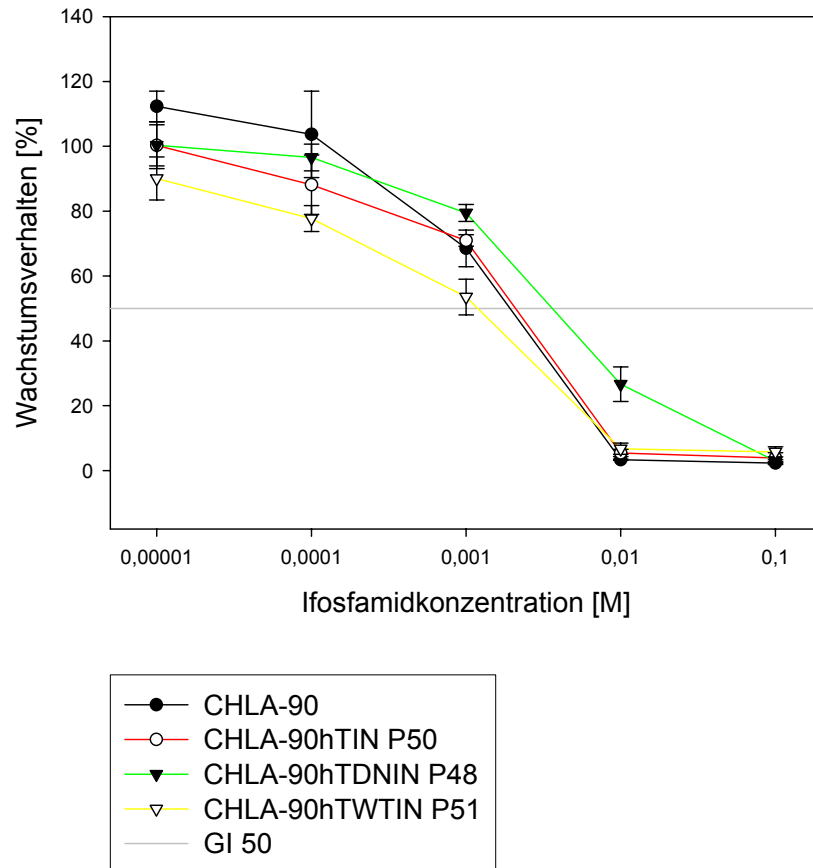


Abb.3.1.1.b: Einfluss verschiedener Ifosfamidkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 96h von CHLA-90, CHLA-90hTIN P50, CHLA-90hTDNIN P48, CHLA-90hTWTIN P51

Für die Zelllinie CHLA-90hTWTIN, welche Telomerase ektop exprimiert, waren im Vergleich zur Zelllinie CHLA-90hTDNIN wesentlich niedrigere Ifosfamidkonzentrationen notwendig, um den Anteil vitaler Zellen auf 50 % zu reduzieren. Die für das Erreichen der GI_{50} erforderlichen Zytostatikakonzentrationen sind in Tabelle 3.1.1.c aufgeführt. Die Konzentrationen für das Erreichen der GI_{50} lagen für die Zelllinie CHLA-90hTDNIN P48 zwischen Werten von 17,4 μM (24h) bis 6,02 μM (96h), während für die Zelllinie CHLA-90hTWTIN P51 Konzentrationen, die lediglich ungefähr ein Drittel so hoch waren, ausreichten und sich im Rahmen von 5,60 μM (24h) bis 1,68 μM (96h) bewegten.

GI ₅₀ IFOSFAMID	CHLA-90	CHLA-90 hTIN P50h	CHLA-90 hTDNIN P48	CHLA-90 hTWTIN P51
24 h	5,10	10,8	17,4	5,60
48 h	4,77	6,04	8,82	5,29
72 h	4,63	6,33	8,25	4,40
96 h	3,56	3,88	6,02	1,68

Tab.3.1.1.c: Ifosfamidkonzentration, bei der der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle (GI₅₀) nur noch 50 % ist. Die Zytostatikakonzentrationen sind in der Einheit μM (mikro Mol) angegeben.

3.1.2 MTT-Test mit Ifosfamid an SK-N-SH

Vergleicht man die Wachstumskurven von Zellen, die hTERT ektop exprimieren mit der Ausgangszelllinie SK-N-SH und denen, die den Leervektor tragen bzw. solchen, bei denen Telomerase durch ein DN-Vektorkonstrukt ausgeschaltet ist, so erkennt man ein ähnliches Wachstumsverhalten. So fanden sich bis zum fünften Tag ein stetiges Zellwachstum, ohne dass eine Sättigungsphase nach 96 Stunden erreicht wurde.

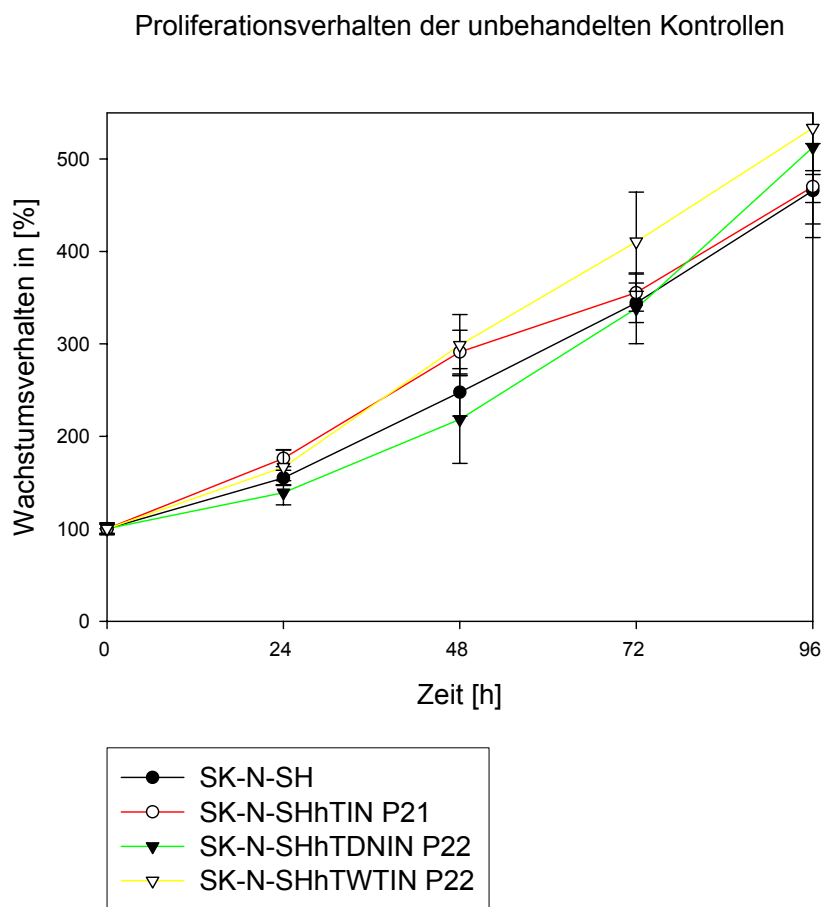


Abb.3.1.2.a: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen zur Stunde 0 für SK-N-SH, SK-N-SHhTIN P21, SK-N-SHhTDNIN P22, SK-N-SHhTWTIN P22

Dabei wurden für alle Zelllinien Werte zwischen dem vier- bis fünffachen des Ausgangswertes erreicht, wobei die Zelllinie SK-N-SHhTWTIN P22 die höchste Wachstumsrate mit einem Wert von 533,5 % erzielte, während die Zelllinie SK-N-SHhTDNIN P22 einen Wert von 512,7 % erreichte.

Die Zytotoxizität von Ifosfamid wurde in den Konzentrationen 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM getestet. Die Hemmung des Zellwachstums fiel für Zellen, die den

Vektor hTERTDNIN trugen stärker aus als für Zellen, die ektop hTERT exprimierten. So betrug die Zellzahl nach 72 Stunden Behandlung mit 10 μM Ifosfamid für SK-N-SHhTDNIN P22 nur noch 2,34 % des Ausgangswertes während sie für SK-N-SHhTWTIN P22 noch 23,7 % umfaßte.

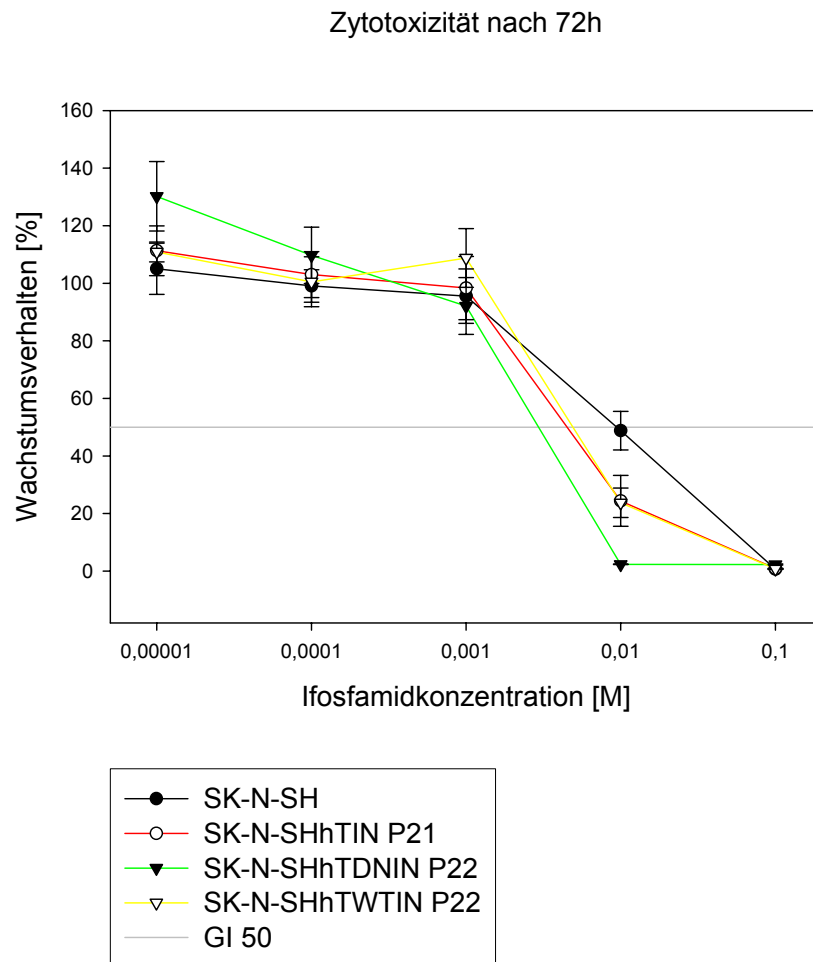


Abb.3.1.2.b: Einfluss verschiedener Ifosfamidkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 72h von SK-N-SH, SK-N-SHhTIN P21, SK-N-SHhTDNIN P22 und SK-N-SHhTWTIN 22

Die erforderlichen Ifosfamidkonzentrationen zum Erreichen der GI_{50} sind in Tabelle 3.1.2.c dargestellt. Dabei lag der erforderliche Konzentrationsbereich von Ifosfamid für SK-N-SHhTDNIN P22 zwischen 6,46 μM (24h) und 5,45 μM (96h), während für die Zelllinie SK-N-SHhTWTIN P22 höhere Zytostatikakonzentrationen zum Erreichen der GI_{50} notwendig waren und den Bereich von 53,4 μM (24h) bis 5,93 μM umfaßten.

GI ₅₀ IFOSFAMID	SK-N-SH	SK-N-SH hTIN P21	SK-N-SH hTDNIN P22	SK-N-SH hTWTIN P 22
24 h	50,9	49,6	6,46	53,4
48 h	35,2	23,06	6,34	11,04
72 h	9,76	6,88	5,22	7,22
96 h	6,84	6,40	5,45	5,93

Tab.3.1.2.c: Ifosfamidkonzentration, bei der der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle (GI₅₀) nur noch 50 % ist. Die Zytostatikakonzentrationen sind in der Einheit μM (mikro Mol) angegeben.

3.1.3 MTT-Test mit Cisplatin an CHLA-90

Das Proliferationsverhalten der Telomerasenegativen Zelllinie CHLA-90 sowie der zugehörigen ektop hTERT exprimierenden Zelllinie wurde hier bestätigt. Man erkennt ein stärkeres Proliferationsverhalten für die Zelllinie, die ektop hTERT exprimiert und es wurde verglichen mit der Wachstumsrate der Ausgangszelllinie (173,1%) nach 96 h eine mehr als verdoppelte Wachstumsrate mit dem Wert von 396 % erreicht. Im Vergleich dazu umfasst der Wert für die Zelllinie CHLA-90hTDNIN P41 nach 96 h 265,6 %.

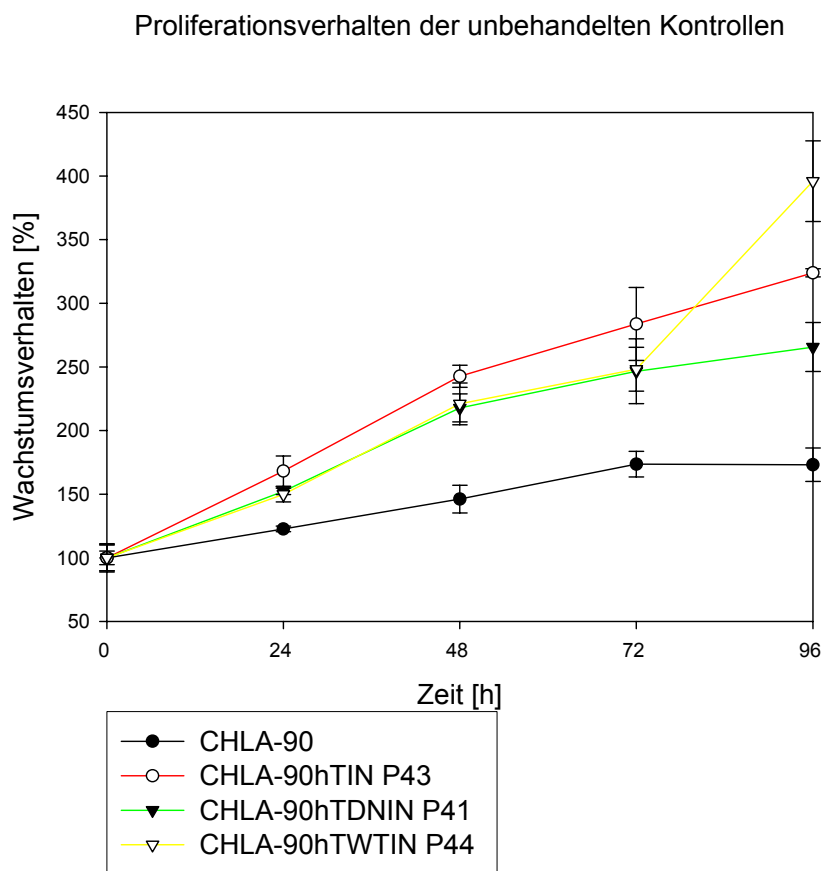


Abb.3.1.3.a: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen für CHLA-90, CHLA-90hTIN P 43, CHLA-90hTDNIN P41 und CHLA-90hTWTIN P44

Unter Inkubation mit Cisplatin in den Konzentrationen 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM konnte eine Wachstumshemmung erreicht werden, die in Abb.3.1.3b für die Werte nach 48 Stunden graphisch dargestellt wird.

Zytotoxizität nach 48 h

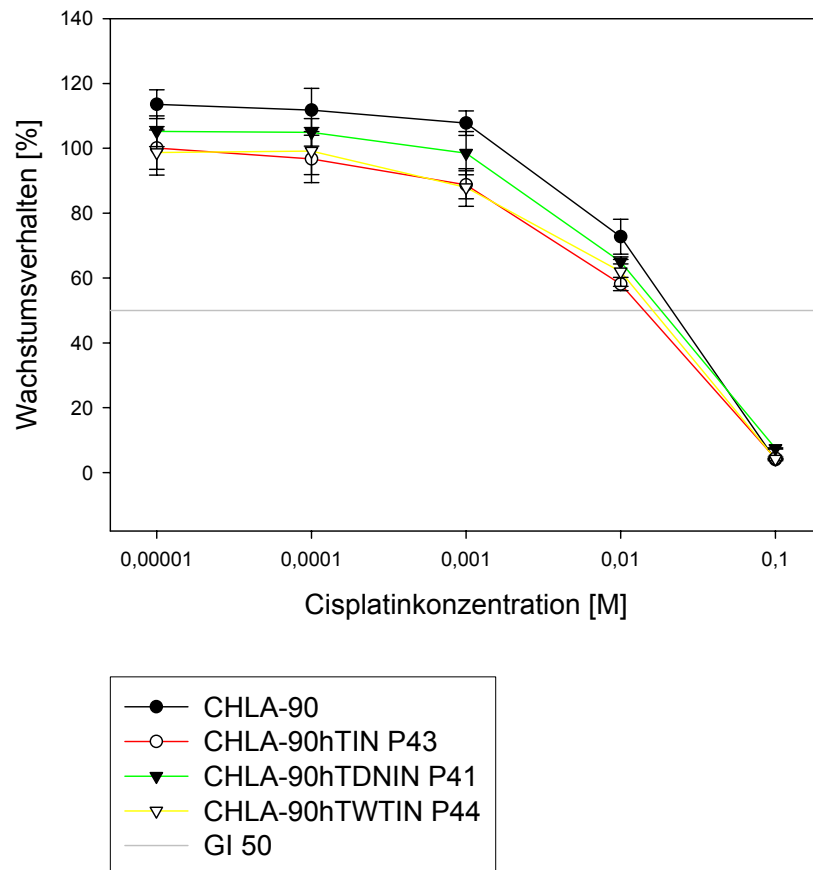


Abb.3.1.3.b: Zytotoxizität verschiedener Cisplatinkonzentrationen nach 48 h auf das Zellwachstum von CHLA-90, CHLA-90hTIN P43, CHLA-90hTDNIN P41 und CHLA-90hTWTIN P44

Die Tabelle 3.1.3.c zeigt die zum Erreichen einer Wachstumshemmung von 50% erforderlichen Zytostatikakonzentrationen für Cisplatin, verglichen mit der Kontrolle. Für die Zelllinie CHLA-90hTDNIN P41 lagen sie im Bereich von 99,6 μM nach 24 h bis 5,85 μM nach 96 h, während die erforderlichen Zytostatikakonzentrationen für CHLA-90hTWTIN P44 etwas geringer ausfielen und den Bereich von 83,02 μM nach 24h bis 5,80 μM nach 96 umfaßten.

GI ₅₀ CISPLATIN	CHLA-90	CHLA-90 hTIN P43	CHLA-90 hTDNIN P41	CHLA-90 hTWTIN P44
24 h	70,04	88,80	99,6	83,02
48 h	39,8	23,7	33,5	28,7
72 h	15,3	7,94	9,10	8,74
96 h	9,11	6,21	5,85	5,80

Tab.3.1.3.c: Cisplatinkonzentration, bei der der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle (GI₅₀) nur noch 50 % ist. Die Zytostatikakonzentrationen sind in der Einheit μM (mikro Mol) angegeben.

3.1.4 MTT-Test mit Cisplatin an SK-N-SH

In den unbehandelten Kontrollen war für alle Zelllinien ein Zellwachstum zu beobachten, ohne dass nach 96 Stunden eine Plateauphase erreicht wurde. Das Zellwachstum nach 96 Stunden lag für alle Zellen unter dem Wert der Ausgangszelllinie SK-N-SH, die einen Wert von 584,02% des Ausgangswertes erreichte. Dennoch konnte für die Zelllinie SK-N-SHhTDNIN P21 ein Wert von 554,4% gemessen werden, während das Proliferationsverhalten für die Zelllinie SK-N-SHhTWTIN P21 nur einen Wert von 464,4% im Vergleich zum Ausgangswert erzielte.

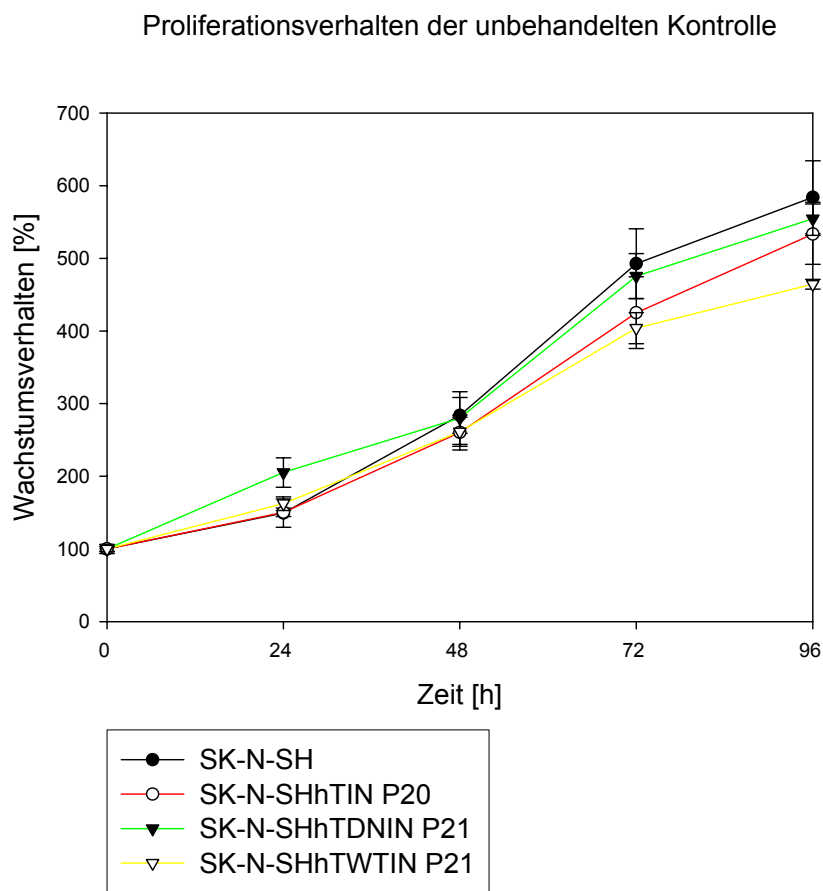


Abb.3.1.4.a: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen für SK-N-SH, SK-N-SHhTIN P20, SK-N-SHhTDNIN P21 und SK-N-SHhTWTIN P21

Die Zytotoxizität von Cisplatin wurde in den Konzentrationen 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM getestet. Eine graphische Darstellung der Zytotoxizität nach 72 Stunden zeigt Abbildung 3.1.4.b. Dabei wurde für die gleiche Zytostatikakonzentration eine unterschiedlich starke Wachstumshemmung erzielt. Die Ausgangszelllinie und die

Zelllinie mit dem Leervektor verhielten sich bezüglich der Wachstumshemmung ähnlich. Für die ektop hTERT exprimierende Zelllinie ließ sich nach Inkubation von 1 μM Cisplatin ein Anteil vitaler Zellen von nur 44,34 % erzielen während dieser im Vergleich für die Zelllinie SK-N-SHhTDNIN P21 noch bei 75,75 % lag.

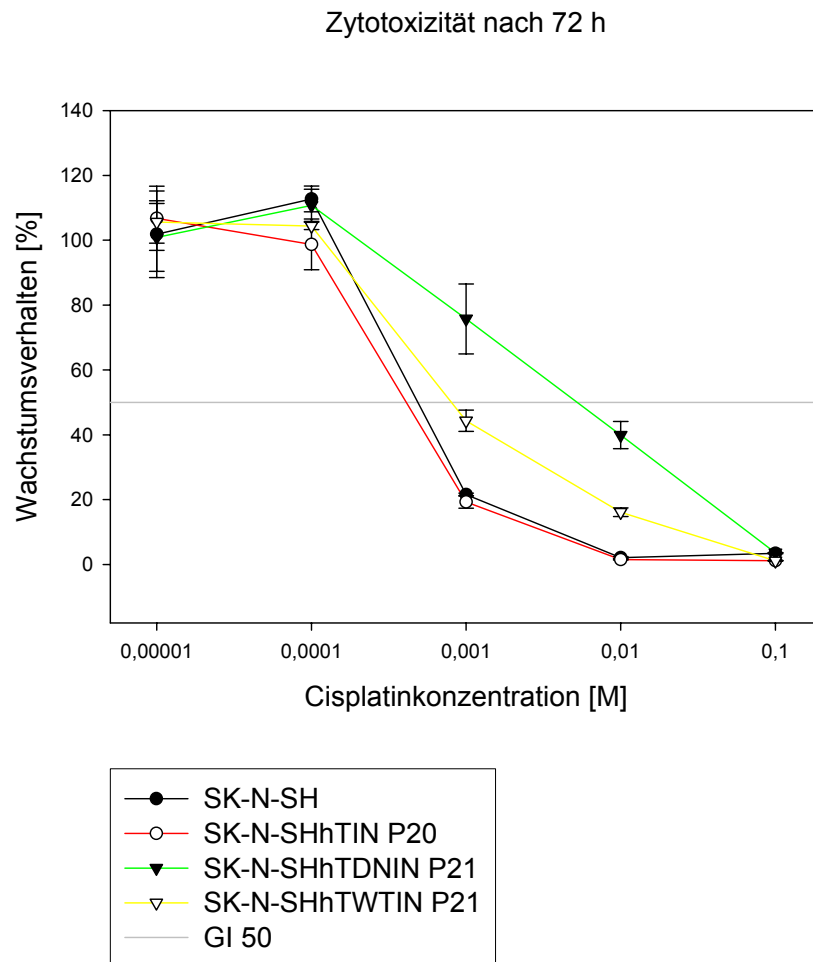


Abb.3.1.4.b: Zytotoxizität verschiedener Cisplatinkonzentrationen nach 72 h auf das Zellwachstum von SK-N-SH, SK-N-SHhTIN P20, SK-N-SHhTDNIN P21 und SK-N-SHhTWTIN P21

Die zum Erreichen der GI_{50} von Cisplatin erforderlichen Zytostatikakonzentrationen sind in Tabelle 3.1.4.c dargestellt. Hierbei reichten die Konzentrationen für SK-N-SHhTDNIN P21 von $>100 \mu\text{M}$ bis $0,80 \mu\text{M}$, während für die Zelllinie SK-N-SHhTWTIN P21 weitaus geringere Konzentrationen im Bereich von $25,04 \mu\text{M}$ bis $0,68 \mu\text{M}$ erforderlich waren.

GI ₅₀ CISPLATIN	SK-N-SH	SK-N-SH hTIN P20	SK-N-SH hTDNIN P21	SK-N-SH hTWTIN P 21
24 h	7,36	7,25	> 100	25,04
48 h	0,96	0,93	20,34	5,34
72 h	0,72	0,65	7,46	0,92
96 h	0,53	0,57	0,80	0,68

Tab.3.1.4.c: Cisplatinkonzentration, bei der der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle (GI₅₀) nur noch 50 % ist. Die Zytostatikakonzentrationen sind alle in der Einheit μM (mikro Mol) angegeben.

3.1.5 MTT-Test mit Doxorubicin an CHLA-90

In den unbehandelten Kontrollen fand bis zum fünften Tag ein stetiges Zellwachstum statt, welches für die Zelllinie CHLA-90hTWTIN P41 einen Wert von 425,13 % im Vergleich zum Ausgangswert (100 %) erreichte.

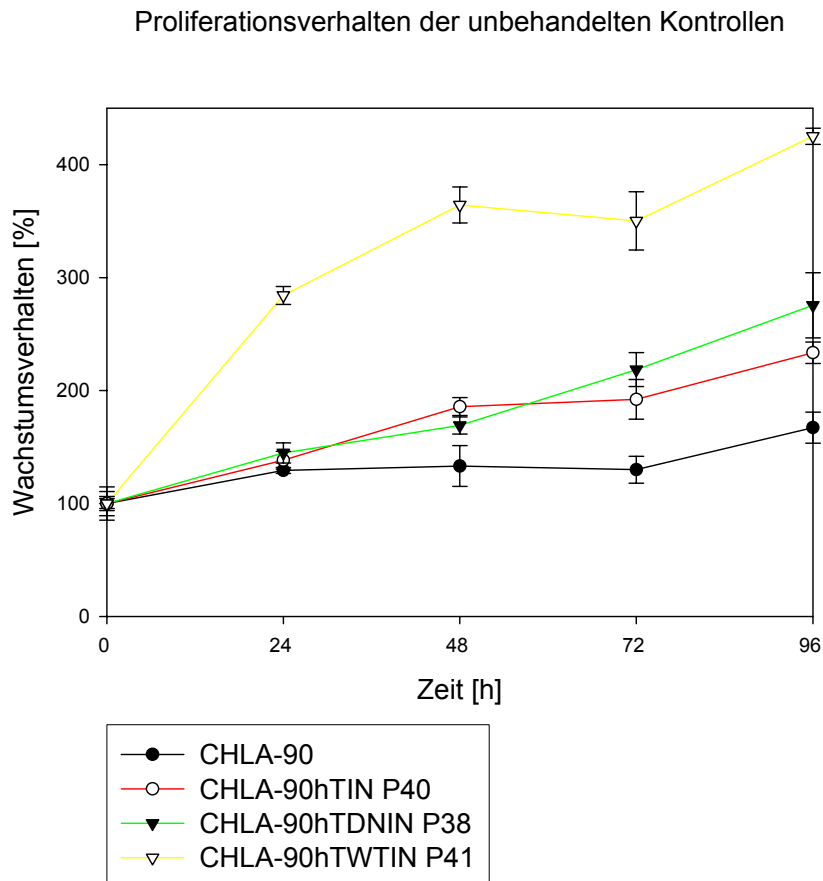


Abb.3.1.5.a: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen für CHLA-90, CHLA-90hTIN P 40, CHLA-90hTDNIN P38 und CHLA-90hTWTIN P41

Bei keiner der Zelllinien wurde bis zum fünften Tag eine Sättigungsphase für das Wachstum erreicht.

Das Zytostatikum Doxorubicin wurde in den Konzentrationen 0,00025 μM , 0,0025 μM , 0,025 μM , 0,25 μM und 2,5 μM eingesetzt. Die graphische Darstellung der Doxorubicinzytotoxizität nach 72 h zeigt, dass für die Zelllinie CHLA-90hTWTIN P41 bei Inkubation mit 0,25 μM Doxorubicin die Wachstumsrate auf 61,95 % reduziert wurde, während für CHLA-90hTDNIN P41 der Anteil vitaler Zellen noch 77,20 % im Vergleich zum Ausgangswert betrug.

Zytotoxizität nach 72h

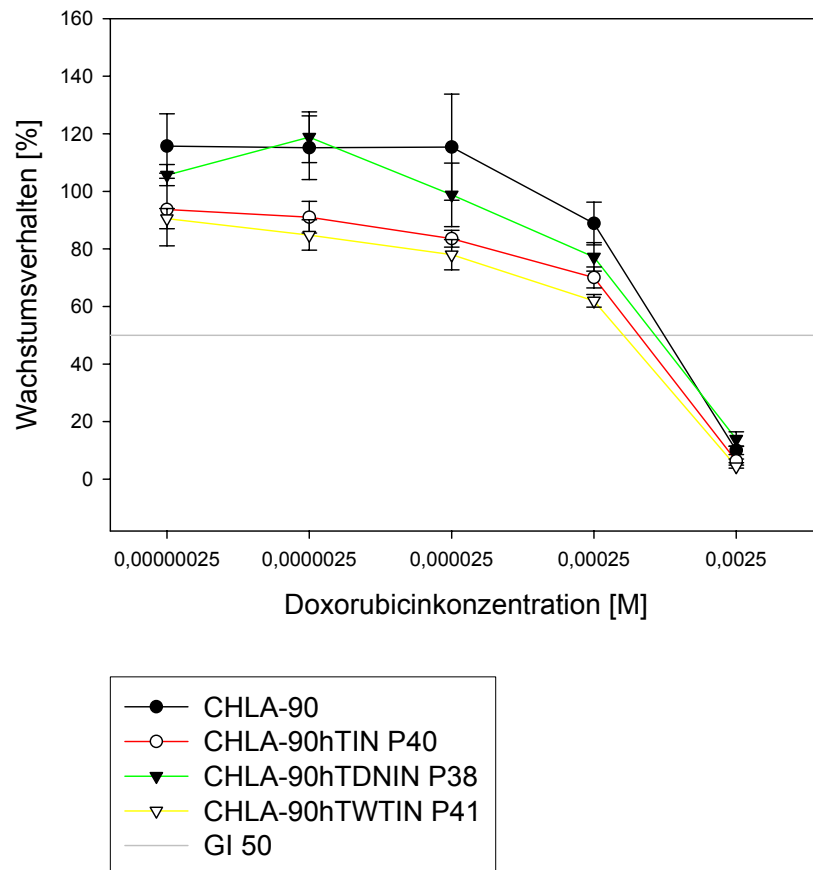


Abb.3.1.5.b: Einfluss verschiedener Doxorubicinkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 72h von CHLA-90, CHLA-90hTIN P40, CHLA-90hTDNIN P38 und CHLA-90hTWTIN P41

Die GI_{50} für Doxorubicin ist in der Tabelle 3.1.5.c für die getesteten Zelllinien aufgeführt. Sie umfaßte für die Zelllinie CHLA-90hTDNIN P38 den Bereich von $>2,5 \mu\text{M}$ nach 24 Stunden bis $0,53 \mu\text{M}$ nach 96 Stunden und erstreckte sich für die Zelllinie CHLA-90hTWTIN P41 im Bereich von $>2,5 \mu\text{M}$ nach 24 Stunden bis $0,29 \mu\text{M}$ nach 96 Stunden.

GI ₅₀ DOXORUBICIN	CHLA-90	CHLA-90 hTIN P40	CHLA-90 hTDNIN P38	CHLA-90 hTWTIN P41
24 h	> 2,5	2,30	> 2,5	> 2,5
48 h	1,80	1,07	1,86	1,29
72 h	1,36	0,96	1,22	0,72
96 h	0,65	0,36	0,53	0,29

Tab.3.1.5.c: Doxorubicinkonzentration, bei der der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle (GI₅₀) nur noch 50 % ist. Die Zytostatikakonzentrationen sind in der Einheit μM (mikro Mol) angegeben.

3.1.6 MTT-Test mit Doxorubicin an SK-N-SH

Das Proliferationsverhalten in Abbildung 3.1.6.a zeigt für alle Zelllinien ein stetiges Wachstumsverhalten bis zu 72 Stunden. Danach zeigte sich für die Zelllinie mit dem Leervektor und die Zelllinie, bei der Telomerase ausgeschaltet wurde, eine Plateauphase in der Wachstumsrate. Nach 96 Stunden erreichte die Zelllinie SK-N-SHhTWTIN P21 einen Wachstumswert von 451,68%, während dieser für SK-N-SHhTDNIN P20 bei 549,25% lag.

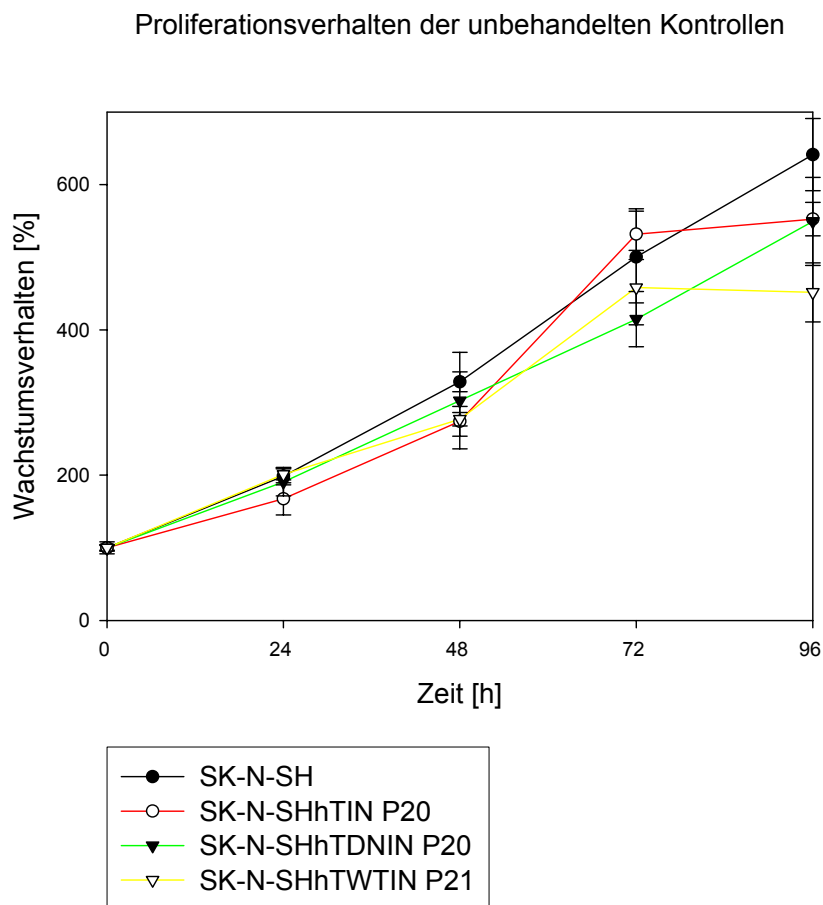


Abb.3.1.6.a: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen für SK-N-SH, SK-N-SHhTIN P20, SK-N-SHhTDNIN P20 und SK-N-SHhTWTIN P21

Bei den Untersuchungen zur Toxizität wurde Doxorubicin in den Konzentrationen 0,00025 μM , 0,0025 μM , 0,025 μM , 0,25 μM und 2,5 μM eingesetzt. Aus der graphischen Darstellung wird ersichtlich, dass nach einer Inkubation von 72 Stunden mit 0,25 μM Doxorubicin die Wachstumsrate für SK-N-SHhTDNIN P20 noch 30,6 % betrug, während sich für SK-N-SHhTWTIN P21 nur noch 12,9 % des Ausgangswertes

messen ließ.

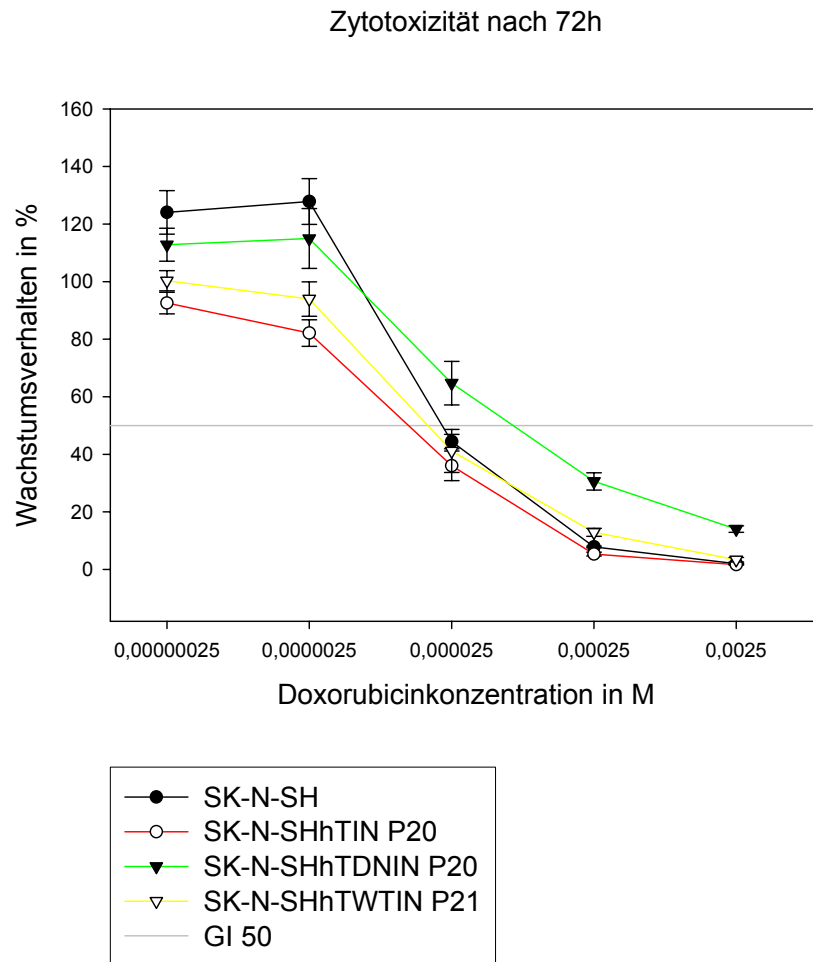


Abb.3.1.6.b: Zytotoxizität verschiedener Doxorubicinkonzentrationen nach 72 h auf das Zellwachstum von SK-N-SH, SK-N-SHhTIN P20, SK-N-SHhTDNIN P20 und SK-N-SHhTWTIN P21

Die Zytostatikakonzentrationen zum Erreichen der GI_{50} für Doxorubicin umfaßten für SK-N-SHhTDNIN P20 Werte zwischen $>2,5 \mu\text{M}$ nach 24 Stunden und Werte von $0,02 \mu\text{M}$ nach 96 Stunden. Für SK-N-SHhTWTIN P21 ließen sich Werte zwischen $0,65 \mu\text{M}$ und $0,02 \mu\text{M}$ Doxorubicin feststellen.

GI ₅₀ DOXORUBICIN	SK-N-SH	SK-N-SH hTIN P20	SK-N-SH hTDNIN P20	SK-N-SH hTWTIN P 21
24 h	0,94	0,40	> 2,5	0,65
48 h	0,17	0,13	2,28	0,17
72 h	0,02	0,02	0,12	0,02
96 h	0,02	0,01	0,02	0,02

Abb.3.1.6.c: Doxorubicinkonzentration, bei der der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle (GI₅₀) nur noch 50 % ist. Die Zytostatikakonzentrationen sind alle in der Einheit μM (mikro Mol) angegeben.

3.1.7 MTT-Test mit Etoposid an CHLA-90

Das Proliferationsverhalten zeigte auch hier ein stetiges Zellwachstum, ohne dass nach 96 Stunden eine Sättigungsphase erreicht wurde. Die Wachstumsrate für CHLA-90hTWTIN P51 zeigte einen Wert von 328,8 % im Vergleich zum Ausgangswert. Die Zelllinie mit dem Leervektor zeigte im Wachstumsverhalten Ähnlichkeit mit der Ausgangszelllinie. Für CHLA-90hTDNIN P48 konnte im Vergleich zur Ausgangszelllinie (266,5% im Vergleich zum Ausgangswert von 100 %) ein geringeres Proliferationsverhalten nach 96 Stunden beobachtet werden und Werte von 231,1 % gemessen werden.

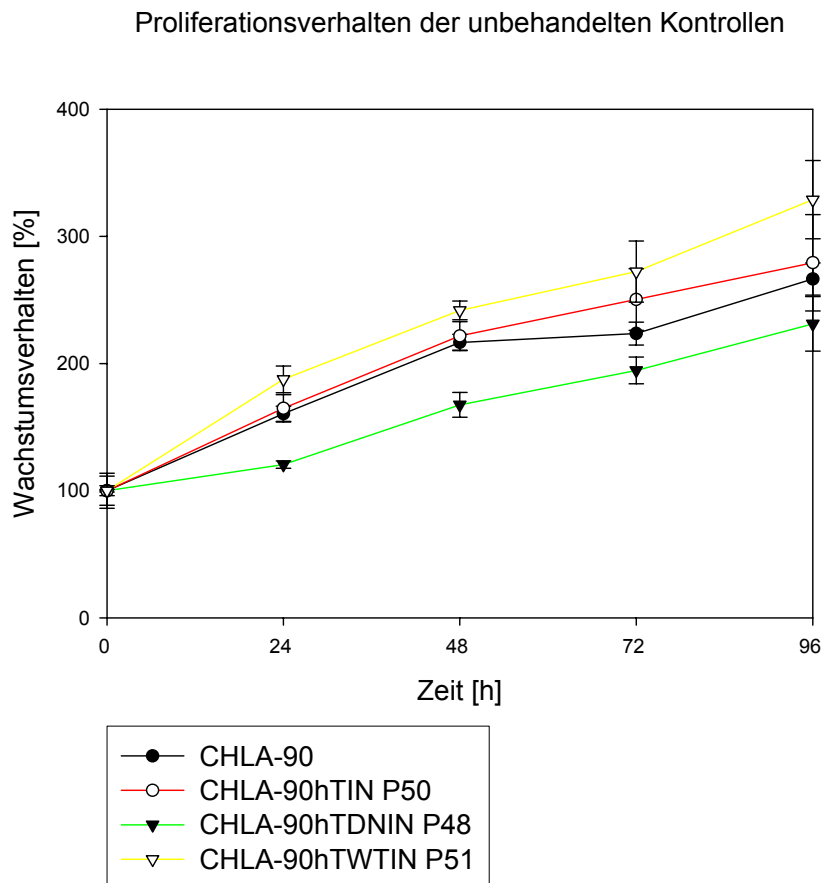


Abb.3.1.7.a: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen für CHLA-90, CHLA-90hTIN P50, CHLA-90hTDNIN P48 und CHLA-90hTWTIN P51

Etoposid wurde in den Konzentrationen 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM eingesetzt. Dabei konnte für die Zelllinie CHLA-90hTDNIN P48 nach einer Inkubation von 72 Stunden mit 10 μM Etoposid eine Reduktion der Wachstumsrate auf 46,8 % und

für CHLA-90hTWTIN P51 auf 59,3 % festgestellt werden.

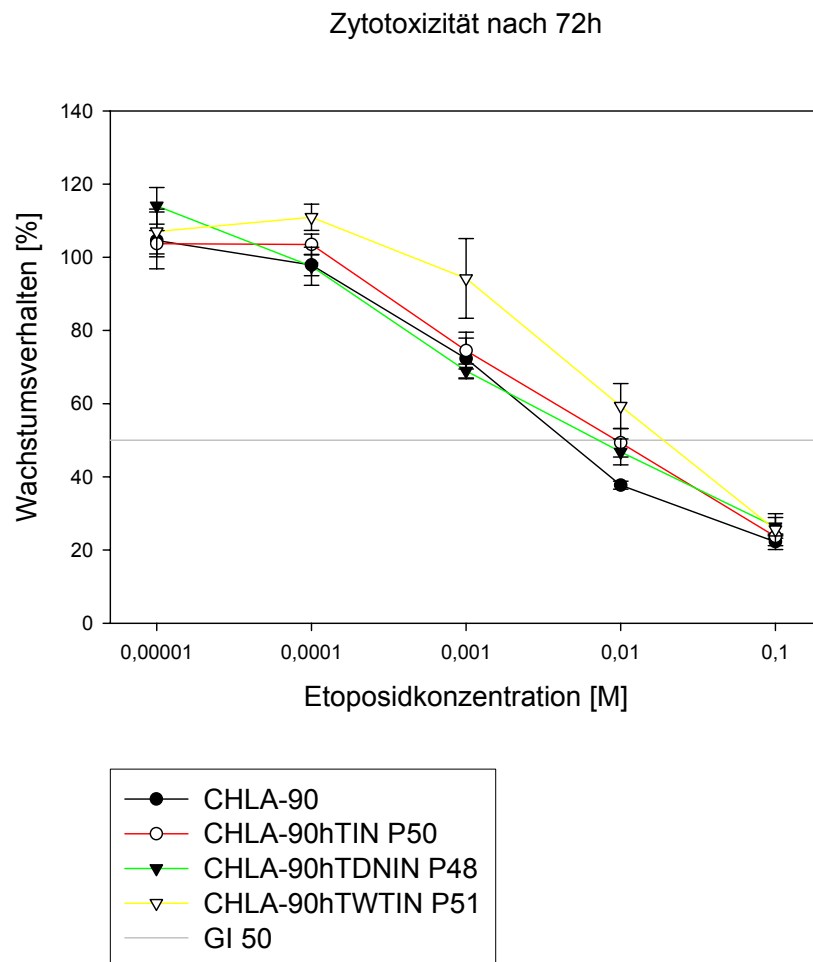


Abb.3.1.7.b: Zytotoxizität verschiedener Etoposidkonzentrationen nach 72 h auf das Zellwachstum von CHLA-90, CHLA-90hTIN P50, CHLA-90hTDNIN P48 und CHLA-90hTWTIN P51

Die zum Erreichen der GI_{50} erforderlichen Etoposidkonzentrationen sind in Tabelle 3.1.7.c dargestellt. Dabei umfaßte die Etoposidkonzentration für CHLA-90hTDNIN P48 den Bereich von 95,9 μM nach 24 Stunden bis 3,67 μM nach 96 Stunden. Für CHLA-90hTWTIN P51 lag der Bereich zwischen 76,3 μM nach 24 Stunden bis 5,63 μM nach 96 Stunden.

GI ₅₀ ETOPOSID	CHLA-90	CHLA-90 hTIN P50	CHLA-90 hTDNIN P48	CHLA-90 hTWTIN P51
24 h	> 100	78,6	95,9	76,3
48 h	46,7	69,9	82,9	71,8
72 h	6,81	9,76	8,71	34,9
96 h	3,74	5,75	3,67	5,63

Tab.3.1.7.c: Etoposidkonzentration, bei der der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle (GI₅₀) nur noch 50 % ist. Die Zytostatikakonzentrationen sind in der Einheit μM (mikro Mol) angegeben.

3.1.8 MTT-Test mit Etoposid an SK-N-SH

Die Abbildung 3.1.8.a zeigt ein stetiges Zellwachstum für alle Zelllinien ohne Erreichen einer Plateauphase nach 96 Stunden. Für SK-N-SHhTDNIN P22 nahm das Zellwachstum nach 96 Stunden auf einen Wert von 588,2% im Vergleich zum Ausgangswert zu. Der Wert für das Zellwachstum von SK-N-SHhTWTIN P22 betrug nach 96 Stunden 516,2%.

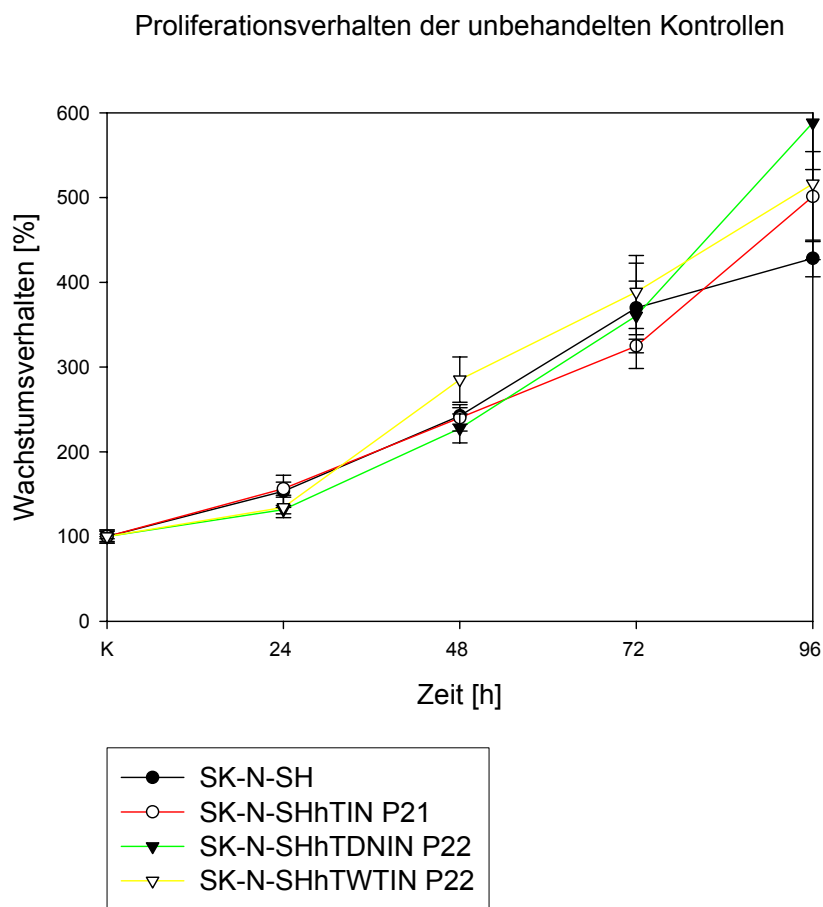


Abb.3.1.8.a: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen für SK-N-SH, SK-N-SHhTIN P21, SK-N-SHhTDNIN P22 und SK-N-SHhTWTIN P22

Das Zytostatikum Etoposid wurde in den Konzentrationen 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM eingesetzt. Die Abb.3.1.8.b zeigt die Wachstumsrate nach 72 Stunden Inkubation mit Etoposid. Dabei konnte für 10 μM Etoposid der Anteil vitaler Zellen von SK-N-SHhTDNIN P22 auf 44,5% verglichen zum Ausgangswert reduziert werden und betrug für SK-N-SHhTWTIN P22 nur noch 12,05 %.

Zytotoxizität nach 72 h

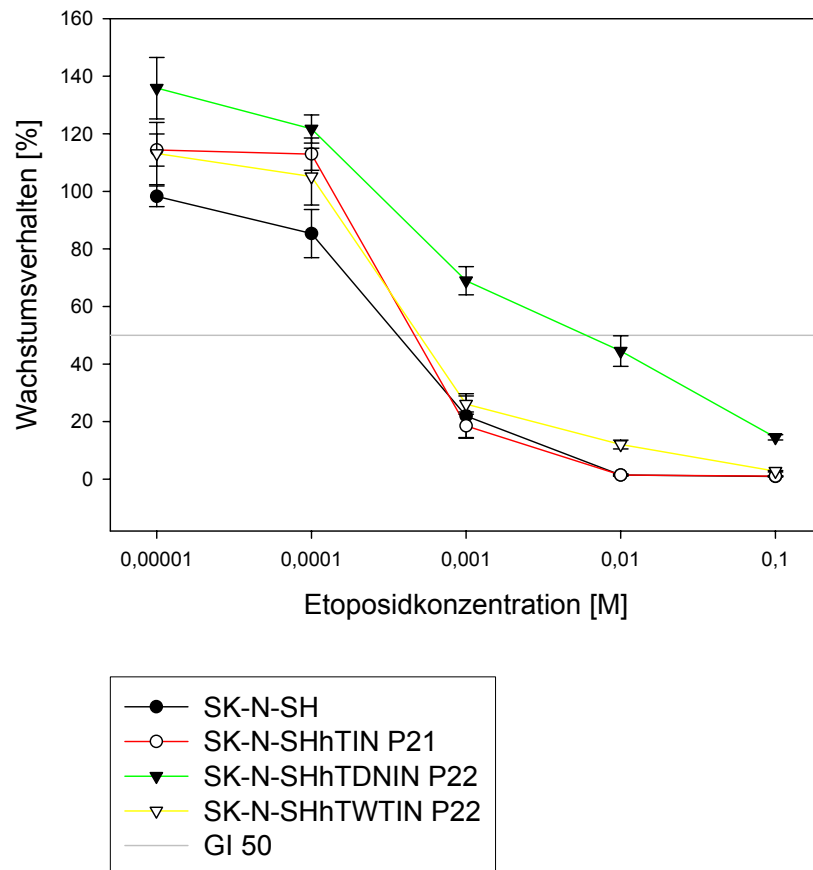


Abb.3.1.8.b: Zytotoxizität verschiedener Etoposidkonzentrationen nach 72 h auf das Zellwachstum von SK-N-SH, SK-N-SHhTIN P21, SK-N-SHhTDNIN P22 und SK-N-SHhTWTIN P22

Die erforderlichen Zytostatikakonzentrationen von Etoposid zum Erreichen der GI_{50} sind in Tabelle 3.1.8.c dargestellt. Diese umfaßten für die Zelllinie SK-N-SHhTDNIN P22 Werte von 92,07 μM nach 24 Stunden bis 0,77 μM nach 96 Stunden, während sie für SK-N-SHhTWTIN P22 bei 9,44 μM nach 24 Stunden und 0,52 μM nach 96 Stunden lagen.

GI ₅₀ ETOPOSID	SK-N-SH	SK-N-SH hTIN P21	SK-N-SH hTDNIN P22	SK-N-SH hTWTIN P 22
24 h	6,43	5,95	92,07	9,44
48 h	1,82	1,51	70,8	2,01
72 h	0,60	0,70	7,98	0,73
96 h	0,38	0,43	0,77	0,52

Tab.3.1.8.c: Etoposidkonzentration, bei der der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle (GI₅₀) nur noch 50 % ist. Die Zytostatikakonzentrationen sind alle in der Einheit μM (mikro Mol) angegeben.

3.2 Zellproliferation und Chemosensitivität nach Transfektion

3.2.1 Zellproliferation nach Transfektion

Die Einführung von hTDNIN in die Zelllinie SK-N-SH führte zunächst zu keiner Wachstumshemmung oder gar vollständigem Wachstumsstopp. Das Wachstumsverhalten von SK-N-SHhTDNIN-Zellen unterschied sich nicht wesentlich von dem Wachstum der Ausgangszelllinie, der Zelllinie mit dem Leervektor oder derjenigen, die hTERT ektop exprimierten. Für SK-N-SHhTWTIN konnte im Vergleich zur Ausgangszelllinie keine eindeutig höhere Wachstumsrate festgestellt werden. Die Wachstumsrate von SK-N-SHhTDNIN war im Vergleich zu SK-N-SHhTWTIN sogar leicht erhöht. SK-N-SH-Zellen, die hTDNIN exprimierten, hörten nicht sofort auf zu proliferieren, sondern proliferierten zunächst weiter bis die Wachstumsrate nach und nach abnahm. Es konnte beobachtet werden, dass das Intervall zwischen dem Passagieren der Zellen zunahm und eine schrittweise Reduktion der Wachstumsrate stattfand bis schließlich um die Passage 28 herum keine weitere Proliferation mehr erfolgte und die Zellen in den Zellkulturflaschen nicht mehr anwuchsen.

Betrachtet man die Telomerasenegative Zelllinie CHLA-90 so hatte die Expression von hTDNIN keinen wesentlichen Effekt auf die Wachstumskinetik verglichen mit der Ausgangszelllinie und der Vektorkontrolle. Dahingegen hatte die Expression von hTWTIN in CHLA-90-Zellen einen stark Proliferations - fördernden Effekt.

3.2.2 Chemosensitivität der Zelllinien CHLA-90 und SK-N-SH

Durch den Vergleich der GI_{50} für die getesteten Zytostatika ließ sich für SK-N-SH-Zellen und CHLA-90-Zellen generell ein Unterschied bezüglich der Chemosensitivität feststellen.

Dabei zeigten SK-N-SH-Zellen im Vergleich zu CHLA-90-Zellen eine höhere Chemosensibilität für die Zytostatikabehandlung mit Cisplatin, Doxorubin und Etoposid. Dieses Ergebnis konnte durch den Vergleich der GI_{50} von SK-N-SH-Zellen mit CHLA-90 Zellen, die beide den Leervektor hTIN trugen, bestätigt werden. Die GI_{50} von SK-N-SH-Zellen und CHLA-90-Zellen sowie der Zellen mit dem Leervektor sind in den Tabellen 3.2.2.a-d dargestellt.

CISPLATIN GI_{50}	CHLA-90	CHLA-90hTIN	SK-N-SH	SK-N-SHhTIN
24h	70,04	88,8	7,36	7,25
48h	39,78	23,65	0,96	0,93
72h	15,29	7,94	0,72	0,65
96h	9,11	6,21	0,53	0,57

Tab.3.2.2.a: Vergleich der Chemosensitivität für Cisplatin zwischen CHLA-90 - und SK-N-SH-Zellen sowie zwischen den Leervektoren hTIN. Die GI_{50} – Werte sind alle in μM angegeben.

DOXORUBICIN GI_{50}	CHLA-90	CHLA-90hTIN	SK-N-SH	SK-N-SHhTIN
24h	2,5	2,3	0,94	0,4
48h	1,8	1,07	0,17	0,13
72h	1,36	0,96	0,02	0,02
96h	0,65	0,36	0,02	0,02

Tab.3.2.2.b: Vergleich der Chemosensitivität für Doxorubicin zwischen CHLA-90 - und SK-N-SH-Zellen sowie zwischen den Leervektoren hTIN. Die GI_{50} – Werte sind alle in μM angegeben.

ETOPOSID GI_{50}	CHLA-90	CHLA-90hTIN	SK-N-SH	SK-N-SHhTIN
24h	100	78,6	6,43	5,95
48h	46,69	69,89	1,82	1,51
72h	6,81	9,76	0,6	0,7
96h	3,74	5,75	0,38	0,43

Tab.3.2.2.c: Vergleich der Chemosensitivität für Etoposid zwischen CHLA-90 - und SK-N-SH-Zellen sowie zwischen den Leervektoren hTIN. Die GI_{50} – Werte sind alle in μM angegeben.

Aus den Tabellen 3.2.2.a-c wird ersichtlich, dass die erforderlichen Zytostatikakonzentrationen für eine Wachstumshemmung von 50% für SK-N-SH-Zellen und die Zellen mit dem Leervektor sehr viel geringer ausfielen als die GI_{50} für CHLA-90-Zellen und die Zelllinie CHLA-90hTIN.

Allerdings konnte darüber hinaus ebenfalls gezeigt werden, dass die Zytostatikabehandlung mit Ifosfamid hinsichtlich der Chemosensitivität eine Ausnahme bildet. Es wiesen sowohl CHLA-90-Zellen als auch Zellen mit dem Leervektor hTIN im Vergleich zu SK-N-SH-Zellen und SK-N-SHhTIN-Zellen eine bessere Chemosensibilität auf. Die GI_{50} für Ifosfamid ist für CHLA-90-Zellen und SK-N-SH-Zellen als auch für die jeweiligen Leervektoren in Tabelle 3.2.2.d dargestellt.

IFOSFAMID GI_{50}	CHLA-90	CHLA-90hTIN	SK-N-SH	SK-N-SHhTIN
24h	5,1	10,83	50,92	49,63
48h	4,77	6,04	35,19	5,22
72h	4,63	6,33	9,76	6,88
96h	3,56	3,88	6,84	6,4

Tab.3.2.2.d: Vergleich der Chemosensitivität für Ifosfamid zwischen CHLA-90- und SK-N-SH - Zellen sowie zwischen den Leervektoren hTIN. Die GI_{50} – Werte sind alle in μ M angegeben.

Bis auf obig erwähnte Ausnahme für Ifosfamid läßt sich abschließend festhalten, dass die Zelllinie SK-N-SH generell als chemosensibler einzustufen ist als CHLA-90-Zellen.

3.2.3 Chemosensitivität von transfizierten CHLA-90 Zellen

Es soll nun beurteilt werden inwieweit die Transfektion von hTWTIN – und hTDNIN – Konstrukten einen Einfluß auf die Chemosensitivität hatte und welche Hinweise aufgrund dessen bezüglich einer möglichen therapeutischen Konsequenz festzuhalten sind.

Die Feststellungen hinsichtlich der Chemosensitivitätsänderungen beziehen sich auf die GI_{50} und setzten die GI_{50} der Vektortransfizierten Zellen zur GI_{50} der Mutterzelllinie in Bezug. Dabei werden nur Änderungen, die größer als der Faktor 2 sind, berücksichtigt und als relevantes Ergebnis hinsichtlich einer Chemosensitivitätsänderung eingestuft.

Für CHLA-90-Zellen ließ sich im Vergleich zur Ausgangszelllinie für die ektope Expression des Enzyms Telomerase weder eine Chemosensitivierung noch eine

Resistenzzunahme bezüglich der Zytotoxizität von Doxorubicin, Cisplatin, Etoposid und Ifosfamid zeigen.

Die Einführung des hTDNIN – Vektorkonstruktes in die Mutterzelllinie CHLA-90 blieb hinsichtlich einer Sensitivitätsänderung für Doxorubicin, Cisplatin, Etoposid und Ifosfamid ebenfalls wirkungslos.

Die gerade beschriebenen Feststellungen sind in Tabelle 3.2.3.a in Faktorform für das Zytostatikum Ifosfamid dargestellt und ergeben sich aus dem Quotienten der GI₅₀ der transfizierten Zelllinie zur Mutterzelllinie.

IFOSFAMID	CHLA-90hTIN	CHLA-90hTDNIN	CHLA-90hTWTIN
24h	2,1	3,4	1,1
48h	1,3	1,8	1,1
72h	1,4	1,8	1,0
96h	1,1	1,7	0,5

Tab.3.2.3.a: X-fache Änderung der GI₅₀ für Ifosfamid bei den transfizierten Zelllinien CHLA-90hTIN, CHLA-90hTDNIN und CHLA-90hTWTIN im Vergleich zur Mutterzelllinie CHLA-90.Cutt Off: Faktor: 2

Der Effekt im Sinne einer verstärkten Chemoresistenz nach 24 h für CHLA-90hTIN und CHLA-90hTDNIN setzt sich bei längerer Nachinkubation nicht fort und hat somit aufgrund der Gesamtgewichtung vermutlich keine Relevanz. Als Kernaussage läßt sich für eine Transfektion von CHLA-90-Zellen mit hTDNIN und hTWTIN festhalten, dass hinsichtlich der Chemosensitivität gegenüber dem Zytostatikum Ifosfamid keine Veränderung im Vergleich zur Mutterzelllinie CHLA-90 nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse für die X-fache Änderung der GI₅₀ für die Zytostatika Cisplatin, Doxorubicin und Etoposid sind in den Tabellen 3.2.3.b-d festgehalten.

CISPLATIN	CHLA-90hTIN	CHLA-90hTDNIN	CHLA-90hTWTIN
24h	1,3	1,4	1,2
48h	0,6	0,8	0,7
72h	0,5	0,6	0,6
96h	0,7	0,6	0,6

Tab.3.2.3.b: X-fache Änderung der GI₅₀ für Cisplatin bei den transfizierten Zelllinien CHLA-90hTIN, CHLA-90hTDNIN und CHLA-90hTWTIN im Vergleich zur Mutterzelllinie CHLA-90. Cutt Off: Faktor: 2

Die X-fache Änderung der GI₅₀ für Cisplatin bestätigt die Kernaussage, dass für eine Transfektion von CHLA-90-Zellen mit hTDNIN und hTWTIN kein Einfluß auf die Chemosensitivität festzustellen war. Der 72h-Wert für CHLA-90hTIN läßt sich nach 96h nicht mehr fortsetzen und auch die 72h und 96h-Werte für CHLA-90hTDNIN und CHLA-90hTWTIN befinden sich lediglich an der Grenze, an der eine Änderung der Chemosensitivität als relevant anzusehen ist.

DOXORUBICIN	CHLA-90hTIN	CHLA-90hTDNIN	CHLA-90hTWTIN
24h	0,9	1,0	1,0
48h	0,6	1,0	0,7
72h	0,7	0,9	0,5
96h	0,6	0,8	0,4

Tab.3.2.3.c: X-fache Änderung der GI₅₀ für Doxorubicin bei den transfizierten Zelllinien CHLA-90hTIN, CHLA-90hTDNIN und CHLA-90hTWTIN im Vergleich zur Mutterzelllinie CHLA-90. Cutt Off: Faktor: 2

Die X-fache Änderung der GI₅₀ für Doxorubicin bestätigt die Kernaussage, dass eine Transfektion von CHLA-90 Zellen mit hTDNIN und hTWTIN vermutlich keine Relevanz für eine Veränderung der Chemosensitivität hat. Der Wert nach 96h Inkubation zeigt für CHLA-90hTWTIN eine Zunahme der Chemosensibilisierung, ist jedoch bei kürzerer Inkubation noch nicht nachweisbar gewesen und insgesamt als eher nicht relevant zu betrachten.

ETOPOSID	CHLA-90hTIN	CHLA-90hTDNIN	CHLA-90hTWTIN
24h	0,8	1,0	0,8
48h	1,5	1,8	1,5
72h	1,4	1,3	5,1
96h	1,5	1,0	1,5

Tab.3.2.3.d: X-fache Änderung der GI₅₀ für Etoposid bei den transfizierten Zelllinien CHLA-90hTIN, CHLA-90hTDNIN und CHLA-90hTWTIN im Vergleich zur Mutterzelllinie CHLA-90. Cutt Off: Faktor: 2

Die X-fache Änderung der GI₅₀ für Etoposid bestätigt ebenfalls die Kernaussage, dass für eine Transfektion von CHLA-90 Zellen mit hTDNIN und hTWTIN kein Einfluß auf die Chemosensitivität festzustellen war. Der Wert nach 72h für CHLA-90hTWTIN zeigt eine Resistenzzunahme gegenüber Etoposid, wobei dies nach 96h Inkubation nicht mehr nachweisbar ist.

Diese Auswertung wurde ebenfalls für die Zelllinien CHLA-90hTDNIN und CHLA-90hTWTIN in Bezug zu CHLA-90hTIN durchgeführt und bestätigte nochmals, dass hTERT keinen Einfluß auf die Chemosensitivität von CHLA-90 Zellen hat.

3.2.4 Chemosensitivität von transfizierten SK-N-SH-Zellen

Bezüglich einer Chemosensitivitätsänderung bei SK-N-SH-Zellen nach Transfektion ist zwischen den einzelnen Chemotherapeutika zu differenzieren, da die Effekte Substanzabhängig unterschiedlich waren. Die Auswertung hierzu erfolgte in analoger Weise wie unter 3.2.3 anhand der Beurteilung durch Faktoren. Als relevant für eine Resistenzzunahme gegenüber einem Chemotherapeutikum wurden ebenfalls Werte die mindestens den Faktor 2 erreichten, angesehen und Faktorwerte, die kleiner als 0,5 waren im Sinne einer Chemosensibilisierung interpretiert.

Für SK-N-SHhTDNIN-Zellen konnte für das Zytostatikum Ifosfamid eine Wachstumshemmung von 50 % (GI₅₀) bereits bei niedrigeren Ifosfamidkonzentrationen erzielt werden, was in Tabelle 3.2.4.a dargestellt ist.

GI ₅₀ IFOSFAMID	SK-N-SH	SK-N-SHhTDNIN
24h	50,92	6,46
48h	35,19	6,34
72h	9,76	5,22
96h	6,84	5,45

Tab.3.2.4.a: Vergleich der GI₅₀ von SK-N-SH und SK-N-SHhTDNIN. Die GI₅₀ ist in μM angegeben.

Es zeigt sich im Vergleich zur Ausgangszelllinie SK-N-SH eine niedrigere GI₅₀ für das Zytostatikum Ifosfamid nach Transfektion mit hTDNIN.

Daraufhin wurde ein Faktorvergleich für die Zelllinien SK-N-SHhTIN, SK-N-SHhTDNIN und SK-N-SHhTWTIN in Bezug zu der Mutterzelllinie SK-N-SH durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2.4.b dargestellt.

IFOSFAMID	SKNSHhTIN	SKNSHhTDNIN	SKNSHhTWTIN
24h	1,0	0,1	1,0
48h	0,1	0,2	0,3
72h	0,7	0,5	0,7
96h	0,9	0,8	0,9

Tab.3.2.4.b: X-fache Änderung der GI₅₀ für Ifosfamid bei den transfizierten Zelllinien SK-N-SHhTIN, SK-N-SHhTDNIN und SK-N-SHhTWTIN im Vergleich zur Mutterzelllinie SK-N-SH. **Cutt Off: Faktor: 2**

Den Faktor 2 berücksichtigend, konnte eine Chemosensibilisierung für die Transfektion von SK-N-SH-Zellen mit dem Vektor hTDNIN im Vergleich zur Mutterzelllinie nachgewiesen werden, welche sich sowohl nach 24h und 48h als auch nach 72h zeigt.

Die X-fache Änderung der GI₅₀ nach 48 h im Sinne einer Chemosensibilisierung zeigt sich in den Zelllinien SK-N-SHhTIN, SK-N-SHhTDNIN als auch SK-N-SHhTWTIN.

Zusammenfassend läßt sich somit festhalten, dass sich durch die Vektorkonstrukte hTDNIN als auch hTWTIN ein Chemosensibilisierender Effekt für Ifosfamid zeigt. Die Chemosensibilisierung durch das Konstrukt hTWTIN deutet an, dass der chemosensibilisierende Effekt nicht ausschließlich als Telomerase-spezifisch zu betrachten ist.

Für die Zytostatika Cisplatin, Doxorubicin und Etoposid konnte beobachtet werden, dass nach Transfektion mit htDNIN im Vergleich zur Mutterzelllinie SKNSH zum Erreichen einer Wachstumshemmung von 50 % höhere Zytostatikakonzentrationen notwendig waren. Dies ist in Tabelle 3.2.4.c-e dargestellt.

GI₅₀ CISPLATIN	SK-N-SH	SK-N-SHhTDNIN
24h	7,36	100
48h	0,96	20,34
72h	0,72	7,46
96h	0,53	0,8

Tab.3.2.4.c:Vergleich der GI₅₀ von SK-N-SH und SK-N-SHhTDNIN. Die GI₅₀ ist in µM angegeben.

Es zeigt sich im Vergleich zur Ausgangszelllinie SK-N-SH eine höhere GI₅₀ für das Zytostatikum Cisplatin nach Transfektion mit hTDNIN.

GI₅₀ DOXORUBICIN	SK-N-SH	SK-N-SHhTDNIN
24h	0,94	2,5
48h	0,17	2,28
72h	0,02	0,12
96h	0,02	0,02

Tab.3.2.4.d:Vergleich der GI₅₀ von SK-N-SH und SK-N-SHhTDNIN. Die GI₅₀ ist in µM angegeben.

Es zeigt sich im Vergleich zur Ausgangszelllinie SK-N-SH eine höhere GI₅₀ für das Zytostatikum Doxorubicin nach Transfektion mit hTDNIN.

GI₅₀ ETOPODSID	SK-N-SH	SK-N-SHhTDNIN
24h	6,43	92,07
48h	1,82	70,8
72h	0,6	7,98
96h	0,38	0,77

Tab.3.2.4.e:Vergleich der GI₅₀ von SK-N-SH und SK-N-SHhTDNIN. Die GI₅₀ ist in µM angegeben.

Es zeigt sich im Vergleich zur Ausgangszelllinie SK-N-SH eine höhere GI₅₀ für das Zytostatikum Etoposid nach Transfektion mit hTDNIN.

Der sich anschließende Faktorvergleich bestätigte die Hinweise für eine Resistenzzunahme gegenüber Cisplatin, Doxorubicin und Etoposid durch Transfektion von SK-N-SH-Zellen mit dem Vektor hTDNIN.

Um die Stärke der Resistenzentwicklung durch den Vektor hTDNIN bei SK-N-SH-Zellen zu verdeutlichen, werden die Faktoren an dieser Stelle für die einzelnen Zytostatika tabellarisch in Tabelle 3.2.4.f-h dargestellt.

CISPLATIN	SK-N-SHhTIN	SK-N-SHhTDNIN	SK-N-SHhTWTIN
24h	1,0	13,6	3,4
48h	1,0	21,2	5,6
72h	0,9	10,4	1,3
96h	1,1	1,5	1,3

Tab.3.2.4.f: X-fache Änderung der GI_{50} für Cisplatin bei den transfizierten Zelllinien SK-N-SHhTIN, SK-N-SHhTDNIN und SK-N-SHhTWTIN im Vergleich zur Mutterzelllinie SK-N-SH. Cutt Off: Faktor: 2

Die 24h, 48h, 72h und 96h Werte zeigen gegenüber dem Zytostatikum Cisplatin für die Zelllinie SK-N-SHhTDNIN eine eindeutige Resistenzentwicklung. Gleichzeitig wird ersichtlich, dass es in SK-N-SHhTIN-Zellen weder zu einem Effekt im Sinne einer Chemosensibilisierung kam, noch eine Zunahme von Resistenzen zu verzeichnen war.

Für die Expression des Konstruktes hTWTIN in SK-N-SH-Zellen zeigte sich nach 24h und 48h eine Resistenzzunahme gegenüber Cisplatin, wobei sich dieser Effekt nach längerer Inkubationszeit nicht mehr nachweisen ließ.

DOXORUBICIN	SK-N-SHhTIN	SK-N-SHhTDNIN	SK-N-SHhTWTIN
24h	0,4	2,7	0,7
48h	0,8	13,4	1,0
72h	1,0	6,0	1,0
96h	1,0	1,0	1,0

Tab.3.2.4.g: X-fache Änderung der GI_{50} für Doxorubicin bei den transfizierten Zelllinien SK-N-SHhTIN, SK-N-SHhTDNIN und SK-N-SHhTWTIN im Vergleich zur Mutterzelllinie SK-N-SH. Cutt Off: Faktor 2.

Gegenüber Doxorubicin zeigte sich bei der Zelllinie SK-N-SHhTDNIN nach 24h, 48h und 72h durch die Transfektion im Vergleich zur Mutterzelllinie eine Zunahme der Resistenzentwicklung.

Für die Zelllinien SK-N-SHhTIN konnte nach 24h eine Chemosensibilisierung im Vergleich zur Mutterzelllinie beobachtet werden, die sich jedoch nach längerer Inkubation nicht kontinuierlich beobachten ließ.

Für SK-N-SHhTWTIN konnte weder ein Effekt im Sinne einer Chemosensibilisierung noch im Sinne einer Resistenzzunahme nachgewiesen werden.

ETOPOSID	SK-N-SHhTIN	SK-N-SHhTDNIN	SK-N-SHhTWTIN
24h	0,9	14,3	1,5
48h	0,8	38,9	1,1
72h	1,2	13,3	1,2
96h	1,1	2,0	1,4

Tab.3.2.4.h: X-fache Änderung der GI_{50} für Etoposid bei den transfizierten Zelllinien SK-N-SHhTIN, SK-N-SHhTDNIN und SK-N-SHhTWTIN im Vergleich zur Mutterzelllinie SK-N-SH. Cutt Off: Faktor 2

Eine Resistenzzunahme durch den Vektor hTDNIN in SK-N-SH-Zellen im Vergleich zur Mutterzelllinie konnte auch gegenüber Etoposid nach 24h, 48h, 72h und 96h beobachtet werden.

Für die Zelllinien SK-N-SHhTIN und SK-N-SHhTWTIN konnte im Vergleich zur Mutterzelllinie weder ein Effekt im Sinne einer Chemosensibilisierung noch im Sinne einer Resistenzzunahme nachgewiesen werden.

Zusammenfassend läßt sich somit festhalten, dass Chemosensitivitätsänderungen nach Transfektion Substanz - spezifisch zu bewerten sind. So führte die Transfektion mit dem Vektor hTDNIN bei SK-N-SH-Zellen zu einer Zunahme der Chemosensitivität gegenüber dem Zytostatikum Ifosfamid, während gegenüber Cisplatin, Doxorubicin und Etoposid eine Resistenzzunahme zu beobachten war.

Interessant ist darüber hinaus die Beobachtung, dass die ektope Transfektion von hTERT in SKNSH Zellen keinen Einfluß auf die Chemosensitivität zeigte. Dabei ist die Auswirkung der retroviralen Transfektion mit hTWTIN für die verschiedenen getesteten

Zytostatika in Vergleich mit der Ausgangszelllinie SK-N-SH und SKNSHhTIN gesetzt worden.

3.3 Telomerenlängenbestimmung

Hypothetisch wird davon ausgegangen, dass die ektope Expression von hTERT (hTWTIN) zu einer Verlängerung bzw. Konstanthaltung der Chromosomenenden führen würde, während eine Hemmung der Expression von hTERT durch den Vektor hTDNIN Telomerasehemmung mit nachfolgender Telomerverkürzung nach sich zieht.

3.3.1 Southern Blot 1

Bei dem optischen Vergleich der TRF der Ausgangszelllinie CHLA-90 und Zellen, welche mit dem IN-Leervektor oder mit Vektor DN-hTERT transfiziert worden waren, konnte kein Unterschied in der Länge der terminalen Restriktionsfragmente im Sinne einer Verkürzung von Telomeren festgestellt werden. Die Telomerenlänge der Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren, stellte sich im optischen Vergleich zur nicht transfizierten Mutterzelllinie nicht signifikant unterschiedlich dar. Die Beobachtung, dass CHLA-90-Zellen, die mit dem DN-hTERT-Konstrukt transfiziert worden sind, optisch keine Änderung hinsichtlich ihrer Telomerenlänge zeigten, ließ die Annahme zu, dass Telomerasehemmung in Zellen, welche ihre Telomeren über den Telomeraseunabhängigen ALT Mechanismus verlängern, keinen Einfluss auf die Telomere und die Länge der terminalen Restriktionsfragmente hat.

Vergleicht man die TRF der CHLA-90-Zellen, die mit dem WT-hTERT-Konstrukt transfiziert worden waren, so fand sich im Vergleich zur Ausgangszelllinie eine Verlängerung der Telomeren.

Neben dieser optischen Auswertung der Länge der terminalen Restriktionsfragmente wurde deren Länge mit Hilfe des Auswertungsprogrammes Telorun ermittelt. Hierbei konnte bestätigt werden, dass für Zellen mit dem Vektorkonstrukt hTWTIN eine Telomerverlängerung stattfand. So errechnete das Programm Telorun für die Zelllinien CHLA-90hTWTIN P42 (Probe 7) eine Basenpaarlänge von 5,5 kbp, während für die zu vergleichende Ausgangszelllinie CHLA-90 (Probe 4) die Bestimmung der Länge des terminalen Restriktionsfragmentes einen Wert von 4,7 kbp ergab. Diese Beobachtung konnte im gleichen Versuch nochmals bestätigt werden. Hierbei wird für die Ausgangszelllinie CHLA-90 (Probe 8) der Wert 4,0 kbp ermittelt und im Vergleich für

CHLA-90hTWTIN P45 (Probe 11) eine Länge von 4,7 kbp für das TRF bestimmt.

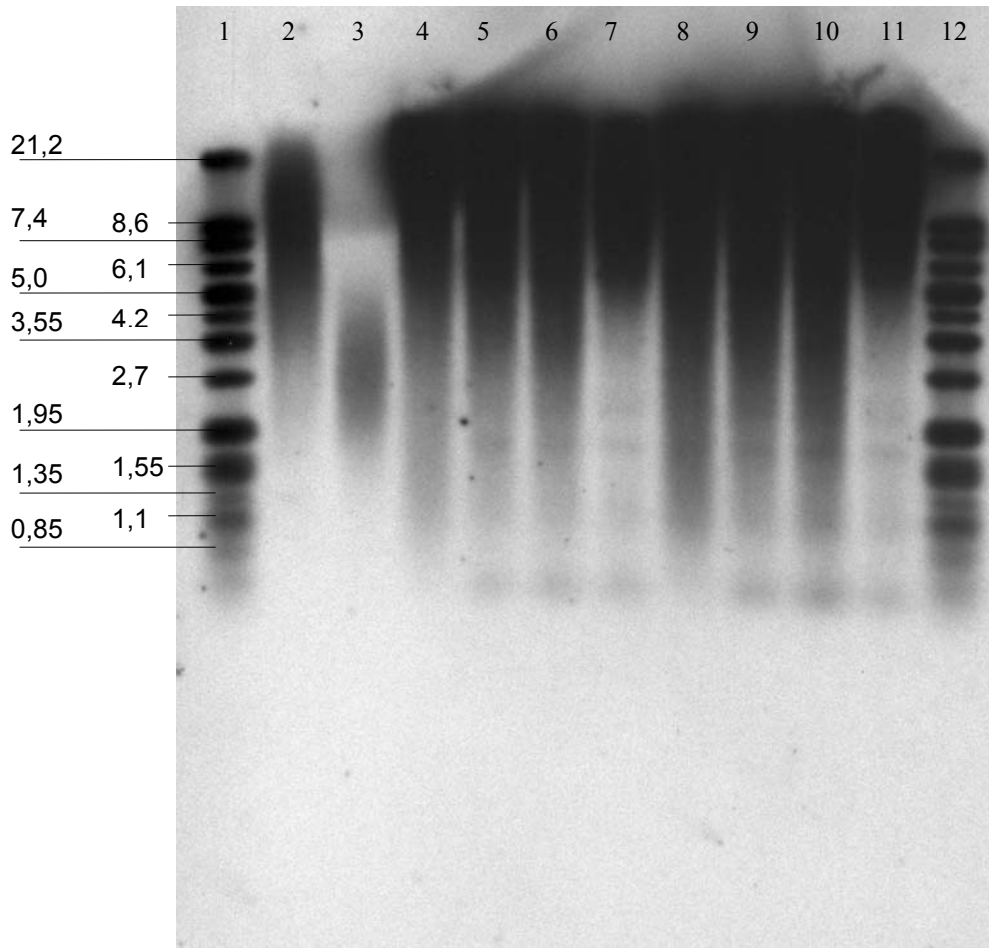


Abb.3.3.1: Telomerenlängenblot der Neuroblastomzelllinien CHLA-90. Bezüglich der TRF lassen sich signifikante Unterschiede im Vergleich transfizierter und untransfizierter Zellen nachweisen.

Die Werte für die TRF sind in kbp (Kilobasenpaare) angegeben.

- Legende:**
- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1: DIG weight marker, | 8: CHLA-90: 3,9 kbp, |
| 2: DNA high: 5.5 kbp, | 9: CHLA-90hTIN P40:4,0 kbp |
| 3: DNA low: 3,2 kbp | 10:CHLA-90hTDNIN P 42: 3,6 kbp, |
| 4: CHLA-90: 4,7 kbp, | 11: CHLA-90hTWTIN P 45: 4,7 kbp |
| 5: CHLA-90hTIN P41:4,8 kbp | 12: DIG weigth marker |
| 6:CHLA-90hTDNIN P 39: 4,7 kbp, | |
| 7: CHLA-90hTWTIN P 42: 5,5 kbp | |

Für die Zellen, die mit dem Vektor hTDNIN transfiziert waren, konnte äquivalent zur optischen Auswertung für CHLA-90hTDNIN P39 (Probe 6) keine Verkürzung der

Telomerenlänge im Vergleich mit der Ausgangszelllinie (Probe 4) festgestellt werden. Zum anderen zeigte sich für CHLA-90hTDNIN P42 (Probe 10) im Vergleich zur Ausgangszelllinie CHLA-90 (Probe 8), die eine Länge der TRF von 3,9 kbp zeigte, eine geringgradige Telomerverkürzung auf 3,6 kbp bei Auswertung mit dem Programm Telorun.

3.3.2 Southern Blot 2

Für CHLA-90hTWTIN P52 (Probe 7) und CHLA-90hTWTIN P60 (Probe 11) ließ sich eine deutliche Verlängerung der terminalen Restriktionsfragmente bereits durch optische Betrachtung nachweisen. Dahingegen konnte für Zellen, die den Vektor hTDNIN trugen keine Telomerverkürzung eindeutig beschrieben werden.

Die Tabelle 3.3.2 zeigt die Verteilung der terminalen Restriktionsfragmente in den Zelllinien CHLA-90hTWTIN und CHLA-90hTDNIN in verschiedenen Passagen. Dabei wird zum einen die Heterogenität der Länge der terminalen Restriktionsfragmente ersichtlich, als auch die Verlängerung der Telomeren durch hTERT nochmals verdeutlicht. Die Berechnung der Länge der terminalen Restriktionsfragmente erfolgte hierbei durch das Programm Telorun.

Southern Blot2	CHLA-90 hTWTIN P42	CHLA-90 hTWTIN P45	CHLA-90 hTDNIN P39	CHLA-90 hTDNIN P42
Telomerenlänge	5,5 kbp	4,7 kbp	4,7 kbp	3,6 kbp
Southern Blot 4	CHLA-90 hTWTIN P52	CHLA-90 hTWTIN P60	CHLA-90 hTDNIN P49	CHLA-90 hTDNIN P57
Telomerenlänge	8,9 kbp	9,6 kbp	Nicht auswertbar	5,2 kbp

Tab.3.3.2: Telomerenlängenverteilung in den Zelllinien CHLA-90hTWTIN und CHLA-90hTDNIN in verschiedenen Passagen. Die Berechnung der Länge der terminalen Restriktionsfragmente erfolgte mit dem Programm Telorun.

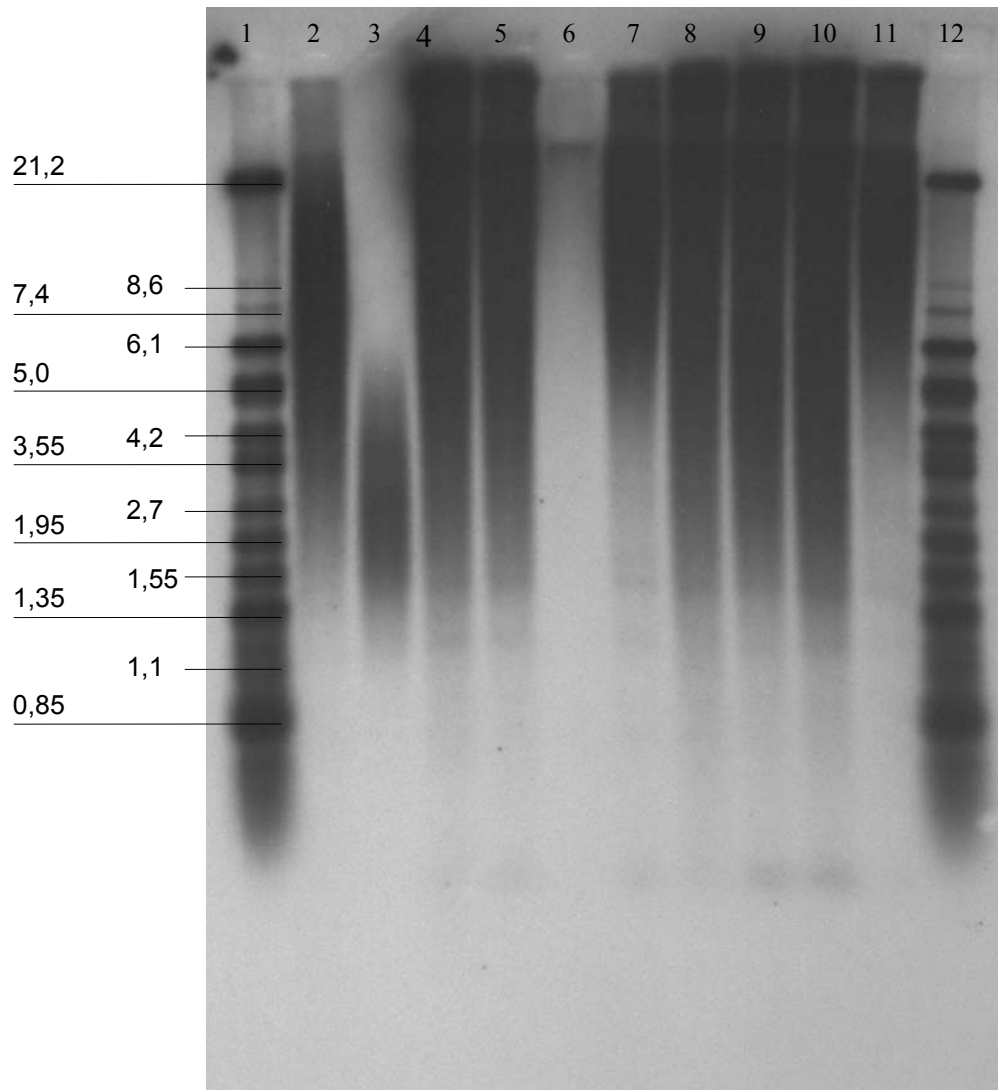


Abb.3.3.2: Telomerenlängenblot der Neuroblastomzelllinien CHLA - 90. Bezüglich der TRF lassen sich signifikante Unterschiede im Vergleich transfizierter und untransfizierter Zellen nachweisen. Die Werte für die Telomerenrestriktionsfragmente sind in kbp (Kilobasenpaare) angegeben.

- Legende:**
- | | |
|--|--------------------------------|
| 1: DIG weight marker, | 11: CHLA-90hTWTIN P60: 9,6 kbp |
| 2: DNA high: 5,4 kbp, | 12: DIG weight marker |
| 3: DNA low: 4,3 kbp | |
| 4: CHLA-90: 6,0 kbp, | |
| 5: CHLA-90hTIN P51: 6,6 kbp | |
| 6:CHLA-90hTDNIN P49: nicht auswertbar, | |
| 7: CHLA-90hTWTIN P52: 8,9 kbp | |
| 8: CHLA-90: 5,9 kbp, | |
| 9: CHLA-90hTIN P59: 6,0 kbp | |
| 10: CHLA-90hTDNIN P57: 5,2 kbp, | |

3.3.3 Southern Blot 3

Allein bei optischer Betrachtung war eine deutliche Verlängerung der terminalen Restriktionsfragmente für SK-N-SHhTWTIN offensichtlich. Jedoch war eine Telomerenverkürzung von Zellen, die den Vektor hTERTDNIN trugen, im Vergleich zu Zellen mit dem Leervektor oder gar zur Ausgangszelllinie SK-N-SH, nicht eindeutig festgestellt worden. Vielmehr könnte man rein optisch betrachtet, vermuten, dass die Telomere von Zellen mit dem Vektorkonstrukt hTERTDNIN gar über geringgradig längere Telomere verfügen als die Kontrollzellen mit dem Leervektor.

Die Auswertung mit dem Programm Telorun zeigte für die Länge der terminalen Restriktionsfragmente eine deutliche Zunahme der Telomerenlängen für Zellen mit dem Vektor hTWTIN. Hierbei zeigte sich für die Ausgangszelllinie SK-N-SH (Probe 4) eine Telomerenlänge von 4,7 kbp, während die Zelllinie SK-N-SHhTWTIN P21 (Probe 7) mit 15 kbp deutlich darüber lag. Dieses Ergebnis konnte für die Zelllinie SK-N-SH (Probe 8), welche 3,8 kbp verzeichnete, und die Zelllinie SK-N-SHhTWTIN P23 (Probe 11) mit 14,2 kbp bestätigt werden.

Der Vergleich der Telomerenlängen von Zelllinien mit dem Vektor hTDNIN und der Zelllinie mit dem Leervektor bot optisch keinen Anhalt für die Annahme einer Telomerverkürzung durch den Vektor hTDNIN. Die Auswertung mit dem Programm Telorun allerdings lieferte eine Telomerenlänge von 4,3 kbp sowohl für SK-N-SHhTIN P20 als auch für SK-N-SHhTDNIN P21. Somit konnte im Vergleich zur Ausgangszelllinie, die eine TRF - Länge von 4,7 kbp zeigte, durch die TRF-Berechnung mittels des Programmes Telorun auf eine Telomerverkürzung hingewiesen werden. Betrachtet man die Länge der TRF für die Probe SK-N-SHhTDNIN P27, so lieferte die Berechnung mit Telorun eine Verkürzung der TRF – Länge auf 3,2 kbp.

Southern Blot 3	SK-N-SH hTWTIN P21	SK-N-SH hTWTIN P23	SK-N-SH hTDNIN P21	SK-N-SH hTDNIN P27
Telomerenlänge	15 kbp	14,2 kbp	4,3 kbp	3,2 kbp

Tab.3.3.3: Telomerenlängenverteilung in den Zelllinien SK-N-SHhTWTIN und SK-N-SHhTDNIN in verschiedenen Passagen. Die Berechnung der Länge der terminalen Restriktionsfragmente erfolgte mit dem Programm Telorun.

In Tabelle 3.3.3 wird nochmals verdeutlicht, dass sich die Längen der terminalen Restriktionsfragmente für Zellen mit dem Vektor hTDNIN und solchen mit dem Vektor hTWTIN deutlich unterscheiden und eine Telomerverlängerung durch die ektope Expression von hTERT eindeutig gegeben war.

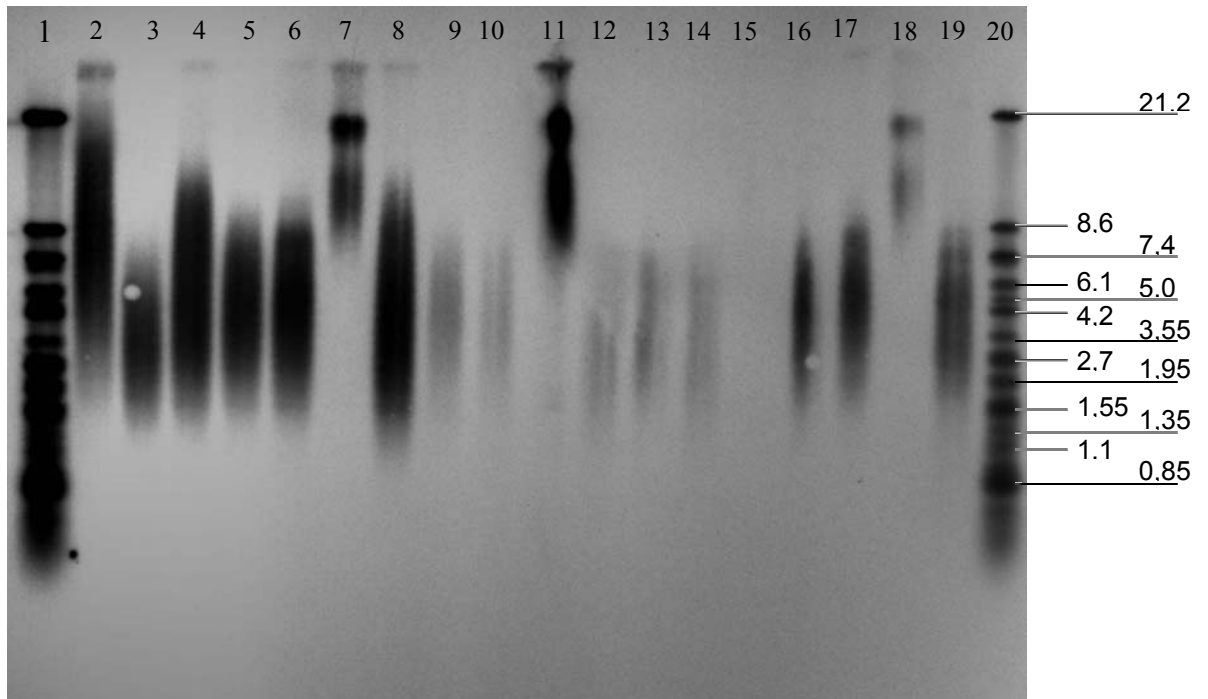


Abb.3.3.3: Telomerenlängenblot der Neuroblastomzelllinien SKNSH. Bezüglich der TRF lassen sich signifikante Unterschiede im Vergleich transfizierter zu untransfizierter Zellen nachweisen. Die Werte für die Telomerenrestriktionsfragmente sind in kbp (Kilobasenpaare) angegeben.

Legende:

- | | |
|--|--|
| 1 und 20: DIG weight marker, | 11: SK-N-SHhTWTIN P23: 14,2 kbp |
| 2: DNA high: 6,7 kbp, 3: DNA low: 3,6 kbp | 12: SK-N-SH: 4,3 kbp, |
| 4: SK-N-SH: 4,7 kbp, | 13: SK-N-SHhTIN P28: 4,7 kbp |
| 5: SK-N-SHhTIN P20: 4,3 kbp, | 14:SK-N-SHhTDNIN P 26: 4,7 kbp, |
| 6:SK-N-SHhTDNIN P21: 4,3 kbp, | 15: SK-N-SHhTWTIN P29: nicht auswertbar |
| 7: SK-N-SHhTWTIN P21: 15 kbp, | 16: SK-N-SHhTIN P20: 4,3 kbp, |
| 8: SK-N-SH: 3,8 kbp, | 17: SK-N-SHhTDNIN P21: 4,6 kbp |
| 9: SK-N-SHhTIN P22: 4,9 kbp, | 18: SK-N-SHhTWTIN P21: 16,7 kbp |
| 10: SK-N-SHhTDNIN P23: 6,2 kbp, | 19: SK-N-SHhTDNIN P27: 3,2 kbp |

Dahingegen konnte eine Telomerverkürzung durch den Vektor hTDNIN im Vergleich mit der Ausgangszelllinie nicht eindeutig festgestellt werden, wobei sich jedoch die

Tendenz einer Telomerverkürzung beim Vergleich unterschiedlicher Passagen von SK-N-SHhTDNIN vermuten ließ.

3.3.4 Southern Blot 4

Bei Betrachtung der in diesem Blot gezeigten Proben kann eine Telomerverlängerung durch hTERT nochmals bestätigt werden.

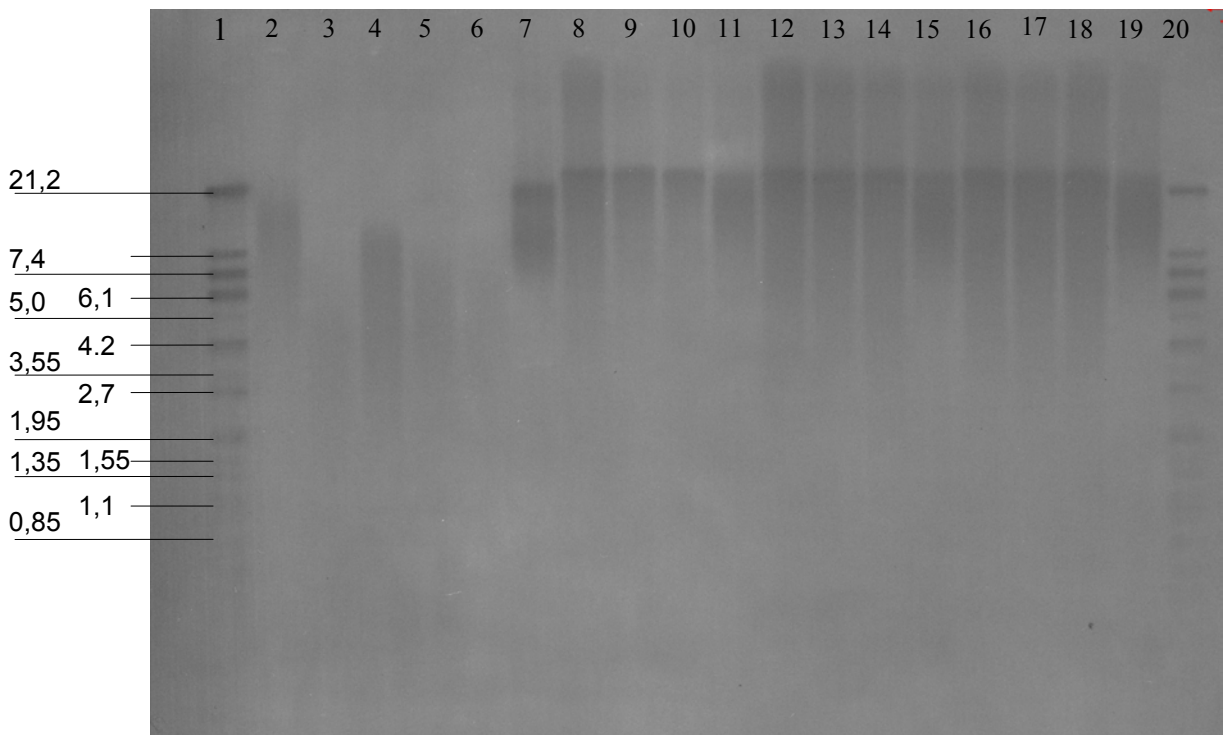


Abb.3.3.4: Telomerenlängenblot der Neuroblastomzelllinien SKNSH und CHLA. Bezüglich der TRF lassen sich signifikante Unterschiede im Vergleich transfizierter und untransfizierter Zellen nachweisen. Die Werte für die Telomerenrestriktionsfragmente sind in kbp (Kilobasenpaare) angegeben.

Legende:

- | | |
|---|----------------------------------|
| 1 u 20: DIG weight marker, | 12: CHLA- 90: 13,9 kbp, |
| 2: DNA high: 7,9 kbp, 3: DNA low: 5,6 kbp | 13: CHLA-90hTIN P41: 13,7 kbp |
| 4: SK-N-SH: 5,8 kbp, 5: SK-N-SHhTIN P22: 6,3 kbp, | 14:CHLA-90hTDNIN P39: 12,0 kbp, |
| 6: SK-N-SHhTDNIN P23: 4,2 kbp,. | 15: CHLA-90hTWTIN P42: 15,9 kbp, |
| 7: SK-N-SHhTWTIN P23: 12,4 kbp, | 16: CHLA-90: 14,2 kbp, |
| 8: CHLA-90: 11,2 kbp, 9: CHLA-90hTIN P51: 14,1 kbp, | 17: CHLA-90hTIN P40: 12,5 kbp |
| 10: CHLA-90hTDNIN P23:18,8 kbp, | 18: CHLA-90hTDNIN P42: 13,7 kbp, |
| 11: CHLA-90hTWTIN P52: 17,9 kbp, | 19: CHLA-90hTWTIN P45: 15,9 kbp, |

Für SK-N-SHhTDNIN P23 (Probe 6) fand sich eine Länge von 4,2 kbp und für SK-N-SHhTWTIN P23 (Probe 7) eine Länge von 12,4 kbp. Zusätzlich ließ sich zu dem optischen Eindruck einer Telomerverkürzung durch den Vektor hTDNIN gegenüber der Ausgangszelllinie und derjenigen mit dem Leervektor selbige auch durch die mittels Telorun ermittelte TRF-Länge bestätigen. Dabei berechnete sich für SK-N-SH (Probe 4) eine TRF - Länge von 5,8 kbp und für SK-N-SHhTIN (Probe 5) eine Länge von 6,3 kbp.

Die Beurteilung der bereits zuvor festgestellten Beobachtungen für die Zelllinie CHLA-90 sowie der zugehörigen transfizierten Zellen lieferte aufgrund der Qualität der Darstellung keine neuen Erkenntnisse und zeigte im Wesentlichen bei genauer Betrachtung eine Telomerverlängerung durch die ektope Expression von hTERT wie sie bereits in vorausgehenden Versuchen beschrieben werden konnte und an dieser Stelle nicht nochmals ausgeführt wird.

Generell ist zu diesem letzten Southern Blot anzumerken, dass eine genaue Berechnung der TRF mit dem Programm Telorun in diesem Fall als problematisch anzusehen war. Dies begründet sich darin, dass die Signalintensität der Proben verglichen mit den vorausgehenden Southern Blots wesentlich geringer ausfiel und man aufgrund des geringeren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses keine valide TRF Quantifizierung treffen konnte.

3.4 Telomeraseaktivität

Parallel dazu wurden die Zelllinien auf Telomerase-Aktivität untersucht, um festzustellen, ob die Vektor - transfizierten Zellen tatsächlich den entsprechenden Vektor exprimieren oder nicht. Dies war notwendig, um den Zusammenhang zwischen Telomerase-Aktivität und Zytostatika-Toxizität bzw. Telomerenlänge überprüfen zu können.

Die Telomeraseaktivität stellt sich graphisch als Telomerenleiter dar. Während die blaue Kurve die Telomeren der getesteten Probe zeigt, spiegelt die rote Kurve den mitgeführten Rox-Standard wieder. Um später die für die unterschiedlichen Zelllinien festgestellte relative Telomeraseaktivität zu beurteilen, wird das Verhältnis der Peak - Fläche der synthetisierten Telomeren ins Verhältnis zur Peak - Fläche des mitgeführten Standards gesetzt.

Für die Mutterzelllinie SK-N-SH sowie die zugehörigen transfizierten Zelllinien mit dem Leervektor IN als auch derjenigen, die ektop hTERT exprimierten (hTWTIN), sind stets Telomeraseaktivität nachweisbar gewesen. Dies soll in den Abbildungen 3.4.a und 3.4.b beispielhaft, auch in Vertretung für die anderen getesteten Proben, dargestellt werden. Man erkennt in beiden Fällen deutlich die „Telomerenleiter“.

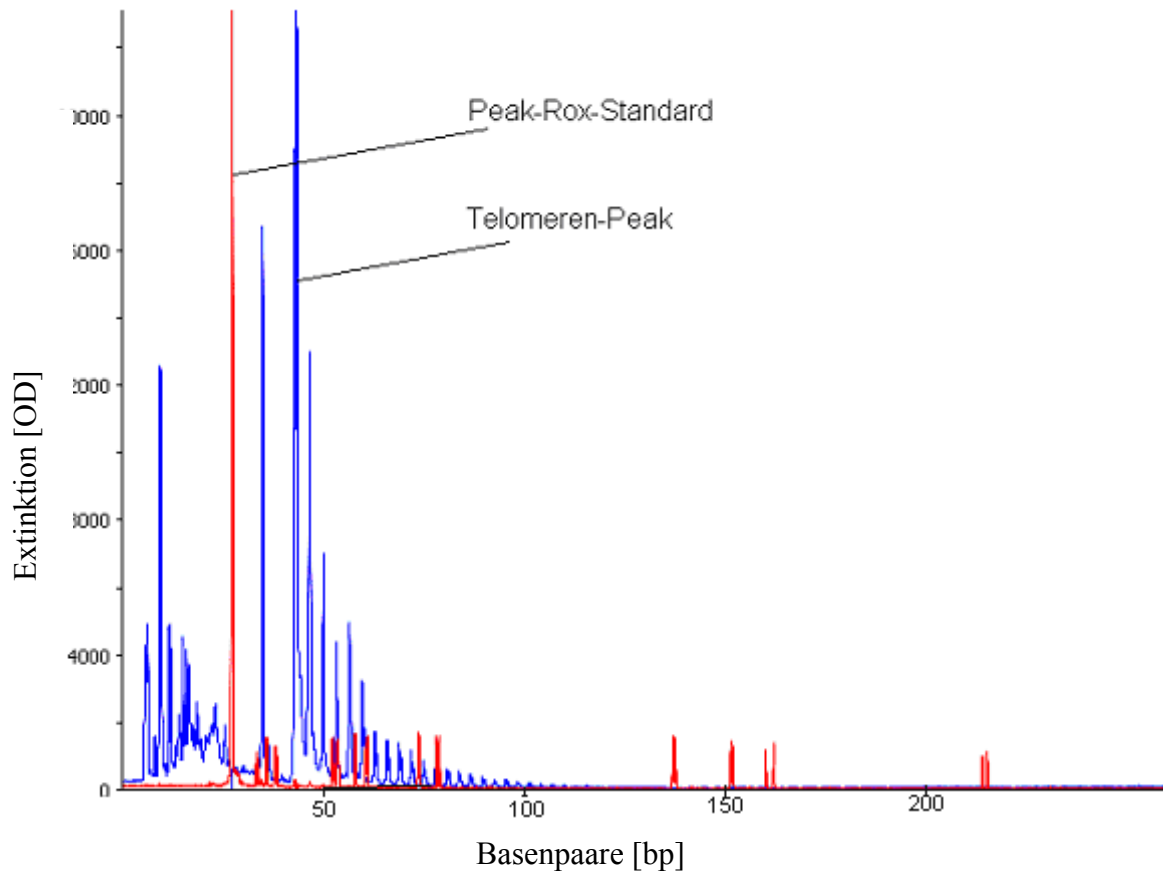


Abb.3.4.a: Telomeraseaktivität bei SK-N-SH

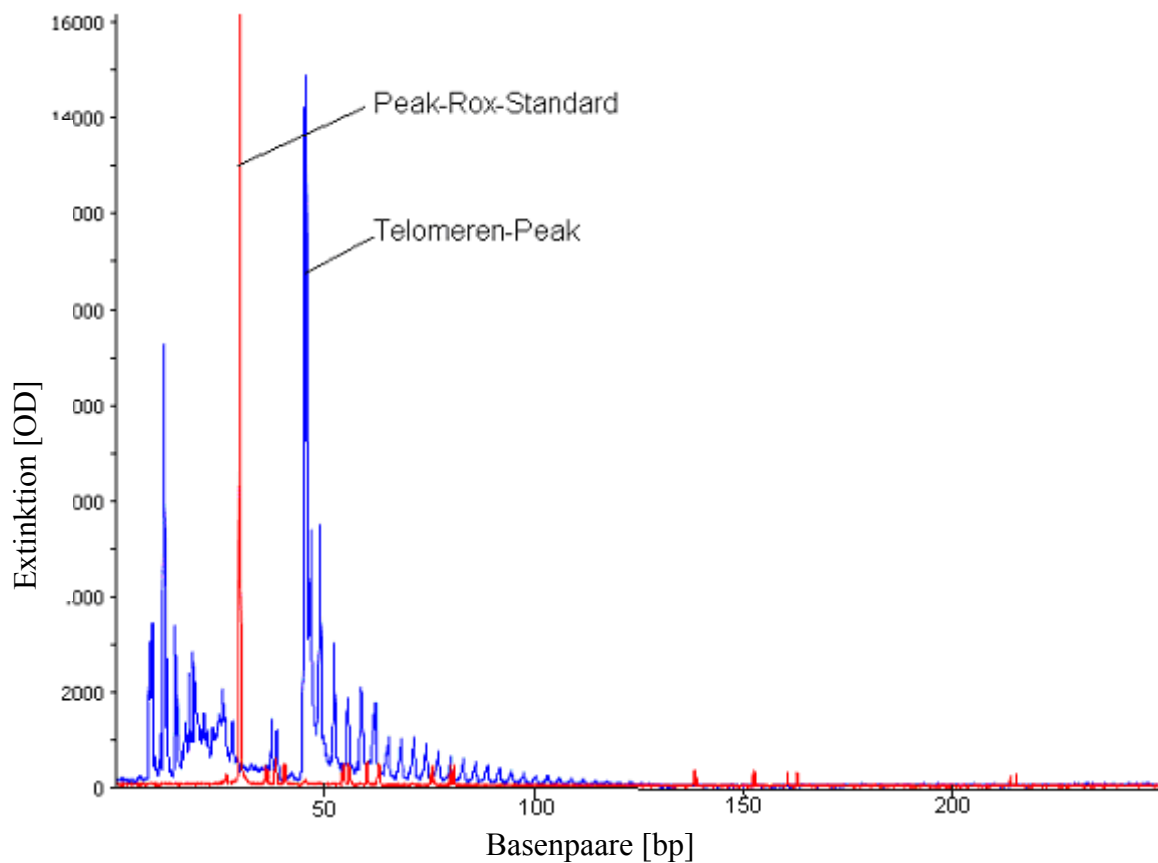


Abb.3.4.b: Telomeraseaktivität bei SK-N-SHhTWTIN P22

Ebenso erfolgte in Abbildung 3.4.c die Darstellung über den fehlenden Nachweis von Telomeraseaktivität für Zellen, die den Vektor hTDNIN trugen. In der angeführten Abbildung ist keine Telomerenleiter ersichtlich und es konnte somit davon ausgegangen werden, dass die Vektortransfektion erfolgreich war und demnach keine Telomeraseaktivität vorlag.

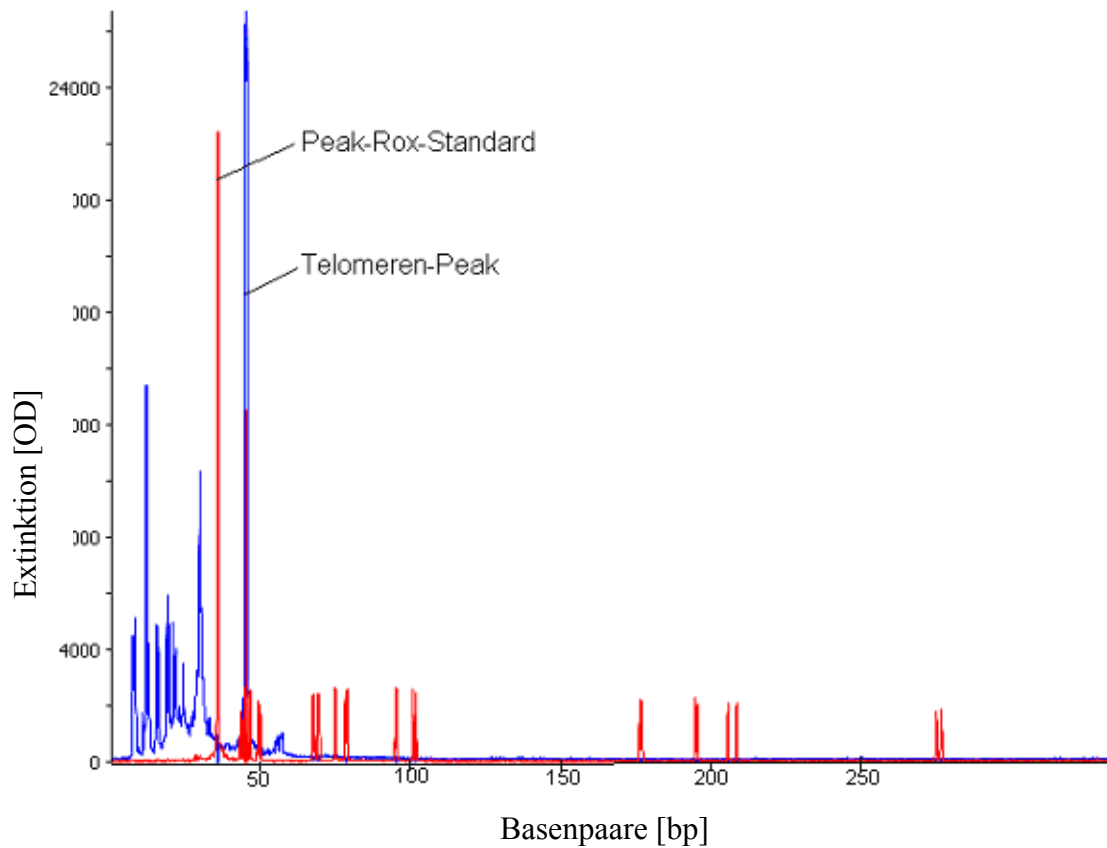


Abb.3.4.c:Fehlende Telomeraseaktivität bei SK-N-SHhTDNIN P26

Die telomerasenegative Zelllinie CHLA-90 sowie die zugehörigen transfizierten Zelllinien wurden ebenfalls auf Telomeraseaktivität untersucht. Hierbei konnte für die Zelllinien, die mit hTWTIN transfiziert worden waren, Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. Beispielhaft ist dies in Abbildung 3.4.d auch in Vertretung für die anderen verwendeten Zellen dargestellt. Die Transfektion mit dem Vektor hTWTIN ist somit erfolgreich gewesen.

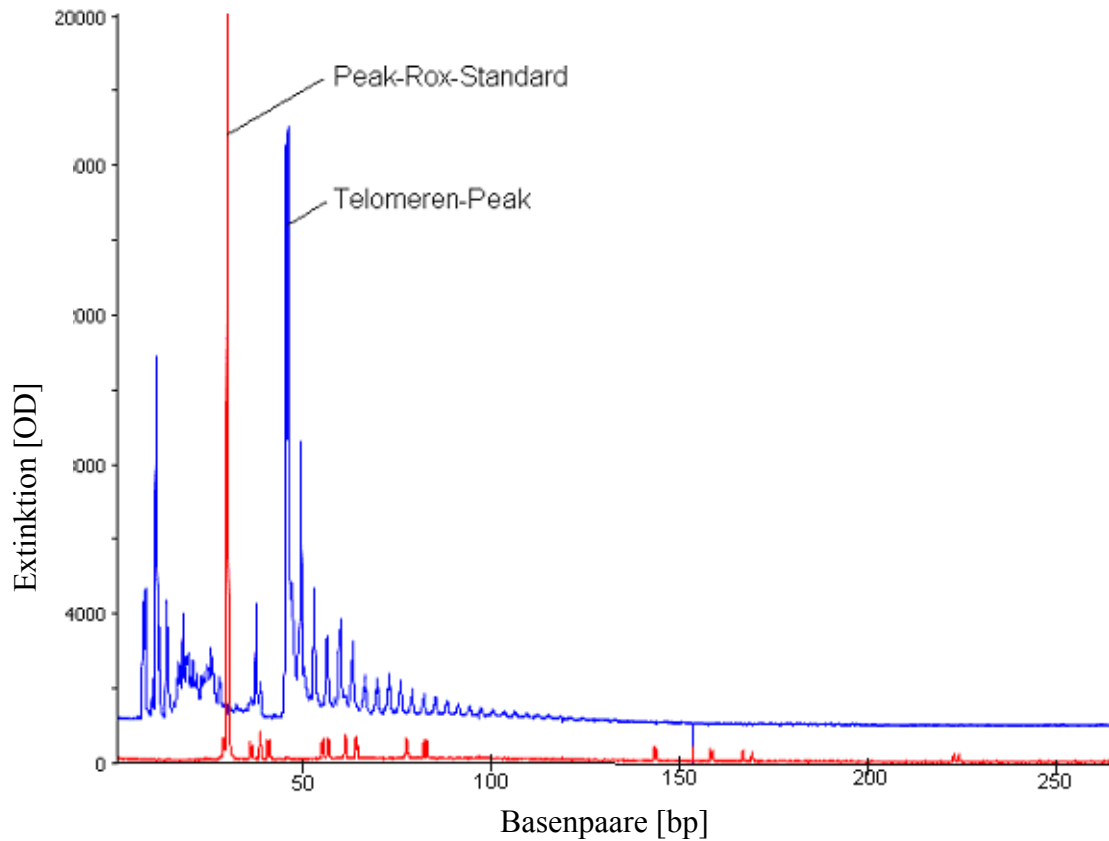


Abb.3.4.d: Telomeraseaktivität bei CHLA-90hTWTIN P45

Parallel dazu wird in Abbildung 3.4.e der fehlende Nachweis von Telomeraseaktivität für die Telomerasenegative Mutterzelllinie CHLA-90 dargestellt. Darüberhinaus gilt die gleiche Darstellung auch für CHLA-90-Zellen, die mit dem Leervektor IN und dem Vektor hTDNIN transfiziert wurden. Beispielhaft wird dies graphisch in Abbildung 3.4.f verdeutlicht und gilt somit auch in Vertretung für all die anderen getesteten Zellen.

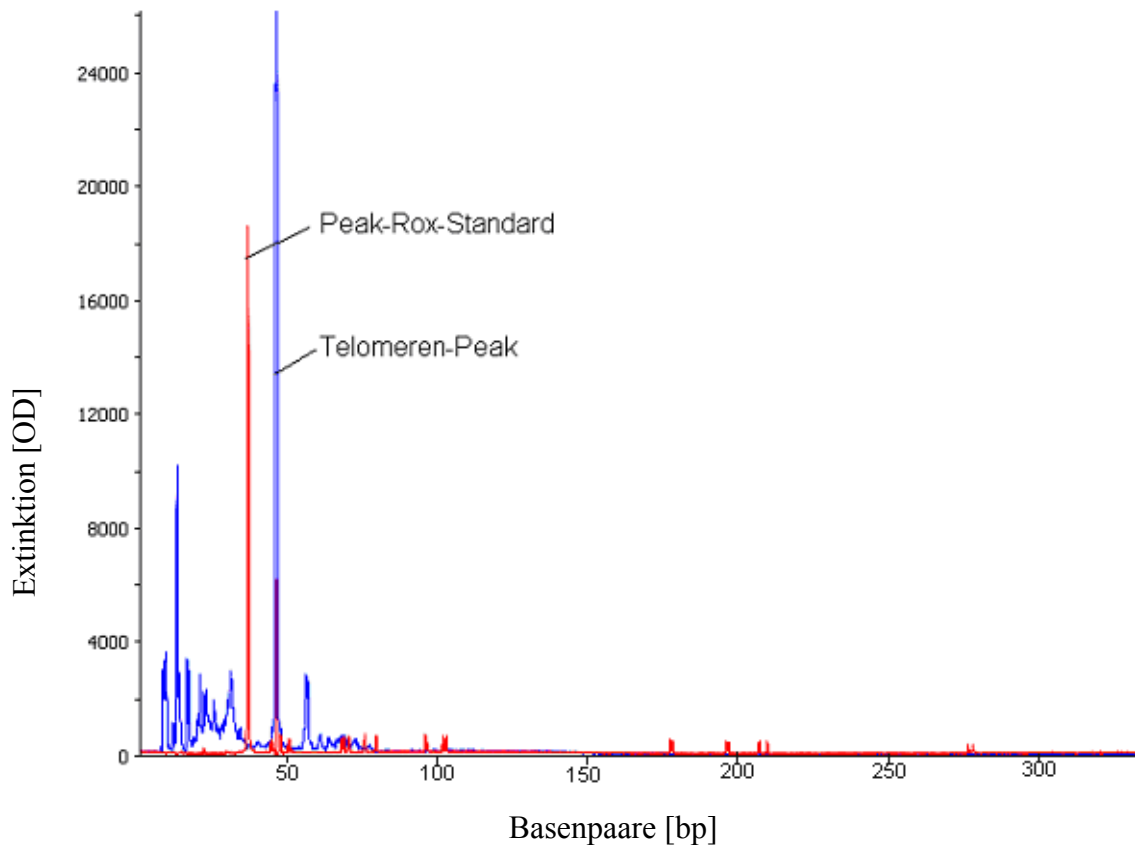


Abb.3.4.e: Fehlende Telomeraseaktivität bei CHLA-90

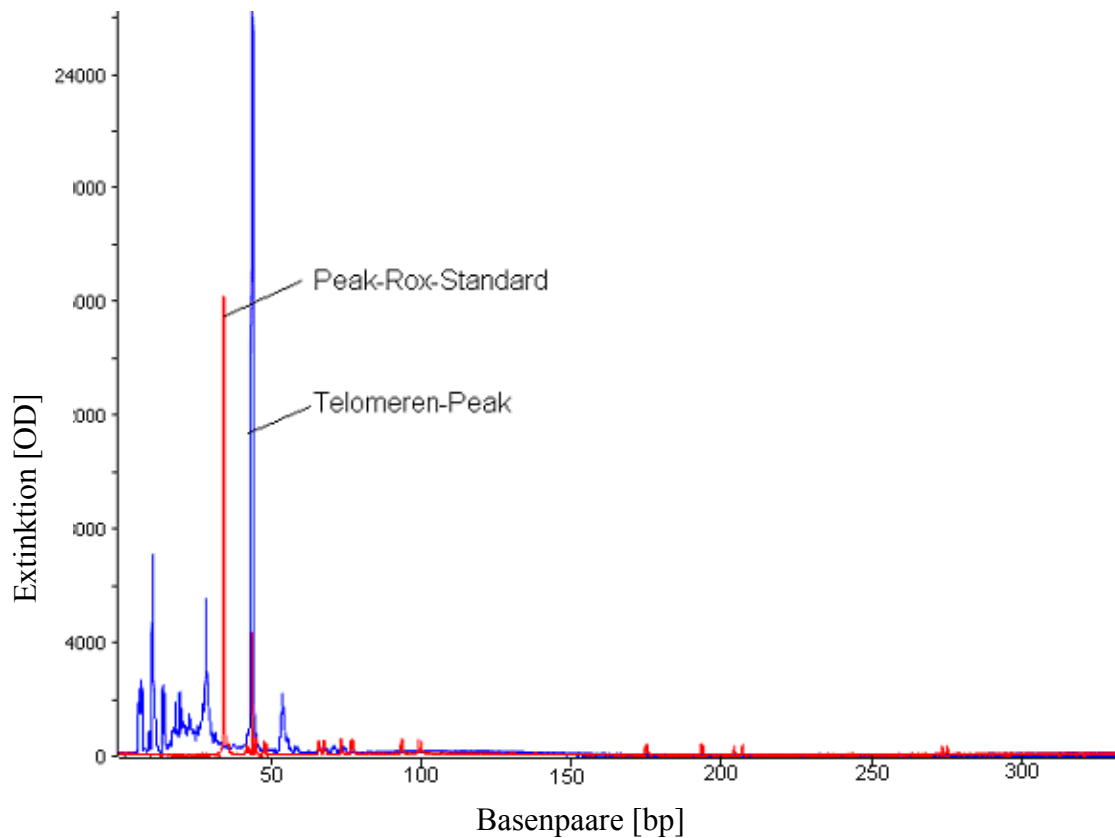


Abb.3.4.f: Fehlende Telomeraseaktivität in CHLA-90hTDNIN P48

Parallel zu den graphischen Darstellungen wurde wie bereits oben erwähnt auch die relative Telomeraseaktivität berechnet sofern sie in der graphischen Darstellung zu finden war. Die Tabellen 3.4.1.a-d sollen durch den Vergleich der verschiedenen Zelllinien untereinander bezüglich ihrer relativen Telomeraseaktivität einen Eindruck über die Unterschiede der Enzymaktivität in Telomerase - negativen sowie Telomerase - positiven Zelllinien geben.

Zelllinien	SK-N-SH	SK-N-SH	SK-N-SH
Relative Telomeraseaktivität	0,7	0,4	2,7

Tab.3.4.1.a: Telomeraseaktivität in SK-N-SH,

Zelllinien	SK-N-SH hTDNIN P20	SK-N-SH hTDNIN P22	SK-N-SH hTDNIN P26
Relative Telomeraseaktivität	0,0	0,0	0,0

Tab.3.4.1.b: Telomeraseaktivität in SK-N-SHhTDNIN,

Zelllinien	SK-N-SH hTIN P20	SK-N-SH hTIN P21	SK-N-SH hTIN P28
Relative Telomeraseaktivität	4,8	6,7	Nicht auswertbar

Tab.3.4.1.c: Telomeraseaktivität in SK-N-SHhTIN,

Zelllinien	SK-N-SH hTWTIN P21	SK-N-SH hTWTIN P22	SK-N-SH hTWTIN P22
Relative Telomeraseaktivität	10,1	2,4	29,3

Tab.3.4.1.d: Telomeraseaktivität in SK-N-SHhTWTIN,

Vergleicht man die Werte der relativen Telomeraseaktivität für die Ausgangszelllinie SK-N-SH mit Zellen, die ektop hTERT exprimierten, so betrug die Telomeraseaktivität für Zellen mit ektopter hTERT Expression im Durchschnitt das 10-fache der Ausgangszelllinie. Dies ließ die Annahme zu, dass durch die ektope Expression von hTERT eine stärkere Telomeraseaktivität erzielt wurde.

Ebenso erfolgte die Darstellung der relativen Telomeraseaktivität für die mit dem Vektor hTWTIN transfizierte ursprünglich Telomerase-negative Zelllinie CHLA - 90 in Tabelle 3.4.1.e für unterschiedliche Passagen.

Zelllinien	CHLA-90 hTWTIN P41	CHLA-90 hTWTIN P45	CHLA-90 hTWTIN P51
Relative Telomeraseaktivität	5,6	11,0	7,7

Tab.3.4.1.e: Telomeraseaktivität in CHLA-90hTWTIN

Die Ausgangszelllinie CHLA-90 sowie die Zellen mit dem Leervektor und dem Vektor hTDNIN zeigten keinerlei Telomeraseaktivität.

Zelllinien	CHLA - 90	CHLA - 90 hTIN P40, P44, P50	CHLA - 90 hTDNIN P38, P42, P48
Relative Telomeraseaktivität	0,0	0,0	0,0

Tab.3.4.1.f: Telomeraseaktivität in CHLA – 90, CHLA - 90 hTDNIN, CHLA – 90hTWTIN

Vergleicht man die Telomeraseaktivität von CHLA-90hTWTIN mit der von Natur aus Telomerase - positiven Zelllinie SK-N-SH, so konnte man feststellen, dass die relative Telomeraseaktivität durch die ektope Expression von hTERT in CHLA-90-Zellen fast das 7-fache der endogenen Telomeraseaktivität in SK-N-SH-Zellen betrug. Die Telomeraseaktivität für SK-N-SH-Zellen mit ektopter hTERT-Expression war jedoch um den Faktor 1,7 größer als für CHLA-90 Zellen mit ektopter hTERT Expression. Diese Beobachtung scheint vor dem Hintergrund endogener Telomeraseaktivität wie sie in SK-N-SH-Zellen natürlicherweise vorliegt, einleuchtend.

4 Diskussion

Für die meisten malignen Tumoren wird angenommen, dass ihre Fähigkeit das Stadium der Seneszenz zu überbrücken, indem sie die Telomer-abhängige Begrenzung von Zellteilungen umgehen, einen entscheidenden Schritt in der malignen Entartung darstellt (69, 167). Demzufolge stellt die Hemmung des Enzyms Telomerase einen möglichen Ansatz in der Behandlung von Krebs dar. Telomeraseinhibitoren wird eine hohe therapeutische Breite vorausgesagt, da Telomerase in den meisten normalen menschlichen Zellen nicht vorhanden ist, während 85% - 90% aller Tumoren Telomerase exprimieren.

Die kontinuierliche Hemmung der Telomeraseaktivität verkürzt die Telomere und führt zu chromosomaler Instabilität und Abberationen, welche folglich das Signal eines DNA - Schadens triggern. Dies, so nimmt man an, überführt die Tumorzellen von einem wachstumsfähigen Zustand hin zu einem Wachstumsstopp, der sich als Stadium der Seneszenz oder als sogenannte Krise und vermehrte Apoptose manifestiert.

Es konnte bereits für verschieden Tumorarten und durch das Anwenden verschiedener therapeutischer Ansätze gezeigt werden, dass Telomerasehemmung dazu führt, dass Zellen, die in Kultur gehalten werden, in das Stadium der Krise und Apoptose eintreten (75, 78, 125, 139, 152, 164, 191). Methoden, die in die Funktion des Enzyms Telomerase eingreifen, schliessen mit ein

- die Herunterregulierung der Transkription, das Einbringen eines dominant-negativen hTERT Gens (67, 203)
- die Hemmung der Faltung des Enzyms Telomerase (z.B. Beeinträchtigung durch p23 und hsp 90 (88))
- die Inhibition Telomerasenspezifischer Phosphorylierung, die Blockade der Zugänglichkeit der Telomerenenden für Telomerase durch G-Quadruplex-Stabilisatoren (51, 150, 154, 158, 175)
- das Anwenden einer mutanten RNA-Matrize (96)
- die Hemmung der Reversen Transkriptase (49, 174)
- die Funktionsbeeinträchtigung des Enzyms Telomerase und Telomer-assoziierte Proteine (161, 204)

Das Ziel dieser Arbeit war die präklinische Evaluation eines möglichen therapeutischen Konzeptes, welches Chemotherapie und Telomerasehemmung vereint. Dieses sollte besonders im Hinblick auf die Effektivität einer Telomerasehemmung mit nachfolgender Regression exemplarisch für das Neuroblastom an den Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und CHLA - 90 untersucht werden.

4.1 Telomeraseaktivität in Neuroblastomen

Die katalytische Komponente hTERT als limitierender Faktor für Telomeraseaktivität erscheint als optimales Target bei der Hemmung von Telomeren und Telomeraseaktivität. Das Einführen einer Mutante für hTERT zielte spezifisch auf die Hemmung von hTERT ab und äußert sich in der Expression eines katalytisch inaktiven Proteins mit fehlender Telomeraseaktivität. Für zwei unabhängige Studien konnte durch Transfektion einer dominant-negativen Mutante für hTERT (hTDN) in verschiedenen Tumorzelllinien (Ovarial-, Brust-, und Kolonkarzinom) als auch in 293 Nierenzellkarzinomen über Unterdrückung der Expression des Enzyms Telomerase eine Abnahme der Wachstumsrate mit darauf folgendem Zelltod gezeigt werden (67, 203). Darüber hinaus konnten Hahn et al. durch die Ergebnisse der mit athymischen Nacktmäusen durchgeführten Experimenten zeigen, dass die Expression des inhibitorisch veränderten Gens für hTERT mit dem Verlust der Tumorgenese einherging (67). Der Eintritt des Zelltodes korrelierte dabei mit der initialen Telomerenlänge, so dass Tumorzellen, die kurze Telomere besitzen, vor solchen mit längeren Telomeren starben. Gleiche Ergebnisse wurden von Delhommeau et al. (40), Zhang et al. (202) und Roth et al. (155) publiziert.

Um zu testen, ob die spezifische Hemmung der Funktion von hTERT ein effektives Instrument bei der Bekämpfung des Neuroblastoms sein könnte, wurde die Telomerase – positive Zelllinie SK-N-SH mit einem dominant-negativen hTERT Transgen transfiziert sowie darüber hinaus mit einem Wildtyp (WT) Transgen als auch mit einem Kontrollvektor. Die gleichen Vektorkonstrukte wurden in der Telomerase – negativen ALT Zelllinie CHLA-90 exprimiert, um die spezifischen Effekte der Telomerase – Regulierung zu beurteilen.

Die retrovirale Transfektion von SK-N-SH-Zellen mit dem Vektor S11hTDN brachte Zellen hervor, für die keine Telomeraseaktivität nachzuweisen war und sich bereits

durch Auswertung der Southern Blots mit dem Programm Telorun Effekte im Sinne eines Verlustes telomerer Sequenzen andeuteten. Obwohl keine Telomeraseaktivität erkennbar war, konnte initial kein unmittelbarer Effekt auf die Proliferation im Sinne einer Proliferationshemmung nachgewiesen werden. Jedoch konnte mit zeitlicher Verzögerung eine merkliche Minderung des replikativen Potentials durch Wachstumsverlangsamung und letztlich einsetzenden Zelltod in höheren Passagen beobachtet werden (Passage 28). Bis auf den nicht eindeutigen Nachweis des Verlustes telomerer Sequenzen stehen die Ergebnisse im Einklang mit denen von anderen Arbeitsgruppen erhobenen Ergebnissen für solide Tumoren, und zwar unabhängig von der Methode der Telomerasehemmung und dem Tumortyp (40, 51, 67, 155, 157, 203). Laut des initialen Paradigma für Telomerasehemmer sollten diese Substanzen nicht in erster Linie die Wachstumsrate beeinflussen, sondern vielmehr nach und nach die progressive Verkürzung von Telomeren induzieren. Verminderte Proliferation soll nur dann beobachtet werden, wenn die Telomere eine kritische Telomerverkürzung erreichen. Deshalb ist die zeitliche Verzögerung bis zum Erzielen des gewünschten antiproliferativen Effektes von der initialen Ausgangslänge der Telomeren abhängig. Die vor Transfektion bestehende Telomerenlänge von 6kb in SK-N-SH-Zellen konnte bis zur Passage 27 nach Transfektion mit hTDN auf 3,2 kb reduziert werden und blieb stabil bei einer Telomerenlänge um 3 kb, ohne dass Telomeraseaktivität bis zum Zelltod nachgewiesen werden konnte.

Die Expression von hTWTIN in Telomerase – positiven Zellen führte zu einem Anstieg der Telomeraseaktivität und einer Telomerverlängerung. Allerdings konnte keine eindeutig erkennbare Zunahme der Wachstumsrate beobachtet werden. Dennoch konnte durch die vergleichsweise zur Ausgangszelllinie höhere Telomeraseaktivität und Telomerverlängerung somit die Funktionalität des Vektorkonstruktes S11hTERT verifiziert werden.

Die Telomerase – negativen CHLA-90-Zellen erhalten ihre Telomeren über einen alternativen Mechanismus (ALT) und wurden ebenfalls mit dem S11 Vektor, S11hTDN und S11hTWT transfiziert. Wie es zu erwarten war, wurden keine Unterschiede bezüglich der Telomerenlänge und Wachstumskinetik zwischen Mutterzelllinie, Vektorkontrolle und mit hTDN-transfizierten Zellen gefunden. Die Expression von hTWTIN führte zur Wiederherstellung der Telomeraseaktivität als auch zu erhöhter

Zellproliferation und Verlängerung der Telomeren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit solchen aus anderen durchgeführten Untersuchungen (35, 60, 148, 177). Obwohl Telomerase in CHLA-90hTWTIN-Zellen aktiv war, hielten diese Zellen Kennzeichen wie heterogene und lange Telomere im Sinne von ALT-Aktivität bei. Dies deutete darauf hin, dass sowohl Telomerase als auch ALT in CHLA-90hTWTIN-Zellen aktiv war. Das Vorliegen beider Mechanismen zum Erhalt der Telomeren wurde von Bryan et al. für einige menschliche Tumoren beschrieben (21). Ob diese Tumoren nun Subpopulationen enthielten mit dem einen oder dem anderen Mechanismus, oder ob es Tumorzellen gibt, die mehr als nur einen Mechanismus benutzen, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Ford et al. (46) zeigten, dass nach ektopter Expression des Wildtyps für hTERT in ALT-Zelllinien das Enzym Telomerase funktionell den auf Rekombination-basierenden Weg zum Erhalt der Telomerenlängen inhibieren kann. Perrem et al. (148, 189) beobachteten die Repression des ALT-Phänotyps nach der Fusion von ALT-Zellen mit Telomerase – positiven Zellen.

4.2 Telomeraseaktivität und Chemotherapie

Verschiedene Arbeitsgruppen haben eine verstärkte Sensitivität gegenüber chemotherapeutischen Substanzen für Tumorzellen mit dysfunktionellen Telomeren, bei denen das Enzym Telomerase gehemmt war, gefunden (26, 101, 110, 114, 130). Dies spricht für synergistische Effekte von Telomeraseinhibitoren und anderen Antitumortherapien. Die stabil transfizierten dominant-negativen Neuroblastomzelllinien (SK-N-SHhTDNIN, CHLA-90hTDNIN), welche in dieser Arbeit eingesetzt wurden, könnten als ein ideales Modell dienen, um zukünftig die Kombination einer Telomerasehemmung mit antineoplastischen Therapieformen zu testen. Diese werden dabei helfen genauere Einblicke in die Funktion des Enzyms Telomerase, und zwar über den Mechanismus der Telomerverkürzung hinaus, zu bekommen und könnten so eine komplett neue Generation von Ansätzen bezüglich der Telomerasehemmung hervorbringen.

Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika werden als einer der Hauptgründe für die Mortalität von Krebs angesehen und treten unter anderem als spätes Ereignis während der Tumorprogression auf. Yague et al. (196) führten in menschliche embryonale Hautfibroblasten sequenziell die katalytische Untereinheit des Enzyms Telomerase

sowie andere Veränderungen ein. Sie konnten zeigen, dass der minimal erforderliche Satz an Veränderungen zum Auftreten von Resistenzen gegenüber vielen Substanzen lediglich die Expression des Enzyms Telomerase sowie die Inaktivierung von p53 und pRB darstellt. Sie konnten so nachweisen, dass die Fähigkeit Resistenzen gegenüber vielen Chemotherapeutika zu erlangen, bereits vor dem Stadium der malignen Transformation auftreten kann. Das Aneignen von Resistenzen gegenüber vielen Chemotherapeutika ist ein bekanntes Merkmal hochmaligner Neuroblastome.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten bezüglich der Zytotoxizität der verschiedenen getesteten Zytostatika kontroverse Ergebnisse. Anders als bei Zellen, die ihre Telomere über den ALT-Mechanismus verlängern, scheint die hTDNIN-Vektor-Transfektion in den ursprünglich Telomerasepositiven SK-N-SH-Zellen zu einer Sensibilisierung gegenüber der Zytotoxizität des Alkylanz Ifosfamid zu führen, da für eine Wachstumshemmung von 50 % geringere Ifosfamidkonzentrationen notwendig waren.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Aussage, dass durch Telomerasehemmung oder Inaktivierung eine verstärkte Sensitivität gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung erzielt werden kann (30). Ward et al. (188) untersuchten eine Kombinationstherapie aus Telomerasehemmung und Chemotherapie. Zur pharmakologischen Hemmung des Enzyms Telomerase verwendeten sie BIBR1532, ein Telomerasehemmer mit hoher Wirksamkeit und Selektivität (37), und untersuchten an resistenten Leukämie- und Brustzellen sowie deren Mutterzelllinien die Effekte der Kombinationstherapie. Sie stellten eine von der Länge der Telomeren abhängige Synergie einer Kombinationstherapie fest, da nur für Zellen, die sensitiv gegenüber BIBR1532 waren und bei denen Telomerase dauerhaft gehemmt wurde, eine Chemosensibilisierung gezeigt werden konnte. Diese Beobachtungen schlagen die pharmakologische Hemmung von Telomerase in Kombination mit Chemotherapie als möglicherweise valides Therapiekonzept für arzneimittelresistente als auch –sensitive Tumoren vor.

Entgegen dieser synergetisch wirksamen Beobachtungen für Ifosfamid in SK-N-SHhTDNIN-Zellen nahm in meinen Untersuchungen für Cisplatin, Doxorubicin und Etoposid die erforderliche Zytostatikakonzentration, zum Erreichen einer Wachstumshemmung von 50%, durch die Transfektion mit hTDNIN in SK-N-SH-

Zellen zu. Diese Ergebnisse, die auf eine Resistenzzunahme durch Telomerasehemmung hinweisen, stehen nicht im Einklang mit sonst erzielten Nachweisen einer Chemosensibilisierung durch die Hemmung von Telomeraseaktivität wie sie auch von Nakamura et al. (137) für das Zervikalkarzinom beschrieben wurden. Sie testeten die Substanzen Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid, Bleomycin und Paclitaxel und stellten im Fall von allen Zytostatika eine Chemosensibilisierung durch das Ausschalten von hTERT im Vergleich zur Ausgangszelllinie fest.

Urbani et al. (181) beschäftigten sich mit der Resistenz von Neuroblastomzellen gegenüber dem Topoisomerasehemmer Etoposid. Sie untersuchten den Grad der Expression von verschiedenen Proteinen in Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) für unbehandelte Zellen, für Zellen, die mit Etoposid behandelt wurden, und für Etoposid-resistente Zellen. Dabei stellten sie für den Etoposid-resistenten Klon eine erhöhte Expression von HSP 27, Peroxiredoxin 1, β -Galactosid-lösliches Lektin-bindendes Protein, Vimentin und Ribonukleoprotein K fest. Für die mit Etoposid behandelten Neuroblastomzellen veränderte sich die Expression im Vergleich zur Ausgangszelllinie für die Proteine FK506-bindendes Protein 4, Keratin 9 und die Peptidylprolylisomerase Cyclophilin A im Sinne einer Hochregulation. Es sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig, um den Mechanismus der Etoposid-Resistenz beim Neuroblastom zu verstehen. Die Hemmung von Telomeraseaktivität alleine kann sicherlich die vorliegende Resistenzzunahme gegenüber Etoposid, dem Alkylanz Cisplatin und dem Anthrazyklin Doxorubicin im Rahmen der durchgeführten Zytotoxizitätstestung nicht ausreichend erklären. Vielmehr könnte grundsätzlich das Proliferationsverhalten, welches sich allerdings nach Einführung von hTDNIN nicht wesentlich von der Ausgangszelllinie unterschied als Erklärungsansatz herangezogen werden. Da es jedoch zu keiner gravierenden Wachstumshemmung oder gar zu einem Wachstumsstopp während der Zytotoxizitätstestungen für hTDNIN bei SK-N-SH-Zellen kam, ist auch dieser Gesichtspunkt nicht im Stande eine plausible Erklärung für die Resistenzentwicklung zu liefern. Man könnte den nicht fehlenden Nachweis einer eindeutigen Telomerverkürzung als Erklärungsansatz heranziehen und vermuten, dass es möglicherweise aufgrund des Selektionsdruckes zum Ausweichen auf den ALT-Mechanismus gekommen ist und somit keine Telomerverkürzung stattfand und folglich wie Ward et al. (188) feststellten, keine Chemosensibilisierung bei fehlender

Telomerverkürzung durch die Kombinatiostherapie erzielt wurde, wobei dies noch nicht die vorliegende Resistenz eindeutig erklären kann.

Zu der Telomerase-negativen Zelllinie CHLA-90, die über den ALT-Mechanismus ihre Telomeren verlängert, ließ sich feststellen, dass sowohl die Transfektion mit dem Vektor hTERTDNIN als auch mit dem Vektor hTERTWTIN gegenüber den Zytostatika Ifosfamid, Cisplatin, Doxorubicin und Etoposid zu keiner Veränderung hinsichtlich der Chemosensitivität geführt hat.

Insgesamt lässt sich also festhalten, dass sich anhand meiner Untersuchungen kein Hinweis auf eine Synergie einer Kombinationstherapie aus Telomerasehemmung und Chemotherapie beim Neuroblastom nachweisen ließ.

Dabei soll an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen werden, dass CHLA – 90 - Zellen im Vergleich zu SK-N-SH-Zellen generell eine geringere Chemosensibilität gegenüber Ifosfamid, Cisplatin, Doxorubicin und Etoposid zeigten wie unter 3.2.2 ausgeführt wurde. Dies galt ebenfalls für die Zelllinien, die den Leervektor trugen.

4.3 Präklinische Evaluation für das Neuroblastom

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen geben Anhaltspunkte dafür, dass Telomerasehemmung bei Telomerasepositiven Tumoren keinen Therapie verbessernden Effekt im Sinne einer Chemosensibilisierung zeigt. Es konnte sogar eine Resistenzzunahme gegenüber Cisplatin, Doxorubicin und Etoposid für die Kombinationstherapie aus Telomerasehemmung und Chemotherapie in Telomerasepositiven Neuroblastomzellen (SK-N-SHhTDNIN) nachgewiesen werden.

Aufgrund der erzeugten Resistenzen legen die Ergebnisse eher nahe Telomerasehemmung nicht in Kombination mit Chemotherapie einzusetzen. Vielmehr sollten die proliferationshemmenden Effekte einer Telomerasehemmung im Sinne einer adjuvanten Therapieergänzung verstanden werden. So könnte Telomerasehemmung eine sinnvolle Ergänzung in therapiefreien Intervallen zu herkömmlichen Therapiekonzepten darstellen und möglicherweise als Erhaltungstherapie eingesetzt werden.

Für die Therapie des Neuroblastom, welches sich insbesondere in höheren Stadien durch Telomerasaktivität und Chemoresistenzen auszeichnet, wäre es erstrebenswert eine weitere Evaluation bezüglich der Vorteile eines adjuvanten Einsatzes von

Telomerasehemmung in therapiefreien Intervallen vorzunehmen.

Die Ergänzung von traditionellen zytotoxischen Therapien und anderen bewährten Therapiemaßnahmen durch Strategien, die auf Telomere oder Telomerase abzielen, sollte dann zu synergetischen Wechselwirkungen, im Sinne einer schnelleren Regression des Tumors bzw. Remissionsverlängerung, führen.

4.4 Telomeraseinhibitoren: Risiken und Anforderungen

Die optimale Anti – Telomerasetherapie muß für jeden Tumortypen sorgfältig evaluiert werden. Die lange zeitliche Verzögerung, die vom Beginn der Behandlung bis zum Eintritt eines therapeutischen Effektes benötigt wird, und folglich die Notwendigkeit einer langfristigen und kontinuierlichen Exposition von Tumorzellen, wirft große Bedenken bezüglich der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Telomeraseinhibitoren und deren Zytotoxizität auf. Die Möglichkeit der Entwicklung verschiedener Abwehrtechniken könnte das Einschlagen von alternativen Wegen zur Telomerverlängerung (ALT) oder das Auftreten überlebender Zellen mit zunehmender genetischer Instabilität (65, 73) mit einschließen. Dies ist vor dem Hintergrund des Entstehens höher entwickelter und aggressiverer Tumoren sowie eines potentiellen Risikos zusätzliche genetische Veränderungen durch die Telomerdysfunktion während der „Wartephase“ zu provozieren sogar noch kritischer zu betrachten (48).

Die entstehende Toxizität, auf die auch Sharma et al (162) hinwiesen, könnte ihre Ursache im Hemmen von Zellen, die Telomerase exprimieren, haben, wozu hämatopoetischen Vorläuferzellen, Keimzellen und andere Zellen von sich proliferierendem Gewebe wie der Epidermis oder den intestinalen Krypten gehören (47). Jedoch ist dies unwahrscheinlich, da die meisten Tumorzellen kürzere Telomeren besitzen als normale Zellen und folglich jede Telomerverkürzung, die durch Inhibition des Enzyms Telomerase entsteht, in Tumorzellen zu schädlichen Effekten führen würde bevor die Telomere normaler Zellen ihre kritische Schwelle erreichen. So sprechen Keith et al. (93) von einem anzustrebenden „therapeutischen Fenster“ und Shay (165) und Autexier (3) schlagen nach einer Chemotherapie zur Verkleinerung der Tumormasse eine anschließende Anti-Telomerase-Therapie im „therapeutischen Fenster“ vor. Ob die Telomerase ein besseres Target einer Krebstherapie ist, als tumorspezifische Antigene, die in verschiedenen klinischen Studien erprobt werden,

bleibt abzuwarten (122). Darüber hinaus jedoch berichten Herbert et al. (79), dass die Verkürzung von Telomeren reversibel ist, was darauf hindeutet, dass normale Zellen sich schnell erholen, sobald die Behandlung einmal abgeschlossen ist. Es lässt sich also sagen, dass der erst spät einsetzende Effekt von Telomeraseinhibitoren als auch die Reversibilität der Telomerverkürzung auf die Notwendigkeit einer längeren und kontinuierlichen Dauer der Behandlung hindeuten, weshalb die Entwicklung von Substanzen mit absoluter Spezifität gewährleistet sein muß. Diese Substanzen sollten auf einfachem z.B. oralem oder systemischem Weg in Depotform zu verabreichen sein. Abschließend soll erwähnt sein, dass die Forschungsergebnisse von Chang et al. (25) Auswirkungen auf den Gebrauch von Telomeraseinhibitoren als Antitumor-Substanzen in menschlichen Tumoren haben dürften. Bei Mäusen konnten sie zeigen, dass die Hemmung des Enzyms Telomerase solche Tumoren, die ursprünglich Telomerase – positiv waren, unter starkem Selektionsdruck setzen kann den ALT – Mechanismus zu aktivieren. Abgesehen davon muss grundsätzlich für Anti-Tumorthérapien, die auf die Hemmung von Telomeren und Telomerase abzielen, auch die Möglichkeit einer Reaktivierung von Telomeraseaktivität in Betracht gezogen werden. Somit könnte der Einsatz beider, sowohl von ALT als auch das Verwenden von Pharmazeutika, die auf das Enzym Telomerase abzielen, dazu beitragen die Entstehung von Arzneimittelresistenzen zu verhindern. Eine Kombination aus konventionellen Therapien und Telomeraseinhibitoren könnte die äußerst lange Zeit zwischen der Blockierung des Enzyms Telomerase, bis hin zu zytostatisch und zytotoxischen Effekten, durch das Steigern der Erosion von Telomeren verkürzen.

4.5 Möglichkeiten einer Anti-Telomerase-Therapie

Da fast alle Tumorarten eine Telomeraseaktivität besitzen, werden große Hoffnungen auf eine adjuvante „Anti-Telomerase-Therapie“ gesetzt. Auch beim Neuroblastom ist das Interesse von Anti – Telomerase - Strategien groß. Telomerase-Hemmstoffe sind attraktive Target Moleküle für diese Krebstherapie (103) und so ist nach Lavelle et al. (109) eine Anti-Telomerase-Therapie durch eine direkte Hemmung der Telomerase denkbar, oder aber auch durch eine Interferenz mit den Telomeren oder eine Interaktion mit anderen Proteinen, die an der Regulierung der Telomerase und der Telomere beteiligt sind. Dies führt zur Entwicklung von selektiven Telomerase-Hemmern für eine

neue Anti-Krebs-Strategie (120). Seimiya et al. zeigten, dass der Einsatz eines Telomeraseinhibitors (MST-312, ein chemisches Derivat einer Komponente von grünem Tee) zusammen mit einem PARP-Hemmer (Tankyrase-hemmend) in nicht toxischen Konzentrationen als Beispiel für eine Kombinationstherapie einen effektiven therapeutischen Ansatz in der Antitumorthherapie darstellen könnte (161).

Telomeraseinhibitoren sollen nach Reduzierung der Tumormasse durch konventionelle Therapiemaßnahmen, wie Operation, Chemo- und Strahlentherapie zur adjuvanten Therapie eingesetzt werden. Das klinische Therapieziel liegt in einem verlängerten rezidivfreien Intervall. Die Effektivität einer Anti-Telomerase-Therapie ist in der Hemmung der Telomerase und in der Verkürzung der Telomere zu sehen (30).

So scheint das Abzielen auf Tumorzellen in Patienten mittels Telomerase-basierter Strategien sehr versprechend zu sein. Abgesehen von der Komplexität der Telomerdynamik, in Bezug auf die Initiierung und das Fortschreiten von Tumoren, sind die Hinweise überzeugend, dass Telomeraseinhibitoren zu einer effektiven Intervention bei der Behandlung von Patienten mit Krebs führen können.

Obwohl weiterhin Fortschritte in der Entdeckung von Telomeraseinhibitoren gemacht werden, haben andere Methoden, die speziell auf die Zerstörung von Telomerase-positiven Tumorzellen abzielen, tatkräftige experimentelle Unterstützung erfahren (164). Zum einen haben sich Telomerase (hTERT) Promoter-gesteuerte onkolytische Viren als effektiv sowohl in vitro als auch in Tiermodellen erwiesen, zum anderen werden bereits therapeutische hTERT Immuntherapie-Strategien in klinischen Studien am Menschen erprobt (164, 201).

4.6 Ausblick

Krebs bleibt eine Haupttodesursache trotz des beachtlichen Fortschrittes bezüglich des Verstehens von molekularen Mechanismen und der Entwicklung einer großen Anzahl von wirksamen Behandlungen. Die Entdeckung gesicherter Angriffsziele und neuer Substanzen hat deshalb hohe Priorität. Auf Telomerase abzielende Substanzen haben das Potential durch neue Mechanismen auch neue Optionen für die Krebstherapie zu schaffen und darüber hinaus neuartige therapeutische Spezifität und Wirksamkeit zu berücksichtigen.

Es muss jedoch stets vor Augen gehalten werden, dass die genetischen Effekte, die

durch Telomerasehemmung erzielt werden in Abhängigkeit des genetischen Hintergrundes der Zelle variieren können und eine Reihe von Zellteilungszyklen notwendig sein werden bis die Effekte einer Telomerasehemmung mit nachfolgender Telomerverkürzung und resultierendem Wachstumsstopp offensichtlich werden.

Für jede neue Substanzklasse gegen Krebs ist im Hinblick auf die möglichst frühe Durchführbarkeit von klinischen Studien die Identifikation eines geeigneten pharmakodynamischen Markers notwendig. Messungen der Telomeraseaktivität und Telomerenlänge, welche ebenfalls die Bestimmung der Länge des 3'-G-reichen Einzelstrang Überhangs in Tumoren zu Beginn der Therapie mit einschließt, könnten hilfreich sein, um eine geeignete Anti-Telomerasebehandlung für Tumoren zu finden. Bezüglich der klinischen Entwicklung von Telomerasetherapeutika hat die präklinische Untersuchung von Telomeraseinhibitoren und von auf hTERT Promoter-basierenden onkolytischen Viren bereits begonnen. Darüber hinaus laufen bereits klinische Studien zur Immuntherapie mit hTERT. Der Schlüssel zum Erfolg für jeden dieser verschiedenen therapeutischen Ansätze, die auf Telomerase abzielen, wird die Identifikation der geeigneten klinischen Situation sein, um eine Evaluation durchzuführen. Jedoch ist es begründet, mit einigen überraschenden Forschungsergebnissen zu rechnen, da die wichtigen Lektionen, die man aus Zellkultur und Tiermodellen gewonnen hat, nun in klinischen Studien auf ihre Richtigkeit geprüft werden müssen.

Abschließend lässt sich sagen, dass trotz der erheblichen Anstrengungen einer großen Anzahl von Forschungsgruppen die Mechanismen der Tumor-spezifischen Telomeraseaktivierung immer noch nicht vollständig verstanden sind. Weitere Analysen sind erforderlich, um ein umfassenderes Verständnis der Regulation der Telomeraseaktivität herauszustellen. Ist dies einmal erreicht, so wird eben dieses Verständnis eine solide Basis für weitere Untersuchungen und Manipulation der Telomeraseaktivität als potentielle therapeutische Modalität bieten.

5 Abkürzungen

μ	mikro-
μM	mikromolar
A/C/G/T/N	Adenin/Cytosin/Guanin/Thymin/Nukleotide
Abb.	Abbildung
c-ABL	physiologische Tyrosinkinase der Hämatopoese
cDNA	Copy DNA
<i>c-myc</i>	humanes Onkogen, (Homolog zu Onkogen aus MC29 avian myelocytomatosis virus)
CT	Computertomographie
dest.	destilliert
D-Loop	displacement-loop
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-Immunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay)
FAM	6-Carboxyfluoreszein
FCS	fötales Kälberserum
h	Stunde
HPV E6	human papillomavirus E6
hTAP1	humanes Telomerase-assoziiertes Protein 1
hTERT	katalytische Untereinheit der Telomerase (human telomerase reverse transcriptase)
hTR	RNA-Komponente der Telomerase (human telomerase RNA)
GI ₅₀	Konzentration, die zur 50%-igen Hemmung des Zellwachstums führt
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
mRNA	Boten (messenger)-RNA

MW	Mittelwert
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Anzahl der untersuchten Proben
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PD	population doubling (Verdopplung der Zellpopulation)
RB	Retinoblastomgen
pRb	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Reverse Transkriptase
RTA	relative Telomeraseaktivität
s	Sekunde
S.D.	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumcitrat (sodium salt citrate)
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
Taq	Polymerase Thermus aquaticus DNA Polymerase
TBP	Telomerbindende Proteine
TEIPP1	Telomerase inhibierendes Polypeptid 1
TIN2	TRF1-interacting nuclear protein 2
t-Loop	telomeric looph
TRAP	Telomeric Repeat Amplification Protocol
TRF	Telomer-Restriktionsfragment (hier: Synonym für Telomerlänge)
TRF1	Telomer-bindende Proteine 1 (telomeric repeat binding factor 1)
TRF2	Telomer-bindende Proteine 2

(telomeric repeat binding factor 2)

U Einheit (unit)
u.a. unter anderem

6 Lebenslauf

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Boos für die Überlassung dieses interessanten und abwechslungsreichen Themas und für die Möglichkeit des selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens in der Arbeitsgruppe für experimentelle pädiatrische Hämatologie und Onkologie.

Frau Dr. rer. nat. Lanvers-Kaminsky danke ich für die engagierte wissenschaftliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente im Labor und die jederzeit gewährte Diskussionsbereitschaft, Ansprechbarkeit und Hilfe, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Tanja Möllers, die mich in besonderem Maße durch ihre ständige Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit sowohl fachlich als auch moralisch tatkräftig unterstützt hat. Auch möchte ich Sandra Schulz und Petra Schulze-Westhoff für Ihre Unterstützung danken.

Dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf und insbesondere Yvonne Braun danke ich für die Bereitstellung von Zelllinien für die Experimente und die Hilfsbereitschaft bezüglich Fragen zur Durchführung des experimentellen Teiles dieser Arbeit.

Mein ganz herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Ralf Lethmate, der durch sein Verständnis und seine Geduld eine große Motivation für das Gelingen dieser Arbeit darstellte.

8 Literatur

1. Alexander F. Neuroblastoma. Vol. No. 3, p. 383-92, 2000.
2. Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Azam M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW, Harley CB. Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 220 (1): 194-200, 1995.
3. Autexier C. Telomerase as a possible target for anticancer therapy. *Chem Biol* 6 (11): R299-303, 1999.
4. Bacchetti S, Counter C. Telomeres and telomerase in human cancer. *Int J Oncol* 7: 423-432, 1995.
5. Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 7 (2): 148-55, 1995.
6. Beattie T, Zhou W, Robinson M, Harrington L. Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol.* 8 (3): 177-80, 1998.
7. Bianchi A, Smith S, Chong L, Elias P, de Lange T. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J* 16 (7): 1785-94, 1997.
8. Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* 17 (2): 236-9, 1997.
9. Blackburn E. Structure and function of telomeres. *Nature* 350 (6319): 569-573, 1991.
10. Böcker W, Denk H, Heitz PU. Pathologie. 2. ed: Urban & Fischer Verlag München Jena, p. 898-899, 2001.
11. Bodnar A, Ouellette M, Frolkis M, Holt S, Chiu C, Morin G, Harley C, Shay J, Lichtsteiner S, Wright W. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279 (5349): 349-52, 1998.
12. Bodnar AG, Kim NW, Effros RB, Chiu CP. Mechanism of telomerase induction during T cell activation. *Exp Cell Res* 228 (1): 58-64, 1996.
13. Bosland M. In vivo regulation of hTERT expression and telomerase activity by androgen. *Urol Oncol* 21: 416, 2003.
14. Bown N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol* 54 (12): 897-910, 2001.
15. Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys G, Speleman F, Nicholson J, Bernheim A, Betts DR, Vandesompele J, Van Roy N. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 340 (25): 1954-61, 1999.
16. Braun Y. Characterization of telomerase as therapeutic target for the treatment of small round blue cell tumors. 1 ed. München: Verlag Dr. Hut, 2005.
17. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* 17 (2): 231-5, 1997.
18. Broccoli D, Young J, de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (20): 9082-6, 1995.
19. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 19 (2): 93-101, 1997.

20. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NLT, Castel V, Castleberry RP, de Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg H, Kaneko M, Kemshead J, Lampert F, Lee REJ, Look AT, Pearson AD, Philip T, Roald B, Sawada T, Seeger RC, Tsuchida Y, Voute PA. Revision of the International Criteria for Neuroblastoma Diagnosis, Staging and Response to Treatment. *J Clin Oncol* 11 (1466-1477), 1993.
21. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 3 (11): 1271-4, 1997.
22. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 14: 4240-8, 1995.
23. Caron H, van Sluis P, de Kraker J, al. e. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 334: 225-30, 1996.
24. Chan S, Blackburn E. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 21 (4): 553-63, 2002.
25. Chang S, Khoo CM, Naylor ML, Maser RS, DePinho RA. Telomere-based crisis: functional differences between telomerase activation and ALT in tumor progression. *Genes Dev* 17 (1): 88-100, 2003.
26. Chen Z, Koeneman K, Corey D. Consequences of telomerase inhibition and combination treatments for the proliferation of cancer cells. *Cancer Res* 63 (18): 5917-25, 2003.
27. Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, De Lange T. A human telomeric protein. *Science* 270 (5242): 1663-7, 1995.
28. Cong Y, Bacchetti S. Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *J Biol Chem*. 275 (46): 35665-8, 2000.
29. Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 8 (1): 137-42, 1999.
30. Corey DR. Telomerase inhibition, oligonucleotides, and clinical trials. *Oncogene* 21 (4): 631-7, 2002.
31. Counter C, Avilion A, LeFeuvre C, Stewart N, Greider C, Harley C, Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11 (5): 1921-9, 1992.
32. Counter C, Botelho F, Wang P, Harley C, Bacchetti S. Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol* 68 (5): 3410-4, 1994.
33. Counter C, Gupta J, Harley C, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85 (9): 2315-20, 1995.
34. Counter C, Hirte H, Bacchetti S, Harley C. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (8): 2900-2904, 1994.
35. Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, Weinberg RA. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* 16 (9): 1217-22, 1998.

36. Cuthbert AP, Bond J, Trott DA, Gill S, Broni J, Marriott A, Khoudoli G, Parkinson EK, Cooper CS, Newbold RF. Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 91 (1): 37-45, 1999.
37. Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Huel N, Kauffmann I, Priepe H, Niestroj C, Daiber C, Enekel B, Guilliard B, Lauritsch I, Muller E, Pascolo E, Sauter G, Pantic M, Martens UM, Wenz C, Lingner J, Kraut N, Rettig WJ, Schnapp A. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *Embo J* 20 (24): 6958-68, 2001.
38. de Lange T. Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *Embo J* 11 (2): 717-24, 1992.
39. de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (8): 2882-5, Review, 1994.
40. Delhommeau F, Thierry A, Feneux D, Lauret E, Leclercq E, Courtier MH, Sainteny F, Vainchenker W, Bennaceur-Griscelli A. Telomere dysfunction and telomerase reactivation in human leukemia cell lines after telomerase inhibition by the expression of a dominant-negative hTERT mutant. *Oncogene* 21 (54): 8262-71, 2002.
41. Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R. Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch.* 437 (1): 1-16, 2000.
42. Ducrest AL, Amacker M, Mathieu YD, Cuthbert AP, Trott DA, Newbold RF, Nabholz M, Lingner J. Regulation of human telomerase activity: repression by normal chromosome 3 abolishes nuclear telomerase reverse transcriptase transcripts but does not affect c-Myc activity. *Cancer Res* 61 (20): 7594-602, 2001.
43. Ducrest AL, Szutorisz H, Lingner J, Nabholz M. Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene* 21 (4): 541-52, 2002.
44. Eggert A, Grotzer M, Ikegaki N. Expression of the neurotrophin receptor TrkA down-regulates expression and function of angiogenic stimulators in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 62: 1802-8, 2002.
45. Feng J, Funk W, Wang S, Weinrich S, Avilion A, Chiu C, Adams R, Chang E, Allsopp R, Yu J, al. e. The RNA component of human telomerase. *Science* 269 (5228): 1236-41, 1995.
46. Ford L, Zou Y, Pongracz K, Gryaznov S, Shay J, Wright W. Telomerase can inhibit the recombination-based pathway of telomere maintenance in human cells. *J Biol Chem.* 276 (34): 32198-203, 2001.
47. Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69 (4-5): 188-97, 2002.
48. Gisselsson D, Jonson T, Petersen A, Strombeck B, Dal Cin P, Hoglund M, Mitelman F, Mertens F, Mandahl N. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (22): 12683-8, 2001.
49. Gomez DE, Tejera AM, Olivero OA. Irreversible telomere shortening by 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 246 (1): 107-10, 1998.
50. Goueli BS, Janknecht R. Upregulation of the catalytic telomerase subunit by the transcription factor ER81 and oncogenic HER2/Neu, RAS, or Raf. *Mol Cell*

- Biol. 24: 25-35, 2004.
51. Gowan SM, Harrison JR, Patterson L, Valenti M, Read MA, Neidle S, Kelland LR. A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity. *Mol Pharmacol* 61 (5): 1154-62, 2002.
 52. Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, Morin GB, DePinho RA. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* 16 (13): 1723-30, 1998.
 53. Greenberg RA, O'Hagan RC, Deng H, Xiao Q, Hann SR, Adams RR, Lichtsteiner S, Chin L, Morin GB, De Pinho RA. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* 18 (5): 1219-26, 1999.
 54. Greider C. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem.* 65 (337-65.Review.), 1996.
 55. Greider C, Blackburn E. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51 (6): 887-98, 1987.
 56. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43 (2 Pt 1): 405-13, 1985.
 57. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337 (6205): 331-7, 1989.
 58. Greider CWB, E.H. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am.* 274 (2): 92-97, 1996.
 59. Griffith J, Comeau L, Rosenfield S, Stansel R, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97 (4): 503-14, 1999.
 60. Grobelny JV, Kulp-McEliece M, Broccoli D. Effects of reconstitution of telomerase activity on telomere maintenance by the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway. *Hum Mol Genet* 10 (18): 1953-61, 2001.
 61. Gunes C, Lichtsteiner S, Vasserot AP, Englert C. Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Research* 60: 2116-21, 2000.
 62. Guo C, Armbruster BN, Price DT, Counter CM. In vivo regulation of hTERT expression and telomerase activity by androgen. *J Urol* 170 (2 Pt1): 615-8, 2003.
 63. Guo C, White P, Weiss M, Hogarty M, Thompson P, Stram D, Gerbing R, Matthay K, Seeger R, Brodeur G, Maris J. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* 18 (35): 4948-57, 1999.
 64. Gutjahr P. Krebs bei Kindern und Jugendlichen. Dt. Ärzteverlag, Köln, 1999.
 65. Hackett J, Greider C. Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* 21 (4): 619-26, 2002.
 66. Hahn W, Counter C, Lundberg A, Beijersbergen R, Brooks M, RA. W. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400 (6743): 464-8, 1999.
 67. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JHM, Meyerson M, Weinberg RA. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *NATURE MEDICINE* 5 (10): 1164-1170, 1999.
 68. Harle-Bachor C, Boukamp P. 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 (13): 6476-81, 1996.
69. Harley C. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res.* 256 (2-6): 271-82. Review, 1991.
 70. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345 (6274): 458-60, 1990.
 71. Harley CB, Kim NW, Prowse KR, Weinrich SL, Hirsch KS, West MD, Bacchetti S, Hirte HW, Counter CM, Greider CW, Piatyszek MA, Wright WE, Shay JW. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 59: 307-315, 1994.
 72. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I, Robinson MO. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275 (5302): 973-7, 1997.
 73. Harrington L, Robinson MO. Telomere dysfunction: multiple paths to the same end. *Oncogene* 21 (4): 592-7, 2002.
 74. Harrington L, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Yeung D, Mar V, Bass M, Robinson M. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev.* 11 (23): 3109-15, 1997.
 75. Harrison RJ, Cuesta J, Chessari G, Read MA, Basra SK, Reszka AP, Morrell J, Gowan SM, Incles CM, Tanious FA, Wilson WD, Kelland LR, Neidle S. Trisubstituted acridine derivatives as potent and selective telomerase inhibitors. *J Med Chem* 46 (21): 4463-76, 2003.
 76. Hartmann U, Brümmendorf TH. Telomerase-Hemmstoffe: Ein neuer Ansatz für die Behandlung maligner Tumoren. *Arzneimitteltherapie* 21 (6): 176-85, 2003.
 77. Hayflick L, Moorhead P. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621, 1961.
 78. Helder MN, Wisman GB, van der Zee GJ. Telomerase and telomeres: from basic biology to cancer treatment. *Cancer Invest* 20 (1): 82-101, 2002.
 79. Herbert B, Pitts AE, Baker SI, Hamilton SE, Wright WE, Shay JW, Corey DR. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (25): 14276-81, 1999.
 80. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 88 (2): 116-22, 1996.
 81. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, Ichikawa T, Shay J, Yokoyama T. Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* 33: 1932-1936, 1997.
 82. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Fukuba I, Yamaoka H, Shay JW, Matsuura Y. Rapid detection of MYCN gene amplification and telomerase expression in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 5 (3): 601-9, 1999.
 83. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1 (3): 249-55, 1995.
 84. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, Kodama T, Piatyszek MA, Shay JW, Matsuura Y. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 55 (15): 3258-62, 1995.
 85. Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek M, Shay J,

- Ishioka S, Yamakido M. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol.* 155 (8): 3711-5, 1995.
86. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 87 (12): 895-902, 1995.
 87. Hoare S, Bryce L, Wisman G, Burns S, Going J, van der Zee A, Keith W. Lack of telomerase RNA gene hTERT expression in alternative lengthening of telomeres cells is associated with methylation of the hTERT promoter. *Cancer Res.* 61 (1): 27-32, 2001.
 88. Holt S, Aisner D, Baur J, Tesmer V, Dy M, Ouellette M, Trager J, Morin G, Toft D, Shay J, Wright W, White M. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* 13 (7): 817-26, 1999.
 89. Hsiao R, Sharma HW, Ramakrishnan S, Keith E, Narayanan R. Telomerase activity in normal human endothelial cells. *Anticancer Res* 17 (2A): 827-32, 1997.
 90. Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem* 274 (19): 13085-90, 1999.
 91. Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 295 (5564): 2446-9, 2002.
 92. Kass-Eisler A, Greider C. Recombination in telomere-length maintenance. *Trends Biochem Sci.* 25 (4): 200-4, 2000.
 93. Keith N, Evans J, Glasspool RM. Telomerase and cancer: time to move from a promising target to a clinical reality. *J Pathol* 195 (4): 404-14, 2001.
 94. Kharbanda S, Kumar V, Dhar S, Pandey P, Chen C, Majumder P, Yuan ZM, Whang Y, Strauss W, Pandita TK, Weaver D, Kufe D. Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase. *Curr Biol* 10 (10): 568-75, 2000.
 95. Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 6 (12): 2011-9, 1997.
 96. Kim M, Rivera M, Botchkina I, Shalaby R, Thor A, Blackburn E. A low threshold level of expression of mutant-template telomerase RNA inhibits human tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (14): 7982-7, 2001.
 97. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266 (5193): 2011-5, 1994.
 98. Kiyono T, Foster S, Koop J, McDougall J, Galloway D, Klingelhutz A. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396 (6706): 84-8, 1998.
 99. Klingelhutz AJ, Foster SA, Mc Dougall JK, et.al. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380: 79-82, 1996.
 100. Kojima H, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H, Omata M. Telomerase activity and telomere length in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Gastroenterology* 112 (2): 493-500, 1997.

101. Kondo Y, Komata T, Kondo S. Combination therapy of 2-5A antisense against telomerase RNA and cisplatin for malignant gliomas. *Int J Oncol* 18 (6): 1287-92, 2001.
102. Krams M, Claviez A, Heidorn K, Krupp G, Parwaresch R, Harms D, Rudolph P. Regulation of telomerase activity by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase mRNA in a subset of neuroblastomas. *Am J Pathol* 159 (5): 1925-32, 2001.
103. Krupp G, Klapper W, Parwaresch R. Cell proliferation, carcinogenesis and diverse mechanisms of telomerase regulation. *Cell Mol Life Sci* 57 (3): 464-86, 2000.
104. Ku WC, Cheng AJ, Wang TC. Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 241 (3): 730-6, 1997.
105. Kyo S, Kanaya T, Ishikawa H, Ueno H, Inoue M. Telomerase activity in gynecological tumors. *Clin Cancer Res* 2 (12): 2023-8, 1996.
106. Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, Orimo A, Inoue M. Estrogen activates telomerase. *Cancer Research* 59 (23): 5917-21, 1999.
107. Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 57 (4): 610-4, 1997.
108. Lastowska M, Roberts P, Pearson A, Lewis I, Wolstenholme J, Bown N. Promiscuous translocations of chromosome arm 17q in human neuroblastomas. *Genes Chromosomes Cancer* 19 (3): 143-9, 1997.
109. Lavelle F, Riou J-F, Laoui A, Mailliet P. Telomerase: a therapeutic target for the third millenium? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 34: 111-126, 2000.
110. Lee K, Rudolph K, Ju Y, Greenberg R, Cannizzaro L, Chin L, Weiler S, DePinho R. Telomere dysfunction alters the chemotherapeutic profile of transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (6): 3381-6, 2001.
111. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 225 (4): 951-60, 1992.
112. Li H, Zhao LL, Funder JW, Liu JP. Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 272 (27): 16729-32, 1997.
113. Li Z, Salovaara R, Aaltonen L, Shibata D. Telomerase activity is commonly detected in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Am J Pathol.* 148 (4): 1075-9, 1996.
114. Ludwig A, Saretzki G, Holm PS, Tiemann F, Lorenz M, Emrich T, Harley CB, von Zglinicki T. Ribozyme cleavage of telomerase mRNA sensitizes breast epithelial cells to inhibitors of topoisomerase. *Cancer Res* 61 (7): 3053-61, 2001.
115. Luttikhuis M, Powell J, Rees S, Genus T, Chughtai S, Ramani P, Mann J, McConville C. Neuroblastomas with chromosome 11q loss and single copy MYCN comprise a biologically distinct group of tumours with adverse prognosis. *Br J Cancer* 85 (4): 531-7, 2001.
116. Maris J, Guo C, White P, Hogarty M, Thompson P, Stram D, Gerbing R, Matthay K, Seeger R, Brodeur G. Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 36 (1): 24-7, 2001.
117. Maris J, Weiss M, Guo C, Gerbing R, Stram D, White P, Hogarty M, Sulman E, Thompson P, Lukens J, Matthay K, Seeger R, Brodeur G. Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not

- decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol.* 18 (9): 1888-99, 2000.
118. Maris JM. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr* 17 (1): 7-13, 2005.
 119. Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 17 (7): 2264-79, 1999.
 120. Matthes E, Lehmann C, Stulich M, Wu Y, Dimitrova L, Uhlmann E, Janta-Lipinski MV. Potent inhibitory activity of chimeric oligonucleotides targeting two different sites of human telomerase. *Oligonucleotides* 15 (4): 255-68, 2005.
 121. McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 1041 (26): 234-282 (zitiert aus Boukamp, P und Mirancea, N, 2007, Telomeres rather than telomerase a key target for anti-cancer therapy?, *Exp Dermatol.*, 2007 Jan;16(1):71-9., 1941).
 122. McKenzie K, Umbricht C, Sukumar S. Applications of telomerase research in the fight against cancer. *Mol Med Today* 5 (3): 114-22, 1999.
 123. McManus M, Gilchrist G, al. e. Neuroblastoma. 16th Edition, 2000, Saunders ed, p. 1552-54, 2000.
 124. Mehle C, Piatyszek MA, Ljungberg B, Shay JW, Roos G. Telomerase activity in human renal cell carcinoma. *Oncogene* 13 (1): 161-6, 1996.
 125. Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou MP, Gilson E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res* 30 (4): 839-65, 2002.
 126. Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol* 18 (13): 2626-34, 2000.
 127. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidhoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90 (4): 785-95, 1997.
 128. Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, Cong YS, Wen J, Hirte HW, Piaggio G, Sacchi A, Pontecorvi A, Bacchetti S, Farsetti A. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol.* 20 (11): 3764-71, 2000.
 129. Mitchell J, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402 (6761): 551-5, 1999.
 130. Mo Y, Gan Y, Song S, Johnston J, Xiao X, Wientjes MG, Au JL. Simultaneous targeting of telomeres and telomerase as a cancer therapeutic approach. *Cancer Res* 63 (3): 579-85, 2003.
 131. Morales C, Holt S, Ouellette M, Kaur K, Yan Y, Wilson K, White M, Wright W, Shay JA. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet.* 21 (1): 115-8, 1999.
 132. Morin G. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59 (3): 521-9, 1989.
 133. Müller H. The remaking of chromosomes. *The Collecting Net-Woods Hole* 13: 181-198 (zitiert aus Boukamp, P und Mirancea, N, 2007, Telomeres rather than telomerase a key target for anti-cancer therapy?, *Exp Dermatol.*, 2007 Jan;16(1):71-9., 1938).
 134. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Mutschler

- Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001.
135. Myers NA. Neuroblastoma. *Pediatr Surg Int* 18 (5-6): 288, 2002.
 136. Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda N, Azar C, Cantor A, Brodeur G. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 328 (12): 847-54, 1993.
 137. Nakamura M, Masutomi K, Kyo S, Hashimoto M, Maida Y, Kanaya T, Tanaka M, Hahn WC, Inoue M. Efficient Inhibition of Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression by RNA Interference Sensitizes Cancer Cells to Ionizing Radiation and Chemotherapy. *HUMAN GENE THERAPY* 16: 859-868, 2005.
 138. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277 (5328): 955-9, 1997.
 139. Neidle S, Parkinson G. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1 (5): 383-93, 2002.
 140. Nishimoto A, Miura N, Horikawa I, Kugoh H, Murakami Y, Hirohashi S, Kawasaki H, Gazdar AF, Shay JW, Barrett JC, Oshimura M. Functional evidence for a telomerase repressor gene on human chromosome 10p15.1. *Oncogene* 20 (7): 828-35, 2001.
 141. Nouso K, Urabe Y, Higashi T, Nakatsukasa H, al. e. Telomerase as a tool for the differential diagnosis of human hepatocellular carcinoma. *Cancer* 78: 232-236, 1996.
 142. Oberthür A, Hero B. Molekulargenetische Veränderungen beim Neuroblastom – wegweisend für Prognose und Therapie? *Journal Onkologie*, 2004.
 143. Oh S, Song Y, Yim J, Kim TK. The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J Biol Chem* 274: 37473-8, 1999.
 144. Oh S, Song YH, Yim J, Kim TK. Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene* 19: 1485-90, 2000.
 145. Ohki R, Tsurimoto T, Ishikawa F. In vitro reconstitution of the end replication problem. *Mol Cell Biol*. 21 (17): 5753-66, 2001.
 146. Olovnikov AM. 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 (1): 181-90, 1973.
 147. Oshimura M, Barrett JC. Multiple pathways to cellular senescence: role of telomerase repressors. *Eur J Cancer* 33 (5): 710-5, 1997.
 148. Perrem K, Colgin LM, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells. *Mol Cell Biol* 21 (12): 3862-75, 2001.
 149. Ramirez RD, Wright WE, Shay JW, Taylor RS. Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. *J Invest Dermatol* 108 (1): 113-7, 1997.
 150. Read M, Wood A, Harrison J, Gowan S, Kelland L, Dosanjh H, Neidle S. Molecular modeling studies on G-quadruplex complexes of telomerase inhibitors: structure-activity relationships. *J Med Chem* 42 (22): 4538-46, 1999.
 151. Reddel R. Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer*

- Lett. 194 (2): 155-62, 2003.
152. Rezler EM, Bearss DJ, Hurley LH. Telomeres and telomerases as drug targets. *Curr Opin Pharmacol* 2 (4): 415-23, 2002.
 153. Rhyu M. Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst.* 87 (12): 884-94, Review, 1995.
 154. Riou JF, Guittat L, Mailliet P, Laoui A, Renou E, Petitgenet O, Megnin-Chanet F, Helene C, Mergny JL. Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (5): 2672-7, 2002.
 155. Roth A, Vercauteren S, Sutherland H, Lansdorp P. Telomerase is limiting the growth of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 17 (12): 2410-7, 2003.
 156. Rufer N, Brummendorf T, Kolvraa S, Bischoff C, al. e. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med* 190: (2): 157-167, 1999.
 157. Saretzki G. Telomerase inhibition as cancer therapy. *Cancer Lett* 194 (2): 209-19, 2003.
 158. Schultes C, Guyen B, Cuesta J, Neidle S. Synthesis, biophysical and biological evaluation of 3,6-bis-amidoacridines with extended 9-anilino substituents as potent G-quadruplex-binding telomerase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 14 (16): 4347-51, 2004.
 159. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer K, Varmus H, Bishop J, Gilbert F, G B, M G, Trent J. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 305 (5931): 245-8, 1983.
 160. Schwartz HS, Juliao SF, Sciadini MF, Miller LK, Butler MG. Telomerase activity and oncogenesis in giant cell tumor of bone. *Cancer* 75 (5): 1094-9, 1995.
 161. Seimiya H, Muramatsu Y, Ohishi T, Tsuruo T. Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell* 7 (1): 25-37, 2005.
 162. Sharma S, Raymond E, Soda H, Sun D, Hilsenbeck SG, Sharma A, Izbicka E, Windle B, Von Hoff DD. Preclinical and clinical strategies for development of telomerase and telomere inhibitors. *Ann Oncol* 8 (11): 1063-74, 1997.
 163. Shay J, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33 (5): 787-91, 1997.
 164. Shay J, Wright W. Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2 (4): 257-65, 2002.
 165. Shay JW. Telomerase in cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer J Sci Am* 4 Suppl 1: S26-34, 1998.
 166. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33 (5): 787-91, 1997.
 167. Shay JW, Wright WE, Werbin H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim Biophys Acta* 1072 (1): 1-7, 1991.
 168. Sitzmann FC. Pädiatrie. 2. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, p. 502-506, 2002.
 169. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 20 (5): 1659-68, 2000.

170. Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW, Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res* 56 (1): 218-22, 1996.
171. Speer CP, Gahr M. Pädiatrie. 2. ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, p. 799-802, 2005.
172. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F. Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 9 (1): 52-8, 2003.
173. Spitz R, Hero B, Skowron M, Ernestus K, Berthold F. MYCN-status in neuroblastoma: characteristics of tumours showing amplification, gain, and non-amplification. *Eur J Cancer* 40 (18): 2753-9, 2004.
174. Strahl C, Blackburn EH. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol* 16 (1): 53-65, 1996.
175. Sun D, Thompson B, Cathers BE, Salazar M, Kerwin SM, Trent JO, Jenkins TC, Neidle S, Hurley LH. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J Med Chem* 40 (14): 2113-6, 1997.
176. Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Yasui W, Shay JW, Ide T, Tahara E. Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clin Cancer Res* 1 (11): 1245-51, 1995.
177. Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, Yoshida K, Itoh M, Kyo S, Ohno T, Taira T, Ariga H, Nakajima K, Hatta M, Kobayashi M, Sano H, Kohgo T, Shindo M. EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer Research* 63 (23): 8338-44, 2003.
178. Tanaka H, Shimizu M, Horikawa I, Kugoh H, Yokota J, Barrett J, Oshimura M. Evidence for a putative telomerase repressor gene in the 3p14.2-p21.1 region. *Genes Chromosomes Cancer* 23 (2): 123-33, 1998.
179. Taylor RS, Ramirez RD, Ogoshi M, Chaffins M, Piatyszek MA, Shay JW. Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions. *J Invest Dermatol* 106 (4): 759-65, 1996.
180. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 58 (18): 4168-72, 1998.
181. Urbani A, Poland J, Bernardini S, Bellincampi L, Biroccio A, Schnölzer M, Sinha P, Federici G. A proteomic investigation into etoposide chemo-resistance of neuroblastoma cell lines. *Proteomics* 5: 796-804, 2005.
182. van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385 (6618): 740-3, 1997.
183. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92 (3): 401-13, 1998.
184. Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8 (5): 279-82, 1998.
185. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp R, Thomas T, Harley C, Lansdorp P. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91 (21): 9857-60, 1994.
186. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the

- telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* 75 (9): 4467-72, 2001.
187. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ. Myc activates telomerase. *Genes Dev.* 12 (12): 1769-74, 1998.
 188. Ward RJ, Autexier C. Pharmacological telomerase inhibition can sensitize drug-resistant and drug-sensitive cells to chemotherapeutic treatment. *Mol Pharmacol* 68 (3): 779-86, 2005.
 189. Wen J, Cong YS, Bacchetti S. Reconstitution of wild-type or mutant telomerase activity in telomerase-negative immortal human cells. *Hum Mol Genet* 7 (7): 1137-41, 1998.
 190. Westermann F, Schwab M. Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Lett* 184 (2): 127-47, 2002.
 191. White LK, Wright WE, Shay JW. Telomerase inhibitors. *Trends Biotechnol* 19 (3): 114-20, 2001.
 192. Wright W, Shay J. Time, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends Cell Biol.* 5 (8): 293-7, 1995.
 193. Wright WE, Shay JW. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol* 27 (4): 383-9, 1992.
 194. Wu G, Jiang X, Lee W, Chen P. Assembly of functional ALT-associated promyelocytic leukemia bodies requires Nijmegen Breakage Syndrome 1. *Cancer Res.* 63 (10): 2589-95, 2003.
 195. Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, Dalla-Favera R. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* 21 (2): 220-4, 1999.
 196. Yague E, Arance A, Kubitza L, O'Hare M, Jat P, Ogilvie CM, Hart IR, Higgins CF, Raguz S. Ability to acquire drug resistance arises early during the tumorigenesis process. *Cancer Res* 67 (3): 1130-7, 2007.
 197. Yatabe N, Kyo S, Maida Y, Nishi H, Nakamura M, Kanaya T, Tanaka M, Isaka K, Ogawa S, Inoue M. HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene* 23: 3708-15, 2004.
 198. Yeager T, Neumann A, Englezou A, Huschtscha L, Noble J, Reddel R. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.* 59 (17): 4175-9, 1999.
 199. Yi X, Shay JW, Wright WE. Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. *Nucleic Acids Res* 29 (23): 4818-25, 2001.
 200. Zakian VA. Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 270 (5242): 1601-7, 1995.
 201. Zanetti M, Hernandez X, Langlade-Demoyen P. Telomerase reverse transcriptase as target for anti-tumor T cell responses in humans. *Springer Semin Immunopathol* 27 (1): 87-104, 2005.
 202. Zhang R, Wang X, Guo L, Xie H. Growth inhibition of BEL-7404 human hepatoma cells by expression of mutant telomerase reverse transcriptase. *Int J Cancer* 97 (2): 173-9, 2002.
 203. Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson MO. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev* 13 (18): 2388-99, 1999.
 204. Zhou XZ, Lu KP. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent

- telomerase inhibitor. *Cell* 107 (3): 347-59, 2001.
205. Zimling ZG, Rechnitzer C, Rasmussen M, Petersen BL. Familial neuroblastoma - different histological manifestations in a family with three affected individuals. *Apmis* 112 (2): 153-8, 2004.