

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk Institut für Pathologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Böcker -

**Evaluation eines retroviralen Transfektionssystems
zur Hemmung der Telomerase mittels DN-hTERT
in Neuroblastomzellen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Wobser, Marion

aus Bonn

2006

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

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

1. Berichtserstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Christopher Poremba

2. Berichtserstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Schuck

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.06

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk Institut für Pathologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Böcker -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Christopher Poremba
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Schuck

ZUSAMMENFASSUNG

Evaluation eines retroviralen Transfektionssystems zur Hemmung der Telomerase mittels DN-hTERT in Neuroblastomzellen

von Marion Wobser

Die Telomerase spielt eine Schlüsselrolle bei der Proliferation, bei Alterungsprozessen und der Krebsentstehung. Das Enzym wird in mehr als 80 % aller menschlichen Tumoren exprimiert und korreliert eng mit dem Wachstumspotential und der Malignität. Die klinische Anwendung der Telomeraseforschung zur Diagnose, Prognose und Therapieplanung verspricht insbesondere für das Neuroblastom eine Verbesserung der Behandlungsoptionen. Deshalb wurde in dieser Studie ein Transfektionssystem entwickelt und evaluiert, welches eine Telomeraseinhibition mittels retroviralen Gentransfers einer dominant-negativen Mutante der katalytischen Telomerasekomponente hTERT (DN-hTERT) bezweckt. Die kodierende cDNA von WT-hTERT/DN-hTERT ist in das pBabe-Puro-Plasmid inkloniert. Um der genetischen Heterogenität des Neuroblastoms gerecht zu werden, wurde das Transfektionssystem an telomerasepositiven Zelllinien (SKNSH, NGP) mit kurzen Telomerlängen (4 kb, 6 kb) und einer telomerasenegativen ALT-Zelllinie (CHLA-90) mit langen, heterogenen Chromosomenenden (14 kb) angewendet. Durch retroviralen Gentransfer der Vektorkonstrukte konnte in allen Neuroblastomzelllinien eine stabile Integration von pBabe-Puro-Gensequenzen erreicht werden, wie die PCR-Analyse des integrierten Resistenzgens zeigte, ohne unmittelbar zytotoxische Effekte. Trotz erfolgreicher Genübertragung war jedoch eine Expression der von WT-hTERT und DN-hTERT in den verschiedenen Zelllinien nur inkonstant nachweisbar. Dementsprechend fehlten funktionelle Konsequenzen einer Telomeraseinhibition wie Telomerenverkürzung, verändertes Wachstumsverhalten und Zelltod. Für eine effektive Telomerasehemmung bieten sich also in nachfolgenden Arbeiten alternative Vektorsysteme an, um neue Erkenntnisse über die Telomerenbiologie des Neuroblastoms zu gewinnen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Telomere und Telomerase	1
	1.1.1 DNA-Struktur der Telomeren	1
	1.1.2 Telomerasekomplex	3
1.2	Zelluläre Seneszenz, Krise und Immortalisierung	5
1.3	Telomerase und Neuroblastom	7
1.4	Problemstellung	9
2	MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1	Charakterisierung der Vektorkonstrukte	11
	2.1.1 Transformation	11
	2.1.2 Anzucht der Bakterien	13
	2.1.3 Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA	14
	2.1.4 Restriktionsanalyse	16
	2.1.5 Gensequenzierung	19
2.2	Genomischer Southern Blot: Telomerenlängenblot	21
	2.2.1 DNA-Isolierung	22
	2.2.2 DNA-Prüfgel	23
	2.2.3 Restriktionsverdau	24
	2.2.4 DNA-Aufreinigung	25
	2.2.5 DNA-Gel	26
	2.2.6 Transfer	27
	2.2.7 Hybridisierung	28
	2.2.8 Detektion	29
2.3	TRAP-Assay	31
	2.3.1 Proteinisolierung	31
	2.3.2 Proteinquantifizierung	32
	2.3.3 TRAP-Reaktion	33
	2.3.4 Fragmentanalyse	36
2.4	Transfektion	37
	2.4.1 Herstellung stabiler Produzentenzellen	38

2.4.2	Infektion der Zielzellen	41
2.4.3	Selektionierung der Zielzellen	42
2.5	Methoden zur Evaluation des Transfektionssystems	43
2.5.1	PCR des Puromycinresistenzgens	43
2.5.2	WT-hTERT-/DN-hTERT-Expression und Sequenzierung der Mutationsstelle	45
2.6	Zellkultur	47
2.6.1	Zelllinien	47
	2.6.1.1 Neuroblastomzelllinien	47
	2.6.1.2 Produzentenzelllinien	49
2.6.2	Materialien	50
2.6.3	Passagieren der Zellen	51
2.6.4	Einfrieren der Zellen	51
2.6.5	Auftauen der Zellen	51
2.6.6	Antibiotika-Selektionierung	52
3	ERGEBNISSE.....	53
3.1	Charakterisierung der Vektorkonstrukte	53
3.1.1	Restriktionsanalyse	53
	3.1.1.1 Restriktionsverdau EcoRI/HindIII	54
	3.1.1.2 Restriktionsverdau EcoRI/SalI	56
3.1.2	Sequenzierung	58
	3.1.2.1 Mutationsstelle	58
	3.1.2.2 Insertionsbeginn	60
	3.1.2.3 Insertionsende	61
3.2	Charakterisierung der Zielzellen	62
	3.2.1 Telomerenlängenbestimmung	62
3.3	Transfektion	64
3.3.1	Transfektion der Verpackungszellen	64
3.3.2	Infektion der Produzentenzellen	65
3.3.3	Infektion der Zielzellen	66
3.4	Evaluation des Transfektionssystems	68
3.4.1	PCR des Puromycinresistenzgens	68
	3.4.1.1 SKNSH	69
	3.4.1.2 NGP	70
	3.4.1.3 CHLA-90	70

3.4.2	Reverse Transkriptase-PCR von WT-hTERT/DN-hTERT	71
3.4.2.1	SKNSH	71
3.4.2.2	NGP	73
3.4.2.3	CHLA-90	73
3.4.3	Sequenzierung der Amplifikationsprodukte	75
3.4.3.1	SKNSH	75
3.4.3.2	NGP	76
3.4.3.3	CHLA-90	76
3.4.4	Telomerenlängenbestimmung	77
3.4.5	Wachstumsstudien	78
3.4.5.1	SKNSH	79
3.4.5.2	NGP	80
3.4.5.3	CHLA-90	81
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Evaluation	83
4	DISKUSSION.....	85
4.1	Evaluation des Transfektionssystems	85
4.1.1	Telomeraseinhibition mittels DN-hTERT	85
4.1.2	Retroviraler Gentransfer	87
4.1.2.1	Stabile Integration der ektopen Gene	88
4.1.2.2	Expression des Puromycinresistenzgens	89
4.1.2.3	Expression von WT-hTERT/DN-hTERT	89
4.1.3	Fazit: Modifikation des retroviralen Transfektionssystems	92
4.2	Telomeraseinhibition und Neuroblastom	95
4.3	Ausblick: Klinische Anwendbarkeit einer Antitelomerasetherapie	98
4.3.1	Nebenwirkungen einer Telomeraseinhibition	98
4.3.2	Adjuvante Kombinationstherapie	99
4.3.3	Behandlungsresistenz	100
4.3.4	Zunahme genetischer Instabilität	102
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	103
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	106
7	ABKÜRZUNGEN.....	120

LEBENS LAUF.....	121
PUBLIKATIONEN.....	122
DANKSAGUNG.....	123
ANHANG.....	124
A) Genehmigungsbescheid für gentechnische Arbeiten	124

1 Einleitung

1.1 Telomere und Telomerase

Die besonderen strukturellen und funktionellen Eigenschaften eukaryotischer Chromosomenenden wurden vor über 60 Jahren aufgedeckt. In Mutationsexperimenten an der Fruchtfliege *Drosophila* stellte sich heraus, dass natürliche, terminale Chromosomensequenzen im Gegensatz zu strahleninduzierten DNA-Fragmenten vor Fusionen und Rekombinationen geschützt waren (Muller HJ, 1938). Zellfusionsanalysen konnten 3 Jahre später die genstabilisierenden Eigenschaften der Chromosomenenden demonstrieren (McClintock B, 1941). Diese frühen Studien definierten Telomere (τελομερ, griech.: Endstück) als eine spezialisierte Struktur mit protektiven Funktionen, die natürliche Chromosomenenden von chromosomalen Doppelstrangbrüchen unterscheidet.

Telomere sind bedeutend für die Wahrung der genetischen Stabilität, schützen die Chromosomen gegen irreguläre Rekombination und Degradation und sichern ihre komplette Replikation bei jeder Zellteilung. Sie spielen eine Rolle für die Lokalisation der Chromosomen im Zellkern, für die korrekte Teilung der Schwesterchromatiden während der Replikation, wirken mit bei der Steuerung der Genexpression, bei der Zellalterung und der Tumorentstehung (Greider CW, 1996).

1.1.1 DNA-Struktur der Telomeren

Die Endstruktur eukaryotischer Chromosomen besteht aus spezialisierten Nukleoproteinkomplexen (Blackburn EH, 2000). Die DNA der Telomeren setzt sich aus repetitiven G-reichen Sequenzen zusammen, die innerhalb der eukaryotischen Spezies große Homologien aufweist (Meyne J, 1989). Diese unterscheiden sich sowohl durch die spezifische Basenabfolge als auch durch funktionelle Charakteristika von internen DNA-Sequenzen. Menschliche Chromosomen enden mit einer 10-15 kb langen 5'-TTAGGG-3'-Wiederholungseinheit.

Als Folge unvollständiger DNA-Replikation (Ohki R, 2001) besitzen die Telomeren an ihrem 3'-Ende einen G-reichen Einzelstrang mit einer Länge von ungefähr 200 Nukleotiden (McElligot R, 1997; Wright WE, 1997). Rückfaltung und Inversion dieses 3'-TTAGGG-Einzelstranges in den komplementären Doppelstrang resultiert in einer Schleifen-Konfiguration, welche eine Interaktion freier Chromosomenenden verhindert und somit strukturellen und numerischen Chromosomenanomalien vorbeugt (Griffith JD, 1999). Diese sogenannte t-Loop-D-Loop-Struktur reguliert die Bindung der Telomerase an die Chromosomenenden (Griffith JD, 1999; Collins K, 2000) und schützt den telomerischen Einzelstrangüberhang vor DNA-Schädigungskontrollen wie p53 und Rb, Nukleasen und Reparaturenzymen (Greider CW, 1999).

Ihre besondere Struktur und Funktion gewinnen die Chromosomenenden jedoch erst durch Interaktion mit subtelomerischen DNA-Domänen (Blackburn EH, 1991) und durch eine Assoziation mit mehreren hochkonservierten Proteinen (Kim NW, 1994; Broccoli D, 1997). Störungen des komplexen Wechselspiels dieser DNA-assoziierten Komponenten führen zu charakteristischen molekularen und biologischen Auswirkungen auf die Genstabilität und das Zellüberleben. Dies ist die sogenannte Telomerdysfunktion.

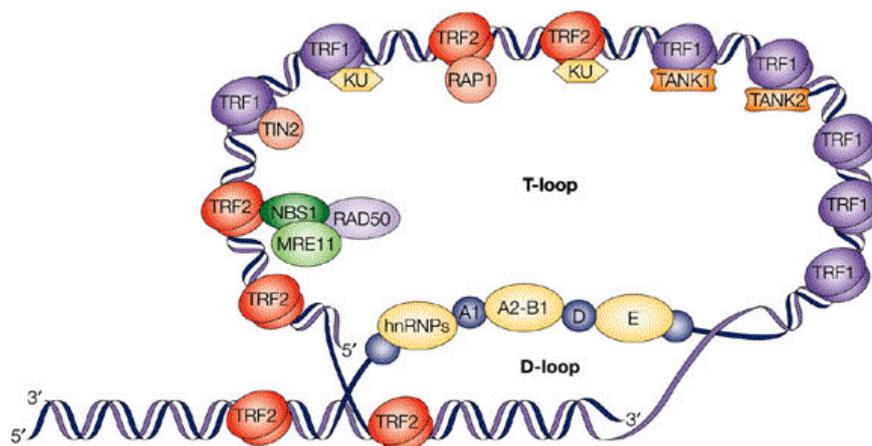


Abb. 1: Telomerassoziierte Proteine in ihrer strukturellen Anordnung. Die charakteristische t-Loop-D-Loop-Struktur bildet die protektive Kappe des Chromosomenendes. Für den Erhalt der Telomerstruktur sind die TTAGGG-bindenden Faktoren TRF1 und TRF2 verantwortlich. Die übrigen assoziierten Faktoren bestimmen über die Telomeraseaktivität, die Aktivierung von Reparaturmechanismen und vermitteln die Folgereaktionen einer Telomerdysfunktion (modifiziert nach Neumann AA, 2002).

1.1.2 Telomerasekomplex

Die DNA-Komponente der Telomeren wird von einer Reversen Transkriptase, der Telomerase, synthetisiert. Dieser Ribonukleoproteinkomplex (RNP) besteht aus mehreren interagierenden Untereinheiten, welche essentiell für die Funktion der Telomerase sind.

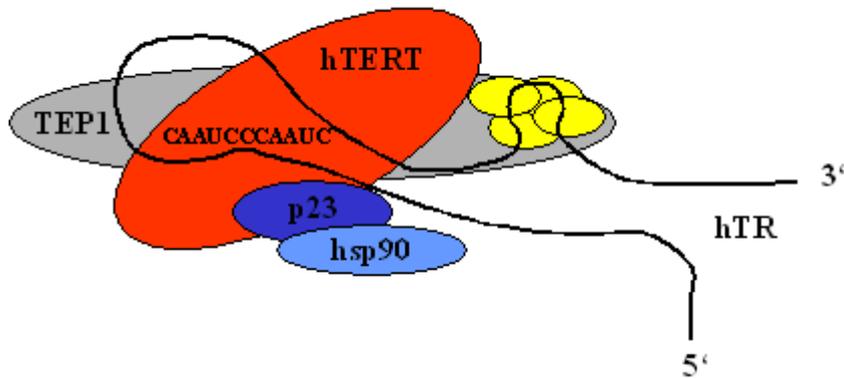


Abb. 2: Telomerasekomplex. Die katalytische Untereinheit hTERT bildet mit ihrer RNA-Matrize hTR und dem telomeraseassoziierten Protein TEP1 den funktionellen Ribonukleoproteinkomplex. Für die korrekte Zusammensetzung und Faltung des Reverse Transkriptase-Moleküls sind Chaperone (p23, hsp90) verantwortlich.

Die katalytische Aktivität der Telomerase wird gewährleistet durch das Protein hTERT, welches signifikante Sequenzhomologien zu anderen eukaryotischen katalytischen Telomeraseuntereinheiten wie EST2p in *Saccharomyces cerevisiae* (Lingner J, 1997), p123 in *Euplotes aediculatus* (Counter CM, 1997), TRT1 in *Schizosaccharomyces pombe* (Nakamura TM, 1997) oder mTERT in *Mus musculus* (Greenberg RA, 1998) aufweist.

Als Reverse Transkriptase katalysiert hTERT die de-novo-Synthese telomerer DNA-Sequenzen. Das Enzym besitzt sechs typische RT-Motive, die essentiell für die katalytische Aktivität sind (Lingner J, 1997; Harrington L, 1997), sowie ein hochspezifisches, konserviertes Telomerase-Motiv T (Greenberg RA, 1998), welches die Bindung der RNA-Komponente reguliert (Bryan TM, 2000). Unterschiedliche Punktmutationen innerhalb der RT-Motive führen zu einer dramatischen Reduktion der enzymatischen Aktivität (Harrington L, 1997; Weinrich SL, 1997), welche als

dominant-negative hTERT-Varianten zur experimentellen Telomerasehemmung genutzt werden können (Zhang X, 1999; Hahn WC, 1999; Guiducci C, 2001).

hTERT ist der limitierende Faktor für die Enzymaktivität (Meyerson M, 2000; Counter CM, 1998). Die Regulation der Telomeraseaktivität kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. In erster Linie werden die hTERT-Wirkungen auf transkriptionellem Wege gesteuert. Transkriptionsfaktoren wie c-Myc, Sp1 oder Östrogen (Kyo S, 1999; Wu KJ, 1999; Li H, 2002) aktivieren den hTERT-Promotor, wohingegen eine Methylierung des GC-reichen Promotors, Histondeazetylierung oder Elemente wie Mad, Tumorsuppressorgene wie p53, Rb oder das WT-Gen eine Repression induzieren (Kyo S, 2000; Xu D, 2000; Kiyono A, 1998). Neben posttranslationaler Modifikation durch Phosphorylierungen (Li H, 1998) ist das alternative Splicing ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Modulierung der Enzymaktivität (Ulaner GA, 1998). Als physiologischer dominant-negativer Inhibitor konnte die hTERT α -Splicevariante identifiziert werden, welche in normalen, somatischen Zellen und ALT-Tumoren an der Supprimierung der Telomeraseaktivität beteiligt zu sein scheint (Colgin LM, 2000; Kilian A, 1997).

Als Matrize für die Addition repetitiver TTAGGG-Sequenzen dient eine im Telomerasekomplex integrierte essentielle RNA-Komponente, hTR (Feng J, 1995). Mit ihrer repetitiven, 11 Nukleotide umfassenden 5'-CUAACCCUAAC-3'-Sequenz bindet die RNA-Einheit (451 bp) an die komplementäre Telomersequenz und liefert das Template für die Basenaddition durch die Reverse Transkriptase hTERT. Das 3'-Ende kann so um die entsprechende Sequenzabfolge verlängert werden (Morin GB, 1989).

Das Telomerase-assoziierte Protein TEP1 interagiert spezifisch mit dem hTERT-Protein und der RNA-Untereinheit des Ribonukleoproteinkomplexes (RNP) (Harrington L, 1997). Ebenso wenig wie hTR korreliert es jedoch konstant mit der enzymatischen Aktivität der reversen Transkriptase (Liu Y, 2000; Ito H, 1998).

1.2 Zelluläre Seneszenz, Krise und Immortalisierung

Die meisten Zellen somatischer Gewebe sind einem Alterungsprozess unterworfen und besitzen eine begrenzte Teilungskapazität. Die Telomeren besitzen eine Schlüsselrolle für das Proliferationspotential, den Zellzyklus und Zellalterungsprozess (Lundblad V, 1989; Yu GL, 1990). Genetische Instabilität, Wachstumsstopp und Zelltod konnten als universelle Antwort auf eine Störung der Telomerfunktion identifiziert werden (Wotton D, 1997; Singer MS, 1994).

Die daraus abgeleitete Telomerhypothese wurde zur Grundlage für das Zweistufenkonzept der Immortalisierung in vitro und der Tumorentstehung in vivo. Dieses stelle ich im folgenden als theoretischen Hintergrund meiner Arbeit kurz dar.

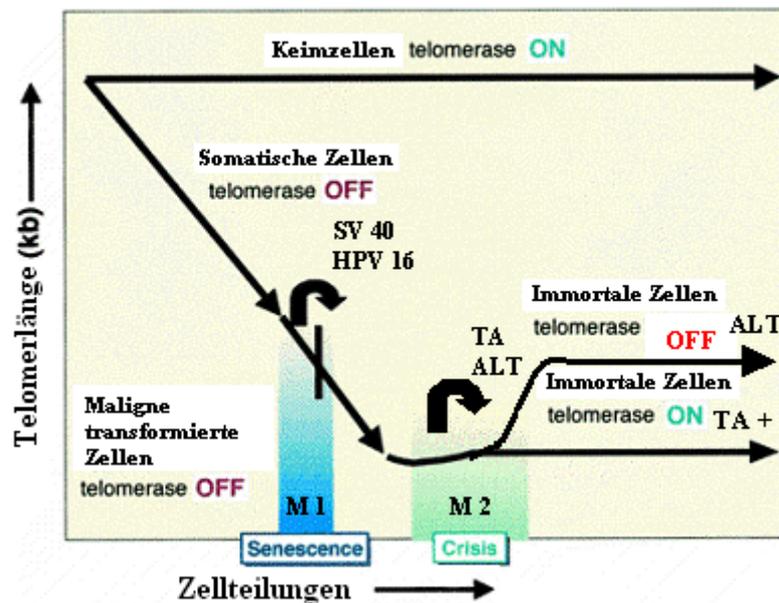


Abb. 3: Telomere und Immortalisierung. Zwei Mortalitätsstadien werden auf dem Weg zur Immortalisierung durchlaufen. Die antiproliferative Stufe der Seneszenz tritt unter dem Diktat der Telomererosion ein und kann durch Ausschaltung der Tumorsuppressorgene p53 und Rb überwunden werden. Weitere Zellteilungen führen zu maximaler genetischer Instabilität, welche das Stadium der Krise kennzeichnen. Nur durch den Erwerb von Telomermaintenance-Mechanismen (TMM) – Telomeraseaktivierung oder ALT – kann der immortale, telomerenstabilisierende Status erreicht werden (modifiziert nach Meyerson M, 2000).

Bis auf wenige Ausnahmen besitzen normale menschliche Zellen keine Telomeraseaktivität. Mit jeder Zellteilung verkürzen sich deshalb die Chromosomenenden um 50-200 bp, da bei der semikonservativen Replikation der linearen eukaryotischen Chromosomen Telomersequenzen verloren gehen. Dies liegt an der unvollständigen Synthese des DNA-Folgestranges durch die unidirektionale DNA-Polymerase (Endreplikationsproblem) (Olovnikov AM, 1973; Harley CB, 1992; Lingner J, 1995). Der replikationsbedingte Verlust von einzelnen Nukleotiden bis hin zu kompletten Okazaki-Fragmenten wird zusätzlich verstärkt durch die zellzyklusregulierte 5'-3'-Nukleaseaktivität mit folgender Prozessierung des C-reichen Einzelstranges (Makarov VL, 1997). Nach 50-100 Zellteilungen, dem zellspezifischen Hayflick-Limit, erreichen die Telomeren eine kritische Länge (Verkürzung von ca. 10 kb auf 6 kb). Die drastisch verkürzten Chromosomen triggern den Eintritt in das Mortalitätsstadium M1, auch replikative Seneszenz genannt (Hayflick L, 1961; Hayflick L, 1976).

Dieses Stadium M1 ist gekennzeichnet durch Zellzyklusarretierung, Proliferationsstop, genetische Instabilität und Zelltod. Auf molekularer Ebene finden sich im Stadium der Seneszenz eine gestörte Telomerstruktur und veränderte subtelomerische DNA-Sequenzen (Wright WE, 1992). Hierdurch werden Tumorsuppressorgene wie p53 und die GADD-Kaskade aktiviert und antiproliferative Signale gesetzt (Chan SW, 2002). Sukzessive Telomerverkürzung bestimmt also als „Mitotische Uhr“ die Proliferationskapazität einer Zelle (Telomerhypothese) (Harley CB, 1991; Greider CW, 1990; Bodnar AG, 1998).

Das Mortalitätsstadium M1 kann durch Inaktivierung wachstumsregulierender Tumorsuppressorgene (p53, Rb) überwunden werden. Eine zentrale Rolle bei der Umgehung des natürlichen Proliferationsstop spielen virale Onkogene (SV40 Large T-Antigen, Humanes Papilloma Virus HPV16 assoziierte Proteine E6/E7), radioaktive Strahlung, Chemikalien und Spontanmutationen (Wright WE, 1989). Die transformierten Zellen erhalten so die Fähigkeit, sich unter progressiver Telomerverkürzung weiter zu teilen, bis sie schließlich nach 15-20 Zellteilungen im Mortalitätsstadium M2 einer maximalen Chromosomeninstabilität (dizentrische Chromosomen, Aneuploidität, Verlust genetischer Information) mit konsekutivem

Zelltod ausgesetzt sind. Dieses Stadium wird als Krise oder Genetische Katastrophe bezeichnet (Huschtscha LI, 1983; Counter CM, 1992).

Lediglich einzelne überlebende Klone (1 von 10^7 Zellen) (Huschtscha LI, 1983; Shay JW, 1996) können auch dieses Stadium trotz multipler DNA-Schäden überwinden. Durch Aktivierung der Telomerase oder eines alternativen Mechanismus zur Telomerverlängerung (ALT) stabilisieren sie die Chromosomenenden auf konstantem Niveau und umgehen somit das Apoptoseprogramm (Counter CM, 1994; Vaziri H, 1998). Die transformierten Zellen sind immortal.

Fazit: Mutationen, die Telomerase reaktivieren, kooperieren demzufolge mit anderen Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen bei der schrittweisen malignen Transformation einer Tumorzelle (Hahn WC, 1999). Im Gegensatz zu normalen menschlichen Zellen - mit Ausnahme von undifferenzierten, embryonalen Zellen (Xu D, 1999), stark proliferierenden Zellen sowie Stammzellen (Broccoli D, 1995; Hiyama E, 1996; Bonatz G, 1998, Belair CD, 1997), Blutzellen (Counter CM, 1995) und Keimzellen (Kim NW, 1994) - besitzen nur Tumorzellen eine hohe Telomeraseaktivität.

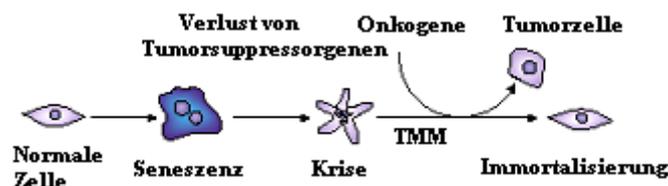


Abb. 4: Modell zur schrittweise Entartung einer normalen, somatischen Zelle begrenzter Proliferationskapazität zur immortalen, maligne transformierten Tumorzelle.

1.3 Telomerase und Neuroblastom

Nach hämolymphatischen Neoplasien und Hirntumoren sind Neuroblastome die dritthäufigsten malignen Tumoren des Kindesalters. Die Tumoren entstehen hauptsächlich in den Nebennieren und im sympathischen Grenzstrang (Harms D, 1997). Das Neuroblastom zeichnet sich durch eine ausgeprägte klinische Variabilität aus,

welcher auf molekularer Ebene eine komplexe Kombination genetischer Aberrationen zugrunde liegt (Maris JM, 1999).

Ausgesprochen aggressiven und therapieresistenten Formen stehen Fälle mit spontaner Regression und Differenzierung der Tumorzellen auch in fortgeschrittenen Stadien gegenüber (Stadium IV S) (Hiyama E, 1995). Die Identifizierung der charakteristischen, genetischen Muster als Grundlage für das biologische Tumorverhalten ermöglicht es, den individuellen Krankheitsverlauf des Neuroblastoms in der Zusammenschau mit klinischen Parametern wie Tumorstadium, Alter und histologischem Befund exakter vorherzusagen.

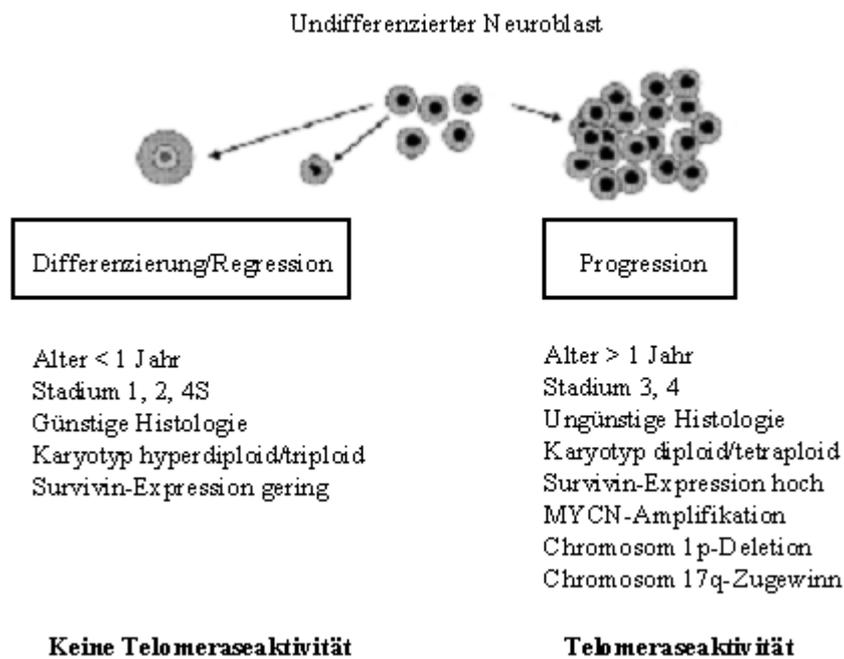


Abb. 5: Aufgrund etablierter klinischer Parameter (Alter bei Diagnosestellung, Stadium INSS, Histologie Shimada/INPC) und molekularer Marker (Ploidie, Survivin-Expression, chromosomale Aberrationen, MYCN-Amplifikation, Telomeraseaktivität) lassen sich zwei prognostisch unterschiedliche Typen des Neuroblastoms unterscheiden (modifiziert nach Poremba C, 2001; Maris JM, 1999).

Ergänzend zu etablierten Markern wie MYCN-Amplifikation und LOH 1p (Maris JM, 1999; Carachi R, 2002) nimmt neben der 17q-Instabilität und der Überexpression des Antiapoptoseproteins Survivin auf 17q25 (Islam A, 2000) das Enzym Telomerase eine Schlüsselrolle für die Tumorbilogie des Neuroblastoms ein (Brodeur GM, 1997). Im

Gegensatz zu differenzierten Ganglioneuromen oder normalem Nebennierengewebe exprimieren 30 % der malignen Neuroblastome das Enzym Telomerase (Hiyama E, 1995; Poremba C, 2000). Die Telomeraseaktivität korreliert mit dem Tumorstadium, der Prognose und dem Therapieansprechen (Poremba C, 2000; Streutker CJ, 2001; Myers NA, 2002). Die Telomeraseinhibition bietet sich demzufolge als ein vielversprechender innovativer Ansatz zur adjuvanten Therapie des Neuroblastoms an (Reynolds CP, 2000).

1.4 Problemstellung

Um genauere Kenntnisse über die Rolle der Telomerase für die Tumorbilogie des Neuroblastoms zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit ein retrovirales Transfektionssystem entwickelt und evaluiert. Dies erfolgt erstmalig an Neuroblastomzelllinien.

Innerhalb eines Gesamtprojektes zum Studium der Telomerenbiologie klein-blau-rundzelliger Tumoren des Kindesalters bildet der retrovirale Gentransfer von WT-hTERT/DN-hTERT-Konstrukten die Voraussetzung, die Folgereaktionen einer Telomeraseüberexpression und Telomerasehemmung *in vitro* zu studieren.

Folgende Problemstellungen wurden der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegt:

- 1) Amplifizierung und Charakterisierung der Vektorkonstrukte pBabe-Puro, pBabe-Puro-WT-hTERT und pBabe-Puro-DN-hTERT, welche die Grundlage für die retrovirale Transfektionsmethode bilden.
- 2) Charakterisierung der Neuroblastomzelllinien bezüglich Telomeraseaktivität und Telomerenlänge. Dies ist Voraussetzung für die nachfolgende Analyse der Konsequenzen, wie sie sich aus dem Gentransfer der Vektorkonstrukte WT-hTERT und DN-hTERT ergeben.
- 3) Durchführung des retroviralen Gentransfers mit Hilfe der Verpackungszelllinie Omega E, der Produzentenzelllinie PG13 und der Neuroblastomzielzellen SKNSH, NGP und CHLA-90 und Isolierung erfolgreich transfizierter Zellen.

- 4) Evaluation des Transfektionssystems bzgl. erfolgreicher, stabiler Integration der Gensequenzen des Plasmidvektors in die Neuroblastomzielzellen, tatsächlicher Expression der Gene von WT-hTERT und von DN-hTERT sowie funktioneller Auswirkungen auf die Telomerlängen der transfizierten Zellen.

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautet: Eignet sich das von uns angewandte retrovirale Transfektionssystem auf Basis des pBabe-Puro-Plasmids, um in den Neuroblastomzelllinien SKNSH, NGP und CHLA-90 die Auswirkungen einer Telomeraseüberexpression oder –inhibition zu studieren?

Die Diskussion des von uns entwickelten Transfektionssystems soll sich schwerpunktmäßig mit folgenden Themen befassen:

1. Evaluation und Diskussion des methodischen Ansatzes zur Telomerasehemmung.
2. Weshalb bietet sich insbesondere das Neuroblastom zur Telomerasehemmung an?
3. Welchen klinischen Nutzen besitzt das entwickelte Neuroblastom-Zellkulturmodell? Wie läßt sich eine eventuelle, zukünftige klinische Anwendbarkeit insbesondere im Hinblick auf die Problematik der genetischen Destabilisierung, Zeitverzögerung und Resistenzerscheinung beurteilen?

2 Material und Methoden

2.1 Charakterisierung der Vektorkonstrukte

2.1.1 Transformation

Transformation bedeutet das Einbringen von DNA in eine bakterielle Zelle. Vor der Genübertragung werden die Bakterien physikalisch und/oder chemisch behandelt, um kompetente Zellen für eine effiziente Plasmidaufnahme zu erhalten. In Anwesenheit zweiwertiger Ionen oder durch Hitzeschock-Exposition steigt die Aufnahmefähigkeit für DNA. Internalisiertes Plasmid wird in der Wirtszelle repliziert, und erfolgreich transformierte Bakterien können durch Expression eines Resistenzgens durch Antibiotikabehandlung selektioniert werden.

a) Material/Geräte

Vektorkonstrukte:	pBabe-Puro-WT-hTERT pBabe-Puro-DN-hTERT pBabe-Puro (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. Weinberg, MIT, Boston, Massachusetts, USA)
SOC-Medium:	1 % Hefeextrakt (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) 2 % Casein (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) 10 mM NaCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 2.5 mM KCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 10 mM MgCl ₂ (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 10 mM MgSO ₄ (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 20 mM Glucose (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) (in Aqua dest., pH 7.5, autoklaviert)
LB-Agar:	5 g NaCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 5 g Pepton (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) 2.5 g Hefeextrakt (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

7.5 g Agar (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)
(in 500 ml Aqua dest., ph 7.4, autoklaviert)

Bakterien: E.coli XL10-Gold Ultracompetent Cells (Stratagene, La Jolla, USA)

LB-Ampicillin-Agar (100 µg/ml Ampicillin)

Ampicillin (50 mg/ml) (Stratagene, La Jolla, USA)

Agarplatten (Falcon, St. Louis, USA)

β-Mercaptoethanol (Stratagene, La Jolla, USA)

1.5 ml Röhren (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

20 ml Röhren (Falcon, St. Louis, USA)

Autoklavierte Zahnstocher/Metallöse

Feinwaage AE 240 (Mettler, Giessen, Deutschland)

Wasserbad Thermocycler 60 (Bachofen Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland)

Schüttler HAT (Infors AG, Basel, Schweiz)

Brutschrank (Mettler, Schwabach, Deutschland)

b) Durchführung

E.coli XL10-Gold Ultracompetent Cells werden mit den Plasmiden pBabe-WT-hTERT, pBabe-DN-hTERT und pBabe transformiert. In einem 1.5 ml Röhren werden je 20 µl der E.coli-Bakterien auf Eis aufgetaut und gemischt. Nach Zugabe von β-Mercaptoethanol (1:20) läßt man die Bakterien unter wiederholtem Mischen für 20 min. auf Eis inkubieren. Dieser Schritt erfolgt, um die bakterielle Zellmembran für Makromoleküle permeabel zu machen und die Transformationseffizienz zu erhöhen.

Zu jedem Ansatz werden je 50 ng Plasmid zugesetzt und anschließend gemischt. Für weitere 30 min. lässt man die kompetenten E.coli auf Eis stehen, um ausreichende DNA-Bindung an die äußere Zellmembran der Bakterien zu gewährleisten. Die Transformationsansätze werden für 30 sec bei 42 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend für 2 min. auf Eis abgekühlt. Durch den Hitzeschock werden die Bakterien unter Streß gesetzt und nehmen vermehrt die Plasmide auf. Je 180 µl SOC-Medium, vorgewärmt auf 42 °C, wird zu den Ansätzen gegeben und bei 37 °C für 1 Stunde mit 200 rpm geschüttelt.

Im folgenden werden je 20 µl der transformierten E.coli auf vorbereiteten Selektions-Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin) mit einem autoklavierten Zahnstocher oder einer sterilen Metallöse gleichmäßig ausgestrichen und für 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Erfolgreich transformierte Bakterienkolonien können über das im pBabe-Vektor integrierte Ampicillin-Resistenzgen selektioniert werden. E.coli mit β-Laktamase-Expression unterlaufen den letalen Antibiotikaeffekt. Durch Kultivierung der resistenten Kolonien kann die aufgenommene Plasmid-DNA vermehrt werden.

2.1.2 Anzucht der Bakterien

a) Material/Geräte

Ampicillin (50 mg/ml) (Stratagene, La Jolla, USA)
LB-Ampicillin-Medium (50 µg/ml Ampicillin)
Glycerol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
30 ml Plasmid-Plastikröhrchen (Falcon, St. Louis, USA)
1.5 ml Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
20 ml Röhrchen (Falcon, St. Louis, USA)
500 ml Erlenmeier-Kolben (Schott, Elmsford, USA)
Autoklavierte Zahnstocher
Brutschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland)
Zentrifuge: Sorvall SS-34 Rotor (Heraeus, Nürnberg, Deutschland)

b) Durchführung

Eine einzelne Bakterienkolonie wird mit einem autoklavierten Zahnstocher von der frisch ausgestrichenen Agarplatte entnommen und zum Animpfen von 2.5 ml LB-Flüssigkultur, versetzt mit Ampicillin (50 µg/ml), im 20 ml Röhrchen verwendet. Nach 8-10 Stunden intensiven Schüttelns mit 300 rpm bei 37 °C (spätlogarithmische Phase der Wachstumskurve) werden 25 µl der Vorkultur in selektivem LB-Medium (1:1000) verdünnt und im 500 ml Erlenmeierkolben für weitere 12-16 Stunden unter Schütteln (300 rpm) inkubiert (frühe stationäre Phase der Wachstumskurve).

Die Bakterienzellen werden anschließend bei 5000 rpm für 15 min. bei 4 °C in 30 ml Plasmid-Plastikröhrchen sedimentiert und der Überstand sofort verworfen.

Das Bakteriensediment kann bis zur weiteren Verarbeitung bei –20 °C eingefroren werden.

Zur Herstellung von Stammkulturen werden vor dem Zentrifugieren je 100 µl E.coli aus der Flüssigkultur entnommen, in einem 1.5 ml Röhrchen mit 100 µl Glycerol (85 %) gemischt, für 1 min. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

2.1.3 Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt nach dem Plasmid Midi Kit-Protokoll (Qiagen). Grundlage bildet das Anionenaustauscher-Prinzip, welches sich die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von Plasmid-DNA, chromosomaler DNA, RNA und Proteinen zunutze macht, um eine selektive Gewinnung bakterieller Plasmide zu gewährleisten. Nach alkalischer Lyse der Zellen erfolgt unter adäquaten pH-Bedingungen die Bindung des negativ geladenen Plasmids an die Anionenaustauschersäule, wohingegen andere zelluläre Bestandteile mittels leicht saurer Waschlösungen entfernt werden können. In einem stark sauren Waschpuffer kann die Plasmid-DNA schließlich von der Anionenaustauscher-Säule gelöst und aufbereitet werden.

a) Material/Geräte

Plasmid Purification Kit (Qiagen, Seattle, USA)

STE:	100 mM NaCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
	10 mM Tris-Cl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
	1 mM EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland)
	(pH 8.0)
TE	10 mM Tris-Cl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
	1 mM EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland)
	(pH 8.0)

Isopropanol 100 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)
20 ml Röhrchen (Falcon, St. Louis, USA)
30 ml Plasmid-Glasröhrchen (Falcon, St. Louis, USA)
10 ml/5 ml Plastik-Pipetten (Falcon, St. Louis, USA)
Peleusball (Falcon, St. Louis, USA)
Zentrifugen: Sorvall SS-34 Rotor (Heraeus, Nürnberg, Deutschland)
Biofuge 13(Heraeus, Nürnberg, Deutschland)
Sigma 2K15 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

b) Durchführung

Die zentrifugierten Bakterien werden in 4 ml alkalischem Resuspendierungspuffer P1 resuspendiert und durch Mischen und Vortexen vollständig gelöst. 4 ml vorgewärmter NaOH-SDS-Lysepuffer P2 wird zu der Bakteriensuspension hinzugegeben und unter vorsichtigem Mischen für maximal 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Diese eng begrenzte Inkubationszeit in SDS-Lösung gewährleistet maximales Freisetzen der Plasmid-DNA aus der Zelle, möglichst ohne dabei auch zellmembrangebundene chromosomale DNA zu gewinnen. Freigewordene RNA wird im denaturierendem alkalischem Milieu durch RNase A verdaut.

Nach Zugabe des sauren Neutralisierungspuffers P3 wird das Lysat durch das Ausfällen von chromosomaler DNA, Proteinen, RNA-Fragmenten, Zelltrümmern und SDS trüb und viskös. Die Trennung von Plasmiden und chromosomaler DNA beruht auf der Kopräzipitation der zellmembrangebundenen bakteriellen Chromosomen-DNA mit den unlöslichen Komplexen aus Salz, RNA und Proteinen, wohingegen die durch ihre spezielle Struktur geschützte Plasmid-DNA im klaren Überstand verbleibt.

Zur möglichst vollständigen Präzipitation zellulärer Bestandteile wird die Suspension für 15 min. auf Eis inkubiert und alle 2 min. gemischt.

Bei 13000 rpm wird das Lysat für 30 min. und 4°C zentrifugiert, vorher noch einmal gut gemischt. Nach dem Zentrifugieren wird der klare Überstand mit der Plasmid-DNA sofort in ein 20 ml Röhrchen überführt.

Eine Qiagen-tip 100-Säule wird mit 4 ml saurem Puffer QBT equilibriert. Während dieses Vorgangs werden die Oberflächenmoleküle der Anionenaustauschersäule (Diethylaminoethanol, DEAE) vollständig protoniert, um eine große Bindungskapazität für die DNA-Moleküle zu gewährleisten.

Der Plasmidüberstand wird sofort nach dem Zentrifugieren auf die Säule gegeben und vollständig durchlaufen gelassen. Durch Interaktion der negativ geladenen Phosphatgruppen der Plasmide erfolgt unter den gegebenen pH-Bedingungen eine feste Bindung der DNA an die positiv geladenen DEAE-Moleküle.

Verunreinigungen durch chromosomale DNA, RNA, Proteine oder Kohlenhydrate können durch 2-maliges Waschen mit je 10 ml Puffer QC (mittlere Salzkonzentration) von den Säulen gelöst werden. Anschließend wird die stärker gebundene Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF (hohe Salzkonzentration) eluiert und in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen.

Durch Hinzufügen von je 3.5 ml Isopropanol 100 % (Raumtemperatur) präzipitiert man die eluierte Plasmid-DNA, anschließend wird bei 11000 rpm zentrifugiert. Zweimal wird das erhaltene DNA-Pellet mit 2 ml 70 % Ethanol (Raumtemperatur) gewaschen und jeweils bei 11000 rpm für 10 min. zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird in ein 1.5 ml-Röhrchen transferiert und für 15-30 min. unter dem Abzug luftgetrocknet. Die Plasmide werden in 100 µl Aqua dest. aufgenommen und nach photometrischer Konzentrations- und Reinheitsbestimmung (260/280 nm) bei -20 °C gelagert.

2.1.4 Restriktionsanalyse

Zur Analyse der isolierten Plasmid-DNA wird das gereinigte Plasmid mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI und HindIII bzw. SalI enzymatisch geschnitten und auf einem 1 % (w/v) Agarose-Gel überprüft. Die entstehenden DNA-Fragmente lassen sich durch ihre unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im Agarose-Gelsystem differenzieren, abhängig von Größe und Konformation (linear, ringförmig, superhelikal). Unterschiedliche Wandergeschwindigkeiten der Restriktionsfragmente im elektrischen Feld erlauben eine Analyse der Plasmide und ihrer Inserts mittels des aufgetragenen DNA-Längenstandards.

a) Material/Geräte

Vektorkonstrukte: pBabe-PuroWT-hTERT
pBabe-PuroDN-hTERT
pBabe-Puro

Restriktionsenzyme: EcoRI 20 U/ μ l (Amersham Pharmaceuticals, Buckinghamshire, England)
HindIII 20 U/ μ l (Eurogentec, Liège, Belgien)
Sall 10 U/ μ l (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

Reaktionspuffer: Green Buffer A 10x (Eurogentec, Liège, Belgien)
REACT3 10x (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

1 % Agarose-Gel: 0.5 g Agarose (Bio Whittacker, Heidelberg, Deutschland)
50 ml 1x TAE-Puffer
2 μ l Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

50x TAE-Puffer: 2 M Tris (Promega, Mannheim, Deutschland)
1 M Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
0.1 M EDTA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
(pH 8.0)

Ladepuffer GBX: 0.25 % Bromphenolblau (Merck, Darmstadt, Deutschland)
0.25 % Xylencyanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
30 % Glycerol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Längenstandard: M6 (1:10) (Eurogentec, Seraing, Belgien)
Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgien)

BSA (0.1 mg/ml) (Serva, Heidelberg, Deutschland)
500 ml Erlenmeierkolben (Schott, Elmsford, USA)
Taschenschablone
Brutschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland)
Elektrophoresekammer EPS 200/600 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)
UV-Quelle Transilluminator LKB (Brommer, Stuttgart, Deutschland)
Kamera Gel Cam 0.7x (Polaroid, Waltham, USA)

b) Durchführung

Pro Plasmid werden in 1.5 ml Röhrchen je 3 Reaktionsgemische angesetzt mit einem Totalvolumen von 10 μ l. Nach dem Pipettieren des Restriktionsansatzes auf Eis werden je 4 μ l DNA zu den 6 μ l Mix hinzupipettiert, gevortext und zentrifugiert und bei 37 $^{\circ}$ C für 1 Stunde verdaut. Ein Restriktionsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

	EcoRI	HindIII	EcoRI/HindIII
DNA	4.0 μ l	4.0 μ l	4.0 μ l
EcoRI	0.25 μ l		0.25 μ l
HindIII		0.25 μ l	0.25 μ l
Green Buffer A	1.0 μ l	1.0 μ l	1.0 μ l
H2O	3.75 μ l	3.75 μ l	2.5 μ l
BSA	1.0 μ l	1.0 μ l	1.0 μ l
Total	10 μl	10 μl	10 μl

bzw.

	EcoRI	SalI	EcoRI/SalI
DNA	4.0 μ l	4.0 μ l	4.0 μ l
EcoRI	0.25 μ l		0.25 μ l
SalI		0.5 μ l	0.5 μ l
React3	1.0 μ l	1.0 μ l	1.0 μ l
H2O	3.75 μ l	3.5 μ l	2.25 μ l
BSA	1.0 μ l	1.0 μ l	1.0 μ l
Total	10 μl	10 μl	10 μl

Die Restriktionsendonucleasen EcoRI, HindIII und SalI unterscheiden sich durch ihre Erkennungssequenzen, welche als molekulare Marker für die Charakterisierung der DNA herangezogen werden können.

Je 5 μ l Proben (6:1 in Ladepuffer GBX) und 2.5 μ l Längenstandard werden auf einem 1% Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetragen und in der Elektrophoresekammer bei 80 mA für 30-60 min. laufen gelassen. Nach beendetem Lauf wird das Gel im durchscheinenden UV-Licht (254/366 nm) mit der Polaroidkamera fotografiert. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in den DNA-Doppelstrang können die

elektrophoretisch getrennten Proben mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden. Der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex erscheint als rot-orange leuchtende Banden.

2.1.5 Gensequenzierung

Die Sequenzanalyse der Vektorkonstrukte erfolgt nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger). Sie beruht auf der enzymatischen Neusynthese eines fluoreszenzmarkierten komplementären DNA-Einzelstranges, die basenspezifisch unterbrochen wird. Die dadurch gebildeten Nukleotid-Fragmente unterschiedlicher Länge können gelelektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Über die größenspezifischen Wandergeschwindigkeiten lassen sich Rückschlüsse auf die Basenabfolge des zu analysierenden Matrizen-Gens schließen.

a) Material/Geräte

Vektorkonstrukte: pBabe-WT-hTERT

pBabe-DN-hTERT

BigDye Terminator Kit (Qiagen, Seattle, USA)

DyeEx Kit (Qiagen, Seattle, USA)

Primer (1 µM) (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Primer Mutationsstelle:

107/01: 5`-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3`

(GenBank Position 2875-2894)

110/01: 3`-CGCAAACAGCTTGTTCTCCATGTC-5`

(GenBank Position 3711-3688)

Primer Insertionsbeginn:

125/01: 3`-TTCAGGCAGGACACCTGG-5`

(GenBank Position 1379-1362)

Primer Insertionsende:

126/01: 5`-CCCTCTGCTACTCCATCCTG-3`

(GenBank Position 4266-4287)

Zentrifuge Biofuge 13 (Heraeus, Nürnberg, Deutschland)

Thermocycler (Bio-Rad, Hercules, USA)

ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, Foster City, USA)

b) Durchführung

Für die Sequenzierreaktion wird ein Ansatz im 200 µl-Röhrchen analog dem BigDye Terminator Kit (Qiagen) hergestellt.

Premix	2.0 µl
DNA (200-400 ng)	2.0 µl
Primer (1 µM)	1.5 µl
H ₂ O	4.5 µl
Total	10 µl

Für die Sequenzierung werden für die Plasmide pBabe-WT-hTERT und pBabe-DN-hTERT zur Analyse der Insertionsstelle und der Mutationsstelle die entsprechend designten Primer eingesetzt. Die Sequenzierreaktion läuft in 200 µl-Röhrchen nach Zugabe von 2 Tropfen Mineralöl nach folgendem PCR-Protokoll mit 30 Zyklen ab:

Elongation	96 °C	4 min.
	96 °C	30 sec.
Annealing	50 °C	20 sec.
	60 °C	2 min.

Mittels der dNTPs und der Taq-Polymerase wird ein dem Plasmid komplementärer Nukleotidstrang synthetisiert. Die Primer hybridisieren an die Vektor-DNA und definieren den Startpunkt für die DNA-Synthese in Gegenwart der Polymerase und der dNTPs. Wird ein komplementäres fluoreszenzmarkiertes ddNTP (dideoxy-NTP) in die wachsende Kette eingebaut, so induziert dieses Nukleotidanalogen einen Kettenabbruch, da keine OH-Gruppe an Position 3 zur Bindung des nächsten Nukleotid vorhanden ist. Je nachdem, an welche Stelle die ddNTPs eingebaut werden, entstehen unterschiedlich lange, fluoreszenzmarkierte Fragmente, welche auf einem Sequenziergel analysiert werden können.

Die Probenaufreinigung der DNA-Ketten für die nachfolgende ABI PRISM-Analyse erfolgt nach dem DyeEx Spin Protocol (Qiagen). Mittels Gelfiltrationschromatographie können die DNA-Fragmente von dem Sequenzierungsfarbstoff und vereinzelt Nukleotiden aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts getrennt werden. Hierzu werden die Proben (1:2 in H₂O) für 3 min. bei 2800 rpm zentrifugiert. Das Eluat mit der gereinigten DNA kann bis zur Analyse auf dem ABI PRISM 3700 bei -20 °C gelagert werden.

Bei der Analyse mit dem ABI PRISM 3700 (Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinik Münster) wandern die Nukleotide mittels Kapillarelektrophorese im elektrischen Feld an einem Laserstrahl vorbei, der diese zur Fluoreszenz anregt. Das Ergebnis schlägt sich nieder in einer Folge von emittierten Fluoreszenz-Peaks, die den einzelnen Nukleotiden zugeordnet sind, und detektiert werden.

Die Auswertung und graphische Darstellung der ABI PRISM-Ergebnisse erfolgt mittels der Computersoftware Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>, Version 1.45) und dem Anwenderprogramm Blast2Sequence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast2seq/wblast2.cgi>).

2.2 Genomischer Southern Blot: Telomerenlängenblot

Die Telomerlänge wird durch Southern-Blot-Analyse der Terminal Restriction Fragmente TRF analysiert. Das Prinzip beruht auf der Fragmentierung genomischer DNA durch Restriktionsenzyme, welche jedoch innerhalb telomerischer und subtelomerischer Genregionen keine palindromischen Sequenzen besitzen, sodass diese Genbereiche intakt bleiben. Nach elektrophoretischer Auftrennung können die so entstandenen TRF in einem Southern Blot auf eine Membran transferiert werden und mit Hilfe einer telomerspezifischen Oligonukleotid-Sonde detektiert werden. Durch Vergleich mit einem Längenstandard läßt sich die durchschnittliche TRF-Länge bestimmen.

2.2.1 DNA-Isolierung

a) Material/Geräte

Zellmaterial

Lysepuffer (Biozym, Hamburg, Deutschland)

Proteinase K (20 mg/ml (Qiagen, Seattle, USA)

RNase A (10 mg/ml) (Qiagen, Seattle, USA)

6 M NaCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Isopropanol 100% (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)

0.1 M TE-Puffer

1.5 ml Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Zellschaber (Falcon, St. Louis, USA)

Brutschrank (Mettler, Schwabach, Deutschland)

Zentrifuge Biofuge 13 (Heraeus, Nürnberg, Deutschland)

b) Durchführung

Die DNA-Isolation erfolgt analog dem Puregene DNA extraction protocol (Biozym, Oldendorf, Deutschland). Mittels 1500 μ l alkalischem Lysepuffer werden die Zellproben lysiert und das Material homogenisiert. Nach Zugabe von 18 μ l Proteinase K wird das Lysat in den Zellkulturflaschen ü.N. bei 56 °C verdaut. Denaturierte Proteine einschließlich Nukleasen werden durch die detergensresistente Proteinase abgebaut. Bei unvollständigem Verdau nach 16 Stunden erneute Zugabe von Proteinase K für weitere 16 Stunden.

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Material auf drei 1.5 ml Röhrchen verteilt, man gibt je 1.2 μ l RNase hinzu und inkubiert für 1-2 Stunden bei 37 °C, um die freigesetzte RNA vollständig zu degradieren. Die weitere Isolierung der DNA erfolgt mittels Salz, Ethanol und Isopropanol, welche die Nukleotidketten dehydratisieren, sodaß diese aus der wäßrigen Lösung präzipitiert.

Hierzu pipettiert man zunächst je 240 µl 6 M NaCl zu den Proben und zentrifugiert diese für 10 min. bei 13000 rpm. Der Überstand wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit je 600 µl eiskaltem 100 % Isopropanol versetzt. Nach sorgfältigem Mischen wird erneut für 3 min. bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand anschließend abpipettiert. Das Pellet wird in einem letzten Schritt mit 600 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, 5 min. bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Für 15-30 min. lässt man das Pellet unter dem Abzug lufttrocknen und nimmt es anschließend in 50 µl TE-Puffer 0.1 M auf. Nach photometrischer Konzentrations- und Reinheitsbestimmung bei einer Wellenlänge von 260/280 nm lagert man die isolierte DNA bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

2.2.2 DNA-Prüfgel

a) Material/Geräte

DNA-Proben

Standard-DNA-Probe (184 µg/ml)

0.8 % Agarosegel: 0.4 g Agarose (Bio Whittacker, Heidelberg, Deutschland)

50 ml TAE 1x

2 µl Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

1x TAE-Puffer

Ladepuffer GBX (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Längenstandard: Marker 6 (1:10) (Eurogentec, Seraing, Belgien)

Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

Elektrophoresekammer EPS 200/600 (Amersham Pharmacia Biotech,
Buckinghamshire, England)

UV-Quelle Transilluminator LKB (Brommer, Stuttgart, Deutschland)

Kamera Gel Cam 0.7x (Polaroid, Waltham, USA)

b) Durchführung

Die isolierte DNA wird auf einem 0.8 %igem Agarosegel vor der weiteren Verarbeitung überprüft. 3 µl der DNA wird mit 1 µl des GBX-Ladepuffers auf einer Mikrotiterplatte gemischt, anschließend werden 3 µl auf das Gel aufgetragen. Zur Abschätzung der Größe und der Konzentration der Proben werden der Marker 6 (Eurogentec) als Längenstandard und eine Standard-DNA-Probe (184 µg/ml) als Referenz eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 mA für 30 min. Anschließend dokumentiert man das Ergebnis mittels einer Polaroidkammer unter UV-Durchleuchtung.

2.2.3 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau mit den Enzymen HinfI und RsaI 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 subtelomerischer Regionen. Diese bleiben intakt und können als Restriktionsfragmente TRF identifiziert werden.

a) Material/Geräte

DNA-Proben

Restriktionsenzyme: HinfI (10 U/µl) (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

RsaI (10 U/µl) (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

10x Puffer : 0.1 M TrisHCl

0.1 M MgCl₂ (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

0.1 M NaCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

(pH 7.9)

DTT (50 mM) (Eurogentec, Seraing, Belgien)

1.5 ml Rörchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Vortex (Janke und Kunkel Labortechnik, Staufen, Deutschland)

Brutschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland)

b) Durchführung

Vor der weiteren Analyse werden die DNA-Proben mit den Restriktionsenzymen HinfI und RsaI verdaut. Zu 10 µl Probe-DNA werden 90 µl des folgenden Ansatzes gegeben:

10x Puffer	10.0 µl
HinfI (10 U/µl)	1.2 µl
RsaI (10 U/µl)	1.2 µl
DTT (50 mM)	2.0 µl
H ₂ O	75.6 µl
Total	90 µl

Nach vortexen und zentrifugieren wird der Ansatz bei 37 °C ü.N im Brutschrank verdaut.

2.2.4 DNA-Aufreinigung

a) Material/Geräte

Fragmentierte DNA-Proben

5 M NaCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Ethanol 100 %/70 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)

0.1 M TE-Puffer

1.5 ml Rörchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

b) Durchführung

Nach dem Verdau erfolgt die Fällung der verdauten DNA in 5 M NaCl (1/20 des Gesamtvolumens) und 100 % Ethanol (2x des Gesamtvolumens) für 4 Stunden -20 °C. Anschließend wird der Ansatz für 15 min. bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgekippt und mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren für 5 min. bei 14000 rpm wird der Überstand vollständig abpipettiert und

das Pellet für 15-30 min. unter dem Abzug getrocknet. Die DNA wird in 15 µl 0.1 M sterilem TE aufgenommen und bei 4 °C ü.N gelöst.

2.2.5 DNA-Gel

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

a) Material/Geräte

Fragmentierte DNA-Proben

0.8 % Agarosegel

1x TAE-Puffer

Ladepuffer GBX (Serva, Heidelberg, Deutschland)

Längenstandard M6 (1:10) (Eurogentec, Seraing, Belgien)

Längenstandard M6 biotinyliert (1:5) (Eurogentec, Seraing, Belgien)

Elektrophoresekammer EPS 200/600 (Amersham Pharmacia Biotech,
Buckinghamshire, England)

UV-Quelle Transilluminator LKB (Brommer, Stuttgart, Deutschland)

Kamera Gel Cam 0.7x (Polaroid, Waltham, USA)

b) Durchführung

Vor dem Auftragen wird die DNA für 3 min. bei 56 °C erhitzt, bis zum Laden dann auf Eis gelagert. 15 µl der DNA werden mit 3 µl GBX-Ladepuffer gemischt, 5 µl M6 (1:10) werden mit 1 µl M6 biotinyliert (1:5) versetzt. Nach dem Auftragen von 18 µl Probe und 6 µl Längenstandard werden die chromosomalen DNA-Fragmente und die TRF nach ihrem Molekulargewicht auf einem 0.8 %-Agarosegel bei 5 Volt/cm für 3 Stunden bei Raumtemperatur elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluß daran fotografiert.

2.2.6 Transfer

Nach Depurinisierung, Denaturierung und Neutralisierung der DNA erfolgt der Transfer mittels Unterdruckverfahren auf die Blottingmembran und die Fixierung (Southern Transfer).

a) Material/Geräte

0.8 % Agarosegel mit elektrophoretisch aufgetrennter DNA

Transferlösungen:	0.2 N HCl	(Depurinierung)
	0.5 M NaOH	(Denaturierung)
	1.5 M NaCl	(Neutralisierung)
	1 M Tris, pH 7.5	(Neutralisierung)
	20x SSC	(Transfer)

Blotting-Membran (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Whatman Papier

Blottingmaschine Vacuum Gene Pump (Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland)

b) Durchführung

Nach Vorbereitung der Blot-Kammer analog dem Herstellerprotokoll der Vacuum Gene Pump (Pharmacia LKB) und Einlegen des Gels erfolgt das Blotting auf die Membran mit 55 mbar nach dem Prinzip des Unterdruckverfahrens.

Um die Transferzeiten für lange DNA-Fragmente zu verkürzen, erfolgt für 20 min. die Depurinisierung mit 0.2 N 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 erfolgt die Denaturierung für 20 min., sodass die gesamte DNA in Einzelstrangform vorliegt, Voraussetzung für die markierende Hybridisierung. Zugabe von 1 M Tris pH 7.5 und 1.5 M NaCl für weitere 20 min. neutralisiert das Gel. Für den Zeitraum von 60 min. läuft der Transfer in salzhaltiger Lösung mit 20x SSC ab. Am Ende werden die Slots mit Bleistift markiert und die

b) Durchführung

Nach 24 stündiger Hybridisierung erfolgen die einzelnen Waschschriffe zur Entfernung nicht hybridisierter Sonde mit je 100 ml Lösung. Zuerst wäscht man die Membran 2 mal für 5 min in 2x SSC/SDS-Waschlösung. Der folgende Schritt beinhaltet das 3 malige Waschen für 20 min in 0.1 % SSC/SDS-Solution im Wasserbad bei 37 °C. Nach einem kurzen Waschgang mit Maleinsäurepuffer 10 %/Tween 0.3 % belässt man die Membran für 30 min in Maleinsäurepuffer 10 %/Blocking 2.5 %.

Nachfolgend wird die Membran für 30 min. mit Streptavidin und biotinylierter Alkalischer Phosphatase im StreptABCComplex/Blocking-Reagent 2.5 % inkubiert. Das tetramerische Protein Streptavidin bindet sehr stark an Biotin, sodass die biotinylierten Telomersonden durch eine Chemilumineszenzreaktion detektiert werden können. Es schließt sich ein 2 maliges Waschschriffe für je 15 min in Maleinsäurepuffer 10 %/Tween 0.3 % und die Äquilibriumierung für 2 mal je 5 min in Detektionspuffer an. Für 5 min belässt man die eingeschweißte Membran mit 4 ml CSPD 1:100 in Detektionspuffer. CSPD ist ein Chlor-substituiertes Chemilumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase. Nach enzymatischer Dephosphorylierung des Substrates erfolgt eine Lichtemission in gepufferter Lösung, welche auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

Kurz trocknet man die Membran auf Whatmanpapier, schweißte sie mit den Slots in einer Höhe in eine neue Folie ein, inkubiert sie für 15 min. bei 37 °C im Brutschrank und exponiert sie schließlich für 3 Stunden in der Röntgenkassette.

Die Terminal Restriction Fragments, die durch die Sonde detektiert werden, erscheinen als Schmier nach ca. 5 min. Belichtung auf dem Film. Dies ist bedingt durch Variationen in der Anzahl an TTAGGG-Wiederholungen und subtelomerischer Fragmentgrößen sowohl innerhalb eines Chromosoms als auch zwischen verschiedenen Zellen einer Population. Zur Telomerenlängenbestimmung wird die Mitte der Bandenlänge im Vergleich zum Längenstandard herangezogen.

2.3 TRAP-Assay

Das Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) beruht auf einem 1994 von Kim NW et al. beschriebenen Verfahren zum in vitro-Nachweis von Telomeraseaktivität in einem Proteinextrakt der zu untersuchenden Zellen.

Die Grundlage des Telomeric Repeat Amplification Protocols bildet die Eigenschaft der Reversen Transkriptase Telomerase, einen DNA-Strang in wiederholten Zyklen am 3'-Ende um je 6 Nukleotide (TTAGGG) zu verlängern. In einem ersten Schritt katalysiert das aus Zellproben isolierte Telomeraseprotein die Verlängerung eines Oligonukleotidsubstrates, wodurch unterschiedlich lange Nukleotidketten entstehen, abhängig von der enzymatischen Aktivität. In einer zweiten Reaktion können diese Nukleotidsequenzen amplifiziert werden, nach Gelelektrophorese quantifiziert werden, wodurch sich Aussagen über die Telomeraseaktivität in der zu untersuchenden Zelle treffen lassen.

2.3.1 Proteinisolierung

a) Material/Geräte

Zellkulturproben

PBS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

CHAPS-Puffer 0.5 % ((3-[(cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat)
(Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Zellschaber (Falcon, St. Louis, USA)

1.5 ml Rörchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Zentrifuge Biofuge 13 (Heraeus, Nürnberg, Deutschland)

b) Durchführung

Vor der Proteingewinnung werden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und dann mit 1 ml PBS und einem Zellschaber von der Kulturgefäßoberfläche gelöst. Die Zellsuspension pipettiert man in ein 1.5 ml Rörchen und zentrifugiert für 5 min. bei

9000 U/min und 4 °C. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Zellpellet in 100 µl CHAPS-Puffer aufgenommen. Die Proben werden für 30 min. auf Eis lysiert, anschließend für 30 min. bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert. Der Überstand, in dem die Proteine inklusive intakter Telomerase gelöst sind, wird direkt auf Eis gestellt oder bei – 80 °C eingefroren.

2.3.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgt 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 (BioRad, München, Deutschland)

BSA (5 mg/ml) (Serva, Heidelberg, Deutschland)

CHAPS-Puffer 0.5 % (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Leerwert: CHAPS-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Probe: 7.5 µl Probe + 7.5 µl CHAPS-Puffer

Standard: 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 Plastikröhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

Zentrifuge Biofuge 13 (Heraeus, Nürnberg, Deutschland)

ELISA-Reader (Alpha Diagnostic, San Antonio, USA)

10 % Glycerol (Impag AG, Zürich, Schweiz)
10x TRAP Reaktionspuffer: 200 mM Tris, pH 8.3
15 mM MgCl₂ (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
630 mM KCl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
0.5 % Tween 20 (Bio-Rad, Hercules, USA)
10 mM EGTA (EMD Bioscience, San Diego, USA)
Primer: TS Primer (fluoreszenzmarkiert) (Oncor, Chicago, USA)
Primer Mix (Oncor, Chicago, USA): RP Primer
K1 Primer
TSK1 Template
Template (Oncor, Chicago, USA): TSR8: Kontroll-Template
TSK1 Template
Kontroll Zellpellet
dNTPs (2,5 mM) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
PBS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Taq Polymerase (Perkin Elmer, Wellesley, USA)
Thermocycler (Bio-Rad, Hercules, USA)
Wasserbad Thermocycler 60 (Bachofner Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland)

b) Durchführung

Die TRAP-Reaktion erfolgt analog zum TRAPeze Telomerase Detection Kit (Oncor). Die zu analysierenden Proben werden in verschiedenen Verdünnungen (1:5, 1:10, 1:20) eingesetzt. Die unverdünnte Probe entspricht einer Proteinkonzentration von 2 µg/ml. Die Positivkontrolle wird 1:20 verdünnt.

Als Negativkontrollen dienen CHAPS-Puffer und eine zweite Probe, die durch Hitzeinaktivierung der 1:20 Positivkontrolle (10 min. bei 85 °C) hergestellt wird. Hierdurch wird das hitzelabile Telomeraseenzym denaturiert, wodurch es seine Enzymaktivität verliert.

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

10x TRAP-Puffer	2.5 µl
10x dNTPs	2.5 µl
TS Primer	0.25 µl
TRAP Primer-Mix	0.5 µl
H2O	17.05 µl
Taq	0.2 µl
Probe/Kontrolle	2.0 µl
Total	25 µl

In der TRAP-Reaktion verlängert vorhandenes Telomeraseprotein das interne Oligonukleotidsubstrat TS am 3'-Ende um TTAGGG-Sequenzen, sodaß abhängig von der enzymatischen Aktivität Nukleotidketten charakteristischer Längen (beginnend mit 50 bp) entstehen, die sich durch die repetitive Sequenz von 6 Basenpaaren unterscheiden. In einer nachfolgend ablaufenden Amplifikationsreaktion können diese DNA-Stränge mit Hilfe der TS und RP Primer vermehrt werden, sodaß sie mittels der ALF-Analyse als charakteristische Leiter detektiert werden können. Gleichzeitig beinhaltet jeder Reaktionsansatz die Primer TS und K1 sowie das TSK1 Template zur Amplifikation eines 36 bp großen Standards. Dies ermöglicht neben der Quantifizierung der Telomeraseaktivität eine Identifizierung falsch negativer Proben, welche Taq-Polymerase Inhibitoren enthalten. Den beiden Reaktionen - telomerische Kettenverlängerung und PCR mit 36 Zyklen - liegt folgendes Protokoll zugrunde.

Template Verlängerung

37 °C	3 min.
30 °C	30 min.
94 °C	5 min.

Polymerasekettenreaktion

94 °C	30 sec.
55 °C	45 sec.
72 °C	45 sec.

Für jede zu analysierende Probe wird ein Mix hergestellt bestehend aus 7 µl Formamid-Stopplösung und zwei internen Standards (0.1 µl 12 bp-Standard und 0.3 µl 100 bp-Standard). Ein externer Standard wird je 2 mal pro Fragmentanalyse mitlaufen gelassen (0.1 µl 268 bp-Standard). In einer Mikrotiterplatte werden 6,7 µl Mix mit 1 µl der TRAP-Assay-PCR-Probe vermischt, anschließend für 2 min. bei 90 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt.

Nach Vorbereitung des ALF-Sequencers (Einsetzen des Gels und Zugabe von 120 ml TBE auf 2 l H₂O) kann das Gel aufgeheizt und der Kamm entfernt werden. Sind die Geltaschen mit TBE-Puffer gespült worden, wird das Gel mit 5 µl Probe/Vertiefung beladen und der Lauf gestartet.

Folgende Parameter werden für den Lauf in 'ALFwin control v1.1' (Pharmacia Biotech) eingestellt: Time: 150 min, Voltage: 1500 V, Current: 65 mA, Power: 45W,

Temperature: 50 °C, Sample int: 2 s

Die Auswertung erfolgt computergestützt mit dem Programm 'AlleleLinks' (Amersham Biosciences, Freiburg). Dabei wird die Fläche des ersten Telomeraseproduktpeaks bei 50 bp in Relation zu der Fläche des 36 bp Peaks, der internen Kontrolle, gesetzt. Hierzu werden alle Peaks automatisch detektiert und der 36 bp-Peak auf Quantity = 100 gesetzt. Alle weiteren Peaks einer Probe können so relativ zu der internen Kontrolle angegeben werden.

2.4 Transfektion

Der retrovirale Gentransfer umfasst 3 verschiedenen Zellsysteme zur Weitergabe der betreffenden DNA. In einem ersten Schritt wird die Plasmid-DNA mittels Transfektion in eine Verpackungszelllinie eingebracht. Diese ermöglicht die Replikation und Verpackung des Vektors in einen Retrovirus. Im nächsten Schritt kann mit diesem eine Produzentenzelllinie infiziert werden, die ihrerseits infektiöse, aber replikationsdefekte retrovirale Partikel abgibt. Nach Infektion der Zielzellen mit den freigesetzten Viren wird bei erfolgreicher Transfektion die DNA in das Zielgenom integriert und stabil exprimiert (s. **2.6.1.2**).

2.4.1 Herstellung stabiler Produzentenzelllinien

a) Material/Geräte

Vektorkonstrukte: pBabe PuroWT-hTERT
pBabe PuroDN-hTERT
pBabe Puro

Kontrollvektor: pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, USA)
(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von
Dr. C. Rössig, Pädiatrische Onkologie, Münster)

Zelllinien: Ecotrop: Omega E (Verpackungszellen)
Amphotrop: PG13 (Produzentenzellen)
(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von
Dr. C. Rössig, Pädiatrische Onkologie, Münster)

Nährmedien: RPMI/10 % FCS/1 % Penstrep (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)
IMDM/20% FCS/2mM L-Glutamin (Gibco BRL, Gaithersburg,
USA)
Trypsin-EDTA (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)
HBSS Hank´s Solution (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

Zellkulturgefäße: Flaschen: 25/75 cm² (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
Platten: 6-well-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz)

Fugene 6 Transfection-Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

0.45 µl-Filter (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland)

10 ml Spritze (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Protaminsulfat (10 mg/ml) (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

Puromycin (10 mg/ml) (Serva, Heidelberg, Deutschland)

1.5 ml Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

20 ml Röhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz)

Brutschrank Hera Safe (Heraeus, Nürnberg, Deutschland)

b) Durchführung

Am Tag vor der Transfektion werden die ecotropen Omega E in 6-well-Platten ausgesiedelt (eine T25-Flasche zu 80 % konfluent wird gleichmäßig auf eine 6-well-Platte ausgesiedelt (3×10^5 - 6×10^5 Zellen/well)). Die Zellen werden in üblichem Medium gehalten (2 ml RPMI/10 % FCS/1 % Penstrep pro well). Sofort nach dem Ausplattieren und 2 Stunden später wird die Zellkulturplatte vorsichtig geschüttelt, sodaß sich die Zellen gleichmäßig verteilen. Bei 37 °C und 5 % CO₂ lässt man die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank.

Die Transfektion der Omega E mit den Plasmiden pBabe-WT-hTERT, pBabe-DN-hTERT und dem pBabe-Leervektor erfolgt nach dem Fugene 6-Protokoll (s.u.). Mittels des lipidähnlichen Transfektionsreagenzes wird die DNA komplexiert und in die Zielzelle transportiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wird zusätzlich der pEGFP-N1-Vektor eingesetzt. Erfolgreich transfizierter Zellen exprimieren das grünfluoreszierende Protein EGFP, welches mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden kann.

Vor Gebrauch wird das Fugene-Reagenz für 15 min. bei Raumtemperatur aufgewärmt, das Röhrchen anschließend gevortext und kurz zentrifugiert. Die Omega E-Zellen werden transfiziert im Verhältnis 3:1 (Transfektionsreagenz (µl) : DNA (µg)).

Die DNA-Reinheit wurde mittels photometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 260/280 nm für pBabe WT-hTERT mit 1.66, pBabe DN-hTERT mit 1.5 und für pBabe mit 1.45 ermittelt.

	pBabe-WT-hTERT (0.37 µg/ml)	pBabe-DN-hTERT (0.64 µg/ml)	pBabe (1.55 µg/ml)	pEGFP-N1 (3 µg/ml)
	1x	1x	1x	1x
RPMI	94.3 µl	95.44 µl	96.35 µl	96.67 µl
Fugene 6	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
DNA (1 µg)	2.7 µl	1.56 µl	0.65 µl	0.33 µl
Total	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Der Transfektionsansatz erfolgt unter dem Abzug im sterilen 1.5 ml Röhrchen nach festgelegter Reihenfolge. Zuerst wird das serum- und antibiotikafreie RPMI-Medium

entsprechend einem Endvolumen von 100 µl vorgelegt, sodann 3 µl Fugene 6 Reagent direkt in das Medium pipettiert und anschließend gemischt. Schließlich wird zu der verdünnten Fugene 6 Transfektionslösung die entsprechende DNA-Menge pipettiert und erneut gemischt. Während der Ansatz für 15-45 min. bei Raumtemperatur inkubiert, wird das Medium der Omega E gewechselt. Tropfenweise werden nun die 100 µl Transfektionslösung zu den Zellen gegeben und gut durch Schwenken der Kulturplatte gemischt. Pro Vektor werden 3 wells transfiziert, die für 24 Stunden bei 37 °C/5 % CO₂ inkubieren.

24 Stunden nach der Transfektion wird das Medium zu 1 ml IMDM/20 % FCS pro well gewechselt. Die Transfektionseffizienz wird indirekt mit Hilfe der pEGFP-Expression unter UV-Licht bestimmt und dokumentiert. Anschließend lässt man die Zellen für 24 Stunden bei

32 °C/5 % CO₂ in IMDM inkubieren.

Die amphotropen PG13 werden 1:10 in T-25 Flaschen gesplittet, eine Flasche pro Transfektion.

Mit einer 10 ml Spritze werden die 3 ml Virusüberstand von den Omega E abgezogen und durch eine 0.45 µl-Spritzenaufsatz gefiltert, um die Lösung von Zellen zu reinigen. Zur Steigerung der Transfektionseffizienz werden 1.2 µl Protaminsulfat (10 mg/ml) zu den 3 ml Virusüberstand pipettiert. Als Polykation bindet Protaminsulfat sowohl an Virus- als auch an Zellprotein und vermag dadurch die Infektion der Zielzellen zu erleichtern. Das Nährmedium der PG13 in den T-25 Flaschen wird durch den Virusüberstand ersetzt. Die Inkubation erfolgt für 2-3 Tage bei 32 °C/5 % CO₂.

Danach wird der Überstand durch RPMI/10 % FCS/1 % Penstrep ersetzt und die PG13-Zellen inkubieren bei 37 °C bis sie konfluent werden. Man splittet sie dann 1:10 und friert mehrere Aliquots im N₂-Tank ein.

2.4.2 Infektion der Zielzellen

a) Material/Geräte

Zelllinien: Transfizierte PG13

Neuroblastomzelllinien: SKNSH (telomerasepositiv)

NGP (telomerasepositiv)

CHLA-90 (telomerasenegativ)

Nährmedien: RPMI/10 % FCS / 1% Penstrep

IMDM / 20 % FCS / 2mM L-Glutamin

(Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

Zellkulturgefäße: Flaschen: 25 cm² / 75 cm² (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

Platten: 96 / 24 / 12 / 6 well-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz)

Trypsin-EDTA (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

HBSS Hank's Solution (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

10 ml Spritze (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

0.45 µl Filter (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland)

15/50 ml Röhrchen (Falcon, St. Louis, USA)

Brutschrank Hera Safe (Heraeus, Nürnberg, Deutschland)

b) Durchführung

Am Tag vor der Transduktion wird das RPMI-Medium der PG13 (90 % konfluent) zu 6 ml IMDM/20 % FCS gewechselt und die Zellen in den T75-Flaschen zur Virusproduktion bei 32 °C inkubiert.

Zur Transduktion wird das virusenthaltende IMDM-Medium (6 ml) abgenommen und filtriert (0.45 µm). Nach Zusatz von 2.4 µl Protaminsulfat (10 mg/ml) wird der Überstand zur Infektion der Neuroblastomzelllinien NGP, SKNSH, CHLA-90 verwendet, welche 60-70 % konfluent sein sollten, da die Retroviren bevorzugt proliferierende Zellen infizieren. Nach Zugabe von 0.5 ml Virusüberstand/well läßt man die Neuroblastom-Zielzellen für 30-60 min. bei 37 °C inkubieren, saugt das Medium ab und versetzt die Zellen mit 0.5 ml frischer Virenlösung. Die Wiederholung des

Infektionsvorganges sorgt für eine möglichst hohe Transfektionseffizienz. Die Neuroblastomzellen inkubieren für 48 Stunden bei 37 °C/5 % CO₂.

2.4.3 Selektionierung der Zielzellen

a) Material/Geräte

Transfizierte Neuroblastomzellen

Puromycin (10 mg/ml) (Serva, Heidelberg, Deutschland)

b) Durchführung

Die Selektionierung der transfizierten Zielzellen erfolgt durch Zugabe des Antibiotikums Puromycin. Erfolgreich mit dem Plasmid transfizierte Zellen sind durch das im pBabe-Vektor enthaltene Puromycin-Resistenzgen unempfindlich gegen das Antibiotikum. Zellen, die das entsprechende Gen nicht enthalten, sterben unter Inkubation mit Puromycin ab. Transfizierte Zellen gelten als erfolgreich selektiert, wenn untransfizierte Kontrollen des gleichen Ansatzes vollständig abgestorben sind.

Die Zugabe des Selektionsantibiotikums erfolgt 48 Stunden nach Transfektion. Entsprechend vorher ermittelter Dosis-Wirkungs-Experimente ergeben sich Puromycin-Konzentrationen von:

NGP:	1.0 µg/ml
SKNSH:	1.5 µg/ml
CHLA-90:	1.6 µg/ml

Nach wiederholtem Mediumwechsel zu frischem Selektionsmedium, wodurch abgestorbene Zellen entfernt werden, erfolgt nach Erreichen von 30-40 % Konfluenz (6-24 Tage) eine Umsiedlung der Zellen in T25 Zellkulturflaschen und weiteres Passagieren.

2.5 Methoden zur Evaluation der Transfektion

Zwei zentrale Anforderungen entscheiden über den Erfolg einer Gentransfermethodik: Erstens eine stabile Integration der Gensequenzen und zweitens eine zuverlässige Expression der ektopen Gene, wobei insbesondere das zweite Kriterium ein häufiges Problem bei der Etablierung effizienter Protokolle zur Übertragung von Fremd-DNA darstellt (Kitamura T, 2003). Mittels PCR, RT-PCR und Gensequenzierung haben wir unser Transfektionssystem auf diese beiden Erfolgskriterien hin evaluiert.

2.5.1 PCR des Puromycinresistenzgens

In der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird ein spezielles Genfragment mittels 2 Primer (Sense und Antisense) und Desoxyribonukleotiden (dNTPs) enzymatisch amplifiziert. Das zyklische Verfahren beruht auf 3 Reaktionsschritten:

1. Denaturierung bei ca. 90 °C: Die doppelsträngige DNA wird in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt.
2. Annealing bei ca. 50 °C: Die Oligonukleotidprimer binden ionisch an komplementäre DNA-Sequenzen.
3. Extension bei ca. 70 °C: Mittels der dNTPs synthetisiert die Polymerase vom 5`- zum 3`-Ende der Einzelstrang-DNA eine komplementäre Basensequenz, welche der Länge zwischen den angelagerten Primern entspricht.

In 30-40 Zyklen werden die Gensequenzen so exponentiell vermehrt.

In den Plasmidvektoren pBabe ist das Gen für die Puromycinresistenz integriert. Bei stabiler Integration der transfizierten DNA in das Genom der Neuroblastom-Zielzellen liefert die Analyse mittels PCR auf Vorhandensein des Gens für die N-Acetyltransferase einen indirekten Hinweis auf gekoppelte Integration der restlichen Plasmid-DNA.

a) Material und Methoden

DNA-Proben

Proteinase K 2 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Verdauungspuffer: 50 mM Tris

1 mM EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland)

0.5 % Tween 20 (Bio-Rad, Hercules, USA)

10 x Puffer (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

dNTPs (2.5 mM) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Taq-Polymerase (5 U/ μ l) (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland)

Primer (1 μ M) (Invitrogen)

Puromycinresistenzgen:

5`-GTCACCGAGCTGCAAGAACT-3`

3`-CAGGAGGCCTTCCATCTGT-5

2 % (w/v) Agarosegel

b) Durchführung

DNA-Extraktion (s. **2.2.1**)

Die nachfolgende PCR-Reaktion läuft mit 35 Zyklen nach folgendem Protokoll:

H2O	13.1 μ l
10 x Puffer	2 μ l
dNTP	2 μ l
Primer Sense	0.4 μ l
Primer Antisense	0.4 μ l
Taq	0.1 μ l
cDNA-Probe	2 μ l
Total	20 μl

94 °C	4 min.
94 °C	30 sec.
55 °C	30 sec.
72 °C	30 sec.

Die Analyse der Amplifikationsprodukte erfolgt auf einem 2 %-Agarose-Gel.

2.5.2 WT-hTERT-/DN-hTERT-Expression und Sequenzierung der Mutationsstelle

Das retrovirale Transfektionssystem ist erfolgreich einsetzbar, wenn das ektope Gen nicht nur stabil in dem Genom der Zielzelle integriert ist, sondern auch zuverlässig exprimiert wird. Zur Bestimmung der Expression der transfizierten Gene WT-hTERT/DN-hTERT in den Neuroblastomzelllinien wird die korrespondierende, transkribierte mRNA in cDNA umgeschrieben, in einer PCR-Reaktion amplifiziert und im Bereich der Mutationsstelle sequenziert.

a) Material und Methoden

RNA-Proben

First Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg)

DEPC-H₂O

Primer (1 µM) (Invitrogen)

Mutationsstelle:

5`-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3` (GenBank Position 2875-2894)

3`-CGCAAACAGCTTGTTCTCCATGTC-5` (GenBank Position 3711-3688)

β-Actin:

5`-CATGCCATCCTGCGTCTGGAC-3`

3`-GGAGTACTTGCGCTCAGGAGG-5`

Taq-Polymerase (5 U/µl) (Amersham Bioscience, Freiburg)

1.5 % Agarosegel

Zentrifuge (Heraeus Biofuge)

b) Durchführung

Die RNA-Isolierung erfolgt analog obig beschriebenen Trizol-Protokoll. Zur cDNA-Synthese wird das First Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) verwendet. Folgender Mix wird eingesetzt:

Bulk First Strand Reaction Mix	5 μ l
DTT (200 mM)	1 μ l
Primer (10 μ M)	2 μ l
Total	8 μl

Zu dem Mix werden 7 μ l DEPC-H₂O und 1 μ l der RNA-Proben (1 μ g/ μ l) hinzupipettiert und der Ansatz für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die cDNA wird sofort in die PCR eingesetzt oder bei – 20 °C gelagert. In der nachfolgenden PCR werden mittels designeter Primer die Sequenzen des Mutationsbereiches von WT-hTERT/DN-hTERT amplifiziert, als Kontrolle dient die Amplifikation der Plasmidvektoren (Positivkontrolle: pBabe-Puro WT-hTERT/pBabe-Puro DN-hTERT, Negativkontrolle: pBabe-Puro). Folgendes PCR-Protokoll kommt mit 35 Zyklen zur Anwendung:

H ₂ O	13.1 μ l
10 x Puffer	2 μ l
dNTP	2 μ l
Primer Sense	0.4 μ l
Primer Antisense	0.4 μ l
Taq	0.1 μ l
cDNA-Probe	2 μ l
Total	20 μl

94 °C	4 min.
94 °C	30 sec.
60 °C	60 sec.
72 °C	60 sec.

Die β -Actin-PCR als interne mRNA-Referenzkontrolle läuft nach folgendem Protokoll mit 30 Zyklen ab:

H ₂ O	13.5 μ l
10 x Puffer	2 μ l
dNTP	2 μ l
Primer Sense	0.2 μ l
Primer Antisense	0.2 μ l

Taq	0.1 µl
cDNA-Probe	2 µl
Total	20 µl

94 °C	4 min.
94 °C	30 sec.
65 °C	30 sec.
72 °C	45 sec.

Die amplifizierten Produkte werden auf einem 1.5 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Da die Analyse der DNA-Bandengrößen im Vergleich zu einem aufgetragenen Längenstandard keine Unterscheidung von WT-hTERT und DN-hTERT zulassen, wird die amplifizierte cDNA nachfolgend im Bereich der Mutationsstelle sequenziert.

2.6 Zellkultur

2.6.1 Zelllinien

2.6.1.1 Neuroblastomzelllinien

Um der genetischen Heterogenität des Neuroblastoms gerecht zu werden und Auswirkungen des retroviralen Gentransfers in Relation zu der Telomeraseaktivität und der Chromosomenlänge interpretieren zu können, haben wir unser Transfektionssystem an telomerasepositiven und –negativen Zelllinien mit unterschiedlichen Telomerlängen angewandt.

Die Zelllinie NGP ist eine telomerasepositive Zelllinie mittlerer Telomeraseaktivität.

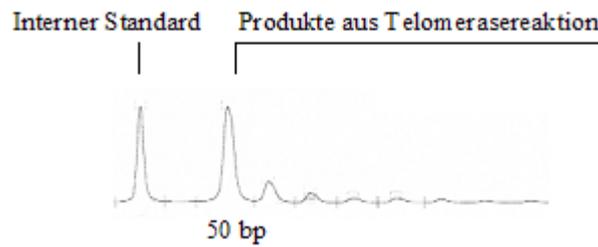


Abb. 6: Graphische Darstellung eines TRAP-Assays der telomerasepositiven Neuroblastomzelllinie NGP auf dem ALFexpress. Die charakteristische 6 bp-Leiter weist die analysierte Zelllinie als telomerasepositiv aus.

An zytogenetischen Aberrationen lassen sich bei dieser Zelllinie außerdem chromosomale Zugewinne und Verluste nachweisen (1 p+, 1q+ und 18 q-, 17 p-) (Voruntersuchungen, Gerhard-Domagk-Institut für Molekularpathologie, Universität Münster).

Die SKNSH-Zelllinie zeichnet sich durch eine ausgesprochen hohe Telomeraseaktivität aus.

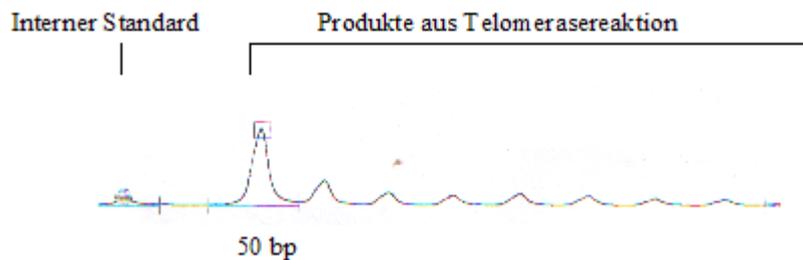


Abb. 7: Graphische Darstellung des TRAP-Assays: Hohe Telomeraseaktivität der Zelllinie SKNSH:

Die Zelllinie CHLA-90 ist telomerasen negativ und stabilisiert die Chromosomenenden über den sog. ALT-Mechanismus.



Abb. 8: Die fehlende 6 bp-Leiter bei der graphischen Darstellung des TRAP-Assays zeigt die fehlende Telomeraseaktivität in der CHLA-90-Zelllinie.

2.6.1.2 Produzentenzelllinien

Die ecotrope Zelllinie Omega E wird in einem ersten Schritt mittels liposomaler Technik mit dem Plasmidvektor transient transfiziert. Mittels der gag/pol/env-Sequenzen aus dem Genom der Verpackungszelllinie Omega E und dem Verpackungssignal ψ , welches im pBabe-Vektor mitgeliefert wird, gibt diese ecotrop verpackte, replikationsdefiziente retrovirale Partikel ab. Diese können keine humanen Zellen infizieren. Mit diesen rekombinanten Viren wird die amphotrope Produzentenzelllinie PG13 transduziert.

Die PG13-Zelllinie leitet sich von NIH/3T3-Zellen ab, in die in zwei unabhängigen Schritten einerseits die gag/pol-Region des MoMLV (Moloney Maus Leukämie Virus) unter der Kontrolle des MoMLV-5'-LTR mit deletiertem Ψ und andererseits die env-Region des GaLV (Gibbonaffen-Leukämie-Virus) ebenfalls unter der Kontrolle des MoMLV-5'-LTR mit deletiertem Ψ stabil chromosomal integriert wurden.

Erst bei Übertragung des pBabe-Vektors mit einkloniertem Verpackungssignal Ψ ist eine erfolgreiche Integration der Vektor-RNA mittels dieser gag/pol/env-Sequenzen der Produzentenzelllinie möglich. Hierbei kodiert das GaLV-Gen für Hüllproteine, welche die rekombinanten Retroviren für die humanen Zielzellen infektiös machen (Pseudotypierung). Mit diesen retroviralen Konstrukten werden die Neuroblastomzellen transduziert.

2.5.2 Materialien

Kulturmedien: RPMI-1640 mit Glutamin (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

IMDM mit Glutamin (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

Pufferlösungen: Hank's Solution HBSS (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

Antibiotika: Penicillin/Streptomycin 100x (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Puromycin 10 mg/ml (Serva, Heidelberg, Deutschland)

Zellkulturflaschen: T25/T75 (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

Titerplatten: 6/24/96 wells (TPP, Trasadingen, Schweiz)

Fetales Kälberserum FCS (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

Trypsin/EDTA 1x (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

Collagen Type VI human placenta (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

DMSO (Serva, Heidelberg, Deutschland)

Pipetten: 5 ml/10 ml/25 ml (Falcon, St. Louis, USA)

Zentrifugierröhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz)

Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

Kryobox (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

Akkupipetter (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland)

Zellkulturbank Hera Cell (Heraeus, Nürnberg, Deutschland)

Zellkulturbrutschrank Hera Safe (Heraeus, Nürnberg, Deutschland)

Zentrifuge Megafuge (Heraeus, Nürnberg, Deutschland)

Mikroskop Leica Type 090-135001 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland)

Die Zellkultur erfolgt für die Neuroblastome in kollagenbeschichteten, für die Verpackungszelllinien in unbeschichteten Kulturflaschen. Die Zelllinien werden in RPMI-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Bei 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % werden die Zellen in einem mit 5 % CO₂ begasten Zellkulturbrutschrank gehalten.

2.11.3 Passagieren der Zellen

Nach Entfernen des Kulturmediums werden die Zellen mit Hank's Solution gewaschen und anschließend für 3 min in Trypsin inkubiert. Die trypsinisierten Zellen werden in komplettem Nährmedium RPMI/10 % FCS/1 % Penstrep aufgenommen und je nach gewünschter Dichte auf neue Zellkulturgefäße verteilt.

2.11.4 Einfrieren der Zellen

Einfriermedium: 2 ml RPMI (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)
 2 ml FCS (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)
 1 ml DMSO (Serva, Heidelberg, Deutschland)

Zum Einfrieren der Zellen werden die mit Trypsin/EDTA abgelösten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen übergeführt und für 5 min bei 1100 U/min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellpellets von 2 Zentrifugenröhrchen in 0.9 ml komplettem Kulturmedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen übergeführt. Nach Zugabe von 0.9 ml Einfriermedium wird das Einfriereröhrchen rasch in einem Einfrierbehälter bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht eingefroren und anschließend für eine längerfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.11.5 Auftauen der Zellen

Das gefrorene Kryoröhrchen wird im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 3 min inkubiert. Anschließend wird die aufgetaute Zellsuspension in Hank's Solution in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Um das zelltoxische DMSO vollständig zu entfernen, erfolgt nach dem Zentrifugieren bei 1100 U/min für 5 min bei Raumtemperatur ein erneuter Waschgang mit Hank's Solution. Das Zellpellet wird in komplettem Nährmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt. Bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einem CO_2 -Gehalt von 5 % werden die Zellen inkubiert.

2.11.6 Antibiotika-Selektionierung

Um die optimale Puromycin-Konzentration zur Selektionierung der transfizierten und transduzierten Zelllinien (PG13 und Neuroblastome) zu ermitteln, werden die Zellen auf 6-well-Titerplatten ausgesiedelt. Nach einer Konfluenz von 50-60 % werden die Zellen mit unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen (0-5-2.5-1.5-1.0-0.5 mg/ml Puromycin) für 72 Stunden behandelt. Die Konzentration, bei der nach ca. 72 Stunden 0 % der Zellen lebendig waren, wurde für die folgenden Selektionierungen verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Vektorkonstrukte

3.1.1 Restriktionsanalyse

Zur Analyse der Struktur der rekombinanten Plasmide pBabe, pBabe-WT-hTERT und pBabe-DN-hTERT (Geschenk von R. Weinberg, MIT, Boston) wurde die Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI, HindIII und SalI in Fragmente geschnitten, die gelelektrophoretisch differenziert wurden. Die Lokalisation der spezifischen Enzymschnittstellen innerhalb des ringförmigen Plasmids lassen charakteristische DNA-Bruchstücke entstehen (Abb. 9, 10). Von vorrangigem Interesse war bei den Restriktionsanalysen die Frage, ob das Insert WT-hTERT/DN-hTERT innerhalb der Multiple Cloning Site vorhanden war und der für erfolgreiche Transkription des Puromycinresistenzgens erforderliche SV40-Promotor korrekt vorgeschaltet war.

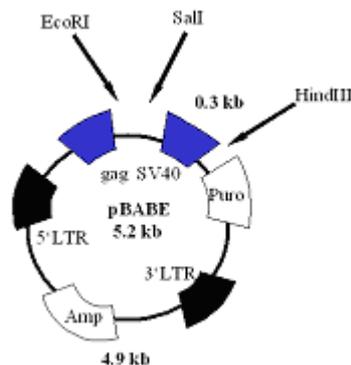


Abb. 9: pBabe-Puro-Leervektor mit EcoRI/SalI- und HindIII-Schnittstellen. Die nach Restriktion entstehenden charakteristischen Fragmente liegen, wie dargestellt, im Bereich von 0.3 kb zwischen der SalI/HindIII-Schnittstelle und von 4.9 kb zwischen der EcoRI/HindIII-Schnittstelle.

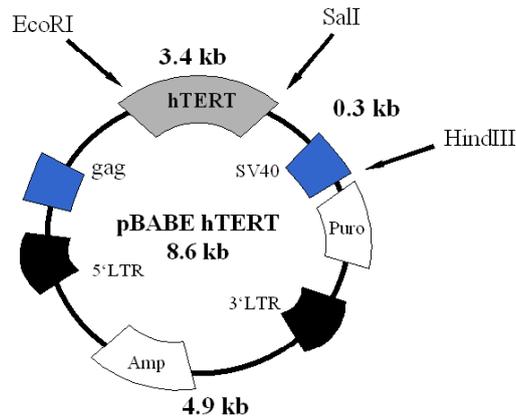


Abb. 10: Rekombinanter pBabe-Puro-Vektor mit Insert, EcoRI/SalI- und HindIII-Schnittstellen. Die Größe der bei Restriktion entstehenden DNA-Fragmente beträgt, wie gekennzeichnet, 3.4 kb (Fragment zwischen EcoRI/SalI-Schnittstelle), 0.3 kb (Fragment zwischen SalI/HindIII-Schnittstelle) und 4.9 kb (Fragment zwischen EcoRI/HindIII-Schnittstelle).

3.1.1.1 Restriktionsverdau EcoRI/HindIII

Da sowohl EcoRI als auch HindIII nur eine einzelne Restriktionsstelle innerhalb des pBabe-Vektors besitzen, entstanden bei der enzymatischen Hydrolyse der doppelsträngigen, ringförmigen Plasmid-DNA mit je einem Enzym lineare Stränge. Für pBabe ergab sich ein DNA-Fragment von 5.2 kb Länge. Bei der enzymatischen Restriktion von pBabe-WT-hTERT/DN-hTERT entstand ein um die Insertgröße (3.4 kb) verlängertes Fragment von 8.6 kb (Abb. 11, 12).

Gleichzeitige Inkubation des pBabe-Leervektors mit EcoRI und HindIII resultierte in einer Abspaltung der 0.3 kb langen SV40-Promotor-Sequenz und der Multiple Cloning Site (MCS), wodurch ein zweites Fragment mit einer Länge von ca. 4.9 kb entstand.

Die palindromische Erkennungssequenz von EcoRI liegt vor der Klonierungsstelle, sodaß bei zusätzlicher Hydrolyse der Vektoren pBabe-WT-hTERT/pBabe-DN-hTERT mit HindIII sich zu der SV40-Sequenz die flankierende Insertlänge (3.4 kb) (Abb. 10)

addierte und sich demzufolge zwei Bruchstücke (4.9 kb und 3.7 kb) ergaben (Abb. 11, 12).

Unhydrolisierte Plasmide zeigten in Abhängigkeit von der vorliegenden Konformation (ringförmig, superhelikal) unterschiedliche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeiten.

Restriktionsenzym	EcoRI	HindIII	EcoRI/HindIII
pBabe Fragmentgröße (kb)	5.2	5.2	4.9 + 0.3
pBabe-WT-hTERT Fragmentgröße (kb)	8.6	8.6	4.9 + 3.7
pBabe-DN-hTERT Fragmentgröße (kb)	8.6	8.6	4.9 + 3.7

Tab. 1: Charakteristische DNA-Fragmente, wie sie sich nach Restriktion der entsprechenden Vektoren mit den Endonukleasen EcoRI/HindIII ergeben.

Bei gelelektrophoretischer Auftrennung der entstandenen Fragmente konnten die DNA-Bruchstücke im Vergleich zu einem Längenstandard in ihrer Größe bestimmt werden. Die korrekte Insertion der WT-hTERT/DN-hTERT-Genabschnitte innerhalb des pBabe-Plasmids war somit nachgewiesen (Tab. 1).

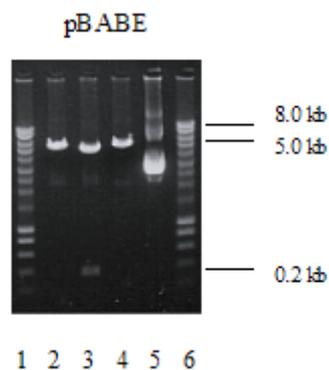


Abb. 11: Gelelektrophoretische Auftrennung der Genfragmente auf einem 1 % Agarosegel nach Restriktionsverdau des Plasmidvektors pBabe mittels EcoRI/HindIII. Die entstandenen Fragmentgrößen lassen sich im Vergleich zum Längenstandard ermitteln. Gleiche Ergebnisse bei Versuchswiederholung.

Legende: 1, 6: Längenstandard, 2: Leervektor nach Verdau mit HindIII, 3: Leervektor nach Verdau mit EcoRI, 4: Leervektor nach Verdau mit EcoRI/HindIII, 5: Unverdauter Leervektor

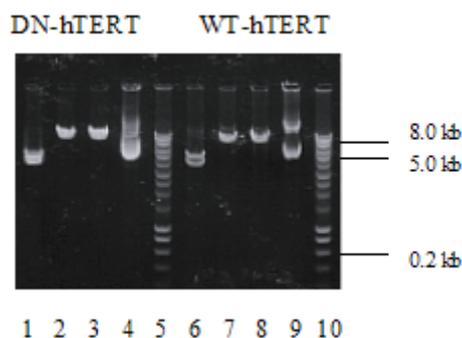


Abb. 12: Nach elektrophoretischer Auftrennung der enzymatisch geschnittenen Plasmidvektoren pBabe-WT-hTERT und pBabe-DN-hTERT zeigten sich reproduzierbar die charakteristischen Fragmente.

Legende: 1,6: pBabe-WT-hTERT/DN-hTERT-Plasmide nach Verdau mit EcoRI/HindII, 2, 7: pBabe-WT-hTERT/DN-hTERT-Plasmide nach Verdau mit HindIII, 3, 8: pBabe-WT-hTERT/DN-hTERT-Plasmide nach Verdau mit EcoRI, 4, 9: Unverdaute pBabe-WT-hTERT/DN-hTERT-Plasmide, 5, 10: Längenstandard

3.1.1.2 Restriktionsverdau EcoRI/SalI

Innerhalb des pBabe-Leervektors liegen die Erkennungssequenzen von EcoRI und SalI in unmittelbarer Nachbarschaft (ca. 10 Nukleotide Differenz).

Sowohl bei Inkubation mit einem einzelnen Enzym (EcoRI oder SalI) als bei auch gleichzeitiger Hydrolyse des pBabe-Plasmids mit EcoRI und SalI lässt sich bei der Gelelektrophorese nur ein einzelner linearer Strang nachweisen, welcher ca. 5.2 kb lang ist.

Zwischen die palindromischen Sequenzen von EcoRI und SalI ist das hTERT-Insert (3.4 kb) inkloniert, welches demzufolge bei einem Restriktionsverdau mit beiden Endonukleasen von dem 5.2 kb langen Restvektor abgespalten wurde. Die Ergebnisse demonstrieren die korrekte Insertion der WT-hTERT/DN-hTERT-cDNA in den pBabe-Vektor (Abb. 13, 14, 15).

Restriktionsenzym	EcoRI	SallI	EcoRI/SallI
pBabe Fragmentgröße (kb)	5.2	5.2	5.2
pBabe-WT-hTERT Fragmentgröße (kb)	8.6	8.6	5.2 + 3.4
pBabe-DN-hTERT Fragmentgröße (kb)	8.6	8.6	5.2 + 3.4

Tab. 2: Restriktionsfragmente bei enzymatischer Hydrolyse mittels EcoRI/SallI.

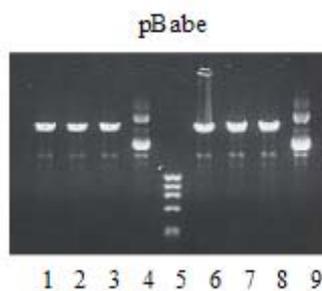


Abb. 13: Gelelektrophorese nach Verdau des pBabe-Leervektors mit EcoRI/SallI. Versuchswiederholung mit analogen Ergebnissen.

Legende: 1, 6: pBabe-Plasmid nach Verdau mit EcoRI/SallI, 2, 7: pBabe-Plasmid nach Verdau mit SallI, 3, 8: pBabe-Plasmid nach Verdau mit EcoRI, 4, 9: Unverdaute DNA

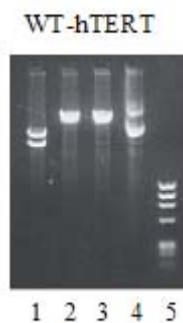


Abb. 14: Nach Restriktionsverdau des Vektoronstrukts pBabe-WT-hTERT mittels EcoRI/SallI erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente im 1 % Agarosegel. Gleiche Ergebnisse bei zweimaliger Versuchswiederholung.

Legende: 1: pBabe-WT-hTERT-Plasmid nach Verdau mit EcoRI/SallI, 2: pBabe-WT-hTERT-Plasmid nach Verdau mit SallI, 3: pBabe-WT-hTERT-Plasmid nach Verdau mit EcoRI, Längenstandard, 4: Unverdaute pBabe-WT-hTERT-Plasmid-DNA, 5: Längenstandard

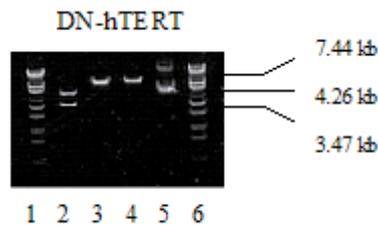


Abb. 15: Elektrophoretische Auftrennung der Plasmidfragmente auf einem 1 % Agarosegel nach Restriktionsverdau von pBabe-DN-hTERT mittels EcoRI/Sall. Längenanalyse mittels Standardmarker.

Legende: 1, 6: Längenstandard, 2: pBabe-DN-hTERT-Plasmid nach Verdau mit EcoRI/Sall, 3: pBabe-DN-hTERT-Plasmid nach Verdau mit Sall, 4: pBabe-DN-hTERT-Plasmid nach Verdau mit EcoRI, 5: Unverdautes Plasmid

3.1.2 Sequenzierung

Mittels der enzymatischen Sequenzierung nach Sanger wurde die genaue Basenabfolge der Vektorkonstrukte pBabe-WT-hTERT und pBabe-DN-hTERT im Bereich der Mutationsstelle und der Insertionsstelle ermittelt. Die Primer erlaubten eine Analyse der Insertionsstellen der cDNA des Telomeraseenzyms innerhalb des pBabe-Puro Vektors, der Lokalisation des Translationsstarts ATG, der Enzymschnittstellen und der Mutationsstelle der dominant-negativen Mutante. Die Sequenzierung charakterisierte die Plasmidvektoren vor der Transfektion und ist nach dem Gentransfer Voraussetzung für eine Identifizierung erfolgreich transfizierter Neuroblastomzellen über eine Sequenzanalyse.

3.1.2.1 Mutationsstelle

Die Wildtypsequenz des pBabe-WT-hTERT-Plasmids im Bereich der Mutationsstelle konnte nach Sequenzierung mit dem Primer 107/01 anhand des Anwenderprogramms Blast2Sequence durch Vergleich mit der registrierten vollständigen hTERT-Sequenz (Gen Bank accession no. AF015950) an Stelle 3560–3568 bp verifiziert werden (Abb. 16).

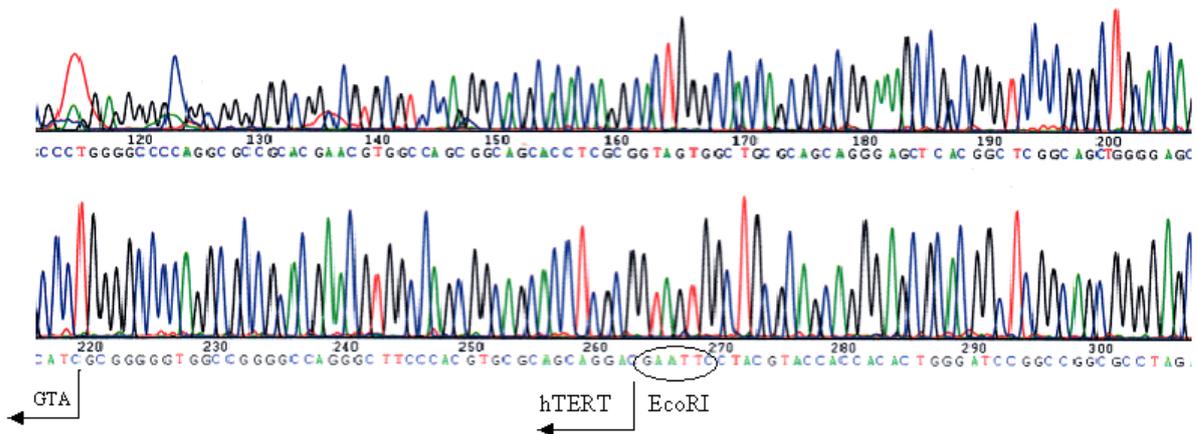


Abb. 20: Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der graphischen Auswertung der Sequenzierreaktion von WT-hTERT mit dem Primer 110/01 (Antisense). Gezeigt wird der Insertionsbeginn pBabe WT-hTERT mit der EcoRI-Schnittstelle 5'-GAATTC-3' (3'-CTTAAG-5')(1379-1384 bp), die nachfolgende WT-hTERT-Sequenz und der Translationsstart 5'-ATG-3'(3'-TAC-5') (1430 bp). Analoge Ergebnisse nach Sequenzierung von pBabe-DN.

3.1.2.3 Insertionsende

Die charakteristische Erkennungssequenz 5'-G-TCGAC-3' der Restriktionsendonuklease SalI an Stelle 4829-4834 bp des rekombinanten Plasmids flankiert das Insertionsende der WT-hTERT/DN-hTERT-cDNA, gefolgt von den Gensequenzen des pBabe Puro-Vektors (Abb. 21).

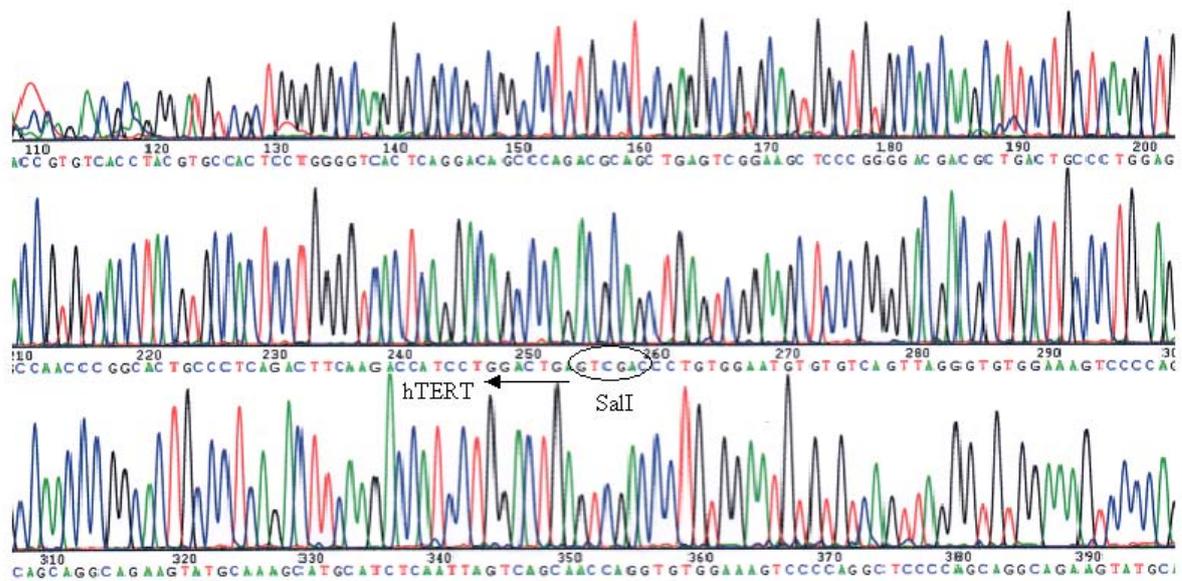


Abb. 21: Ausschnitt aus der Sequenz von pBabe WT-hTERT/DN-hTERT mit SalI-Schnittstelle (GTCGAC) und nachfolgenden Leervektorsequenzen.

3.2 Charakterisierung der Zielzellen

3.2.1 Telomerenlängenbestimmung

Die zentrale Funktion des Ribonukleoproteinkomplexes der Telomerase besteht in der Konstanterhaltung der Chromosomenenden und der Bewahrung der genetischen Stabilität. Dies wird mittels enzymatisch katalysierter Addition von repetitiven Telomerasequenzen ebenso wie durch direkte protektive Wirkungen des Telomerasekomplexes erreicht (Blackburn EH, 2000; Greider CW, 1999).

Um die unmittelbaren und verzögerten Auswirkungen des Gentransfers auf die Chromosomenenden sowohl telomerasepositiver als auch telomerasenegativer Zelllinien studieren zu können, wurden die Telomerenlängen der Neuroblastomzellen vor und nach der Transfektion mittels eines TRF-Southern Blots bestimmt (Abb. 22).

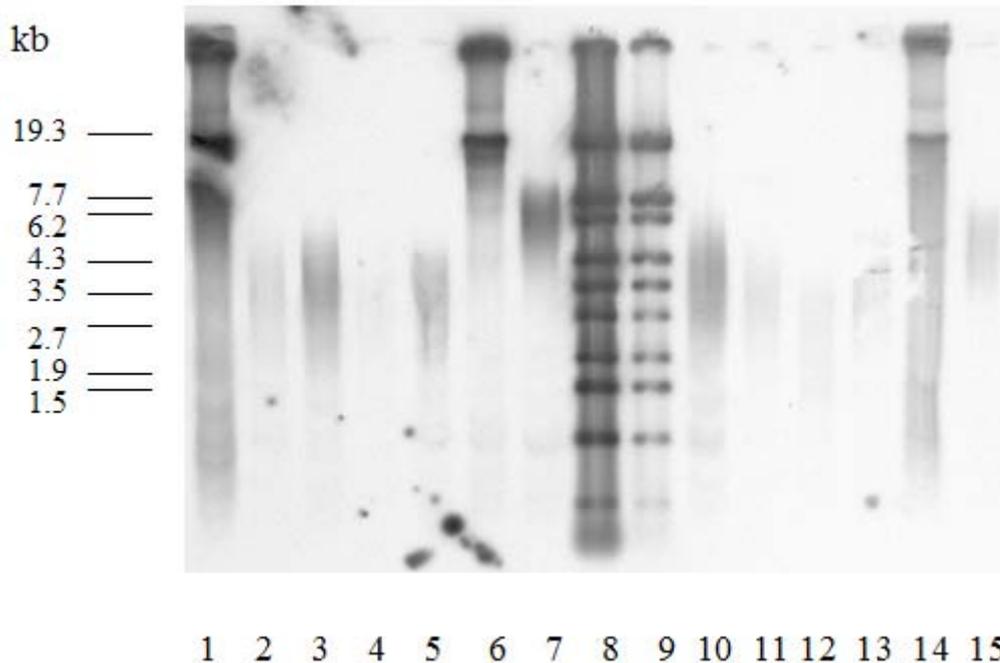


Abb. 22: Telomerenlängenblot der Neuroblastomzelllinien SKNSH, NGP und CHLA-90 sowie weiterer telomerasepositiver und telomerasenegativer Zelllinien. Genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen HinfIII und RsaI hydrolisiert, in einem 0.8 % Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran gebロットet und mit telomerspezifischen, biotinylierten Oligonukleotidproben hybridisiert. Die heterogenen Hybridisierungssignale spiegeln die intra- und interzelluläre Heterogenität der TRF der ALT-Zelllinien wider. Im Vergleich mit einem Längenstandard kann die mittlere Telomerlänge annähernd bestimmt werden. Bei 2maliger Versuchswiederholung entsprechende Ergebnisse.

Legende: 1: CHLA-90, 2: CHP100, 3, 4:IMR-5, 5: KCN, 6: LAN-6, 7: NGP, 8, 9: Marker, 10: NMB, 11: SAM-2, 12: SHEP-SF, 13: SH-SY-5Y, 14: SK-NF-1, 15: SKNSH

Die beiden telomerasepositiven Neuroblastomzelllinien NGP und SKNSH zeichnen sich durch relativ kurze Telomeren aus, wie es für telomerasepositive Tumorzellen charakteristisch ist. Für NGP liegt die Länge repetitiver telomerischer Sequenzen bei ca. 6 kb und für SKNSH bei ca. 4 kb (Abb. 22).

Die telomerasenegative Zelllinie CHLA-90, die ihre Chromosomenenden über einen Alternativen Mechanismus (ALT) unabhängig von der Telomerase stabilisiert, weist deutlich längere und heterogene Telomeren im Bereich von < 1 kb bis > 20 kb auf (Abb. 22) .

Funktionelle Konsequenzen einer erfolgreichen ektopten WT-hTERT-Überexpression oder einer Telomerasehemmung durch DN-hTERT nach Transfektion lassen sich durch Vergleich der endständigen Sequenzlängen von Ausgangssituation vor der Transfektion und wiederholten Messungen nach erfolgter Genübertragung ablesen (**Abb. 43**).

3.3 Transfektion

Der retrovirale Gentransfer des entwickelten Transfektionsmodells umfaßt zwei Komponenten: den charakterisierten, retroviralen Vektor und die Verpackungs-, Produzenten- und Zielzellen. Ziel ist erstens die stabile Integration der WT-hTERT-DNA, bzw. der DN-hTERT-DNA in das Genom der telomerasepositiven und – negativen Neuroblastomzelllinien und zweitens die langfristige Expression der eingeführten Gene.

3.3.1 Transfektion der Verpackungszellen

Mittels liposomalen Gentransfers wurden die Plasmide pBabe-WT-hTERT, pBabe-DN-hTERT, der pBabe-Leervektor und der pEGFP-Vektor als Kontrolle in die ecotrope Verpackungszelllinie Omega E eingebracht.

Da das Vektorkonstrukt pBabe weder eine HA-tag- noch eine GFP-Sequenz besitzt, wird die Transfektionseffizienz mittels eines pEGFP-Vektors mit einer Größe von 4.7 kb, welcher nach identischem Protokoll transfiziert wird, annähernd ermittelt (**Abb. 23**). 10-20 % der transfizierten Omega E fluoreszierten nach 22 Stunden, nach 24 Stunden lag die Transfektionseffizienz für pEGFP bei 20 %.

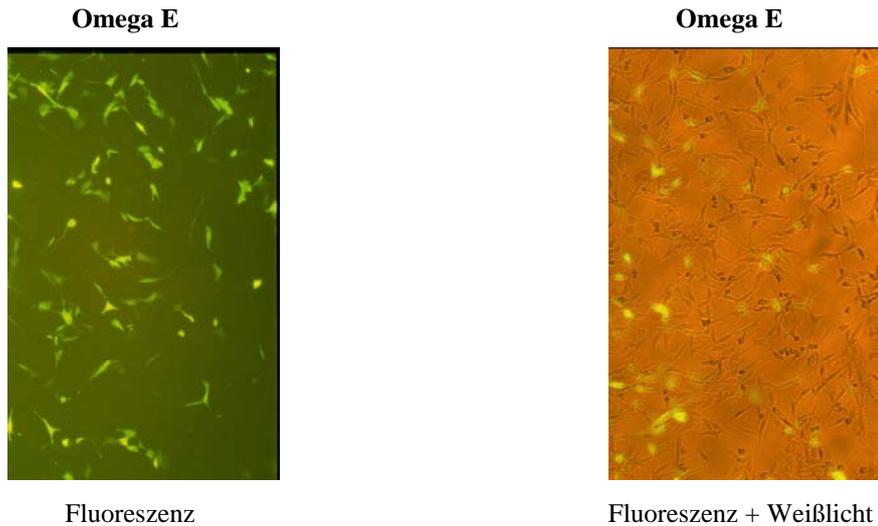


Abb. 23: Die pEGFP-Kontrolltransfektion zeigte nach 24 Stunden mehrmals reproduzierbar eine Transfektionseffizienz von 20 % in der Omega E-Zelllinie. Das identische Transfektionsprotokoll legt eine entsprechende Transfektionseffizienz für die rekombinanten Vektorkonstrukte nahe. 10x Vergrößerung

3.3.2 Infektion der Produzentenzellen

Die ecotropen Viren aus den transfizierten Verpackungszellen Omega E vermögen die Produzentenzelllinie PG13 mit hoher Effizienz zu infizieren. Der Erfolg der stabilen Geninternalisierung wurde durch Resistenzkultivierung nachgewiesen. Mittels des im Vektor mitgelieferten Resistenzgens Puromycin-N-Acetyl-Transferase konnten erfolgreich transfizierte Produzentenzellen selektioniert und kultiviert werden.

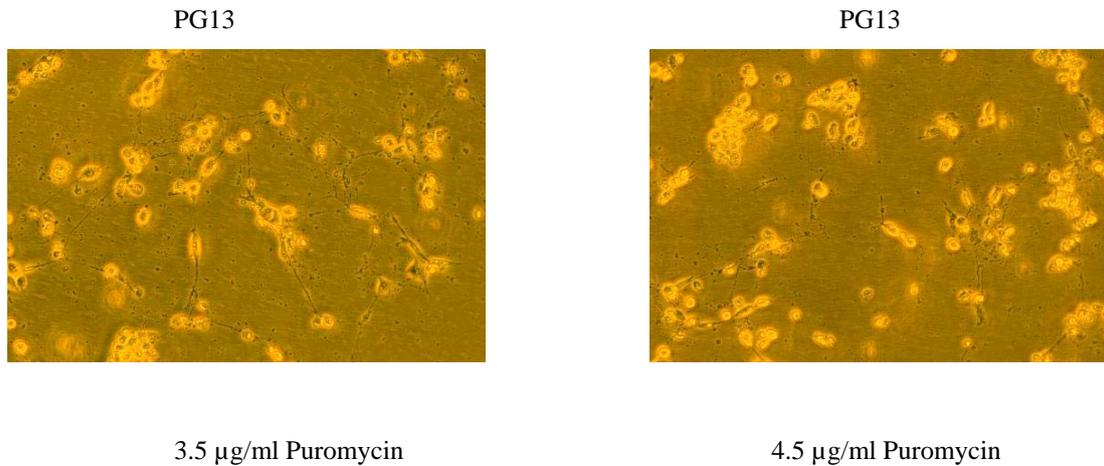


Abb. 24: 10 Tage nach Transfektion mit dem pBabe-Vektor bildeten sich unter Puromycinselektion erfolgreich transfizierte, antibiotikaresistente Kolonien. 20x Vergrößerung

3.3.3 Infektion der Zielzellen

Nach Infektion der Neuroblastomzielzellen mit den amphotropen Viren wurde der Erfolg der Transfektion mittels Selektionierung resistenter Zellen unter Puromycinzugabe demonstriert. Bei allen 3 Zelllinien bildeten sich unter kontinuierlicher Antibiotikazugabe (SKNSH: 1.5 µg/ml Puromycin, NGP: 1.0 µg/ml Puromycin, CHLA-90: 1.6 µg/ml Puromycin) resistente Kolonien aus, untransfizierte Kontrollzellen waren nach 2-3 Tagen durch entsprechende Konzentrationen von Puromycin vollständig abgetötet.

Unmittelbar toxische Wirkungen des pBabe-Leervektors und der pBabe-WT-hTERT oder pBabe-DN-hTERT-Konstrukte auf die Neuroblastomzellen konnten nach erfolgter Transfektion und Selektionierung zellmorphologisch nicht beobachtet werden. Unter Transfektion mit den verschiedenen Vektorkonstrukten ließen sich keine Unterschiede in der Zellmorphologie zu untransfizierten Zellen beobachten (Abb. 25, 26, 27).

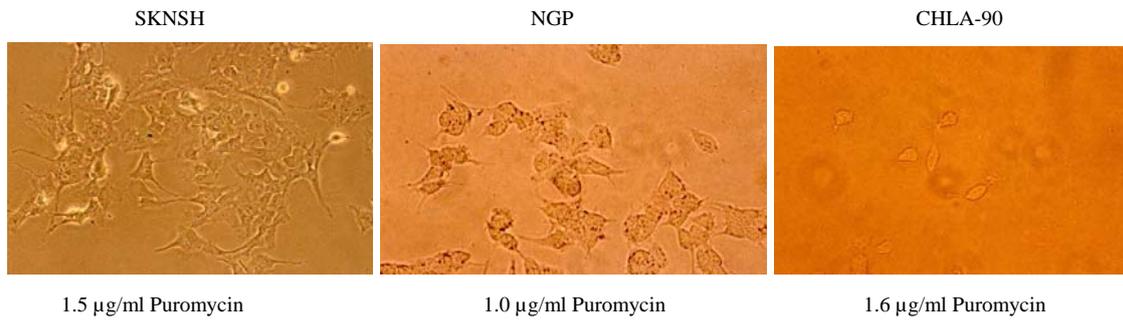


Abb. 25: Neuroblastomzellen 14 Tage nach Transfektion mit pBabe-WT-hTERT und Kultivierung in Selektionsmedium. Die Zellen wiesen unmittelbar nach der Transfektion und 14 Tage später keine morphologischen Veränderungen auf. Entsprechende Ergebnisse bei Versuchswiederholung. 10x Vergrößerung

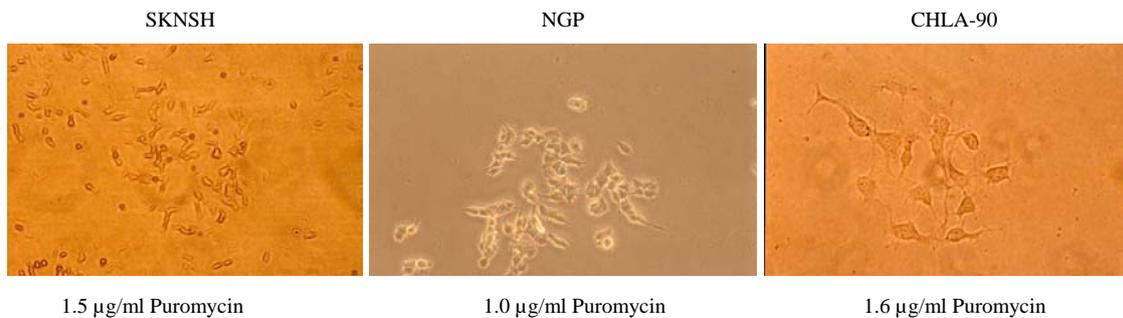


Abb. 26: Neuroblastomzellen 14 Tage nach Transfektion mit pBabe-DN-hTERT. Der Transfektionserfolg kann durch das Ausreten Puromycin-resistenter Zellen kontrolliert werden. Die Transfektion hat sich nicht auf die Zellmorphologie ausgewirkt. 10x Vergrößerung

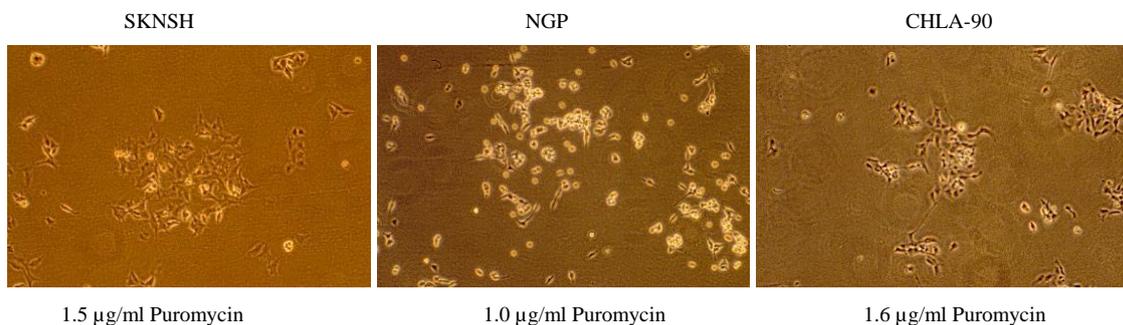


Abb. 27: Neuroblastomzellen 12 Tage nach Transfektion mit pBabe. Antibiotikaresistente Kolonien demonstrieren den Erfolg der Genübertragung. Die Kontroll-Transfektion verändert das Zellaussehen nicht. 10x Vergrößerung

3.4 Evaluation des Transfektionssystems

Voraussetzung für eine experimentelle Anwendung des Transfektionssystems sind:

- 1) eine stabile Insertion der DNA (WT-hTERT/DN-hTERT) in das Genom der Zielzellen
- 2) eine effektive Transkription der entsprechenden Gensequenzen

Zu 1)

Die stabile Insertion der Gensequenzen von WT-hTERT/DN-hTERT in den transfizierten Neuroblastomzelllinien SKNSH, NGP und CHLA-90 wurde indirekt durch eine Polymerasekettenreaktion auf das im Plasmid enthaltende Puromycinresistenzgen nachgewiesen. Die Expression des Resistenzgens wurde durch erfolgreiche Selektionierung antibiotikaresistenter Zellen demonstriert.

Zu 2)

Zur Ermittlung der tatsächlichen Transkription der ektopen Gene WT-hTERT/DN-hTERT wurden transfizierte Zellen in einer Reversen-Transkriptase-PCR auf den Gehalt von mRNA von WT-hTERT/DN-hTERT untersucht. Die Amplifikationsprodukte wurden nachfolgend bzgl. der Basenabfolge im Bereich der Mutationsstelle sequenziert.

Die Analyse des Wachstumsverhaltens und der Telomerlängen nach erfolgter Transfektion der Neuroblastomzelllinien dokumentierte mögliche funktionelle Auswirkungen des Gentransfers.

3.4.1 PCR des Puromycinresistenzgens

Die Plasmidvektoren pBabe, pBabe-WT-hTERT und pBabe-DN-hTERT enthalten zur Selektionierung der transfizierten Zellen ein Resistenzgen für Puromycin, welches unter Kontrolle des SV40-Promotors steht (Morgenstern JP, 1990). Um den Erfolg der Transfektion zu evaluieren, wurden die Zielzellen nach dem retroviralen Gentransfer und Kultivierung mittels Polymerasekettenreaktion auf dieses Gen untersucht.

Das Amplifikationsprodukt des Puromycin-N-Acetyltransferase-Resistenzgens hat eine Länge von 204 bp und läßt sich gelelektrophoretisch nachweisen. Ein Vorhandensein liefert einen indirekten Hinweis auf Integration des Vektors mit den restlichen Gensequenzen in die Zielzelle.

3.4.1.1 SKNSH

Alle transfizierten SKNSH-Zellen zeigten in der Gelelektrophorese das 204 bp umfassende Amplifikationsprodukt des Puromycinresistenzgens (Abb. 28, 29). Auch nach Kultivierung > 1 Monat blieb das Genprodukt konstant nachweisbar, als indirekter Hinweis auf stabile Integration des Plasmids und der WT-hTERT/DN-hTERT-Gene.

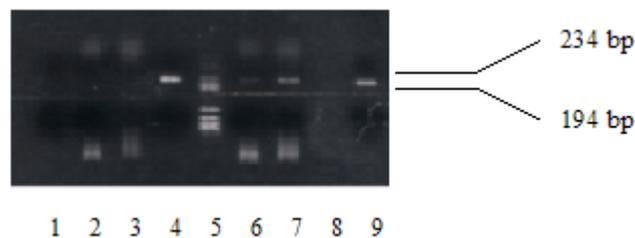


Abb. 28: Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA weist das amplifizierte Puromycinresistenzgen in der mit dem pBabe-Leervektor und pBabe-WT-hTERT-Vektor transfizierten Zelllinie SKNSH nach. Im Bereich von ca. 200 bp zeigt sich die DNA-Bande. Als Positivkontrolle wurden die Plasmide pBabe/pBabe-WT-hTERT/pBabe-DN-hTERT in die PCR eingesetzt. Der Versuch wurde 2 mal während eines Kultivierungszeitraums von 1 Monat mit entsprechenden Ergebnissen wiederholt.

Legende: 1: Positivkontrolle (Plasmid pBabe-DN-hTERT), 2, 3: SKNSH pBabe-WT-hTERT, 4: Längenstandard, 5: Negativkontrolle (Ladepuffer), 6, 7: SKNSH pBabe-Leervektor

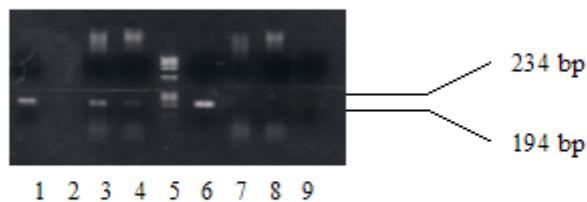


Abb. 29: Das Amplifikationsprodukt lässt sich nur in den mit DN-hTERT transfizierten SKNSH-Zellen nachweisen, nicht jedoch in den untransfizierten Zellen. Eine Versuchswiederholung lieferte gleiche Ergebnisse.

Legende: 1: Positivkontrolle (Plasmid pBabe-DN-hTERT), 2: Negativkontrolle (Ladepuffer), 3, 4: SKNSH pBabe-DN-hTERT, 5: Längenstandard, 6: Positivkontrolle (pBabe-Leervektor), 7, 8: untransfizierte SKNSH, 9: Negativkontrolle (Ladepuffer)

3.4.1.2 NGP

Alle transfizierten NGP-Zelllinien sind positiv für das Puromycinresistenzgen, auch nach längerer Kultivierung über einen Zeitraum von 1 Monat.

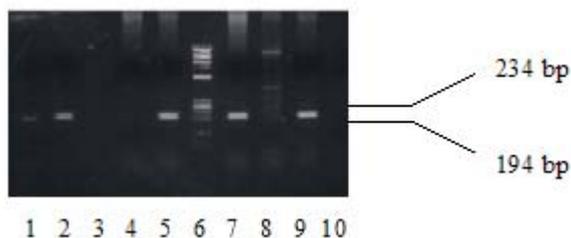


Abb. 30: Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA transfizierter und untransfizierter NGP-Zelllinien. Der Versuch wurde mit gleichen Ergebnissen wiederholt.

Legende: 1: Positivkontrolle (Plasmid pBabe-DN-hTERT), 2: Positivkontrolle (Plasmid pBabe-WT-hTERT), 3, 4, 10: Negativkontrolle (Ladepuffer), 5: NGP pBabe-WT-hTERT, 6: Längenstandard, 7: NGP pBabe-DN-hTERT, 8: NGP untransfiziert, 9: NGP pBabe-WT-hTERT

3.4.1.3 CHLA-90

Der Nachweis des Amplifikationsproduktes in allen transfizierten CHLA-90 Zelllinien ist ein indirekter Hinweis auf die Integration des Plasmids in die Zielzelle.

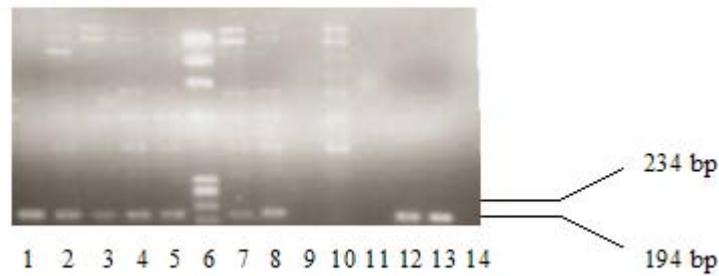


Abb. 31: Nach Transfektion und Kultivierung ließ sich wiederholt mittels PCR und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung das 204 bp umfassende Genfragment des Puromycinresistenzgens in den Zielzellen nachweisen. Bei untransfizierten CHLA-90 Zelllinien fehlte die charakteristische Bande.

Legende: 1: SKNSH pBabe-DN-hTERT, 2: NGP pBabe, 3, 4: CHLA-90 pBabe, 5: CHLA-90 pBabe-WT-hTERT, 6: Längenstandard, 7, 8: CHLA-90 pBabe-DN-hTERT, 9: Negativkontrolle (Ladepuffer), 10: CHLA-90 untransfiziert, 11: Negativkontrolle (Ladepuffer), 12: Positivkontrolle (Leervektor pBabe), 13: Positivkontrolle (Plasmid pBabe-DN-hTERT), 14: Negativkontrolle (Ladepuffer)

3.4.2 Reverse Transkriptase-PCR von WT-hTERT/DN-hTERT

Um nachzuweisen, ob die integrierte, ektope DNA von WT-hTERT und DN-hTERT auch tatsächlich transkribiert wird, wurden die transfizierten Neuroblastomzelllinien auf den Gehalt von mRNA der entsprechenden Gensequenzen untersucht. Eine Reverse-Transkriptase-PCR ergibt bei Expression des ektope Genes ein 836 bp umfassendes cDNA-Genprodukt, welches gelelektrophoretisch als signalintensive Bande nachgewiesen werden kann.

3.4.2.1 SKNSH

Die SKNSH-Zelllinie besitzt eine endogene Telomeraseaktivität. Amplifikationsprodukte von hTERT-Gensequenzen sind demzufolge sowohl in transfizierten, als auch untransfizierten Zelllinien zu erwarten.

Das endogene Telomerasegen mit Exons und Introns kann in verschiedenen mRNA-Splicevarianten transkribiert werden (Ulaner GA, 1998), die komplementäre,

amplifizierte cDNA läßt sich aufgrund entsprechend unterschiedlicher Längen gelelektrophoretisch auftrennen und ergibt distinkte Banden.

Das in den pBabe-Vektor, welcher defizient für die Splicing-Donor-Site ist, klonierte WT-hTERT/DN-hTERT-Insert besteht aus cDNA ohne Introns (Hahn WC, 1999). Ektope Telomeraseexpression ist demzufolge keinem Splicing unterworfen, zu erwarten wäre also nach elektrophoretischer Auftrennung neben den endogenen Spliceprodukten eine homogene, deutlich intensivere Bande von 836 bp bei transfizierten SKNSH-Zelllinien. Bei Überexpression des ektopten WT-hTERT/DN-hTERT-Gens ist von einer deutlichen Signalintensitätserhöhung in diesem Bereich im Vergleich zu untransfizierten Zellen auszugehen.

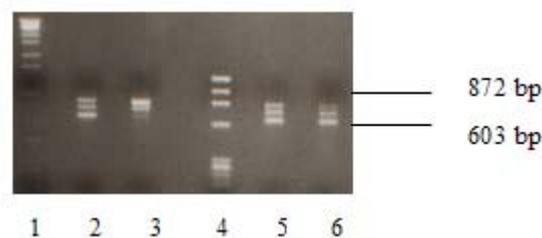


Abb. 32: Auftrennung der cDNA der amplifizierten Gensequenzen des WT-hTERT/DN-hTERT-Gens. Deutlich sichtbar die amplifizierte cDNA der 3 hTERT-Spliceprodukte in Größenbereichen von ca. 600 bp-870 bp, sowohl in transfizierten als auch untransfizierten Zelllinien als Hinweis auf endogene hTERT mRNA-Expression. Im Bereich von 836 bp fehlt in mit pBabe-WT-hTERT/DN-hTERT transfizierten SKNSH-Zellen eine deutliche Bande als Hinweis auf effiziente, ektope Expression von WT-hTERT bzw. ihrer dominant-negativen Mutante. Dieser Versuch wurde insgesamt 3 mal mit analogen Ergebnissen durchgeführt.

Legende: 1: Längenstandard, 2: SKNSH pBabe, 3: SKNSH pBabe-WT-hTERT, 4: Längenstandard, 5: SKNSH pBabe-DN-hTERT, 6: SKNSH untransfiziert

Alle transfizierten SKNSH-Zellen zeigten nach Auftrennung der amplifizierten RT-PCR-Produkte drei Banden, entsprechend den Splicevarianten der endogenen Telomerase (**Abb. 32**). Eine signalintensivere Bande im Größenbereich von 836 bp fand sich nicht. Diese ließ sich auch nach wiederholten Transfektionen mit den pBabe-Vektorkonstrukten nicht nachweisen.

3.4.2.2 NGP

Bei endogener Telomeraseaktivität stellen sich bei transfizierten und untransfizierten NGP-Zellen analog der SKNSH-Zelllinie die mRNA-Splicevarianten von hTERT dar. Eine signifikant stärkere Bande im Bereich von 836 bp als Hinweis für eine Überexpression von WT-hTERT/DN-hTERT ließ sich auch nach wiederholten Transfektionen nicht nachweisen.

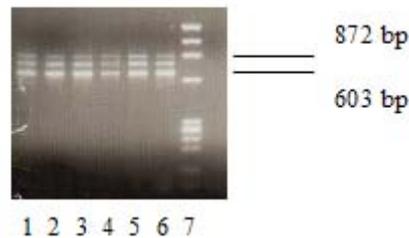


Abb. 33: Nach elektrophoretischer Auftrennung der cDNA-Produkte zeigen sich bei transfizierten und untransfizierten Zellen gleichermaßen Banden der Telomerasesplicevarianten ohne signifikante Konzentrationserhöhung im Bereich von 836 bp in transfizierten Zellen. Eine Versuchswiederholung zeigte ein gleiches Resultat.

Legende: 1: NGP pBabe-DN-hTERT, 2: SKNSH untransfiziert, 3: NGP pBabe, 4: NGP-pBabe-WT-hTERT, 5: NGP pBabe-DN-hTERT, 6: NGP untransfiziert, 7: Längenstandard

3.4.2.3 CHLA-90

CHLA-90 ist eine telomerasenegative Zelllinie, weist also keine endogene hTERT-Expression auf. Bei Reverser-Transkriptase-PCR von WT-hTERT/DN-hTERT-mRNA aus CHLA-90 Zelllinien sind demzufolge nur bei denjenigen CHLA-90 Zellen das charakteristische Amplifikationsprodukt von 836 bp zu erwarten, in denen das ektope Gen (WT-hTERT/DN-hTERT) stabil integriert ist und auch tatsächlich transkribiert wird.

Trotz mittels Puromycin-PCR nachgewiesener Integration von Sequenzen der Plasmide pBabe-Puro-WT-hTERT, pBabe-Puro-DN-hTERT und pBabe-Puro (Abb. 31) konnte eine stabile Expression des Zielgens nur bei Transfektion der dominant-negativen Mutante DN-hTERT beobachtet werden. Plasmidsequenzen in mit pBabe-

WT-hTERT-transfizierten CHLA-90-Zellen waren zwar bei wiederholten Transfektionsansätzen und längerer Kultivierung mittels PCR des Puromycinresistenzgens nachweisbar, korrelierten jedoch nicht mit einer Transkription von WT-hTERT.

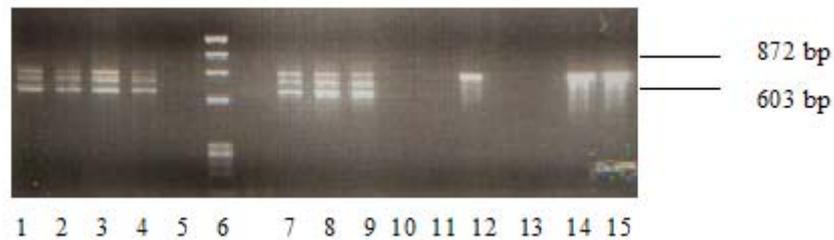


Abb. 34: Deutlich sichtbar die einzelne Bande im Bereich von 836 bp als Hinweis für Expression des ektopen Gens DN-hTERT in telomerasenegativen, transfizierten CHLA-90-Zellen. Fehlendes Signal bei 5 zeigt die fehlende Expression des ektopen hTERT-Gens an, 6 weist die CHLA-90-Zielzellen als endogen telomerasenegativ aus. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der PCR der telomerasepositiven Neuroblastomzelllinien NGP und SKNSH (transfiziert und untransfiziert) dargestellt.

Legende: 1: SKNSH pBabe, 2, 3: SKNSH pBabe-DN-hTERT, 4: SKNSH untransfiziert, 5: Negativkontrolle, 6: Längenstandard, 7: NGP pBabe-WT-hTERT, 8: NGP pBabe-DN-hTERT, 9: NGP untransfiziert, 10: CHLA-90 pBabe, 11: CHLA-90 pBabe-WT-hTERT, 12: CHLA-90 pBabe-DN-hTERT, 13: Negativkontrolle (pBabe-Leervektor), 14: Positivkontrolle (pBabe-DN-hTERT), 15: Positivkontrolle (pBabe-WT-hTERT)

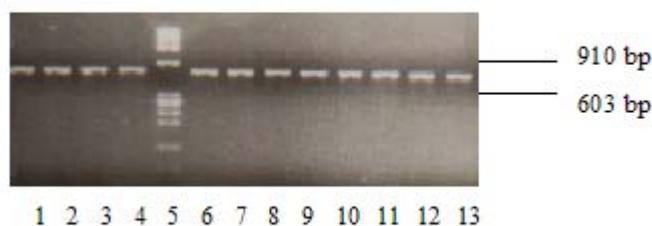


Abb. 35: β -Actin-RT-PCR als interne Kontrolle und zum Nachweis, dass intakte RNA-Isolate zum Einsatz kamen.

Legende: 1: SKNSH pBabe, 2: SKNSH pBabe-WT-hTERT, 3: SKNSH pBabe-DN-hTERT, 4: Längenstandard, 5,6: NGP pBabe, 7: NGP pBabe-WT-hTERT, 8: NGP pBabe-DN-hTERT, 9: NGP untransfiziert, 10: CHLA-90 pBabe, 11: CHLA-90 pBabe-WT-hTERT, 12: CHLA-90 pBabe-DN-hTERT, 13: CHLA-90 untransfiziert

3.4.3 Sequenzierung der Amplifikationsprodukte

3.4.3.1 SKNSH

Die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten cDNA von WT-hTERT/DN-hTERT vermag in den telomerasepositiven Zelllinien SKNSH und NGP nicht exakt zu differenzieren zwischen endogener hTERT-Transkription und ektopter WT-hTERT- oder DN-hTERT-Transkription.

Ein indirekter Hinweis auf fehlende Überexpression der ektopten Gene in beiden telomerasepositiven Zelllinien ergab sich aus der Beobachtung, dass im Bereich der charakteristischen Bande des 836 bp umfassenden Amplikons keine erhöhte Signalintensität in transfizierten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nachweisbar war.

Ein direkter Nachweis der ektopten Expression der dominant-negativen Mutante von hTERT ist möglich durch Sequenzierung der charakteristischen cDNA im Bereich der Mutationsstelle. Wenn das integrierte Gen tatsächlich in mRNA transkribiert wird, zeigt sich in der cDNA-Sequenz neben der endogenen Wildtyp-Gensequenz (GTG GAT GTG) auch die Basenabfolge der Mutante (GTC GCG ATC). Eine Differenzierung zwischen endogener WT-hTERT-Expression und Expression des transfizierten WT-hTERT-Gens ist aufgrund identischer Gensequenzen hierdurch nicht möglich.

Die Sequenzierung der cDNA der mit pBabe DN-hTERT transfizierten SKNSH-Zellen zeigte lediglich die Wildtypbasenabfolge der endogenen hTERT-Transkription, die mutierte Sequenz konnte nicht nachgewiesen werden.

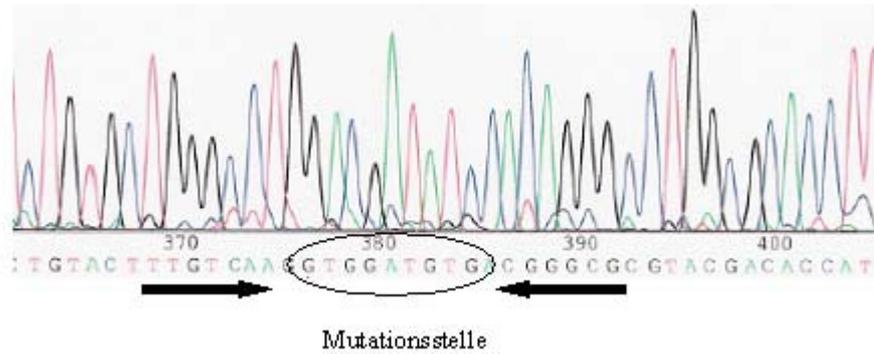


Abb. 36: Die Sequenzierung im Bereich der Mutationsstelle zeigt, dass lediglich die Basenabfolge des endogenen hTERT-Wildtyps (GTG GAT GTG) zur Darstellung kommt. cDNA-Sequenzen der DN-hTERT-Mutante fehlen und bestätigen die fehlende Genexpression.

3.4.3.2 NGP

In DN-hTERT-transfizierten telomerasepositiven NGP-Zellen ließen sich mittels Sequenzierung der cDNA-Amplifikationsprodukte keine Sequenzen der dominant-negativen Mutante nachweisen, eine direkte Bestätigung der fehlenden Transkription des integrierten Gens.

3.4.3.3 CHLA-90

Da die telomerasenegative Zelllinie CHLA-90 keine endogene hTERT-Expression aufweist, liefert eine singuläre cDNA-Bande (836 bp) nach Reverser Transkription von WT-hTERT/DN-hTERT-Genfragmenten und PCR-Amplifikation den Nachweis der ektopen Expression, wie wir sie bei DN-hTERT-transfizierten CHLA-90-Zellen nachweisen konnten. In der Sequenzierung dieser amplifizierten Produkte konnten wir den direkten Nachweis erbringen, dass es sich bei der cDNA tatsächlich um das erfolgreich, transfizierter Gen DN-hTERT handelte.

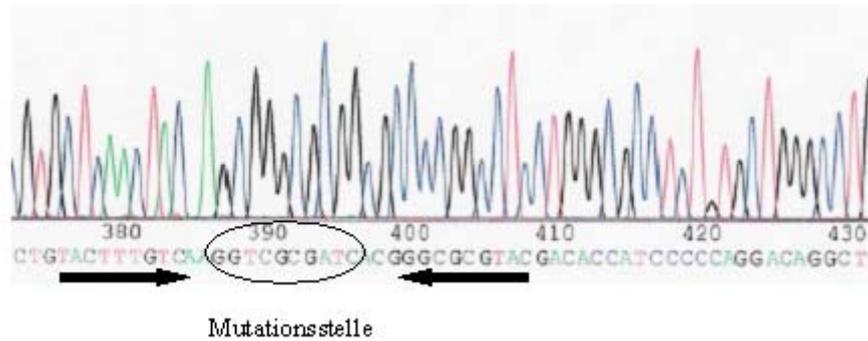


Abb. 37: Die Sequenzierung der 836 bp-umfassenden cDNA bestätigt, dass die transfizierten CHLA-90-Zellen das mittels retroviralen Gentransfers übertragene Gen für DN-hTERT stabil integriert haben und erfolgreich transkribieren.

3.4.4 Telomerenlängenbestimmung

Um mögliche funktionelle Konsequenzen der retroviralen Genübertragung von WT-hTERT oder DN-hTERT und einer evtl. erfolgreichen Expression der ektopen Gene auf die Telomerenlängen telomerasepositiver Zelllinien nachzuweisen (Hahn WC, 1999), wurde nach 1 Monat Kultivierung unter kontinuierlicher Puromycinselektion von den transfizierten, telomerasepositiven Zelllinien SKNSH und NGP eine Telomerenlängenbestimmung durchgeführt. Hypothetisch wurde davon ausgegangen, dass ektopye WT-hTERT-Expression zu einer Verlängerung, bzw. Konstanterhaltung der Chromosomenden führen würde, die Telomerasehemmung durch DN-hTERT jedoch eine Telomerverkürzung nach sich ziehen würde.

Im Vergleich zu den TRF von untransfizierten Zellen (**Abb. 22**) und Zellen, welche mit dem pBabe-Leervektor oder pBabe-WT-hTERT transfiziert worden waren, ließen sich keine Änderungen in den TRF der DN-hTERT-transfizierten Zellen feststellen. DN-hTERT-transfizierte SKNSH-Zellen behielten ihre TRF während der 1-monatigen Kultivierung konstant bei ca. 4 kb, für transfizierte und untransfizierte NGP-Zellen betragen die TRF unverändert 6 kb (**Abb. 38**). Insbesondere ließen sich keine Telomerverkürzungen zeigen. Ebenso wenig resultierte die Transfektion mit WT-hTERT in einer Verlängerung der Telomeren im Vergleich mit Kontrolltransfektionen (**Abb. 38**).

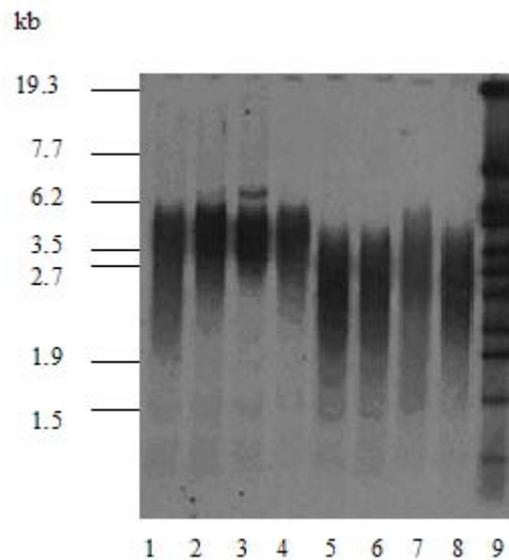


Abb. 38: Telomerlängenblot der Neuroblastomzelllinien SKNSH und NGP 32 Tage nach Transfektion. Bezüglich der TRF lassen sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich transfizierter Zellen und untransfizierten Zellen nachweisen.

Legende: 1: NGP untransfiziert, 2: NGP pBabe-DN-hTERT, 3: NGP pBabe-WT-hTERT, 4: NGP pBabe, 5: SKNSH, 6: SKNSH pBabe-DN-hTERT, 7: SKNSH pBabe-WT-hTERT, 8: SKNSH pBabe, 9: Marker

Mit diesem Ergebnis konnten wir auch auf funktioneller Ebene zeigen, dass eine Transkription der retroviral integrierten WT-hTERT/DN-hTERT-Gensequenzen nicht stattfand, bzw. keinen Einfluss auf die Telomerlängen der telomerasepositiven Neuroblastomzelllinien hatte.

3.4.5 Wachstumsstudien

Das Wachstumsverhalten der transfizierten Neuroblastomzellen wurde unter kontinuierlicher Antibiotikaselektion über einen Zeitraum von 2 Monaten analysiert. Hintergrund der Untersuchung bildet die Frage nach wachstumsbeeinflussenden Wirkungen von erfolgreich exprimiertem WT-hTERT, welches allgemein vitalitätssteigernde, proliferationsfördernde Eigenschaften besitzt (Cao Y, 2002), und dessen dominant-negativer Mutante DN-hTERT, welche bei Überexpression durch eine

Hemmung der Telomerase langfristig zu Telomererosion, Wachstumsstop und Zelltod führt (Hahn WC, 1999; Nakajima A, 2003; Zhang X, 1999).

Hierzu wurde der Zeitpunkt der Transfektion der Zielzellen als Punkt 0 definiert.

Zum einen wurde davon ausgehend die Zeit bestimmt, die die transfizierten Neuroblastomzellen unter Antibiotikaselektion benötigten, um in den 6-well-Platten eine Konfluenz von 70-80 % zu erreichen. Dies wurde als Voraussetzung für die weitere Kultivierung in T25-Kulturflaschen gesetzt.

Nach besagtem Umsiedeln der Zellen in T25-Flaschen wurde des weiteren das Wachstumsverhalten während der nun folgenden Passagierung studiert. Das Splitting und Umsiedelne der kultivierten Zellen erfolgte im Verhältnis 1:2/1:4 oder 1:20. 1 PD wurde definiert als der Zeitpunkt, an dem die Kultur eine 90 % Konfluenz erreicht hatte und nachfolgend gesplittet werden konnte.

3.4.5.1 SKNSH

Die Zeit von der Transfektion (Startpunkt 0) bis zum Erreichen einer 70-80%igen Konfluenz in den 6-well-Platten wurde für die 3 transfizierten Zelllinien ermittelt mit:

SKNSH pBabe:	14 Tage
SKNSH pBabe-WT-hTERT:	23 Tage
SKNSH pBabe-DN-hTERT:	17 Tage

Nach diesem Zeitraum wurden die transfizierten SKNSH-Zelllinien über einen weiteren Monat bezüglich ihres Wachstumsverhaltens analysiert (**Abb. 39**). Hier zeigten alle 3 transfizierten Zelllinien ähnliche Proliferationsgeschwindigkeiten, ohne Hinweis auf proliferationsfördernde Effekte von WT-hTERT oder wachstumshemmende Auswirkungen von DN-hTERT.

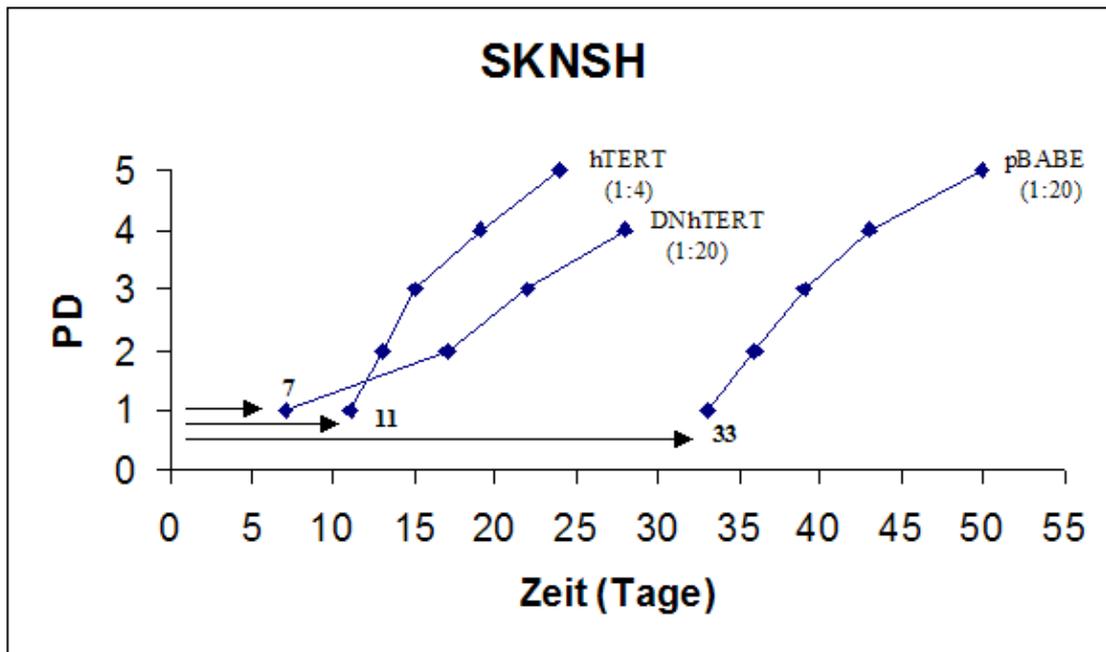


Abb. 39: Wachstumskurven (Population Doubling/Zeit) für SKNSH-Zelllinien, welche mit pBabe, pBabe-WT-hTERT und pBabe-DN-hTERTtransfiziert sind. Angezeigt ist die Zeit, welche die Zelllinien nach Transfektion zum Erreichen einer 70-80 % Konfluenz benötigten (Pfeil): SKNSH-pBabe: 33 Tage, SKNSH-pBabe-WT-hTERT: 7 Tage und SKNSH-pBabe-DN-hTERT: 11 Tage. Die Kurve kennzeichnet die Proliferationsgeschwindigkeit der transfizierten Zelllinien nach Umsiedeln in T25-Flaschen und 1:4 (pBabe-WT-hTERT, pBabe-DN-hTERT), bzw. 1:20-Passagierung (pBabe).

3.4.5.2 NGP

Die Zeit von der Transfektion bis zum Erreichen einer 70-80%igen Konfluenz in den 6-well-Platten betrug für die 3 transfizierten Zelllinien:

NGP pBabe:	24 Tage
NGP pBabe-WT-hTERT:	37 Tage
NGP pBabe-DN-hTERT:	29 Tage

Nach diesem Zeitraum wurden das weitere Wachstumsverhalten in selektivem Medium beobachtet. Hierbei ließen sich im langfristigen Verlauf keine Unterschiede in der Proliferationskinetik feststellen, insbesondere kein Proliferationsstop nach DN-hTERT-Transfektion oder Wachstumsbeschleunigung durch WT-hTERT-Transfektion (Abb. 40).

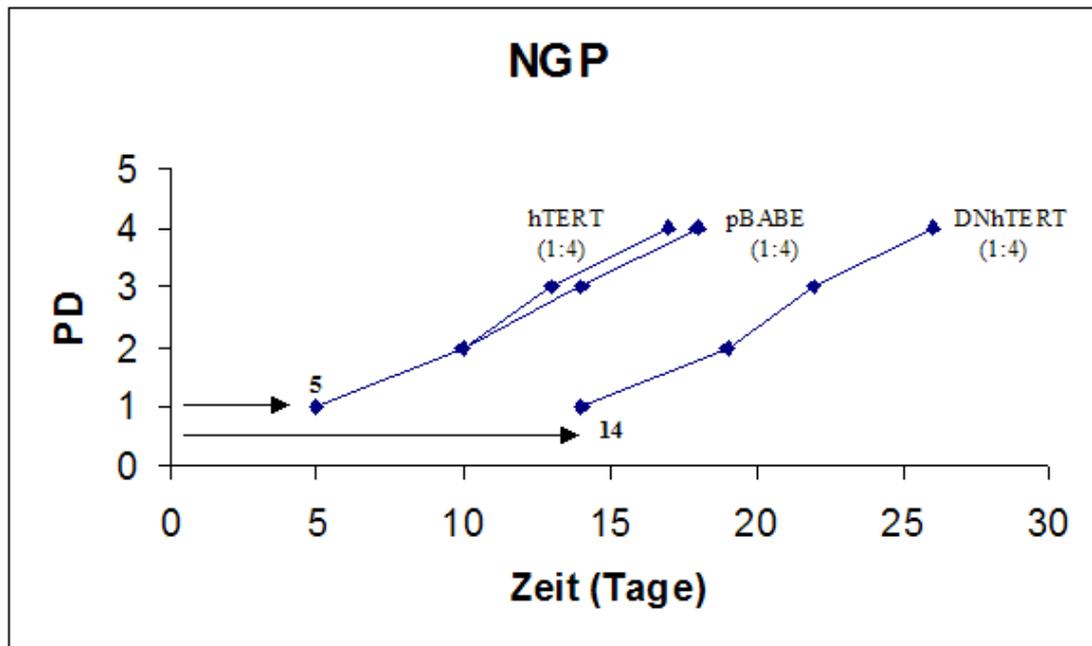


Abb. 40 Wachstumskurven (Population Doublings/Zeit) für NGP pBabe, pBabe-WT-hTERT und pBabe-DN-hTERT0-80 %iger Konfluenz in 6-well plates (Pfeil): NGP-pBabe/WT-hTERT: 5 Tage, NGP-pBabe-DN-hTERT: 14 Tage. Nach Umsiedeln in T25-Flaschen und 1:4-Passagierung ähnliche Proliferationskinetiken (Kurve).

3.4.5.3 CHLA-90

Die transfizierten CHLA-90-Zellen benötigten zwischen Transfektion und Umsiedelung bei 70-80%igen Konfluenz folgende Zeit:

CHLA-90 pBabe:	15 Tage
CHLA-90 pBabe-WT-hTERT:	29 Tage
CHLA-90 pBabe-DN-hTERT:	24 Tage

In dem sich anschließendem Studium der PD fand sich in den transfizierten, telomerasenegativen Zellen kein Hinweis auf proliferationssteigernde Wirkungen von WT-hTERT und keine Beeinflussung des Wachstumsverhaltens nach Transfektion mit DN-hTERT im Vergleich zur Kontrolltransfektion, was hypothetisch auch nicht erwartet war (Abb. 41).

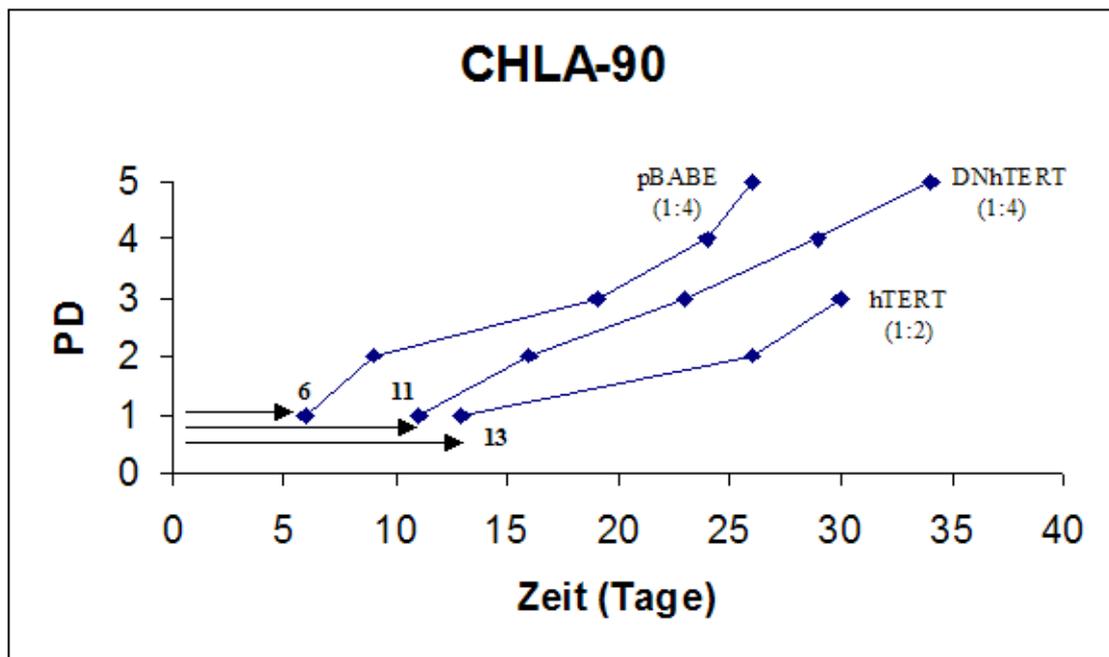


Abb. 41: Wachstumskurven für CHLA-90 pBabe, pBabe-WT-hTERT und pBabe-DN-hTERT nach Umsiedeln in T25-Flaschen und 1:4/1:2-Passagierung. Zeitspanne von der Transfektion (Punkt 0) bis zum Erreichen von 70-80 % Konfluenz: CHLA-90-pBabe: 6 Tage, CHLA-90-pBabe-WT-hTERT: 11 Tage, CHLA-90-pBabe-DN-hTERT: 13 Tage. Ähnliche Proliferationseigenschaften während Kultivierung über 1 Monat.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Evaluation

Den Hintergrund der vorliegenden Arbeit bildet das Studium der Telomerenbiologie in klein-blau-rundzelligen Tumoren des Kindesalters. Zielsetzung dieser Arbeit war, die Anwendbarkeit eines retroviralen Transfektionssystems als in vitro-Modell zur Telomerasehemmung mit den Vektoren pBabe-Puro-WT-hTERT und pBabe-Puro-DN-hTERT an den telomerasepositiven und telomerasenegativen Neuroblastomzelllinien SKNSH, NGP und CHLA-90 zu evaluieren.

Zwei Anforderungen wurden an das Transfektionssystem gestellt:

- 1) Stabile Integration der DNA von WT-hTERT und dessen dominant-negativer Mutante DN-hTERT
- 2) Zuverlässige Expression der entsprechenden Gene

Zu 1)

Mittels Polymerasekettenreaktion für die im pBabe-Puro-Plasmid integrierten Genabschnitte des Puromycinresistenzgens konnten wir nach Transfektion reproduzierbar eine stabile Integration von Plasmidsequenzen in allen 3 Zelllinien SKNSH, NGP und CHLA-90 nachweisen. Die längerfristige Kultivierung erfolgreich transfizierter Neuroblastomzelllinien in Puromycin-Selektionsmedium zeigte die tatsächliche Expression des Resistenzgens an. Das von uns evaluierte Transfektionssystem konnte also zur stabilen Integration der ektopen Gene erfolgreich eingesetzt werden.

Zu 2)

In den telomerasepositiven Zelllinien SKNSH und NGP konnte trotz nachgewiesener Integration des Plasmids auch nach wiederholten Transfektionen keine Transkription von DN-hTERT induziert werden.

Dementsprechend fehlten die in der Literatur beschriebenen, funktionellen Konsequenzen des Gentransfers der dominant-negativen hTERT-Mutante wie

Telomerverkürzung und Proliferationshemmung/Wachstumsstop über einen Beobachtungszeitraum von 1 Monat.

Ebensowenig bewirkte die Transfektion von WT-hTERT in den telomerasepositiven Zelllinien eine Überexpression von WT-hTERT, eine Telomerenverlängerung oder eine gesteigerte Proliferation.

Die telomerasenegative Zelllinie CHLA-90 exprimierte zwar stabil DN-hTERT, der retrovirale Gentransfer von WT-hTERT resultierte jedoch nicht in einer Aktivierung der Telomerase. Funktionelle Konsequenzen des Gentransfers bzgl. Wachstumskinetik ließen sich in erfolgreich transfizierten Zellen nicht feststellen.

Fazit: Die vorliegende Arbeit zeigt demzufolge, dass sich das vorgestellte, retrovirale Transfektionssystem auf Basis des pBabe-Puro-Plasmids nicht eignet, um im Kontext der Neuroblastomzelllinien SKNSH, NGP und CHLA-90 Auswirkungen einer Telomeraseüberexpression oder –inhibition zu studieren.

In meinem nachfolgenden Kapitel werde ich das von uns verwendete methodische Konzept des retroviralen Gentransfers zur Telomerasehemmung und mögliche Ursachen für die inkonstante Expression der Zielgene WT-hTERT und DN-hTERT diskutieren. Die Diskussion unseres Ansatzes zur experimentellen Telomeraseinhibition soll Möglichkeiten zur Modifikation des Transfektionssystems aufzeichnen, um einen Fortschritt in der Etablierung eines effizienten Gentransfersystems zu erreichen.

Außerdem möchte ich den von uns entwickelten Ansatz zur Telomerasehemmung in die aktuelle Forschung über das Gesamtthema „Telomerasehemmung am Beispiel des Neuroblastoms“ kritisch einordnen.

4. Diskussion

Die Diskussion des entwickelten Transfektionssystems soll sich schwerpunktmäßig mit folgenden Themenkomplexen befassen:

- 1) Evaluation und Diskussion des methodischen Ansatzes zur Telomerasehemmung
- 2) Weshalb bietet sich insbesondere das Neuroblastom zur Telomerasehemmung an?
- 3) Welchen klinischen Nutzen besitzt das entwickelte Neuroblastom-Zellkulturmodell?

4.1. Evaluation des Transfektionssystems

4.1.1 Telomeraseinhibition mittels DN-hTERT

Trotz immenser Fortschritte in der Erforschung der genetischen Grundlagen von Tumorerkrankungen steht Krebs nach wie vor an vierter Stelle der Todesursachenstatistik (Statistisches Bundesamt, 2004). Die onkologische Therapie bedient sich zunehmend der molekularen Erkenntnisse für die Entwicklung neuer antineoplastischer Strategien. Proliferationssteigernde und tumorassoziierte Funktionen der Reversen Transkriptase machen die Telomerase zu einem attraktiven Zielmolekül einer spezifischen Tumorthherapie, da die Mehrzahl hochproliferierender, maligner Tumoren im Gegensatz zu somatischen, menschlichen Zellen eine ausgesprochen hohe Telomeraseaktivität aufweisen (Kim NW, 1994). Die Identifizierung und Charakterisierung der strukturellen Komponenten der Chromosomenenden und der Telomerase hat zur Entwicklung einer Vielzahl von verschiedenen Methoden zur Telomerasehemmung verholfen. Bedeutende Angriffspunkte liegen in der hTERT-Komponente der Telomerase, ihrer RNA-Matrize hTR (Herbert B, 1999) oder der charakteristischen Struktur der telomerischen DNA (Collins K, 2000) (Abb. 45).

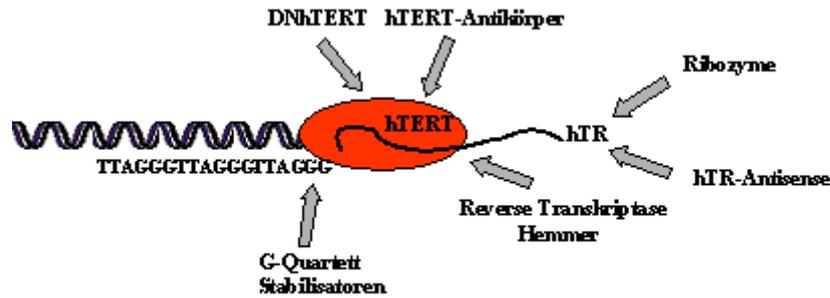


Abb. 45: Verschiedene Angriffspunkte zur Hemmung der Telomerasefunktion

Ein vielversprechendes Zielmolekül für Inhibitionsstrategien im Rahmen der „Target-oriented therapy“ stellt die essentielle katalytische Telomeraseuntereinheit hTERT dar. Telomerasehemmung kann so durch dominant-negative hTERT-Mutanten (Hahn WC, 1999), Reverse Transkriptase Hemmer (Murakami J, 1998), durch promotorvermittelte Downregulation der Genexpression (Shay JW, 2002) und durch immunologische Methoden wie hTERT-Antikörper oder zytotoxische T-Zell-Antworten (Vonderheide RH, 2002; Nair SK, 2000) vermittelt werden.

Das in vorliegender Arbeit von uns eingesetzte molekulare Hilfsmittel zur Analyse und Manipulation der Telomerenbiologie ist eine dominant-negative Mutante (DN-hTERT) der katalytischen Telomerasekomponente hTERT, welche freundlicherweise von Dr. R. Weinberg (Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge, Massachusetts, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Punktmutationen innerhalb des essentiellen Reverse Transkriptase Motivs RT 3, welche typische Asparaginsäure-Reste betreffen, führen zum Verlust der enzymatischen Aktivität (Hahn WC, 1999; Counter CM, 1997).

In verschiedenen Transfektionssystemen wurden analoge katalytisch inaktive hTERT-Mutanten bereits genutzt, um biochemische, physiologische und genetische Konsequenzen einer Telomerasehemmung in immortalen und maligne transformierten menschlichen Zellen studieren zu können (Guo C, 2001; Beattie TL, 1998; Harrington L, 1997; Weinrich SL, 1997; Hahn WC, 1999; Zhang X, 1999; Colgin LM, 2000; Yi X, 2000).

Die stabile Expression von DN-hTERT bewirkte in diesen Zellsystemen eine drastische (Zhang X, 1999) bis vollständige (Hahn WC, 1999) Supprimierung der Telomeraseaktivität. Ein Verlust der Telomeraseaktivität führte zu sukzessiver Chromosomenverkürzung (Zhang X, 1999), zu Proliferationsstop, Einschränkung zellulärer Vitalität (Delhommeau F, 2002), Apoptose und Verlust der malignen Potenz (Guo C, 2001). Die Telomerasehemmung durch DN-hTERT erwies sich dabei als sowohl hochspezifisch (Zhang X, 1999) und sehr effizient (Hahn WC, 1999), sodass wir für unser Zellsystem diesen Ansatz wählten.

An Neuroblastomzelllinien ist dieses Transfektionssystem mit DN-hTERT bisher noch nicht zur Anwendung gekommen, sodass die Evaluation unseres methodischen Ansatzes einen bedeutenden Fortschritt in der Entwicklung von Strategien zur Telomerasehemmung und der Erforschung der Telomerenbiologie am Beispiel des Neuroblastoms liefert.

4.1.2. Retroviraler Gentransfer

Vorliegender Arbeit liegt als methodisches Konzept zur Telomeraseinhibition das Prinzip des retroviralen Gentransfers zugrunde. Im Gegensatz zu alternativen, transienten Verfahren der Übertragung von WT-hTERT/DN-hTERT-Fremd-DNA (CaPO₄-Präzipitation, Elektroporation oder liposomale Techniken (Misawa M, 2002)) kann bei erfolgreicher Integration der zu übertragenden, viralen DNA in das Genom der Zielzelle eine stabile Weitergabe der ektopen Gene mit langfristiger Expression erreicht werden (Kitamura T, 2003; Robbins PB, 1998). Dies ist für die Anwendbarkeit unseres Transfektionssystems essentiell, da längerfristige Auswirkungen der Telomeraseinhibition auf Chromosomenlänge und Wachstumsverhalten von vorrangigem Interesse sind (Hahn WC, 1999).

Das hier verwendete System des retroviralen Gentransfers beruht auf dem von Morgenstern et al. im Jahre 1990 entwickelten System, welches aus den Komponenten des rekombinanten, vom Moloney Mouse Leukemia-Virus abgeleiteten pBabe-Vektors, der ecotropen Verpackungszelllinie Omega E und der amphotropen Produzentenzelllinie PG13 besteht (Morgenstern JP, 1990). Nach liposomaler Transfektion und anschließender Transduktion des rekombinanten Plasmids pBabe in die

Zelllinien Omega E/PG 13 wird die Vektor-RNA mit Hilfe der gag-, pol- und env-Gensequenzen und des Verpackungssignals ψ in Retroviren verpackt, welche die Zielzellen SKNSH, NGP und CHLA-90 zu infizieren vermögen und durch die Integrase einen Einbau in das Genom ermöglichen können. Das Protokoll von Morgenstern et al. beschreibt einen hohen Virustiter von $> 10^6$ U/ml (Morgenstern JP, 1990), welches bei uns mit einer mäßig guten Transfektionseffizienz (ca. 20 %) bei den Neuroblastomzelllinien korrelierte.

Die Generierung von retroviralen Partikeln ist bei diesem mehrschrittigen Verfahren relativ zeitaufwendig, im Gegensatz zu Transfektionsmethoden, welche effiziente Virustiter durch unmittelbaren, transienten Gentransfer einer Produzentenzelllinie erreichen (Pear, 1993). So benötigten wir für ein Standardprotokoll ca. 14 Tage für die Gewinnung von einer ausreichenden Menge an Retroviren zur Infektion der Zielzellen. Das mehrschrittige Verfahren hat jedoch den Vorteil, dass wir stabile, hochtitrig virusproduzierende PG13-Zelllinien generieren konnten, in denen wir auch nach längerer Kultivierung in Selektionsmedium die internalisierten Puromycinresistenzgensequenzen nachweisen konnten.

4.1.2.1 Stabile Integration der ektope Gene

Eine der Grundvoraussetzungen für die Anwendbarkeit der Gentransfermethodik ist die stabile Integration der Vektor-DNA in die Chromosomen der Neuroblastomzielzellen (Hahn WC, 1999; Guo C, 2000). Mittels PCR konnten wir nachweisen, dass alle 3 Neuroblastom-Zelllinien nach retroviralem Gentransfer das Resistenzgen für Puromycin internalisiert hatten. Auch über einen längeren Kultivierungszeitraum von 1 Monat blieben die Zellen positiv für das Reportergen, sodass von einer stabilen Integration dieser Gensequenzen auszugehen ist. Diese ausgesprochen effiziente Internalisierung ektope Gene ist bekannt für MoMLV-Vektoren und macht diese zu einem häufig gebrauchten Instrument zur Übertragung von Fremd-DNA in vitro und in vivo (Haas DL, 2003).

4.1.2.2 Expression des Puromycinresistenzgens

Der retrovirale Gentransfer führt zu einer zufälligen Integration der ektopen Gene in das Chromosom (Ceresetto A, 2004). Häufig sind hier Chromatinstrukturen mit offenem Leseraster betroffen, welche charakteristisch für aktiv transkribierte Gene sind (Ceresetto A, 2004). Da die Integrationsstelle jedoch auch in sog. „silent regions“ der Chromosomen lokalisiert sein kann, bleibt eine erfolgreiche Transkription der eingebauten Gene teilweise aus (Kitamura T, 2003).

Dass eine tatsächlich Expression der Puromycin-N-Acetyltransferase in allen 3 transfizierten Zelllinien erfolgte, demonstrierten wir funktionell durch Vorhandensein puromycinresistenter Kolonien. Der vorgeschaltete SV40-Early-Promotor, welcher die Transkription des Puromycingens reguliert, garantiert also nach chromosomaler Integration eine effiziente Genexpression. Dies steht im Einklang mit anderen experimentellen Studien, nach denen der SV40-Promotor ein hocheffizientes System zur Transkription korrespondierender Gene ist (Morgenstern JP, 1990; Spenger A, 2004).

4.1.2.3 Expression von WT-hTERT/DN-hTERT

Da das Puromycinresistenzgen unter der Kontrolle anderer regulatorischer Einheiten als die einklonierten Inserts steht (Morgenstern JP, 1990) und nur einen indirekten Hinweis auf gekoppelte Integration der anderen Vektorgene liefert (Delhommeau F, 2002), müssen die Ziel-Gene WT-hTERT und DN-hTERT gesondert auf tatsächliche Transkription untersucht werden. Die Expression dieser Gene ist der entscheidende Faktor für die Anwendbarkeit unseres Transfektionssystems zur Telomeraseinhibition an den Neuroblastomzelllinien.

Hierbei zeigte sich in den verschiedenen telomerasepositiven und –negativen Zelllinien eine inkonstante Expression dieser ektopen Gene. Mit Ausnahme der DN-hTERT-transfizierten CHLA-90-Zelllinie konnte in den Neuroblastomzelllinien trotz stabiler Integration und nachweisbarer Expression von anderen pBabe-Plasmidsequenzen keine

Transkription von WT-hTERT und dessen dominant-negativer Mutante DN-hTERT induziert werden.

Für von dem Moloney Murine Leukemia Virus abgeleitete Vektoren ist eine inkonstante Expression der Zielgene ein häufig beschriebenes Problem (Robbins PB, 1998; Laker C, 1998). Der Hauptgrund für dieses sog. „Proviral Silencing“ wird in speziellen Charakteristika des 5`-LTR des MoMLV-Vektors gesehen (Laker C, 1998), welches in dem von uns verwendeten pBabe-Plasmid als Promotor ektopes WT-hTERT/DN-hTERT kontrolliert (Morgenstern JP, 1990).

Die LTR der MoMLV-verwandten Vektoren weisen nach Gentransfer überdurchschnittlich häufig Methylierungen ihrer CpG-reichen Sequenzen auf (Robbins PB, 1998; Svoboda J, 2000). Durch Methylierung (Razin A, 1998; Ng HH, 1999) und nachfolgende Histondeazetylierung (Bird AP, 1999; Yang WM, 1996) wird die transkriptionelle Aktivität supprimiert und die Expression nachgeschalteter Gene unterbleibt. Dies ist also eine mögliche Ursache für die ausbleibende Transkription in unserem Transfektionssystem.

Außerdem ist bekannt, dass MoMLV-basierte Vektoren zusätzliche Sequenzen besitzen, welche eine Transkription durch das LTR supprimieren. Zu den vier wichtigsten, hemmenden Genelementen zählen:

- 1) dysfunktionelle MoMLV-Enhancer Repeats in der 5`-Region der LTR, welche die Fähigkeit zur Bindung sog. „Transcriptional Activator Sites“ verloren haben (Grez M, 1991)
- 2) die negative Kontrollregion (NCR) in Nachbarschaft zu den Enhancer Repeats (Flanagan JR, 1992)
- 3) die Primer Binding Site Region (PBS) für den Transkriptionsstart mit den überlappenden Sequenzen der Repressor Binding Site (RBS) (Petersen R, 1991; Kempler G, 1993; Haas, DL, 2003)
- 4) die Bindungsstelle für das embryonale LTR Binding Protein, synonym mit *Drosophila fushi tarazu* Faktor 1 (Tsukiyama T, 1992).

Auch die Lokalisation, an der die virale Geninformation in das Chromosom integriert wird, scheint eine bedeutende Rolle für die erfolgreiche Expression eingeführter Gene zu spielen. Verschiedene in vitro und in vivo-Studien zeigten, dass Expressionsraten

insbesondere von MoMLV-abgeleiteten Vektoren abhängig von der Integrationsstelle sind (Robbins PB, 1998; Pawliuk 1997). Die zufällige Integration in transkriptionell aktive Genbereiche könnte so eine Erklärung für die stabile Expression von DN-hTERT in den transfizierten CHLA-90-Zellen liefern, wohingegen wiederholte Transfektionen von WT-hTERT zur Integration dieses Gens in Bereiche von Silencers geführt haben, in denen der SV40-Promotor für das Puromycinresistenzgen weiterhin aktiviert ist, das LTR des MoMLV jedoch supprimiert wird.

Ein wichtiger Faktor, welcher über den Erfolg des retroviralen Gentransfers entscheidet, ist auch die adäquate Auswahl des Vektors in Beziehung zu den Zielzellen (Spenger A, 2004; Couture LA, 1994). Wir wendeten unser Transfektionssystem zur Telomerasehemmung an undifferenzierten, embryonalen Tumorzelllinien an (Neuroblastomzelllinien SKNSH, NGP und CHLA-90). MoMLV-basierte Vektoren werden häufig in unreifen Zellen, wie embryonalen Tumoren (Stewart CL, 1992; Swindle CS, 2002), embryonalen (Greig M, 1991) und hämatopoetischen (Kitamura T, 2003) Stammzellen in ihrer Transkription supprimiert. So ist eventuell gerade unser Zellsystem ungeeignet für MoMLV-abgeleitete Vektorkonstrukte, und kennzeichnet die Neuroblastomzelllinien als sog. „non-permissive cells“ für den pBabe-Vektor. In anderen Zellsystemen wie Colonkarzinom-, Prostatakarzinom-, Bronchialkarzinom-, Mammakarzinom- und Ovarialkarzinomzelllinien konnten analoge pBabe-Vektorkonstrukte mit den WT-hTERT/DN-hTERT-Inserts bereits erfolgreich eingesetzt werden (Hahn WC, 1999; Guo C, 2001; Misawa M, 2002). Hier führte im Gegensatz zu unseren Beobachtungen an den Neuroblastomzelllinien SKNSH, NGP und CHLA-90 der retrovirale Gentransfer zu einer stabilen Integration und konstanten Expression der Zielgene, sowohl in telomerasepositiven und –negativen Zellen (Hahn WC, 1999) mit entsprechenden funktionellen Konsequenzen.

In der Literatur wurde des weiteren eine Entkopplung von Selektionsmarker und der „Genes of interest“ beschrieben (Delhommeau F, 2002), welche eine Erklärung für die fehlende WT-hTERT/DN-hTERT-Expression darstellen könnte. Die von uns nachgewiesene stabile Integration und Expression von Puromycin liefert demzufolge keine Gewähr für tatsächliche gekoppelte Internalisierung und Transkription von WT-hTERT/DN-hTERT.

Vor diesem Hintergrund mangelnder Expression der ektopen Gene WT-hTERT/DN-hTERT lassen sich unsere Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen nach Gentransfer interpretieren. So zeigten alle 3 Zelllinien keine Änderungen ihres Wachstumsverhaltens über einen Zeitraum von 1 Monat. Bei erfolgreicher Transkription von DN-hTERT ist in einem Teil ähnlicher Transfektionssysteme in anderen Zelllinien schon innerhalb dieses kurzen Zeitraumes eine Einschränkung der Proliferationsgeschwindigkeit, zellulärer Vitalität und beginnender Wachstumsstop gezeigt worden (Hahn WC, 1999; Delhommeau F, 2002). Ebenso resultierte der Gentransfer nicht in einer Beeinflussung der Telomerlängen der telomerasepositiven Zelllinien, wie im TRF-Southern Blot gezeigt wurde. Unmittelbar zytotoxische Effekte der retroviralen Genübertragung von pBabe-Vektorkonstrukten auf die Neuroblastomzelllinien konnten zellmorphologisch und durch Analyse der Proliferationskinetik ausgeschlossen werden und wurden bisher in der Literatur auch nicht beschrieben.

4.1.3 Fazit: Modifikation des retroviralen Transfektionssystems

Das vorgestellte entwickelte und evaluierte Transfektionssystem ist ein Schritt vorwärts auf dem Weg zur Entwicklung einer analogen Strategie zur Telomerasehemmung am Beispiel des Neuroblastoms. Zwei zentrale Anforderungen werden an Strategien zum Gentransfer gestellt, und sind häufige Gründe für das Scheitern des experimentellen Ansatzes (Robbins PB, 1998): Erstens eine stabile Integration der Vektorgene in das Chromosom der Zielzelle, ohne dass diese mutagen wirken, und zweitens eine langfristige, konstante und effiziente Expression der Zielgene.

In unserem Ansatz konnte erreicht werden, dass Plasmidsequenzen des pBabe-Vektors stabil in das Genom der Neuroblastomzielzellen integriert worden sind. Allerdings ließ sich eine Expression von WT-hTERT und DN-hTERT nicht konstant und reproduzierbar induzieren, sodass sich das vorliegende Transfektionssystem auf Basis des pBabe-Puro-Vektors nicht zur Telomeraseinhibition an den Neuroblastomzelllinien SKNSH, NGP und CHLA-90 eignet. Mögliche Ursachen liegen - wie erläutert - in der zufälligen Integration der ektopen Gene in beliebige Abschnitte der Chromosomen, in einem ineffizienten MoMLV-Promotorsystem oder einer

intrazellulären Modifikation des 5`-LTR durch Methylierung oder Silencing-Gensequenzen begründet.

In meinem folgendenden Abschnitt möchte ich deshalb kurz Möglichkeiten zur Modifikation des Vektorsystems aufzeigen.

Ein zentraler Ansatzpunkt ist der 5`-LTR-Promotor aus dem MoMLV, welcher die Expression unserer Zielgene WT-hTERT/DN-hTERT steuert (Morgenstern JP, 1990). Verschiedene Modifikationen des MoMLV-Promotor/Enhancer tragen dazu bei, diesen weniger anfällig gegenüber den obig beschriebenen supprimierenden Gensequenzen zu machen:

- 1) Tsukiyama T et al. demonstrierten, dass Punktmutationen innerhalb der Consensus-Bindestelle für das embryonale LTR-Binding Protein ausreichen, um eine Bindung dieses supprimierenden Faktors zu verhindern (Tsukiyama T, 1992).
- 2) Eine effektive Transkription konnte ebenfalls erreicht werden durch Substitution der PBS-Region des MoMLV-Virus durch die Primer Binding Site (PBS) eines alternativen Vektors wie z.B. des dl587rev-Vektors, welches eine Bindung des Repressor Binding-Proteins an die overlap-region der Repressor Binding Site (RBS) verhinderte (Kempler G, 1993; Petersen R, 1991). Eine Transkriptionshemmung von LTR abhängigen WT-hTERT/DN-hTERT-Gensequenzen durch Effekte der RBS ist in unserem System jedoch eher unwahrscheinlich, da wir eine erfolgreiche SV40 abhängige Transkription nachweisen konnten, obwohl dieser Promotor ebenfalls unter der Kontrolle supprimierender Effekte der RBS steht (Petersen R, 1991).
- 3) Durch Entfernen der negativen Kontrollregion (NCR) des LTR konnte die Bindung des YY-1-Proteins mit Downregulation des LTR ausgeschaltet werden (Flanagan JR, 1992).

Sollten Methylierung ursächlich für die von uns beobachtete, fehlende Genexpression von WT-hTERT/DN-hTERT sein, so ist die Einklonierung von Hypomethylierungssignalen wie z.B. SP1-Gensequenzen oder Fragmente des Thy1-

Gens in den Vektor als effektive Strategie beschrieben worden (Challita PM, 1996; Robbins PB, 1997; Svoboda J, 2000). Alternativ führte auch eine Verkürzung des 5'-LTR mit gleichzeitiger Deletion supprimierender Sequenzen und transkriptionsregulierender CpG-Islands zu einer verbesserten Expressionsrate (Osborne CS, 1999). Ohne genetische Modifikationen des Promotors läßt sich die Expressionsrate auch durch Zufuhr von exogenen Demethylierungssubstanzen wie 5-Azacytidin erhöhen (Escher G, 2004).

Wir haben bei unseren Transfektionsexperimenten beobachtet, dass nach Integration des retroviralen Vektorkonstrukts das Resistenzgen vermittelt des SV40-Promotors erfolgreich exprimiert wird, die dem MoMLV-LTR nachgeschalteten Gensequenzen jedoch nur teilweise. Um eventuelle positionsabhängige Effekte der chromosomalen Integration zu vermeiden, eignen sich sog „Locus control regions“, welche die Anfälligkeit gerade von MoMLV-Promotoren für Silencing nach Einbau in das Zielgenom beseitigen können (Robbins PB, 2000).

Da insbesondere undifferenzierte Zellen als sog. „non-permissive cells“ für klassische MoMLV-Vektoren gelten, wäre es möglich, dass alternative Vektoren mit anderen Promotorsystemen eine stabile Integration und erfolgreiche Expression der Gene für WT-hTERT und DN-hTERT in den undifferenzierten, embryonalen Tumorzelllinien SKNSH, NGP und CHLA-90 erzielen. So sind die rekombinanten Vektoren MESV und PCMV Mutanten des MoMLV-Vektors mit modifizierten Promotoren, welche eine effektive Transkription der Zielgene auch in undifferenzierten Zellen (Kitamura T, 2003) gewährleisten. Dadurch eignen sie sich also speziell für unser System, welches an undifferenzierten, embryonalen Tumorzelllinien zur Anwendung kommen soll.

Da der Expressionsgrad des DN-hTERT-Transgenes die Kinetik, die inhibitorische Stärke und damit das Ausmaß an zellulären und molekularen Folgereaktionen bestimmt (Guo C, 2001), ist das methodische Design aus einem effektiven Vektorpromotorsystem in einem adäquaten Zellsystem von zentraler Bedeutung. Um vergleichbare Reaktionsbedingungen in verschiedenen Zelllinien zu gewährleisten, bietet sich demzufolge ein Transfektionssystem an, welches das Gen für die dominant-negative Mutante unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors stellt und damit eine direkte Steuerung der Expressionsrate ermöglicht (Zhang X, 1999).

Bei Ansätzen zur Modifikation des von Morgenstern und Land im Jahre 1990 entwickelten Systems zum retroviralen Gentransfer wäre darüber hinaus eine Klonierung von EGFP-Sequenzen in das Plasmid an das „Gene of interest“ sinnvoll. Bei Transfektion des pBabe-Vektors konnten wir nur indirekt mittels Cotransfektion eines pEGFP-Plasmids Aussagen bzgl. der Transfektionseffizienz treffen und zur Integrations- und Transkriptionskontrolle waren Sequenzierungen und RT-PCRs nötig. Vergleichbare Transfektionsprotokolle verwendeten das Fluoreszenzgen GFP, welches - getrennt durch Internal Ribosom Entry Sites (IRES) - an die Gensequenzen für WT-hTERT/DN-hTERT gekoppelt ist, und unmittelbare Rückschlüsse auf die Transfektionseffizienz vermittelt, eine einfache Selektionierung der Zielzellen ermöglicht und die Expression des Zielgenes unter kontinuierliche visuelle Kontrolle stellt (Delhommeau F, 2002).

In unserer Arbeitsgruppe ist als Alternative zu dem pBabe-Puro-Vektorkonstrukt ein S11-Vektor zum Einsatz gekommen. Das Insert WT-hTERT/DN-hTERT steht in diesem Vektor unter Kontrolle eines PCMV-LTR-Promotors. Die Kopplung an EGFP ermöglicht hierbei eine einfache Transfektionskontrolle. Mit dem S11-Vektor führte der retrovirale Gentransfer nach analogem Protokoll zu einer stabilen Integration und auch erfolgreichen Expression von WT-hTERT und DN-hTERT in den Neuroblastomzelllinien SKNSH, NGP und CHLA-90. Die typischen Folgereaktionen einer Telomerasehemmung konnten über diesen methodischen Ansatz induziert werden. Dies zeigt, dass das methodische Prinzip vorliegender Arbeit erfolgreich anzuwenden ist. Allerdings war in vorliegendem Konzept der pBabe-Puro-Vektor ungeeignet, um eine Expression der Zielgene in den Neuroblastomzelllinien hervorzurufen.

4.2 Telomeraseinhibition und Neuroblastom

Einen bedeutenden Fortschritt für eine zukünftige, klinische Einführung der Telomerasehemmung am Beispiel des Neuroblastoms liefern Zellkulturmodelle ähnlich dem von uns evaluierten, welche eine Telomeraseinhibition mittels retroviralem Gentransfer einer dominant-negativen Mutante von hTERT ermöglichen. Durch eine

Reihe von tumorspezifischen Charakteristika erweist sich gerade das Neuroblastom als geeignet für eine telomerasebasierte, antiproliferative Tumorthherapie.

1. Trotz verbesserter konventioneller Behandlungsmaßnahmen gehört das Neuroblastom nach wie vor zu den kindlichen Tumoren mit der höchsten Letalität und ist ausgesprochen schwierig zu therapieren. Speziell die fortgeschrittenen Stadien mit signifikant schlechterer Prognose, welche einer aggressiven Therapie bedürfen, gegen herkömmliche Therapiestrategien jedoch häufig resistent sind, besitzen eine hohe Telomeraseaktivität (Myers NA, 2002; Poremba C, 2002). In der Kombination mit konventioneller Therapie und innovativen Ansätzen wie Immuntherapie, Antiangiogenese oder Differenzierungsinduktion könnte die Telomeraseinhibition demzufolge als adjuvante Therapieoption von Bedeutung gewinnen, um die Heilungschancen des kindlichen Tumors zu verbessern.
2. Die molekularen Charakteristika des Neuroblastom lassen eine gute Wirkung einer antiproliferativen Telomerasehemmung erwarten. So sind Deletionen oder Mutationen des Tumorsuppressorgenes p53, welche neben selteneren p53-unabhängigen Wegen (Hahn WC, 1999) die zentrale Antwort auf eine Telomerdysfunktion vermittelt, relativ selten beim Neuroblastom (Imamura J, 1993; Vogan ; 1993; Komuro H, 1993). Die intakte DNA-Schadenskaskade läßt ein rasches und effektives Ansprechen auf eine Telomerverkürzung erhoffen.

Um der genetischen Heterogenität des embryonalen Tumors gerecht zu werden, integriert unser Transfektionssystem drei Neuroblastomzelllinien mit unterschiedlichen molekularen Profilen, Chromosomenlängen und Telomeraseexpressionsmustern.

Die Charakterisierung der Zelllinien vor dem Gentransfer identifizierte die SKNSH- und NGP-Linien als telomerasepositiv mit kurzen Telomerlängen im Bereich von 4 kb und 6 kb. Die Auswahl dieser telomerasepositiven Zelllinien erlaubt es, die Wirkungen des Gentransfers von DN-hTERT in Abhängigkeit zur initialen Telomerlänge zu interpretieren.

So zeigten analoge Transfektionssysteme, dass bei Hemmung der Telomerase mittels einer dominant-negativen Mutante zuerst Zelllinien mit kurzen Telomerlängen in das Stadium der Seneszenz mit Wachstumsstopp und nachfolgendem Zelltod eintreten, wohingegen Zelllinien mit längeren Telomersequenzen noch über einen begrenzten Zeitraum hinweg proliferieren können (Hahn WC, 1999; Zhang X, 1999; Colgin LM, 2000; Yi X, 2000; Guo C, 2000). Der Beginn des zellulären Arrests ist von der initialen Telomerlänge abhängig und tritt bei Zelllinien mit kurzen Telomeren (ca. 5 kb) im Laufe von 50 Zellteilungen auf, wohingegen Zellen mit längeren Telomeren (ca. 7 kb) bis zu 70 Zellteilungen durchlaufen können, ehe sie ihr Wachstum einstellen. Ein mathematisches Modell zur Vorhersage der Effektivität hemmender Strategien hat dementsprechend die Telomerlängen, die heterogene Verteilung innerhalb des Tumorumfanges, die Wachstumsdynamik und die anteilmäßige Fraktion proliferierender Zellen zu berücksichtigen (Sidorov A, 2002).

Nach erfolgreichem retroviralem Gentransfer konnten wir - im Gegensatz zu anderen Transfektionssystemen (Hahn WC, 1999; Zhang X, 1999) - weder Auswirkungen des Gentransfers auf die Telomerlängen der telomerasepositiven Zelllinien, noch ein vermindertes Wachstumspotential nach Transfektion von pBabe-DN-hTERT feststellen. Dies läßt sich auf die fehlende Expression von ektopem DN-hTERT in unserem methodischen Ansatz zurückführen. Ebenso wie in analogen Transfektionsansätzen (Hahn WC, 1999) beobachteten wir jedoch auch keine unmittelbaren zytotoxischen Einflüsse des Gentransfers.

Zum Monitoring der spezifischen Wirkung von DN-hTERT integrierten wir eine telomerasenegative CHLA-90-Zelllinie mit langen Telomersequenzen (14 kb) in unser Modell. Diese stabilisiert ihre Chromosomenenden unabhängig von der Telomerase über den sogenannten ALT-Mechanismus, welcher homologe Rekombination und Fusionen beinhaltet (Henson JD, 2001; Scheel C, 2001). In verschiedenen experimentellen Studien wurde gezeigt, dass diese telomerasenegativen Zelllinien resistent gegenüber einer Telomerasehemmung sind (Hahn WC, 1999; Colgin LM, 2000; Guo C, 2000). Dementsprechend konnten wir bei stabiler Expression von DN-hTERT in transfizierten CHLA-90-Zellen während 1-monatiger Kultivierung keine proliferationshemmenden Auswirkungen beobachten. Zellmorphologisch zeigten sich

während der Kultivierung keine Hinweiszeichen für das Stadium der Seneszenz, welches bei effektiver Telomeraseinhibition telomerasepositiver Zelllinien beobachtet werden kann (Hahn WC, 1999). Die Zellmorphologie im Stadium der Seneszenz oder Krise ist hierbei gekennzeichnet durch große, flache oder abgerundete Zellen mit phänotypischen Merkmalen wie Chromatinkondensation (Zhang X, 1999) und einem granulären Zytoplasma (Delhommeau F, 2002).

4.3 Ausblick: Klinische Anwendbarkeit der Antitelomerasetherapie

4.3.1 Nebenwirkungen einer Telomeraseinhibition

Telomerasehemmer sind durch ihre spezifische Wirkungsweise eine innovative therapeutische Alternative gegenüber konventionellen, nebenwirkungsreichen Zytostatika. So konnten wir in unserem Zellkulturmodell *in vitro* keine Auswirkungen von erfolgreich exprimiertem DN-hTERT auf telomerasenegative Zelllinien (CHLA-90) beobachten, was die spezifische Wirkungsweise demonstriert und den Beobachtungen zahlreicher analoger Transfektionssysteme entspricht (Hahn WC 1999; Zhang X, 1999). Trotzdem befürchtete, potentielle Nebenwirkungen einer Telomerasehemmung auf normale Zellen lassen sich vom Expressionsmuster der Telomerase in menschlichen Geweben ableiten. Das Enzym wird nicht nur in mehr als 80 % aller malignen Tumoren exprimiert, sondern erscheint auch in normalen menschlichen Zellen wie stark proliferierenden Zellen, Stammzellen, Blutzellen und Keimzellen (Shay JW, 1996), sodass unter Telomerasehemmung toxische Effekte auf diese Gewebe nicht auszuschließen sind. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass normale, somatische Zellen in der Regel viel längere Telomeren als Tumorzellen besitzen (Shay JW, 2002), also erst verspätet von einer Antitelomerasetherapie tangiert werden. Des Weiteren wurde nach Stop der Telomerasehemmung eine Wiederherstellung der ursprünglichen Chromosomenlängen durch reversible Telomeraseaktivierung in normalen Zellen beobachtet (Holt SE, 1996).

Studien an Telomerase-Knockout-Mausmodellen veranschaulichen die essentielle Funktion der Telomerase für proliferierende und regenerierende Organsysteme (Lee

HW, 1998). Kontinuierliche Telomerasesupprimierung in mTR^{-/-} Mäusen führt zu eingeschränkter Fruchtbarkeit (Lee HW, 1998), zu hämatopoetischer und immunologischer Dysfunktion sowie zu allgemeinen degenerativen und altersassoziierten Defekten (Rudolph KL, 1999).

Erste klinische Phase I-Studien am Menschen, in welchen durch Vakzinierung mit hTERT-gepulsten dendritischen Zellen CTL-Antworten gegen telomerasepositive Tumoren induziert werden konnte, gingen nicht mit toxischen Effekten auf normale Gewebe einher (Vonderheide RH, 2004).

4.3.2 Adjuvante Kombinationstherapie

Aufgrund ihrer zeitlichen Wirkungsverzögerung bieten sich Telomeraseinhibitoren als adjuvante Therapiestrategie neben konventioneller antineoplastischer Therapie an. Nach Reduktion des Tumolvolumens mittels operativer Entfernung, Strahlen- oder Chemotherapie (de Lange T, 1999) könnte der molekulare Angriffspunkt der Telomeraseinhibition für Minimal Residual Disease, Mikrometastasen oder als Rezidivprophylaxe genutzt werden (Wright WE, 2001; Mirawa M, 2002).

Die Kombination mit einer Antitelomerasetherapie vermag außerdem die Effektivität konventioneller Therapieoptionen zu verstärken, indem Tumorzellen sensitiver auf Radiotherapie (Goytisolo FA, 2000) oder Chemotherapeutika (Kondo Y, 1998; Lee CJ, 2002) reagieren und die körpereigene immunologische Abwehr gegen entartete Zellen aktiviert wird (Herbert B, 1999; Lee KH, 2001; Boklan J, 2002).

Erfolgreich transfizierte, telomasedefiziente Neuroblastomzellen sind aus diesem Grund ein interessantes Zellkulturmodell, um in vitro das radiotherapeutische und chemotherapeutische Profil unter Telomeraseinhibition zu analysieren.

Zur Vermeidung des verspäteten Wirkungseintritts von Telomeraseinhibitoren bieten immuntherapeutische Ansätze eine interessante Alternative (Vonderheide RH, 2002; Nair SK, 2000). Durch Vakzinierung mit immunogenen hTERT-Epitopen lassen sich effektive T-Zell vermittelte Immunantworten gegen telomerasepositive Zellen mit unmittelbarer Lyse der Zielzellen induzieren (Vonderheide RH, 2002).

4.3.3 Behandlungsresistenz

Ideale Vorbedingungen für den Therapieerfolg einer Telomeraseinhibition sind eine hohe Telomeraseaktivität der Tumorzellen bei kurzen Telomeren (2-3 kb), eine hohe Proliferationsrate, niedrige c-myc Expression, Wildtyp p53-Status und die Abwesenheit eines Alternativen Mechanismus der Telomerverlängerung ALT (Sasgary S, 2001).

Vor allem letzteres Kriterium stellt ein gravierendes Problem für die Anwendung der Telomeraseinhibition dar. Ein Teil immortalisierter Zellen in vitro (40 %) und 10 % menschlicher Tumoren - insbesondere mesenchymalen Ursprungs (Reddel RR, 2001; Scheel C, 2001) - sind telomerasenegativ und bedienen sich des ALT-Mechanismus oder weiterer, bis dato nur unvollständig bekannter Telomermaintenance-Mechanismen (TMM) (Dhaene K, 2000) zur Telomerstabilisierung (Bryan TM, 1997; Henson JD, 2002; Lundblad, 2002). Da die ALT-Zellen ihre Chromosomenenden durch Rekombination und intertelomerische Kopiervorgänge (Henson JD, 2001; Scheel, 2002) auf konstanter Länge halten, sind sie unabhängig von der Telomeraseaktivität und demzufolge unempfindlich gegenüber einer Telomerasehemmung (Hahn WC, 1999). So konnten wir zeigen, dass erfolgreiche DN-hTERT-Expression in den ALT-Zelllinien CHLA-90 zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums führte.

Diese primäre Resistenz wird für eine potentielle, therapeutische Anwendung der Antitelomerasetherapie von zentraler Bedeutung werden und betrifft auch den häufigsten, soliden Tumor des Kindesalters, das Neuroblastom, welcher zum Teil aus telomerasenegativen ALT-Zellen entsteht.

Um diesen molekularen Grundlagen des embryonalen Tumors gerecht zu werden, integriert das entwickelte Transfektionsmodell deshalb sowohl die telomerasepositiven Neuroblastomzelllinien NGP und SKNSH, als auch die telomerasenegative CHLA-90-Linie, welche über alternative Mechanismen die Chromosomen stabilisiert.

Zwei Fragestellungen sind in diesem Kontext für die Transfektion der Vektorkonstrukte pBabe-WT-hTERT und pBabe-DN-hTERT in telomerasepositive und telomerasenegative Neuroblastomzellen von vordergründigem Interesse:

1. Können die telomerstabilisierenden Mechanismen Telomerase und ALT innerhalb einer Neuroblastomzelle koexistieren und welche genetischen und biologischen Konsequenzen ergeben sich aus der Einführung von WT-hTERT in die ALT-Zelllinie CHLA-90?
2. Bewirkt eine Hemmung der Telomeraseaktivität durch ektope Expression von DN-hTERT in den vormals telomerasepositiven Neuroblastomzelllinien NGP und SKNSH die Aktivierung von ALT-Mechanismen?

Insbesondere der zweite Punkt ist für die klinische Anwendung im Hinblick auf die Entwicklung von Sekundärresistenzen gegenüber einer Telomeraseinhibition von zentraler Bedeutung.

Um Primär- und Sekundärresistenzen von ALT-Zellen gegenüber einer telomerasebasierte Tumorthherapie vorzubeugen, ist die Kombination von ALT-Inhibitoren und Telomeraseinhibitoren ein möglicher Ausweg. Ein neuer, potentieller klinischer Kandidat ist Telomestatin, welcher durch Stabilisierung intramolekularer G-Quadruplexstrukturen wie der telomerischen d(TTAGGG)₄-Konfiguration beide Mechanismen verhindert (Kim MY, 2002).

Allerdings sind in vitro auch primäre und sekundäre Resistenzen endogen telomerasepositiver Zelllinien gegenüber einer Telomeraseinhibition beschrieben worden (Guo C, 2001).

Über einen bis dato ungeklärten Mechanismus führt die ektope Expression von DN-hTERT in den Prostatazelllinien DU145 nur zur partiellen Hemmung der Telomeraseaktivität, lediglich zu Verlangsamung des Zellwachstums ohne konsekutive Apoptoseinduktion und zu unvollständiger Supprimierung der Tumorigenität in vivo (Guo C, 2001). Es scheinen also Mechanismen zu existieren, welche einigen Zelllinien eine primäre Resistenz gegenüber Strategien zu Telomerasehemmung verleihen.

Im Hinblick auf die Entwicklung von Sekundärresistenzen zeigte sich, dass in verschiedenen Zellsystemen längerfristige Telomeraseinhibition mittels DN-hTERT (Zhang X, 1999; Delhommeau F, 2002; Guo C, 2001) oder hTR-Antisenseoligonukleotiden (Herbert B, 1999) durch Reaktivierung endogener Telomerase zu einer Umgehung des induzierten Wachstumsstops und der

Telomererosion führte. Mögliche Ursachen für diesen Escape-Mechanismus sind transkriptionelle Heraufregulation von hTERT, hTR, TP1 oder von anderen, bis dato unbekanntem Telomerasekomponenten (Zhang X, 1999) und transkriptionsunabhängige Faktoren. Hierzu zählen der Verlust des ektopen DN-hTERT-Gens im Rahmen der genetischen Destabilisierung durch progressive Telomererosion, des weiteren Amplifikationen des endogenen hTERT-Gens (Delhommeau F, 2002).

4.3.4 Zunahme genetischer Instabilität

Ziel der Antitelomerasetherapie ist die spezifische Verkürzung der Chromosomenenden, welche im Prozess der Tumorigenese jedoch zwei paradoxe Funktionen übernimmt: Erwünschte tumorsuppressive Auswirkungen der Telomerverkürzung zeigen sich in Wachstumsstop und Apoptose (Hahn WC, 1999; Blasco MA, 1999), wohingegen die induzierte genetische Instabilität aber auch eine Tumorprogression fördern kann (Blasco MA, 1999; Hemann MT, 2001; Rudolph KL, 1999). Antineoplastische Effekte einer Telomeraseinhibition könnten so durch die Selektion noch malignerer Tumorzellen zunichte gemacht werden.

Die erhöhte Tumorzinzidenz in mTR^{-/-}-Knockout-Mäusen (Lee KH, 2001; Blasco MA, 1999) konnte jedoch bisher an humanen Zellen nicht nachvollzogen werden (Wright WE, 2000), als Hinweis für grundlegende Unterschiede in der Telomerenbiologie muriner und humaner Zellen.

5 Zusammenfassung

Das Neuroblastom, der dritthäufigste kindliche Tumor, zeichnet sich durch eine starke, klinische Heterogenität aus, welchem auf molekularer Ebene eine Kombination verschiedener, genetischer Aberrationen zugrunde liegt. Die Telomerase spielt hierbei eine Schlüsselrolle in der Tumorbilogie des Neuroblastoms. Eine erhöhte Telomeraseaktivität findet sich insbesondere in hoch proliferierenden, malignen Tumoren und ist klinisch assoziiert mit einem höheren Tumorstadium und einer signifikant schlechteren Prognose. Im Rahmen der „Target-oriented Therapy“ bietet sich also die Telomerase als ein innovatives Zielmolekül an, um durch Telomerasehemmung in Ergänzung zu konventionellen Therapieoptionen wie Operation, Chemotherapie und Radiotherapie das Outcome des kindlichen Tumors zu verbessern.

In vorliegender Arbeit wurde aus diesem Grund ein retrovirales Transfektionssystem für Neuroblastomzelllinien entwickelt und evaluiert, mittels dessen es ermöglicht werden sollte, Auswirkungen einer Telomeraseinhibition in vitro studieren zu können.

Um die genetische Heterogenität des Neuroblastoms zu berücksichtigen, integrierten wir in das Zellkulturmodell die telomerasepositiven und –negativen Zelllinien SKNSH, NGP und CHLA-90, welche sich in ihrer Telomeraseaktivität und ihren Telomerlängen unterscheiden. Grundlage des methodischen Ansatzes bildet das pBabe-Puro-Plasmid, ein vom Moloney Mouse Leukemia Virus (MoMLV) abgeleitetes rekombinantes Vektorkonstrukt, in welches die kodierende cDNA von WT-hTERT/DNhTERT inkloniert ist. Die korrekte Sequenz des Inserts mit der Mutationsstelle konnten wir mittels Restriktionsanalysen und Gensequenzierung nachweisen.

Der methodische Ansatz wurde unter zwei Gesichtspunkten auf seine Anwendbarkeit hin evaluiert:

1) Stabile Integration der ektopen Gene

Mittels retroviralen Gentransfer haben wir in allen 3 Zelllinien eine stabile Internalisierung der ektopen Gensequenzen in das Genom der Zielzellen erreichen

können. Auch nach längerer Kultivierung blieben die transfizierten Zellen in der PCR-Analyse positiv für das Puromycinresistenzgen.

2) Erfolgreiche Expression der transfizierten Gene

Die Expression des Puromycinresistenzgens durch den SV40-Promotor wurde mittels erfolgreicher Kultivierung transfizierter Zellen in Selektionsmedium im Vergleich zu Kontrollzellen demonstriert.

Die Expression der Zielgene WT-hTERT und DN-hTERT durch den Promotor des MoMLV-5`LTR war in wiederholten Transfektionen der Neuroblastomzielzellen nur inkonstant zu induzieren.

a) In den transfizierten telomerasepositiven Zelllinien SKNSH und NGP war eine Überexpression von DN-hTERT nicht nachweisbar. Dementsprechend zeigten sich während einmonatiger Kultivierung keine Verkürzung der Telomerlängen, keine Einschränkung der Proliferation und keine morphologischen Veränderungen im Sinne der Seneszenz.

Ebensowenig ließ sich in den telomerasepositiven transfizierten Zellen eine hTERT-Expression erzielen. Auswirkungen auf Telomerlängen oder Wachstumskinetik blieben demzufolge aus.

b) Die telomerasedefiziente Zelllinie CHLA-90 exprimierte stabil das ektopye Gen DN-hTERT. Über einen Beobachtungszeitraum von einem Monat war in diesen Zellen, wie erwartet, keine Änderung des Wachstumsverhalten zu verzeichnen. Dies unterstreicht die spezifische Wirkungsweise der von uns angewandten Telomeraseinhibitionsstrategie.

Eine Reaktivierung der Telomerase durch Einführen von WT-hTERT konnten wir mit unserer Methodik in der telomerasenegativen Zelllinie nicht induzieren.

Fazit: Das von uns verwendete Konzept zur Telomerasehemmung in Neuroblastomzelllinien eignet sich aufgrund ineffizienter Expressionsraten nicht, um Auswirkungen einer Telomerasehemmung in vitro studieren zu können.

Es obliegt also weiterführenden Arbeiten, das methodische Design zwecks verlässlicher Expression zu modifizieren. Ein möglicher, zentraler Ansatzpunkt ist hier der MoMLV-

5`-LTR-Promotor, welche die Expression der Zielgene WT-hTERT/DN-hTERT reguliert.

Für die Evaluation einer klinischen Anwendbarkeit der Antitelomerasetherapie sind Zellkulturmodelle analog dem von uns entwickelten und evaluierten von herausragender Wichtigkeit. In vitro lassen sich hier zelluläre und molekulare Folgereaktionen einer Telomerdysfunktion studieren (Proliferationsstop, Apoptose, genetische Instabilität). Somit können Voraussagen über die Auswirkungen einer zukünftigen in-vivo Telomerasehemmung gemacht werden (Resistenz, verändertes Ansprechen auf Radio- oder Chemotherapie, Tumorigenität). Diese in-vitro-Systeme sind ein erster Schritt vorwärts zur klinischen Etablierung innovativer „Target-oriented“-Strategien zur Tumorthherapie.

6 Literaturverzeichnis

1. Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, DePinho RA (2000) Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 406:641-5.
2. Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L (1998) Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol.* 8:177-80.
3. Belair CD, Yeager TR, Lopez PM (1997) Telomerase activity: A biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13677-13682.
4. Bird AP, Wolff AP (1999) Methylation-induced repression – belts, braces and chromatin. *Cell* 99: 451-455.
5. Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* 350:569-573
6. Blackburn EH (2000) Telomere states and cell fates. *Nature* 408: 53-56.
7. Blackburn EH, Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120:33-53.
8. Blasco MA, Gasser SM, Lingner J (1999) Telomeres and telomerase. *Genes Dev* 13, 18:2353-9.
9. Blasco MA, Lee HW, Hande MP (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91:25-34.
10. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352.
11. Boklan J, Nanjangud G, MacKenzie KL, May C, Sadelain M, Moore MA (2002) Limited proliferation and telomere dysfunction following telomerase inhibition in immortal murine fibroblasts. *Cancer Res* 62: 2104-14.
12. Bonatz G, Klapper W, Barthe A (1998) Analysis of telomerase expression and proliferative activity in the different layers of cyclic endometrium. *Biochem Biophys Res Commun* 253:214-221.
13. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* 17:231-235.

14. Broccoli D, Young JW, de Lange T (1995) Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9082-9086.
15. Brodeur GM, Ambros PF (1997) Biological aspects of neuroblastoma screening. *Med Pediatr Oncol* 1998;31:394-400.
16. Bryan TM, Goodrich KJ, Cech TR (2000) Telomerase RNA bound by protein motifs specific to telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell* 6: 493-499.
17. Bryan TM, Marusic L, Bacchetti S, Namba M, Reddel RR (1997) The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. *Hum Mol Genet* 6:921-926.
18. Cao Y, Li H, Liu J-P (2002) TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 21: 3130-3138.
19. Carachi R (2002) Perspectives in neuroblastoma. *Ped Surg Int* 18: 299-305.
20. Ceresetto A, Giacca M (2004) Integration site selection by retroviruses. *AIDS Rev* 6: 13-21.
21. Challita PM, Skelton D, El-Khoueiry A, Yu XJ, Weinberg K, Kohn DB (1995) Multiple modifications in cis elements of the long terminal repeat of retroviral vectors lead to increased expression and decreased DNA methylation in embryonic carcinoma cell. *J Virol* 69: 748-755.
22. Chan SW, Blackburn EH (2002) New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 21: 553-56.
23. Colgin LM, Wilkinson C, Englezou A, Kilian A, Robinson MO, Reddel RR (2000) The hTERT α splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia* 2:426-432.
24. Collins K (2000) Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol* 12, 3: 378-383.
25. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11:1921-1929.
26. Counter CM, Botelho FM, Wang P (1994) Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol* 68:3410-3414.

27. Counter CM, Gupta J, Harley CB (1995) Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85:2315-2320.
28. Counter CM, Hahn WC, Wei W, Caddle SD, Beijersbergen RL, Lansdorp PM, Sedivy JM, Weinberg RA (1998) Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14723-14728.
29. Counter CM, Meyerson M, Eaton EN (1997) The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9202-9207.
30. Couture LA, Mullen CA, Morgan RA (1994) Retroviral vectors containing chimeric promoter/enhancer elements exhibit cell-type-specific gene expression. *Hum Gene Ther.* 5: 667-77.
31. de Lange T, Jacks T (1999) For better or worse? Telomerase inhibition and cancer. *Cell* 98, 3: 273-275.
32. de Lange T, Shiue L, Myers RM (1990) Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10:518-527.
33. Delhommeau F, Thierry A, Feneux D, Lauret E, Leclercq E, Courtier MH, Sainteny F, Vainchenker W, Bennaceur-Griscelli A (2002) Telomere dysfunction and telomerase reactivation in human leukemia cell lines after telomerase inhibition by the expression of a dominant-negative hTERT mutant. *Oncogene* 2: 8262-8271.
34. Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R (2000) Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch* 437:1-16.
35. Ducray C, Pommier JP, Martins L, Boussin FD, Sabatier L (1999) Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process. *Oncogene* 18:4211-4223.
36. Escher G, Hoang A, Georges S, Tchoua U, El-Osta A, Krozoweki Z, Sviridov D (2004) Demethylation using the epigenetic modifier, 5-azacytidine, increases the efficiency of transient transfection of macrophages. *J Lipid Res* 1.
37. Feng J, Funk WD, Wang SS (1995) The RNA component of human telomerase. *Science* 269:1236-1241.
38. Flanagan JR, Becker KG, Ennist DL, Gleason SL, Driggers PH, Levi BZ, Appella E, Ozato K (1992) Cloning of a negative transcription factor that binds

- to the upstream conserved region of Molone murine leukemia virus. *Mol Cell Biol* 12: 38-44.
39. Goytisolo FA, Blasco MA (2002) Many ways to telomere dysfunction: in vivo studies using mouse models. *Oncogene* 21: 584-591.
 40. Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L (1998) Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* 16:1723-1730.
 41. Greider CW (1990) Telomeres, telomerase and senescence. *Bioessays* 12:363-369
 42. Greider CW (1999) Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:90–92.
 43. Greider CW, Blackburn EH (1996) Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am* 274:92–97.
 44. Grez M, Zornig M, Nowock J, Ziegler M (1991) A single point mutation activates the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in embryonal stem cells. *J Virol.* 65, 9: 4691-4698.
 45. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97:503-514
 46. Guiducci C, Cerone MA, Bacchetti S (2001) Expression of mutant telomerase in immortal telomerase-negative human cells results in cell cycle deregulation, nuclear and chromosomal abnormalities and rapid loss of viability. *Oncogene* 6:714-25.
 47. Guo C, Geferd D, Liao R, Hamad N, Counter CM, Price DT (2001) Inhibition of telomerase is related to the life span and tumorigenicity of human prostate cancer cells. *The Journal of Urology* 16: 694-698.
 48. Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E (2000) High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 19,5: 617-623.
 49. Haas DL, Lutzko C, Logan AC, Cho GJ, Skelton D, Yu XJ, Pepper KA, Kohn DB (2003) The Moloney Murine Leukemia Virus Repressor Binding Site

- represses expression in murine and human hematopoietic stem cells. *J of Virol* 77, 1739-1750.
50. Hahn WC, Sheila AS, Brocks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Bejersbergen RL, Knoll JA, Meyerson M, Weinberg RA (1999) Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature* 3, 10: 1164-1169.
 51. Harley CB (1991) Telomere loss: Mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 256:271-282.
 52. Harley CB, Kim NW, Prowse KR (1994) Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 59: 307–315.
 53. Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC (1992) The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp. Gerontol* 27, 4: 375-382.
 54. Harms D, Schmidt D (1997) Solide Tumoren des Kindes- und Adoleszentenalters. In: Remmele W (Hrsg) *Pathologie*, Bd 4. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo: 503-510.
 55. Harrington L, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Yeung DS, Mar V, Bass MB, Robinson MO (1997) Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev* 11, 23:3109-3115.
 56. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG (1990) Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346:866-868.
 57. Hayflick L (1976) The cell biology of human aging. *N Engl J Med* 295:1302-1308.
 58. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621.
 59. Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW (2001) The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107:67-77.
 60. Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR (2002) Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 21,4:598-610.
 61. Herbert B, Pitts AE, Baker SI, Hamilton SE, Wright WE, Shay JW, Corey DR (1999) Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14276-14281.

62. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T (1996) Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 88:116-122
63. Hiyama E, Hiyama K, Katsumoto N (1996) Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol* 9:453–458
64. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T (1995) Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1:249-255
65. Holt SE, Shay JW, Wright WE (1996): Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer. *Nat Biotechnol* 14:836-9.
66. Huschtscha LI, Holliday R (1983) Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. *J Cell Sci* 63:77-99.
67. Imamura J, Bartram CR, Berthold F (1993) Mutation of the p53 gene in neuroblastoma and its relationship with N-myc amplification. *Cancer Res* 53:4053-8.
68. Ito H, Kyo S, Kanaya T (1998) Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. *Clin Cancer Res* 4:1603-1608.
69. Kempler G, Freitag B, Berwin B, Nanassy O, Barklis E (1993) Characterization of the Moloney murine leukemia virus stem cell-specific repressor binding site. *Virology* 193: 690-699.
70. Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA (1997) Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 6:2011-2019.
71. Kim MY, Vankayalapati H, Shin-Ya K, Hurley LH (2002) Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. *J Am Chem Soc* 124: 2098-2099.
72. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011-2015.
73. Kitamura T, Koshina Y, Hibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, Kunagai H (2003) Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning powerful tools in functional genomics. *Exp Hematology* 31,11: 1007-1014.

74. Kiyono A, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ (1998) Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396:84–88.
75. Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM (1998) Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nat Genet* 19:182-186.
76. Komuro H, Hayashi Y, Kawamura M (1993) Mutations of the p53 gene are involved in Ewing's sarcomas but not in neuroblastomas. *Cancer Res* 53:5284-8.
77. Kondo Y, Kondo S, Tanaka Y, Haqqi T, Barna BP, Cowell JK (1998) Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* 16, 17: 2243-8.
78. Kyo S, Inoue M (2000) Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy? *Oncogene* 21, 4: 688.697.
79. Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Tanaka M, Inoue M (1999) Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int J Cancer* 80, 1: 60-63.
80. Laker C, Meyer J, Schopen A, Friel J, Herberlein C, Ostertag W, Stocking C (1998) Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. *J Virol* 72, 1: 339-348.
81. Lee CJ, Suh EJ, Kang HT, Im JS, Um SJ, Park JS, Hwang ES (2002) Induction of senescence-like state and suppression of telomerase activity through inhibition of HPV E6/E7 gene expression in cells immortalized by HPV16 DNA. *Exp Cell Res* 277,2: 173-82.
82. Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ (1998) Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392:569-574.
83. Lee KH, Rudolph KL, Ju YJ, Greenberg RA, Cannizzaro L, Chin L, Weiler SR, DePinho RA (2001) Telomere dysfunction alters the chemotherapeutic profile of transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 3381-3386.
84. Li H, Lee TH, Avraham H (2002) A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer. *J Biol Chem* 277, 23:20965-20973.

85. Li H, Zhao L, Yang Z, Funder JW, Liu JP (1998) Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 273, 50:33436-42.
86. Lingner J, Cech TR (1995) Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 20:10712-7.
87. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A (1997) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276:561-567.
88. Liu Y, Snow BE, Hande MP, Yeung D, Erdmann NJ, Wakeham A, Itie A, Siderovski DP, Lansdorp PM, Robinson MO, Harrington L (2000) The telomerase reverse transcriptase is limiting and necessary for telomerase function in vivo. *Curr Biol* 10, 22: 1459-1462.
89. Lundblad V, Szostak JW (1989) A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57:633-643.
90. Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP (1997) Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88:657-666.
91. Maris JM, Matthay KK (1999) Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 17:2264-2279.
92. Martin-Rivera L, Herrera E, Albar JP (1998) Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10471-10476.
93. McClintock B (1941) The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26:234-282.
94. McElligott R, Wellinger RJ (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J* 16:3705-3714.
95. Meyerson M (2000) Role of telomerase in normal and cancer cells. *Journ of Clin Onc* 18: 2626-2634.
96. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN (1997) hEST 2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is upregulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:785-795.

97. Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7049-7053.
98. Misawa M, Tauchi T, Sashida G, Nakajima A, Abe K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K (2002) Inhibition of human telomerase enhances the effect of chemotherapeutic agents in lung cancer cells. *Int Journal of Oncol* 21: 1087-1092.
99. Morgenstern JP, Land H (1990) Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acid Research* 18, 12: 3587-3596.
100. Morin GB (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59:521-529.
101. Muller HJ (1938) *Collecting Net* 13: 181-198.
102. Murakami J, Nagai N, Ohama K, Tabara H, Ide T (1997) Telomerase activity in ovarian tumors. *Cancer* 80,6: 1085-1092.
103. Myers NA (2002) Neuroblastoma. *Pediatr. Surg Int* 18: 288.
104. Nair SK, Heiser A, Boczkowski D, Majundar A, Naoe M, Lebkowski JS, Vieweg J, Gilboa E (2000) Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat. Med.* 6,9: 1011-1017.
105. Nakajima A, Tauchi T, Sashida G, Sumi M, Aloe K, Yamamoto K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K (2003) Telomerase inhibition enhances apoptosis in human acute leukemia cells: possibility of antitelomerase therapy. *Leukemia* 17: 560-567.
106. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, et al (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277:955-959.
107. Ng HH, Bird A (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 158-163.
108. Ohki R, Tsurimoto T, Ishikawa F (2001) In vitro reconstitution of the end replication problem. *Mol Cell Biol* 21: 5753-5766.

109. Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41:181-190.
110. Osborne CS, Pasceri P, Singal R, Sukonnik T, Ginder GD, Ellis J (1999) Amelioration of retroviral vector silencing in locul control region β -globin-transgenic mice and transduced F9 embryonic cells. *J Virol* 65: 5490-5496.
111. Pawliuk R, Eaves CJ, Humphries RK (1997) Sustained high-level reconstitution of the hematopoietic system by preselected hematopoietic cells expressing a transduced cell-surface antigen. *Hum Gene Ther* 8, 13: 1595-1604.
112. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8392-8396.
113. Petersen R, Kempler G, Barklis E (1991) A stem cell-specific silencer in the primer-binding site of a retrovirus *Mol Cell Biol* 11,3: 1214-1221.
114. Poremba C, Heine B, Diallo R, Heinecke A, Wai D, Schaefer KL, Braun Y, Schuck A, Lanvers C, Bankfalvi A, Kneif S, Torhorst J, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Sauter G, Stein H, Fogt F, Boecker W (2002) Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR. *J Pathol* 2: 181-189.
115. Poremba C, Scheel C, Hero B, Christiansen H, Schaefer KL, Nakayama J, Berthold F, Juergens H, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B (2000) Telomerase activity and telomerase subunits gene expression patterns in neuroblastoma: a molecular and immunohistochemical study establishing prognostic tools for fresh-frozen and paraffin-embedded tissues. *J Clin Oncol* 18:2582-2592.
116. Razin A (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing - a three- way connection. *EMBO J* 17: 4905-4908.
117. Reddel RR, Bryan TM, Colgin LM, Perrem KT, Yeager TR (2001) Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat Res* 155:194-200.
118. Reynolds CP, Choi L, Kim NW (2000) Telomerase activity by TRAP assay and Telomerase RNA (hTR) expression are predicive of outcome in neuroblastoma. *Med Ped Onc* 35: 643-650.

119. Robbins PB, Shelton DC, Yu X, Halene S, Leonard EH, Kohn DB (1998) Consistent, persistent expression from modified retroviral vectors in murine hematopoietic stem cells. *PNAS* 95: 10182-10187.
120. Rudolph KL, Chang S, Lee HW (1999) Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96:701-712.
121. Sasgary S, Wieser M, Cerni C (2001) Targeted inhibition of telomerase in human cancer: Will it be a double-edged sword? *Onkologie* 24:22-6.
122. Scheel C, Schaefer KL, Jauch A, Keller M, Wai D, Brinkschmidt C, van Valen F, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B, Poremba C (2001) Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas. *Oncogene* 20:3835-3844.
123. Schneider-Stock R, Epplen JT, Walter H (1999) Telomeric lengths and telomerase activity in liposarcomas. *Mol Carcinog* 24:144-151.
124. Shay JW, Bacchetti S (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33:787-791.
125. Shay JW, Wright WE (1996) The reactivation of telomerase activity in cancer progression. *Trends Genet* 2,4 : 129-130.
126. Shay JW, Wright WE (2002) Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 4: 257-265.
127. Sidorov A, Hirsch KS, Dimitrov DS (2002) Cancer cell dynamics in presence of telomerase inhibitors. *J Theor Biol* 219: 225-233.
128. Singer MS, Gottschling DE (1994) TLC1: Template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266:404-409.
129. Soder AI, Hoare SF, Muir S, Going JJ, Parkinson EK, Keith WN (1997) Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene* 14, 9: 1013-1021.
130. Spenger A, Ernst W, Condreay JP, Kost TA, Grabherr R (2004) Influence of Promoter choice and trichostatin A treatment on expression of baculovirus delivered genes in mammalian cells. *Protein Expr Purif* 38: 17-23
131. Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung (2004) www.destatis.de/presse.htm.

132. Stewart CL, Stuhlmann H, Jahner D, Jaenisch R (1982) De novo methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells. *PNAS* 79: 4098-4102.
133. Streutker CJ, Thorner P, Fabricius N, Weitzman S, Zielenska M (2001) Telomerase activity as a prognostic factor in neuroblastomas *Pediatr Dev Pathol* 4(1):62-7.
134. Sugino T, Yoshida K, Bolodeoku J, Tahara H, Buley I, Manek S, Wells C, Goodison S, Ide T, Suzuki T, Tahara E, Tarin D (1996) Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates. *Int J Cancer.*: 69, 4: 301-306.
135. Svoboda J, Hejnar J, Geryk J, Dlleder D, Vemerova Z (2000) Retroviruses in foreign species and the problem of provirus selencing. *Gene* 261: 181-188.
136. Swindle CS, Klug CA (2002) Mechanisms that regulate silencing of gene expression from retroviral vectors. *J Hematother Stem Cell Res* 11: 449-56.
137. Taylor RS, Ramirez RD, Ogoshi M, Chaffins M, Piatyszek MA, Shay JW (1996) Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions. *J Invest Dermatol* 106,4:759-765.
138. Tsukiyama T, Niwa O (1992) Isolation of high affinity cellular targets of the embryonal LTR binding protein, an undifferentiated embryonal carcinoma cell-specific repressor of Moloney leukemia virus. *Nucleic Acids Res* 20,7: 1477-1482.
139. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Girudice LC, Hoffman AR (1998) Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 58, 18: 4168-4172.
140. Van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92:401-413.
141. Vaziri H, Benchimol S (1998) Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8:279-282.

142. Vogan K, Bernstein M, Brisson L (1993) Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Res* 53:5269-73.
143. Vonderheide RH (2002) Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Oncogene* 21, 4: 674-679.
144. Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen D, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM (2004) Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T-lymphocytes. *Clin Cancer Res* 10: 828-839.
145. Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* 17, 4: 498-502.
146. Weirich-Schwaiger H, Weirich HG, Gruber B, Schweiger M, Hirsch-Kauffmann M (1994) Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes. *Mutat Res* 316, 1:37-48.
147. Wotton D, Shore D (1997) A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 11, 6: 748-760.
148. Wright WE, Pereira SO, Shay JW (1989) Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 9:3088-3092.
149. Wright WE, Shay JW (1992) The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol* 27,4: 383-389.
150. Wright WE, Shay JW (2001) Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of countin. *Curr Opin Genet Dev* 11,1: 98-103.
151. Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE (1997) Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* 11:2801-2809.

152. Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, Dalla-Favera R (1999) Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* 21,2: 220-224.
153. Xu D, Wang Q, Gruber A, Bjorkholm M, Chen Z, Zaid A, Selivanova G, Peterson C, Wiman KG, Pisa P (2000) Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 19, 45:5123-33.
154. Yang WM, Inouye C, Zeng Y, Berass D, Seto E (1996) Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *PNAS* 93: 12845-12850.
155. Yi X, White DM, Aisner DL, Baur JA, Wright WE, Shay JW (2000) An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity. *Neoplasia* 2, 5:433-40.
156. Yu GL, Bradley JD, Attardi LD (1990) In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNA. *Nature* 344:126-132.
157. Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson Mo (1999) Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev* 13, 18: 2388-2399.
158. Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH (1999) Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3723-3728.

7 Abkürzungen

ALF:	Automated Laser Fluorescence Sequencer
ALT:	Alternative Lengthening of Telomers, Telomerverlängerung durch Fusion und Rekombination
cDNA:	copy-DNA, von einer RNA-Matrize synthetisierte DNA
Env:	Envelope, Hüllprotein in der äußeren Lipidschicht, welches den viralen Tropismus definiert
GADD:	Growth arrest and DNA-Damage, Gene, welche als Antwort auf genetische Schäden exprimiert werden und Folgereaktionen wie Zellzyklusarrest und Apoptose einleiten
Gag:	Group specific antigen, virale Proteine der Hülle und der Matrix
hTERT:	Human telomerase reverse transkriptase
hTR:	Human telomerase RNA
INSS:	International Neuroblastoma Staging System
LOH:	Loss of heterozygosity
LTR:	Long terminal repeat, retroviraler 3`-/5`-Promotor
MoMLV:	Moloney Mouse Leukemia Virus
Ori:	Origin of replication, bakterieller Replikationsstart im Plasmidvektor
PBS:	Primer Binding Site
PCR:	Polymerasekettenreaktion, Methode zur exponentiellen Amplifikation von Genfragmenten
Pol:	Polymerase, Funktion der Reversen Transkriptase, RNaseH und Integrase
RBS:	Repressor Binding Site
RT-PCR:	Reverse Transkriptase PCR aus zuvor synthetisierter cDNA
SV40:	Simian Virus 40
TA:	Telomeraseaktivität
TMM:	Telomermaintenance Mechanism (TA und ALT)
TP1:	Telomeraseassoziiertes Protein 1
TRF:	Telomer Restriction Fragment, telomerische und subtelomerische Sequenzen, die bei enzymatischer Hydrolyse genomischer DNA mit den Restriktionsendonukleasen HinfI und RsaI entstehen

Lebenslauf

Name: Marion Wobser

Geburtsdatum: 08. April 1979

Geburtsort: Bonn

- 1985-89: Grundschule St. Ingbert
- 1989-95: Leibniz-Gymnasium St. Ingbert
- 1995-1998: Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium Münster
-
- 1998: Abitur
-
- 1998-2003: Studium der Humanmedizin
 an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
-
- 09/2000: Ärztliche Vorprüfung
- 08/2001: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 09/2003: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
-
- 2003-2004: Studium der Humanmedizin
 an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
-
- Praktisches Jahr: Dermatologie, Universitäts-Hautklinik Freiburg
 Chirurgie, Stadtspital Waid Zürich
 Innere Medizin, Universitätsspital Zürich
-
- 11/2004: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 Ärztliche Approbation
-
- seit 01/2005: Assistenzärztin an der Universitäts-Hautklinik Würzburg

Publikationen

Wobser M, Keikavoussi P, Kunzmann V, Weininger M, Andersen MH, Becker JC: Complete remission of liver metastasis of pancreatic cancer under vaccination with a HLA-A2 restricted survivin peptide. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2005.

Wobser M, Siedel C, Schrama D, Bröcker EB, Becker JC, Vetter-Kauczok CS: Expression pattern of the lymphatic and vascular markers VEGFR-3 and CD31 does not predict regional lymph node metastasis in cutaneous melanoma. *Archives of Dermatological Research*, 2006.

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. med. Christopher Poremba, Institut für Pathologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, für die Bereitstellung des Themas und die engagierte Betreuung bei Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit bedanken. Außerdem danke ich Prof. Dr. med. Andreas Schuck, Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universität Münster, dass er freundlicherweise die zweite Berichterstattung dieser Arbeit übernommen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Priv.-Doz. Dr. Karl-Ludwig Schäfer für die thematische Einarbeitung in die Materie, die kontinuierliche Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Yvonne Braun für die engagierte, gemeinsame Arbeit bei vielen Experimenten, für die Überlassung der Ergebnisse zur Evaluation des Transfektionssystems und insbesondere für ihre ausdauernde Hilfsbereitschaft bei großen und kleinen Problemen.

Weiter bedanke ich mich bei Petra Fischer, Anja Sommer und Frauke Schmidt für die freundliche Unterstützung bei allen Experimenten und die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden.

Meiner Familie bin ich ausgesprochen dankbar für ihre aufmunternde Stütze, die sie mir bei Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit gegeben hat, und die vielen, bereichernden Diskussionen.

Anhang

A) Genehmigungsbescheid für gentechnische Arbeiten



Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen

Landesumweltamt NRW • Postfach 10 23 63 • 45023 Essen

Gegen Empfangsbekennnis

Universitätsklinikum Münster
- Der Kaufmännische Direktor -
Domagkstraße 5

D-48149 Münster

Wallneyer Straße 6
45133 Essen
Telefon (02 01) 79 95-0
Telefax (02 01) 79 95-14 46/14 47

Bankverbindung:
Oberfinanzkasse Düsseldorf
Konto-Nr. 4 059 911
bei der Westdeutschen Landesbank
Girozentrale Düsseldorf (BLZ 200 500 00)

20.11.01

Mein Zeichen
64-M-1.22/01

Datum
12.11.2001

BESCHIED

Auf die vom Universitätsklinikum Münster im Wege der Auftragsverwaltung vorgelegte Anmeldung vom 19.10.2001 ergeht nach § 12 Abs. 8 und § 12 Abs. 10 Gentechnikgesetz (GenTG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 16. Dezember 1993 (BGBl. I S. 2066) nach Durchführung des nach dem GenTG vorgeschriebenen Verfahrens folgende Entscheidung:

I.

1.
Der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Schloßplatz 2 in 48149 Münster, wird unbeschadet der Rechte Dritter aufgrund § 9 Abs. 1, § 12 Abs. 1 und 3 in Verbindung mit § 11 Abs. 2 GenTG sowie der aufgrund von § 30 Abs. 2 GenTG erlassenen Rechtsverordnungen die Anmeldung weiterer gentechnischer Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 zu Forschungszwecken in der bestehenden gentechnischen Anlage [Genehmigungsbescheid vom 20.05.1999, Az. 521-M-1.17/98] der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde - Pädiatrische Hämatologie / Onkologie im Erdgeschoss des Knochenmarktransplantationszentrums (KMTZ), Domagkstraße 9a in 48129 Münster, bestätigt.

Die Anmeldung umfasst die gentechnischen Arbeiten mit dem Thema:
" Telomerase: Targetmolekül in der Krebstherapie klein-blau-rundzelliger Tumoren des Kindesalters "

2.
Die Regelungen aus den Bescheiden des Landesumweltamtes Nordrhein-Westfalen vom 20.05.1999, Az. 521-M-1.17/98, und vom 02.07.2001, Az. 64-M-1.1/01 gelten fort, sofern sie nicht durch die Regelungen dieses Bescheides - insbesondere die in Abschnitt III aufgeführten Nebenbestimmungen - geändert, ergänzt oder ersetzt werden.

Weitere Dienstgebäude:

Düsseldorf
Auf dem Deisp 25
Telefon (02 11) 15 90-0
Telefax (02 11) 15 90-21 76

Düsseldorf
Metzmannstr. 16
Telefon (02 11) 98 30 86-0
Telefax (02 11) 98 30 86-25 00

Essen
Huyssenallee 105
Telefon (02 01) 1 05 79-0
Telefax (02 01) 1 05 70-18 57

Essen
Zweigertstr. 14
Telefon (02 01) 3 72 58-0
Telefax (02 01) 3 72 58-19 10

Recklinghausen
Leibnizstr. 10
Telefon (02 36 1) 3 75 95-0
Telefax (02 36 1) 3 75 95-28 28

Neu: Alle Dienstgebäude des LUA sind nun unter der zentralen Rufnummer (02 01) 79 95-0 zu erreichen

Mit den gentechnischen Arbeiten i. S. d. § 3 GenTG kann unter Einhaltung aller Nebenbestimmungen ab sofort begonnen werden.

Die als Anlage 1 beigefügte Stellungnahme des Landesumweltamtes NRW ist zu beachten.

3.

Dieser Bescheid ergeht gemäß § 24 Abs. 1 GenTG i. V. m. § 8 Abs. 1 Nr. 2 Gebührengesetz für das Land Nordrhein-Westfalen gebührenfrei.

II:

Dieser Bescheid schließt andere die gentechnische Anlage betreffende behördliche Entscheidungen nicht ein (insbesondere öffentlich-rechtliche Genehmigungen, Zulassungen, Verleihungen, Erlaubnisse und Bewilligungen, behördliche Entscheidungen aufgrund atomrechtlicher Vorschriften).

III. Nebenbestimmungen

1. Durchführung der Arbeiten

Die Durchführung der angemeldeten weiteren gentechnischen Arbeiten muss gemäß den mit diesem Bescheid verbundenen Unterlagen erfolgen, nämlich:

- | | |
|----------------------------------|---------|
| a) Anmeldung vom 19.10.2001 | 1 Blatt |
| b) Formblattsatz: | |
| Formblatt A | 4 Blatt |
| Formblatt GA | 2 Blatt |
| Formblatt GE (humane Zelllinien) | 3 Blatt |
| Formblatt GO | 5 Blatt |
| Formblatt GS I eco (Omega E) | 3 Blatt |
| Formblatt GS II amphi (PG13) | 5 Blatt |

2. Gentechnische Arbeiten

Dieser Bescheid umfasst nur weitere gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 2, so weit sie in der Stellungnahme des Landesumweltamtes Nordrhein-Westfalen (Anlage 1) bewertet wurden. Andere Arbeiten, insbesondere unter Verwendung von anderen Spenderorganismen der Telomerase-cDNA als Säugern oder anderen menschlichen cDNAs als denen der hTERT und ihrer Mutanten, unter Verwendung von anderen retroviralen Vektoren als denen auf der Grundlage des pBAGE Puro oder anderen amphotrop vergleichbaren Verpackungszellen als PG13 oder unter Verwendung von anderen Empfängerorganismen als menschlichen Zellen der Risikogruppe 1, dürfen nur nach einem erneuten Anmeldeverfahren durchgeführt werden.

IV. Begründung

Das Universitätsklinikum Münster hat im Wege der Auftragsverwaltung mit Schreiben vom 19.10.2001, eingegangen beim Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen am 23.10.2001, weitere gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 zu Forschungszwecken in einer genehmigten gentechnischen Anlage angemeldet. Die durch das Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen genehmigte gentechnische Anlage (Bescheid vom 20.05.1999, Az. 521-M-1.17/98) umfasst den Raum 0.26 im Erdgeschoss des Knochenmarktransplantationszentrums (KMTZ), Domagkstraße 9a in 48129 Münster.

Zusätzlich zu den bisher in der gentechnischen Anlage durchgeführten Arbeiten sollen nunmehr gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 zu Forschungszwecken zu dem Thema "Telomerase: Targetmolekül in der Krebstherapie klein-blau-rundzelliger Tumoren des Kindesalters" unter der **Projektleiterschaft** von Herrn Dr. rer.nat. Karl-Ludwig Schäfer und Herrn Dr. rer.nat. Marc Hoffelder durchgeführt werden. Als **Beauftragter für die Biologische Sicherheit** bleibt Herr Dr. Wolfgang Nacken benannt.

Die Anmeldung und die eingereichten Unterlagen wurden vom Landesumweltamt NRW als Anmelde- und Genehmigungsbehörde geprüft. Die Prüfung der Anmeldeunterlagen hat ergeben, dass gegen die Durchführung der gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 (vgl. Stellungnahme des Landesumweltamtes Nordrhein-Westfalen, Anlage 1) keine Bedenken geltend gemacht werden, wenn die mit diesem Bescheid verbundenen Regelungen eingehalten werden.

V. Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist schriftlich oder zur Niederschrift bei mir einzulegen. Falls die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden sollte, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Im Auftrag


(Dr. Eichler)

