

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
- Pädiatrische Hämatologie und Onkologie -
- Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Claudia Rössig -

Effektivität einer Kombination von Telomerasehemmung und
Chemotherapie beim Ewing Sarkom

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Annika Maatz (geb. Turck)

aus Mülheim an der Ruhr

2019

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Herrmann

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

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Stefan Könemann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2019

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik und Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
- Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Claudia Rössig –
Referent: Univ.-Prof. Dr. Joachim Boos
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Stefan Könemann

ZUSAMMENFASSUNG

EFFEKTIVITÄT EINER KOMBINATION VON TELOMERASEHEMMUNG UND CHEMOTHERAPIE BEIM EWING SARKOM

MAATZ, ANNIKA

Auf dem Weg der malignen Transformation einer Zelle bildet die Reaktivierung des Enzyms Telomerase einen wichtigen Schritt, die aufgrund kritischer Telomerenverkürzung begrenzte Teilungskapazität der Zelle zu überwinden und den Eintritt in die Seneszenz zu verhindern. Da in über 85% aller Tumorzellarten eine Reaktivierung von Telomeraseaktivität nachweisbar ist, erscheint Telomerasehemmung als sinnvoller Ansatz potentieller Anti-Tumor Strategien. Einige der bislang entwickelten Telomeraseinhibitoren finden ihren Einsatz bereits in klinischen Studien. Die vorliegenden Daten zu einer Kombination von Telomeraseinhibition und Chemotherapie zeigen jedoch häufig widersprüchliche Ergebnisse bezüglich eines möglichen Synergismus. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die genetische Telomeraseinhibition durch Expression eines dominant-negativen hTERT-Gens (DNhTERT) in den beiden Ewing Sarkom-Zelllinien STA-ET1 und RM-82 zur Evaluation eines möglichen therapeutischen Konzeptes. Durch DNhTERT konnte eine effektive Telomerenverkürzung und Reduktion der Telomeraseaktivität erreicht werden, welche sich bei STA-ET1 zudem im Proliferationsverlust äußerte. Mit zunehmender Passage kam es in den dominant-negativ für hTERT transfizierten Zellen der Zelllinie STA-ET1 zu einer Reaktivierung der Telomerase, ohne Einfluss auf Telomerenlänge und Proliferationsverhalten. Für beide Ewing-Sarkom-Zelllinien konnte nach Ausschaltung der Telomeraseaktivität eine Sensibilisierung gegenüber Doxorubicin nachgewiesen und erste Hinweise auf eine geringfügige Sensibilisierung gegenüber Ifosfamid beobachtet werden. Für Etoposid zeigten sich für beide Zelllinien divergente Ergebnisse (Sensibilisierung und Resistenzhöhung). Ebenfalls Hinweise auf eine tendenzielle Resistenzhöhung konnten gegenüber Vincristin gesehen werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2019

Ich, Annika Maatz, gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Effektivität einer Kombination von Telomerasehemmung und Chemotherapie beim Ewing Sarkom

in der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Münster unter der Anleitung von Herrn Univ. - Prof. Dr. J. Boos und Frau Dr. rer. nat. C. Lanvers-Kaminsky

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.



Münster, den 14.05.2017

Annika Maatz

I. Inhalt

I. INHALT	I
II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1. EINLEITUNG	1
1.1 TELOMERASE UND TELOMERE	1
1.1.1 <i>Die Telomere – Wirkort der Telomerase</i>	1
1.1.2 <i>Struktur und Funktion der Telomerase</i>	5
1.1.3 <i>Vorkommen der Telomerase in humanen Zellen</i>	7
1.1.4 <i>Regulation der Telomeraseaktivität</i>	8
1.1.5 <i>Stellenwert der Telomerase in Tumoren und immortalen Zellen</i>	10
1.1.6 <i>Alternative Verlängerung der Telomeren (ALT- Mechanismus)</i>	12
1.1.7 <i>Telomerase-Inhibitoren</i>	15
1.1.8 <i>Telomerasehemmung und Chemotherapie</i>	21
1.2 DAS EWING SARKOM	25
1.2.1 <i>Epidemiologie</i>	25
1.2.2 <i>Ätiologie und Lokalisation</i>	26
1.2.3 <i>Tumorbiologie und Zytogenetik</i>	27
1.2.4 <i>Telomeraseaktivität beim Ewing Sarkom</i>	28
1.2.5 <i>Klinik</i>	30
1.2.6 <i>Diagnostik und Stadieneinteilung</i>	31
1.3 THERAPIEOPTIONEN BEIM EWING SARKOM	31
1.3.1 <i>Chemotherapie</i>	33
1.3.2 <i>Lokaltherapie (Operative-/ und Radiotherapie)</i>	33
1.3.3 <i>Alternative Therapien</i>	34
1.3.4 <i>Prognose</i>	34
1.4 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	38
2. MATERIAL UND METHODEN	40
2.1 MATERIAL	40
2.1.1 <i>Zelllinien</i>	40
2.1.2 <i>Transfizierte Zellen</i>	41
2.1.3 <i>Die Vektoren</i>	41
2.1.4 <i>Zytostatika, Lösungen und Reagenzien</i>	43
2.1.5 <i>Einmal- Laborbedarf/ Mehrfachartikel</i>	46
2.1.6 <i>Geräte</i>	47
2.2 DIE ZELLKULTUR	49
2.2.1 <i>Zellkultivierung</i>	49
2.2.2 <i>Collagen-Beschichtung (Coating)</i>	49
2.2.3 <i>Einfrieren/Auftauen</i>	50
2.2.4 <i>Zellpellets</i>	50
2.3 DAS IN-VITRO-ZYTOTOXIZITÄTS-SCREENING (MTT-ASSAY)	51
2.3.1 <i>Aussiedeln der Zellen</i>	51
2.3.2 <i>Inkubation mit Zytostatikalösung</i>	51
2.3.3 <i>Standardversuchsablauf des MTT-Assays</i>	52
2.3.4 <i>Verdünnungsreihen der Prüfsubstanzen</i>	53
2.3.5 <i>Übersicht der Versuchsreihen</i>	54
2.3.6 <i>Auswertung des MTT- Assay</i>	56

2.4	MESSUNG DER TELOMERASEAKTIVITÄT (TRAP- ASSAY)	57
2.4.1	<i>Proteinisolierung</i>	57
2.4.2	<i>Proteinbestimmung nach Lowry</i>	58
2.4.3	<i>Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	59
2.4.4	<i>Fragmentanalyse</i>	60
2.4.5	<i>Auswertung des TRAP-Assay</i>	61
2.5	BESTIMMUNG DER TELOMERENLÄNGE (SOUTHERN-BLOT)	62
2.5.1	<i>DNA-Isolierung</i>	62
2.5.2	<i>Telomer-Längen-Assay</i>	63
2.5.3	<i>Auswertung des Southern Blots</i>	68
2.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG	69
3.	ERGEBNISSE	73
3.1	CHARAKTERISIERUNG DER TRANSFIZIERTEN ZELLEN	73
3.1.1	<i>Telomerenlänge der Zelllinien (TRF)</i>	73
3.1.2	<i>Vergleich der TRF (Passagezahl und transfizierte Zellen)</i>	77
3.1.3	<i>Telomeraseaktivität der Zelllinien</i>	79
3.1.4	<i>Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen</i>	85
3.1.5	<i>Verdopplungsraten der Zellpopulationen (Population Doubling)</i>	90
3.2	ZYTOTOXIZITÄTSTESTUNG	94
3.2.1	<i>Chemosensitivität transfizierter und nicht-transfizierter Zelllinien</i>	94
3.2.1.1	<i>Inkubation mit Doxorubicin</i>	94
3.2.1.2	<i>Inkubation mit Etoposid</i>	99
3.2.1.3	<i>Inkubation mit Ifosfamid</i>	104
3.2.1.4	<i>Inkubation mit Vincristin</i>	107
3.2.2	<i>Vergleich der Chemosensitivität von STA-ET1 und RM-82</i>	111
3.2.3	<i>Vergleich der Chemosensitivität nach Transfektion</i>	112
3.2.3.1	<i>Inkubation mit Doxorubicin</i>	113
3.2.3.2	<i>Inkubation mit Etoposid</i>	115
3.2.3.3	<i>Inkubation mit Ifosfamid</i>	117
3.2.3.4	<i>Inkubation mit Vincristin</i>	119
4.	DISKUSSION	120
4.1	TELOMERASEAKTIVITÄT BEIM EWING SARKOM	120
4.2	TELOMERASE-INHIBITOREN	121
4.3	GENETISCHE TELOMERASEINHIBITION DURCH DNHTERT	123
4.4	TELOMERASEINHIBITION UND CHEMOTHERAPIE	126
4.5	RISIKEN UND GRENZEN DER TELOMERASEINHIBITION	129
4.6	LIMITATION DER ANGEWANDTEN METHODIK	131
4.7	AUSBLICK	132
5.	ZUSAMMENFASSUNG	134
6.	LITERATURVERZEICHNIS	136
7.	DANKSAGUNG	154
8.	LEBENS LAUF	155

II. Abkürzungsverzeichnis

(ds) - DNA	Doppelstrang - DNA
(ss) - DNA	Einzelstrang - DNA
Abb.	Abbildung
ALT	Alternativer Mechanismus zur Verlängerung der Telomeren (alternative lengthening of telomeres)
AML	Akute myeloische Leukämie
anschl.	anschließend
Art. No.	Artikel-/Katalognummer
BCR-ABL	Durch reziproke Translokation entstandene Chromosomenanomalie bei chronischen/akuten Leukämien (v.a. CML)
bp	Basenpaare
Ca	Karzinom
CD4/CD8	Glykoprotein an der Oberfläche von T-Lymphozyten als immunphänotypisches Merkmal (CD = Cluster of Differentiation)
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CSC	Krebsstammzelle (cancer stem cell)
dem.	demineralisiert
DNhTERT	dominant-negative Mutante der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT)
ESFT	“Ewing’s sarcoma family tumors”
EtOH	Ethanol
FI	Fluoreszenzintensität
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GT	Guanosin und Thymin
H ₂ O	Wasser
HER2	Tumormarker mit prognostischer Relevanz beim Mamma-Ca (human epidermal growth factor receptor 2)

hTERC	humane Telomerase - RNA Gen
hTERT	Katalytische Untereinheit der Telomerase (Humane Telomerase Reverse Transkriptase)
JAK2	signalübermittelnde, zytoplasmatische Tyrosinkinase (Janus-Kinase 2). Mutation als Marker Myeloproliferativer Neoplasien
kbp	Kilobasenpaar
konz.	konzentriert
LSC	Leukämische Stammzelle
Lsg.	Lösung
mbar	Millibar
Min	Minute(n)
nf-H ₂ O	Nuklease-freies Wasser
nm	Nanometer
NSCLC	Nicht-kleinzelliges-Bronchialkarzinom (Non-small cell lung cancer)
p53	Tumorsuppressor(gen)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pNET	Peripherer Neuroektodermaler Tumor
rpm	rounds per minute
sek	Sekunden
sog.	so genannt
TA	Telomeraseaktivität
TERC	RNA-Komponente der Telomerase
TRF	(Telomere) Terminale Restriktionsfragmente (Parameter zur Bestimmung/Vergleich der Telomerenlänge)
TRF1/2	Telomeric-binding repeat factor 1/2
V	Volt
vs.	versus
WT	Wildtyp
xg	Erdumdrehungen
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

1. Einleitung

1.1 Telomerase und Telomere

Seit langer Zeit ist Telomerase immer wiederkehrend im Fokus der Wissenschaft. Unter anderem ist es, aufgrund seiner Wirkung im Bereich der Zellalterung, als Anti-Aging-Ziel durchaus medienwirksam und im Interesse der kosmetischen Pharmaindustrie. Auch gibt es Studien zur Untersuchung von Telomerase-Aktivierung in der regenerativen Medizin (Tissue Engineering, Wiederherstellungschirurgie) sowie Hoffnungen auf den Einsatz zur Behandlung chronischer Erkrankungen wie Arteriosklerose (112). Wichtig ist zudem ein weiterer Bereich, in dem die Telomerase eine bedeutende Stellung einnimmt. Sie ist in über 85% aller Tumorarten zu finden (217), sodass die Vermutung nahe liegt, dass dieses Enzym eine Schlüsselfunktion innehat, die entartete Zellen sich zu Nutze gemacht haben, um dem Verlauf von natürlicher Zellalterung und frühzeitigem Zelltod zu entgehen. Somit bietet sie ein interessantes Ziel im Bereich zukünftiger Anti-Tumor-Strategien bezüglich der Therapie und Detektion von Tumoren.

Um die Rolle der Telomeraseaktivität in Hinblick auf Zellalterung und Immortalisierung zu verstehen ist es wichtig, einen Überblick über den Wirkmechanismus dieses Enzyms sowie dessen Wirkort, die Telomere, zu erlangen.

1.1.1 Die Telomere – Wirkort der Telomerase

Struktur der Telomere

Geprägt wurde der Begriff der Telomere (griech; telos = τέλος Ende; meros = μέρος Teil) im Jahr 1938 - 1942 von Mueller und McClintock (156). Telomere sind DNA-Protein-Komplexe an den Enden der Chromosomen. Sie setzen sich zusammen aus repetitiven DNA-Sequenzen sowie verschiedenen Proteinen. Je nach Spezies unterscheiden sich die DNA-Sequenzen in ihrer Länge und Zusammensetzung. Sie enthalten GT-reiche Sequenzen und bestehen bei den meisten Eukaryonten aus einer repetitiven Sequenz von ca. 6-8 Basenpaaren (bp) (164). In humanen Zellen existiert eine Sequenz von 6 bp (TTAGGG)_n, welche sich einige tausend Male wiederholt. So werden 5-20 kb in humanen Zellen beschrieben (60, 172). In anderen Säugetieren, z.B. der Maus, findet sich sogar ein Vielfaches dieser Länge (127).

Obwohl Telomere hauptsächlich aus doppelsträngiger DNA bestehen, besitzen sie zusätzlich einen einsträngigen 3'-Überhang, welcher ebenfalls GT-reich ist und ca. 30-250 Nukleotide umfasst (157, 203, 259, 269). Dieser 3'-Überhang verbindet sich durch Basenpaarung mit der doppelsträngigen Telomeren-DNA und bildet so die typische, Lasso-ähnliche „*t-loop*“-Struktur (Telomeren-loop). Im Bereich der Hybridisierung des 3'-Überhangs mit der doppelsträngigen DNA bildet sich aus dem freien, komplementären Strang der sog. „displacement (*d-loop*)“ (siehe Abbildung 1.1.1-a) (83).

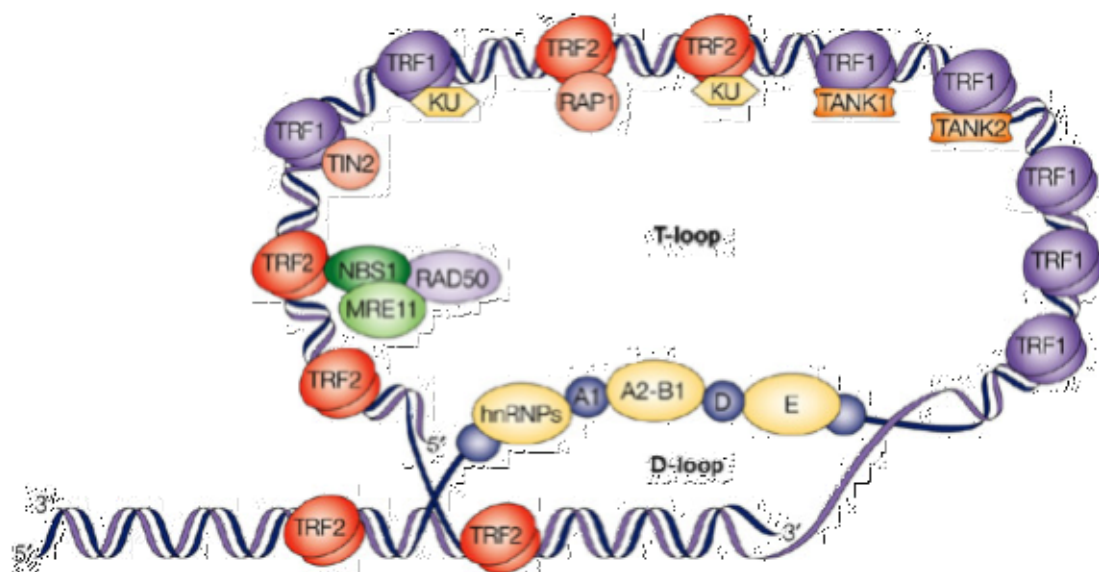


Abbildung 1.1.1-a: Struktur der Telomere. Entstehung der typischen „*t-loop/d-loop*“ Struktur der Telomere durch Fusion des 3'Ende (einsträngiger Überhang der Telomeren-DNA) mit der doppelsträngigen Telomeren-DNA mit Hilfe verschiedener Telomerbindungsproteine u.a. TRF1 und TRF2. (aus (178) Lizenznummer: 4067620333079)

Des Weiteren besitzen Telomere die Fähigkeit, sogenannte *G-Quadruplex-Strukturen* zu bilden. Hierbei handelt es sich um eine mittels Wasserstoffbrückenbindung, „gefaltete“ Tertiärstruktur aus einer 16-Nukleotid-Sequenz d(GGGTTAGGGTTAGGGT) und 6-Nukleotid-Sequenz d(TAGGGT) des Telomeren 3'-Überhangs, welche so gestapelte Guanodin-Tetraden (G-Quadruplex) bildet (203). G-Quadruplexe schützen den 3'-Überhang der Telomere z.B. vor Rekombination und der Telomerase-abhängigen Verlängerung der Telomere. Sie regulieren so die katalytische Aktivität dieses Enzyms (150, 199, 203).

Telomeren-Bindungs-Proteine

In der Stabilisierung/ Entstehung oben genannter Struktur spielen verschiedene Proteine wie z.B. TRF1 (telomeric-repeat binding factor) und TRF2 eine wichtige Rolle. Diese beiden binden stabilisierend als Homodimer an die doppelsträngige (ds)-DNA der Telomere (30). TRF1 bewirkt u.a. die parallele Anordnung der Duplexstränge zueinander (20, 21, 82). TRF2 induziert ein Auftrennen der DNA-Doppelhelix und ihrer komplementären Stränge und macht so die Invasion des 3' Überhangs als Voraussetzung für die „t-loop“-Struktur möglich (22). Mit ihrer Funktion als architektonische Proteine bewirken sie die Struktur der Telomere und dienen als wichtige Mechanismen der Telomerenverlängerung. Sie fungieren zudem als negative Regulatoren der Telomerase. Eine Überexpression von TRF1 und TRF2 inhibiert die Verlängerung der Telomere (221, 238).

Ein weiteres wichtiges Protein in diesem Zusammenhang ist POT1 (protection of telomeres 1), welches an die ss-DNA der Telomeren bindet (12). Störungen der Expression von TRF1 und POT1 führen zur chromosomalen Instabilität bis hin zu Zellarrest und -tod (105, 119, 238, 244). Eine gestörte Expression von TRF1 ist bereits embryonal letal, dies legt nahe, dass TRF1 neben der Telomerenlängenregulation noch andere wichtige Funktionen hat (121).

TRF1 und TRF2 bilden zusammen mit POT1 und drei weiteren Proteinen (TIN2, RAP1, TPP1) einen Telomer-protectiven Komplex welcher auch Shelterin oder Telosom genannt wird (62). Überdies existieren noch zahlreiche Proteine, denen Regulationsfunktionen innerhalb des Telomerasekomplex/ Telosom nachgesagt werden. So konnten zum Beispiel durch Lee et al. in ihrer Untersuchung über 300, teils noch unbekannt Proteine, welche in die Telomeraseregulation eingreifen, identifiziert werden (143, 150).

Funktion der Telomere

Die Funktion der Telomere ist vielfältig. Sie schützen die Chromosomen vor enzymatischem Abbau durch Endonukleasen, indem sie den Enden als sog. „caps“ anliegen (61). Durch Bildung der „t-loop“-Struktur bewahren sie die einsträngigen Enden der Telomere vor der Verwechslung mit DNA-Brüchen, sodass Reparaturmechanismen

nicht in Kraft treten. Neben dem eben genannten Schutz vor Degradation bietet diese Struktur ebenfalls Schutz vor Rekombination und Fusion mit anderen Chromosomen (205). Darüber hinaus werden den Telomeren noch wichtige Funktionen in Prozessen innerhalb des Zellkerns wie Verankerung der Chromosomen in der Kernmatrix, Anordnung des Chromatins und Trennung der Chromosomen während des Zellzyklus zugeschrieben (81, 128). Eine entscheidende Rolle spielen sie jedoch, insbesondere für die Fragestellung dieser Arbeit, bezüglich des Chromosomenreplikationsproblems.

Das Chromosomenreplikationsproblem

Okazaki et al. beschrieben 1967 mit den Mechanismen der DNA-Replikation einen Grundstein für das Chromosomenreplikationsproblem. Hierbei verliert, aufgrund der semikonservativen Replikation, der chromosomale DNA-Strang bei jeder Zellteilung einige Nukleotide (184, 185). Der Verlust entsteht dadurch, dass die DNA-Polymerase nach Bindung an den RNA-Primer den Strang (Matrize) nur in 3' - 5' Richtung replizieren kann, so dass ein kontinuierlicher und ein diskontinuierlicher Strang entstehen (siehe Abbildung 1.1.1-b). Das Resultat sind die Okazaki-Fragmente, welche durch eine DNA-Ligase verbunden werden müssen (185).

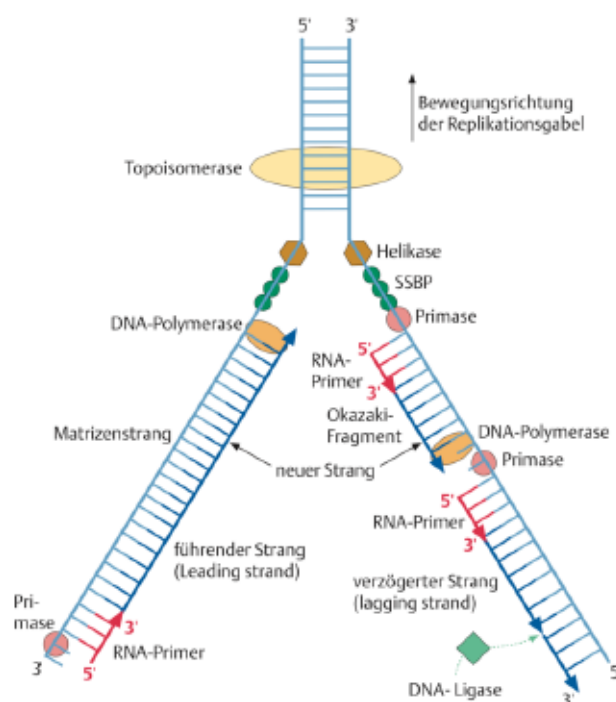


Abbildung 1.1.1-b: Prinzip der semikonservativen Replikation

Nach Auftrennung der Doppelhelix des maternalen DNA-Strangs durch das Enzym Helikase bindet die Primase den RNA-Primer (rot) an die beiden DNA-Stränge (hellblau). Die DNA-Polymerase synthetisiert nun, beginnend am RNA-Primer, in 3' - 5' Richtung (dunkelblau). Dadurch entstehen ein kontinuierlicher Strang („leading strand“) sowie ein diskontinuierlicher Folgestrang („lagging strand“). Der Folgestrang besteht aus vielen (ca. 1000 Nukleotide langen) Einzelfragmenten – die Okazaki-Fragmente, welche in einem weiteren Schritt, durch die DNA-Ligase aufgefüllt werden. SSBP: einzelstrangbindendes Protein (Abbildung aus(113))

An den Enden, den Telomeren, kann die Replikation nicht vollständig stattfinden, da die Ligase das letzte Stück nicht auffüllen kann, sodass die Chromosomen sich bei jeder Zellteilung an den 5' Enden verkürzen. Hierdurch entsteht ein Verlust von 50 bis 200 Basenpaaren pro Replikationszyklus (89, 144). In einem gewissen Rahmen ist dieser Verlust tolerierbar, da zunächst die Telomere „aufgebraucht“ werden, welche keine wichtige Erbinformation enthalten. Greift der Verlust jedoch über ein kritisches Limit hinaus, verfällt die Zelle in eine Art Ruhezustand (Seneszenz) und wird später apoptotisch (216). Die mögliche Anzahl an Zellteilungen somatischer Zellen wird auch als *Hayflick limit* bezeichnet. Dieser Begriff wurde 1965 von Hayflick et al. geprägt (95). Einen Zusammenhang zwischen der zellulären Seneszenz und dem Endreplikationsproblem schafft Olovnikov 1971 mit seiner Hypothese, dass der mitotische Verlust der Telomeren-DNA letztlich zum Verlust essenzieller Gene und damit zum Zelltod führen muss (186, 187). Diese These lässt sich im Weiteren u. a. anhand verschiedener Versuche in vitro (Fibroblastenkultur) bestätigen (2, 89). Aus dem gleichen Gedanken entwickelte sich 1991 das Model der „*mitotic clock*“, in welchem Telomerenlänge und Telomeraseaktivität einen Marker der replikativen Vergangenheit und des proliferativen Potentials einer Zelle darstellen (90). Die Telomere nehmen mit dem Endreplikationsproblem einen wichtigen Stellenwert in der Zellalterung ein (144). An diesem Punkt kommt nun die Telomerase ins Spiel.

1.1.2 Struktur und Funktion der Telomerase

Im Jahre 1985 gelang der Nachweis eines Enzyms in Tetrahymena Zellextrakten, welches dem replikationsbedingten Verlust der Telomerenenden entgegenwirkt (80). Vier Jahre später entdeckte Morin erstmalig Telomeraseaktivität in einer humanen Tumorzelllinie (170).

Bei der Telomerase handelt es sich um ein Ribonukleoprotein, dessen katalytische Untereinheit, die *humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT)*, zusammen mit einer RNA Untereinheit, der *humanen Telomerase RNA (hTR oder hTERC)*, einen Komplex bildet. Dieser Komplex ist maßgebend daran beteiligt (249), nach jeder Zellteilung neu synthetisierte Telomerasequenzen an die Chromosomenenden zu fügen und so der begrenzten Teilungsfähigkeit vieler Zellen entgegenzuwirken. Auf diese Weise kann das oben genannte Chromosomenreplikationsproblem überwunden werden.

Im Gegensatz zu hTERT, deren Expression vor allem in Keimzellen und malignen Zellen gefunden wurde (163, 177), konnte hTR in den meisten humanen (embryonalen und adulten) Geweben nachgewiesen werden (9, 73). Dies lässt darauf schließen, dass hTERT eine bedeutsamere Rolle in der Tumorforschung zukommt.

In späteren Arbeiten wurde noch eine weitere Komponente als existentiell für den Telomerasekomplex benannt. Das „*humane Telomerase-assoziierte Protein-1*“ (*hTEP1*) oder *Dyskerin* ist wichtig für die Stabilisierung von hTR (45, 145) und bildet so den dritten Teil des Telomerase-Komplexes.

Neben ihrem wesentlichen Beitrag (durch Aufrechterhaltung der Telomerenlänge), die zelluläre Alterung zu überwinden und die Tumorprogression zu unterstützen, sind noch *weitere Telomeren-unabhängige Funktionen* beschrieben. So wird der Telomerase eine (mitochondrial) proapoptotische sowie (nukleär) antiapoptotische Funktion ebenso wie Einfluss auf den „DNA-Damage Response“ (teils über die Hemmung des p53-Pathway), die Funktionalität von Stammzellen in Gewebe (gilt ebenso für hTERT) und Regulation der Gen-Expression (u.a. c-Myc, p21, p53, DNMT1 und NF- κ B p65) zugesprochen (47).

Katalytische Untereinheit hTERT

Die katalytische Untereinheit scheint ein Phosphoprotein zu sein, deren Aktivität u.a. durch mehrere Proteinkinasen moduliert wird. Dies wird z.B. der Proteinkinase B (PKB/Akt), PKC und c-Abl zugeschrieben (124, 137, 146). Es wird vermutet, dass hTERT als funktionell kooperierendes Dimer oder Multimer in vivo vorliegt (14, 45). Der TERT-Promotor enthält verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, z.B. für c-Myc, ein die Aktivität modulierender Transkriptionsfaktor (252, 261). Lokalisiert wurde das kodierende Gen als single copy auf Chromosom 5p15.33 (36, 125, 163). Im Vorfeld war bereits einer verstärkte Expression sowie Amplifikation im Bereich von 5p für verschiedene Tumore beschrieben worden (134).

RNA-Untereinheit hTR

Die humane Telomerase-RNA ist bis 450 Nukleotide lang (73). Sie enthält eine Sequenz aus elf Nukleotiden (5'-CUAACCCUAAC-3'), welche komplementär zur Telomerasequenz sind. Sie wird Template-Region genannt und dient der reversen Transkriptase als Matrize, welche repetitive TTAGGG-Sequenzen an das 3' Ende der

Telomere anfügt (170). Überdies besteht sie aus einer zweiten Domäne, welche für die Verankerung in der katalytischen Untereinheit verantwortlich ist (19). Das kodierende Gen (single copy) wurde auf Chromosom 3q26.3 lokalisiert (222).

Telomerase-bindende Proteine

Den Komplex der Telomerase bilden neben den zwei eben genannten Untereinheiten noch weitere Telomerase-bindende Proteine. Ihnen werden u. a. wichtige Funktionen zur Regulierung des Enzyms nachgesagt. So interagieren z.B. hStau und L22 mit hTR in vitro (142). Das bereits oben erwähnte, in humanen Zellen identifizierte Protein hTEP1/Dyskerin (91) agiert ebenfalls mit hTR und hat hier strukturelle und modulierende Funktionen inne (167). Zunächst wurde es als nicht essentiell für die Telomeraseaktivität in vivo und in vitro propagiert (13, 148). In späteren Arbeiten zeigte sich jedoch, dass es aufgrund seiner für hTR wichtigen, stabilisierenden Funktion essentiell ist und so den dritten Bestandteil des Telomerase-Enzymkomplexes bildet (45). Weitere, als essentiell/regulierend beschriebene Proteine der humanen Telomerase sind hsp90 und p23 (74, 106).

1.1.3 Vorkommen der Telomerase in humanen Zellen

Während der Embryonalentwicklung lässt sich Telomeraseaktivität in vielen fetalen Geweben nachweisen (258). Diese ist im adulten Zustand nur noch in Keimzellen, peripheren Blutzellen (29, 102) und in einigen wenigen somatischen Geweben wie z.B. epidermalen Keratinozyten nachweisbar, in diesen jedoch auf deutlich niedrigerem Niveau (263). Fügt man in solche normalerweise Telomerase-negativen Zellen hTERT, führt dies in vitro zu einer Erweiterung der potenziellen Lebensspanne und schützt die Zellen vor dem Eintritt in die Seneszenz (24, 242).

Dass Telomerase in humanen Zellen, nicht nur in Hinblick auf Alterung und Herausögern der Seneszenz, langfristig betrachtet einen hohen Stellenwert hat, zeigt sich an Krankheitsbildern wie z.B. der x-chromosomalen Form der Dyskeratosis congenita (DKC), welche sich durch eine Mutation im *dkc1*-Gen (kodiert für die Komponente Dyskerin des Telomerasekomplex) auszeichnet (167). Die klinischen Folgen können sich schon frühzeitig u.a. in hochregenerativen Geweben mit Knochenmarkversagen und

Hautveränderungen äußern. Auch finden sich verkürzte Telomere mit chromosomaler Instabilität und der Gefahr, schon frühzeitig Malignome zu entwickeln (209).

1.1.4 Regulation der Telomeraseaktivität

Die Regulation der Telomeraseaktivität ist immerwährender Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Während in der Anti-Aging-Therapie ihre Aktivierung bzw. Reaktivierung im Fokus des Interesses steht (93), versucht man in der Anti-Tumor-Therapie die Hemmung dieses Enzyms selektiv herbeizuführen. Beiden Strategien ist gemeinsam, dass es ein sehr breites und bei Weitem nicht endgültig entschlüsselt Feld der Modulationsmöglichkeiten und Angriffspunkte gibt. Letztere geschehen z.B. auf der Ebene der Transkription wie das alternative Splicen und der posttranslationalen Modifikation mittels Phosphorylierung (125, 233, 252). Die folgende Tabelle 1.1.4-a soll eine kleine Auswahl darstellen. Eine breite Übersicht gibt die Arbeit von Wojtyla et al. (254).

Tabelle 1.1.4-a: Regulationsmöglichkeiten der Telomeraseaktivität

	Angriffspunkt	Mechanismus	Effekt	Quelle
c-ABL (Protein-Tyrosinkinase)	hTERT	Phosphorylierung	Inhibierend	(124)
hEST2 Gen	hTERT	Hochregulation in Tumorzellen /ektopye Expression	Aktivierend	(54, 163)
c-Myc (Protoonkogen)	hTERT-Promotor /hsp90A	Aktivierung der Transkription (TERT)	Induktion der TA (Telomeraseaktivität)	(229, 247, 261)
E6 (Protein von HPV16)	hTERT	Aktivierung von hTERT-Gen	Aktivierend	(132, 243)
Ostrogene	hTERT	Direkt (hTERT-Promotor) o. Indirekt (c-Myc)	Aktivierend (in E ₂ -sensiblen Geweben)	(139, 166, 174)
pRB (Onkogen Retinoblastom)/ INK4A (cyclin-abh. Kinase Inhibitor p16)	hTERT	Transkriptionsfaktor	Suppression der TA	(56, 129)

	Angriffspunkt	Mechanismus	Effekt	Quelle
NF-kappa B	TERT (Maus)	Transkriptionsfaktor	Aktivierung der TERT-Expression	(266) (153)
Chromosom 3p (3p21.2-3p14.2, 3p24.3-3p24.1 und Weitere)	hTERT-Gen	Tumorsuppressor-gen	Unterdrückt Telomeraseaktivität chromosomaler Verlust führt zur ↑ hTERT-Expression	(57, 159) (180)
Chromosom 10p15.1				
MZF-2	hTERT	Transkriptionsfaktor	Repression von hTERT	(76)
hTERT-α (alpha)	hTERT	Alternatives Splicing	dominant negativer Inhibitor der TA	(46, 265)
hTERT-β (beta)	hTERT	Alternatives Splicing	prämaturre Termination und nonfunkt. Proteine	(252, 265)
hTERT-γ (gamma)	hTERT	Alternatives Splicing	nonfunktionale Proteine	(99)
TRF-1/TRF-2 (1.1.1)	Telomere	Telomeren- Bindungsproteine	neg. Regulator der Telomeraseaktivität	(221, 238)
Tankyrase [poly- (ADP-ribose) - Polymerase] 1+2	TRF-1	ADP-Ribosylierung	Inaktiviert den neg. Regulator TFR-1	(49, 107, 194, 220)
PKC und PKB (Proteinkinasen)	hTERT	Phosphorylierung	Aktivierung der TA	(117, 137, 146)
Androgene (Prostata- CA in vivo)	hTERT-Promotor	unklar	hTERT-Expression ↓	(86)
EWS/ETS (Fusionsprotein)	hTERT-Gen	Transkriptionaler Co-Faktor?	Hochregulation /Aktivierung	(226)
HER2/Neu, Ras, und Raf (Onkoproteine)	hTERT-Gen	Über Transkriptions- faktor ER81	Induktion hTERT- Expression	(79)
Leptin (in MCF-7 Brustkrebszellen)	hTERT (mRNA und Proteine)	Fördert Bindung STAT3 (Phosphorylierung) an hTERT-Promotor	Aktivierung Transkription und Proteinexpression	(198)
Grainyhead-like 2 (GRHL2)	hTERT- Gen Promotor	Transkriptionsfaktor	↓ Methylierung hTERT-Promotor → hTERT-Expr. ↑	(41)

1.1.5 Stellenwert der Telomerase in Tumoren und immortalen Zellen

In über 85% aller Tumorzellarten findet sich eine Aktivierung der Telomerase (insbesondere der katalytischen Untereinheit hTERT), ebenso in immortalen Zelllinien ist sie hochaktiv (51, 126, 150). Im Vergleich von embryonalem zu entartetem Gewebe zeigt sich, dass die Telomere von Tumorgeweben kürzer sind als die des entsprechenden embryonalen „gesunden“ Gewebes (203), so dass die Verkürzung der Telomere in frühen Stadien der Tumorgenese fortzulaufen scheint. Aus einer kontinuierlichen Telomerenverkürzung resultieren instabile Chromosomenenden, welche wiederum die Entstehung von entarteten Zellen fördern (60, 94). Dennoch lässt sich, wie bereits erwähnt, in vielen Tumorgeweben eine hohe Telomeraseaktivität nachweisen, sodass die Vermutung naheliegt, dass die Reaktivierung der Telomerase zu einem späteren Zeitpunkt der Tumorgenese erfolgt (53, 126).

In Untersuchungen bezüglich Telomeraseaktivität (TA) zeigt sich ein breites Vorkommen in vielen Tumorgeweben. Die Übersichtsarbeiten von Shay und Bachetti et al., sowie Dhaene et al. zeigen eine tabellarische Übersicht über Lokalisationen, Tumorgewebe und prozentualen Nachweis der Telomeraseaktivität. Solide Tumore mit deutlicher TA sind u.a. Nierenzell-, Kolorektal-, Bronchial-, hepatozelluläre- und Magenkarzinome; auch in Melanomen, Basalzellkarzinomen sowie in lymphatischen/ myeloischen Erkrankungen lässt sich eine signifikant erhöhte TA nachweisen (66, 217).

Es zeigte sich eine große Heterogenität bezüglich der unterschiedlichen Tumorentitäten einer Lokalisation. So konnte z.B. im duktalem und lobulären Mamma-Ca in 88% (300/339) TA nachgewiesen werden (101, 215, 225), während diese nur in 28% (11/40) der Fibroadenome der Mamma nachzuweisen war (16, 101, 225). Eine spätere Studie zeigte wiederum 81,8% TA in duktalem Carcinoma in situ (DCIS), sodass im Gegensatz zu der oben genannten Vermutung hier von einer frühen Reaktivierung im Rahmen der Karzinogenese auszugehen ist (173).

Auch sind Zusammenhänge zwischen Überlebensrate und TA beschrieben. So zeigte sich in einer Studie an Patienten mit telomerasepositiven Magen-Karzinomen eine signifikant schlechtere Überlebensrate als bei den telomerasenegativen Kontrollen. Hierbei gilt jedoch auch zu beachten, dass die telomerasepositiven Magenkarzinome zum Zeitpunkt der Diagnose in einem fortgeschrittenem Stadium und metastasiert waren (100).

Seneszenz und Immortalisierung

Wie unter 1.1.1 erwähnt, unterliegt jede menschliche Zelle einer begrenzten Anzahl an möglichen Zellteilungen. Ab einem bestimmten Limit verfällt die Zelle in eine Seneszenz, um weitere Zellteilungen mit der Folge des chromosomalen Verlustes und der Instabilität zu vermeiden (133). Die Mechanismen dieser zellulären Entwicklung sind vielfältig und komplex. Sie zu verstehen ist jedoch essentiell, um den Prozess, den entartete Zellen im Rahmen der Karzinogenese durchlaufen, nachvollziehen zu können. Es gelingt ihnen, der replikativen Seneszenz zu entfliehen, um unbegrenzt proliferieren zu können. Hierbei spielt unter anderem die Stabilisierung der Chromosomen eine wichtige Rolle (66).

Ist das replikative Limit erreicht und die Zelle in die Seneszenz eingetreten, bleibt sie weiterhin vital. Dieser Zustand ist daher nicht mit dem zellulären Tod gleichzusetzen, sondern eher als eine Art „Ruhephase“ zu sehen und wird auch „mortality stage 1“ (M1) genannt (216, 246). Für den Eintritt in die M1-Phase scheint unter anderem die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 (lokalisiert auf Chromosom 17p) verantwortlich zu sein (155). Durch retrovirale Transfektion mit onkogenen Retroviren konnte die These *in vitro* bestätigt werden, dass Genprodukte von p53 und pRB wichtig sind für den Weg in die M1-Phase (25, 257). Durch Blockierung von p53 und pRB mittels viraler Onkogene (z.B. SV40 large T-Antigen (TAg) oder HPV E6/E7) kann die M1-Phase übersprungen werden (214, 255) und die Zelle sich wieder replizieren. Hierbei wird jedoch schnell (nach 30 – 40 Populationsverdopplungen) ein weiteres Stadium (M2) „crisis“ oder „mortality stage 2“ erreicht (256). M2-Zellen zeichnen sich typischerweise durch extrem kurze Telomere und chromosomale Instabilität aus. Nur wenige Zellen können diesem Stadium mit konsekutivem Untergang/ Zelltod entfliehen (Abbildung 1.1.5 a). Der häufigste Mechanismus ist eine Reaktivierung der Telomerase (51, 52, 262) (siehe 1.1.2 und 1.1.5), überdies werden noch alternative Verlängerungen der Telomere genannt (siehe 1.1.6).

Eine weitere Möglichkeit in die zelluläre Seneszenz zu gelangen ist, neben o.g. Telomerhypothese, das „telomere uncapping“, welches die Zellen, Telomerlängen-unabhängig, durch Veränderungen in der DNA-Struktur der Telomere und/oder der telomeren Proteine in die Seneszenz und Apoptose führen kann (61, 120).

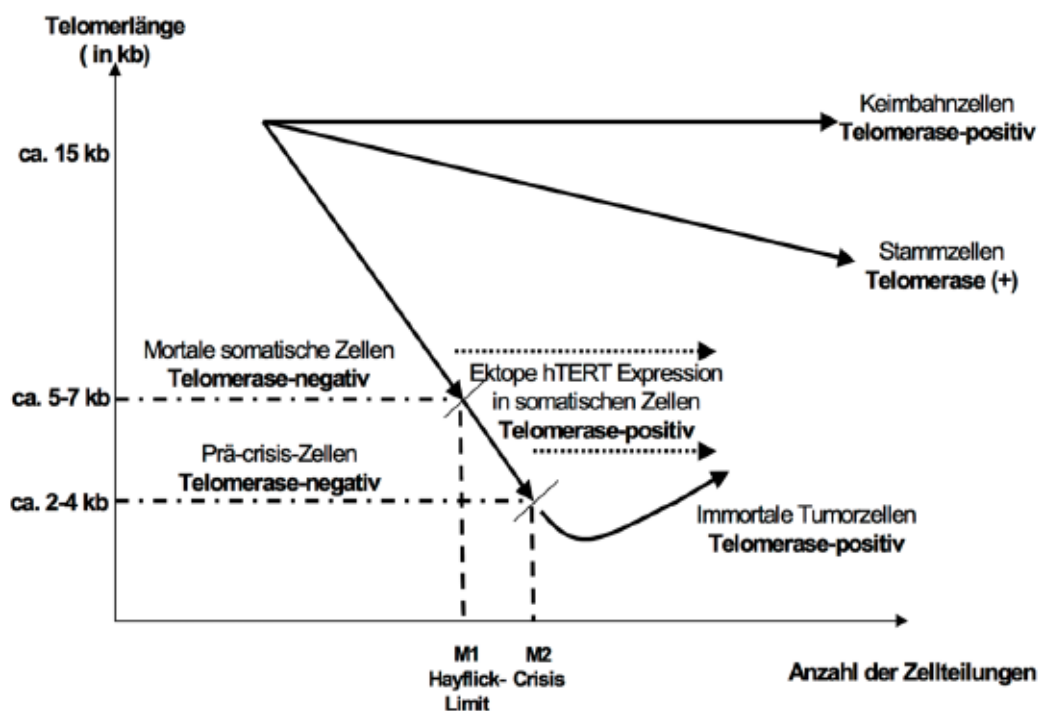


Abbildung 1.1.5-a: Prinzip der Telomerhypothese von zellulärer Alterung und Immortalisierung. Aufgrund der semikonservativen Replikation verliert der chromosomale DNA-Strang bei jeder Zellteilung einige Nukleotide. Ist das replikative Limit einer Zelle erreicht, verfällt sie in eine Art Ruhephase (M1), welcher nach weiteren Zellteilungen zur Krise (M2) mit konsekutivem Zelluntergang führt. Eine Möglichkeit aus dem M2-Stadium auszubrechen ist die Reaktivierung der Telomerase, wie es sich Tumorzellen zu Nutze machen können. Weitere Zellteilungen sind dann, ebenso wie bei generell Telomerase-positiven Zellen (z.B. Keimbahnzellen) wieder verlustlos möglich. (Abbildung aus (92))

1.1.6 Alternative Verlängerung der Telomeren (ALT- Mechanismus)

Einige Tumore (10-15%) humaner Zellen sowie manche *in vitro* immortalisierten Zelllinien stabilisieren ihre Telomeren Telomerase-unabhängig (35). Insbesondere in Tumoren mesenchymalen Ursprungs scheint diese Phänomen zu existieren (40).

Im Jahre 1995 beschreiben Bryan und Reddel et al. erstmals diesen alternativen Mechanismus, welcher später als „ALT pathway“ (alternative lengthening of telomeres) bezeichnet wurde. In ihrer Studie zeigten sich von 35 untersuchten immortalen Zelllinien 15 für Telomerase negativ (32). Auffällig bei diesen Zellen war, dass sie *heterogene, teilweise sehr lange Telomere* hatten (variierten zwischen 2-50 kb Länge), wohingegen Telomerase-positive Zellen typischerweise sehr kurze Telomere haben. Eine ähnliche Beobachtung machten Kim et al. bereits 1994 bei zwei immortalen, Telomerase-negativen SV-40 Zelllinien (126). Mechanismen des „ALT-pathway“ lassen sich häufiger

in nicht-humanen Zelllinien nachweisen, wie z.B. bei *Anopheles gambiae* (Mosquito), bei *Drosophila melanogaster* oder bei Hefen, sodass zunächst vermutet wurde, dass dieses Phänomen bei Säugetieren nur *in vitro* zu finden ist (197). Dennoch folgten Untersuchungen, die nahe legten, dass in geringerem Maße auch *in vivo* ALT bei humanen Zellen eine Rolle spielt (33, 78, 264). Überdies konnten Neumann et al. sogar in nicht-entarteten, somatischen Mauszellen ebenfalls geringfügige Mengen an ALT-Aktivität nachweisen (179). Daneben wird beschrieben, dass ALT und Telomerase in manchen Tumoren koexistieren (33, 97). Untersuchungen an Hefen zeigen bei *in vitro* herbeigeführter Koexistenz dieser beiden Systeme jedoch ein Dominieren der Telomerase zur Erhaltung der Telomere (122, 228, 250). Auch in einer neueren Arbeit von Queisser et al. konnte an humanen Oesophagus-Epithelzellen gezeigt werden, dass diese zellzyklusabhängig zwischen dem „ALT-pathway“ (vermehrt in G1/G2-Phase) und Telomeraseaktivität (verstärkt in S-Phase) wechseln und im genetisch definierten Oesophagus-Karzinogenese-Modell sogar koexistieren können. Interessanterweise konnte zusätzlich gesehen werden, dass es nach Telomeraseinhibition in immortalisierten, pre-malignen Oesophaguszellen ebenso wie in genetisch herbeigeführten, maligne transformierten Oesophaguszellen, zu einem Wechsel auf ALT-Mechanismen kam (195).

Warum es jedoch in den meisten „ALT-pathway“ positiven Zellen zu einem Fehlen der Telomerase kommt, ist bislang unklar. In einer Arbeit von Bryan et. al zeigte sich, dass die Sequenz des Telomerase RNA-Gen (hTRC) in allen untersuchten ALT-Zellen intakt und eine Mutation der hTRC daher unwahrscheinlich war (34). Es gibt Arbeiten, die zeigen, dass der hTRC- und hTERT-Promotor (beide enthalten CG-reiche Sequenzen) durch verstärkte Methylierung mit konsekutivem Verlust der Expression in das Fehlen von TA involviert sind (64, 65, 103).

Auffällig sind neben den oben beschriebenen heterogenen, teils sehr langen Telomeren folgende phänotypische Charakteristika für Zellen, die den ALT- Mechanismus nutzen: In untersuchten Zellen fanden sich ALT-assoziierte *PML-Körper* („promyelocytic leukemia bodies“), die sog. APB. In Telomerase-positiven immortalen Zellen sowie Telomerase-negativen mortalen humanen Zellen konnten APB nicht nachgewiesen werden. Dennoch enthalten nur ca. 5-10 % der ALT- Zellen auch APB (260, 264), sodass die genaue Funktion der APB für ALT-Zellen noch unklar ist. APB bestehen u.a. aus

repetitiven Sequenzen telomerer DNA, deren Bindungsproteinen TRF1 und TRF2, dem Replikationsfaktor A sowie der humanen Variante der in Hefen gefundenen Rekombinationsfaktoren RAD51 und RAD52 (264).

Es liegt der Verdacht nahe, dass *Rekombination* auch eine wichtige Rolle in den ALT-Zellen spielt (69). So konnte in einer Untersuchung an Telomerase-positiven und ALT-positiven humanen Fibroblasten gesehen werden, dass die Summe der Rekombinationen in beiden Zelllinien vergleichbar war, es jedoch nur bei den ALT-Zellen nach pharmakologischer Induktion fragiler Telomere zu einer Zunahme der Rekombination kam (15). Zudem hat sich gezeigt, dass Mutationen im Tumorsuppressor-Gen p53 die Rate der Rekombination erhöhen (160). Untersuchungen an Zellen von Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom (Heterozygote p53- Mutation) bestätigen diese Beobachtung, indem sie eine erhöhte Rate an ALT- Zelllinien zeigen (264, 267).

Überdies konnte eine hohe Dynamik der Telomerenlänge in ALT-Zellen beobachtet werden, diese reicht von schneller Elongation bis zur rasanten Deletion, welche wiederum aufgrund der Instabilität gehäuft zur Entwicklung *extrachromosomaler Telomeren-DNA (ECTR- DNA)* führt (175, 182, 232). ECTR- DNA kann linear oder zirkulär auftreten. Die zirkulären Strukturen („t-circles“) werden gehäuft in ALT-Zellen gefunden (11, 39). Eine weitere Arbeit zeigt, dass lineare ECTR-DNA bevorzugt mit APBs assoziiert ist, sodass hier eine protektive Funktion (Schutz vor Reparatur bei Verwechslung mit Doppelstrang-Brüchen) vermutet wird (72).

Insgesamt ist der Mechanismus der alternativen Telomeren- Verlängerung komplex und noch nicht vollständig verstanden, zumal immortale Zellen beschrieben sind, welche weder bekannte ALT -Merkmale noch TA aufweisen (38, 138), so dass vermutet wird, dass weitere ALT-Mechanismen existieren (40). Auch gibt es Überlegungen, dass ALT-Mechanismen eher der frühen Karzinogenese zuzuschreiben sind und später ein Wechsel auf Telomeraseaktivität erfolgt, wobei es nach Hemmung der Telomerase durch Telomeraseinhibitoren konsekutiv zu einer Reaktivierung von ALT-Mechanismen kommen kann (195).

1.1.7 Telomerase-Inhibitoren

Einen Überblick über vier unterschiedliche Ansätze, bei denen die Telomerase als neuer Angriffspunkt in der Tumorbekämpfung im Fokus steht, gibt Tabelle 1.1.7-a. Neben diesen vier Ansätzen gibt es noch weitere Strategien in präklinischer Erprobung, welche die Telomeren oder Telomerase als Angriffspunkt sehen. Zu diesen gehören *Telomeren- / Telomerase-assoziierte Proteine* wie HSP90 (Geldanamycin, Curcumin) und *Tankyrasehemmer* (XAV939 und 3-Aminobenzamid (3AB)), welche TRF1 als wichtige Komponente des Shelterin-Komplexes angreifen (194, 203), ebenso wie sog. „*T-Oligos*“, welche als Oligonukleotide, mit Telomer-homologen Sequenzen, direkt zytotoxisch wirken können und somit Telomerase-unabhängig agieren (55, 208). Einen weiteren, neueren Angriffspunkt in der Telomeraseregulation stellen *epigenetische Mechanismen* dar, welche zum Beispiel durch diätetischen Einsatz die hTERT-Expression regulieren sollen (145, 158).

Prinzipiell gilt es bei der direkten Telomerase-Hemmung zu beachten, dass mit Effekten, aufgrund des „*phenotypic lag*“ (die Notwendigkeit kontinuierlicher Zellteilung mit konsekutiver Reduktion der Telomerenlänge bis zum Erreichen von vorzeitiger Seneszenz und Zelltod), eher langfristig bzw. verzögert zu rechnen ist. Daher sollte in Phase-II-Studien Endpunkten wie „Zeit bis zur Tumorprogression“ Vorrang vor „objektivierbarer Reduktion der Tumorgröße“ gegeben werden (123).

Tabelle 1.1.7-a: Angriffspunkte in der Entwicklung von Telomerase-Inhibitoren (modifiziert nach (123, 203, 218))

Konzept	Vorteile	Herausforderung	Inhibitoren (Beispiel)
<i>Immuntherapie</i>			
<ul style="list-style-type: none"> stimuliert CD8+, -zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) gegen hTERT 	<ul style="list-style-type: none"> Effekte direkt verfügbar, ohne „phenotypic lag“ Telomerase als Antigen-Ziel in > 85% aller Tumore zu finden 	<ul style="list-style-type: none"> Zusätzlich Hemmung CTL-suppressiver-Signale und Aktivierung von CD4+-T-Helferzellen sinnvoll 	<ul style="list-style-type: none"> GV1001(109), GRNVAC1/2, Vx-001
<i>Gentherapie</i>			
<ul style="list-style-type: none"> selektiv zytotoxisch für Tumorzellen durch Expression des therapeutischen Proteins Einbringen unter transkriptionaler Kontrolle in den Tumor Promotor – hTERT oder hTERC 	<ul style="list-style-type: none"> direkter Effekt auf Zellen, welche Telomerase exprimieren, daher ohne „phenotypic lag“ 	<ul style="list-style-type: none"> Problem der Biodistribution, Monitoring notwendig Bislang Herstellung und Einbringen sehr aufwendig und kostspielig (z.B. für Studien mit großen Fallzahlen) 	<ul style="list-style-type: none"> Telomelysin, Ad-hTERT-NTR/CB1954, hTERTp-HRP/IAA
<i>Antisense (AS)-Oligonukleotide (ODNs)</i>			
<ul style="list-style-type: none"> direkte Hemmung der TA durch modifizierte/nicht-modifizierte DNA oder RNA mit konsekutiver Downregulation von hTERT/hTERC oder kompetitiver Hemmung der hTERC-Template-Region 	<ul style="list-style-type: none"> sehr Tumorspezifisch leichtere Herstellung Fehlen von MDR (Multidrug-Resistance Mechanismen) 	<ul style="list-style-type: none"> „phenotypic lag“ Downregulation der Telomerase-Genexpression ist nicht gleichzusetzen mit kompetitiver Hemmung und kann auch weitere Nebeneffekte hervorrufen Einige Methoden erzeugen schnelle Zytotoxizität, unabhängig von der Telomerenlänge 	<ul style="list-style-type: none"> GRN163L (98) 2'-O-methyl-RNA (153) PS-ODN (153)
<i>„Small-molecule“-Inhibitoren</i>			
<ul style="list-style-type: none"> Modulieren/Hemmen innerhalb des Signalweges am hTERT-Promotors z.B. als <i>G-Quadruplex-Stabilisatoren</i> oder direkte Enzymhemmung von hTERT (BIBR1532) oder hTERC 	<ul style="list-style-type: none"> kostengünstig, gut herstellbar, hohe Bioverfügbarkeit viele Angriffspunkte innerhalb des Signalweges wählbar gut zugänglich für präklinische Studien 	<ul style="list-style-type: none"> „phenotypic lag“ weitere, Telomerase-unabhängige Nebeneffekte durch Hemmung des entsprechenden Signalwegs zu erwarten nicht allein Telomerase-spezifische Wirkung 	<ul style="list-style-type: none"> BRACO19, RHPS4, Telomestatin BIBR1532 (190)

Zu den unterschiedlichen Ansätzen sind bislang eine große Anzahl präklinischer – und teils klinischer Studien erfolgt. Diesbezüglich wird auf die ausführlichen Übersichtsarbeiten von Shay et al. (2008) und Ruden et al. (2013) verwiesen (218) (203). Im Folgenden soll lediglich eine kleine Auswahl aktueller oder für diese Arbeit relevanter Studien wiedergegeben werden.

Small-Molecule-Inhibitoren

- Brassat et al. (27) zeigten für p53-negative BCR-ABL positive *CML-Zelllinien* unter Behandlung mit BIBR1532 („Small-Molecule“-Inhibitor), dass trotz kritischer Telomerenverkürzung kein Effekt auf Wachstumskinetik oder Steigerung der Apoptoserate zu erkennen war. Parallel wurde das Wachstumsverhalten von Zellen mit genetischer Telomeraseinhibition (durch eine *DNhTERT-Mutante*) beurteilt. Hierbei zeigte ein Teil der Zellen, bei sichtbarer Telomerenverkürzung, lediglich einen geringfügigen Proliferationseinbruch, aber letztendlich ein Entkommen aus Seneszenz/M2-Stadium (Crisis), der andere Teil der Zellen wuchs trotz messbarer Telomeraseinhibition scheinbar unverändert. Nach retroviraler Transfektion eines induzierbaren p53-Vektorkonstruktes in Telomerase-negative CML-Zellen kam es zum Zellverlust und letztlich vollständigen Absterben der Zellpopulation. Die Autoren folgerten, dass *funktionelles p53* vorhanden sein muss, um die gewünschte Wirkung der Telomeraseinhibition (kritische Telomerenverkürzung mit konsekutivem Zellarest und Apoptose) zu vermitteln.

In weiteren präklinischen Studien war eine erfolgreiche Telomeraseinhibition mit BIBR1532 abhängig von der ausgewählten Tumorentität. So konnte u.a. für eine Zelllinie vom *Lungen-Ca* ebenso wie für p53-negative Zelllinien vom *Fibrosarkom*, *Mamma-Ca* und *Prostata-Ca* eine erfolgreiche Telomerenverkürzung und Proliferationsverlust in hohen Passagen gesehen werden (58), während in anderen Arbeiten, trotz initialer Telomerenverkürzung durch BIBR1532, für das *Chondrosarkom* und *Keimzelltumore* kein längerfristig erfolgreicher Proliferationsverlust erreicht werden konnte (27).

Antisense-Oligonukleotide

- Erst 2014 untersuchten Burchett et. al den Einfluss des Antisense-Oligonukleotid **Imetelstat (GRN163L** = „lipid-attached phosphoramidate oligonucleotide“) auf zehn *Pankreaszelllinien in vitro*. Es konnte für alle gezeigt werden, das Imetelstat zu einer Hemmung der Telomeraseaktivität (TA) in den Zellen führte, unabhängig von initialer Telomerenlänge und TA. Unter chronischer Exposition (zwei der Zelllinien) kam es nach acht Wochen zu einem Proliferationsstopp und bei weiterer Inkubation letztlich zum vollständigen Zellverlust. Der Effekt von Imetelstat war nach Beendigung der Exposition reversibel, so konnte ab der dritten Woche eine Reaktivierung der TA und Verlängerung der Telomere beobachtet werden (37).

In einer anderen Arbeit wurde für *AML-Stammzellen* zunächst im Vergleich von *TERC*^{-/-} (= negativ für Template der RNA-Untereinheit der Telomerase durch retrovirale Transfektion) und Wildtyp-Zellen *in vitro* gezeigt, dass die genetische Deletion von *TERC* im retroviralen AML-Maus-Modell Zellzyklusarrest und Apoptose der leukämischen Stammzellen (LSC) induzierte, bei nachweisbar verkürzten Telomeren. Ebenso konnten *in vivo* im Xenograft-Modell durch eine genetische oder pharmakologische (Imetelstat) Inhibition der Telomerase, die Stammzellen angegriffen, ein Fortschreiten der Leukämie behindert und eine größere Latenzzeit zwischen Ende der Chemotherapie und einem Rezidiv erreicht werden. *In vitro* und *in vivo* zeigte sich, dass der erzielte Effekt auf die LSC von der Anwesenheit von *p53* und der Länge der Telomeren abhängig war (31).

- Für Imetelstat (GRN16L) sind weitere zahlreiche *präklinische Studien* erfolgt. So wurde Imetelstat zum Beispiel erfolgreich beim *Glioblastom* (*in vitro* und im Mausmodell) getestet und zeigte sich dort synergistisch mit Radio -und Chemotherapie (154).

In *Myelomzellen* wirkte GRN163L *in vitro* und *in vivo* synergistisch mit dem Hsp90-Inhibitor 17AAG (212). Auch für das *Barrett-Adeno-Ca* konnte dieselbe Arbeitsgruppe eine effektive Hemmung (*in vitro/vivo*) zeigen, synergistisch in Kombination mit Ritonavir und Doxorubicin (213).

Auch für das *Mamma-Ca* konnte in verschiedenen Studien eine Effektivität von GRN16L bezüglich kritischer Telomerenverkürzung und Abnahme der Proliferation gesehen werden. So zeigte sich bei Gellert et al. für das Adeno-Ca der Mamma in Zellkultur ein Effekt nach einer Latenzzeit von zwei Wochen Behandlung (77). Eine Wirksamkeit konnte auch bei einer Studie an verschiedenen Subtypen des Mamma-Ca (u.a. HER2+ und Doxorubicin-Resistenz) in vitro/ vivo belegt werden (104). In gleicher Weise konnte in neueren Arbeiten gezeigt werden, dass Imetelstat beim HER2(+)-Mamma-Ca die TA in CSC- (cancer-stem-cells) und non-CSC-Subpopulationen hemmt sowie Anzahl und Funktion der Tumor-Stammzellen reduziert. Zudem wurde in dieser Arbeit ein synergistischer Effekt in Kombination mit Trastuzumab (monoklonaler AK bei HER2+ Mamma-Ca) beschrieben (136).

- Auch in der pädiatrischen Onkologie sind Untersuchungen zur Telomerasehemmung mit Imetelstat erfolgt. So konnte in einer *Phase-I-Studie* zu Imetelstat und *Kindern mit refraktären oder rezidivierenden soliden Tumoren* (20 Patienten zwischen 12 Monaten und 22 Jahren alt), bei insgesamt guter Verträglichkeit, bei zwei Patienten (davon ein Patient mit *paraspinalem Ewing Sarkom*) eine partielle Remission erreicht werden. Die Dosis-limitierende Wirkung war hier eine Myelosuppression (231).
- Für Imetelstat sind bereits *Phase-II-Studien* verfügbar. So zeigte sich bei Patienten mit *Myelofibrosis* bei 21% (7/33) eine komplette oder partielle Remission. Als unerwünschte Nebenwirkung entwickelten hierbei jedoch einige Probanden eine Myelosuppression. Das Ansprechen war unter Anderem abhängig vom Mutationstatus (z.B. positiv für JAK2 Mutation, sowie Nachweis/Fehlen weiterer typischer Mutationen Myeloproliferativer Neoplasien oder des Myelodysplastischen Syndroms) und interessanterweise nicht mit der ursprünglichen Telomerenlänge korreliert (227).

Für Imetelstat und Patienten mit *essentieller Thrombozythämie* (10) konnte bei 18/18 Patienten ein Ansprechen auf die Therapie gesehen werden, bei 16/18 sogar eine komplette Remission. Ein molekularer Respons wurde in 7/8 Fällen (positiv

für JAK2-Mutation) erreicht. Die Nebenwirkungen wurden in dieser Studie als mild bis moderat beschrieben (u.a. Anämie, Neutropenie und Kopfschmerzen).

Im Gegensatz dazu konnte in einer randomisierten Phase-II-Studie für das *Nicht-kleinzellige-Lungen-CA (NSCLC)* an 116 Patienten für Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC und Ansprechen auf Standard-Therapie keine Verbesserung bezüglich rezidivfreiem Überleben gesehen werden. Lediglich für Patienten mit kurzen Telomeren konnte ein positiver Trend für rezidivfreies und allgemeines Überleben festgestellt werden (43).

Es sind weitere klinische Studien zu Imetelstat initiiert worden, deren Ergebnisse noch ausstehen, wie für das *Multiple Myelom* (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01242930), *pädiatrische, refraktäre oder rezidivierende Hirntumore* (NCT01836549) und *pädiatrische, refraktäre oder rezidivierende solide Tumore* oder *Lymphome* (NCT01273090).

Immuntherapie

- Für das *Peptid-Vakzin GV1001* (GM-CSF-adjutant, stimuliert CD4+-T-Helferzellen) (109) ist bereits eine *Phase-III-Studie* für Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasierten *Pankreas-Ca* erfolgt. In dem untersuchten Kollektiv von 1062 Patienten (randomisiert in drei Therapiearme – Chemotherapie vs. Chemotherapie plus intermittierende Immuntherapie vs. Chemotherapie plus kontinuierliche Immuntherapie) konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich allgemeinem Überleben gegenüber der Standardbehandlung mit Gemcitabin und Capecitabin gesehen werden (165). Erfolgreicher scheint GV1001 dagegen in der Behandlung des *NSCLC* zu sein. So konnte in einer *Phase-II-Studie* (38 Patienten) ohne schwerwiegende Nebenwirkungen nach vier Wochen Behandlung bei 54% und nach acht Wochen bei 86% eine Immunantwort erreicht werden (194).

1.1.8 Telomerasehemmung und Chemotherapie

Mit Telomerasehemmung als weiterer therapeutischer Option in der Krebstherapie liegt es nahe, diese in Kombination mit konventioneller Chemotherapie zu betrachten. Denkbare Ziele wären synergistische Effekte in der Kombinationstherapie, die Möglichkeit, Resistenzmechanismen innerhalb etablierter Chemotherapie entgegenzuwirken (im Sinne einer (Re)-Sensibilisierung gegenüber dem entsprechenden Zytostatikum) oder vielmehr die Telomeraseinhibition (als vermutet nebenwirkungsarme Therapie) in manchen Bereichen als Alternative zur herkömmlichen Chemotherapie zu verwenden - zum Beispiel in der Langzeittherapie.

Auch hier haben die bislang erfolgten Studien unterschiedliche Ergebnisse hervorgebracht. Einige sind im Folgenden kurz wiedergegeben.

- So konnten Uziel et al. 2010 *in vitro* an der Ewing Sarkom-Zelllinie SK-N-MC sowie einer Zelllinie des Mamma-Ca und der CML, mit der Kombination von GRN163 mit Doxorubicin, Vincristin und Cisplatin zeigen, dass die Zellen nach pharmakologischer Telomerenverkürzung *sensitiver gegenüber Cisplatin* waren, *nicht jedoch gegenüber Doxorubicin und Vincristin*. Als ursächlich hierfür wurde die Telomerenverkürzung (durch Inkubation mit GRN163 in Langzeitkultur) und nicht die Hemmung der Telomeraseaktivität per se gesehen. Auch *in vivo* (Mausmodell mit Zellen vom Pankreas-Ca) fiel ein synergistischer Effekt (bezüglich der Tumorgroße) in der Kombination von GRN163L und Cisplatin auf, während mit der Kombination von GRN163L und Vincristin keine Verbesserung erzielt werden konnte. Doxorubicin wurde nicht *in vivo* getestet (235).
- Wie bereits oben erwähnt, konnte auch für das Barrett-Adeno-Ca *in vitro* und zusätzlich *in vivo* eine *synergistische Wirkung* in der Kombination von GNR16L mit *Doxorubicin* gesehen werden (213).
- Eine ebenfalls synergistische Wirkung von Telomeraseinhibition mit dem Antisense-Oligonukleotid „2'-O-MOE“ (2'-O-Methoxyethyl-Oligonucleotid) und Cisplatin zeigten bereits im Vorfeld Chen et al.. So kam es unter

Langzeitinhibition der Telomerase (55d und 65d) mit nachweisbarer Telomerenverkürzung für die eine Prostata-Ca-Zelllinie (RB(-), p53(+)) zu einer *Sensibilisierung gegenüber Cisplatin und Carboplatin, nicht jedoch gegenüber Etoposid, Doxorubicin und Paclitaxel*. Bei der zweiten getesteten Prostata-Ca-Zelllinie (RB(+), p53(+)) konnte für keines der fünf Zytostatika eine Sensibilisierung erreicht werden (42).

Entgegen der oben genannten Untersuchungen ergaben sich in weiteren Studien folgende Ergebnisse.

- An zwei Zelllinien des Cervix-Ca konnte durch retrovirale Transfektion von „small interfering RNA“ (siRNA) eine effektive Telomeraseinhibition erreicht werden. So zeigte sich *in vitro* u.a. eine Verkürzung der Telomere und Abnahme der Proliferationsrate und *in vivo* (im Maus-Modell) eine geringere Kanzerogenität. Die Zellen fielen zudem durch eine *erhöhte Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung und Zytostatika (Doxorubicin, Etoposid und Bleomycin), welche Doppelstrangbrüche induzieren*, auf. Für *Cisplatin und Paclitaxel konnte dahingegen keine* Steigerung der Wirksamkeit belegt werden (176).
- Auch Akiyama et al. konnten in CML-Zellen (K562) einen Zusammenhang zwischen Telomeraseaktivität und Sensitivität gegenüber Doppelstrangbrüche induzierender Agenzien (ionisierende Strahlung und Etoposid) sehen. So waren hTERT-transfizierte K562-Zellen geschützt vor Apoptose, hervorgerufen durch Etoposid oder ionisierende Strahlung, jedoch *nicht vor den DNA-Syntheseinhibitoren Cytarabin oder Hydroxyurea* (1).
- Eine weitere Untersuchung an Chemotherapie-resistenten und -sensiblen AML- und Mamma-Ca-Zelllinien, mit dem Telomerase-Inhibitor BIBR1532 zeigte neben progressiver Telomerenverkürzung und abnehmender Proliferationsrate, eine *Sensibilisierung gegenüber Melphalan und Etoposid*. Eine zunehmende Sensibilisierung gegenüber Doxorubicin konnte dahingegen, in Kombination mit

BIBR1532, *nur für die Doxorubicin-sensible, nicht aber für die Doxorubicin-resistente Zelllinie* demonstriert werden. Auch kam es bei der Doxorubicin-resistenten Zelllinie nicht zur Telomerenverkürzung unter Therapie mit BIBR1532 und Doxorubicin. Der Synergismus zeigte sich als abhängig von der Telomerenlänge, da nach Beendigung der Telomeraseinhibition mit zunehmender Passage (und Zunahme der Telomerenlänge), die Effekte rückläufig waren (248).

- Bei einer mit unseren Untersuchungen am Ewing-Sarkom vergleichbaren Arbeit führte die retrovirale Transfektion eines DNhTERT-Vektors an der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH zu nachweisbarer Reduktion der TA und Verkürzung der Telomerenlänge. Die Zellen waren anschließend (ähnlich zu oben genannter Untersuchung am Cervix-Ca von Nakamura et al.) *sensitiver gegenüber ionisierender Strahlung und Ifosfamid*, jedoch zeigten sie *eine Resistenzzunahme gegenüber Doxorubicin, Etoposid und Cisplatin*. Dieser Effekt konnte in Zellkultur gesehen werden, war nach 24h am stärksten und nahm im Weiteren bis 96h kontinuierlich ab (251).

Auch Betrachtungen bezüglich der Wirkung bereits etablierter Chemotherapie auf die Telomeraseaktivität sind erfolgt.

- Für den Einsatz von Doxorubicin zeigte sich in verschiedenen Untersuchungen, dass es bei *Doxorubicin-resistenten Zellen* zu einer *Steigerung oder unveränderten Aktivität der Telomerase* kam, während *Doxorubicin-sensible* Zellen in therapeutischen Bereichen eine *Aktivitätsminderung* der TA aufwiesen. So konnte zum Beispiel beim Mamma-Ca gesehen werden, dass die Telomeraseaktivität in Doxorubicin-resistenten Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin zunahm (110) bzw. beim Magen-Ca sich Doxorubicin-resistente Zellen unverändert bezüglich ihrer TA zeigten, im Vergleich zur Reduktion bei den Doxorubicin-sensiblen Zellen (268). Ebenfalls eine Reduktion der TA durch Doxorubicin konnte in toxischen Konzentrationen beim Ewing-Sarkom in vitro gesehen werden, während es in nicht-toxischen Dosen sogar zu einer

Aktivitätssteigerung der Telomerase kam. Auch in vivo konnte eine vorübergehende (bis 11 Tage) Aktivitätsminderung festgestellt werden (140).

- Einige Studien berichteten für *Etoposid* von einer *Hochregulierung* der Telomeraseaktivität bei Leukämie-Zelllinien (114, 169), Zelllinien des Neuroblastoms (114) und des Pankreas-Ca (130), welche zeit- und konzentrationsabhängig waren (248), wohingegen andere Studien (147, 189) diesen Effekt in Zellkultur nicht bestätigen konnten, jedoch die Beobachtung teilten, dass es zu einem späteren Zeitpunkt und nach Ende der Behandlung zu einer *Abnahme der TA* kam (248).
- Kanzawa et al. untersuchten Zusammenhänge zwischen Telomeraseaktivität und Resistenz gegenüber Temozolomid (TMZ) beim malignen Gliom. So zeigten sich Tumorzellen mit einer Resistenz gegenüber Temozolomid (assoziiert mit einem hohen Level an Alkylguanin-Alkyltransferase –AGT) nach Inkubation mit dem AGT-Inhibitor O(6)-BG resensibilisiert gegenüber TMZ bei gleichzeitiger Unterdrückung der Telomeraseaktivität. *TMZ sensible Tumorzellen* zeigten unter TMZ-Therapie ebenfalls eine *Downregulation von hTERT* und damit reduzierte Telomeraseaktivität (118)
- In diesen Kontext ist auch die Arbeit von Zhang et al. einzuordnen. Hier konnte für den Einsatz von *DNA-Methyltransferase-Inhibitoren* (DNMTIs) wie 5-Azacytidin (5-AZA) bei AML-Zellen eine Dysfunktion der Telomeren mit *Downregulation der hTERT-Expression* sowie Apoptose gesehen werden. Analog dazu führte eine Überexpression von hTERT zu einer abgeschwächten Wirkung von 5-AZA bezüglich DNA-Schaden, Telomeren-Dysfunktion und Apoptose (273).

Insgesamt sind die Ergebnisse der hier genannten Arbeiten teils als kontrovers bezüglich der postulierten Synergismen von Telomeraseinhibition und den verschiedenen Zytostatika zu sehen, sodass auch die Erklärungen für Wirksamkeit (z.B. Schädigungsmechanismus des einzelnen Zytostatikums), Studienaufbau und

Unterschiede in Art der Telomeraseinhibition und des behandelten Tumors hinterfragt werden sollten. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Effektivität einer Kombination von Telomeraseinhibition und Chemotherapie in signifikanten Bereichen nachgewiesen werden konnte, die Mechanismen jedoch komplex und bei Weitem noch nicht verstanden sind, sodass allgemeingültige Aussagen für bestimmte Tumorentitäten oder Zytostatikagruppen nicht zu treffen sind.

Es lässt sich allgemein jedoch feststellen, dass die Telomerase bzw. hTERT, neben der bekannten Funktion zur Aufrechterhaltung der Telomerenlänge, zu einer Förderung von Überleben, Chemoresistenz sowie Invasion und Metastasierung von malignen Zellen (und zwar unabhängig von der Telomerenlänge) führen kann (273), sodass sie einen wichtigen Angriffspunkt in der Onkologie darstellt.

1.2 Das Ewing Sarkom

Das Ewing Sarkom wurde erstmals im Jahre 1921 von James Ewing beschrieben als rundzelliger Knochentumor eines 14-jährigen Mädchens und weiterer Fallserien (71).

Aktuell spricht man von der „Familie der Ewing Sarkom Tumore“ (Ewing's sarcoma family tumors, ESFT), zu welcher die „klassischen“ Ewing-Sarkome der Knochen (ETB oder EWS), die extraossären Ewing-Sarkome (EOE oder aES = atypische ES), die primitiven (oder peripheren) neuroektodermalen Tumore (PNET) und die Askin-Tumore der Brustwand gehören (5, 7, 111).

1.2.1 Epidemiologie

Das Ewing Sarkom ist der zweithäufigste primäre Knochentumor des Kindes- und Jugendalters und macht dabei ca. 40% aller Knochentumore (168) bzw. 10-15% aller primären Knochentumore aus (115). Die jährliche Inzidenz liegt bei 2,9 -3,3/1.000.000 Einwohner (50). Der mediane Erkrankungsgipfel liegt um das 15. Lebensjahr (230), zudem wird eine Knabenwendigkeit (1,3:1) mit zunehmendem Lebensalter beschrieben (151). Eine genetische Prädisposition für das Ewing Sarkom ist bislang nicht bekannt. Auffällig ist jedoch, dass dieser Tumor in der asiatischen sowie der afrikanischen Bevölkerung deutlich seltener vorkommt als in der weißen Bevölkerung (96, 200). Als

mitursächlich hierfür wird u.a. ein spezifischer Polymorphismus im EGR2-Gen (kooperiert mit dem Genprodukt der EWS1-FLI-1-Fusion) gesehen (23).

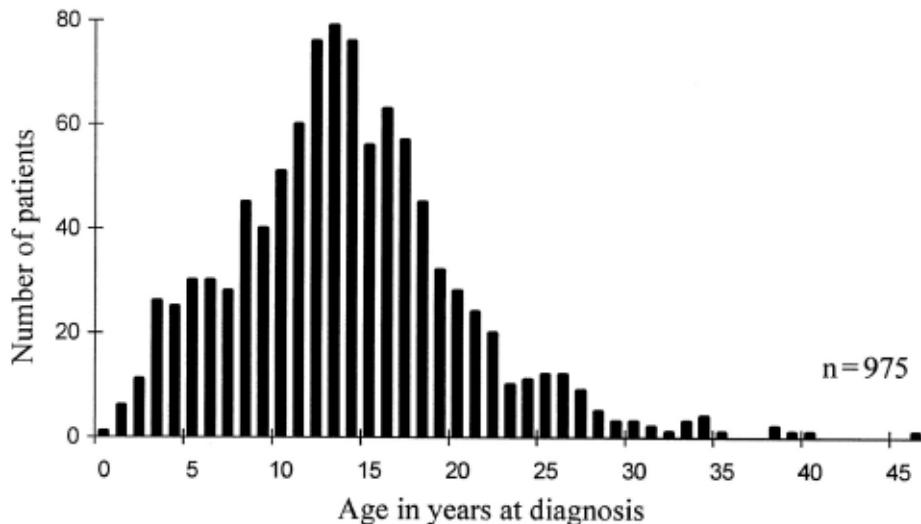


Abbildung 1.2.1-a: Altersverteilung des Ewing Sarkoms. Mit medianem Altersgipfel um das 15. Lebensjahr. Aus „Prognostic Factors in Ewing’s Tumor of Bone: Analysis of 975 Patients From The European Intergroup Cooperative Ewing’s Sarcoma Study Group“ (50)

1.2.2 Ätiologie und Lokalisation

Insgesamt ist die Familie der Ewing Sarkome der Gruppe der „klein-blau-rundzelligen“ Tumore im Kindesalter zugehörig, welche sich durch eine immunhistochemische und klinische Heterogenität bei molekularbiologischer Homogenität auszeichnen (59).

Zu den „klein-blau-rundzelligen“ Tumoren zählen auch das Neuroblastom, das Rhabdomyosarkom und die Non-Hodgkin-Lymphome (191).

Das Ewing Sarkom entwickelt sich aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) mesodermalen Ursprungs oder mit Ursprung aus dem Neuralrohr (85). Für die ESFT des Knochens wird vermutet, dass sie im Markraum des Knochens entstehen, rasch zur Rinde fortschreiten und dort eine Weichgewebekomponente bilden, während die ESFT des Weichteilgewebes oft angrenzend zum Knochen (ohne sichtbare, intraossäre Komponente) oder in isolierten Weichteilgeweben entstehen (193).

Lokalisiert ist das Ewing Sarkom typischerweise v.a. im Bereich des Beckens und der langen Röhrenknochen (Femur, Tibia, Fibula und Humerus). Hierbei tritt der Tumor im Gegensatz zum Osteosarkom in der Regel diaphysär und nicht metaphysär auf. Daneben

ist häufig ein Befall der Brustwand beschrieben. Seltener tritt ein extraossärer Befall im Weichteilgewebe auf (18, 115, 151).

In ca. 25% der Fälle ist der Tumor bei Diagnosestellung primär metastasiert (Lunge, Knochen oder Knochenmark). Eine Metastasierung in Lymphknoten, Leber oder zentrales Nervensystem ist eher selten (18, 230).

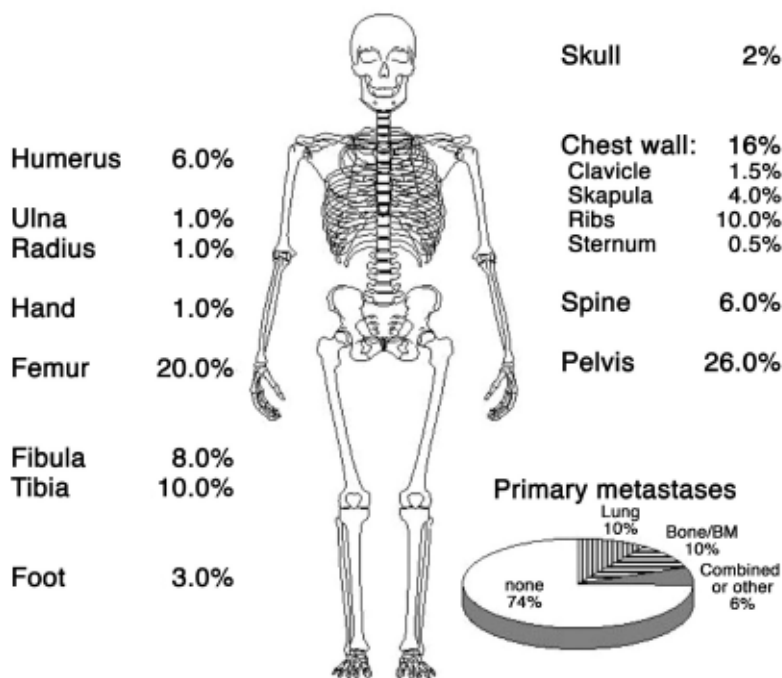


Abbildung 1.2.2-a: Häufige Lokalisationen des ossären Ewing Sarkoms. Primärer Befall v.a. diaphysär im Bereich der langen Röhrenknochen, sowie des Beckens (18).

1.2.3 Tumorbiologie und Zytogenetik

Zytogenetisch zeichnen sich ESFT durch eine reziproke Chromosomen-Translokation aus, welche typischerweise einhergeht mit einer Fusion des EWSR1-Gen (EWS) (lokalisiert auf Chr22q12) mit einem ETS-Gen. In 90-95% ist der EWS- Fusionspartner das FLI1-Gen (t(11;22)(q24;q12)), aus welchem ein EWS-FLI1-Fusions-Onkoprotein entsteht. Weitere Fusionspartner sind das ERG-Gen (bis 10%) sowie seltener ETV1, E1AF und FEV (236).

Dem EWS-ETS-Fusionsprodukt wird eine wichtige Funktion für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der malignen Ausdifferenzierung des Tumors zugeschrieben, ebenso wie die Unterdrückung der zellulären Seneszenz. Der Ursprung hierfür soll vor allem in einer geänderten transkriptionalen Aktivität liegen (193). Selvanathan et al. konnten zudem kürzlich für EWS-FLI1 zeigen, dass es eine wichtige Funktion im Rahmen des alternativen Spleißens (u.a. für das TERT-Gen) innehat (211). Dennoch scheint das EWS-ETS-Fusionsprodukt nicht alleine ursächlich für die maligne Transformation der Ewing Sarkome zu sein. Auch sekundäre (numerische und strukturelle) chromosomale Aberrationen werden in über 80% der Tumore beschrieben (z.B. Deletion des CDKN2A-Lokus, Mutationen von p53 oder pRb), deren Veränderungen u.a. einen prognostischen Einfluss haben (193). In diesen Bereich fällt auch eine Veränderung an Chromosom 1q. Hier konnte in einer Untersuchung von Mackintosh et al. an 105 Ewing Sarkom Patienten bei 31% ein Zugewinn im Bereich von 1q (1qG) gesehen werden. 1qG kodiert unter anderem für das Protein CDT2 (Ubiquitin-Ligase), welches in diesen Tumoren ebenfalls verstärkt nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich eine deutliche Assoziation von 1qG und hoher Rezidivwahrscheinlichkeit sowie schlechtem allgemeinem Überleben (152).

Eine weitere, kürzlich publizierte Arbeit beschreibt den modulierenden Einfluss von EWS-FLI-1 auf EGR2 (early growth response 2), einem Gen, das auf Chromosom 10q21.3 lokalisiert ist und ebenfalls für einen Transkriptionsfaktor kodiert, welcher verantwortlich ist für Proliferation, Differenzierung und/ oder Überleben verschiedener Zelltypen (u.a. mesodermaler Osteoprogenitorzellen und Schwann-Zellen der Neuralleiste). EWS-FLI-1 fördert die EGR2-Expression, ein Knockdown von EGR2 führt zu Hemmung der Proliferation *in vitro* und fördert eine Regression von Ewing Sarkom Xenografts (85).

Auch scheint für die EWS-FLI1 vermittelte, zelluläre Transformation beim ES eine intakte Expression von IGF1R notwendig zu sein, sodass der IGF1-Rezeptor ebenfalls ein interessantes Target in der Therapie des Ewing Sarkoms darstellt (245).

1.2.4 Telomeraseaktivität beim Ewing Sarkom

Es gibt verschiedene Arbeiten, welche Telomeraseaktivität (oder hTERT) sowohl in Tumorproben von Patienten mit primäre Ewing Sarkom als auch in Ewing Sarkom

Zelllinien nachweisen konnten. Der Nachweis von Telomeraseaktivität lag hierbei oft zwischen 70-100%, mit einem großen Anteil hoher TA, wie die folgende Tabelle zeigt.

Tabelle 1.2.4-a: Nachweis von TA (oder hTERT) beim Ewing Sarkom (Auswahl an Studien, in Anlehnung an (193))

Probe/Zelllinie	Telomeraseaktivität (TA) oder hTERT (Positive/Untersuchte Proben)	Quelle
Gewebeproben von ES-Patienten (davon zwei PNET)	100% (7/7) TA (davon bis auf PNET alle hohe TA)	(206)
Zelllinie PNET (STA-ET1) (zusätzlich auf Xenograft etabliert)	100% (1/1) TA	(140, 210)
Gewebeproben von ES-Patienten (davon eine Lungenmetastase)	94% (15/16) TA, davon 66% (10/15) hohe TA	(4)
Zelllinien PNET (KN-OH1, GR-OH1, KKJ-P)	100% (3/3) TA (hochaktiv)	(131)
Patienten mit primären ES (Gewebe- o. periphere Blutprobe)	84% (21/25) TA (Gewebeproben) davon 71% hohe TA 67% (6/9) (periphere Blutproben) davon 56% hohe TA	(183)
Zelllinien Ewing Sarkom	100% (2/2) TA hochaktiv	(226)
Gewebeproben von ES-Patienten (Biopsie vor Therapiebeginn)	78% (24/31) hTERT-Expression (Immunhistochemische Färbung)	(75)
Gewebeproben von ES-Patienten	12,5% (1/8) TA (Primärtumor) 100% (5/5) TA (Metastasen)	(223)
Gewebeproben u. Zelllinien von ES-Patienten	70% (21/30) TA (Gewebeproben) 90% (9/10) TA (Zelllinien)	(234)
Zelllinien Ewing Sarkom (TC32, A4573, TC71, STA-ET7.2, SKES)	100% (5/5) hTERT-Gen (Im Rahmen einer Arbeit über alternatives Spleißen durch EWS-FLI1)	(211)

Nicht nur als weiteres Anti-Tumor-Target, sondern auch als Prognosefaktor oder zur Verlaufsbeurteilung liefert Telomeraseaktivität einen interessanten Angriffspunkt. Zwar konnte bislang für das Ewing Sarkoms keine Korrelation zwischen TA des Primärtumors und Prognose gesehen werden (4, 183), dennoch scheint sie einen Verlaufparameter unter Therapie und im Follow-Up darstellen zu können (siehe 1.3.4.) (183). Auch konnte für das Ewing Sarkom eine Reduktion der TA durch toxische Dosen von Doxorubicin (140) und Imatinib festgestellt werden (193), was die Hypothese von TA als Verlaufparameter (Ansprechen auf die Therapie) unterstützen würde.

Dass Telomeraseaktivität im Ewing Sarkom einen hohen Stellenwert zu haben scheint, ergibt sich zusätzlich aus der Beobachtung, dass das Fusionsprodukt von EWS-FLI-1

(nachweisbar in 90-95% aller ESFT), durch transkriptionelle Aktivierung zu einer Hochregulation der hTERT-Genexpression und damit Zunahme der TA führt (226). Dies erklärt unter anderem auch den hohen Anteil an Ewing Sarkom Proben mit hoher TA (siehe Tabelle 1.2.4-a). Für ein weiteres Fusionsprodukt (EWS-ER81) konnte ebenfalls eine Aktivierung von hTERT nachgewiesen werden (75). Ebenso führt c-Myc zu einer Aktivierung des hTERT-Promoters und c-Myc wiederum wird durch EWS-FLI1 aktiviert (193). Zudem sind beim Ewing Sarkom, z.B. im Gegensatz zum Osteosarkom, bislang deutlich weniger Zellen beschrieben, welche alternative Mechanismen zur Verlängerung ihrer Telomeren (ALT-Mechanismus) nutzen (193). So zeigten z.B. Ulaner et al. an 30 Ewing Sarkom Tumorproben (21/30 TA positiv) und 10 Ewing Sarkom Zelllinien (9/10 TA positiv) im Vergleich zu 60 Gewebeproben von Osteosarkomen, dass lediglich in der einen Telomerase-negativen Zelllinie Hinweise auf ALT (lange, heterogene Telomere) gesehen werden konnten, jedoch in keiner der 30 Tumorproben. Im Gegensatz dazu fanden sich bei 38 der 60 Osteosarkom Tumorproben Hinweise auf ALT (234).

1.2.5 Klinik

Die Zeit zwischen ersten Symptomen bis zur Diagnosestellung ist oft lang (medianes Intervall von 2 – 5 Monaten). Ein längeres Zeitintervall ist häufig mit höherem Alter und einem Primärbefall im Becken assoziiert, jedoch nicht mit Metastasierungsstatus, chirurgischem Outcome oder Überleben (23).

Symptome sind abhängig von der Lokalisation des Primärtumors und dem metastatischen Befall. Erstsymptome sind gewöhnlich Schmerzen in der vom Tumor betroffenen Region, welche in der Regel aktivitätsbezogen zunehmen, jedoch meist auch nachts persistieren. Häufig werden die Schmerzen im Zusammenhang mit einem kürzlich erlittenen Trauma gesehen. Im Weiteren folgt oft eine Schwellung der betroffenen Region. Bei Befall der Wirbelsäule oder peripherer Nerven können entsprechende Ausfallerscheinungen hinzukommen. Bei ca. einem Drittel der Patienten zeigen sich Allgemeinsymptome, wie Fieber bzw. eine B-Symptomatik, welche oft mit fortgeschrittener oder primär metastasierter Erkrankung korreliert sind (115).

1.2.6 Diagnostik und Stadieneinteilung

In der Diagnostik des Primärtumors steht zunächst die radiologische Diagnostik im Vordergrund (Röntgen nativ in 2 Ebenen, ergänzend ggf. nativ Computertomographie (CT) und Darstellung der Primärtumorregion mittels MRT). Dies dient ebenfalls der weiteren operativen Planung und als Basis für die Verlaufskontrollen unter Chemotherapie. Die Sicherung der Diagnose erfolgt dann durch eine Biopsie mit entsprechender histologischer Begutachtung und molekularbiologischer Einteilung (67). Für das weitere Staging werden neben der bereits erwähnten radiologischen Diagnostik noch Röntgen/ CT Thorax, Knochenszintigrafie und/oder FDG-PET-(/ CT), Knochenmark-Aspiration und Stanzbiopsien aus vom Primärtumor entfernten Regionen, empfohlen. Auch kann bei Verdacht auf ZNS-Befall eine Lumbalpunktion erfolgen (23, 67).

Eine klassische TNM-Klassifikation wird für das Ewing Sarkom in der Praxis nicht angewendet. Es wird der *loko-regionale Befall* abgegrenzt von einer *primären Metastasierung in Lunge und /oder Knochen/ Knochenmark*, da diese mit einer schlechteren Prognose korreliert ist. Auch wird bei lokalem Befall das initiale Tumolvolumen in die Stratifizierung mit einbezogen, da die Größe des Tumors ebenfalls einen Einfluss auf die weitere Behandlung hat (67).

Abhängig von der Einteilung in entsprechende Risikogruppen der aktuellen Therapieprotokolle (z.B. loko-regionaler Befall = R1; schlechtes Ansprechen auf Initialtherapie oder Tumolvolumen > 200ml = R2; primär metastasiert = R3) erfolgt dann die Einteilung zur weiteren Therapie (siehe Protokoll „EWING 2008“ Kapitel 1.3.).

1.3 Therapieoptionen beim Ewing Sarkom

Die Therapie für das Ewing Sarkom umfasst eine systemische Kombinations-Chemotherapie in Verbindung mit chirurgischer Therapie und/oder Strahlentherapie zur lokalen Tumorkontrolle. Das Therapieregime richtet sich nach der Ausbreitung des Tumors (loko-regional vs. primär metastasiert vs. rezidivierend sowie dem initialen Ansprechen auf die Chemotherapie) und beinhaltet in der Regel immer eine *präoperative Chemotherapie* (chemotherapeutische Induktionsphase) vor weiteren Maßnahmen zur

lokalen Tumorkontrolle (23). Im Anschluss an die *lokale Therapie (Chirurgisch und/oder Radiatio)* folgt dann eine *adjuvante Chemotherapie*. Bei primärer oder sekundärer Metastasierung und schlechtem histologischen Ansprechen auf die konventionelle Chemotherapie ist eine Hochdosischemotherapie mit nachfolgender Retransfusion autologer hämatopoetischer Stammzellen zu erwägen (67).

Die Therapie erfolgt multizentrisch anhand standardisierter Protokolle in entsprechenden Kliniken. Aktuell wird in Deutschland nach dem Protokoll „*EWING 2008*“ therapiert. Hierbei handelt es sich um ein gemeinsames Therapieprotokoll verschiedener europäischer Gesellschaften (CCLG, COG, DCOG, EORTC, GPOH, SFCE, SIAK und SSG). Die folgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Behandlungsschemas des Protokolls „*EWING 2008*“.

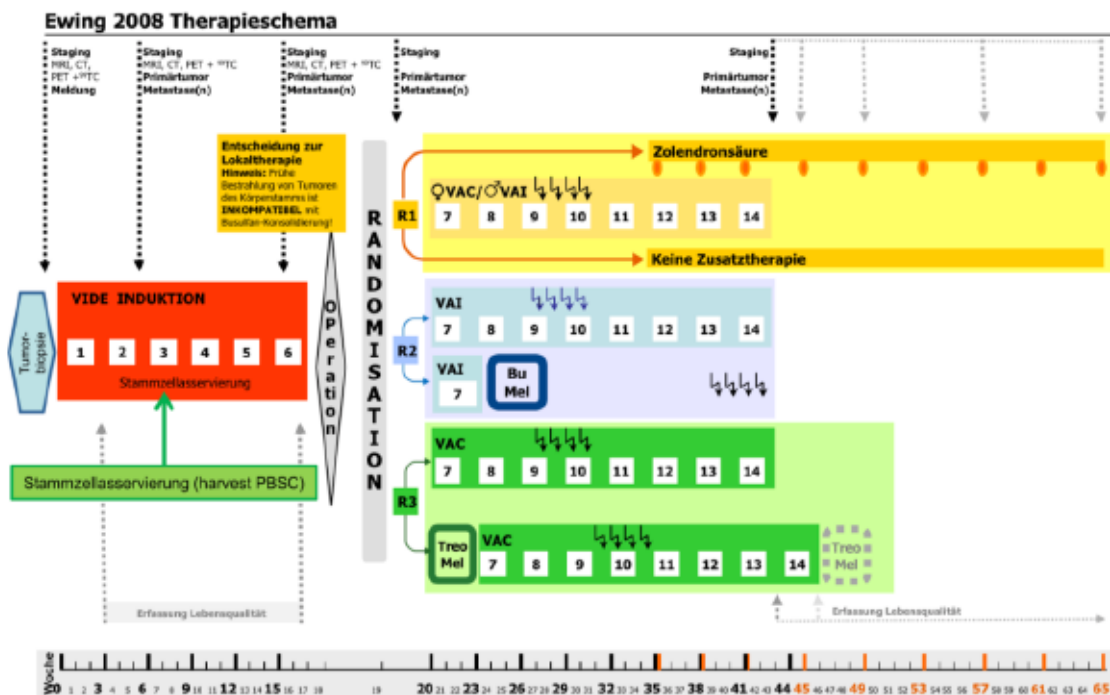


Abbildung 1.2.6-a: Ausschnitt des Behandlungsschemas aus „*EWING 2008*“. Nach einer gemeinsamen Induktions-Chemotherapie bestehend aus 6 Kursen VIDE (Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin und Etoposid), folgt die Lokalthherapie (Operation und/ oder Bestrahlung). Anschließend werden die Patienten in drei Risikogruppen stratifiziert und entsprechend weiter behandelt. (Abbildung aus (17))

1.3.1 Chemotherapie

Allgemein werden in der Behandlung des Ewing Sarkoms vor allem alkylierende Substanzen (*Ifosfamid*, *Cyclophosphamid*) und Antrazykline (*Doxorubicin*) verwendet. Auch *Etoposid* (Topoisomerase-II-Hemmer), *Actinomycin D* (interkalierendes Antibiotikum) und *Vincristin* (Vincaalkaloid) spielen eine wichtige Rolle. Bei histologisch schlechtem Ansprechen auf die Initialtherapie sollte eine Hochdosischemotherapie (HDtx) mit anschließender autologer Stammzelltransplantation erfolgen (67). Das aktuelle Therapieprotokoll sieht hierfür Busulfan und Melphalan (beides Alkylanzien) vor. Bei primär metastasierter Erkrankung wird die Hochdosischemotherapie mit Treosulfan und Melphalan durchgeführt. Auch für das rezidivierende Ewing Sarkom ist eine HDtx eine Option. Allerdings scheint nur eine geringe Anzahl der Rezidiv-Patienten davon zu profitieren (196, 245). Als weitere Agenzien in der Rezidivtherapie haben sich zudem Topotecan (Alkaloid), Irinotecan (Topoisomerase-Hemmer) und Temozolomid (alkylierendes Zytostatikum) bewährt (67). Vielversprechend scheint dabei für das rekurrende oder rezidivierende Ewing Sarkom die Kombination von Irinotecan und Temozolomid zu sein (63-68% Ansprechrate und progressionsfreies Überleben von 3 - 8,3 Monate) (245).

1.3.2 Lokaltherapie (Operative-/ und Radiotherapie)

Bei der Lokaltherapie steht zunächst das Ziel der vollständigen Resektion im Gesunden mittels chirurgischer Intervention im Vordergrund. Bei lediglich inkomplett resezierbaren Tumoren sollte zusätzlich eine Bestrahlung erfolgen. Zwar wird die Bestrahlung als alleinige Therapie (abhängig von Lokalisation und Größe) mit einem höheren Risiko eines Lokalrezidives beschrieben (67), dennoch scheint zwischen den beiden Therapien kein Unterschied bezüglich allgemeinem Überleben zu bestehen. So konnte zum Beispiel in einer Studie der „Children’s Oncology Group“ (465 Patienten) gesehen werden, dass die Bestrahlung ein höheres Risiko eines lokalen Rezidives im Vergleich zur chirurgischen Therapie barg, sich beim Vergleich des Event-freien-Überlebens oder des allgemeinen Überlebens jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ergaben (68). Zusätzlich sollte im Rahmen der Lokaltherapie auch der Entnahmekanal/

Narbenbereich der vorangegangenen Biopsie mitberücksichtigt und vollständig entfernt werden, um die von Tumorgewebe kontaminierten Bereiche zu dezimieren.

1.3.3 Alternative Therapien

Gerade in der Behandlung der primär disseminierten oder rekurrenden/refraktären Ewing Sarkome sind bislang, unter anderem aufgrund bestehend schlechter Heilungschancen, weitere Therapiemöglichkeiten notwendig.

So gibt es zum Beispiel in der Behandlung des metastasierten Ewing Sarkoms eine Phase-II-Studie für den Einsatz von Irinotecan (Topoisomerase-Hemmer) (171) oder Ganitumab (monoklonaler Antikörper gegen IGF1R), welcher ebenfalls für das rekurrende Ewing Sarkom in Erprobung ist. Andere Ansätze/ Studien umfassen weitere monoklonale Antikörper (Pembrolizumab) oder die Immuntherapie in der Rezidivsituation (23). Eine breite und aktuelle Übersicht über alternative/ zusätzliche Therapien beim Ewing Sarkom gibt die kürzlich publizierte Übersichtsarbeit von Vornicova et al. (245). Sie beschreibt als mögliche, weitere Anti-Tumor-Targets in Erprobung u.a. mTOR (Mammalian target of rapamycin), EWS-FLI1, Angiogenesefaktoren (VEGF) und die Telomerase (siehe auch 1.1.7 und 1.1.8). Auch scheinen Bisphosphonate in ESFT-Zelllinien und im Xenograft synergistisch mit der konventionellen Chemotherapie das Tumorwachstum zu hemmen (245). Leider zeigt sich insgesamt, dass die bislang angestrebten Ansätze noch ohne durchschlagenden Erfolg sind, sodass weitere Studien und/ oder Therapiemöglichkeiten notwendig sind. Jedoch wird auch ersichtlich, dass die zusätzlichen Anti-Tumor-Strategien idealerweise in Kombination mit der konventionellen und etablierten Chemotherapie erfolgen sollten.

1.3.4 Prognose

Insgesamt hat sich die Prognose des Ewing Sarkoms über die letzten 35 Jahre (1975-2010) deutlich verbessert (219). So kam es für Kinder (< 15 Jahre) zu einem Anstieg der 5-Jahres-Überlebensrate von 59% auf 78% und für Jugendliche (15- 19 Jahre) von 20% auf 60%. Neben der allgemeinen Überlebensrate gibt es natürlich noch Langzeitfolgen der Therapie zu beachten, welche ein regelmäßiges Follow-up auch noch Jahre nach Therapieende notwendig machen (23). Besonders gefährdete Organe für die Entwicklung

von Langzeitfolgen sind Herz, Nieren und Gonaden (67). Abhängig von der vorangegangenen Therapie können auch weitere Organe (z. B. Lunge) betroffen sein oder Folgen lokoregionaler Therapien auftreten. Die Wahrscheinlichkeit Sekundärmalignome zu entwickeln wird in der Literatur mit 1 – 2% beschrieben (vor allem Leukämien und Sarkome, seltener Karzinome) (67).

Es gibt zahlreiche *prognostische Faktoren*, welche aufgeteilt werden können in Faktoren vor Therapiebeginn und Ansprechen auf die initiale Therapie. Die folgende Tabelle gibt diesbezüglich einen Überblick.

Tabelle 1.3.4-a: Prognosefaktoren für das Ewing Sarkom (in Anlehnung an (23))

Faktoren vor Therapiebeginn	Prognose	
<i>Tumorlokalisierung</i>		
distale Extremität	+	
proximale Extremität	+/-	
zentral oder Becken	-	
<i>Tumorvolumen</i>	> 100-200 ml und/oder > 8 cm Ausmaß	-
<i>Alter</i>	> 15 Jahre	-
<i>Geschlecht</i>	Jungen (vs. Mädchen)	-
<i>Serum LDH</i>	erhöht vor Therapiebeginn (zusätzlich mit großem Primärtumor und Metastasierung assoziiert)	-
<i>Metastasierung</i>	(bei Metastasen generell schlechtere Prognose)	-
- pulmonale Metastasierung	bessere Prognose als extrapulmonale Metastasen	
- Anzahl pulm. Metastasen	nicht relevant, aber unilateraler Befall besser als bilateral	
- Metastasen in Knochen und Lunge	schlechtere Prognose als isolierter Knochenbefall	
- Regionale Lymphknotenbeteiligung	verschlechtert Prognose	
<i>Vorangegangene Malignomtherapie (Ewing Sarkom oder andere)</i>		-
<i>Auffällige Zytogenetik</i>		-
- ≥5 Chromosomenveränderungen zum Zeitpunkt der Diagnose		
- modale Chromosomenzahl < 50		
<i>Nachweisbare Fusionstranskripte in morphologisch unauffälligem KM</i>		-
<i>Weitere biologische Faktoren</i>		-
- Überexpression von p53*)		
- Expression von Ki67		
- Verstärkte Expression der mikrosomalen Glutathion-S-Transferase (GST), da assoziiert mit verstärkter Resistenz gegenüber Doxorubicin		

*) jedoch in prospektiver Analyse der „Children’s Onkology Group“ an TP53-Mutation und/oder CDKN2A-Deletion bei Patienten mit Ewing-Sarkom keine Korrelation bezüglich eventfreiem Überleben gefunden

Ansprechen auf die initiale Therapie	Prognose
<i>Minimaler/fehlender, sichtbarer Tumor</i> nach präoperativer Chemotherapie	+
<i>Weibliches Geschlecht und jüngeres Alter</i> (besseres histologisches Ansprechen auf präoperative Therapie)	+
<i>Abnehmendes PET-Uptake</i> nach Chemotherapie (falls PET-Scan vor und nach Induktionschemotherapie erfolgt)	+
<i>Schlechtes Ansprechen auf präoperative Chemotherapie</i> (erhöhte Gefahr für lokales Rezidiv)	-

Keinen Einfluss auf die Prognose haben pathologische Frakturen und der Grad der neuronalen Differenzierung des Tumors (in der Histopathologie) (23).

Auch hat sich in zwei größeren, prospektiven Fallserien (141, 236) gezeigt, dass entgegen früherer Annahmen eine EWSR1-ETS (*EWS-FLI-1*) Translokation **nicht** mit der Prognose korreliert ist (23). Während früher die (am häufigsten vorkommende) Typ-1 EWS-FLI-1 Fusion als prognostischer Vorteil gesehen wurde, konnte dies zuletzt nicht mehr bestätigt werden. Als mögliche Erklärung hierfür wird eine allgemeine Verbesserung der Therapie über die letzten Jahre gesehen, welche den prognostischen Nachteil für Patienten mit „Non-Typ-1“ eliminiert hat (236).

Dagegen konnte gezeigt werden, dass die sekundäre, genetische Aberration 1qG (unabhängig von den klassischen Parametern) signifikant mit einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit und schlechterem allgemeinen sowie krankheitsfreien Überleben korreliert (152).

Während für einige Tumorarten Telomeraseaktivität mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (193, 237), wird der Nachweis von *Telomeraseaktivität* beim Ewing Sarkom zu Diagnosebeginn bislang als nicht mit der Prognose korreliert beschrieben (75, 183). Lediglich in einer Studie zeigte sich, bei nachweisbarer TA im Primärtumor von 12,5% (1/8) und von 100% (5/5) der Metastasen, eine Korrelation zwischen hoher TA und schlechterer Prognose (223). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die TA mit 12,5% der Primärtumoren deutlich unterhalb der Ergebnisse der übrigen Studien lag (siehe Tabelle 1.2.4-a) (193). Ohali et al. konnten allerdings in ihrer Studie an 31

Patienten mit nicht-metastasiertem Ewing Sarkom zeigen, dass unter Therapie und im Follow-up eine signifikante Korrelation zwischen hoher TA (gemessen im peripheren Blut) und schlechterer Prognose bestand (183).

Eine weitere Studie beschreibt den Einfluss der *Telomerenlänge* auf die Prognose beim Ewing Sarkom. So konnte in einem Kollektiv von 32 Patienten mit Ewing Sarkom gesehen werden, dass kürzere Telomere zu einer verstärkten Chromosomeninstabilität aufwiesen und zum anderen kürzere Telomere signifikant mit einem schlechteren Überleben bzw. einer höheren Wahrscheinlichkeit eines Rezidives korreliert waren (8).

Auch wenn sich die Prognose des Ewing Sarkoms in den letzten Jahren zunehmend verbessert hat, ist sie für das *fortgeschrittene, metastasierte Ewing Sarkom weiterhin sehr schlecht*. Hier liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei lediglich 25%, bei refraktären oder rekurrendem Befall sogar nur bei knapp 10% (237). Als weitere Risikofaktoren gelten der Zeitpunkt und die Form des Rezidives. So sind Frührezidive (innerhalb der ersten zwei Jahre nach Diagnosestellung) ebenso wie kombinierte, systemische Rezidive (mit Knochenbeteiligung) mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet, wohingegen Spätrezidive, isoliert pulmonale oder Lokalrezidive eine bessere Prognose aufweisen (67).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Insgesamt muss die Prognose für das fortgeschrittene, metastasierte Ewing Sarkom, trotz steter Verbesserung der onkologischen und chirurgischen Therapiealgorithmen, weiterhin als schlecht bezeichnet werden, sodass neue Therapieoptionen nötig sind, um diese zu verbessern.

Da auch beim Ewing Sarkom in hohem Maße Telomeraseaktivität nachweisbar ist (siehe 1.2.4), erscheint Telomerasehemmung als potentiell sinnvolle Option, z.B. als adjuvante Therapie und / oder im Rahmen einer Erhaltungstherapie.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Konzept der Telomerasehemmung als adjuvante Therapie zur etablierten Chemotherapie. Aktuell gibt es verschiedene Ansätze zur Telomerasehemmung (siehe 1.1.7). Auch wenn einige Inhibitoren bereits den Weg in Phase-II/-III-Studien geschafft haben, sind allgemeingültige Aussagen noch lange nicht zu treffen. Vielmehr zeigt sich, dass sich der Nachweis positiver Effekte bei einer Tumorart nicht zwangsläufig in anderen Tumorentitäten reproduzieren lässt. Zwar ist Telomerase ein Enzym, welches in über 85% aller Tumoren nachweisbar ist (150), dennoch scheint man Mechanismen der Telomeraseinhibition als neue Anti-Tumor-Strategie (ähnlich der herkömmlichen Chemotherapie) für jede Tumorentität einzeln betrachten zu müssen. Speziell für das Ewing Sarkom sind diesbezüglich bislang nur wenige Untersuchungen erfolgt.

Die in Erprobung befindlichen Telomeraseinhibitoren zeigen je nach Ansatzpunkt (siehe 1.1.7 und 1.1.8) unterschiedliche, teils gewünschte/unerwünschte Nebeneffekte. Um Wechselwirkungen zwischen der Substanz zur Telomeraseinhibition und des Chemotherapeutikums möglichst gering zu halten, wurde in dieser Arbeit die Telomerasehemmung mithilfe eines dominant negativen hTERT-Vektor-Konstruktes (htDNIN) herbeigeführt, zumal sich diese Methode bereits in vorangegangenen Arbeiten als wirkungsvolle Inhibition etabliert hat (251).

Zur besseren Reproduzierbarkeit wurden zwei verschiedene Zelllinien des Ewing Sarkoms gewählt (STA-ET1 und RM-82). Um eine zusätzliche Beeinflussung durch die Vektortransfektion leichter erkennen zu können, erfolgten die Versuche parallel an der entsprechenden (nicht-transfizierten) Mutterzelllinie sowie an Zellen mit einem

Leervektor (enthielt lediglich das Merkmal der Antibiotikaresistenz) und einem hTERT-Wildtyp-Vektor-Konstrukt (exprimiert verstärkt hTERT) (siehe 2.1.2). Überdies wurden die Zellen, zum Nachweis erfolgreicher Vektortransfektion, bezüglich ihrer Telomerenlänge (siehe 2.5) und Telomeraseaktivität (siehe 2.4) untersucht.

Die Zytotoxizitätstestung der transfizierten und nicht-transfizierten Zellen beider Zelllinien (STA-ET1 und RM-82) erfolgte an den vier für das Ewing Sarkoms gut etablierten Zytostatika Doxorubicin, Etoposid, Vincristin und Ifosfamid.

Primäres Ziel dieser Arbeit ist die *Effektivität einer Kombination von Telomerasehemmung und Chemotherapie beim Ewing Sarkom* im Sinne eines „Proof of principle“ zu betrachten, um anschließend eine Aussage treffen zu können, inwieweit Telomerasehemmung als zusätzliche Therapieoption in Frage kommen kann.

Explizit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Konnte durch Einbringen des dominant-negativen hTERT-Vektors (htDNIN) ein Ausschalten der Telomeraseaktivität erreicht werden?
- Führt die mit Hilfe des Wildtyp-Vektors (htWTIN) eingeführte, zusätzliche ektopische Expression von hTERT zu verstärkter Telomeraseaktivität?
- Wie verhalten sich Telomeraseaktivität und Telomerenlänge in den transfizierten/nicht-transfizierten Zellen untereinander bzw. welchen Einfluss haben sie auf das Proliferationsverhalten der Zellen?
- Welchen Einfluss hat die Transfektion auf die Zytotoxizität gegenüber Doxorubicin, Etoposid, Vincristin und Ifosfamid?
- Sind Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien STA-ET1 und RM-82 bezüglich Zytotoxizität, Proliferationsverhalten und Telomerenlänge/Telomeraseaktivität zu erkennen (transfizierte und nicht-transfizierte Zellen)?
- Lassen sich anhand der oben genannten Punkte Schlussfolgerungen ziehen, welche den additiven Effekt einer Kombination von Telomerasehemmung und Chemotherapie beim Ewing Sarkom belegen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Zur Verwendung kamen etablierte, humane Zelllinien von zwei verschiedenen Patienten mit Tumoren aus der Familie der Ewing Sarkome. Es handelte sich um adhären wachsende Zellen, deren Kultivierung auf Kollagen-beschichteten Zellkulturflaschen erfolgte.

STA-ET1 etablierte und charakterisierte humane Zelllinie aus einem peripheren neuroektodermalen Tumor einer 13 Jahre alten Patientin mit Primärlokalisierung im Humerus (3, 135)
(Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. Ambros des St. Anna Kinderspitals in Wien)

RM-82 etablierte und charakterisierte humane Zelllinie aus einem Ewing Sarkom eines 8 Jahre alten Patienten, mit Primärlokalisierung im Femur (239, 240).
(Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. F. van Valen, Labor für experimentelle Orthopädie in Münster)

Tabelle 2.1.1-a: Charakteristika der verwendeten Zelllinien (188, 241)

Zelllinie	STA-ET1	RM-82
Patient	weiblich, 13 Jahre	männlich, 8 Jahre
Tumorlokalisierung	Humerus	Femur
Klassifikation	pNET (Primärtumor)	Ewing Sarkom (Primärtumor)
Zytogenetik	t(11;22)	t(21;22)
EWS-Fusions-Transkript	EWS Ex 7 /FLI-1 Ex 6	EWS Ex 7 /ERG Ex 6
p53-Mutation	wt (Wildtyp)	pArg273His
Imunhistochemische	+++ 10%	+++ 100%
Färbung für p53-Protein	(stark)	(stark)

2.1.2 Transfizierte Zellen

Um den spezifischen Einfluss von Telomeraseaktivität auf das Wachstum der Zellen zu untersuchen, verlangte der Versuchsaufbau vergleichbare Zellen mit einem unterschiedlichen Aktivitätsgrad an Telomerase. Das Prinzip der genetischen Inhibition von Telomeraseaktivität durch ein DNhTERT-Vektor-Konstrukt richtet sich nach den erfolgreichen Versuchen vorangegangener Arbeiten (88) (202).

So wurden neben den beiden Mutterzelllinien (STA-ET1 und RM-82) transfizierte Zellen verwendet, welche zusätzlich die katalytische Untereinheit hTERT in der Wildform (htWT) ektop exprimierten oder dominant-negativ (htDN) für hTERT waren. Zur Selektion erfolglos transfizierter Zellen wurden die Vektoren zusätzlich an einen Vektor mit Neomycin-/Geneticinresistenz (IN) gekoppelt, welcher zudem auch isoliert als „Leervektor“ eingesetzt wurde. Daraus folgten für jeden Versuchsaufbau (pro Zelllinie) vier „Zell-Entitäten“ – Mutterzelle, htWTIN, htDNIN und htIN.

Die transfizierten Zellen wurden uns freundlicherweise aus dem Arbeitskreis von Prof. C. Poremba (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum in Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Im Folgenden sollen die Vektoren und der Mechanismus der Transfizierung nur kurz angesprochen werden. Bezüglich einer ausführlichen Beschreibung wird auf die Dissertation „Characterization of Telomerase as Therapeutic Target for the Treatment of Small Round Blue Cell Tumors“ von Ivonne Braun verwiesen (28).

2.1.3 Die Vektoren

Die transfizierten Zellen beinhalten den retroviralen S11-Vektor (S11-IN). Dieser besteht aus dem BR322-Rückgrat mit Ampicillin-Resistenz (AmpR), einem CMV-Promotor, einer MCS („Multiple Cloning Site“, welche Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme enthält) und einer Eintrittsstelle zu den inneren Ribosomen (IRES), welche als Expressionslinker zwischen dem Gen von Interesse, dem Indikatorgen und dem Gen für Neomycin Resistenz (NeoR) fungiert (28).

Die Herstellung der verschiedenen Vektoren erfolgte mittels Subklonierung der cDNA-Sequenz aus der „Wildtyp-hTERT Mutante“ (htWT) und der „Dominant-Negativ-hTERT Mutante“ (htDN) eines zuvor hergestellten S11hTWIEG- bzw. S11hTDNIEG-Plasmids (-IEG steht für ein grün fluoreszierendes Protein) in den S11IN-Vektor. Für oben

genannte S11hTIEG-Plasmide wiederum bediente man sich nach selbigem Muster aus cDNA-Sequenzen der retroviralen Plasmid-DNA-Vektoren „pBABE-puro-WT“ bzw. „pBABE-puro-DN“ (28).

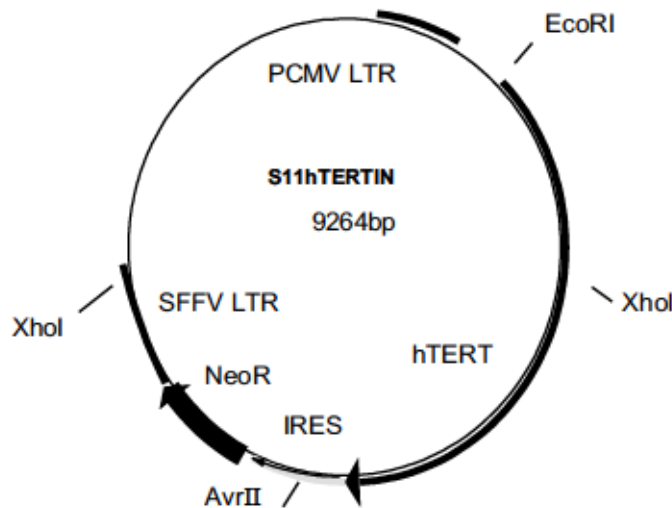


Abbildung 2.1.3-a: Vektor (S11hTERTIN):

AvrII: endogene Schnittstelle (Restriktionsenzym), EcoRI: Restriktionsenzym (Escherichia coli, Stamm RI), hTERT: humane Telomerase Reverse Transkriptase (katalytische Untereinheit der Telomerase), IRES: internal ribosome entry site, NeoR: Neomycin-Resistenz, PCMV LTR: CMV- long terminal repeats - Promoter, SFFV-LTR: spleen focus forming virus - long terminal repeats - Promotor, XhoI: Restriktionsenzym (modifiziert nach (28) - der S11hTERTIEG-Vektor ist hier nicht mit abgebildet)

Mechanismus der Transfizierung

Prinzip: Ziel dieser Methode ist es, stabiles und vererbbares genetisches Material in das Genom einer neuen Zelle zu integrieren (Infektion bzw. Transduktion), indem man die natürliche Infektionsmaschinerie der Viren ausnutzt (44).

Man verwendet einen retroviralen Vektor (siehe 2.1.3), welcher das gewünschte Ziel-Gen enthält, und führt ihn mit der sog. Verpackungszelle zusammen. Dies sind Zellen, welche ein virusspezifisches Antigen (gag – group-specific antigen), ein Gen für reverse Transkriptase und Integrase (pol – polymerase) und ein Gen für Hüllproteine und Typenspezifität (env – Envelope) enthalten. Der Vektor kann nun mit Hilfe einiger Transkriptions- und Prozessionelemente die Verpackungszelle befallen, wird in das Genom integriert und die Zelle produziert die neu eingeführten viralen Transkripte. Die so entstandenen Virus-Partikel sind wiederum in der Lage, die Zielzelle zu infizieren und das Zielgen sowie Selektionsmarker in das Genom der befallenen Zelle zu integrieren (28).

Tabelle 2.1.3-a: Transfizierte Vektoren

Vektor	Eigenschaften	Eingesetzte Zelllinie
S11-IN	Neomycin-Resistenz (neoR)	STA-ET-1/RM-82
S11-hTDNIN	dominant-negativ, neoR	STA-ET-1/RM-82
S11-hTWTIN	wild-typ, neoR	STA-ET-1/RM-82

Zur Generierung dieser retroviralen Partikel wurden *AmphoPack-293* Zellen mit einem S11 –Vektor transfiziert, sodass Gene zur Expression von Telomerase in das Genom der Verpackungszelllinie integriert wurden. Die entstandene Lösung wurde mit den Zielzellen (STA-ET1 und RM-82) zusammengeführt und die Zielzellen wurden ebenfalls infiziert. Der Vorgang richtete sich nach dem Protokoll des *Fugene transfection reagent* (Roche Diagnostics, Mannheim) (28).

Durch Expression des Neomycin-Resistenzgens (Resistenzgen für die Aminoglykoside-Neomycin, Kanamycin und Geneticin) konnten die genetisch veränderten Zelllinien mittels Antibiotikabehandlung mit dem Aminoglykosid Geneticin (G418) selektioniert werden, sodass nur diejenigen Zellen überlebten, deren Transfektion erfolgreich war.

2.1.4 Zytostatika, Lösungen und Reagenzien

Zytostatika

Die in den Versuchen angewandten Konzentrationen der Zytostatika orientieren sich an klinischen Erfahrungen bzw. den Ergebnissen vorangegangener Zytotoxizitätstests unseres Hauses.

Tabelle 2.1.4-a: Überblick über die angewandten Zytostatika

Zytostatikum	Doxorubicin (-hydrochlorid)	Etoposid	Ifosfamid ^a	Vincristin
Handelsname	Adriblastin®	Etoposid-Hexal®	Holoxan®	Vincristinsulfat Hexal®
Firma	Pharmacia GmbH (Karlsruhe)	Hexal AG (Holzkirchen)	ASTA Medica AG (Frankfurt)	Hexal AG (Holzkirchen)
Molekulargew (g/mol)	580	588,57	293,1	923,1
Wirkgruppe	Anthracycline	Topoisomerase Inhibitor	Alkylantien	Vinca-Alkaloide

^a - Da unter den Bedingungen der Zellkultur Ifosfamid nicht zu dem aktiven, alkylierenden Metaboliten 4-Hydroxyperoxy-Ifosfamid metabolisiert wird, wurde dieser für die Untersuchungen in der Zellkultur direkt eingesetzt.

Medien und Seren

Aqua dest	B. Braun Melsungen AG (Melsungen), autoklaviert
Bromphenol- blau	Merck KGaA(Darmstadt)
BSA	Proteinstandard, BSA (5 mg/ml), Serva (Heidelberg)
Collagen	Collagen Typ I, 6mg/ml steril, aus Rattenschwanz, nativ Cell Concepts GmbH (Umkirch), Art.No: Z-17C03-C
CHAPS 1x	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat, Roche Diagnostics (Mannheim)
dem. H ₂ O	hergestellt mit Milli-Q-UF, Millipore (Eschborn)
DMF	N,N-Dimethylformamid, Baker Chemicals (Deventer, Niederlande)
DMSO	Dimethylsulfoxid, Sigma (Deisenhofen)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Molgewicht 372.2 g/l, Sigma (Deisenhofen)
Eisessig	Baker Chemicals (Deventer, Niederlande)
EtOH 70%	Ethanol 70%, Roth (Karlsruhe)
FCS	Foetal Calf Serum, GibcoBRL (Eggenstein)
Geneticin	G418-Sulfat, Invitrogen (Karlsruhe)
HCL	(= Salzsäure), Merck KGaA(Darmstadt)

Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
100%	
Laurylsulfate	(= Sodiumdodecylsulfate), Firma Sigma (Deisenhofen)
MTT	3 [4,5-Dimethylthiazol-2 yl]-2,5 diphenyl-terazoliumbromide Sigma (Deisenhofen)
NaCl	(= Natriumchlorid) Molgewicht 58.44g/l; Merck KGaA(Darmstadt)
PBS-Puffer	Phosphate-Buffered Salines, pH 7.4 ± 0.05 Invitrogen (Karlsruhe), Art.No: 10010-056
Rox Standard	GeneScan™ 1000 ROX™ STANDARD Applied Biosystems (Foster City, California,U.S.A.), Art.No: 401098F
RPMI 1640	plus L-Glutamine (2mM)
Medium	Invitrogen (Karlsruhe), Art.No: 21875-034
SDS	Sodiumdodecylsulphate, Sigma (Deisenhofen)
SodiumCitrat	Molgewicht: 294.1 g/l, Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris 0.5M	(= Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) Molgewicht:121.14 g/l, Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypsin	0,5 g Trypsin (1:250), Ltr. PAA Laboratories GmbH, Linz (Österreich)

Lösungen

Alle unten aufgeführten Lösungen wurden (soweit erforderlich) unter sterilen Bedingungen hergestellt oder nach Herstellung steril filtriert bzw. autoklaviert.

Collagen- Essigsäure 1,6 ml Collagen verdünnt auf 0,2 mg/ml mit 48,4 ml 0,1N Essigsäure

Essigsäure 0,1 N 497,05 ml demineralisiertes Wasser versetzt mit 2,95 ml Eisessig, steril filtriert bzw. autoklaviert

Gefrierlsg. für 5 ml: 2 ml RPMI 1640 (+ L-Glutamine), 2 ml FCS, 1 ml DMSO

Lyse für 500 ml: 100 g SDS wurden in 250 ml demineralisiertem H₂O und 250 ml DMF unter Verwendung eines Magnetrührers gelöst. Anschließend über Papierfilter in Braunglasflasche filtriert.

MTT-Lösung für 50 ml: 250 mg MTT wurden mit 50 ml PBS-Puffer (pH 7.4) gelöst (Aufbewahrung im Kühlschrank unter Lichtschutz)

PBS-EDTA 0,9306 g EDTA wurden mit 5 ml NaOH (1N) gemischt, 500 ml PBS hinzugegeben, pH-Wert 7.3 eingestellt mit konzentrierter HCL (0.1N)

2.1.5 Einmal- Laborbedarf/ Mehrfachartikel

FalconTubes (50 ml) Sarstedt AG&Co (Nümbrecht)

Gefiertubes NUNC (Wiesbaden)

Handschuhe Satin Plus AQL 1,5, SafeSkin GmbH (Neufahrn)

Mikrotiterplatte Multiply®-PCR-Platte 96-Well, Sarstedt AG&Co (Nümbrecht)

Neubauerplatte	0.0025 cm ² , 0.100 mm Brand, Deutschland
Nylonmembran	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
Pipetten, steril, (1ml)	Castor, Steripette
Pipetten, steril (5, 10, 20, 50ml)	Falcon, Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, N.J., U.S.A)
Reaktionsgefäße	1.5 ml, Eppendorf (Hamburg)
Röntgenfilm	Kodak, Biomax MS, Kodak AG (Stuttgart)
Standard Tips	Eppendorf (Hamburg)
Whatmann Papier	Whatmann, Papier Serva (Heidelberg)
Zellkulturgefäße	T25, Greiner bio-one (Frickenhausen)
96-Well- Zellkulturplatten	Microtest™ 96, Tissue Culture Plate, Falcon, Becton Dickinson Labware, Art.No.: 353072

2.1.6 Geräte

ABI 3700	ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster)
Akupipette	pipetus-akku, Hirschmann Laborgeräte (Ebertstadt)

Brutschrank	Sanyo Industries (Nördlingen) Heraeus Instruments GmbH (Düsseldorf) Biotron Labortechnik GmbH (Hilden) (alle: 5% CO ₂ , 37°C)
Blotkammer	Pharmacia Biotech Vacu Gene XL (Freiburg)
Elektrophorese- kammer	peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
ELISA-Reader	Multiskan Ascent Thermo Labsystems (Helsinki, Finnland)
GENE SCANNER™	Model 362 Fluorescent Fragment Analyzer, Applied Biosystems (Foster City, California, U.S.A.)
Hybridisierofen	Medizinische Einrichtung der Universität Münster, Anlagen-Nr. 9612250
Mikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Köln)
Photometer	Eppendorf Bio Photometer (Hamburg)
Rüttler	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH (Hechingen)
Thermocycler	Biometra, TRIO Thermoblock (Göttingen)
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417 R (Hamburg)
Werkbank, steril	LaminAir HB 2472 Heraeus instruments (Hanau)
Zentrifuge	Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech GmbH (Osterode)

2.2 Die Zellkultur

Die Zusammensetzung der im Folgenden verwendeten Lösungen und Reagenzien ist, soweit nicht im Text direkt einsehbar, dem Materialteil „Zytostatika, Lösungen und Reagenzien“ (siehe 2.1.4) zu entnehmen.

2.2.1 Zellkultivierung

Nach Aussiedeln der Zellen in die Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche: 25 cm²) erfolgte die Kultivierung in 5 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C im Brutschrank. Als Nährmedium diente RPMI 1640, versetzt mit 2 mM Glutamin und 10 % FCS.

Die transfizierten Zellen erhielten zusätzlich Geneticin in einer Endkonzentration von 500 µg/ml. Dies führte zur Selektion jener Zellen, welche das Genmaterial der Vektoren erfolgreich in ihr Genom integriert hatten (siehe 2.1.3).

Zur Detektion einer Kontamination erfolgte in regelmäßigen Abständen eine Mykoplasmentestung (PCR).

Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Das alte Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 0,8 ml Trypsin benetzt und anschließend für einige Minuten im Brutschrank inkubiert.

Die so entstandene Zellsuspension wurde resuspendiert und ein Teil, entsprechend dem angestrebten Teilungsverhältnis, in eine neue Zellkulturflasche überführt, um dann mit frischem Nährmedium aufgefüllt zu werden. Das Teilungsverhältnis richtete sich nach der Zelldichte auf dem Flaschenboden und beruhte auf Erfahrungswerten.

Für die Zelllinie STA-ET-1 war z. B. in der Regel ein Teilungsverhältnis von 1:4 – 1:10 (Zellsuspension aus der alten Flasche [ml] : frisches Nährmedium [ml]) ausreichend, sodass die Zellen ca. alle 3-4 Tage einer erneuten Zellteilung zugeführt wurden.

2.2.2 Collagen-Beschichtung (Coating)

Für optimale Haftungs- und Wachstumsbedingungen wurden die Zellkulturflaschen und Zellkulturplatten (für den Zytotoxizitätstest) im Vorhinein mit Collagen-Essigsäure beschichtet.

Zur Beschichtung der Zellkulturflaschen stellte man unter sterilen Bedingungen ein Collagengemisch mit 0,1 M HAC (Essigsäure) her, dessen Collagen-Endkonzentration sich auf 0,2 mg/ml belief. Jede Flasche wurde mit 1,5 ml dieser Collagelösung benetzt und für 2 Tage unter der Werkbank inkubiert. Im Anschluss wurde die restliche Lösung abgesaugt und die Flaschen für einen weiteren Tag offen unter der Werkbank getrocknet. Zur Beschichtung der 96-well Platten wurde analog dem oben Beschriebenen vorgegangen. Es wurden je 50 μ l (pro Vertiefung) des Collagengemisches (Endkonzentration 0,2 mg/ml) auf die Platten pipettiert und diese anschließend offen für 24 h unter der Werkbank getrocknet.

2.2.3 Einfrieren/Auftauen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese mit 0,8 ml PBS-EDTA aus den Zellkulturflaschen abgelöst, anschließend mit 5 ml Medium aufgefüllt und bei 1200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde in 500 μ l Nährmedium aufgenommen. Danach erfolgte die Zugabe von 500 μ l Gefrierlösung. Die Zellsuspension konnte auf -80°C abgekühlt nach 24 h in flüssigen Stickstoff (-197°C) überführt werden.

Zum Auftauen wurden die Gefiertubes im Wasserbad bei 37°C erwärmt, mit 4-5 ml RPMI 1640 Medium resuspendiert und für 5 Minuten (1200 rpm, 20°C) abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet unter Zugabe von 5 ml frischem Nährmedium in Kulturflaschen überführt. Den transfizierten Zellen beider Zelllinien wurde zusätzlich je 50 μ l Geneticin hinzugefügt.

2.2.4 Zellpellets

Zellpellets wurden für die Versuche zur Telomeraseaktivität (TRAP-Assay, siehe 2.4) und Telomerenlänge (Southern Blot, siehe 2.5) erstellt. Um Differenzen in der Passagehöhe zu vermeiden, stellte man sie direkt im Anschluss an den jeweiligen Zytotoxizitätstest her. Hierfür wurden kultivierte Zellen mit PBS-EDTA gelöst, bei 1200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das restliche Zellgemisch auf Eppendorf –Cups verteilt. Diese wurden nun erneut bei 2000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und das Pellet anschließend bei -80°C eingefroren.

2.3 Das in-vitro-Zytotoxizitäts-Screening (MTT-Assay)

Prinzip: Der Test misst die Aktivität mitochondrialer Aldehyd-Dehydrogenasen lebender Zellen, welche die zugegebene MTT-Lösung spalten und so die Bildung eines blauen Farbstoffes (Formazan) induzieren. Dieser kristallisiert in den Zellen. Nach Zugabe eines Lyse-Reagenzes kommt es unter vorsichtiger Rüttlung zur Auflösung der Zellmembran und Lösung der Farbkristalle. Die Intensität der Farblösung ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und dient so als Surrogat für die Proliferation. Sie wird mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenz: 650 nm) gemessen (192).

2.3.1 Aussiedeln der Zellen

Die eingesetzte Zellzahlmenge richtet sich nach den Erfahrungswerten vorausgegangener Arbeiten unseres Institutes (Wachstumskurven). Pro Vertiefung wurden 5000 Zellen eingesetzt.

Nach Ablösen (mit PBS-EDTA) und Abzentrifugieren (1200 rpm für 5 min) der Zellen aus ihren Kulturflaschen folgte die Zellzahlbestimmung durch Zugabe von Bromphenolblau mittels Zellzähler und Neubauerplatte. Im Anschluss daran wurde durch Verdünnung mit Nährmedium eine Zellsuspension hergestellt, welche die angestrebte Zellzahl pro 100 µl enthielt. Hierbei richtete man sich nach der Standardarbeitsanweisung „SOP-MTT.doc“ der Arbeitsgruppe „Klinische Pharmakologie“ von Prof. J. Boos (Version 1-2001). Das Aussiedeln erfolgte auf Collagen beschichteten 96-Well-Zellkulturplatten mit jeweils 100 µl Zellsuspension pro Vertiefung. Um zu gewährleisten, dass die verschiedenen Zelllinien einer Versuchsreihe gleichen Bedingungen ausgesetzt sind, wurde eine Platte in vier Quadranten aufgeteilt, und jeder Quadrant mit einer anderen Zelllinie besiedelt. Pro Zytostatikum sind fünf Platten angelegt worden. Anschließend fand eine 72-stündige Inkubation im Brutschrank statt.

2.3.2 Inkubation mit Zytostatikalösung

Nach Aussiedeln der Zellen auf die 96-well-Platten folgte 72 Stunden später die Zytostatika-Inkubation. Hierzu wurden von jeder Zelllinie vier Ansätze pro Verdünnung

hergestellt, indem man in jede Vertiefung 100 μl der entsprechenden Zytostatikaverdünnung (siehe 2.3.4) pipettierte. Vier weiteren Ansätzen jeder Zelllinie wurden 100 μl Nährmedium hinzugefügt. Diese bildeten die Kontrolle (K), um im weiteren Verlauf zwischen der Zytostatikawirkung und dem Wachstumsverhalten der unbehandelten Zellen unterscheiden zu können. In der folgenden Abbildung ist beispielhaft eine Belegung wiedergegeben.

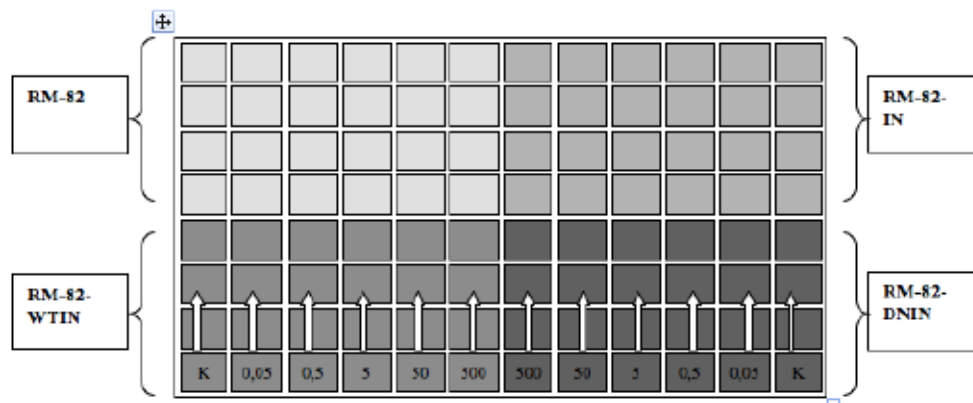


Abbildung 2.3.2-a: Beispiel einer Belegung – RM-82 Versuch mit Etoposid

Pro Zytostatikum wurden auf diese Weise vier Platten pipettiert. Sie bildeten „Tag 1“ – „Tag 4“ der Versuchsreihe. Der fünften Platte fügte man lediglich 100 μl Medium für die Kontrolle („Tag 0“) hinzu.

2.3.3 Standardversuchsablauf des MTT-Assays

Nach Zugabe der Zytostatika erfolgte die Bearbeitung der ersten Platte („Tag 0“). Hierbei folgte man, wie auch in den kommenden vier Versuchstagen, einem standardisierten Ablauf:

1. Zugabe von 10 μl MTT-Lösung pro Vertiefung
2. Inkubation für 3 h im Brutschrank
3. Absaugen der MTT-Lösung mittels Vakuumpumpe
4. Zugabe von 100 μl Lyse pro Vertiefung
5. Vorsichtige Schüttelung auf einem Rüttler für 15 min
6. Messung der optischen Dichte auf dem ELISA-Reader (Wellenlänge 570 nm)

Die eben aufgeführten Schritte wurden, unter Beibehaltung der gleichen Tageszeit, analog an den folgenden vier Versuchstagen durchgeführt. Auf diese Weise erhielt man einen Einblick in das Wachstumsverhalten der Zellen unter zytostatischer Behandlung.

2.3.4 Verdünnungsreihen der Prüfsubstanzen

Die Verdünnungsreihen des zu prüfenden Zytostatikums wurden zu Beginn jeder Versuchsreihe mit Hilfe von eingefrorenen Stammlösungen, frisch hergestellt. Dabei ging man wie folgt vor:

Zunächst wurde die höchste zu erreichende Konzentration durch Addition des Nährmediums zubereitet. Die weiteren, nächst geringeren Konzentrationen erhielt man durch weitere Verdünnung. Hierbei war zu beachten, dass die hergestellte Verdünnung in der doppelten angestrebten Endkonzentration vorlag, um die Verdünnung der Prüfsubstanz durch das schon auf den Platten befindliche Volumen der Zellsuspension zu berücksichtigen. (Endvolumen pro Well: 100 μ l Zellsuspension + 100 μ l Prüfsubstanz)

Die verwendeten Zytostatika (siehe 2.1.4) wurden, anhand der Ergebnisse vorangegangener in-vitro-Zytotoxizitätstests, in fünf verschiedenen Konzentrationsstufen eingesetzt.

Tabelle 2.3.4-a: Eingesetzte Zytostatikakonzentrationen

Zytostatikum	Umfang der Prüfkonzentrationen
Doxorubicin	0,0005 – 5 μ M
Etoposid	0,05 – 500 μ M
Ifosfamid ^a	0,01 – 100 μ M
Vincristin	0,01 – 100 μ M

^a – es wurde der aktive, alkylierende Metabolit 4-Hydroxyperoxy-Ifosfamid verwendet, da unter den Bedingungen der Zellkultur Ifosfamid nicht direkt zu dem zytotoxisch wirksamen 4-Hydroxyperoxy-Ifosfamid metabolisiert werden kann.

2.3.5 Übersicht der Versuchsreihen

In jedem Versuch wurde die Toxizität der Zytostatika im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, wie in Abbildung 2.3.2-a abgebildet, für die nicht-transfizierte Zelllinie und die entsprechenden transfizierten Zelllinien nach 24h, 48h, 72h und 96h Stunden ermittelt. Pro Zelllinie und Messzeitpunkt wurde jede Zytostatika-Konzentration für jedes Zytostatikum viermal getestet (siehe auch Abbildung 2.3.2-a).

Jeder Versuch wurde mit zwei Ausnahmen unabhängig voneinander einmal wiederholt. So wurde jeweils der Versuch mit Ifosfamid bei den transfizierten und nicht-transfizierten Zelllinien von STA-ET1 und der Versuch mit Vincristin bei den nicht-transfizierten und transfizierten RM-82 Zelllinien nur einmal durchgeführt.

Die Wiederholungen erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Dies hatte zur Folge, dass die Zelllinien zum Zeitpunkt der Wiederholungsversuche unterschiedliche Passagen durchlaufen hatten, was speziell vor dem Hintergrund des Knock-outs der Telomeraseaktivität durch die Transfektion mit dem dominant-negativem hTERT-Gen (Verkürzung der Telomeren mit jeder Zellteilung) und der ektopen Überexpression mit hTERT (Telomerenverlängerung) bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden musste. Die Toxizitätstests mit den verschiedenen Zytostatika wurden z.T. zum gleichen Zeitpunkt mit den Zelllinien einer identischen Passage angesetzt. Diese parallel angesetzten Versuche werden im Folgenden als Versuchsansatz zusammengefasst.

Daraus ergibt sich als Definition für die im Weiteren verwendete Nomenklatur:

- Versuch:**
- Alle 4 Zelllinien (STA-ET1/RM-82, -htWTIN, -htDNIN, -htIN)
 - Alle 4 Messzeitpunkte (24h, 48h, 72h, 96h)
 - 1 Zytostatikum (Doxorubicin/Etoposid/Ifosfamid/Vincristin)
 - Alle Zytostatikakonzentrationen mit n=4 (siehe Abbildung 2.3.2-a)

- Versuchsansatz:**
- Alle parallel durchgeführten Versuche
(Für STA-ET1: E-I, E-II, E-III bzw. für RM-82: R-I, R-II, R-III)

Für die einzelnen Versuchsansätze wurden die Zellen im Vorfeld in der Regel frisch aufgetaut um sie dann nach erfolgreicher Kultivierung einem neuen Toxizitätstest zuzuführen. Der Überschuss an Zellen wurde als Zellpellet für nachfolgende Versuche wieder eingefroren (siehe hierzu Kapitel 2.2.3 „Einfrieren/Auftauen“). Dies erklärt die

teils unterschiedlichen Passagen der transfizierten Zellen in den sechs Versuchsansätzen (STA-ET1 und RM-82). Auch wurde für die transfizierten Zellen der Zelllinie STA-ET1 in der zweiten Versuchsreihe bewusst für die Zelllinie STA-ET1-htDNIN die erste Passage gewählt, da für höhere Passagen eine ungewollte Reaktivierung der Telomeraseaktivität vermutet wurde.

Tabelle 2.3.5-a gibt eine Übersicht über die in den jeweiligen Versuchsansätzen angesetzten Versuche mit den jeweiligen Passagen der transfizierten Zelllinien.

Tabelle 2.3.5-a: Übersicht der Zytotoxizitätstests

Zelllinie	Versuchsansatz (Kürzel)	Zytostatika	Pasage der transfizierten Zelllinie		
			htDNIN	htWTIN	htIN
STA-ET1	E-I	Doxorubicin	P23	P20	P22
		Etoposid	-	-	-
		Vincristin	-	-	-
		Hydroxyperoxy-Ifosfamid	-	-	-
	E-II	Doxorubicin	P1	P12	P13
		Etoposid	P1	P12	P13
		Vincristin	P1	P12	P13
		Hydroxyperoxy-Ifosfamid	-	-	-
	E-III	Doxorubicin	-	-	-
		Etoposid	P14	P14	P15
		Vincristin	P14	P14	P15
		Hydroxyperoxy-Ifosfamid	P14	P14	P15
RM-82	R-I	Doxorubicin	P9	P9	P11
		Etoposid	P9	P9	P11
		Vincristin	-	-	-
		Hydroxyperoxy-Ifosfamid ^a	P9	P9	P11
	R-II	Doxorubicin	P13	P12	P14
		Etoposid	P13	P12	P14
		Vincristin	-	-	-
		Hydroxyperoxy-Ifosfamid	P13	P12	P14
	R-III	Doxorubicin	-	-	-
		Etoposid	-	-	-
		Vincristin	P10	P10	P12
		Hydroxyperoxy-Ifosfamid	-	-	-

^a - In diesem Versuchsansatz wurden 2 Versuche mit Hydroxyperoxy-Ifosfamid durchgeführt

2.3.6 Auswertung des MTT- Assay

Die Erfassung und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft-Excel™ (Version OfficeXP).

Die Graphen zur Veranschaulichung des Wachstumsverhaltens wurden mit dem Programm SigmaPlot™ (Version 8.0) realisiert. Neben der graphischen Auswertung wurde im Besonderen die GI₅₀ der Versuchsreihen dargestellt.

Bestimmung der GI₅₀ (Groth Inhibition)

Die GI₅₀ beschreibt die Konzentration eines Zytostatikums, bei der es zur 50%igen Wachstumshemmung der behandelten Zellpopulation im Vergleich zur Kontrolle (K) kommt. Die GI₅₀ wird zu den Inkubationszeiten graphisch dargestellt. Die Kontrolle entspricht dabei einem 100%igem Wachstum. In der graphischen Darstellung wird das prozentuale Wachstum, als Surrogat aus der gemessenen Extinktion, auf die y-Achse aufgetragen. Die Darstellung der GI₅₀ erfolgt als Parallele zur x-Achse, auf welcher die Zytostatikakonzentrationen aufgetragen sind.

Zur Berechnung der GI₅₀ wurde die Steigung jeder Wachstumskurve zwischen dem Wert, bei dem die Wachstumshemmung über 50 % betrug (y_1, x_1), und dem Wert, bei dem sie unter 50 % lag (y_2, x_2), bestimmt.

Steigungsgleichung: $m = (y_1 - y_2) / (x_1 - x_2)$

Gradengleichung (aufgelöst zu x_3): $x_3 = [50 - y_2 + (m * x_2)] / m$

Somit ist x_3 die Zytostatikakonzentration in μM , bei der eine 50 %-ige Wachstumshemmung (GI₅₀) der Zellen erreicht wurde (in Anlehnung an (181)).

2.4 Messung der Telomeraseaktivität (TRAP- Assay)

Prinzip: Der TRAP-Assay (= Telomeric Repeat Amplification Protocol) dient dem Nachweis von Telomeraseaktivität mit Hilfe eines PCR-basierten Detektionssystems. Der Test wurde erstmalig von Kim et al. 1994 etabliert (126). Der Test beinhaltet drei Schritte. Beim ersten Schritt der Reaktion („Extension“) fügt die in den Zellen enthaltene Telomerase die Telomersequenzen (GGTTAG) an das 3'-Ende eines Oligonukleotids (TS). Hierdurch entstehen in Abhängigkeit von der enzymatischen Aktivität unterschiedlich lange Nukleotidsequenzen. Im zweiten Schritt („Amplifikation“) werden die verlängerten Produkte mittels PCR (etabliert 1987 (204)) amplifiziert. Die so entstandenen Produkte können im dritten Schritt („Detektion“) mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden (161). Mit entsprechender Software (siehe 2.4.5) können nun die Peakflächen der Telomerenfragmente bestimmt werden, welche proportional zur Telomeraseaktivität sind. Die unten genannten Versuche erfolgten mit einem modifizierten TRAP-Assay unter Verwendung des TRAPeze Telomerase Detection Kit™ (Intergen Company, Purchase, N.Y. U.S.A).

2.4.1 Proteinisolierung

Voraussetzung für die Proteinbestimmung war die Proteinisolierung. Zunächst nahm man die Zellpellets (siehe 2.2.4) abhängig von ihrer Größe in 30-150 µl CHAPS Puffer auf. Das Gemisch wurde 30 Minuten auf Eis gekühlt. Dies führte zur Lyse der Zellen. Anschließend wurden die Proben bei 12000 xg und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues RNase freies Eppendorfgefäß pipettiert und auf Eis gestellt. Das Gefäß enthielt nun die gelösten Proteine einschließlich der im Weiteren zu bestimmenden Telomerase.

2.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Im nächsten Schritt erfolgte die Proteinbestimmung. Hierbei richtete man sich nach dem Protein Assay RC/DC Protokoll der Firma BioRad (München).

Prinzip Der Assay basiert auf der Farbreaktion nach Lowry (149). Es handelt sich um eine kolorimetrische Prüfung des Proteingehalts mit Hilfe reduzierender Agenzien und Detergenzien. Im ersten Schritt reagiert die Proteinlösung mit einer alkalischen Kupferlösung. Dies führt zur Ausbildung von Kupfer-Proteinkomplexen, welche in einem zweiten Schritt durch Reduktion eines Farbindikators (Folinreagenz) zur Bildung eines blauen Farbstoffes führen. Im Vergleich mit dem eingesetzten Proteinstandard kann nun mittels ELISA-Reader (Wellenlängenbereich 650 – 750 nm) der Proteingehalt der Probe errechnet werden (253).

In den durch CHAPS-Extraktion gewonnenen Proben wurde der Proteingehalt mittels erweiterter Lowry-Methode bestimmt. Als Standard diente BSA (eingesetzter Proteingehalt: 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml).

Zu jeweils 5 µl von Probe, Standard und Negativ-Kontrolle (CHAPS) wurden 25 µl Reagenz I hinzugefügt, der Ansatz kurz gevortext und anschließend für eine Minute bei Raumluft inkubiert. Nach Zugabe von je 25 µl Reagenz II und erneutem Vortexen wurde das Gemisch fünf Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und der Ansatz nach Hinzufügen von je 25,4 µl Reagenz A kurz gevortext und dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich das Präzipitat vollständig gelöst hatte. Zu jedem Ansatz wurden 200 µl DC Reagenz B zugegeben und vorsichtig vermischt. Jeweils 200 µl des Ansatzes (Proben, Standard und Negativ-Kontrolle) wurden in eine Mikrotiterplatte überführt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 655 nm. Anhand der Ergebnisse der Proteinbestimmung konnte durch Verdünnung mit demineralisiertem H₂O eine Proteinlösung mit einem Proteingehalt von 25 ng/µl hergestellt werden.

2.4.3 Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Als Vorbereitung zur PCR wurden 23 μl eines Mix mit 2 μl Proteinlösung (Proteingehalt 25 $\text{ng}/\mu\text{l}$) inkubiert.

Der Mix bestand aus 2.5 μl 10x TRAP-Puffer, 2.5 μl dNTP's (2 mM), 0.25 μl FAM-Primer Mix (15 μM ; markiert mit einem Fluoreszenzfarbstoff), 0.5 μl TRAP-Primer Mix, 17.05 μl H_2O (PCR) und 0.2 μl Taq.

Die Reagenzien wurden, mit Ausnahme der dNTP's, alle aus dem TRAPeZe-Kit der Firma Intergen Company (New York, U.S.A.) bezogen. Die dNTP's (2 mM) sind bei der Firma Sigma (Deisenhofen) erhältlich. Alle Pipettierarbeiten wurden auf Eis durchgeführt.

Neben den zu untersuchenden Proben wurde pro PCR-Ansatz eine negativ Kontrolle (K-) (CHAPS-Puffer statt Proteinlösung), eine für TA positive Kontrolle (ET1 oder RM-82) sowie eine hitzeinaktivierte Probe (HI) eingesetzt. Bei der HI-Probe handelte es sich um eine vormals für Telomerase-Aktivität positive Probe.

Die so entstandenen Proben durchliefen folgendes PCR-Programm:

1. 3 min bei 37 °C (Erwärmung der Proben)
 2. 30 min bei 30 °C (Telomerase vermittelte Verlängerung d. TS-Oligonucleotide)
 3. 5 min bei 94 °C (schnelle Erhitzung)
 4. 30 sec bei 94 °C (Denaturierung)
 5. 45 sec bei 55 °C (Tempern der Primer)
 6. 45 sec bei 72 °C (Elongation)
- } 36 Zyklen

2.4.4 Fragmentanalyse

Die weitere Verarbeitung erfolgte freundlicherweise durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster (Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin) mit dem „ABI Prism 3700™“.

Prinzip Die PCR- amplifizierten Proben wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurden die DNA-Fragmente durch einen Fluoreszenzfarbstoff (6FAM) markiert. Dabei handelt es sich um ein 6FAM-markiertes Oligonukleotid, welches komplementär zu den Telomerase spezifischen Sequenzen war.

Das Prinzip der Kapillarelektrophorese macht sich zunutze, dass kürzere Fragmente schneller wandern als längere. Die Proben werden aufgetragen und wandern durch die mit polymeren Gel gefüllten Kapillaren, sobald eine Spannung angelegt ist. Erreichen sie das Ende einer Kapillare, werden sie von einem Argonlaser erfasst, welcher den Farbstoff zum Fluoreszieren bringt. Eine Kamera zeichnet die Fluoreszenz auf, welche anschließend durch einen angeschlossenen Computer digitalisiert werden kann. Da die Extinktion der Probe proportional zur enthaltenen Menge an Telomerase-Oligonukleotiden ist, kann diese anschließend als Fluoreszenzintensität (FI) angegeben und die Telomeraseaktivität quantifiziert werden.

Zur Kontrolle läuft bei jeder Probe zusätzlich ein vorher definierter Standard mit (hier: „Rox 1000“). Dieser enthält einen eigenen Fluoreszenzfarbstoff und erlaubt später, anhand seiner bekannten Länge, die Größe der untersuchten DNA-Fragmente genau zu bestimmen (70).

Zur Vorbereitung pipettierte man auf eine Mikrotiterplatte je 20.5 µl eines Mix (bestehend aus 20 µl H₂O und 0.5 µl Rox 1000 Standard) zu 2 µl der PCR-verlängerten Probe. Für den Rox Standard fügte man analog 20.5 µl Mix zu 2 µl H₂O.

Die Platte enthielt neben den zu untersuchenden Proben eine negative Kontrolle (K-), eine hitzeinaktivierte Probe (HI) sowie den Rox Standard und konnte anschließend dem ABI Prism 3700™ zur weiteren Verarbeitung zugeführt werden.

2.4.5 Auswertung des TRAP-Assay

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Peak Scanner™ Software 1,0 (Applied Biosystems, Darmstadt) und Microsoft Excel™ (Microsoft, Redmond, U.S.A.).

Aus den Genescan Analyzer produzierten Daten kann mit Hilfe der oben genannten Software ein Elektropherogramm erstellt werden.

Die blaue Farbe repräsentiert die Telomeraseaktivität und die rote Farbe den Rox-Standard. Jeder Peak (Gipfel, Spitze) entspricht einem Fragment. Eine Telomerase-positive Probe zeichnet sich durch die typische „Telomerenleiter“ aus (siehe Abbildung 2.4.5-a).

Im Weiteren kann so die Telomeraseaktivität zum einen graphisch dargestellt, zum anderen anhand der Peakfläche mit folgender Formel berechnet werden:

Relative Telomeraseaktivität = Fläche Telomerase Peak / Fläche Rox Standard Peak

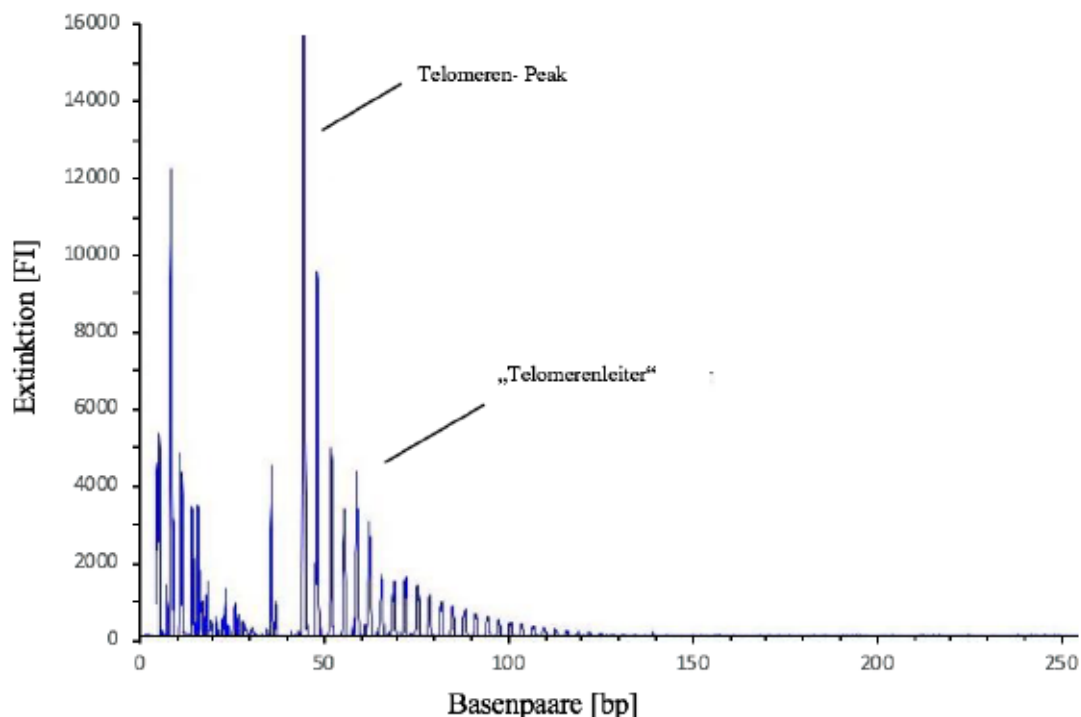


Abbildung 2.4.5-a: Graphische Darstellung der „Telomerenleiter“ (Bsp. STA-ET1htWTIN)

2.5 Bestimmung der Telomerenlänge (Southern-Blot)

Prinzip: Der *Telo TAGGG Telomere Length Assay* (Roche Diagnostics, Mannheim, Art.No. 12209136001) ermöglicht die Darstellung der durchschnittlichen Telomerenlänge einer Zellpopulation anhand terminaler Restriktionsfragmente (TRF). Diese bestehen aus telomerischer und subtelomerischer DNA. Gewonnen werden die TRF durch den Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen, welche die nicht-telomerische DNA in niedermolekulare Fragmente zerschneiden während die Telomere und die subtelomerische Region intakt bleiben. Die DNA wird durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Southern Blot auf eine Nylonmembran übertragen. Die TRF können direkt mit einer Fluoreszenzmarkierten (Digoxigenin = DIG)-, telomer-spezifischen Sonde hybridisiert und anschließend mittels Chemilumineszenz Detektion auf einer Filmfolie sichtbar gemacht werden. Die durchschnittliche Telomerenlänge wird anhand des Vergleichs mit einem Längenstandard (DIG-markiert) ermittelt (162, 201). Etabliert wurde der Southern Blot erstmalig 1975 von Edwin M. Southern (224).

2.5.1 DNA-Isolierung

Als Vorbereitung für den Längen Assay musste zunächst die genomische DNA aus den Zellen isoliert werden.

Hierzu orientiert man sich an dem Protokoll des Puregene™ DNA Isolierungs Kit (Gentra Systems, Mineapolis, U.S.A). Die im Folgenden genannten Reagenzien und Lösungen entstammen dem Puregene™ DNA Isolierungs Kit mit Ausnahme des 100% Isopropanols und 70% Ethanol (siehe hierzu 2.1.4). Das zu untersuchende Zellpellet (siehe 2.2.4) wurde in einem Eppendorf Cup mit 600 µl Cell Lysis Solution zu einer homogenen Lösung resuspendiert. Anschließend fügte man 3 µl RNase A Solution hinzu, das Tube wurde 25-mal geschwenkt und bei 37 °C für 60 min inkubiert. Die Probe wurde bei Raumtemperatur abgekühlt, bevor man 200µl Protein Precipitation Solution hinzugab. Nach 20 sek. Vortexen und 3 min. Zentrifugieren bei 14000 xg wurde der Überstand vorsichtig in 600 µl Isopropanol 100% überführt und im Folgenden 50-mal

geschwenkt, bis ein weißer „DNA-Faden“ erkennbar war. Bei 14000 xg auf der Zentrifuge für 1 min entstand nun ein Pellet, welches einmalig mit EtOH gewaschen, erneut abzentrifugiert und 15 min bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet wurde. In einem letzten Schritt fügte man 30 µl DNA Hydration Solution (TE Puffer) hinzu und ließ das Pellet über Nacht bei Raumtemperatur trocknen.

Der DNA-Gehalt der Pellets wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260/280nm gemessen (Eppendorf Bio Photometer, Programm „dsDNA“, Arbeitsgruppe Prof. Boos), sodass im Weiteren rechnerisch die Menge (in µl) des Pellets bestimmt werden konnte, welches die für den Assay erforderliche Menge von 2 µg DNA enthielt. Die so gewonnene DNA war bei 2 - 8° bis zur weiteren Verwendung lagerbar.

2.5.2 Telomer-Längen-Assay

Die verwendeten Reagenzien entstammen dem Kit des TeloTAGGG Telomere Length Assay, mit Ausnahme des 1x TAE-Puffers und des Bromphenolblaus (siehe 2.1.4). Die Herstellung der Puffer und Lösungen ist zum besseren Überblick direkt am Ende eines jeden Handlungsabschnittes beschrieben, die hierfür verwendeten Reagenzien entstammen, falls nicht dem Materialteil (siehe 2.1.4) zu entnehmen, ebenfalls dem Kit. Die Handhabung der Reagenzien sowie die Pipettierarbeiten fanden auf Eis statt.

DNA Digestion

Durch diesen Vorgang gelang es, mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Hinf-1 und Rsa-1 die nicht-telomerische DNA zu niedermolekularen Fragmenten zu verdauen. Die telomerische- und subtelomerische DNA wird von den beiden Enzymen nicht erkannt und bleibt intakt. Diese DNA bildet die gewünschten Restriktionsfragmente (TRF)(70) .

Zunächst füllte man 2 µg einer der oben gewonnenen DNA-Proben (siehe 2.5.1) mit nuklease-freiem H₂O (nf-H₂O) auf ein Endvolumen von 17 µl auf. Diese wurden mit je 2µl *digestion buffer 10x* und 1 µl Restriktionsenzymen (0.5 µl *Hinf I* + 0.5 µl *Rsa I*) versetzt und inkubiert (120 min, 37 °C).

Analog ging man mit weiteren Proben sowie einer Probe mit bekannt niedrigem DNA-Gehalt (*Control-DNA low*, 3.9 kbp) und bekannt hohem DNA-Gehalt (*Control-DNA*

high, 10.2 kbp) vor. Gestoppt wurde die Verdauung durch Hinzufügen von je 4 μ l *TAE-Puffer 1x* (abweichend vom Protokoll) und kurzes Zentrifugieren.

1x TAE-Puffer 450 ml Aqua dest + 50 ml *10x TAE-Puffer*

10x TAE-Puffer 24.2 g Tris + 1.861 g EDTA auf 400 ml mit Aqua dest auffüllen
und mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 8.0 einstellen, danach
auf 500 ml mit Aqua dest auffüllen

Gelelektrophorese

Mit dieser Methode gelang es, die niedermolekularen DNA-Fragmente sowie die TRF, entsprechend ihrem Molekulargewicht, elektrophoretisch aufzutrennen.

Im Folgenden wurden die Proben in die Taschen eines etwa 9 x 11 cm großen Agarosegels 0.8% pipettiert. Als Farbmarder fügte man zusätzlich 2 μ l *Bromphenolblau* in jede Tasche. Als Längenvergleich diente ein Mix aus 4 μ l *DIG molekular weight marker*, 12 μ l *nf-H₂O* und 4 μ l *loading buffer 5 x* (enthält bereits Bromphenolblau). Je 10 μ l dieses Mix wurden in die Taschen seitlich der beiden äußersten Proben aufgetragen. Der Molekulargewichtsmarker enthielt DNA-Fragmente mit einer Länge von 81 bp bis 21266 bp. Das präparierte Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit *TAE-Puffer x 1* platziert und lief bei 100 V für ca. 15 min, bis die Proben aus den slots herauskamen. Im Anschluss wurde auf 10 V reduziert und die Spannung über Nacht (ca. 12 h) belassen.

Agarose-Gel 0.8 g Agarose (0.8%) gelöst in 100 ml *TAE-Puffer 1x* (Mikrowelle),
anschließend erkalten lassen

Waschen des Gels

Die folgenden Waschschritte beinhalten die Depurinierung, Denaturierung und Neutralisierung als Voraussetzung für das anschließende Blotten. Im ersten Schritt, der Depurinierung der DNA-Fragmente (HCL solution), werden die Purinbasen der DNA von ihrer Desoxyribose getrennt. Der nächste Schritt, die Denaturierung, bewirkt eine Auftrennung der Doppelstrang-DNA in Einzelstrang-DNA (ssDNA), da nur ssDNA

geblottet werden kann. Der letzte Schritt, die Neutralisierung, wird benötigt, um die durch HCL-Solution entstandene Säure wieder zu neutralisieren (253).

Das fertige Gel wurde in eine Plastischale gelegt, mit HCL-Solution bedeckt und bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler für 10 min leicht geschwenkt. Anschließend wurde das Gel zweimalig mit H₂O gewaschen, bevor es 2 x für je 15 min mit Denaturation solution bedeckt bei RT auf dem Schüttler inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen mit H₂O (2 x) folgte die Inkubation in Neutralization solution (2 x bei RT unter leichtem Schwenken).

HCL-solution 0.25 M HCL: 125 ml HCL (1M/l) auf 500 ml mit Aqua dest.
(*Depurination*) auffüllen

Denaturation 10 g NaOH (0,5 M) Plätzchen + 43.8 g NaCl (1,5 M)
solution auf 500ml mit Aqua dest auffüllen

Neutralization 30.29 g Tris (0,5 M) + 87.66 g NaCl (3 M, ph 7,5) auf 400 ml mit
solution Aqua dest auffüllen, anschl. mit konz. HCL pH-Wert von 7.5
einstellen, danach auf 500 ml mit Aqua dest auffüllen

Das Blotten

Durch diesen Vorgang konnten die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente von dem Agarosegel auf einer Nylonmembran fixiert werden. Die SSC-Lösung lieferte hierbei den benötigten hohen Salzgehalt für den DNA-Transfer. Nach dem Transfer wurde, zur Fixierung der übertragenen DNA, die Nylonmembran auf Whatmann Papier gebacken (253).

Als Vorbereitung für das Blotten fertigte man eine Maske an (Klarsichtfolie), welche in der Mitte ein Loch aufwies und auf das Gel gelegt die „slots“ größenmäßig überragte, jedoch 5-10 mm pro Seite kleiner war als das Gel. Des Weiteren benötigte man eine Nylon-Membran, welche die Größe des Gels um 10 mm pro Seite überragte (siehe Abbildung 2.5.2 a). Als Blotvorrichtung diente eine Blotkammer der Firma Pharmacia

Biotech Vacu Gene XL (Freiburg). Eine zugehörige Matte wurde im Vorfeld für 10 min in *autoklaviertem H₂O* getränkt. Ebenso wurde die Nylonmembran kurz gewässert und danach in *Neutralization solution* eingelegt (10 min). In die mittlere Vertiefung der Blotkammer füllte man Aqua dest und baute die Vorrichtung entsprechend der unten gezeigten Abbildung auf.

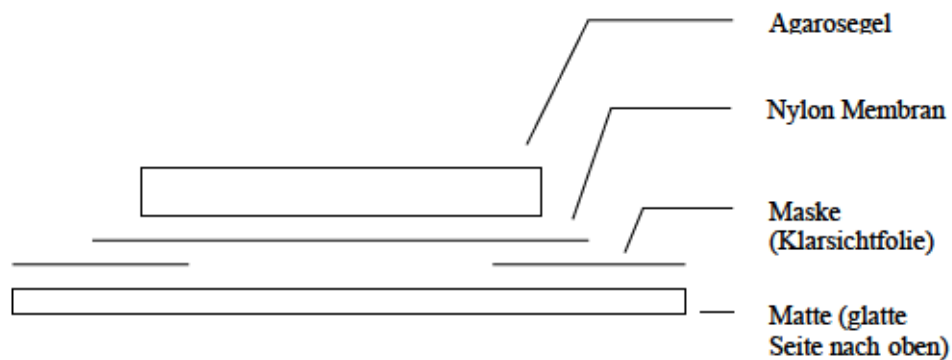


Abbildung 2.5.2-a: Schematische Darstellung des Blotaufbaus

Beim Anstellen der Vakuumpumpe wurde darauf geachtet, dass die Maske glatt anlag und sich keine Luftblasen zwischen Maske und Gel befanden. Der Transfer lief bei 55 mbar für ca. 90 min. Währenddessen wurde die Geloberfläche mit *20 x SSC* benetzt, sodass das Gel nie austrocknete. Die Nylonmembran wurde auf Whatmann Papier gelegt, für 2 min in der Mikrowelle bei 750 Watt gebacken und im Anschluss zweimalig in *2x SSC* gewaschen und luftgetrocknet. In Folie eingeschweißt war sie so bei 2-8 °C lagerbar.

20 x SSC 87.6 g NaCl (3 M) + 44.12 g Natrium Citrat (0,3 M, pH 7.0) auf 500 ml mit Aqua dest auffüllen

2 x SSC 50 ml *20 x SSC* auf 500ml mit Aqua dest auffüllen

Hybridisierung und Chemilumineszenz Detektion

Eine Prähybridisierung (*DIG Easy Hyb*) führte dazu, dass die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert wurden, um ein späteres unspezifisches Anlagern der Sonden auf die Membran zu verhindern. In der Hybridisierung band eine Telomer-spezifische Sonde („*Telomere probe*“) an die entsprechenden Regionen (*TTAGGG/CCCUAA*) der terminalen restriktions-spezifischen Fragmente. Anschließend wurde die Membran in mehreren Waschschritten für die Antikörperreaktion vorbereitet. Hierbei handelte es sich um einen mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörper gegen *DIG* (*Anti-DIG-AP working solution*). Der Antikörper band an die mit der telomerischen DNA hybridisierten, *DIG*-markierten Sonden. Nach Zugabe des chemilumineszierenden Substrates *CDP-Star* (*substrate solution*) setzte die Alkalische Phosphatase dieses um, wodurch Photonen emittiert wurden, welche auf Filmfolie entwickelt werden konnten (253).

Zur Prähybridisierung wurde die Membran in 18 ml *DIG Easy Hyb* (vorgewärmt auf 42 °C) 60 min. im Schwenkbad bei 42 °C inkubiert. Nach Abgießen der Prähybridisierungslösung folgte die Hybridisierung unter Rotation im Glaskolben (Ofen, 3 h, 42 °C). Die Hybridisierungslösung bestand aus 7.5 ml vorgewärmter *DIG Easy Hyb* und 1.5 µl *Telomere probe*. Nach 3 h wurde die Lösung abgegossen und die Membran zweimalig mit *stringent wash buffer I* gewaschen (im Schwenkbad bei RT für je 10 min.) sowie zweimalig in vorgewärmten *stringent wash buffer II* (Schwenkbad, 50 °C für je 40 min.). Im Anschluss daran wurde sie mit *washing buffer x 1* für 5 min. bei RT auf dem Schüttler umspült. Dann mit 100 ml *blocking solution x 1* (30 min., Schüttler bei RT) sowie anschließend mit *Anti-DIG-AP working solution* (30 min., Schüttler bei RT) inkubiert. Nach 2 x 15 min Waschen mit je 200 ml *washing buffer x 1* (Schüttler, RT) wurde die Membran mit 100 ml *detection buffer x 1* inkubiert (5 min., Schüttler, RT). Dann wurde sie mit der DNA-Seite nach oben auf ein Stück Whatmann Papier gelegt und so die Reste des *detection buffer x 1* aufgesogen, ohne die Membran austrocknen zu lassen. Anschließend verpackte man sie in eine glatte Klarsichtfolie und gab zügig etwa 40 Tropfen *substrate solution* in die Folie, verstrich die Flüssigkeit gleichmäßig und beließ diese für 5 min., bevor man sie in eine neue trockene Folie verpackte. Danach wurde die Membran mit der DNA-Seite nach oben in eine Filmkassette gelegt. Innerhalb

der nächsten 30 bis 60 min. wurde in einer Dunkelkammer eine Filmfolie mit der Photonen-emittierenden Membran belegt und entwickelt.

Anti DIG-AP working solution 100 ml *blocking solution x 1* plus 10 µl *Anti-DIG-AP*
(mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Antikörper gegen DIG)

blocking solution x 1 10 ml *blocking buffer* + 90 ml *Maleic acid buffer*

stringent wash buffer I 2 x SSC; 0.1% SDS:
5 ml 10% SDS + 50 ml 20 x SSC mit Aqua dest auf 500 ml auffüllen

stringent wash buffer II 0.2 x SSC; 0.1% SDS
5 ml 10% SDS + 5 ml 20 x SSC mit Aqua dest auf 500 ml auffüllen

10% SDS 5 g Laurylsulfate in 45 ml Aqua dest lösen

2.5.3 Auswertung des Southern Blots

Die Terminalen-Restriktions-Fragmente (TRF) waren als schwarzer Schmier auf dem Film erkennbar. Dessen höchste Dichte war der Bereich, der die durchschnittliche TRF Länge einer Probe widerspiegelte. Durch Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker („DIG molekular weight marker“), welcher DNA Fragmente bekannter Länge enthielt, konnte die durchschnittliche TRF Länge einer Probe direkt abgelesen und so eine Aussage über die Telomerenlänge gemacht werden. Zusätzlich konnte ein optischer Vergleich mit DNA-Proben mit niedrigem („DNA low“) und hohem („DNA high“) DNA-Gehalt erfolgen.

Die Berechnung der Telomerenlänge erfolgte mithilfe des Programms „Telorun“ (http://www4.utsouthwestern.edu/cellbio/shay-wright/research/sw_lab_methods.htm), wie dort beschrieben. Die für die Kalkulation benötigte Bandendichte (des „Schmiers“) wurde mit der „Quantity One® 1-D Analysis Software“ (Firma Bio-Rad) bestimmt.

2.6 Statistische Auswertung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine erste Erfassung/Beschreibung möglicher Unterschiede hinsichtlich der Toxizität von Zytostatika bei Ewing Sarkom Zelllinien mit unterschiedlichem Status an Telomeraseaktivität.

In erster Linie sollte untersucht werden, ob sich erkennbare Unterschiede bezüglich des Wachstumsverhaltens der transfizierten Zellen (fehlende oder verstärkte Expression von hTERT) zu der nicht-transfizierten Mutterzelllinie unter Inkubation mit dem gewählten Zytostatikum ergeben (MTT-Assay). Auch wurde überprüft, ob die gewünschten Voraussetzungen bezüglich Telomeraseaktivität (TRAP-Assay) und Telomerenlänge (Southern-Blot) in den transfizierten Zellen (-htIN, htDNIN und -htWTIN) bzw. den Mutterzelllinien STA-ET1 und RM82 gegeben waren.

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte rein deskriptiv mit dem Ziel der Mustererkennung und einer möglichen Priorisierung für weiterführende wissenschaftliche Arbeiten. Aufgrund der im nachfolgenden Abschnitt erwähnten Einschränkung des biologischen Modells wurde diese Art der Auswertung bewusst gewählt. Im Folgenden ist daher die Beschreibung der verwendeten Parameter der deskriptiven Analyse für die einzelnen Untersuchungen (MTT-Assay, TRAP-Assay und Southern-Blot) genannt:

MTT-Assay:

Alleine durch die notwendigen Prozesse der Zellkultur - erneutes Auftauen der Zellen, Kultivierung bis zum Erreichen der angestrebten Zellzahl als Voraussetzung für den Zytotoxizitätstest (MTT-Assay) - gestaltete sich eine Versuchswiederholung mit biologischen Replikaten der transfizierten Zellen schwierig, da eine veränderte Passagzahl auch das biologische Modell veränderte.

Daher wurden die jeweiligen Versuche, in welchen an den vier Versuchstagen (24h, 48h, 72h und 96h nach Zytostatikazugabe) die Vitalität der Mutterzelllinie und der transfizierten Zelllinien (-htIN, -htDNIN und -htWTIN) gemessen wurde, primär einzeln betrachtet, auch wenn mit Ausnahme von Ifosfamid bei STA-ET1 und Vincristin bei RM-82, alle Versuche in zeitlichem Abstand wiederholt wurden.

Eine Wiederholung der Versuche nach unterschiedlichen Passagen erschien aufgrund der Dynamik von Telomerenlänge und Telomeraseaktivität in den htDNIN-transfizierten Zellen unterschiedlicher Passagen der Zelllinie STA-ET1 (siehe 3.1.2 und 3.1.3) angebracht.

In jedem Versuch wurde bei jeder Zelllinie, zu jedem Untersuchungszeitpunkt, jede Zytostatikakonzentration vierfach analysiert (siehe Abbildung 2.3.2-a, S. 52). Aus den Vierfachbestimmungen der Extinktionen (= n der Graphiken im Ergebnisteil) wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Diese Ergebnisse wurden durch den Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen in Prozent umgerechnet mit dem Ziel des explorativen prozentualen Vergleiches im Rahmen der deskriptiven Analyse. Die prozentualen Werte bilden die Grundlage der graphischen Darstellungen der einzelnen Versuche in dem Kapitel 3.2.1 „**Chemosensitivität transfizierter und nicht-transfizierter Zellen**“ (S. 94) und dienten auch der Ermittlung der GI₅₀ für die einzelnen Versuche.

In dem Kapitel 3.2.2 „**Vergleich der Chemosensitivität von STA-ET1 und RM82**“ wurden analog die GI₅₀- Konzentrationen der nicht-transfizierten Zellen aus den einzelnen Versuchen gegenübergestellt, um mögliche Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien zu erkennen.

Ebenso erfolgte in dem Kapitel 3.2.3 „**Vergleich der Chemosensitivität nach Transfektion**“ durch den Faktorenvergleich eine Detektion möglicher Unterschiede zur potentiellen Mustererkennung für die einzelnen Versuche.

Die Feststellung einer Chemosensitivitätsänderung durch einen Faktorenvergleich orientierte sich dabei an den Ergebnissen einer vorangegangenen Arbeit aus dem Arbeitskreis (70). Die Faktoren beziehen sich auf die GI₅₀ und setzen für jeden einzelnen Versuch die GI₅₀ der transfizierten Zellen zur GI₅₀ der Mutterzelllinie in Bezug. Ein Faktor ≥ 2 wurde als Zeichen einer Resistenzzunahme und ein Faktor $\leq 0,5$ als Zeichen einer Chemosensibilisierung kategorisiert (siehe Kapitel 3.2.3, S.112). Diese Kategorisierung diente der präziseren Mustererkennung im Rahmen der deskriptiven Ergebnisanalyse.

In dem Kapitel 3.1.4 „Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen“ wurde das prozentuale Wachstum der unbehandelten Kontrollen (Mutterzellen und transfizierte Zellen) aus den oben geschilderten Gründen für jeden MTT-Versuch über die vier Messzeitpunkte 24h, 48h, 72h und 96h betrachtet und graphisch dargestellt, um Tendenzen für verändertes Wachstum zu erkennen, welche die formulierten Hypothesen unterstützten oder widerlegten. Hier wurden die unbehandelten Kontrollen eines Versuchsansatzes zusammengefasst, wenn Versuche mit unterschiedlichen Zytostatika gemacht wurden (siehe Tabelle 2.3.5-a). D.h. wenn, wie in E-II die Zytostatika Doxorubicin, Vincristin und Etoposid getestet wurden, standen unbehandelte Kontrollen der gleichen Passage aus drei Versuchen mit unterschiedlichen Zytostatika zur Verfügung. Aus den gemessenen Extinktionen pro Versuch (n=4) und den drei verschiedenen Zytostatika erhielt man für den Versuchsansatz E-II folglich n=12 gemessene Extinktionen. Aus diesen wurde dann Mittelwert und Standardabweichung berechnet und so die Werte für den prozentualen Vergleich (Proliferationsverhalten zu den Messzeitpunkten 24h, 48h, 72h und 96h im Vergleich zur Stunde 0) bestimmt.

In dem anschließenden Kapitel 3.1.5 „Verdopplungsraten der Zellpopulation (Population Doubling)“ (S. 90) erfolgte aus den unter 3.1.4 berechneten prozentualen Ergebnissen die Berechnung der Zeit, die nötig war, bis sich die vitalen Zellen in den unbehandelten Kontrollen verdoppelt hatten („Population Doubling“ - Zeitintervall bis eine Verdopplung der Extinktion erreicht wurde). Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{„Population Doubling“} = \text{LN}(2) / ((\text{LOG}(x;10) - 2) * 2,303/h)$$

x = Zellwachstum [%] verglichen mit der Kontrolle zum Zeitpunkt 0h

h = Zeitintervall pro Versuchstag (24, 48, 72 oder 96h)

Die Ergebnisse wurden tabellarisch für jede Zelllinie und für jeden Versuchsansatz (jeweils für Mutterzelllinie und die einzelnen transfizierten Zelllinien) gegenübergestellt.

Southern-Blot:

Die Auswertung des Southern-Blot zur Bestimmung der Telomerenlänge erfolgte zum einen mit der optischen Auswertung und zum anderen durch Berechnung der Telomerenlänge mithilfe der TRF (terminalen Restriktionsfragmente) mit dem Programm „Telorun“ wie unter 2.5.3 (S.68) beschrieben.

Die berechneten Telomerenlängen wurden dann für jeden Southern-Blot Versuch einzeln dargestellt und zur besseren Übersicht in „**Vergleich der TFR (Passagezahl und transfizierte Zelle)**“ (siehe 3.1.2) nach Passagezahl und transfizierter Zellen tabellarisch gegenübergestellt. Auch dies diente der Visualisierung und möglichen Mustererkennung.

TRAP-Assay:

Neben der optischen Darstellung der Telomeraseaktivität anhand eines Elektropherogrammes (u.a. mit der typischen „Telomerenleiter“) erfolgte die Berechnung der relativen Telomeraseaktivität wie unter 2.4.5 (S. 61) beschrieben und die so erhaltenen Daten wurden für die einzelnen Zellen gegenübergestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der transfizierten Zellen

Im Folgenden soll aufgezeigt werden, welche Auswirkungen die Transfektion auf Telomerenlänge, Telomeraseaktivität und Proliferationsverhalten der Zellen hatte. Durch die Untersuchung der nicht-transfizierten Zelllinien konnte die Variabilität der Parameter Telomeraseaktivität und Telomerenlänge in beiden Mutterzelllinien geprüft werden.

3.1.1 Telomerenlänge der Zelllinien (TRF)

In der Regel zeigte sich, dass Zellen mit dem htDN-Vektor-Konstrukt kürzere Telomere aufwiesen, wohingegen sich Zellen, in denen hTERT ektop exprimiert wurde (htWTIN), mit deutlich längeren Telomeren präsentierten. Zudem konnte man bei Zellen mit dem Leervektor (htIN) und der entsprechenden Mutterzelllinie eine vergleichbare Telomerenlänge finden. Dies konnte in der optischen Auswertung (Abbildung 3.1.1 a und b) gesehen werden und stimmte auch bei der Berechnung der Telomeren-Länge mithilfe des Programms „Telorun“ überein (Tabelle 3.1.1 a und b).

Für die Zelllinie STA-ET1 konnte dieses Verhalten in beiden Versuchen gesehen werden. Für die Zelllinie RM-82 zeigte sich dies ebenfalls für Zellen mit dem htDNIN- und htWTIN-Vektor. Die Nativzelle (RM-82) wies jedoch, im Vergleich zur Zelle mit dem Leervektor (RM-82htIN), eine kürzere Telomerenlänge auf.

Southern-Blot I

Im ersten Southern Blot zeigte die nicht-transfizierte Zelllinie (RM-82), im Vergleich mit zum Leervektor (RM-82htIN), leichte Unterschiede zugunsten größerer terminaler Restriktionsfragmente (TRF) für RM-82htIN. Der Wildtyp (RM-82htWTIN) dominierte mit der größten Mengen TRF, wohingegen RM-82htDNIN die geringste Menge Telomeren-DNA aufwies.

Für STA-ET1 konnten nahezu gleiche Mengen an TRF für die nicht-transfizierte Zelle und die Zelle mit dem Leervektor (STA-ET1htIN) gesehen werden. Als Zeichen langer Telomeren lag die DNA des Wildtyp (STA-ET1htWTIN) sogar oberhalb der Kontroll-DNA („Control-DNA High“), während die Zelle mit dem dominant-negativ-Vektor (STA-ET1htDNIN) deutlich geringere Mengen TRF aufwies.

Tabelle 3.1.1-a: Telomerenlänge im Southern Blot 1. Berechnung mithilfe der terminalen Restriktionsfragmente (TRF). Angabe in Kilobasenpaare (kbp).

<i>Southern-Blot 1</i>				
<i>Zelllinie</i>	RM-82	RM-82htIN P12	RM-82htWTIN P10	RM-82htDNIN P10
<i>Telomerenlänge</i>	3,0 kbp	4,1 kbp	6,2 kbp	2,6 kbp
<i>Zelllinie</i>	STA-ET1	STA-ET1htIN P14	STA-ET1htWTIN P14	STA-ET1htDNIN P2
<i>Telomerenlänge</i>	4,6 kbp	4,5 kbp	7,5 kbp	3,8 kbp

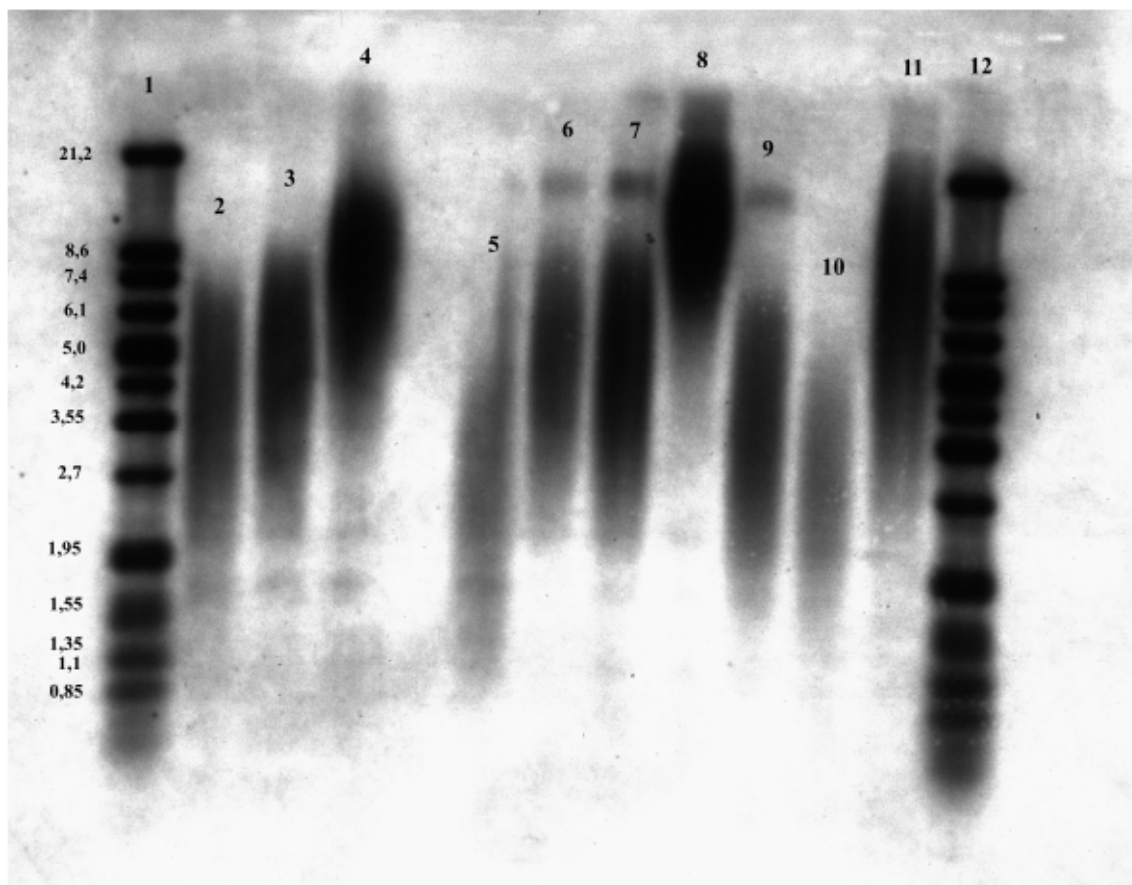


Abbildung 3.1.1-a: Southern-Blot I zur Bestimmung der Telomerenlänge für RM-82 und STA-ET1. Angabe der Länge der Terminalen Restriktionsfragmente (TRF) in Kilobasenpaare (kbp).

1: DIG Molecular weight marker
 2: RM-82: 3,0 kbp
 3: RM-82htIN P12: 4,1 kbp
 4: RM-82htWTIN P10: 6,2 kbp
 5: RM-82htDNIN P10: 2,6 kbp
 6: STA-ET1: 4,6 kbp

7: STA-ET1htIN P14: 4,5 kbp
 8: STA-ET1htWTIN P14: 7,5 kbp
 9: STA-ET1htDNIN P2: 3,8 kbp
 10: Control-DNA-low: 3,1 kbp
 11: Control-DNA-high: 5,7 kbp
 12: DIG Molecular weight marker

Southern-Blot II

Für STA-ET1 wiesen die nicht-transfizierte Zelle (STA-ET1) und die Zelle mit dem Leervektor (STA-ET1htIN) annähernd gleiche Mengen an TRF auf. Der Wildtyp-Vektor (STA-ET1htWTIN) führte zu einer Verlängerung der Telomeren, wohingegen es beim dominant-negativen Vektor (STA-ET1htDNIN) zwar zu einer optisch sichtbaren, rechnerisch jedoch nicht deutlichen Verkürzung der Telomere kam.

Auch bei der Zelllinie RM-82 fanden sich sichtbar größere Mengen an TRF bei dem Wildtyp-Vektor (RM-82htWTIN). Die dominant-negative Zelle (RM-82htDNIN) wies, im Vergleich zum Leervektor (RM-82htIN), geringere Menge an TRF auf, als Zeichen einer Verkürzung der Telomere durch den DNhTERT-Vektor. Die nicht-transfizierte Zelle RM-82 wurde in diesem Southern-Blot durch eine sehr schwache Signalintensität auffällig, ggf. muss hier eine zu geringe Probenzufuhr in Betracht gezogen werden.

Tabelle 3.1.1-b: Telomerenlänge im Southern Blot 2. Berechnung mithilfe der terminalen Restriktionsfragmente (TRF). Angabe in Kilobasenpaare (kbp).

<i>Southern-Blot 2</i>				
<i>Zelllinie</i>	RM-82	RM-82htIN P11	RM-82htWTIN P9	RM-82htDNIN P9
<i>Telomerenlänge</i>	2,4 kbp	4,2 kbp	7,0 kbp	3,2 kbp
<i>Zelllinie</i>	STA-ET1	STA-ET1htIN P15	STA-ET1htWTIN P14	STA-ET1htDNIN P14
<i>Telomerenlänge</i>	3,9 kbp	4,0 kbp	7,0 kbp	3,8 kbp
<i>Zelllinie</i>	STA-ET1	STA-ET1htIN P22	STA-ET1htWTIN P20	STA-ET1htDNIN P23
<i>Telomerenlänge</i>	4,2 kbp	4,8 kbp	8,7 kbp	3,9 kbp

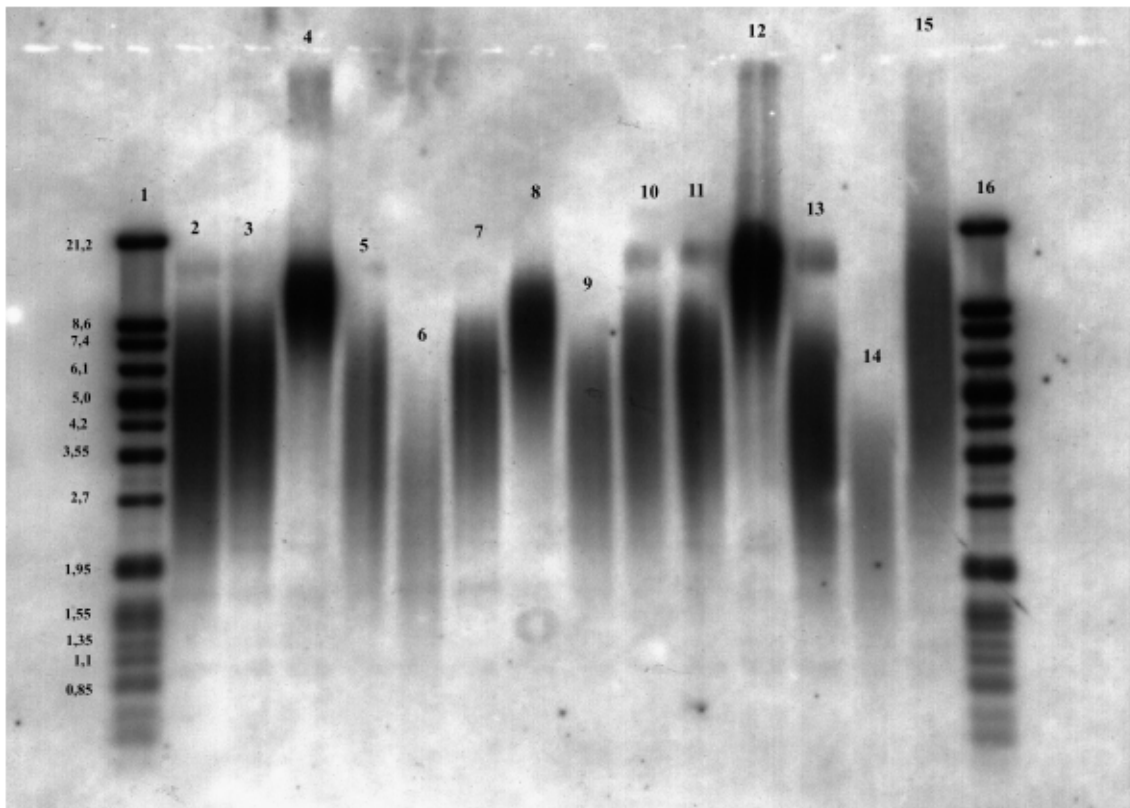


Abbildung 3.1.1-b: Southern-Blot II zur Bestimmung der Telomerenlänge für RM-82 und STA-ET1. Angabe der Länge der Terminalen Restriktionsfragmente (TRF) in Kilobasenpaare (kbp).

1: DIG Molecular weight marker

2: STA-ET1: 3,9 kbp

3: STA-ET1htIN P15: 4,0 kbp

4: STA-ET1htWTIN P14: 7,0 kbp

5: STA-ET1htDNIN P14: 3,8 kbp

6: RM-82: 2,4 kbp

7: RM-82-htIN P11: 4,2 kbp

8: RM-82-htWTIN P9: 7,0 kbp

9: RM-82htDNIN P9: 3,2 kbp

10: STA-ET1: 4,2 kbp

11: STA-ET1htIN P22: 4,8 kbp

12: STA-ET1htWTIN P20: 8,7 kbp

13: STA-ET1htDNIN P23: 3,9 kbp

14: Control-DNA-low: 2,9 kbp

15: Control-DNA-high: 6,0 kbp

16: DIG Molecular weight marker

3.1.2 Vergleich der TRF (Passagezahl und transfizierte Zellen)

Um Unterschiede in der Telomerenlänge in Abhängigkeit von Passagezahl und transfizierter Zelle besser darstellen zu können, wurden die Ergebnisse der Berechnung der terminalen-Restriktionsfragmente (TRF) im Folgenden gegenübergestellt (Tabelle 3.1.2 a - c).

Vergleich der TRF für STA-ET1

Zum einen zeigten sich für STA-ET1 vergleichbare TRF für die Mutterzelle und die entsprechende Zelle mit dem Leervektor (STA-ET1-IN P14, 15 und 22). Zum anderen wurde deutlich, dass die Zelle mit dem htWT-Vektor (P14 und 20) TRF-Mengen im Bereich des doppelten der Zelle mit dem htDN-Vektor (P2, 14 und 23) aufwies. Für STA-ET1htWTIN P20 war mit einer TRF-Länge von 8,7 kbp der höchste Wert erreicht, im Vergleich zu 7,0 bzw. 7,5 kbp für STA-ET1htWTIN (beides P14), sodass dies als positive Korrelation von Telomerenlänge und Passagenzahl für den htWT-Vektor gesehen werden konnte. Dahingegen fanden sich bei der Zelllinie STA-ET1htDNIN in allen drei getesteten Passagen (P2, 14 und 23) gleiche Mengen an TRF.

Tabelle 3.1.2-a: Vergleich der terminalen Restriktionsfragmente zur Telomerenlängen-Bestimmung bei STA-ET1 und STA-ET1htIN. Angabe in Kilobasenpaare (kbp). MW = Mittelwert, VK= Variationskoeffizient

	STA-ET1	STA-ET1htIN	Passage
Southern-Blot 1	4,6 kbp	4,5 kbp	14
Southern-Blot 2	3,9 kbp	4,0 kbp	15
	4,2 kbp	4,8 kbp	22
MW (VK)	4,2 kbp (8,3%)	4,4 kbp (9,1%)	

Tabelle 3.1.2-b: Vergleich der terminalen Restriktionsfragmente zur Telomerenlängen-Bestimmung bei STA-ET1htWTIN und STA-ET1htDNIN. Angabe in Kilobasenpaare (kbp). MW = Mittelwert, VK= Variationskoeffizient.

	STA-ET1htWTIN	Passage	STA-ET1htDNIN	Passage
Southern-Blot 1	7,5 kbp	14	3,8 kbp	2
Southern-Blot 2	7,0 kbp	14	3,8 kbp	14
	8,7 kbp	20	3,9 kbp	23
MW (VK)	7,7 kbp (11,3%)		3,8 (1,5%)	

Vergleich der TRF für RM-82

Für die Zelllinie RM-82 lagen die terminalen Restriktionsfragmente (TRF) der Zelle mit dem Leervektor über 1 kbp über der Mutterzelllinie. Im zweiten Southern Blot fiel der Wert für RM-82 sogar noch geringer aus. Hier muss jedoch (wie bereits in der optischen Auswertung erwähnt) differentialdiagnostisch zu wenig Ausgangsmaterial (DNA) als ursächlich vermutet werden.

Auch für die Zelllinie RM-82 konnte gesehen werden, dass sich die Zelle mit dem htWT-Vektor (P9 und 10) mit TRF-Mengen zeigte, die deutlich oberhalb des Doppelten von der Zelle mit dem htDN-Vektor (P9 und 10) lagen, sodass auch hier eine Telomerenverlängerung durch htWTIN bzw. Telomerenverkürzung durch htDNIN bestätigt werden konnte. Aufgrund nahezu gleicher Passagenzahl konnte keine Aussage zur Änderung der Telomerenlänge, in Abhängigkeit von der Passagenzahl, für die Zelllinie RM-82 getroffen werden.

Tabelle 3.1.2-c: Vergleich der terminalen Restriktionsfragmente zur Telomerenlängen-Bestimmung bei RM-82 und RM-82htIN. Angabe in Kilobasenpaare (kbp). MW = Mittelwert, VK= Variationskoeffizient.

	<i>RM-82</i>	<i>RM-82htIN</i>	<i>Passage</i>
<i>Southern-Blot 1</i>	3,0 kbp	4,1 kbp	12
<i>Southern-Blot 2</i>	2,4 kbp	4,2 kbp	11
<i>MW (VK)</i>	<i>2,7 kbp (15,7%)</i>	<i>4,2 (1,7%)</i>	

Tabelle 3.1.2-d: Vergleich der terminalen Restriktionsfragmente zur Telomerenlängen-Bestimmung bei RM-82htWTIN und RM-82htDNIN. Angabe in Kilobasenpaare (kbp). MW = Mittelwert, VK= Variationskoeffizient.

	<i>RM-82htWTIN</i>	<i>Passage</i>	<i>RM-82htDNIN</i>	<i>Passage</i>
<i>Southern-Blot 1</i>	6,2 kbp	10	2,6 kbp	10
<i>Southern-Blot 2</i>	7,0 kbp	9	3,2 kbp	9
<i>MW (VK)</i>	<i>6,6 kbp (8,6%)</i>		<i>2,9 kbp (14,6%)</i>	

3.1.3 Telomeraseaktivität der Zelllinien

Neben den TRF wurde die Telomeraseaktivität (mithilfe des TRAP-Assays) bestimmt, um die Auswirkungen der Transfektion zu charakterisieren. Analog dazu konnte auch hier die Untersuchung der nicht-transfizierten Zelllinien genutzt werden, um die Variabilität des Parameters Telomeraseaktivität zu prüfen.

Hierzu erfolgte zunächst die optische Auswertung, bei der eine Telomerase-positive Zelle dies an der typischen blauen „Telomerenleiter“ erkennen ließ. In Rot dargestellt ist der Rox-Standard. Gut sichtbar sind hierbei der hohe Telomerenpeak sowie, neben dem Peak des Rox-Standard, der Peak des internen Standards (Abbildung 3.1.3 a). Anhand dieser konnte dann im nächsten Schritt die relative Telomeraseaktivität mit folgender Formel berechnet werden:

Relative Telomeraseaktivität = Fläche Telomerase-Peak / Fläche Interner Standard

Telomeraseaktivität der Zelllinie STA-ET1

Für STA-ET1 konnte durchgehend gezeigt werden, dass die Mutterzelllinie sowie Zellen mit dem Leervektor (htIN) und Zellen mit dem htWTIN-Vektor eine gut sichtbare „Telomerenleiter“ erkennen ließen und somit positiv für Telomeraseaktivität waren. Beispielhaft ist dies im Folgenden an STA-ET1htWTIN P12 dargestellt.

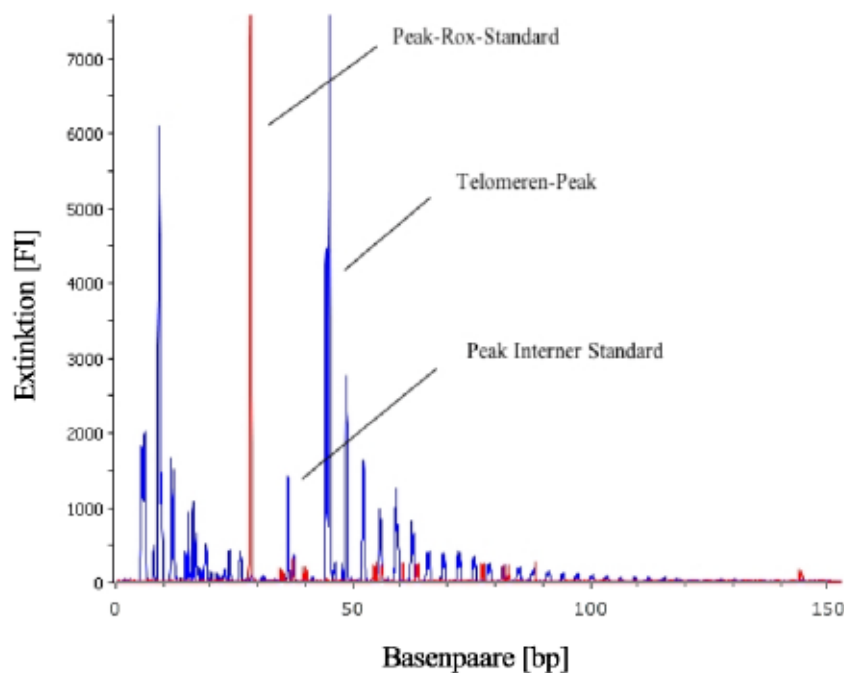


Abbildung 3.1.3-a: Darstellung der Telomeraseaktivität bei STA-ET1htWTIN P12

Für htDNIN-transfizierte Zellen zeigte sich in allen getesteten Zellen eine „Telomerenleiter“. Diese fiel mitunter deutlich schwächer aus als vergleichbare Darstellungen bei den übrigen Telomerase-positiven Zellen (Mutterzelllinie oder Zellen mit dem htIN- bzw. htWTIN-Vektor), dennoch muss diese Zelllinie ebenfalls als Telomerase-positiv bezeichnet werden. Mit zunehmender Passagezahl konnte die Telomerenleiter bei STA-ET1htDNIN zunehmend deutlicher dargestellt werden.

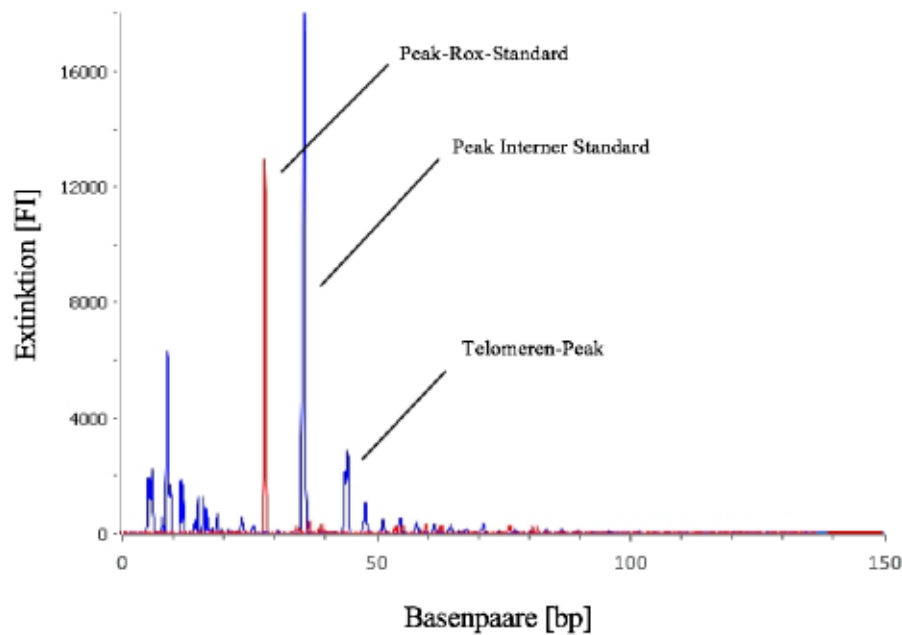


Abbildung 3.1.3-b: Schwache Telomeraseaktivität bei STA-ET1htDNIN P1

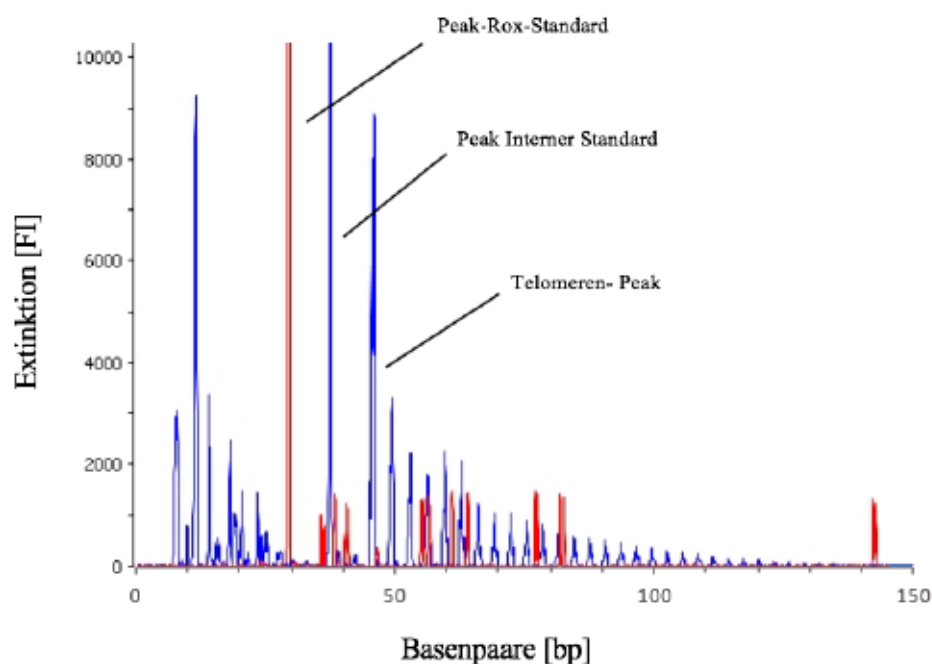


Abbildung 3.1.3-c: Deutlichere Telomeraseaktivität bei STA-ET1htDNIN P11

Im Weiteren erfolgte die Berechnung der relativen Telomeraseaktivität (rel. TA), um diese für Mutterzelllinie und transfizierte Zellen gegenüberzustellen und Unterschiede zwischen den verschiedenen Vektor-Konstrukten auf die TA aufzuzeigen.

Für STA-ET1 und STA-ET1htIN konnten vergleichbare Werte gemessen werden, als Hinweis darauf, dass der htIN-Vektor alleine die Telomeraseaktivität nicht beeinflusst.

Tabelle 3.1.3-a: Telomeraseaktivität bei STA-ET1

Zelllinie	STA-ET1	STA-ET1	STA-ET1	STA-ET1
Relative Telomeraseaktivität	1,8	1,0	1,8	1,3

Tabelle 3.1.3-b: Telomeraseaktivität bei STA-ET1htIN. STA-ET1htIN P22 nicht auswertbar.

Zelllinie	STA-ET1htIN P12	STA-ET1htIN P13	STA-ET1htIN P15	STA-ET1htIN P22
Relative Telomeraseaktivität	1,4	1,0	2,4	nicht auswertbar

Für STA-ET1htWTIN lagen die Werte für Telomeraseaktivität zwei- bis neunfach über denen der Mutterzelllinie bzw. der Zelle mit dem Leervektor. Daraus konnte gedeutet werden, dass Zellen mit dem htWTIN-Vektor und somit zusätzlich ektopter Telomeraseproduktion zu verstärkter Telomeraseaktivität führten.

Tabelle 3.1.3-c: Telomeraseaktivität bei STA-ET1htWTIN

Zelllinie	STA-ET1 htWTIN P11	STA-ET1 htWTIN P12	STA-ET1 htWTIN P14	STA-ET1 htWTIN P20
Relative Telomeraseaktivität	4,4	9,5	8,5	5,6

Nach Transfektion mit dem htDNIN-Vektor zeigten die Zellen eine schwankende Telomeraseaktivität. Lediglich in Passage 1 konnte bei nur schwach sichtbarer Telomerenleiter mit einem Wert von 0,2 kaum Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. Insgesamt wurde sichtbar, dass die Zelle in höheren Passagen sicher Telomerase positiv wurde, sodass eine Reaktivierung von hTERT vermutet werden musste.

Tabelle 3.1.3-d: Telomeraseaktivität bei STA-ET1htDNIN. STA-ET1htDNIN P14 nicht auswertbar.

Zelllinie	STA-ET1 htDNIN P1	STA-ET1 htDNIN P11	STA-ET1 htDNIN P14	STA-ET1 htDNIN P23
Relative Telomeraseaktivität	0,2	1,4	nicht auswertbar	1,0

Telomeraseaktivität der Zelllinie RM-82

Betrachtete man die Mutterzelllinie RM82 bzw. die entsprechende Zelle mit dem Leervektor RM82-htIN, so zeigten sich beide Zelllinien positiv für Telomeraseaktivität. Erkennbar war dies an der typischen „Telomerenleiter“, welche beispielhaft für beide Zelllinien im Folgenden an RM-82 dargestellt ist.

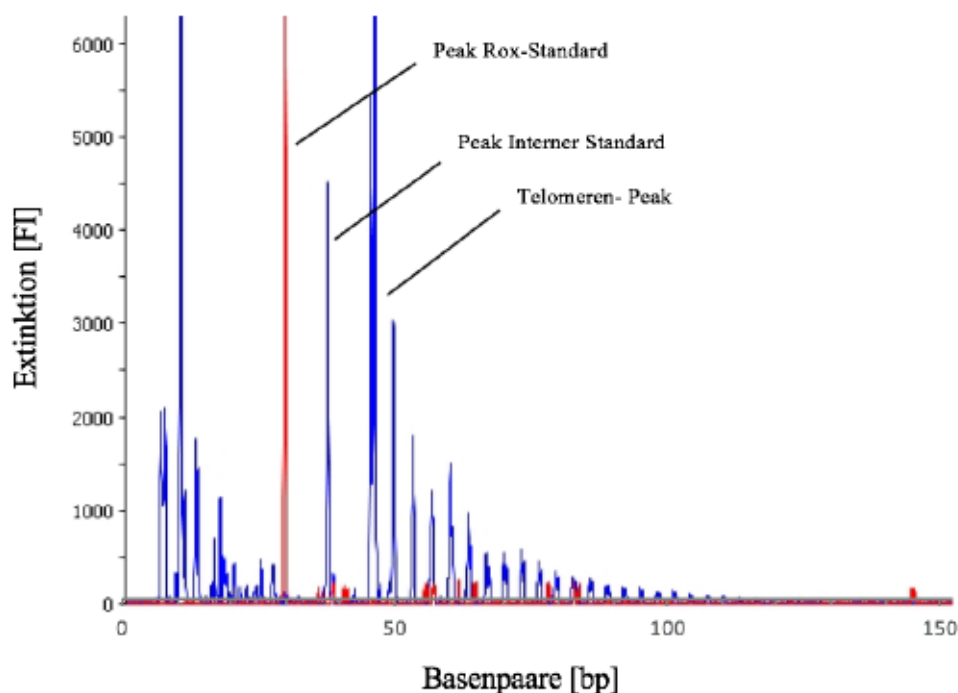


Abbildung 3.1.3-d: Telomeraseaktivität bei RM-82

Durch Transfektion mit dem htWTIN-Vektor war ebenfalls in beiden getesteten Proben deutlich Telomeraseaktivität nachweisbar.

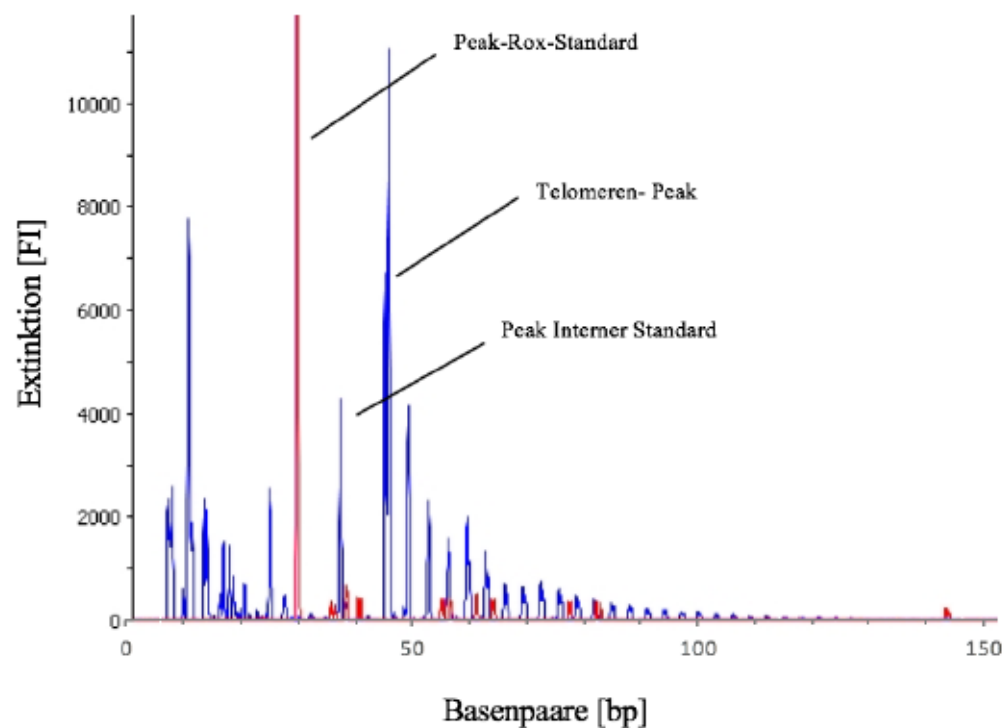


Abbildung 3.1.3-e: Telomeraseaktivität bei RM82-htWTIN P10

Ähnlich der Zelllinie STA-ET1 war auch RM82-htDNIN nicht gänzlich frei von TA. Auch hier war die „Telomerenleiter“ im Vergleich zu den übrigen Zellen (Wildtyp, Leervektor und Mutterzelle) schwächer ausgeprägt, aber dennoch sichtbar.

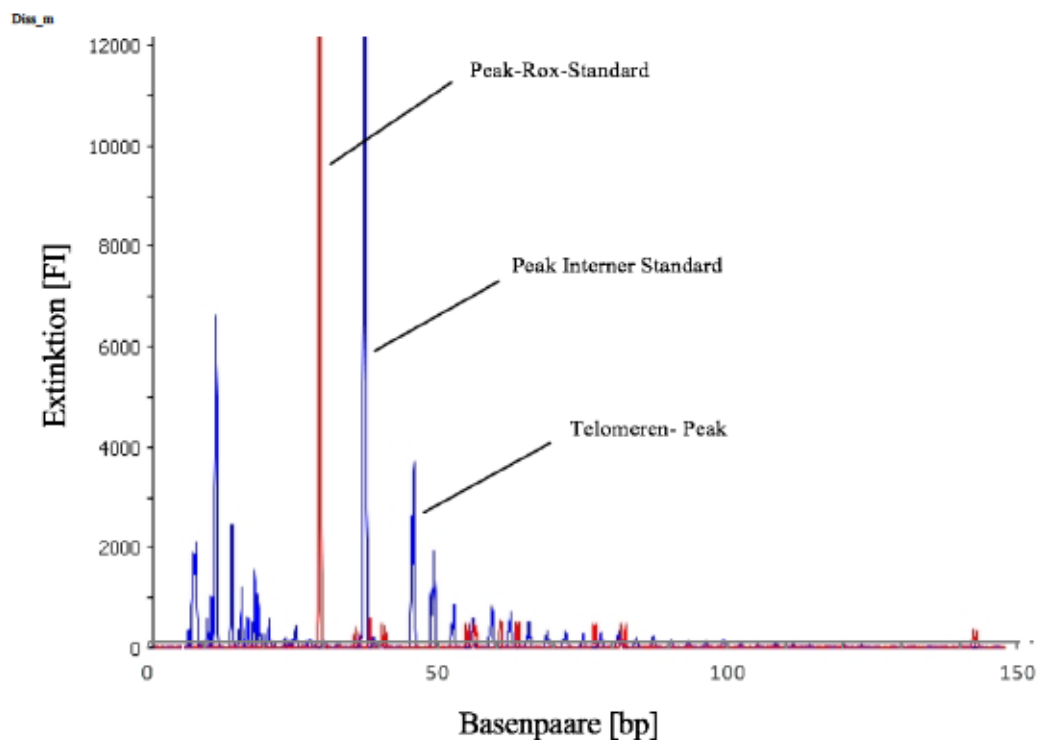


Abbildung 3.1.3-f: Telomeraseaktivität bei RM82-htDNIN P9

Analog erfolgte für die Zelllinie RM-82 (Ausgangs- und transfizierte Zellen) die Berechnung der relativen Telomeraseaktivität, um im Vergleich eventuelle Unterschiede in Abhängigkeit vom Vektorkonstrukt aufzuzeigen.

Für RM-82 konnten in zwei Versuchen vergleichbare Werte an Telomeraseaktivität (TA) bestimmt werden. Die TA für RM-82htIN ergab mit 1,6 und 4,8 eine breitere Bandbreite, war im Mittel jedoch ebenfalls der Mutterzelllinie entsprechend.

Tabelle 3.1.3-e: Relative Telomeraseaktivität für RM-82 und RM-82htIN

Zelllinie	RM-82	RM-82	RM-82htIN P11	RM-82htIN P12
Relative Telomeraseaktivität	3,9	3,7	4,8	1,6

Betrachtet man die TA für Zellen mit dem htWT-Vektor, lag diese mit Werten von 4,8 und 5,6 oberhalb der TA der Mutterzelllinie (3,7 und 3,9), allerdings schien, im Vergleich mit der Zelllinie STA-ET1, hier die zusätzliche, ektope hTERT-Produktion zu einer weniger starken Aktivitätssteigerung zu führen.

Entsprechend den Beobachtungen der optischen Auswertung waren die Zellen mit dem htDNIN-Vektor weiterhin Telomerase-positiv, allerdings wurde mit Werten von 0,3 und 0,4 auch hier eine deutliche Reduktion der TA durch die Transfektion erreicht.

Tabelle 3.1.3-f: Relative Telomeraseaktivität für RM-82htWTIN und RM-82htDNIN

Zelllinie	RM-82 htWTIN P9	RM-82 htWTIN P10	RM-82 htDNIN P9	RM-82 htDNIN P10
Relative Telomeraseaktivität	5,6	4,8	0,3	0,4

3.1.4 Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen

Mit Hilfe des MTT-Assay konnte das Proliferationsverhalten der Vektor-transfizierten und nativen Zellen untersucht werden. Wie unter 2.3 erwähnt, diente hier die gemessene Vabilität der Zellen als Surrogat für die Proliferation, sodass im Weiteren nur von Proliferation gesprochen wird.

Während im Rahmen der Kultivierung für beide Zelllinien (STA-ET1 und RM-82) sowohl für die Mutterzellen als auch die transfizierten Zellen gleiche Teilungsraten gewählt werden konnten (die Zellen wurden in der Regel alle 3-4 Tage einer Teilung zugeführt), zeigte sich in der genaueren Betrachtung im Rahmen des MTT-Test ein unterschiedlich dominantes Wachstum für transfizierte und nicht-transfizierte Zellen.

Proliferationsverhalten der Zelllinie STA-ET1

Es konnten drei Versuchsansätze mit der Zelllinie STA-ET1 ausgewertet werden. Eine Übersicht der einzelnen Versuchsansätze ist Tabelle 2.3.5-a zu entnehmen.

Überwiegend konnte bestätigt werden, dass im Vergleich zum Wildtyp, der Mutterzelle und der Zelle mit dem Leervektor, die Zelle STA-ET1htDNIN das geringste Proliferationsverhalten zeigte.

Im ersten Versuchsansatz (Abbildung 3.1.4-a) zeigten alle Zellen ein kontinuierliches Zellwachstum bis zur Stunde 96. Die ektop hTERT exprimierende Variante ließ mit einem 22,4-fachen Anstieg zur Stunde 96 ein besseres Wachstum erkennen als die dominant negative Variante (Steigerung um den Faktor 18,2). Die Mutterzelllinie konnte in diesem Versuch nicht mit ausgewertet werden, da bei fehlendem Zellwachstum eine Kontamination oder mangelnde Probenzugabe vermutet werden musste.

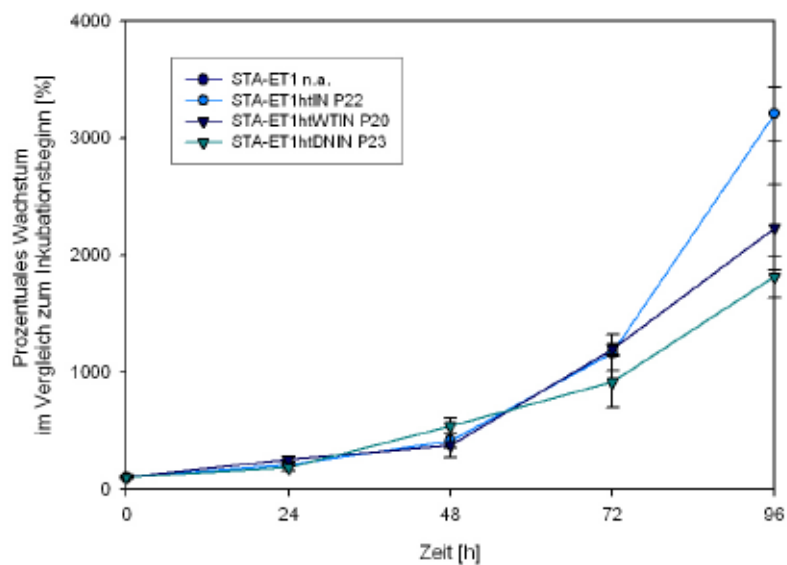


Abbildung 3.1.4-a : Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen Versuchsansatz E-I. STA-ET1htIN P22 (n=4), STA-ET1htWTIN P20 (n=4), STA-ET1htDNIN P23 (n=4). (STA-ET1 ist in diesem Versuch nicht auswertbar).

Auch im zweiten Versuchsansatz (Abbildung 3.1.4-b) zeigten alle Zellen ein kontinuierliches Wachstum bis zur Stunde 72. Anschließend erreichte die Zelle STA-ET1htDNIN (P1) eine Sättigungsphase mit einem maximalen Anstieg um den Faktor 4,4 nach 96 h. Die übrigen Zellen wuchsen stetig weiter und erreichten nach 96h das 10-fache (htWTIN) bis 18-fache (STA-ET1) des Ausgangswertes.

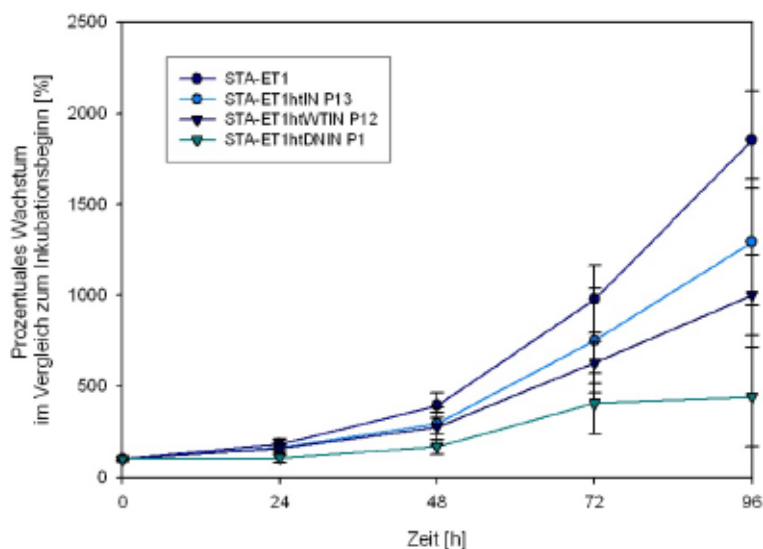


Abbildung 3.1.4-b: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen Versuchsansatz E-II. STA-ET1 (n=12), STA-ET1htIN P13 (n=12), STA-ET1htWTIN P12 (n=12), STA-ET1htDNIN P1 (n=12)

Eine Dominanz des Wildtyp (STA-ET1htWTIN) konnte lediglich im dritten Versuchsansatz (Abbildung 3.1.4-c) gesehen werden. Alle Zellen ließen auch nach 96 h ein stetiges Zellwachstum erkennen, eine Sättigungsphase wurde nicht erreicht. STA-ET1htWTIN hatte zur Stunde 96 im Vergleich zu STA-ET1htDNIN das Wachstum in den letzten 24h verdreifacht, während die Zelle mit dem Negativ-Vektor lediglich die doppelte Wachstumsrate erreichte und somit das schlechteste Wachstum zeigte.

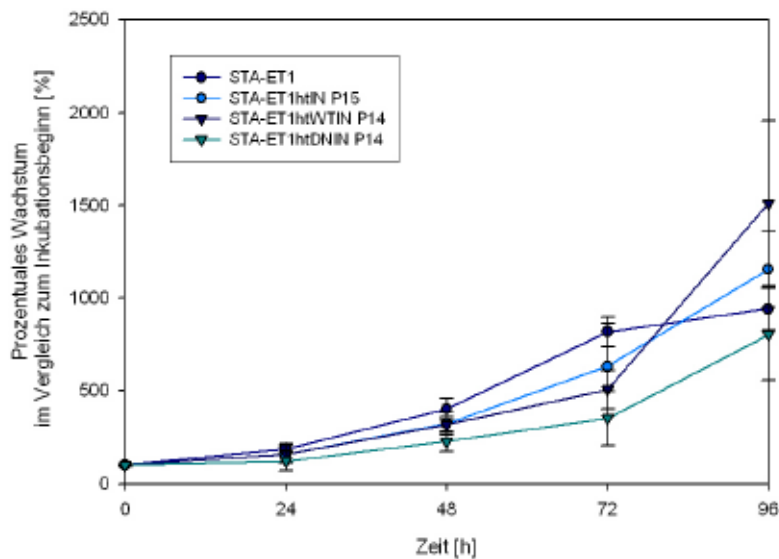


Abbildung 3.1.4-c: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen Versuchsansatz E-III. STA-ET1 (n=12), STA-ET1htIN P15 (n=12), STA-ET1htWTIN P14 (n=12), STA-ET1htDNIN P14 (n=12)

Bei der genaueren Betrachtung der dominant negativen Zelllinie fiel ein unterschiedliches Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von der Passage auf (Abbildung 3.1.4-d). In der niedrigsten Passage (P1) war das geringste Zellwachstum zu vermerken. Nach 72h wurde ein Sättigungsplateau erreicht und es war kein Proliferationszuwachs mehr zu erkennen (maximal Anstieg um den Faktor 4,4 nach 96h). Die Zelle der mittleren Passagen ließ ein zunehmendes Zellwachstum erkennen mit einem maximalen Anstieg um den Faktor 8,0 (P14) nach 96h. Demgegenüber zeigte die Zelle der höchsten Passage (P23) das beste Wachstum mit einem Faktor von 18,2 zur Stunde 96. Sie erreichte damit das 4,5-fache der Zelle in Passage 1.

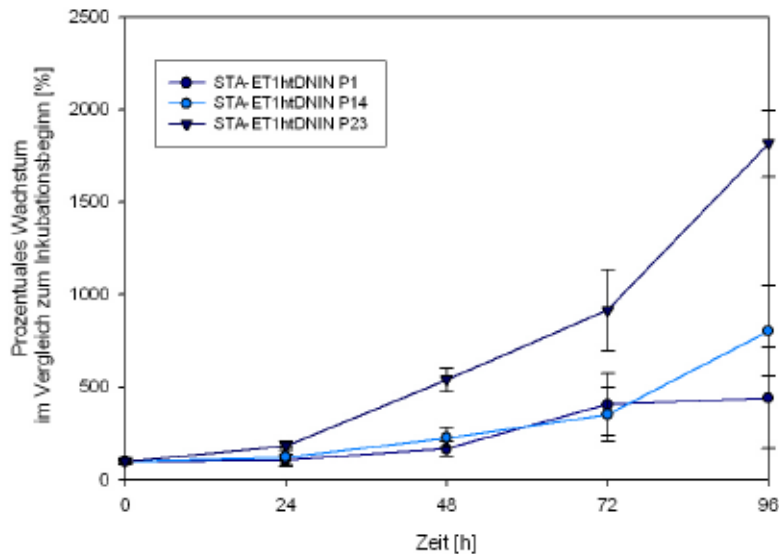


Abbildung 3.1.4-d: Proliferationsverhalten STA-ET1htDNIN in Abhängigkeit von der Passage. Daten aus den Versuchsansätzen E-I bis E-III. STA-ET1htDNIN P1 (n=12), STA-ET1htDNIN P14 (n=12) und STA-ET1htDNIN P23 (n=4)

Proliferationsverhalten der Zelllinie RM-82

Es wurden drei Versuchsansätze mit der Zelllinie RM-82 durchgeführt. Eine Übersicht der einzelnen Versuchsansätze ist Tabelle 2.3.5 a zu entnehmen.

Alle Zellen dieser drei Versuchsansätze zeigten eine kontinuierliche Proliferationszunahme über die gesamte Versuchsdauer. Eine Sättigungsphase wurde nicht erreicht. Auffällig war hier, im Gegensatz zu der Zelllinie STA-ET1, dass die dominant negative Variante (RM-82htDNIN) in zwei der drei Versuchsreihen das stärkste Wachstumsverhalten aller Zellen erkennen ließ. Auch zeigt sich bei der Zelllinie RM-82 generell ein schwächeres Wachstum im Vergleich zu STA-ET1, indem der Ausgangswert bei RM-82 (Stunde 0) sich um den Faktor 3,4 bis maximal 11,9 erhöhte (Stunde 96), während er bei STA-ET1 ein 20-faches des Ausgangswertes erreichte.

So zeigte sich im ersten Versuchsansatz (Abbildung 3.1.4-e) bei allen Zellen ein kontinuierliches Zellwachstum über die Versuchsdauer hinaus, ohne Erreichen einer Sättigungsphase. Das stärkste Proliferationsverhalten war bei der Zelllinie RM-82htDNIN zu erkennen, gefolgt von der Wildtyp-Variante.

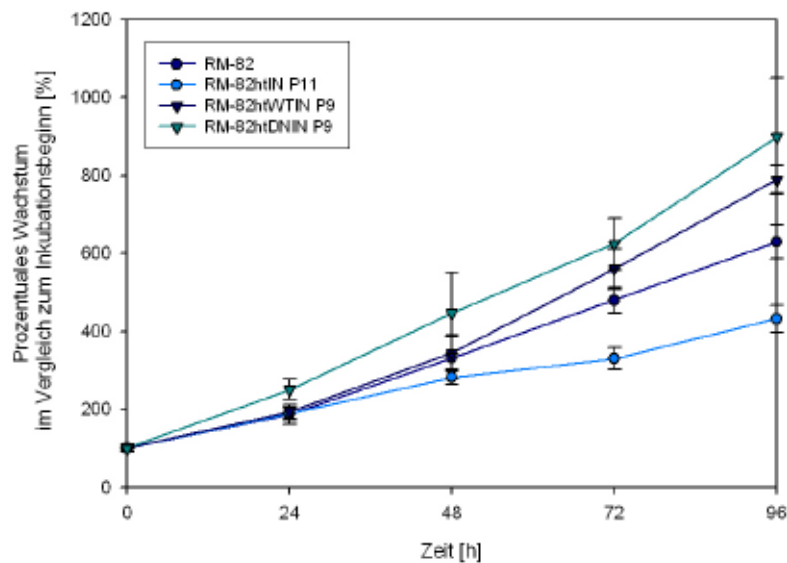


Abbildung 3.1.4-e: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen Versuchsansatz R-I. RM-82 (n=16), RM-82htIN P11 (n=16), RM-82htWTIN P9 (n=16), RM-82htDNIN P9 (n=16)

Auch im zweiten Versuchsansatz (Abbildung 3.1.4-f) konnte bei allen Zellen ein kontinuierliches Zellwachstum über die Versuchsdauer gesehen werden. Das Wachstumsverhalten ähnelte dem aus dem ersten Versuchsansatz, mit dem stärksten Zuwachs bei der Zelle RM-82htDNIN, welche nach 96h fast ein 12-faches des Ausgangswertes erreichte. Das zweitstärkste Wachstum war auch hier bei dem Wildtyp (RM-82htWTIN) zu erkennen. Die Mutterzelle und die Zelle mit dem Leervektor wuchsen annähernd mit gleicher Wachstumsgeschwindigkeit mit einem maximalen Anstieg um den Faktor 5,4 (RM-82) bzw. 6,3 (RM-82htIN).

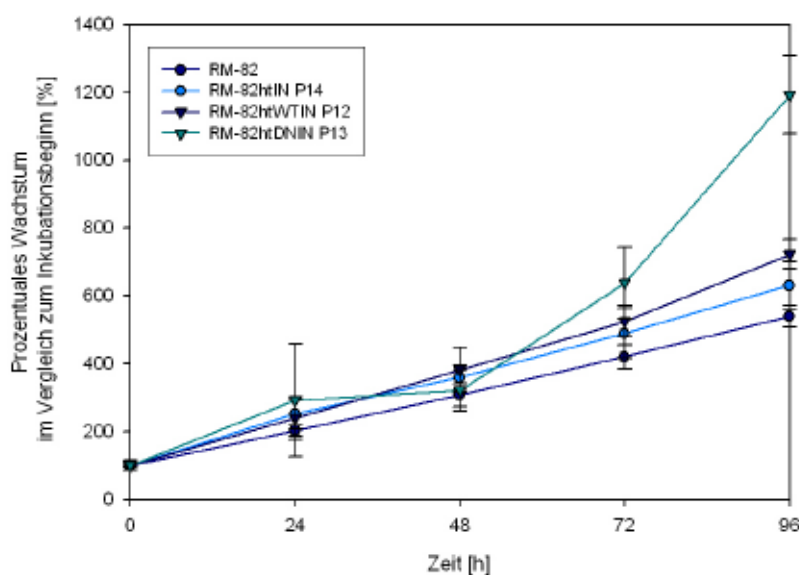


Abbildung 3.1.4-f: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen Versuchsansatz R-II. RM-82 (n=12), RM-82htIN P14 (n=12), RM-82htWTIN P12 (n=12), RM-82htDNIN P13 (n=12)

Lediglich im dritten Versuchsansatz (Abbildung 3.1.4-g) zeigte sich nach 96h das stärkste Wachstum bei der Zelle mit dem Leervektor (htIN), gefolgt von dem Wildtyp (htWTIN). Dieser wies jedoch von 72 bis 96h den größten Wachstumszuwachs auf, indem sich die Zellpopulation nahezu verdreifachte (2,7-fach), wohingegen die Zelle mit dem Leervektor ihre Population zu diesem Zeitpunkt knapp verdoppelt (1,9-fach) hatte. Die dominant negative Zelle zeigte hier, im Vergleich mit den Vorversuchen, einen geringeren Zuwachs. So hatte RM-82htDNIN zur Stunde 96 den Ursprungswert etwas mehr als verdreifacht, während RM-82-htIN fast ein Achtfaches erreichte. Eine Sättigungsphase wurde bei keiner Zelle erreicht.

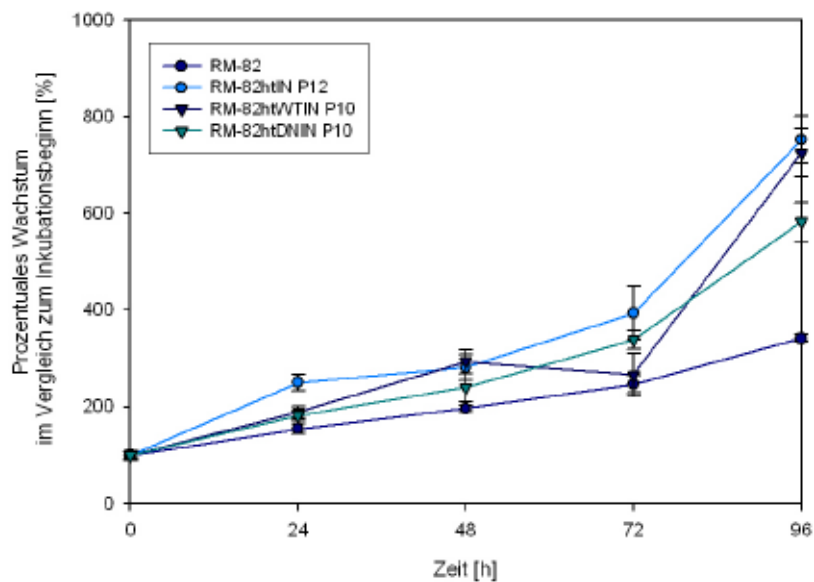


Abbildung 3.1.4-g: Proliferationsverhalten der unbehandelten Kontrollen Versuchsansatz R-III. RM-82 (n=4), RM-82htIN P12 (n=4), RM-82htWTIN P10 (n=4), RM-82htDNIN P10 (n=4)

3.1.5 Verdopplungsraten der Zellpopulationen (Population Doubling)

Im Anschluss wurden die Verdopplungsraten = „Population Doubling“ (Zeitintervall, pro Versuchstag, bis eine Verdopplung der Extinktion erreicht wurde) beider Zelllinien gegenübergestellt, um Effekte der Transfektion auf das Zellwachstum zu erfassen und damit die Effekte der Zytotoxizitätstestung insgesamt und im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Zytotoxizitätstestung besser beurteilen zu können.

Für die Zelllinie STA-ET1 wurden im zweiten und dritten Versuchsansatz vergleichbare Verdopplungsraten (*MW 24,1; V_k 9,7* und *MW 25,9; V_k 10,7*) über die vier Versuchstage erreicht. Der erste Versuchsansatz konnte für STA-ET1, aufgrund von ausbleibendem Zellwachstum über die vier Versuchstage, nicht ausgewertet werden (Tabelle 3.1.5-a).

Für STA-ET1htIN zeigte sich im ersten Versuchsansatz eine veränderliche Verdopplungsrate, mit einer kontinuierlichen Abnahme der Verdopplungszeit innerhalb der ersten drei Versuchstage, während bei den übrigen Versuchen annähernd vergleichbare Werte erreicht wurden (*MW 21,3; V_k 8,1* sowie *MW 29,0; V_k 15,4* und *MW 29,9; V_k 16,1*) (Tabelle 3.1.5 b). Diese lagen somit geringfügig höher als die Verdopplungsraten der Mutterzelle.

Für STA-ET1htWTIN konnte nicht gesehen werden, dass die Zellen in kürzerer Zeit eine Verdopplung ihrer Extinktion (und somit Populationsrate) erreichten. Vielmehr zeigten sich Werte ähnlich denen von STA-ET1 und STA-ET1htIN (Tabelle 3.1.5-c).

Bei der Zelllinie STA-ET1htDNIN war in Passage 1 und 14 sichtbar, dass die Zellen zunächst deutlich länger brauchten (61,2h bzw. 81,1h am ersten Versuchstag), um eine Verdopplung ihrer Population zu erreichen. Zwar nahm die Verdopplungszeit mit jedem Versuchstag weiter ab, lag dennoch im Mittel sichtbar über den Zeiten der Mutterzelle und der übrigen Zellen. Im Gegensatz dazu wurde in Passage 23 ein mit den übrigen transfizierten Zellen bzw. der Mutterzelle vergleichbarer Wert erreicht (Tabelle 3.1.5 d).

Tabelle 3.1.5-a: Population Doubling für STA-ET1 pro Versuchstag. Angabe in h (Stunden); MW= Mittelwert, V_k= Variationskoeffizient; n.a.= nicht auswertbar

<i>Population Doubling [h]</i>	<i>STA-ET1 Versuch E-I</i>	<i>STA-ET1 Versuch E-II</i>	<i>STA-ET1 Versuch E-III</i>	<i>MW (V_k)</i>
<i>24h</i>	<i>n.a.</i>	<i>27,3</i>	<i>26,2</i>	<i>26,8 (2,9 %)</i>
<i>48h</i>	<i>n.a.</i>	<i>24,2</i>	<i>23,9</i>	<i>24,1 (0,9 %)</i>
<i>72h</i>	<i>n.a.</i>	<i>22,0</i>	<i>23,7</i>	<i>22,9 (5,3 %)</i>
<i>96h</i>	<i>n.a.</i>	<i>22,8</i>	<i>29,7</i>	<i>26,3 (18,6 %)</i>
<i>MW</i>		<i>24,1</i>	<i>25,9</i>	
<i>V_k [%]</i>		<i>9,7</i>	<i>10,7</i>	

Tabelle 3.1.5-b: Population Doubling für STA-ET1htIN pro Versuchstag. Angabe in Stunden (h); MW= Mittelwert, Vk= Variationskoeffizient

<i>Population Doubling [h]</i>	<i>STA-ET1htIN P13</i>	<i>STA-ET1htIN P15</i>	<i>STA-ET1htIN P22</i>	<i>MW (VK)</i>
24h	34,5	37,1	22,2	31,3 (25,5 %)
48h	30,6	28,4	23,4	27,5 (13,4 %)
72h	24,8	27,0	20,3	24,0 (14,2 %)
96h	26,0	27,2	19,2	24,1 (17,9 %)
MW	29,0	29,9	21,3	
VK [%]	15,4	16,1	8,8	

Tabelle 3.1.5-c: Population Doubling für STA-ET1htWTIN pro Versuchstag. Angabe in Stunden (h); MW= Mittelwert, Vk= Variationskoeffizient

<i>Population Doubling [h]</i>	<i>STA-ET1 htWTIN P12</i>	<i>STA-ET1 htWTIN P14</i>	<i>STA-ET1 htWTIN P20</i>	<i>MW (VK)</i>
24h	35,9	36,2	18,0	30,0 (34,7 %)
48h	32,7	28,9	25,2	28,9 (13,0 %)
72h	27,1	30,7	20,1	26,0 (20,8 %)
96h	28,9	24,5	21,4	24,9 (15,1 %)
MW	31,2	30,1	21,2	
VK [%]	12,6	16,2	14,3	

Tabelle 3.1.5-d: Population Doubling für STA-ET1htDNIN pro Versuchstag. Angabe in Stunden (h); MW= Mittelwert, Vk= Variationskoeffizient

<i>Population Doubling [h]</i>	<i>STA-ET1 htDNIN P1</i>	<i>STA-ET1 htDNIN P14</i>	<i>STA-ET1 htDNIN P23</i>	<i>MW (VK)</i>
24h	61,2	81,1	27,7	56,7 (47,6 %)
48h	65,1	40,6	19,7	41,8 (54,4 %)
72h	35,6	39,6	22,5	32,6 (27,5 %)
96h	44,9	31,9	22,9	33,2 (33,3 %)
MW	51,7	48,3	23,2	
VK [%]	26,8	46,0	14,3	

Im Gegensatz dazu war bei der Zelllinie RM-82 keine einheitliche Tendenz innerhalb der verschiedenen transfizierten Zellen bzw. der Mutterzelle zu erkennen. Die Verdopplungszeit war bei nahezu allen von Tag eins bis Tag vier kontinuierlich

zunehmend (Tabelle 3.1.5-e bis 3.1.5 g). Insgesamt zeigten sich bei RM-82htDNIN im Mittel die niedrigsten Verdopplungsraten (Tabelle 3.1.5-h).

Tabelle 3.1.5-e: Population Doubling für RM-82 pro Versuchstag. Angabe in Stunden (h); MW= Mittelwert, Vk= Variationskoeffizient

<i>Population Doubling [h]</i>	<i>RM-82 Versuch R-I</i>	<i>RM-82 Versuch R-II</i>	<i>RM-82 Versuch R-III</i>	<i>MW (VK)</i>
24h	26,6	23,5	38,4	29,5 (26,7 %)
48h	27,7	29,6	49,3	35,5 (33,7 %)
72h	31,8	34,8	55,2	40,6 (31,4 %)
96h	36,2	39,4	54,2	43,3 (22,2 %)
<i>MW</i>	30,6	31,8	49,3	
<i>VK [%]</i>	14,2	21,5	15,6	

Tabelle 3.1.5-f: Population Doubling für RM-82htIN pro Versuchstag. Angabe in Stunden (h); MW= Mittelwert, Vk= Variationskoeffizient

<i>Population Doubling [h]</i>	<i>RM-82htIN P11</i>	<i>RM-82htIN P12</i>	<i>RM-82htIN P14</i>	<i>MW (VK)</i>
24h	26,0	18,1	18,0	20,7 (22,2 %)
48h	32,0	32,1	26,0	30,0 (11,6 %)
72h	41,7	36,4	31,4	36,5 (14,1 %)
96h	45,4	33,0	36,1	38,2 (16,9 %)
<i>MW</i>	36,3	29,9	27,9	
<i>VK [%]</i>	24,5	27,0	27,8	

Tabelle 3.1.5-g: Population Doubling für RM-82htWTIN pro Versuchstag. Angabe in Stunden (h); MW= Mittelwert, Vk= Variationskoeffizient

<i>Population Doubling [h]</i>	<i>RM-82 htWTIN P9</i>	<i>RM-82 htWTIN P10</i>	<i>RM-82 htWTIN P12</i>	<i>MW (VK)</i>
24h	25,2	26,1	19,1	23,5 (16,2 %)
48h	26,9	30,9	24,9	27,6 (11,1 %)
72h	29,0	51,0	30,1	36,7 (33,8 %)
96h	32,2	33,6	33,6	33,1 (2,4 %)
<i>MW</i>	28,3	35,4	26,9	
<i>VK [%]</i>	10,6	30,7	23,6	

Tabelle 3.1.5-h: Population Doubling für RM-82htDNIN pro Versuchstag. Angabe in Stunden (h); MW= Mittelwert, Vk= Variationskoeffizient

<i>Population Doubling [h]</i>	<i>RM-82 htDNIN P9</i>	<i>RM-82 htDNIN P10</i>	<i>RM-82 htDNIN P13</i>	<i>MW (VK)</i>
24h	18,1	27,8	15,5	20,5 (31,7 %)
48h	22,2	38,1	28,5	29,6 (27,1 %)
72h	27,2	40,9	26,9	31,7 (25,3 %)
96h	30,3	37,7	26,8	31,6 (17,6 %)
<i>MW</i>	24,5	36,1	24,4	
<i>VK [%]</i>	22,1	15,8	24,6	

3.2 Zytotoxizitätstestung

Im Folgenden wurde die Zytotoxizität der vier für das Ewing Sarkom etablierten Zytostatika Doxorubicin, Etoposid, Ifosfamid und Vincristin an beiden Zelllinien (STA-ET1 und RM-82) untersucht und die Mutterzellen den Vektor-transfizierten Zellen gegenübergestellt. Wie unter 2.3 erwähnt, diente hier die gemessene Viabilität der Zellen als Surrogat für die Proliferation, sodass im Weiteren nur von Proliferation bzw. dem Anteil überlebender/vitaler Zellen gesprochen wird.

3.2.1 Chemosensitivität transfizierter und nicht-transfizierter Zelllinien

3.2.1.1 Inkubation mit Doxorubicin

Doxorubicin mit STA-ET1

Es erfolgten zwei Versuchsreihen mit Doxorubicin (Konzentrationen: 0,0005 μM , 0,005 μM , 0,05 μM , 0,5 μM , 5 μM). In beiden Versuchen konnte gesehen werden, dass eine Inkubation mit niedrigen Zytostatikakonzentrationen (0,0005 μM und 0,005 μM) zur Steigerung der Proliferation führte, während nach 48h (bei Inkubation mit 0,05 μM bis 5 μM Doxorubicin) die Höhe der Zytostatika-Konzentration positiv mit einer Abnahme der Wachstumsrate korreliert war. Die Zytotoxizität von Doxorubicin im ersten Versuch ist nach 48h in Abbildung 3.2.1 a graphisch dargestellt. Es zeigte sich das schwächste Proliferationsverhalten bei der „Telomerase-negativen“ Zelle (STA-ET1htDNIN P23) und das stärkste beim Wildtyp STA-ET1htWTIN P20 (exprimiert zusätzlich ektoptelomerase). So waren für die Zellen mit dem htDN-Vektor geringere Mengen an

Doxorubicin als für den Wildtyp notwendig, um den Anteil vitaler Zellen auf 50% (GI_{50}) zu reduzieren. Nach 72h war dieses Verhalten nicht mehr sichtbar.

Das Wachstumsverhalten der Mutterzelllinie STA-ET1 ist in Versuchsansatz E-I (vermutlich aufgrund fehlender Zytostatikainkubation) nicht auswertbar und somit nicht dargestellt.

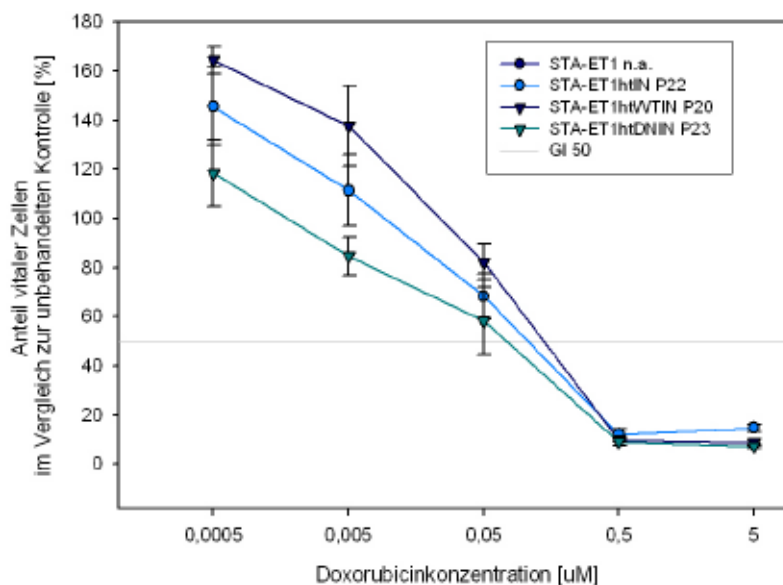


Abbildung 3.2.1-a: Zytotoxizität verschiedener Doxorubicinkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 48h (Versuchsansatz E-I). STA-ET1htIN P22 (n=4), STA-ET1htWTIN P20 (n=4) und STA-ET1htDNIN P23 (n=4) (STA-ET1 graphisch nicht dargestellt)

Die folgende Tabelle 3.2.1-a gibt die für das Erreichen der GI_{50} erforderlichen Zytostatikakonzentrationen wieder. Nach 48h lag diese für STA-ET1htDNIN bei 0,13 μ M, während für den Wildtyp mit 0,25 μ M fast die doppelte Menge an Doxorubicin notwendig war. Zu den übrigen Zeitpunkten bestand kein Unterschied zwischen den vier Zelllinien.

Tabelle 3.2.1-a: Darstellung der GI_{50} [in μ M] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz E-I für Doxorubicin und STA-ET1.

GI_{50} [μ M]	STA-ET1	STA-ET1 htIN (P22)	STA-ET1 htWTIN (P20)	STA-ET1 htDNIN (P23)
Doxorubicin				
24 h	n.a.	0,38	0,37	0,41
48 h	n.a.	0,20	0,25	0,13
72 h	n.a.	0,03	0,03	0,04
96 h	n.a.	0,02	0,03	0,03

Im zweiten Versuch konnte eine noch deutlichere Sensibilisierung gegenüber Doxorubicin für STA-ET1htDNIN nach 48h gesehen werden. Diese zeigte sich besonders stark im Vergleich zum Wildtyp, welcher deutlich höhere Zytostatikakonzentration zum Erreichen der GI₅₀ benötigt (Abbildung 3.2.1. b). Zur Stunde 72 und 96 waren keine Unterschiede mehr erkennbar (nicht abgebildet).

Entsprechend wurde im Vergleich der Konzentrationen zum Erreichen der GI₅₀ (siehe Tabelle 3.2.1-b) nach 48h für STA-ET1htDNIN bei einer Konzentration von 0,06 µM eine Reduktion auf 50%vitaler Zellen erzielt, während für den Wildtyp ein fast 6-faches der Menge (0,35 µM Doxorubicin) notwendig war.

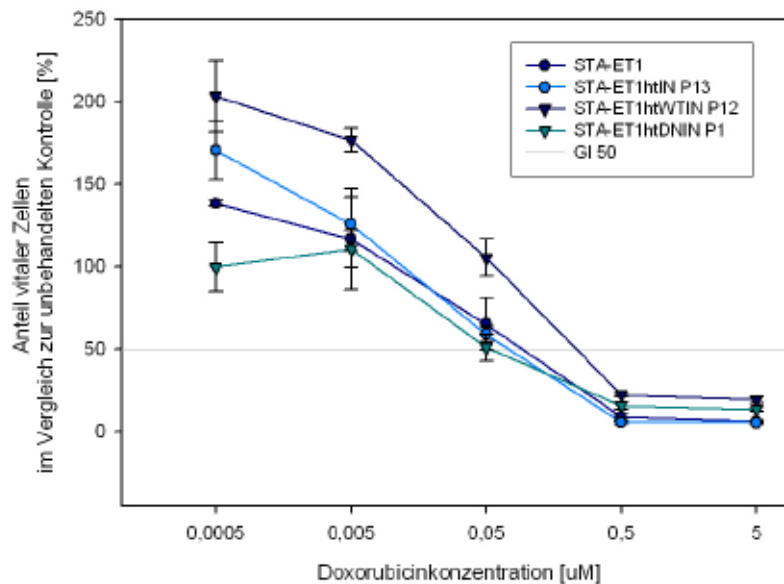


Abbildung 3.2.1-b: Zytotoxizität verschiedener Doxorubicinkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 48h (Versuchsansatz E-II). STA-ET1 (n=4), STA-ET1htIN P13 (n=4), STA-ET1htWTIN P12 (n=4) und STA-ET1htDNIN P1 (n=4)

Tabelle 3.2.1-b: Darstellung der GI₅₀ [in µM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz E-II für Doxorubicin und STA-ET1.

GI ₅₀ [µM]	STA-ET1	STA-ET1 htIN (P13)	STA-ET1 htWTIN (P12)	STA-ET1 htDNIN (P1)
Doxorubicin				
24 h	2,84	0,40	0,45	4,33
48 h	0,17	0,13	0,35	0,06
72 h	0,04	0,04	0,05	0,04
96 h	0,03	0,03	0,03	0,03

Doxorubicin mit RM-82

Es erfolgten zwei Versuchsreihen mit Doxorubicin (Konzentrationen: 0,0005 μM , 0,005 μM , 0,05 μM , 0,5 μM , 5 μM). In beiden Versuchen zeigte sich überwiegend, dass die Zelllinie RM-82htDNIN das schlechteste Wachstum aller Zelllinien unter Inkubation mit Doxorubicin aufwies.

Im ersten der beiden Versuche, graphisch dargestellt nach 48h (Abbildung 3.2.1-c), findet sich der geringste Anteil überlebender Zellen bei der Zelle mit dem DN-Vektor (RM-82htDNIN). Dies wurde im Weiteren insbesondere in höheren Konzentrationsbereichen (0,05 – 5 μM) deutlich. RM-82 und RM-82htIN zeigten sich annähernd ähnlich, mit dem durchschnittlich besten Anteil überlebender Zellen, wohingegen der Wildtyp keinen deutlichen Überlebensvorteil aufwies.

Dies spiegelte sich in ähnlicher Weise in der Betrachtung der GI_{50} wider. RM-82htDNIN lag bis 48h (mit 0,04 μM) deutlich unter der notwendigen Menge für RM-82 (0,19 μM) und RM-82htIN (0,16 μM), welche damit ein 4-faches der Doxorubicinkonzentration benötigten. Allerdings zeigte sich dieses Verhalten auch bei dem Wildtyp (0,05 μM). Nach 96h fand sich für alle Zellen eine nahezu gleiche GI_{50} , so dass eine Steigerung der Sensibilität gegenüber Doxorubicin für RM-82htDNIN oder RM-82htWTIN nicht mehr zu erkennen war.

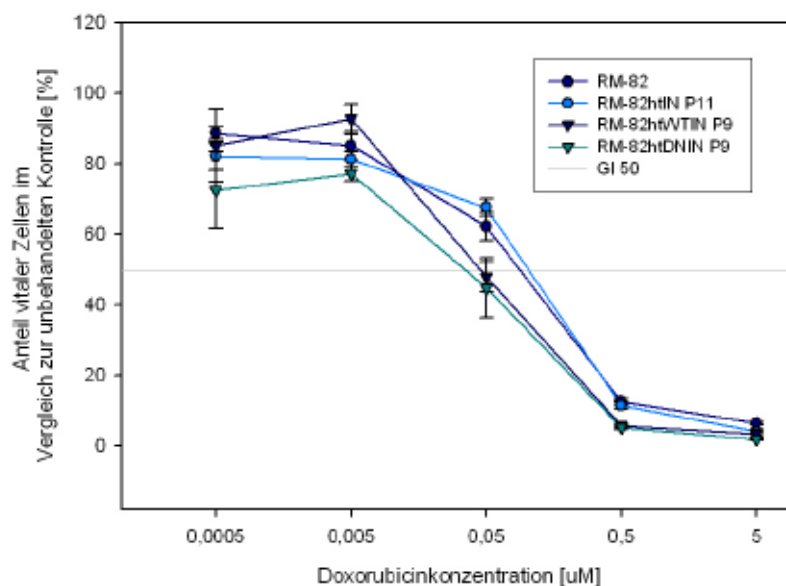


Abbildung 3.2.1-c: Zytotoxizität verschiedener Doxorubicinkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 48h (Versuchsansatz R-I). RM-82 (n=4), RM-82htIN P11 (n=4), RM-82htWTIN P9 (n=4) und RM-82htDNIN P9 (n=4)

Tabelle 3.2.1-c: Darstellung der GI_{50} [in μM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz R-I für Doxorubicin und RM-82.

GI_{50} [μM]	RM-82	RM-82 htIN (P11)	RM-82 htWTIN (P9)	RM-82 htDNIN (P9)
Doxorubicin				
24 h	3,55	0,98	0,62	0,46
48 h	0,16	0,19	0,05	0,04
72 h	0,03	0,12	0,03	0,03
96 h	0,02	0,03	0,02	0,02

Auch im zweiten Versuch zeigte sich eine Sensibilisierung der Zelllinien RM-82htDNIN und RM-82htWTIN gegenüber Doxorubicin. Diesmal über die gesamte Versuchsdauer, sodass für RM-82htDNIN ebenso wie für den Wildtyp geringere Zytostatikamengen zum Erreichen der GI_{50} notwendig waren. Die graphische Darstellung erfolgte hier (Abbildung 3.2.1-d) nach 72h.

In der folgenden Tabelle 3.2.1-d sind die Doxorubicinkonzentrationen zum Erreichen der GI_{50} angegeben. Hier zeigte sich zum Beispiel, dass nach 48h Inkubation für diejenigen Zellen, welche dominant negativ für hTERT waren oder hTERT ektop exprimierten, Konzentrationen von 0,04 μM (RM-82htDNIN) bzw. 0,03 μM (RM-82htWTIN) ausreichen, um den Anteil vitaler Zellen um 50% zu reduzieren, während für die Zelle mit dem Leervektor (RM-82htIN) bzw. die Mutterzelle (RM-82) mit 0,21 μM ein 7-faches der Menge benötigt wurde.

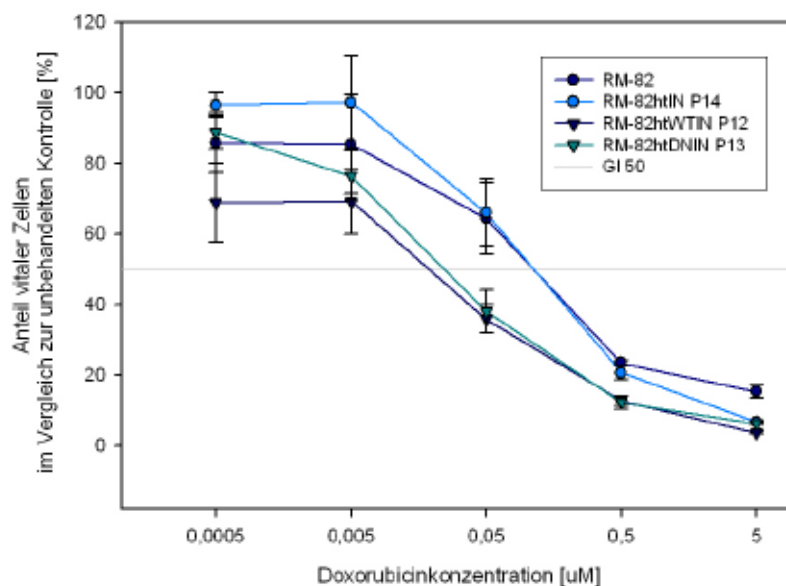


Abbildung 3.2.1-d: Zytotoxizität verschiedener Doxorubicinkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 48h (Versuchsansatz R-II). RM-82 (n=4), RM-82htIN P14 (n=4), RM-82htWTIN P12 (n=4) und RM-82htDNIN P13 (n=4)

Tabelle 3.2.1-d: Darstellung der GI_{50} [in μM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz R-II für Doxorubicin und RM-82.

GI_{50} [μM]	RM-82	RM-82 htIN (P14)	RM-82 htWTIN (P12)	RM-82 htDNIN (P13)
Doxorubicin				
24 h	3,38	1,01	0,80	0,50
48 h	0,21	0,21	0,03	0,04
72 h	0,04	0,05	0,03	0,03
96 h	0,02	0,03	0,01	0,01

3.2.1.2 Inkubation mit Etoposid

Etoposid mit STA-ET1

Es erfolgten zwei Versuchsreihen mit Etoposid (Konzentrationen: 0,05 μM , 0,5 μM , 5 μM , 50 μM , 500 μM). In beiden Versuchen zeigte sich, über nahezu die gesamte Versuchsdauer, der höchste Anteil überlebender Zellen bei STA-ET1htDNIN. Deutlich wurde dies vor allem bei Zytostatika-Konzentrationen über 0,5 μM .

Der erste Versuch mit Etoposid ist in Abbildung 3.2.1-e bei 72h graphisch dargestellt. Wie an den übrigen Tagen lag der Anteil überlebender Zellen bei der Zelle mit dem DN-Vektor (STA-ET1htDNIN) höher als bei den übrigen Zelllinien. Die Zellen mit dem Wildtyp-Vektor (STA-ET1htWTIN) zeigten ein schwächeres Überleben unter Zytostatikainkubation als Zellen mit dem htDN-Vektor, lagen jedoch noch knapp über dem Anteil überlebender Zellen mit dem htIN-Vektor (STA-ET1htIN) bzw. der Mutterzelle (STA-ET1).

Dies spiegelte sich ebenso in der Betrachtung der GI_{50} -Konzentrationen wider (Tabelle 3.2.1-e). Die Zelllinie STA-ET1htDNIN benötigte nach 48h über ein 5-faches (2,18 μM) der Menge an Etoposid, welches STA-ET1htWTIN benötigte (0,40 μM), um die GI_{50} zu erreichen. Auch nach 96h lag der Bedarf bei STA-ET1htDNIN (1,76 μM) noch knapp 8-fach höher als beim Wildtyp (0,23 μM).

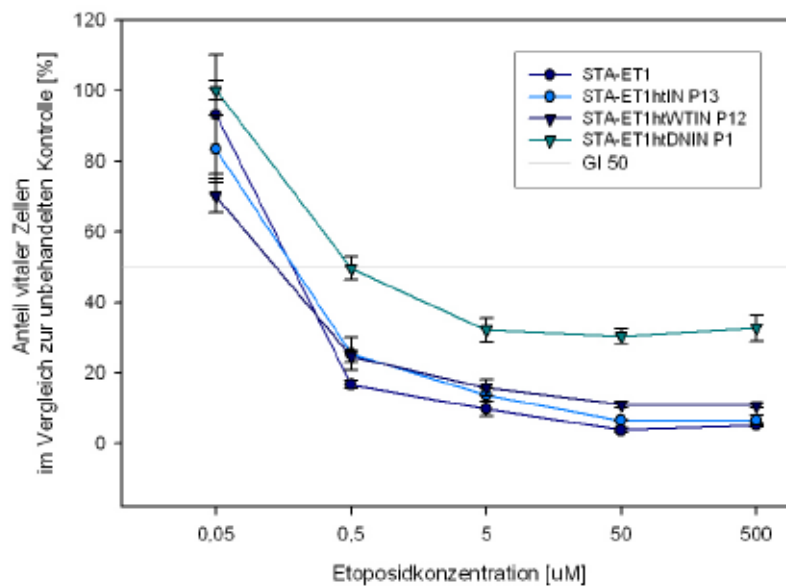


Abbildung 3.2.1-e: Zytotoxizität verschiedener Etoposidkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 72h Inkubation (Versuchsansatz E-II). STA-ET1 (n=4), STA-ET1htIN P13 (n=4), STA-ET1htWTIN P12 (n=4) und STA-ET1htDNIN P1 (n=4)

Tabelle 3.2.1-e: Darstellung der GI_{50} [in µM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz E-II für Etoposid und STA-ET1. STA-ET1htDNIN bei 24h nicht auswertbar (n.a.).

GI_{50} [µM]	STA-ET1	STA-ET1 htIN (P13)	STA-ET1 htWTIN (P12)	STA-ET1 htDNIN (P1)
Etoposid				
24 h	12,35	27,93	41,76	n.a.
48 h	0,46	0,44	0,40	2,18
72 h	0,30	0,31	0,25	0,50
96 h	0,22	0,30	0,23	1,76

Auch im zweiten Versuch (graphisch dargestellt nach 48h in Abbildung 3.2.1-f) ließ STA-ET1htDNIN über 0,5 µM an allen Versuchstagen das stärkste Überleben erkennen. Dennoch unterschied sich das Wachstumsverhalten von STA-ET1htDNIN deutlich weniger stark von den anderen Zelllinien als im Vorversuch, sodass die GI_{50} für den DN-Vektor einen messbaren Bereich zwischen 0,39 µM (48h) und 0,17 µM (72h) umfasste und damit ein bis zu 2,8-faches des Wildtyp mit 0,28 µM (48h) und 0,06 µM (72h) (siehe Tabelle 3.2.1-f).

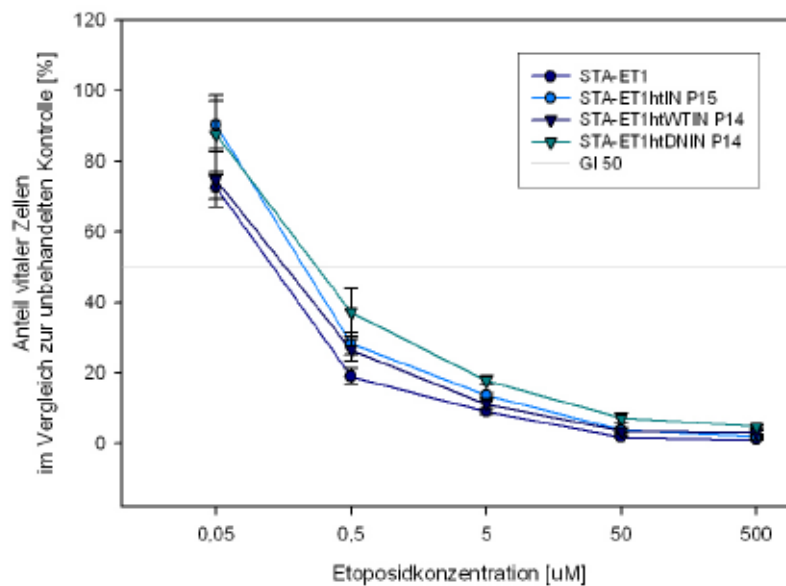


Abbildung 3.2.1-f: Zytotoxizität verschiedener Etoposidkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 48h Inkubation (Versuchsansatz E-III). STA-ET1 (n=4), STA-ET1htIN P15 (n=4), STA-ET1htWTIN P14 (n=4) und STA-ET1htDNIN P14 (n=4)

Tabelle 3.2.1-f: Darstellung der GI_{50} [in µM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz E-III für Etoposid und STA-ET1. STA-ET1htIN und STA-ET1htDNIN bei 24h nicht auswertbar (n.a.).

GI_{50} [µM]	STA-ET1	STA-ET1 htIN (P15)	STA-ET1 htWTIN (P14)	STA-ET1 htDNIN (P14)
Etoposid				
24 h	0,85	n.a.	1,65	n.a.
48 h	0,24	0,34	0,28	0,39
72 h	0,10	0,14	0,06	0,17
96 h	0,24	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Etoposid mit RM-82

Es erfolgten zwei Versuchsreihen mit Etoposid (Konzentrationen: 0,05 µM, 0,5 µM, 5 µM, 50 µM, 500 µM). Zwar zeigte sich in beiden Versuchen überwiegend das geringste Zellwachstum bei der Zelllinie RM-82htDNIN, jedoch lagen die Wachstumskurven aller Zelllinien insgesamt sehr dicht beieinander.

Der erste Versuch ist nach 96h graphisch dargestellt (Abbildung 3.2.1-g). Es zeigte sich (wie an den übrigen Versuchstagen) RM-82htDNIN am sensibelsten gegenüber Etoposid.

Am deutlichsten wurde dies in mittleren Konzentrationsbereichen (0,5 - 5 μM). Das zweitschwächste Überleben fand sich hier bei dem Wildtyp (RM-82htWTIN).

In der Betrachtung der GI_{50} (Tabelle 3.2.1-g) zeigte sich, dass RM-82htDNIN und RM-82htWTIN nahezu vergleichbare Mengen an Etoposid zum Erreichen der GI_{50} benötigten. Nach 24h Inkubation lagen sie mit 2,71 μM (RM-82htDNIN) bzw. 3,34 μM (RM-82htWTIN) noch deutlich unter RM-82htIN und RM-82, welche mit 14,35 μM (RM-82htIN) und 18,09 μM (RM-82) ein 4-6 -faches der Zytostatikamenge erforderten. An den folgenden Versuchstagen glichen sich die Zytostatikamengen aller Zelllinien zunehmend an und ließen keine einheitliche Tendenz mehr erkennen.

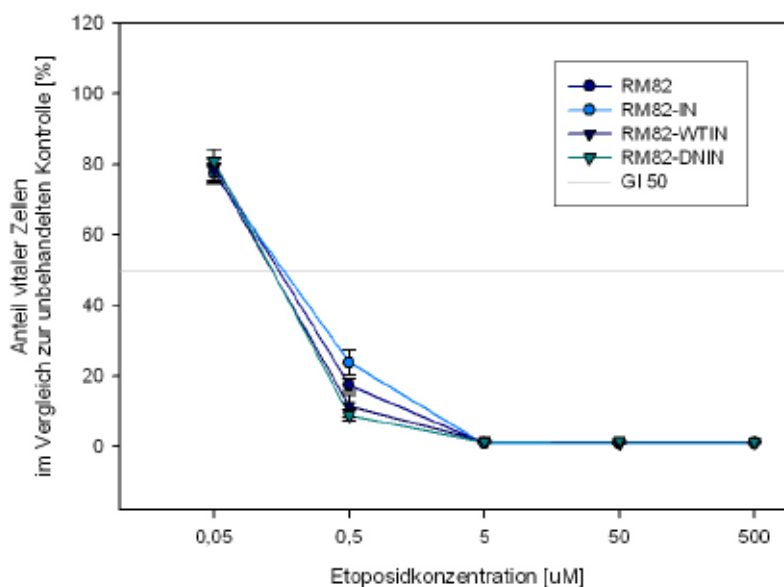


Abbildung 3.2.1-g: Zytotoxizität verschiedener Etoposidkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 96h Inkubation (Versuchsansatz R-I). RM-82 (n=4), RM-82htIN P11 (n=4), RM-82htWTIN P9 (n=4) und RM-82htDNIN P9 (n=4)

Tabelle 3.2.1-g: Darstellung der GI_{50} [in μM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz R-I für Etoposid und RM-82.

GI_{50} [μM]	RM 82	RM-82 htIN (P11)	RM-82 htWTIN (P9)	RM-82 htDNIN (P9)
Etoposid				
24 h	18,09	14,35	3,34	2,71
48 h	0,37	0,77	0,48	0,37
72 h	0,32	0,42	0,31	0,31
96 h	0,26	0,28	0,24	0,24

Der zweite Versuch ist ebenfalls nach 96h graphisch dargestellt (Abbildung 3.2.1-h). In Konzentrationsbereichen bis 0,5 μM wies RM-82htDNIN hier den geringsten Anteil überlebender Zellen auf und präsentierte sich so am sensibelsten gegenüber Etoposid. Dennoch war diese Tendenz an den übrigen Versuchstagen deutlich weniger stark ausgeprägt, teilweise lag der Prozentsatz des Wildtyp noch unter der Zelle mit dem Negativ-Vektor.

Ähnlich zeigte es sich im Vergleich der GI_{50} (Tabelle 3.2.1-h). So lag die benötigte Menge Etoposid nach 48h für RM-82htDNIN mit 0,4 μM zwar deutlich unter der von RM-82 (0,72 μM) und RM-82htIN (0,85 μM), dennoch wurden für RM-82htWTIN sogar nur 0,36 μM zur 50% Wachstumshemmung benötigt.

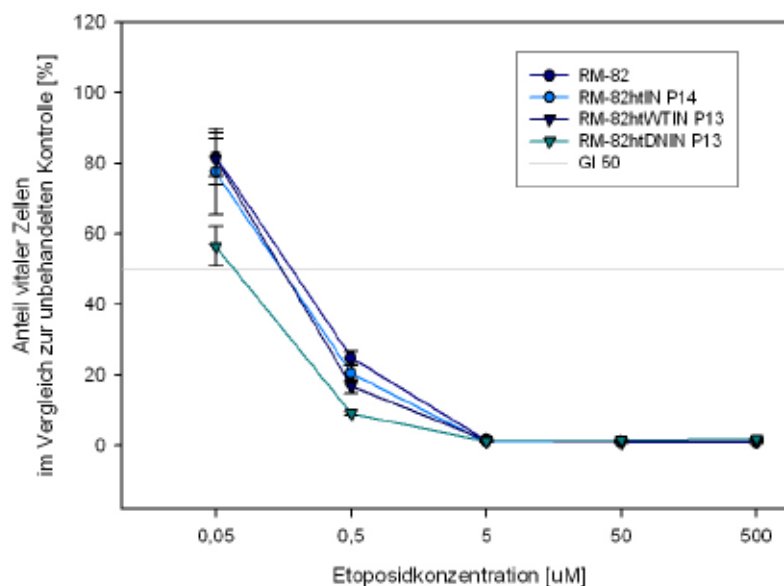


Abbildung 3.2.1-h: Zytotoxizität verschiedener Etoposidkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 96h Inkubation (Versuchsansatz R-II). RM-82 (n=4), RM-82htIN P14 (n=4), RM-82htWTIN P12 (n=4) und RM-82htDNIN P13 (n=4)

Tabelle 3.2.1-h: Darstellung der GI_{50} [in μM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz II für Etoposid und RM-82

GI_{50} [μM]	RM 82	RM-82 htIN (P14)	RM82ht WTIN(P12)	RM-82 htDNIN (P13)
Etoposid				
24 h	22,31	4,48	2,75	4,08
48 h	0,72	0,85	0,36	0,40
72 h	0,39	0,38	0,28	0,34
96 h	0,30	0,27	0,27	0,11

3.2.1.3 Inkubation mit Ifosfamid

Ifosfamid mit STA-ET1

Für die Inkubation mit Ifosfamid erfolgte ein Versuch (Konzentrationen: 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM), graphisch dargestellt bei 72h (Abbildung 3.2.1-i).

STA-ET1htDNIN zeigte, ebenso wie STA-ET1htWTIN, bei Konzentrationen von 1 -100 μM ein schlechteres Überleben als die Mutterzelllinie und die Zelle mit dem Leervektor. Bei der Betrachtung der GI_{50} bestätigte sich diese Beobachtung. Unter Inkubation mit Ifosfamid lag der Bereich der benötigten Ifosfamiddosis für STA-ET1htDNIN bei 4,52 μM bis 17,14 μM und für STA-ET1htWTIN bei 2,62 μM bis 13,55 μM , während für STA-ET1htIN ein bis zu 3-faches der Dosis (6,41 μM bis 41,89 μM) notwendig war.

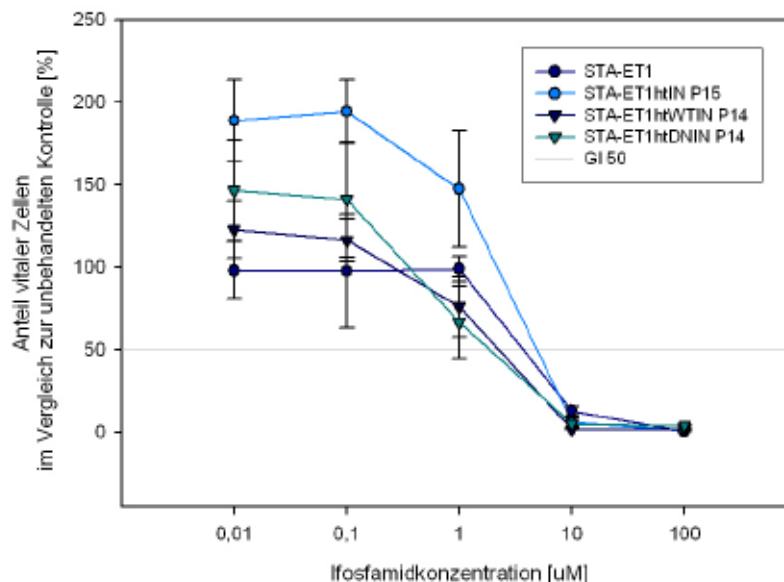


Abbildung 3.2.1-i: Zytotoxizität verschiedener Ifosfamidkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 72h Inkubation (Versuchsansatz E-III). STA-ET1 (n=4), STA-ET1htIN P15 (n=4), STA-ET1htWTIN P14 (n=4) und STA-ET1htDNIN P14 (n=4)

Tabelle 3.2.1-i: Darstellung der GI_{50} [in μM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz E-III für Ifosfamid und STA-ET1.

GI_{50} [μM]	STA-ET1	STA-ET1 htIN (P15)	STA-ET1 htWTIN (P14)	STA-ET1 htDNIN (P14)
Ifosfamid				
24 h	56,62	41,89	13,55	17,14
48 h	8,07	7,71	6,42	6,32
72 h	6,13	7,20	4,17	3,44
96 h	5,71	6,41	2,62	4,52

Ifosfamid mit RM-82

Es erfolgten zwei Versuche für die Inkubation mit Ifosfamid (Konzentrationen: 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM). Insgesamt zeigte sich in beiden Versuchen überwiegend der geringste Anteil überlebender Zellen bei der Zelle mit dem Negativ-Vektor (RM-82htDNIN), gefolgt vom Wildtyp.

Der erste Versuch ist nach 48h graphisch dargestellt (Abbildung 3.2.1-j). Insbesondere in Konzentrationsbereichen über 1 μM ließ RM-82htDNIN den geringsten Anteil lebender Zellen erkennen, gefolgt vom Wildtyp (RM-82htWTIN), welcher zusätzlich (bis zur Stunde 48) für Ifosfamidkonzentrationen über 0,1 μM den höchsten Prozentsatz erreichte.

In der der Betrachtung der GI_{50} (Tabelle 3.2.1 j) fand sich nach 48h (5,98 μM) und 72h (4,76 μM) ein geringerer Wert für RM-82htDNIN als für RM-82 (7,94 μM nach 48h und 5,75 μM nach 72h) oder RM-82htWTIN (6,40 μM nach 48h und 5,05 μM nach 72h). Insgesamt lag die GI_{50} aller Zellen jedoch in ähnlichen Konzentrationsbereichen, sodass sich kein einheitlicher Unterschied über alle vier Versuchstage finden ließ.

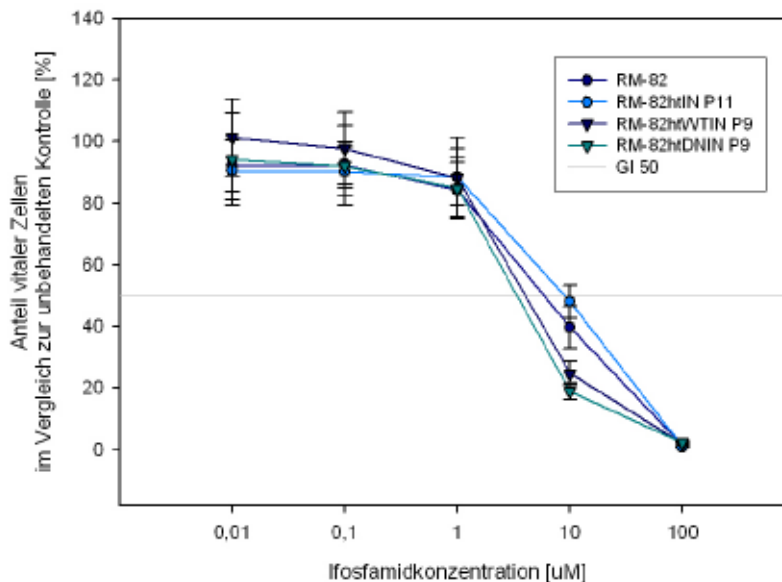


Abbildung 3.2.1-j: Zytotoxizität verschiedener Ifosfamidkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 48h Inkubation (Versuchsansatz R-I). RM-82 (n=8), RM-82htIN P11 (n=8), RM-82htWTIN P9 (n=8) und RM-82htDNIN P9 (n=8)

Tabelle 3.2.1-j: Darstellung der GI_{50} [in μM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz R-I für Ifosfamid und RM-82.

GI_{50} [μM]	RM-82	RM-82 htIN (P11)	RM-82 htWTIN (P9)	RM-82 htDNIN (P9)
Ifosfamid				
24 h	45,77	39,35	47,31	38,83
48 h	7,94	9,30	6,40	5,98
72 h	5,75	7,14	5,05	4,76
96 h	4,35	5,65	4,29	4,53

Im zweiten Versuch mit Ifosfamid, graphisch dargestellt nach 48h (Abbildung 3.2.1.k), konnte eine deutlichere Abnahme der Zellzahl (im Sinne einer Sensibilisierung gegenüber Ifosfamid) für die Zelle mit den DN-Vektor gesehen werden. Der prozentuale Anteil überlebender Zellen lag nach 48h und einer Konzentration von 1 μM bei 66,8%, während für RM-82 noch 91,6% der Zellen vital waren.

In gleicher Weise konnten bei der Betrachtung der GI_{50} (Tabelle 3.2.1-k) an allen vier Versuchstagen geringere Konzentrationen für die GI_{50} bei RM-82htDNIN festgestellt werden.

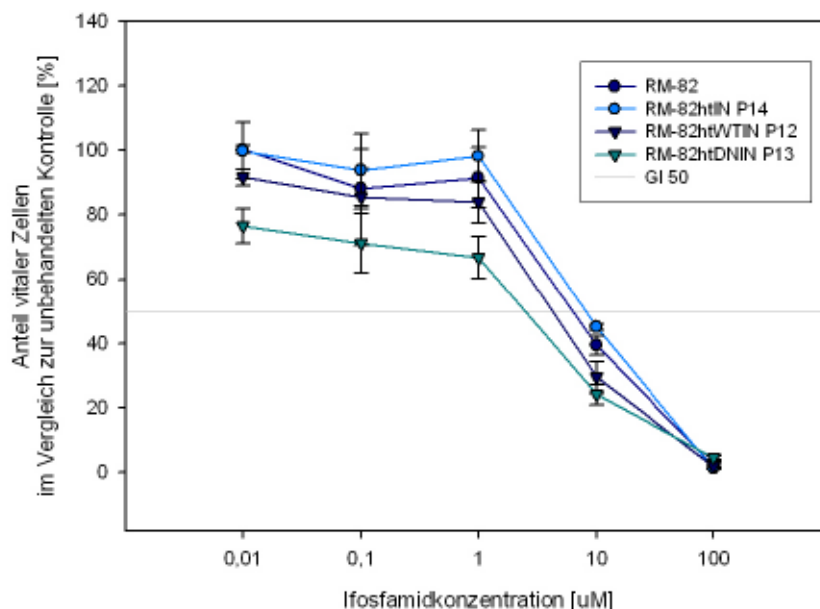


Abbildung 3.2.1-k: Zytotoxizität verschiedener Ifosfamidkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 48h Inkubation (Versuchsansatz R-II). RM-82 (n=4), RM-82htIN P14 (n=4), RM-82htWTIN P12 (n=4) und RM-82htDNIN P13 (n=4)

Tabelle 3.2.1-k: Darstellung der GI_{50} [in μM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz R-II für Ifosfamid und RM-82

GI_{50} [μM]	RM-82	RM-82 htIN (P14)	RM-82 htWTIN (P12)	RM-82 htDNIN (P13)
Ifosfamid				
24 h	45,84	46,64	44,60	35,31
48 h	8,18	9,16	6,62	4,54
72 h	5,36	7,25	5,79	3,98
96 h	3,86	3,90	2,42	2,09

3.2.1.4 Inkubation mit Vincristin

Vincristin mit STA-ET1

Es erfolgten zwei Versuchsreihen mit Vincristin (Konzentrationen: 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM). Insgesamt zeigte sich nach 48h bis 96h in beiden Versuchen der höchste Anteil überlebender Zellen bei der Zelle mit dem htDNIN-Vektor. Zudem fiel auf, dass alle Zelllinien insgesamt sehr chemosensibel waren, so dass die GI_{50} nach 48h in beiden Versuchen unterhalb der eingesetzten Zytostatikadosis lag.

Der erste Versuch mit Vincristin an STA-ET1 ist nach 48h (Abbildung 3.2.1 I) graphisch dargestellt. Die dominant negative Zelle zeigte über 48h in allen Konzentrationsbereichen den höchsten Anteil überlebender Zellen, gefolgt von dem Wildtyp. Für STA-ET1 und STA-ET1htIN fand sich ein vergleichbares Überleben. Dieses lag zu jeder Zeit unter den Zellen mit dem htWTIN- und htDNIN-Vektor.

Auch in der Betrachtung der GI_{50} (Tabelle 3.2.1-l) zeigte sich eine deutliche Chemosensitivität aller Zellen gegenüber Vincristin. Nach 48h lag die GI_{50} bei allen Zelllinien unter der minimal eingesetzten Zytostatikakonzentration. Somit ließen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien erkennen.

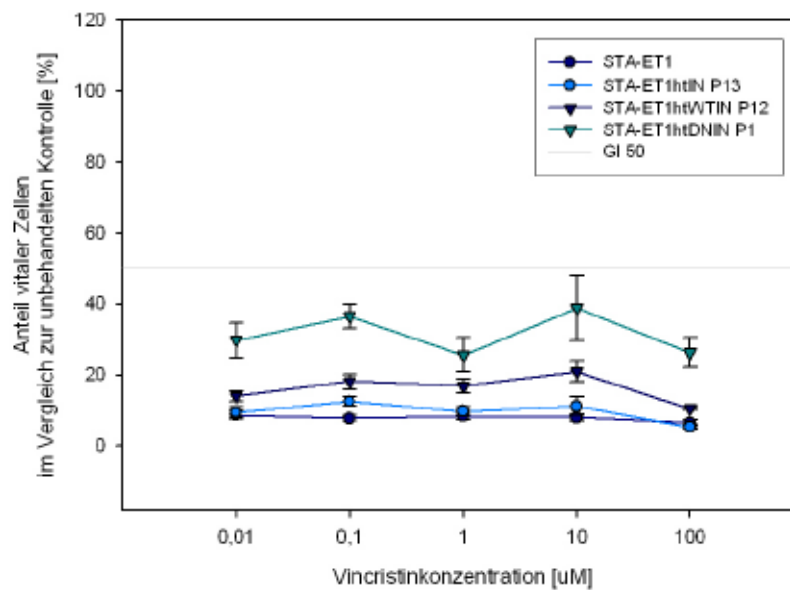


Abbildung 3.2.1-l: Zytotoxizität verschiedener Vincristinkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 48h Inkubation (Versuchsansatz E-II). STA-ET1 (n=4), STA-ET1htIN P13 (n=4), STA-ET1htWTIN P12 (n=4) und STA-ET1htDNIN P1 (n=4)

Tabelle 3.2.1-l: Darstellung der GI_{50} [in µM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz E-II für Vincristin und STA-ET1.

GI_{50} [µM]	STA-ET1	STA-ET1 htIN (P13)	STA-ET1 htWTIN (P12)	STA-ET1 htDNIN (P1)
Vincristin				
24 h	> 100	< 0,01	24,10	30,98
48 h	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
72 h	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
96 h	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Auch im zweiten Versuch lag, nach 24h (Abbildung 3.2.1-m), der Anteil überlebender Zellen von STA-ET1htDNIN zwar über den übrigen Zelllinien, der Unterschied fiel jedoch aufgrund der starken Chemosensitivität aller Zelllinien im Weiteren graphisch nicht mehr sehr deutlich auf. In gleicher Weise konnte ein Vergleich der GI_{50} nicht erfolgen (Tabelle 3.2.1-m).

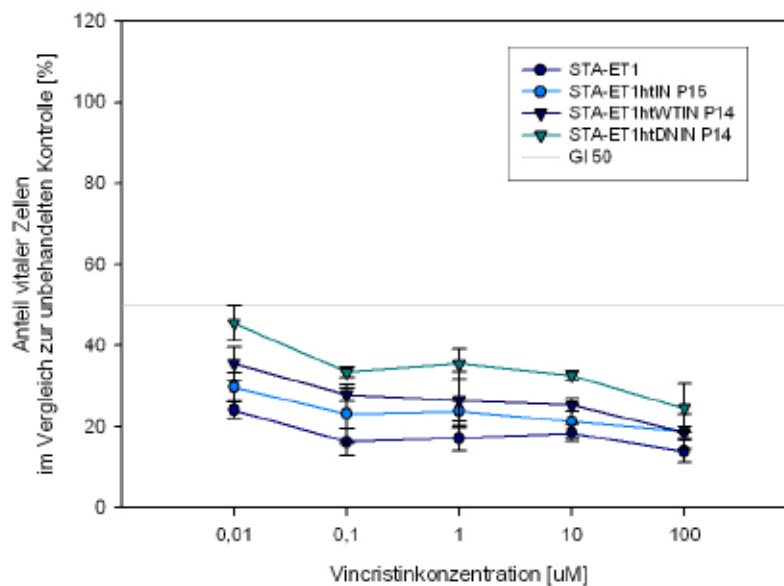


Abbildung 3.2.1-m: Zytotoxizität verschiedener Vincristinkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 24h Inkubation (Versuchsansatz E-III). STA-ET1 (n=4), STA-ET1htIN P15 (n=4), STA-ET1htWTIN P14 (n=4) und STA-ET1htDNIN P14 (n=4)

Tabelle 3.2.1-m: Darstellung der GI₅₀ [in µM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz E-III für Vincristin und STA-ET1.

GI ₅₀ [µM]	STA-ET1	STA-ET1 htIN (P15)	STA-ET1 htWTIN (P14)	STA-ET1 htDNIN (P14)
Vincristin				
24 h	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
48 h	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
72 h	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
96 h	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Vincristin mit RM-82

Es erfolgte ein Versuch mit Vincristin (Konzentrationen: 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM). Die Ergebnisse sind nach 96h graphisch dargestellt (Abbildung 3.2.1-n).

Der prozentuale Anteil überlebender Zellen zeigte sich für alle transfizierten Zellen gleich. Die nicht-transfizierte Mutterzelllinie RM-82 wies, bei einer Konzentration von 0,01 µM Vincristin, mit 15,1% noch ein besseres Überleben auf, während die Anzahl der transfizierten Zellen sich maximal um 1% belief. In höheren Konzentrationsstufen war kein Unterschied mehr zu erkennen. Dieses Verhalten zeigten die Zellen, ausgenommen

nach der Inkubationszeit von 24h (graphisch nicht abgebildet) mit inhomogenem Überleben innerhalb der verschiedenen Zytostatikakonzentrationen und Zelllinien, an allen Versuchstagen.

Bei der Betrachtung der GI_{50} (Tabelle 3.2.1-n) zeigte sich diese für alle Zellen unterhalb der kleinsten angewandten Vincristinkonzentration, sodass ein Unterschied zwischen den einzelnen Zellenvarianten so nicht zu benennen war.

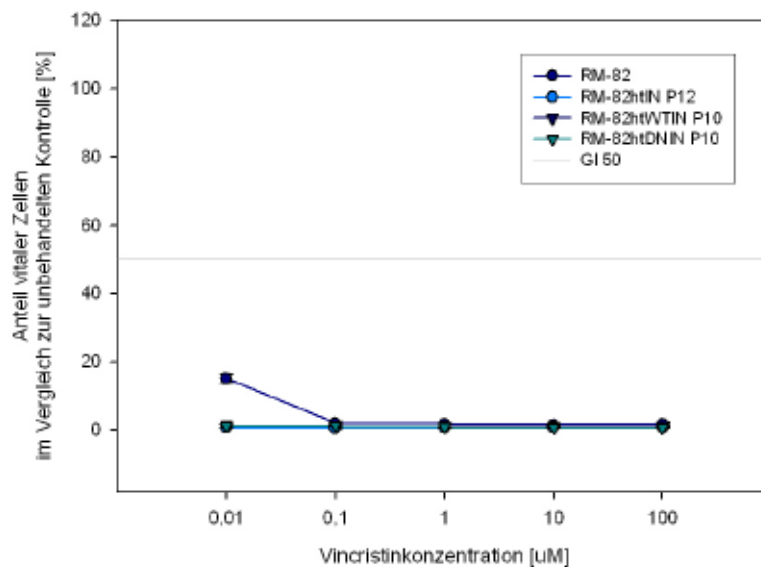


Abbildung 3.2.1-n: Zytotoxizität verschiedener Vincristinkonzentrationen auf das Zellwachstum nach 96h Inkubation (Versuchsansatz R-III). RM-82 (n=4), RM-82htIN P12 (n=4), RM-82htWTIN P10 (n=4) und RM-82htDNIN P10 (n=4)

Tabelle 3.2.1-n: Darstellung der GI_{50} [in µM] zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (24-96h). Versuchsansatz R-III für Vincristin und RM-82.

GI_{50} [µM]	RM-82	RM-82 htIN (P12)	RM-82 htWTIN (P10)	RM-82 htDNIN (P10)
Vincristin				
24 h	0,02	< 0,01	< 0,01	< 0,01
48 h	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
72 h	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
96 h	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

3.2.2 Vergleich der Chemosensitivität von STA-ET1 und RM-82

Es wurde die Chemosensitivität der beiden Ewing-Zelllinien STA-ET1 und RM-82 anhand einer Gegenüberstellung der GI_{50} der nativen Zelle und der Zelle mit dem Leervektor (STA-ET1htIN und RM-82htIN) verglichen. Bei zwei Teilversuchen eines Zytostatikums erfolgte die Berechnung der GI_{50} aus dem Mittelwert der einzelnen Teilversuche.

Unter der Inkubation mit Doxorubicin zeigten RM-82 und RM-82-IN nach 24h noch einen höheren Zytostatikabedarf als STA-ET1 und STA-ET1-IN. Nach 48h ergab sich zwischen den beiden Zelllinien kein deutlicher Unterschied mehr.

Tabelle 3.2.2-a: Vergleich der mittleren GI_{50} [μ M] von STA-ET1/STA-ET1htIN und RM-82/RM-82htIN unter Inkubation mit Doxorubicin. GI_{50} (bei zwei Teilversuchen) als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD) angegeben.

Doxorubicin	STA-ET1	STA-ET1htIN (P13, 22)	RM-82	RM-82htIN (P11, 14)
24 h	2,84	0,41 (SD 0,05)	3,46 (SD 0,12)	0,99 (SD 0,02)
48 h	0,17	0,15 (SD 0,04)	0,18 (SD 0,03)	0,20 (SD 0,01)
72 h	0,04	0,04 (SD <0,01)	0,04 (SD 0,01)	0,09 (SD 0,05)
96 h	0,03	0,03 (SD <0,01)	0,02 (SD <0,01)	0,03 (SD <0,01)

Unter Inkubation mit Etoposid erscheint an allen vier Versuchstagen die Zelllinie STA-ET1 leicht chemosensibler als RM-82. So wurde z.B. nach 72h für RM-82 mehr als das Doppelte der notwendigen Dosis von STA-ET1 benötigt, um eine 50%ige Wachstumshemmung zu erreichen.

Tabelle 3.2.2-b: Vergleich der mittleren GI_{50} [μ M] von STA-ET1/STA-ET1htIN und RM-82/RM-82htIN unter Inkubation mit Etoposid. Die GI_{50} ist (bei zwei Teilversuchen) als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD) angegeben.

Etoposid	STA-ET1	STA-ET1htIN (P13, 15)	RM-82	RM-82htIN (P11, 14)
24 h	6,60 (SD 8,13)	n.a.	20,20 (SD 2,98)	9,41 (SD 6,98)
48 h	0,35 (SD 0,16)	0,39 (SD 0,07)	0,55 (SD 0,25)	0,81 (SD 0,06)
72 h	0,20 (SD 0,14)	0,23 (SD 0,12)	0,35 (SD 0,05)	0,40 (SD 0,03)
96 h	0,23 (SD 0,01)	0,17 (SD 0,18)	0,28 (SD 0,03)	0,27 (SD 0,01)

Für Ifosfamid ergibt sich in den ersten drei Versuchstagen kein deutlicher Unterschied zwischen STA-ET1 und RM-82. Lediglich nach 96h zeigen sich RM-82 (3,86 μ M) und RM82-htIN (3,90 μ M) geringfügig chemosensibler als STA-ET1 (5,71 μ M) und STA-ET1htIN (6,41 μ M).

Tabelle 3.2.2-c: Vergleich der mittleren GI₅₀ [μ M] von STA-ET1/STA-ET1htIN und RM-82/RM-82htIN unter Inkubation mit Ifosfamid. Die GI₅₀ ist (bei zwei Teilversuchen) als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD) angegeben.

Ifosfamid	STA-ET1	STA-ET1htIN (P15)	RM-82	RM-82htIN (P11, 14)
24 h	56,62	41,89	45,80 (SD 0,73)	41,78 (SD 4,24)
48 h	8,07	7,71	8,02 (SD 0,16)	9,26 (SD 0,16)
72 h	6,13	7,20	5,62 (SD 0,26)	7,18 (SD 0,11)
96 h	5,71	6,41	4,19 (SD 0,45)	5,06 (SD 1,23)

Für Vincristin wurde bei STA-ET1 und RM-82 die GI₅₀ nicht erreicht, sodass eine Aussage bezüglich unterschiedlicher Chemosensibilität zwischen den beiden Zellreihen nicht getroffen werden kann (keine Tabelle dargestellt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zelllinie STA-ET1 unter Inkubation mit Etoposid über die gesamte Versuchsdauer und unter Inkubation mit Doxorubicin bis 24h geringfügig chemosensibler als RM-82 war. RM-82 wies hingegen für Ifosfamid nach 96h eine stärkere Chemosensibilisierung im Vergleich zu STA-ET1 auf.

Ein deutlicher Unterschied zwischen STA-ET1 und RM-82 konnte jedoch in keiner der Versuchsreihen für Doxorubicin, Etoposid, Ifosfamid oder Vincristin gesehen werden.

3.2.3 Vergleich der Chemosensitivität nach Transfektion

Im Folgenden wurde die Chemosensitivität nach Transfektion beurteilt. Es sollte zum einen gezeigt werden, ob eine Transfektion der Nativzelle mit dem htDNIN- bzw. htWTIN-Vektorkonstrukt oder dem Leervektor (htIN) zu einer Änderung der Chemosensitivität im Vergleich zur nicht transfizierten Zelle führte, und zum anderen, ob insbesondere zwischen dem Wildtyp und der dominant-negativen-Mutante ein Unterschied bezüglich der Chemosensitivität zu finden war.

Hierzu wurde die X-fache Änderung der GI_{50} betrachtet, berechnet aus dem Quotienten der GI_{50} der transfizierten Zelle zur GI_{50} der Mutterzelllinie. Ein Faktor ≥ 2 wurde als Resistenzzunahme gedeutet, ein Faktor $\leq 0,5$ als Zeichen einer Chemosensibilisierung und orientierte sich damit an die Ergebnisse aus einer vorangegangenen Arbeit unseres Hauses (70).

3.2.3.1 Inkubation mit Doxorubicin

STA-ET1 mit Doxorubicin

Zusammengefasst ließ sich in beiden Teilversuchen nach 48h erkennen, dass das DNIN-Vektorkonstrukt die Zelle tendenziell chemosensibler und das WTIN-Vektorkonstrukt sie tendenziell resistenter gegenüber Doxorubicin machte.

Im ersten Teilversuch konnten der Wildtyp und das Negativ-Vektor-Konstrukt lediglich in Bezug zur Zelle mit dem Leervektor gesetzt werden, da die Mutterzelle in diesem Versuch (wie unter 3.2.1.1 erwähnt) nicht ausgewertet werden konnte.

Zwar zeigte sich nach 48h STA-ET1htDNIN (Faktor 0,6) als deutlich chemosensibler als STA-ET1htWTIN, deren Faktor mit 1,3 mehr als doppelt so hoch war, STA-ET1htDNIN blieb dabei jedoch noch knapp unter dem Cut-off von 0,5.

Tabelle 3.2.3-a: X-fache Änderung der GI_{50} der htWTIN- und htDNIN- transfizierten Zellen im Vergleich zur Zelle mit dem Leervektor STA-ET1htIN. Versuchsansatz E-I mit Doxorubicin. STA-ET1htWTIN (P20) und STA-ET1htDNIN (P23), STA-ET1htIN (P22). STA-ET1 nicht auswertbar. Ein Faktor ≥ 2 zeigte eine Resistenzzunahme, ein Faktor $\leq 0,5$ eine Chemosensibilisierung.

Doxorubicin	STA-ET1htWTIN (P20)	STA-ET1htDNIN (P23)
24 h	1,0	1,1
48 h	1,3	0,6
72 h	1,0	1,1
96 h	1,1	1,4

Im zweiten Teilversuch fiel nach 24h eine Chemosensibilisierung für STA-ET1htIN und STA-ET1htWTIN auf, welche so im weiteren Versuchsablauf nicht mehr zu sehen war. Auch hier zeigte sich nach 48h eine deutliche Resistenzzunahme für den Wildtyp gegenüber Doxorubicin (Faktor 2,0) bei einer sichtbaren Chemosensibilisierung für STA-

ET1htDNIN (Faktor 0,4). Nach 72h und 96h lagen die Faktoren der drei transfizierten Zellen in vergleichbaren Bereichen.

Tabelle 3.2.3-b: X-fache Änderung der GI50 der transfizierten Zellen im Vergleich zur Mutterzelle STA-ET1. Versuchsansatz E-II mit Doxorubicin. STA-ET1, STA-ET1htIN (P13), STA-ET1htWTIN (P12) und STA-ET1htDNIN (P1). Ein Faktor ≥ 2 zeigte eine Resistenzzunahme, ein Faktor $\leq 0,5$ eine Chemosensibilisierung.

Doxorubicin	STA-ET1htIN (P13)	STA-ET1htWTIN (P12)	STA-ET1htDNIN (P1)
24 h	0,1	0,2	1,5
48 h	0,7	2,0	0,4
72 h	0,9	1,1	0,9
96 h	1,0	0,9	0,9

RM-82 mit Doxorubicin

Im ersten der beiden Teilversuche zeigte sich nach 24h für RM-82htIN, RM-82htWTIN und RM-82htDNIN eine deutliche Chemosensibilisierung gegenüber Doxorubicin. Am stärksten konnte dies, mit einem Faktor von 0,1, beim dominant negativen Vektorkonstrukt gesehen werden. Nach 48h Inkubation zeigte sich eine Chemosensibilisierung nur noch bei RM-82htWTIN und RM-82htDNIN. Nach 72h und 96h war diesbezüglich kein deutlicher Effekt mehr zu sehen. Die Zelle mit dem Leervektor war insgesamt resistenter als RM-82htWTIN und RM-82htDNIN. Sie lag nach 72h einmalig (Faktor 3,8) sogar oberhalb des cutoff.

Tabelle 3.2.3-c: X-fache Änderung der GI50 der transfizierten Zellen im Vergleich zur Mutterzelle RM-82. Versuchsansatz R-I mit Doxorubicin. RM-82, RM-82htIN (P11), RM-82htWTIN (P9) und RM-82htDNIN (P9). Ein Faktor ≥ 2 zeigte eine Resistenzzunahme, ein Faktor $\leq 0,5$ eine Chemosensibilisierung.

Doxorubicin	RM-82htIN (P11)	RM-82htWTIN (P9)	RM-82htDNIN (P9)
24 h	0,3	0,2	0,1
48 h	1,2	0,3	0,3
72 h	3,8	0,9	0,9
96 h	1,5	0,9	1,0

Auch im zweiten Teilversuch ließ sich die verstärkte Chemosensibilität nach 24h für alle drei Zelllinien, bzw. nach 48h lediglich noch für RM-82htWTIN und RM-82htDNIN nachweisen. Der Wildtyp wies eine Sensibilisierung auch noch nach 96h auf.

Tabelle 3.2.3-d: X-fache Änderung der GI50 der transfizierten Zellen im Vergleich zur Mutterzelle RM-82. Versuchsansatz R-II mit Doxorubicin. RM-82, RM-82htIN (P14), RM-82htWTIN (P12) und RM-82htDNIN (P13). Ein Faktor ≥ 2 zeigte eine Resistenzzunahme, ein Faktor $\leq 0,5$ eine Chemosensibilisierung.

Doxorubicin	RM-82htIN (P14)	RM-82htWTIN (P12)	RM-82htDNIN (P13)
24 h	0,3	0,2	0,1
48 h	1,0	0,1	0,2
72 h	1,4	0,8	0,7
96 h	1,6	0,5	0,6

3.2.3.2 Inkubation mit Etoposid

STA-ET1 mit Etoposid

In beiden Teilversuchen mit Etoposid wiesen die transfizierten Zellen intermittierend eine zunehmende Chemoresistenz auf. Dies wird insbesondere bei der Zelle mit dem dominant-negativen-Vektorkonstrukt deutlich.

Im ersten Teilversuch war nach 24h für alle drei transfizierten Zelllinien eine vermehrte Chemoresistenz zu verzeichnen. Am deutlichsten trat dies nach 24h mit einem Faktor von 39,4 bei STA-ET1htDNIN hervor und ließ sich auch nach 48h (Faktor 4,7) und 96h (Faktor 7,9) noch weiter nachweisen. Für STA-ET1htIN und STA-ET1htWTIN konnte nach 48h, 72h und 96h keine Veränderung im Sinne einer Sensibilisierung/Resistenzzunahme gegenüber Etoposid gesehen werden.

Tabelle 3.2.3-e: X-fache Änderung der GI50 der transfizierten Zellen im Vergleich zur Mutterzelle STA-ET1. Versuchsansatz E-II mit Etoposid. STA-ET1, STA-ET1htIN (P13), STA-ET1htWTIN (P12) und STA-ET1htDNIN (P1). Ein Faktor ≥ 2 zeigte eine Resistenzzunahme, ein Faktor $\leq 0,5$ eine Chemosensibilisierung.

Etoposid	STA-ET1htIN (P13)	STA-ET1htWTIN (P12)	STA-ET1htDNIN (P1)
24 h	2,3	3,4	39,4
48 h	0,9	0,9	4,7
72 h	1,0	0,8	1,6
96 h	1,3	1,0	7,9

Auch im zweiten Teilversuch fiel nach 24h eine Resistenzzunahme für STA-ET1htDNIN (Faktor 5,5) und etwas schwächer auch für STA-ET1htIN (Faktor 4,6) auf. Der Wildtyp blieb mit einem Faktor von 1,9 knapp unterhalb der cutoff-Grenze.

Nach 72h zeigte sich STA-ET1htWTIN, im Vergleich zur Nativzelle, sensibler für eine Behandlung mit Etoposid (Faktor 0,5). Nach 96h konnte dieser Effekt dann bei allen drei transfizierten Zelllinien (Faktor 0,2) gesehen werden.

Tabelle 3.2.3-f: X-fache Änderung der GI50 der transfizierten Zellen im Vergleich zur Mutterzelle STA-ET1. Versuchsansatz E-III mit Etoposid. STA-ET1, STA-ET1htIN (P15), STA-ET1htWTIN (P14) und STA-ET1htDNIN (P14). Ein Faktor ≥ 2 zeigte eine Resistenzzunahme, ein Faktor $\leq 0,5$ eine Chemosensibilisierung.

Etoposid	STA-ET1htIN (P15)	STA-ET1htWTIN (P14)	STA-ET1htDNIN (P14)
24 h	4,6	1,9	5,5
48 h	1,4	1,2	1,6
72 h	1,3	0,5	1,7
96 h	0,2	0,2	0,2

RM-82 mit Etoposid

Unter Inkubation mit Etoposid waren RM-82htWTIN und RM-82htDNIN, im Vergleich zur Nativzelle, nach 24h deutlich chemosensibler. Die Zelle mit dem Leervektor wies nach 48h einmalig eine sichtbare Chemoresistenz auf. Im Weiteren konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien mehr gesehen werden.

Tabelle 3.2.3-g: X-fache Änderung der GI50 der transfizierten Zellen im Vergleich zur Mutterzelle RM-82. Versuchsansatz R-I mit Etoposid. RM-82, RM-82htIN (P11), RM-82htWTIN (P9) und RM-82htDNIN (P9). Ein Faktor ≥ 2 zeigte eine Resistenzzunahme, ein Faktor $\leq 0,5$ eine Chemosensibilisierung.

Etoposid	RM-82htIN (P11)	RM-82htWTIN (P9)	RM-82htDNIN (P9)
24 h	0,8	0,2	0,1
48 h	2,1	1,3	1,0
72 h	1,3	1,0	1,0
96 h	1,1	0,9	0,9

Ähnlich zum Vorversuch waren alle drei transfizierten Zellen nach 24h (bzw. für RM-82htWTIN und RM-82htDNIN bis 48h) chemosensibler gegenüber Etoposid. Für RM-82htDNIN zeigte sich dieser Effekt auch noch nach 96h.

Tabelle 3.2.3-h: X-fache Änderung der GI50 der transfizierten Zellen im Vergleich zur Mutterzelle RM-82. Versuchsansatz R-II mit Etoposid. RM-82, RM-82htIN (P14), RM-82htWTIN (P12) und RM-82htDNIN (P13). Ein Faktor ≥ 2 zeigte eine Resistenzzunahme, ein Faktor $\leq 0,5$ eine Chemosensibilisierung.

Etoposid	RM-82htIN (P14)	RM-82htWTIN (P12)	RM-82htDNIN (P13)
24 h	0,2	0,1	0,2
48 h	1,2	0,5	0,5
72 h	1,0	0,7	0,9
96 h	0,9	0,9	0,4

3.2.3.3 Inkubation mit Ifosfamid

STA-ET1 mit Ifosfamid

Nach 24h fiel im Faktorvergleich der transfizierten Zellen für die Zelllinien STA-ET1htWTIN (Faktor 0,2) und STA-ET1htDNIN (Faktor 0,3) eine Zunahme der Sensibilität gegenüber Ifosfamid auf. Auch nach 96h zeigte sich der Wildtyp erneut chemosensibler unter Inkubation mit Ifosfamid. Ansonsten konnte keine Änderung im Sinne einer Sensibilitäts-/oder Resistenzzunahme der transfizierten Zellen im Vergleich zur Nativzelle STA-ET1 gesehen werden.

Tabelle 3.2.3-i: X-fache Änderung der GI50 der transfizierten Zellen im Vergleich zur Mutterzelle STA-ET1. Versuchsansatz E-III mit Ifosfamid. STA-ET1, STA-ET1htIN (P15), STA-ET1htWTIN (P14) und STA-ET1htDNIN (P14). Ein Faktor ≥ 2 zeigte eine Resistenzzunahme, ein Faktor $\leq 0,5$ eine Chemosensibilisierung.

Ifosfamid	STA-ET1htIN (P15)	STA-ET1htWTIN (P14)	STA-ET1htDNIN (P14)
24 h	0,7	0,2	0,3
48 h	1,0	0,8	0,8
72 h	1,2	0,7	0,6
96 h	1,1	0,5	0,8

RM-82 mit Ifosfamid

Unter Inkubation mit Ifosfamid konnte in beiden Teilversuchen das gleiche Verhalten bestätigt werden. Die Transfektion bewirkte keine erkennbare Änderung im Sinne einer Sensibilisierung oder Resistenzzunahme gegenüber Ifosfamid.

Tabelle 3.2.3-j: X-fache Änderung der GI50 der transfizierten Zellen im Vergleich zur Mutterzelle RM-82. Versuchsansatz R-I mit Ifosfamid. RM-82, RM-82htIN (P11), RM-82htWTIN (P9) und RM-82htDNIN (P9). Ein Faktor ≥ 2 zeigte eine Resistenzzunahme, ein Faktor $\leq 0,5$ eine Chemosensibilisierung.

Ifosfamid	RM-82htIN (P11)	RM-82htWTIN (P9)	RM-82htDNIN (P9)
24 h	0,9	1,0	0,8
48 h	1,2	0,8	0,8
72 h	1,2	0,9	0,8
96 h	1,3	1,0	1,0

Lediglich im zweiten Teilversuch kam es für RM-82htDNIN nach 96h einmalig zu einer Chemosensibilisierung (Faktor 0,5), welche jedoch aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit als nicht repräsentativ zu werten ist.

Tabelle 3.2.3-k: X-fache Änderung der GI50 der transfizierten Zellen im Vergleich zur Mutterzelle RM-82. Versuchsansatz R-II mit Ifosfamid. RM-82, RM-82htIN (P14), RM-82htWTIN (P12) und RM-82htDNIN (P13). Ein Faktor ≥ 2 zeigte eine Resistenzzunahme, ein Faktor $\leq 0,5$ eine Chemosensibilisierung.

Ifosfamid	RM-82htIN (P14)	RM-82htWTIN (P12)	RM-82htDNIN (P13)
24 h	1,0	1,0	0,8
48 h	1,1	0,8	0,6
72 h	1,4	1,1	0,7
96 h	1,0	0,6	0,5

3.2.3.4 Inkubation mit Vincristin

STA-ET1 mit Vincristin

Im ersten der beiden Teilversuche lag die GI50, unter Inkubation mit Vincristin, für alle vier Zelllinien nach 48h unterhalb der eingesetzten Zytostatika-Konzentrationen (< 0,01 μ M). Im zweiten Teilversuch zeigte sich dieses Verhalten bereits nach 24h für alle transfizierten- sowie nicht-transfizierten Zellen. Lediglich in der graphischen Darstellung beider Versuche erschienen die transfizierten Zellen geringfügig chemosensibler als STA-ET1, eine GI50 wurde jedoch nicht erreicht.

Aufgrund dessen konnte für Vincristin an der Versuchsreihe mit STA-ET1 kein Faktorvergleich erfolgen.

RM-82 mit Vincristin

Auffällig war hier, dass alle drei transfizierten Zelllinien (Wildtyp, dominant-negativ Vektorkonstrukt und Leervektor) unter Inkubation mit Vincristin ein nahezu unverändertes Verhalten zeigten. Nach 24h war im Vergleich zur Nativzelle bei allen eine Chemosensibilisierung (Faktor 0,4) zu erkennen. Im Weiteren verhielten sich die Zellen nicht auffällig unterschiedlich zur nicht-transfizierten Mutterzelllinie.

Tabelle 3.2.3-I: X-fache Änderung der GI50 der transfizierten Zellen im Vergleich zur Mutterzelle RM-82. Versuchsansatz R-III mit Vincristin. RM-82, RM-82htIN (P12), RM-82htWTIN (P10) und RM-82htDNIN (P10). Ein Faktor ≥ 2 zeigte eine Resistenzzunahme, ein Faktor $\leq 0,5$ eine Chemosensibilisierung.

Vincristin	RM-82htIN (P12)	RM-82htWTIN (P10)	RM-82htDNIN (P10)
24 h	0,4	0,4	0,4
48 h	0,7	0,7	0,8
72 h	0,7	0,8	0,8
96 h	1,2	1,2	1,2

4. Diskussion

Im Rahmen der malignen Transformation einer Zelle bildet die Reaktivierung des Enzyms Telomerase einen wichtigen Schritt, die begrenzte Teilungskapazität der Zelle zu überwinden und den Eintritt in die Seneszenz zu verhindern (66, 249).

In über 85% aller Tumorzellarten ist eine Reaktivierung von Telomeraseaktivität nachweisbar (126, 150). Daher erscheint Telomerasehemmung als sinnvoller Ansatz potentieller Anti-Tumor Strategien. Zusätzlich bietet Telomerasehemmung den Vorteil, nahezu selektiv gegen Tumorzellen zu wirken, da sie in nicht-entarteten Zellen lediglich in Keimzellen, peripheren Blutzellen und einigen wenigen somatischen Geweben nachweisbar ist (102) und dort zudem auf deutlich niedrigerem Niveau exprimiert wird (263). Auch weisen Tumorgewebe kürzere Telomere auf als entsprechende „gesunde“ Gewebe mit natürlichem Vorkommen an Telomerase (203).

Betrachtet man den Weg der Telomerasehemmung über eine kontinuierliche Telomerenverkürzung zur chromosomalen Instabilität und letztendlich Zellarrest und Zelltod (133), ist der Einsatz von Telomeraseinhibition primär in der Langzeittherapie oder in der Kombination mit schneller wirksamen Substanzen (z.B. Zytostatika) zu sehen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Konzept der genetischen Telomeraseinhibition in Kombination mit etablierter Chemotherapie (Doxorubicin, Etoposid, Ifosfamid und Vincristin) an den beiden Ewing-Sarkom-Zelllinien STA-ET1 und RM-82 erprobt werden, um ein mögliches therapeutisches Konzept zu evaluieren.

4.1 Telomeraseaktivität beim Ewing Sarkom

Während für das Osteosarkom 50% der Tumore auf den ALT-Mechanismus zur Verlängerung der Telomeren zurückgreifen (108), liegt der Nachweis von Telomeraseaktivität (TA) beim Ewing Sarkom in der Regel zwischen 70-100% des untersuchten Materials (4, 75, 131, 140, 183, 206, 210, 211, 223, 226, 234). Auffällig ist zudem ein besonders hoher Anteil an Proben mit hochaktiver Telomeraseaktivität (4, 131, 183, 206, 226).

Unterstützend dazu machten Takahashi et al. die Beobachtung, dass das Fusionsprodukt von EWS-FLI-1 (nachweisbar in 90-95% aller ESFT) durch transkriptionelle Aktivierung zu einer Hochregulation der hTERT-Genexpression und damit Zunahme von TA führt

(226). Für ein weiteres Fusionsprodukt (EWS-ER81) konnte ebenfalls eine Aktivierung von hTERT nachgewiesen werden (75). Ebenso führt c-Myc zu einer Aktivierung des hTERT-Promoters und wird wiederum durch EWS-FLI1 aktiviert (193).

Dennoch sind für das Ewing Sarkom bislang nur wenige Studien zur Telomeraseinhibition erfolgt. Thompson et al. konnten in einer Phase-I-Studie für das Antisense-Oligonukleotid Imetelstat (GRN163L) bei Kindern mit refraktären oder rezidivierenden soliden Tumoren, bei einem Patienten mit paraspinalem Ewing Sarkom und einem Patienten mit Osteosarkom eine partielle Remission erreichen (231). Auch Uziel et al. wiesen unter anderem an der Ewing Sarkom-Zelllinie SK-N-MC durch die Kombination von GRN163 mit Doxorubicin, Vincristin und Cisplatin nach, dass die Zellen nach pharmakologischer Telomerenverkürzung sensitiver gegenüber Cisplatin waren, nicht jedoch gegenüber Doxorubicin und Vincristin. Als ursächlich hierfür wurde jedoch die Telomerenverkürzung (durch Inkubation mit GRN163 in Langzeitkultur) und nicht die Hemmung der Telomeraseaktivität per se gesehen (235). Beim Osteosarkom führte eine Behandlung mit Imetelstat (Zelllinien und Xenograft) zur Abnahme von Telomeraseaktivität, Telomerenlänge und Proliferationsverhalten bzw. Tumormasse. Dieser Effekt konnte in Kombination mit dem HSP90-Inhibitor Alveospimycin noch weiter gesteigert werden (108).

Obwohl sich die Prognose des Ewing Sarkoms über die letzten Jahre zunehmend verbessert hat (219), so ist das Langzeitüberleben im Vergleich mit der gemeinsamen Prognose aller onkologischer Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter noch unterdurchschnittlich (116). Dies lässt alternative/zusätzliche Therapien zur etablierten Chemotherapie wichtig erscheinen. Insbesondere vor dem Hintergrund der erwähnten Existenz hoher Telomeraseaktivität beim Ewing Sarkom könnte die Telomeraseinhibition einen sinnvollen therapeutischen Ansatz darstellen.

4.2 Telomerase-Inhibitoren

Um sich Telomerasehemmung als potentielle Anti-Tumor-Strategie zu Nutze machen zu können, stehen verschiedenen Mechanismen zur Verfügung. Diese reichen von „Small-molecule“-Inhibitoren (z.B. G-Quadruplex-Stabilisatoren), welche innerhalb des Signalweges am hTERT-Promotor modulieren oder hTERT direkt hemmen (190), über

Antisense Oligonukleotide (direkte Hemmung der Telomeraseaktivität durch modifizierte DNA/RNA) (98) bis zur Hemmung Telomerase-assoziiertes Proteine wie HSP90 oder Tankyrasehemmer, welche TRF1 als wichtige Komponente des Shelterin-Komplexes angreifen (108, 203). Weitere erfolgreiche Strategien in Erprobung umfassen die Immuntherapie (durch Stimulation CD8+, zytotoxischer T-Lymphozyten gegen hTERT und Aktivierung CD4+ T-Helferzellen) (109) sowie die Gentherapie (selektiv zytotoxisch gegenüber Telomerase produzierender Zellen durch Expression des therapeutischen Proteins) (203). Auch epigenetische Ansätze werden diskutiert, welche zum Beispiel durch diätetischen Einsatz die hTERT-Expression regulieren sollen (145, 158).

Einige der erwähnten Substanzgruppen haben ihren Einsatz bereits in Phase-I/II-Studien gefunden. Insbesondere für das Antisense-Oligonukleotid Imetelstat (GRN163L) konnten vielversprechende Ergebnisse im Bereich hämatologischer Erkrankungen (essentielle Thrombozytämie und Myelofibrose) erzielt werden, so wurde teilweise eine partielle oder komplette Remission bei den Patienten erreicht (10, 227). Im Gegensatz dazu konnten Chiappori et al. für Imetelstat beim nicht-kleinzelligen-Lungen-Ca (NSCLC) lediglich für Patienten mit initial kurzen Telomeren einen positiven Trend für rezidivfreies und allgemeines Überleben feststellen, ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht gesehen werden (43). Weitere klinische Studien sind für pädiatrische, refraktäre oder rezidivierende Hirntumore (48) und pädiatrische, refraktäre oder rezidivierende solide Tumore oder Lymphome (84) initiiert, deren Ergebnisse sind allerdings noch ausstehend.

In der Immuntherapie lieferte der Einsatz des Peptid-Vakzins GV1001 (aktiviert u.a. CD4+ T-Helferzellen gegen hTERT) bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasierten Pankreas-Ca (Phase-III-Studie) keine Verbesserung für allgemeines Überleben gegenüber der Standardbehandlung (165). Erfolgreicher scheint GV1001 dagegen in der Behandlung des NSCLC zu sein. So konnte bei einer Phase-II-Studie eine Verbesserung der Immunantwort erreicht werden (194).

Insgesamt ist festzustellen, dass die vorliegenden präklinischen und klinischen Daten zu Telomeraseinhibitoren und deren Einsatz bei hämatologischen/onkologischen Erkrankungen abhängig vom eingesetztem Inhibitor und der Tumorart unterschiedliche

Ergebnisse liefern. Daher ist es wichtig, Telomeraseinhibition für jede Tumorentität isoliert zu betrachten.

4.3 Genetische Telomeraseinhibition durch DNhTERT

Das Phosphoprotein hTERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase) ist die katalytische Untereinheit der Telomerase (270). Ihre Expression erfolgt vor allem in Keimzellen und malignen Zellen (163, 177). Dies lässt darauf schließen, dass hTERT eine bedeutsamere Rolle in der Tumorforschung zukommt als der RNA-Untereinheit hTR, welche in den meisten humanen (embryonalen und adulten) Geweben nachgewiesen werden kann (9, 73).

Für das Ziel der präklinischen Evaluation von Telomeraseinhibition beim Ewing Sarkom wurde für diese Arbeit die genetische Telomeraseinhibition mittels retroviraler Transfektion eines dominant negativen hTERT-Vektor-Konstruktes (DNhTERT) gewählt. Diese Methode konnte bereits von mehreren Arbeitsgruppen erfolgreich angewendet werden. Hahn et al. konnten zeigen, dass es durch Expression der mutierten katalytischen Untereinheit (DNhTERT) zur Hemmung der Telomeraseaktivität und Reduktion von Telomerenlänge und Proliferationsverhalten bis hin zum Zelltod kam (Zelllinien von Kolon-/Mamma- und Ovarial-Ca und immortalisierte embryonale Nierenzellen). In vivo zeigte sich zudem an immundefizienten Nacktmäusen, dass die Expression von DNhTERT zum Verlust der Fähigkeit führte, Tumore auszubilden (88). Auch andere Arbeiten bestätigen dieses Verhalten *in vitro* und teilweise *in vivo* (271) bei Zelllinien eines Epidermoidtumors sowie immortalisierten embryonalen Nierenzellen (272), bei Leukämie-Zelllinien (27, 63, 202) und Zelllinien vom hepatozellulärem Karzinom (271) und Neuroblastom (251).

Um in der vorliegenden Arbeit den Einfluss der Kombination von Telomeraseaktivität und Chemotherapie zu untersuchen, verlangte der Versuchsaufbau vergleichbare Zellen mit einem unterschiedlichen Aktivitätsgrad an Telomerase. Es erfolgte an den beiden Telomerase-positiven Zelllinien STA-ET1 und RM-82 die retrovirale Transfektion eines dominant-negativen hTERT-Vektors (htDNIN), eines Wildtyp-Vektors (htWTIN) und eines Kontrollvektors (htIN) (siehe 2.1.1 und 2.1.2).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der oben genannten Arbeiten konnte für die beiden Ewing Sarkom Zelllinien bestätigt werden, dass Zellen mit dem dominant-negativen-Vektor-Konstrukt kürzere Telomere aufweisen und Zellen, in denen hTERT ektop exprimiert wird (Wildtyp) deutlich längere Telomere. Zusätzlich zeigte sich bei STA-ET1 für den Wildtyp eine positive Korrelation von Telomerenlänge und Passagenzahl. Auch konnte für STA-ET1 bei Zellen mit dem Kontrollvektor und der entsprechenden Mutterzelllinie eine vergleichbare Telomerenlänge als Beweis dafür gesehen werden, dass der Einfluss auf die Telomerenlänge durch das Transgen und nicht durch den Mechanismus der Transfektion bestimmt wurde.

Bezüglich der Telomeraseaktivität konnte in beiden Zelllinien durch das Wildtyp-Transgen eine verstärkte Telomeraseaktivität gesehen werden. Dass diese ektope Expression von hTERT für die Zellen nicht toxisch ist und zur Steigerung der Telomeraseaktivität führt, konnte in gleicher Weise an der ursprünglich Telomerase-negativen Neuroblastom-Zelllinie CHLA-90 gezeigt werden, welche nach Transfektion mit dem Wildtyp-Vektor Telomeraseaktivität aufwies (28).

Die Expression des dominant-negativen Vektors bewirkte, in Konkordanz mit den Ergebnissen anderer Autoren (195), auch in unseren Versuchen initial eine deutliche Abnahme der Telomeraseaktivität und führte interessanterweise bei STA-ET1 in höheren Passagen jedoch zu einem Wiederanstieg der Telomeraseaktivität in Bereiche, die mit der nicht-transfizierten Zelle vergleichbar waren. Dies deutet darauf hin, dass es nach längerer Kultivierung zu einer Reaktivierung von Telomeraseaktivität kam, und deckt sich mit den Beobachtungen in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (27, 63, 202).

Eine mögliche Hypothese für die Reaktivierung ist, dass die genetische Telomerasehemmung einen starken selektiven Nachteil für ursprünglich Telomerase-positive Tumorzellen darstellt, sodass die induzierte chromosomale Instabilität und Telomeren-Dysfunktion zur positiven Selektion der Klone mit geringer Expression des dominant-negativen hTERT-Transgen führt (63, 202). Unterstützt wird diese Vermutung von der Erkenntnis, dass die Integration des Transgens einer biologischen Verteilung folgt, sodass verschiedene Klone einer Population das mutierte Genprodukt unterschiedlich stark exprimieren können (26).

Trotz zunehmender Telomeraseaktivität wies STA-ET1 für Zellen mit dem dominant-negativen Vektor-Konstrukt in allen drei getesteten Passagen die gleiche Telomerenlänge auf. Unter der Hypothese, dass die kritische Telomerenverkürzung die Schlüsselfunktion des synergistischen Effektes von Telomeraseinhibition und Chemotherapie ist, kann STA-ET1, für Zellen mit dem dominant-negativen Vektor, dennoch als erfolgreich transfiziert angesehen werden und mit in die Auswertung der Zytotoxizitätstestung mit eingehen.

Betrachtet man das Proliferationsverhalten der Zelllinie STA-ET, war dieses für Zellen mit dem dominant-negativen Vektorkonstrukt am schwächsten ausgeprägt. Auffällig war jedoch eine positive Korrelation von Passagenzahl (P1, P14 und P23) und Proliferationsverhalten. So wurde einzig in Passage 1 ein Proliferationsstopp mit Plateauphase erreicht. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass es, wie hier bereits beschrieben, im Laufe der Kultivierung zu einer Zunahme der Telomeraseaktivität bei STA-ET1 mit dem dominant-negativen Vektor kam. Das Proliferationsverhalten von STA-ET1 (dominant-negativer Vektor) in früher Passage deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (27, 88, 202). Dennoch kann gesagt werden, dass die dominant –negativ transfizierte Zelllinie STA-ET1 in allen Passagen ein schlechteres Proliferationsverhalten als die übrigen transfizierten und die nicht transfizierte Zelllinie aufwies.

Im Gegensatz dazu konnte trotz erfolgreicher Telomerenverkürzung und deutlich reduzierter Telomeraseaktivität bei RM-82 für Zellen mit dem dominant-negativen Vektor kein Proliferationsnachteil erzeugt werden. In einer vergleichbaren Arbeit zum Neuroblastom zeigte eine ursprünglich Telomerase-positive Zelle nach erfolgreicher Transfektion ein vergleichbares Verhalten (70). Ob eine Begründung hierfür in der Latenz zwischen Telomerenverkürzung und erst später folgendem Proliferationseinbruch in höheren Passagen zu sehen ist (70) oder unterschiedliche zytogenetische Merkmale (siehe 2.1.1) der beiden Ewing-Sarkom- Zelllinien STA-ET1 und RM-82 ursächlich für das differente Proliferationsverhalten sind, sollte in weiteren Studien evaluiert werden, da ein Einfluss auf eine erfolgreiche Telomeraseinhibition so nicht sicher auszuschließen ist.

4.4 Telomeraseinhibition und Chemotherapie

Die vielversprechenden präklinischen Ergebnisse zur Telomeraseinhibition sind in klinischen Studien oft enttäuschend, sodass gerade neue Anti-Tumor-Strategien in Kombination miteinander und vor allem in Kombination mit der konventionellen Chemotherapie im Fokus stehen sollten (245).

In dieser Arbeit konnte für die Zelllinie STA-ET1 nach 48h bei Zellen mit dem dominant-negativen Transgen (DNhTERT) eine Sensibilisierung gegenüber Doxorubicin erreicht werden und für Zellen mit dem Wildtyp-Transgen eine Resistenzsteigerung. Am deutlichsten war der Effekt in niedrigen Konzentrationsbereichen der Zytostatika zu erkennen. Über 48h Inkubation hinaus konnte kein Unterschied mehr beobachtet werden. Auch für RM-82 zeigte sich bis 48h eine Sensibilisierung für Zellen mit dem dominant-negativen Transgen, allerdings war dies auch beim Wildtyp zu beobachten.

Eine Sensibilisierung gegenüber Doxorubicin unter Telomeraseinhibition wurde ebenfalls für das Cervix-Ca (176) sowie für Doxorubicin-sensible Zelllinien vom Mamma-Ca gesehen (248), nicht jedoch für das Prostata-Ca (42) oder das Neuroblastom. Hier führte das Einbringen eines DNhTERT-Transgens sogar zu einer Resistenzzunahme gegenüber Doxorubicin (251).

Lanvers-K. et al. konnten *in vitro* zeigen, dass Doxorubicin in toxischen Dosen zu einer Reduktion der Telomeraseaktivität beim Ewing Sarkom führte, in nicht-toxischen Dosen sogar zu einer Aktivitätssteigerung (140). Auch in unserer Untersuchung führte die Doxorubicin-Inkubation bei einer der beiden Ewing Sarkom Zelllinien (STA-ET1) im niedrigsten Konzentrationsbereich (0,0005 μM) zu einem proliferationssteigernden Effekt. Am deutlichsten war dies bei dem Wildtyp (mit hoher Telomeraseaktivität) und am schwächsten bei Zellen mit dem dominant-negativen Transgen in Passage 23 (reduzierte Telomeraseaktivität) bzw. nahezu ohne proliferationssteigernden Effekt in Passage 1 (kaum Telomeraseaktivität) zu erkennen. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass die Kombination von Telomeraseinhibition und Doxorubicin dazu dienen könnte, die klinisch eingesetzte Menge Doxorubicin zu reduzieren (um potentielle Nebenwirkungen der zytostatischen Therapie geringer zu halten), ohne die eben beschriebene Aktivitätssteigerung der Telomerase in niedrigen Konzentrationsbereichen zu riskieren.

Für STA-ET1 unter Inkubation mit Etoposid fiel maßgeblich eine Resistenzzunahme seitens der Zellen mit dem dominant-negativen Transgen auf. Der Wildtyp und die Zellen mit dem Kontrollvektor zeigten ein heterogenes Bild innerhalb zweier unabhängiger Versuche und über die gesamte Versuchsdauer mit Sensibilisierung und Resistenzzunahme gegenüber Etoposid, sodass keine klare Aussage bezüglich einer Effektivität gemacht werden kann. Für RM-82 kam es primär zu einer Sensibilisierung gegenüber Etoposid für Zellen mit dem dominant-negativen Transgen und vereinzelt für den Wildtyp.

Diese divergenten Ergebnisse decken sich mit den Resultaten anderer Autoren, die ebenfalls teils sensibilisierende Einflüsse beschrieben (Cervix-Ca, Mamma-Ca, CML) (176, 248) oder eine Resistenzentwicklung gegenüber Etoposid (Neuroblastom) (251) bzw. eine ausbleibende Sensibilisierung (Prostata-Ca) beobachteten (42).

Für das Zytostatikum Ifosfamid zeigte sich für beide Zelllinien eine Tendenz zur Sensibilisierung für Zellen mit Expression des dominant-negativen Transgens. Diese war nur sporadisch sichtbar und bedarf weiterer Prüfung, entspricht jedoch der Beobachtung von Wesbuer et al., welche beim Neuroblastom eine signifikante Sensibilisierung gegenüber Ifosfamid unter genetischer Telomeraseinhibition beobachten konnten (251).

Für die Inkubation mit Vincristin konnte zumindest bei einer der beiden Zelllinien (STA-ET1) für Zellen mit dem dominant-negativen Transgen eine Resistenzerhöhung gesehen werden. Allerdings lag die GI50% (Zytostatikamenge zum Erreichen einer 50%igen Wachstumshemmung) in allen Versuchen unterhalb der minimal eingesetzten Zytostatikadosis, sodass ebenfalls keine sichere Aussage getroffen werden kann. In einer Arbeit von Uziel et al. an der Ewing Sarkom-Zelllinie SK-N-MC konnte lediglich eine ausbleibende Sensibilisierung gegenüber Vincristin unter pharmakologischer Telomeraseinhibition beobachtet werden (235).

Insgesamt konnte vereinzelt eine Steigerung der Zytostatikawirkung unter Telomerase-Hemmung beobachtet werden. Die Ergebnisse sind jedoch substanzspezifisch und können zudem innerhalb desselben Tumors in unterschiedlichen Zelllinien variieren.

Dies zeigt sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit (z.B. für Etoposid an STA-ET1 und RM-82), aber auch im Vergleich mit anderen Studien. So bewirkte die pharmakologische Telomeraseinhibition (mit GNR16L) bei der Ewing-Sarkom-Zelllinie SK-N-MC, im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, zwar eine Sensibilisierung gegenüber Cisplatin, nicht jedoch gegenüber Doxorubicin und Vincristin (235).

Daraus ergibt sich die Frage, ob Unterschiede innerhalb einer Tumorentität durch die molekularbiologischen/zytogenetischen Charakteristika der Zelllinien zu erklären sind oder die Methodik der Auswertung zu hinterfragen ist. Uziel et al. sehen als ursächlich für eine Sensibilisierung gegenüber Cisplatin bei SK-N-MC die Telomerenverkürzung (durch Inkubation mit dem Antisense-Oligonukleotid GRN163 in Langzeitkultur) und nicht die Hemmung der Telomeraseaktivität per se. Sie konnten zeigen, dass die kurzen Telomere zur Entwicklung von sog. „Telomerschaden-induzierten-Foci“ (TIFs) mit Nachweis von γ H2AX (Histon-Marker für DNA-Schäden) führten. Die zellulären Reparaturmechanismen wurden durch Cisplatin zusätzlich effektiv behindert, nicht aber durch Etoposid (235). Jedoch konnte in unseren Analysen unter effektiver Telomerenverkürzung bei der Zelllinie RM-82 eine auffällige Sensibilisierung gegenüber Etoposid sowie bei STA-ET1 und RM-82 gegenüber Doxorubicin gezeigt werden, sodass noch weitere Substanz- und Zelllinien-spezifische Mechanismen als ursächlich für die Sensibilisierung in Frage kommen müssen.

Auch die Frage einer Relevanz des p53-Mutations-Status wurde in anderen Arbeiten untersucht. Im Gegensatz zu einer beschriebenen p53-Mutation bei der Zelllinie RM-82 (pArg273His), weist STA-ET1 für p53 den Wildtyp auf. Einige Autoren sehen als ursächlich für eine ineffektive Telomeraseinhibition eine p53-Mutation, welche dazu führt, dass Zellen mit dysfunktionalen Telomeren nicht in eine Seneszenz/Apoptose überführt werden können (27, 203). Unterstützend dahingehend wirkt unsere Beobachtung des ausbleibenden Proliferationsverlustes trotz erfolgreicher Telomeraseinhibition bei RM-82 (p53⁻) im Gegensatz zu STA-ET1 (p53⁺). Dennoch zeigten sich sowohl für RM-82 als auch STA-ET1 vergleichbare Sensibilisierungen gegenüber Doxorubicin und Ifosfamid, sodass der Effekt zumindest für unsere Kombination von Telomeraseinhibition und Chemotherapie als nicht relevant erscheint.

4.5 Risiken und Grenzen der Telomeraseinhibition

Auch wenn Telomerase in über 85% aller Tumore nachweisbar ist und damit ein weit verbreitetes Ziel in der Anti-Tumor-Therapie darstellt, so ist nicht zu vernachlässigen, dass sie insbesondere auch in Keimzellen und peripheren Blutzellen nachweisbar ist, wenn auch auf deutlich niedrigerem Aktivitätsniveau (263). Zwar wird Telomeraseinhibitoren im Allgemeinen eine hohe Spezifität vorausgesagt, doch sind gerade oben genannte Zelllinien unter etablierter Chemotherapie besonders gefährdet.

Der bislang den größten Erfolg versprechende pharmakologische Inhibitor Imetelstat zeigt sich insbesondere bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie sowie myelodysplastischem Syndrom effektiv. Betrachtet man nun die Nebenwirkung der Thrombozytopenie unter Therapie mit Imetelstat und die Tatsache, dass in der megakaryozytären Zelllinie relativ niedrige Level an Telomerase vorliegen, wird verständlich, dass gerade diese Zelllinie besonders sensibel auf Imetelstat reagiert (6).

Trotz dagegen ausbleibendem klinischen Erfolg von Imetelstat beim NSCLC konnten die Autoren eine positive Tendenz für die Tumoren mit der geringsten Telomerenlänge beobachten (43). Dies veranlasste zum einen Arndt et al. zu der Schlussfolgerung, dass die Messung der Telomerenlänge ein sinnvolles Maß zur Bestimmung des Ansprechens unter Therapie sein könnte (6), und sollte zum anderen Anlass dazu geben, die Kombination unterschiedlicher Telomerasinhibitoren zur Steigerung der Effektivität mit folglich schnellerer Telomerenverkürzung in Erwägung zu ziehen. Ein Beispiel hierfür ist die bereits erwähnte Kombination von Imetelstat mit dem HSP90-Inhibitor Alveospimycin in einer präklinischen Studie beim Osteosarkom Erfolg versprach (108). Auch eine protrahierte Telomeraseinhibition in krankheitsstabilen Phasen als „vorbereitende“ Telomerenverkürzung sollte erprobt werden, kommt jedoch vor diesem Hintergrund auch nicht für jedes Patientenkollektiv bzw. insbesondere für rasch fortschreitende Tumore in Frage.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass es einige Tumorzellen schaffen, dem Mechanismus der Telomerasehemmung zu entfliehen. So konnte auch in unserer Arbeit gezeigt werden, dass es bei STA-ET1 für Zellen mit dem dominant-negativen Transgen (DNhTERT) im Verlauf zu einer Reaktivierung von Telomeraseaktivität kam. Dies äußerte sich in unserer Untersuchung noch nicht in einer Veränderung der Telomerenlänge. Ob eine längere

Kultivierung zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Telomerenveränderung geführt hätte, müsste in weiteren Untersuchungen gezeigt werden. Dies wäre insbesondere interessant um eine mögliche Relevanz der Telomerasereaktivierung besser einordnen zu können. In unseren Versuchen zeigte die Zelllinie STA-ET1 zwar für Zellen mit dem dominant-negativen Transgen mit zunehmender Passage/Telomeraseaktivität eine Zunahme der Proliferation, dennoch proliferierten die Zellen insgesamt weiterhin schlechter als die übrigen transfizierten Zelllinien/Mutterzelllinie, sodass die Telomerasehemmung dennoch als effektiv zu bezeichnen war. Wie bereits oben erwähnt machten auch andere Arbeitsgruppen die Beobachtung einer vermuteten Reaktivierung der Telomeraseaktivität. Sie folgerten, dass in späten Passagen die Expression von DNhTERT nicht mehr effizient genug ist, um die intrinsische hTERT-Expression kompetitiv zu unterdrücken (27, 63).

Ein weiteres Problem der Telomeraseinhibition ist ein möglicher Wechsel auf ALT-Mechanismen (Alternative Verlängerung der Telomeren) zur Aufrechterhaltung der Telomerenlänge. So konnten Queisser et al. in ihrem Modell der Ösophagus-Karzinogenese zeigen, dass Telomeraseaktivität und ALT-Mechanismen zellzyklusabhängig alternieren können (195), und unterstützen damit die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (33, 97). Zusätzlich konnten sie zeigen, dass Zellen nach genetischer Telomeraseinhibition auf ALT-Mechanismen wechselten (u.a. Nachweis typischer heterogener, langer Telomere und PML-Körperchen) (195). In unserer Arbeit ergab sich diesbezüglich bei stabil kurzen Telomeren innerhalb des dominant-negativen hTERT-Kollektives kein Anhalt. Dennoch sollten hierüber weitere Beobachtungen unter längerer Kultivierungszeit erfolgen.

Positiv erscheint vor dem Hintergrund eines möglichen Wechsels auf ALT-Mechanismen, dass viele Autoren eine zügige Reversibilität der Telomeraseinhibition nach Absetzen der Therapie beschreiben (248), sodass ein zeitlich begrenzter Einsatz der Telomerasehemmer eine Option sein könnte, dieses Problem zu umgehen.

Letztlich sollte noch erwähnt werden, dass ein Verlust von Telomeraseaktivität zur genetischen Instabilität der dysfunktionalen Telomere führen kann, welche neben dem

erwünschten Ziel der Apoptose der Tumorzellen die Gefahr birgt, die Entstehung höher entwickelter aggressiver Tumoren zu unterstützen (70, 87).

4.6 Limitation der angewandten Methodik

Obwohl der TRAP-Assay als hochsensitiv und „Gold-Standard“ zur Bestimmung der Telomeraseaktivität gilt, scheint er dennoch gering fehleranfällig zu sein und aufgrund von PCR-Artefakten zu einer Unterschätzung der Telomerasehemmung führen zu können (6). Auch stellt sich die Frage, ob bei einer biologischen Verteilung der Integration des Transgens (verschiedene Klone einer Population exprimieren das mutierte Genprodukt unterschiedlich stark) (26) das Kollektiv der dem TRAP-Assay zugeführten Zellen dem tatsächlichen Telomerasegehalt der gesamten Zellpopulation entspricht. Um zu validieren, ob die hier gemessenen Unterschiede bezüglich der Telomeraseaktivität zwischen den dominant-negativen Zellen bei STA-ET1 und RM-82 durch Fehlmessung bedingt sind oder wie vermutet durch die Reaktivierung der Telomerase bei STA-ET1 (trotz ausbleibender Veränderung der Telomerenlänge), müsste in alternativen Aktivitätsbestimmungen (6) oder größeren/wiederholten Stichproben untersucht werden.

Des Weiteren stellt sich die Frage, inwiefern die Telomeraseinhibition generell die zytostatische Wirkung der etablierten Behandlung schwächen kann. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen mit dem dominant-negativen Vektorkonstrukt reduziert proliferierten. Auch wiesen Zellen mit dem dominant-negativen Transgen bei STA-ET1, im Vergleich mit den übrigen Zellen, die längste Zeit zur Verdoppelung der Gesamtpopulation („Population Doubling“) auf. Wenn man die Tatsache betrachtet, dass der Wirkmechanismus der meisten Zytostatika darauf zielt, gerade die verstärkt proliferierenden (Tumor-)Zellen anzugreifen, erscheint das Ziel, den Proliferationszyklus der Tumorzellen zu reduzieren, kontraproduktiv. Allerdings zeigte die zweite Ewing-Sarkom-Zelllinie RM-82, mit nachweisbar reduzierter Telomeraseaktivität bei Zellen mit dem dominant-negativen Transgen trotz STA-ET1 ähnlicher Sensibilisierung gegenüber Doxorubicin keine Abnahme der Proliferation und kein verlängertes Population Doubling, sodass für unseren Versuchsaufbau der Einfluss des Proliferationsverhalten auf die Zytostatikawirkung vermutlich nicht relevant ist.

4.7 Ausblick

Das Konstrukt der Telomerasehemmung als sehr spezifisches und nahezu allgegenwärtiges Ziel in der Tumorthherapie scheint verlockend. Obwohl seit der Entdeckung des Enzyms Telomerase vor mehr als 30 Jahren, nach ersten präklinischen Erfolgen effektiver Telomeraseinhibitoren, einige dieser Inhibitoren bereits in klinischen Studien evaluiert wurden, bleibt der erhoffte große Durchbruch weiterhin aus.

In der vorliegenden Arbeit zeigen die Untersuchungen an den beiden Ewing-Sarkom-Zelllinien STA-ET1 und RM-82, trotz effektiver Telomerenverkürzung und (zumindest initialer) Reduktion der Telomeraseaktivität mittels genetischer Inhibition durch einen retroviralen dominant-negativen hTERT-Vektor, divergente Ergebnisse bezüglich Proliferationsverhalten und Ansprechen auf die zytostatische Therapie. Es zeigt sich, dass die Antwort auf Telomeraseinhibition nicht nur zwischen verschiedenen Tumorarten unterschiedlich ausfällt, sondern auch in zwei Zelllinien derselben Tumorentität verschieden ausfallen kann.

Idealerweise sollten geeignete Marker existieren, welche ein mögliches Ansprechen auf die Therapie detektierbar machen, bevor Telomeraseinhibitoren einen sicheren Einsatz in klinischen Studien finden. Diese müssten über die grundsätzliche Bestimmung der Telomerenlänge und Messung von Telomeraseaktivität hinausreichen und könnten z.B. einen positiven p53-Status umfassen bzw. weitere zytogenetische Marker, deren Einfluss bislang noch unbekannt zu sein scheint und Gegenstand weiterer Forschung sein sollte.

Von Bedeutung ist in jedem Fall, dass Einflüsse zwischen Telomeraseaktivität und Chemotherapie bestehen, deren Erkenntnisse in die onkologische Therapie mit einfließen sollten. So spielt Telomeraseaktivität bei manchen Erkrankungen schon jetzt eine nachgewiesene Rolle als prognostischer Marker oder in der Entwicklung von Chemotherapieresistenzen (118, 193, 237). Auch wenn speziell für das Ewing Sarkom bislang kein sicherer Zusammenhang zwischen Telomeraseaktivität und Prognose gezeigt werden konnte, so beobachteten Ohali et al. in ihrer Studie an 31 Patienten mit nicht-metastasiertem Ewing Sarkom, dass nicht bei Diagnose (Primärtumor), aber unter Therapie und im Follow-up eine signifikante Korrelation zwischen hoher Telomeraseaktivität und schlechterer Prognose bestand (183). Zusammen mit der

Beobachtung, dass unter anderem Doxorubicin zu einer Reduktion von TA führen kann (140), dieser Zustand auf Doxorubicin-resistente Zellen jedoch häufig nicht zutrifft (110, 268), ergibt sich, dass Patienten mit Tumoren schlechter Prognose, bei schlechtem Ansprechen auf zytostatische Therapie und zunehmender Telomeraseaktivität, von zusätzlicher Telomerasehemmung profitieren könnten bzw. vielmehr Telomeraseinhibition eine Möglichkeit sein kann, Chemotherapie-Resistenzen zu verringern.

Eine weitere wichtige Frage könnte sein, inwiefern der weitere Fokus auf Funktionen von hTERT außerhalb der Telomerenlänge gerichtet werden sollte. Allgemein lässt sich sagen, dass die Telomerase, neben der bekannten Funktion zur Aufrechterhaltung der Telomerenlänge, zu einer Förderung von Überleben, Chemoresistenz sowie Invasion und Metastasierung von malignen Zellen (und zwar unabhängig von der Telomerenlänge) führen kann (176, 207, 273). Vor diesem Hintergrund erscheinen insbesondere hTERT und Dyskerin (die dritte essentielle Komponente des Telomerasekomplex) attraktiv (6). In Hinblick auf hTERT würde sich unser präklinisches Modell der genetischen Telomeraseinhibition mittels dominant-negativen hTERT-Vektor (DNhTERT) ebenfalls eignen, um Effekte der hTERT-Inhibition in frühen Kultivierungsphasen (außerhalb einer fortgeführten Telomerenverkürzung) zu beurteilen. In diesem Fall würde auch eine Reaktivierung von Telomeraseaktivität, wie bei STA-ET1 (DNhTERT) in späten Passagen beobachtet, in den Hintergrund treten und so die Limitation unseres Modells relativieren.

5. Zusammenfassung

Auf dem Weg der malignen Transformation einer Zelle bildet die Reaktivierung des Enzyms Telomerase einen wichtigen Schritt, die aufgrund kritischer Telomerenverkürzung begrenzte Teilungskapazität der Zelle zu überwinden und ein Eintreten in die Seneszenz zu verhindern. Da in über 85% aller Tumorzellarten eine Reaktivierung von Telomeraseaktivität nachweisbar ist, erscheint die Hemmung dieses Enzyms als sinnvoller Ansatz potentieller Anti-Tumor Strategien. Einige der bislang entwickelten Telomeraseinhibitoren finden ihren Einsatz bereits in klinischen Studien. Auch bezüglich der Kombination von Telomeraseinhibition und Chemotherapie liegen Daten für einige Tumorarten vor, zeigen jedoch häufig widersprüchliche Ergebnisse bezüglich eines möglichen Synergismus von Telomerasehemmung und zytoreduktiver Therapie.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die genetische Telomeraseinhibition durch Expression eines dominant-negativen hTERT-Gens (DNhTERT) in den beiden Ewing Sarkom-Zelllinien STA-ET1 und RM-82 zur Evaluation eines möglichen therapeutischen Konzeptes. Durch DNhTERT konnte eine effektive Telomerenverkürzung und Reduktion der Telomeraseaktivität erreicht werden, welche sich bei STA-ET1 zudem im Proliferationsverlust äußerte. Mit zunehmender Passage kam es in den dominant-negativ für hTERT transfizierten Zellen der Zelllinie STA-ET1 zu einer Reaktivierung von Telomeraseaktivität, ohne Einfluss auf Telomerenlänge und Proliferationsverhalten der Zellen zu nehmen. Für beide Ewing-Sarkom-Zelllinien konnte nach Ausschaltung der Telomeraseaktivität eine Sensibilisierung gegenüber Doxorubicin nachgewiesen und erste Hinweise auf eine geringfügige Sensibilisierung gegenüber Ifosfamid beobachtet werden. Für Etoposid zeigten sich für beide Zelllinien divergente Ergebnisse (Sensibilisierung und Resistenzerhöhung). Ebenfalls Hinweise auf eine tendenzielle Resistenzerhöhung konnten gegenüber Vincristin gesehen werden.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, dass durch die Hemmung der Telomeraseaktivität in Telomerase-positiven Ewing-Sarkom-Zelllinien die Zytostatika-Toxizität je nach Zytostatikum durchaus gesteigert werden kann. Basierend auf den gemachten Beobachtungen erscheint vor allem die Kombination von Telomerase-Hemmung und Doxorubicin vielversprechend für weitere Untersuchungen.

Zusätzlich weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Antwort auf Telomeraseinhibition nicht nur zwischen verschiedenen Tumorarten, sondern auch in zwei Zelllinien derselben Tumorentität unterschiedlich ausfallen kann. Zwar gibt es Hinweise auf molekular-/zytogenetische Merkmale der Zellen, welche eine effektive Telomeraseinhibition beeinflussen können, jedoch sind bei Weitem noch nicht alle beteiligten Mechanismen bekannt und sollten ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Akiyama M, Yamada O, Kanda N, Akita S, Kawano T, Ohno T, Mizoguchi H, Eto Y, Anderson KC, Yamada H (2002). Telomerase overexpression in K562 leukemia cells protects against apoptosis by serum deprivation and double-stranded DNA break inducing agents, but not against DNA synthesis inhibitors. *Cancer letters*.178(2):187-197.
2. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(21):10114-10118.
3. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M (1991) MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer*. 67(7):1886-93.
4. Amiel A, Ohali A, Fejgin M, Sardos-Albertini F, Bouaron N, Cohen IJ, Yaniv I, Zaizov R, Avigad S (2003) Molecular cytogenetic parameters in Ewing sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 140(2):107-12.
5. Angervall L, Enzinger FM (1975) Extraskelletal neoplasm resembling Ewing's sarcoma. *Cancer*. 36(1):240-51.
6. Arndt GM, MacKenzie KL (2016) New prospects for targeting telomerase beyond the telomere. *Nat Rev Cancer*. 16(8):508-24.
7. Askin FB, Rosai J, Sibley RK, Dehner LP, McAlister WH (1979) Malignant small cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood: a distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. *Cancer*. 43(6):2438-51.
8. Avigad S, Naumov I, Ohali A, Jeison M, Berco GH, Mardoukh J, Stark B, Ash S, Cohen IJ, Meller I, Kollender Y, Issakov J, Yaniv I (2007) Short telomeres: a novel potential predictor of relapse in Ewing sarcoma. *Clin Cancer Res*. 13(19):5777-83.
9. Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta J, Shay JW, Bacchetti S, Greider CW (1996) Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res*. 56(3):645-50.
10. Baerlocher GM, Oppliger Leibundgut E, Ottmann OG, Spitzer G, Odenike O, McDevitt MA, Roth A, Daskalakis M, Burington B, Stuart M, Snyder DS (2015) Telomerase inhibitor Imetelstat in patients with essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 373(10):920-8.
11. Basenko EY, Cesare AJ, Iyer S, Griffith JD, McEachern MJ (2010) Telomeric circles are abundant in the stn1-M1 mutant that maintains its telomeres through recombination. *Nucleic Acids Res*.38(1):182-9.
12. Baumann P, Cech TR (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*. 292(5519):1171-5.
13. Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L (2000) Polymerization defects within human telomerase are distinct from telomerase RNA and TEP1 binding. *Mol Biol Cell*. 11(10):3329-40.
14. Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L (2001) Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol*. 21(18):6151-60.
15. Bechter OE, Dlaska M. (2011) Homologous recombination between telomeres is present in ALT and telomerase-positive immortal cells. In: *Proceedings of the*

- 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Orlando, FL. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res. 71(8 Suppl): Abstract Nr 2993.
16. Bednarek AK, Sahin A, Brenner AJ, Johnston DA, Aldaz CM (1997) Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin Cancer Res.* 3(1):11-6.
 17. Berning P. (2017) Plerixafor: Stammzellmobilisation mit pro-tumorigenen Eigenschaften im Ewing Sarkom? [Dissertation]. Münster: Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
 18. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H (2006) Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist.* 11(5):503-19.
 19. Bhattacharyya A, Blackburn EH (1997) A functional telomerase RNA swap in vivo reveals the importance of nontemplate RNA domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(7):2823-7.
 20. Bianchi A, Smith S, Chong L, Elias P, de Lange T (1997) TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *Embo J.* 16(7):1785-94.
 21. Bianchi A, Stansel RM, Fairall L, Griffith JD, Rhodes D, de Lange T (1999) TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *Embo J.* 18(20):5735-44.
 22. Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E (1997) Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet.* 17(2):236-9.
 23. Board PPTe (Pediatric Treatment Editorial Board) (2016) Ewing sarcoma treatment (PDQ®): Health professional version. National Cancer Institute (US), Bethesda (MD). Online im Internet: URL: <http://www.cancer.gov/types/bone/hp/ewing-treatment-pdq>. PMID: 26389480 [Abrufdatum: 27.08.2016].
 24. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 279(5349):349-52.
 25. Bond JA, Wyllie FS, Wynford-Thomas D (1994) Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene.* 9(7):1885-9.
 26. Brassat U (2009) Evaluation telomeraseinhibitorischer Strategien als neues Therapieprinzip in der Behandlung der Chronischen Myeloischen Leukämie [Dissertation]. Hamburg: Universität Hamburg.
 27. Brassat U, Balabanov S, Bali D, Dierlamm J, Braig M, Hartmann U, Sirma H, Gunes C, Wege H, Fehse B, Gontarewicz A, Dikomey E, Borgmann K, Brummendorf TH (2011). Functional p53 is required for effective execution of telomerase inhibition in BCR-ABL-positive CML cells. *Exp Hematol.* 39(1):66-76.
 28. Braun Y (2005) Characterization of telomerase as therapeutic target for the treatment of small round blue cell tumors [Dissertation]. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität. Pharmazeutische Chemie, Verlag Dr Hut: 26-31.
 29. Broccoli D, Young JW, de Lange T (1995) Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(20):9082-6.
 30. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet.* 17(2):231-5.
 31. Bruedigam C, Bagger FO, Heidel FH, Paine Kuhn C, Guignes S, Song A, Austin R, Vu T, Lee E, Riyat S, Moore AS, Lock RB, Bullinger L, Hill GR, Armstrong

- SA, Williams DA, Lane SW (2014) Telomerase inhibition effectively targets mouse and human AML stem cells and delays relapse following chemotherapy. *Cell stem cell*. 15(6):775-90.
32. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR (1995) Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J*. 14(17):4240-8.
33. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR (1997) Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*. 3(11):1271-4.
34. 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(6):921-6.
35. Bryan TM, Englezou A, Dunham MA, Reddel RR (1998) Telomere length dynamics in telomerase-positive immortal human cell populations. *Exp Cell Res*. 239(2):370-8.
36. Bryce LA, Morrison N, Hoare SF, Muir S, Keith WN (2000) Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia*. 2(3):197-201.
37. Burchett KM, Yan Y, Ouellette MM. (2014) Telomerase inhibitor Imetelstat (GRN163L) limits the lifespan of human pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 9(1): e85155. doi: 10.1371/journal.pone.0085155. PubMed PMID: 24409321; PubMed Central PMCID: PMC3883701.
38. Cerone MA, Autexier C, Londono-Vallejo JA, Bacchetti S (2005) A human cell line that maintains telomeres in the absence of telomerase and of key markers of ALT. *Oncogene*. 24(53):7893-901.
39. Cesare AJ, Griffith JD (2004) Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol Cell Biol*. 24(22):9948-57.
40. Cesare AJ, Reddel RR (2010) Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature reviews Genetics*. 11(5):319-30.
41. Chen W, Dong Q, Shin KH, Kim RH, Oh JE, Park NH, Kang MK (2010) Grainyhead-like 2 enhances the human telomerase reverse transcriptase gene expression by inhibiting DNA methylation at the 5'-CpG island in normal human keratinocytes. *J Biol Chem*. 285(52):40852-63.
42. Chen Z, Koeneman KS, Corey DR (2003) Consequences of telomerase inhibition and combination treatments for the proliferation of cancer cells. *Cancer Res*. 63(18):5917-25.
43. Chiappori AA, Kolevska T, Spigel DR, Hager S, Rarick M, Gadgeel S, Blais N, Von Pawel J, Hart L, Reck M, Bassett E, Burington B, Schiller JH (2015) A randomized phase II study of the telomerase inhibitor imetelstat as maintenance therapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 26(2):354-62.
44. Coffin JM (1996) Retrovirus restriction revealed. *Nature*. 382(6594):762-3.
45. Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR (2007) Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*. 315(5820):1850-3.
46. Colgin LM, Wilkinson C, Englezou A, Kilian A, Robinson MO, Reddel RR (2000) The hTERTalpha splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia*. 2(5):426-32.

47. Cong Y, Shay JW (2008) Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell Res.* 18(7):725-32.
48. Consortium PBT (Pediatric Brain Tumor Consortium) (2016) Imetelstat Sodium in Treating Younger Patients With Recurrent or Refractory Brain Tumors. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* (NCT01836549) Online im Internet: URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01836549> [Abrufdatum: 08.12.2016].
49. Cook BD, Dynek JN, Chang W, Shostak G, Smith S (2002) Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol.* 22(1):332-42.
50. Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jurgens HF, Voute PA, Gadner H, Craft AW (2000) Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol.* 18(17):3108-14.
51. 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(5):1921-9.
52. Counter CM, Botelho FM, Wang P, Harley CB, Bacchetti S (1994) Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol.* 68(5):3410-4.
53. Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB (1994) Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(8):2900-4.
54. Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, Weinberg RA (1998) Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene.* 16(9):1217-22.
55. Crees Z, Girard J, Rios Z, Botting GM, Harrington K, Shearrow C, Wojdyla L, Stone AL, Uppada SB, Devito JT, Puri N (2014) Oligonucleotides and G-quadruplex stabilizers: targeting telomeres and telomerase in cancer therapy. *Curr Pharm Des.* 20(41):6422-37.
56. Crowe DL, Nguyen DC (2001) Rb and E2F-1 regulate telomerase activity in human cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1518(1-2):1-6.
57. Cuthbert AP, Bond J, Trott DA, Gill S, Broni J, Marriott A, Khoudoli G, Parkinson EK, Cooper CS, Newbold RF (1999) Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 91(1):37-45.
58. Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Huel N, Kauffmann I, Priepke H, Niestroj C, Daiber C, Enenkel B, Guilliard B, Lauritsch I, Muller E, Pascolo E, Sauter G, Pantic M, Martens UM, Wenz C, Lingner J, Kraut N, Rettig WJ, Schnapp A (2001) A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J.* 20(24):6958-68.
59. de Alava E, Gerald W (2000). Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol.* 18(1):204-13.
60. de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol.* 10(2):518-27.
61. de Lange T (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene.* 21(4):532-40.

62. de Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 19(18):2100-10.
63. 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.* 21(54):8262-71.
64. Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beijersbergen RL, Weinberg RA (2000) Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res.* 60(3):537-41.
65. Devereux TR, Horikawa I, Anna CH, Annab LA, Afshari CA, Barrett JC (1999) DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res.* 59(24):6087-90.
66. Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R (2000) Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch.* 437(1):1-16.
67. Dirksen U, Juergens H (2014) S1-Leitlinie: Ewing-Sarkome des Kindes- und Jugendalters. AWMF online (Stand 06/2014). Online im Internet: URL: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/025-006.html> [Abrufdatum: 01.09.2016].
68. DuBois SG, Krailo MD, Gebhardt MC, Donaldson SS, Marcus KJ, Dormans J, Shamberger RC, Sailer S, Nicholas RW, Healey JH, Tarbell NJ, Randall RL, Devidas M, Meyer JS, Granowetter L, Womer RB, Bernstein M, Marina N, Grier HE (2015) Comparative evaluation of local control strategies in localized Ewing sarcoma of bone: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer.* 121(3):467-75.
69. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR (2000) Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet.* 26(4):447-50.
70. Duran Seuberth I (2009). Telomerasehemmung und Chemotherapie-präklinische Evaluation eines möglichen therapeutischen Konzeptes beim Neuroblastom [Dissertation]. Münster: Westfälische Wilhelms-Universität.
71. Ewing J (1972) Classics in oncology. Diffuse endothelioma of bone. James Ewing. Proceedings of the New York Pathological Society, 1921. *CA Cancer J Clin.* 22(2):95-8.
72. Fasching CL, Neumann AA, Muntoni A, Yeager TR, Reddel RR (2007) DNA damage induces alternative lengthening of telomeres (ALT) associated promyelocytic leukemia bodies that preferentially associate with linear telomeric DNA. *Cancer Res.* 67(15):7072-7.
73. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, Le S, West MD, Harley CB, Andrews WH, Greider CW, Villeponteau B (1995). The RNA component of human telomerase. *Science.* 269(5228):1236-41.
74. Forsythe HL, Jarvis JL, Turner JW, Elmore LW, Holt SE (2001) Stable association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with active human telomerase. *J Biol Chem.* 276(19):15571-4.
75. Fuchs B, Inwards C, Scully SP, Janknecht R (2004) hTERT Is highly expressed in Ewing's sarcoma and activated by EWS-ETS oncoproteins. *Clin Orthop Relat Res.* (426):64-8.
76. Fujimoto K, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Kitagawa Y, Itoh H, Takahashi M, Inoue M (2000) Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: possible role of

- MZF-2 in transcriptional repression of hTERT. *Nucleic Acids Res.* 28(13):2557-62.
77. Gellert GC, Dikmen ZG, Wright WE, Gryaznov S, Shay JW (2006) Effects of a novel telomerase inhibitor, GRN163L, in human breast cancer. *Breast cancer Res Treat.* 96(1):73-81.
78. Gollahon LS, Kraus E, Wu TA, Yim SO, Strong LC, Shay JW, Tainsky MA (1998) Telomerase activity during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome skin fibroblasts. *Oncogene.* 17(6):709-17.
79. Goueli BS, Janknecht R (2004) Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol Cell Biol.* 24(1):25-35.
80. Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell.* 43(2 Pt 1):405-13.
81. Greider CW (1996) Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem.* 65:337-65.
82. Griffith J, Bianchi A, de Lange T (1998) TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro. *J Mol Biol.* 278(1):79-88.
83. 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(4):503-14.
84. Group CsO (Children`s Onkology Group) (2014) Imetelstat Sodium in Treating Young Patients With Refractory or Recurrent Solid Tumors or Lymphoma. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* (NCT01273090). Online im Internet: URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01273090> [Abrufdatum 08.12.2016].
85. Grunewald TG, Bernard V, Gilardi-Hebenstreit P, Raynal V, Surdez D, Aynaud MM, Mirabeau O, Cidre-Aranaz F, Tirode F, Zaidi S, Perot G, Jonker AH, Lucchesi C, Le Deley MC, Oberlin O, Marec-Berard P, Veron AS, Reynaud S, Lapouble E, Boeva V, Rio Frio T, Alonso J, Bhatia S, Pierron G, Cancel-Tassin G, Cussenot O, Cox DG, Morton LM, Machiela MJ, Chanock SJ, Charnay P, Delattre O (2015) Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene EGR2 via a GGAA microsatellite. *Nat Genet.* 47(9):1073-8.
86. Guo C, Armbruster BN, Price DT, Counter CM (2003) In vivo regulation of hTERT expression and telomerase activity by androgen. *J Urol.* 170(2 Pt 1):615-8.
87. Hackett JA, Greider CW (2002) Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene.* 21(4):619-26.
88. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinberg RA (1999) Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med.* 5(10):1164-70.
89. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 345(6274):458-60.
90. Harley CB (1991) Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res.* 256(2-6):271-82.
91. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I, Robinson MO (1997) A mammalian telomerase-associated protein. *Science.* 275(5302):973-7.
92. Hartmann U (2005) Telomerlänge und Telomeraseaktivität, sowie deren pharmakologische Modulation in myeloischen Leukämien [Dissertation]. Tübingen: Eberhard Karls Universität.

93. Hartwig FP, Bertoldi D, Larangeira M, Wagner MS (2014) Up-regulating telomerase and tumor suppressors: focusing on anti-aging interventions at the population level. *Aging Dis.* 5(1):17-26.
94. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature.* 346(6287):866-8.
95. Hayflick L (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res.* 37:614-36.
96. Hense HW, Ahrens S, Paulussen M, Lehnert M, Jurgens H (1999) Descriptive epidemiology of Ewing's tumor--analysis of German patients from (EI)CESS 1980-1997. *Klin Padiatr.* 211(4):271-5.
97. Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR (2002) Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene.* 21(4):598-610.
98. Herbert BS, Gellert GC, Hochreiter A, Pongracz K, Wright WE, Zielinska D, Chin AC, Harley CB, Shay JW, Gryaznov SM (2005) Lipid modification of GRN163, an N3'-->P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition. *Oncogene.* 24(33):5262-8.
99. Hisatomi H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Nagao K, Kanamaru T, Hirata H, Hibi N, Tsukada Y (2003) Expression profile of a gamma-deletion variant of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Neoplasia.* 5(3):193-7.
100. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, Kodama T, Piatyszek MA, Shay JW, Matsuura Y (1995) Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res.* 55(15):3258-62.
101. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA, Shay JW (1996) Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst.* 88(2):116-22.
102. Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, Shay JW, Ishioka S, Yamakido M (1995) Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol.* 155(8):3711-5.
103. Hoare SF, Bryce LA, Wisman GB, Burns S, Going JJ, van der Zee AG, Keith WN (2001) Lack of telomerase RNA gene hTERC expression in alternative lengthening of telomeres cells is associated with methylation of the hTERC promoter. *Cancer Res.* 61(1):27-32.
104. Hochreiter AE, Xiao H, Goldblatt EM, Gryaznov SM, Miller KD, Badve S, Sledge GW, Herbert BS (2006) Telomerase template antagonist GRN163L disrupts telomere maintenance, tumor growth, and metastasis of breast cancer. *Clin Cancer Res.* 12(10):3184-92.
105. Hockemeyer D, Daniels JP, Takai H, de Lange T (2006) Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell.* 126(1):63-77.
106. Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DO, Shay JW, Wright WE, White MA (1999) Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* 13(7):817-26.
107. Hsiao SJ, Smith S (2008) Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie.* 90(1):83-92.
108. Hu Y, Bobb D, He J, Hill DA, Dome JS (2015) The HSP90 inhibitor alvespimycin enhances the potency of telomerase inhibition by imetelstat in human osteosarcoma. *Cancer Biol Ther.* 16(6):949-57.

109. Inderberg-Suso EM, Trachsel S, Lislerud K, Rasmussen AM, Gaudernack G (2012) Widespread CD4+ T-cell reactivity to novel hTERT epitopes following vaccination of cancer patients with a single hTERT peptide GV1001. *Oncoimmunology*. 1(5):670-86.
110. Ishikawa T, Kamiyama M, Hisatomi H, Ichikawa Y, Momiyama N, Hamaguchi Y, Hasegawa S, Narita T, Shimada H (1999) Telomerase enzyme activity and RNA expression in adriamycin-resistant human breast carcinoma MCF-7 cells. *Cancer letters*. 141(1-2):187-94.
111. Jaffe R, Santamaria M, Yunis EJ, Tannery NH, Agostini RM, Jr., Medina J, Goodman M (1984) The neuroectodermal tumor of bone. *Am J Surg Pathol*. 8(12):885-98.
112. Jager K, Walter M (2016) Therapeutic targeting of telomerase. *Genes (Basel)*. 7(7). pii: E39. doi: 10.3390/genes7070039. PubMed PMID: 27455328; PubMed Central PMCID: PMC4962009.
113. Janning W, Knust E. (2008) Struktur und Funktion der DNA. In: Janning W, Knust E (Hrsg) *Genetik*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2. Aufl. S 137-142.
114. Jeyapalan J, Leake A, Ahmed S, Saretzki G, Tilby M, von Zglinicki T (2004) The role of telomeres in Etoposide induced tumor cell death. *Cell cycle*. 3(9):1169-76.
115. Juergens H, Paulussen M, Zoubek A (2006) Ewing-Tumoren. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J (Hrsg) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 1. Aufl. S 894-899.
116. Kaatsch P SC (2015). German childhood cancer registry - Annual report 2015 (1980-2014) Mainz: Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz.
117. Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI (1999) Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem*. 274(19):13085-90.
118. Kanzawa T, Germano IM, Kondo Y, Ito H, Kyo S, Kondo S (2003) Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. *British journal of cancer*. 89(5):922-9.
119. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T (1999) p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science*. 283(5406):1321-5.
120. Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T (2002) Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science*. 295(5564):2446-9.
121. Karlseder J, Kachatrian L, Takai H, Mercer K, Hingorani S, Jacks T, de Lange T (2003) Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1. *Mol Cell Biol*. 23(18):6533-41.
122. Kass-Eisler A, Greider CW (2000) Recombination in telomere-length maintenance. *Trends Biochem Sci*. 25(4):200-4.
123. Keith WN, Bilstrand AE (2008). Targeting telomerase: therapeutic options for cancer treatment. In: Rudolph KL (Hrsg) *Telomeres and telomerase in ageing, disease, and cancer*. Springer, Berlin Heidelberg. S 247-283.
124. Kharbanda S, Kumar V, Dhar S, Pandey P, Chen C, Majumder P, Yuan ZM, Whang Y, Strauss W, Pandita TK, Weaver D, Kufe D (2000) Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase. *Curr Biol*. 10(10):568-75.

125. 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(12):2011-9.
126. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 266(5193):2011-5.
127. Kipling D, Cooke HJ (1990) Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature.* 347(6291):400-2.
128. Kirk KE, Harmon BP, Reichardt IK, Sedat JW, Blackburn EH (1997) Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation. *Science.* 275(5305):1478-81.
129. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ (1998) Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature.* 396(6706):84-8.
130. Klapper W, Qian W, Schulte C, Parwaresch R (2003) DNA damage transiently increases TRF2 mRNA expression and telomerase activity. *Leukemia.* 17(10):2007-15.
131. Kleideiter E, Schwab M, Friedrich U, Koscielniak E, Schafer BW, Klotz U (2003) Telomerase activity in cell lines of pediatric soft tissue sarcomas. *Pediatr Res.* 54(5):718-23.
132. Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK (1996) Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature.* 380(6569):79-82.
133. Klingelutz AJ (1997) Telomerase activation and cancer. *J Mol Med.* 75(1):45-9.
134. Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y (1998) DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol.* 152(5):1107-23.
135. Kovar H, Pospisilova S, Jug G, Printz D, Gadner H (2003) Response of Ewing tumor cells to forced and activated p53 expression. *Oncogene.* 22(21):3193-204.
136. Koziel JE, Herbert BS (2015) The telomerase inhibitor imetelstat alone, and in combination with trastuzumab, decreases the cancer stem cell population and self-renewal of HER2+ breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment.* 149(3):607-18.
137. Ku WC, Cheng AJ, Wang TC (1997) Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 241(3):730-6.
138. Kumakura S, Tsutsui TW, Yagisawa J, Barrett JC, Tsutsui T (2005) Reversible conversion of immortal human cells from telomerase-positive to telomerase-negative cells. *Cancer Res.* 65(7):2778-86.
139. Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, Orimo A, Inoue M (1999) Estrogen activates telomerase. *Cancer Res.* 59(23):5917-21.
140. Lanvers-Kaminsky C, Winter B, Koling S, Frodermann B, Braun Y, Schaefer KL, Diallo R, Koenemann S, Wai D, Willich N, Poremba C, Schuck A (2005) Doxorubicin modulates telomerase activity in Ewing's sarcoma in vitro and in vivo. *Oncology reports.* 14(3):751-8.

141. Le Deley MC, Delattre O, Schaefer KL, Burchill SA, Koehler G, Hogendoorn PC, Lion T, Poremba C, Marandet J, Ballet S, Pierron G, Brownhill SC, Nessler M, Ranft A, Dirksen U, Oberlin O, Lewis IJ, Craft AW, Jurgens H, Kovar H (2010) Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol.* 28(12):1982-8.
142. Le S, Sternglanz R, Greider CW (2000) Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol Biol Cell.* 11(3):999-1010.
143. Lee OH, Kim H, He Q, Baek HJ, Yang D, Chen LY, Liang J, Chae HK, Safari A, Liu D, Songyang Z. (2011) Genome-wide YFP fluorescence complementation screen identifies new regulators for telomere signaling in human cells. *Mol Cell Proteomics.* 10(2): M110.001628. doi: 10.1074/mcp.M110.001628. PubMed PMID: 21044950; Pubmed Central PMCID: PMC3033672.
144. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol.* 225(4):951-60.
145. Lewis KA, Tollefsbol TO (2016) Regulation of the telomerase reverse transcriptase subunit through epigenetic mechanisms. *Front Genet.* 7: (9): pii: E61. doi: 10.3390/genes7090061 PubMed: PMID: 27618103 PubMed Central PMCID: PMC5039560
146. 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.
147. Lin Z, Lim S, Viani MA, Sapp M, Lim MS (2001) Down-regulation of telomerase activity in malignant lymphomas by radiation and chemotherapeutic agents. *Am J Pathol.* 159(2):711-9.
148. Liu Y, Snow BE, Hande MP, Baerlocher G, Kickhoefer VA, Yeung D, Wakeham A, Itie A, Siderovski DP, Lansdorp PM, Robinson MO, Harrington L (2000) Telomerase-associated protein TEP1 is not essential for telomerase activity or telomere length maintenance in vivo. *Mol Cell Biol.* 20(21):8178-84.
149. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75.
150. Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M (2013) Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res.* 319(2):133-41.
151. Ludwig JA (2008) Ewing sarcoma: historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future. *Curr Opin Oncol.* 20(4):412-8.
152. Mackintosh C, Ordonez JL, Garcia-Dominguez DJ, Sevillano V, Llombart-Bosch A, Szuhai K, Scotlandi K, Alberghini M, Scot R, Sinnaeve F, Hogendoorn PC, Picci P, Knuutila S, Dirksen U, Debiec-Rychter M, Schaefer KL, de Alava E (2012) 1q gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma. *Oncogene.* 31(10):1287-98.
153. Man RJ, Chen LW, Zhu HL (2016) Telomerase inhibitors: a patent review (2010-2015). *Expert opinion on therapeutic patents.* 26(6):679-88.
154. Marian CO, Cho SK, McEllin BM, Maher EA, Hatanpaa KJ, Madden CJ, Mickey BE, Wright WE, Shay JW, Bachoo RM (2010) The telomerase antagonist, imetelstat, efficiently targets glioblastoma tumor-initiating cells leading to decreased proliferation and tumor growth. *Clin Cancer Res.* 16(1):154-63.

155. Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, Ward RK, Lansdorp PM (1998) Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet.* 18(1):76-80.
156. McClintock B (1941) The stability of broken ends of chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics.* 26(2):234-82.
157. McElligott R, Wellinger RJ (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *Embo J.* 16(12):3705-14.
158. Meeran SM, Ahmed A, Tollefsbol TO (2010) Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. *Clin Epigenetics.* 1(3-4):101-16.
159. Mehle C, Lindblom A, Ljungberg B, Stenling R, Roos G (1998) Loss of heterozygosity at chromosome 3p correlates with telomerase activity in renal cell carcinoma. *Int J Oncol.* 13(2):289-95.
160. Mekeel KL, Tang W, Kachnic LA, Luo CM, DeFrank JS, Powell SN (1997) Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene.* 14(15):1847-57.
161. Mender I, Shay JW (2015) Telomerase repeated amplification protocol (TRAP). (Author Manuscript). *Bio Protoc.* 5(22). pii: e1657. PubMed PMID: 27182535; PubMed Central PMCID: PMC4863463.
162. Mender I, Shay JW (2015) Telomere restriction fragment (TRF) analysis. (Author Manuscript). *Bio Protoc.* 5(22). pii: e1658. PubMed PMID: 27500189; PubMed Central PMCID: PMC4972328.
163. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA (1997) hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell.* 90(4):785-95.
164. 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(18):7049-53.
165. Middleton G, Silcocks P, Cox T, Valle J, Wadsley J, Propper D, Coxon F, Ross P, Madhusudan S, Roques T, Cunningham D, Falk S, Wadd N, Harrison M, Corrie P, Iveson T, Robinson A, McAdam K, Eatock M, Evans J, Archer C, Hickish T, Garcia-Alonso A, Nicolson M, Steward W, Anthony A, Greenhalf W, Shaw V, Costello E, Naisbitt D, Rawcliffe C, Nanson G, Neoptolemos J (2014) Gemcitabine and capecitabine with or without telomerase peptide vaccine GV1001 in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer (TeloVac): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15(8):829-40.
166. Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, Cong YS, Wen J, Hirte HW, Piaggio G, Sacchi A, Pontecorvi A, Bacchetti S, Farsetti A (2000) Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol.* 20(11):3764-71.
167. Mitchell JR, Wood E, Collins K (1999) A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature.* 402(6761):551-5.
168. Mora J, de Torres C, Parareda A, Torner F, Galvan P, Rodriguez E, Cardesa T, Salvador H, Sunol M, Huguet R, Cruz O (2011) Treatment of Ewing sarcoma family of tumors with a modified P6 protocol in children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer.* 57: 69-75.

169. Moriarty TJ, Dupuis S, Autexier C (2002) Rapid upregulation of telomerase activity in human leukemia HL-60 cells treated with clinical doses of the DNA-damaging drug etoposide. *Leukemia*. 16(6):1112-20.
170. Morin GB (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*. 59(3):521-9.
171. Morland B, Platt K, Whelan JS (2014) A phase II window study of irinotecan (CPT-11) in high risk Ewing sarcoma: a Euro-E.W.I.N.G. study. *Pediatr Blood Cancer*. 61(3):442-5.
172. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(18):6622-6.
173. Mueller C, Riese U, Kosmehl H, Dahse R, Claussen U, Ernst G (2002) Telomerase activity in microdissected human breast cancer tissues: association with p53, p21 and outcome. *Int J Oncol*. 20(2):385-90.
174. Murillo-Ortiz B, Astudillo-De la Vega H, Castillo-Medina S, Malacara JM, Benitez-Bribiesca L (2006) Telomerase activity, estrogen receptors (alpha, beta), Bcl-2 expression in human breast cancer and treatment response. *BMC Cancer*. 6:206. doi: 10.1186/1471-2407-6-206 PubMed PMID: 16911782; PubMed Central PMCID: PMC1562436.
175. Murnane JP, Sabatier L, Marder BA, Morgan WF (1994) Telomere dynamics in an immortal human cell line. *Embo J*. 13(20):4953-62.
176. Nakamura M, Masutomi K, Kyo S, Hashimoto M, Maida Y, Kanaya T, Tanaka M, Hahn WC, Inoue M (2005) Efficient inhibition of human telomerase reverse transcriptase expression by RNA interference sensitizes cancer cells to ionizing radiation and chemotherapy. *Human gene therapy*. 16(7):859-68.
177. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*. 277(5328):955-9.
178. Neumann AA, Reddel RR (2002) Telomere maintenance and cancer -- look, no telomerase. *Nat Rev Cancer*. 2(11):879-84.
179. Neumann AA, Watson CM, Noble JR, Pickett HA, Tam PP, Reddel RR (2013) Alternative lengthening of telomeres in normal mammalian somatic cells. *Genes Dev*. 27(1):18-23.
180. Nishimoto A, Miura N, Horikawa I, Kugoh H, Murakami Y, Hirohashi S, Kawasaki H, Gazdar AF, Shay JW, Barrett JC, Oshimura M (2001) Functional evidence for a telomerase repressor gene on human chromosome 10p15.1. *Oncogene*. 20(7):828-35.
181. Nolting D-M (2005) Untersuchungen zur Zytotoxizität von Alkylanzien, Topoisomerasehemmstoffen und Ukrain auf vier humane Ewing-Sarkom-Zelllinien [Dissertation] Münster: Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
182. Ogino H, Nakabayashi K, Suzuki M, Takahashi E, Fujii M, Suzuki T, Ayusawa D (1998) Release of telomeric DNA from chromosomes in immortal human cells lacking telomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 248(2):223-7.
183. Ohali A, Avigad S, Cohen IJ, Meller I, Kollender Y, Issakov J, Gelernter I, Goshen Y, Yaniv I, Zaizov R (2003) Association between telomerase activity and outcome in patients with nonmetastatic Ewing family of tumors. *J Clin Oncol*. 21(20):3836-43.

184. Ohki R, Tsurimoto T, Ishikawa F (2001) In vitro reconstitution of the end replication problem. *Mol Cell Biol.* 21(17):5753-66.
185. Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K, Sugimoto K (1967) Mechanism of DNA replication possible discontinuity of DNA chain growth. *Jpn J Med Sci Biol.* 20(3):255-60.
186. Olovnikov AM (1971) Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 201(6):1496-9.
187. 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(1):181-90.
188. Ottaviano L, Schaefer KL, Gajewski M, Huckenbeck W, Baldus S, Rogel U, Mackintosh C, de Alava E, Myklebost O, Kresse SH, Meza-Zepeda LA, Serra M, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC, Buerger H, Aigner T, Gabbert HE, Poremba C (2010) Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort. *Genes Chromosomes Cancer.* 49(1):40-51.
189. Park KH, Rha SY, Kim CH, Kim TS, Yoo NC, Kim JH, Roh JK, Noh SH, Min JS, Lee KS, Kim BS, Chung HC (1998) Telomerase activity and telomere lengths in various cell lines: changes of telomerase activity can be another method for chemosensitivity evaluation. *Int J Oncol.* 13(3):489-95.
190. Pascolo E, Wenz C, Lingner J, Huel N, Priepke H, Kauffmann I, Garin-Chesa P, Rettig WJ, Damm K, Schnapp A (2002) Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *J Biol Chem.* 277(18):15566-72.
191. Pizzo PAP, David G (1997) Principles and practice of pediatric oncology. Lippincott-Raven, Philadelphia, 6. Aufl. S 138-163
192. Plumb JA, Milroy R, Kaye SB (1989) Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* 49(16):4435-40.
193. Proctor A, Brownhill SC, Burchill SA (2009) The promise of telomere length, telomerase activity and its regulation in the translocation-dependent cancer ESFT; clinical challenges and utility. *Biochim Biophys Acta.* 1792(4):260-74.
194. Puri N, Girard J. (2013) Novel therapeutics targeting telomerase and telomeres. *J Cancer Sci Ther.* 5 (10):1-3. e127. Online im Internet: doi:10.4172/1948-5956.1000e127. [Abrufdatum: 27.08.2016].
195. Queisser A, Heeg S, Thaler M, von Werder A, Opitz OG (2013) Inhibition of telomerase induces alternative lengthening of telomeres during human esophageal carcinogenesis. *Cancer genetics.* 206(11):374-86.
196. Rasper M, Jabar S, Ranft A, Jurgens H, Amler S, Dirksen U (2014) The value of high-dose chemotherapy in patients with first relapsed Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 61(8):1382-6.
197. Reddel RR, Bryan TM, Colgin LM, Perrem KT, Yeager TR (2001) Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat Res.* 155(1 Pt 2):194-200.
198. Ren H, Zhao T, Wang X, Gao C, Wang J, Yu M, Hao J (2010) Leptin upregulates telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 394(1):59-63.

199. Rhodes D, Giraldo R (1995) Telomere structure and function. *Curr Opin Struct Biol.* 5(3):311-22.
200. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR (1999) Cancer Incidence and Survival Among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975–1995. National Cancer Institute, SEER Program. Bethesda, MD: 99-110, Online im Internet: URL: <https://seer.cancer.gov/archive/publications/childhood/childhood-monograph.pdf> [Abrufdatum: 01.09.2016]
201. Roche-applied-science. (2011) Gebrauchsanleitung "TeloTAGGG telomere length assay". Version 09, Online im Internet: URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/12209136001?lang=de®ion=DE> [Abrufdatum: 09.05.2017].
202. Roth A, Vercauteren S, Sutherland HJ, Lansdorp PM (2003) Telomerase is limiting the growth of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia.* 17(12):2410-7.
203. Ruden M, Puri N (2013) Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer treatment reviews.* 39(5):444-56.
204. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239(4839):487-91.
205. Sandell LL, Zakian VA (1993) Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell.* 75(4):729-39.
206. Sangiorgi L, Gobbi GA, Lucarelli E, Sartorio SM, Mordenti M, Ghedini I, Maini V, Scrimieri F, Reggiani M, Bertoja AZ, Benassi MS, Picci P (2001) Presence of telomerase activity in different musculoskeletal tumor histotypes and correlation with aggressiveness. *Int J Cancer.* 95(3):156-61.
207. Saretzki G (2014) Extra-telomeric functions of human telomerase: cancer, mitochondria and oxidative stress. *Current pharmaceutical design.* 20(41):6386-403.
208. Sarkar S, Faller DV (2011) T-oligos inhibit growth and induce apoptosis in human ovarian cancer cells. *Oligonucleotides.* 21(1):47-53.
209. Savage SA, Alter BP (2009) Dyskeratosis congenita. *Hematol Oncol Clin North Am.* 23(2):215-31.
210. Schuck A, Poremba C, Lanvers C, Konemann S, Schleifer T, Wai D, Horn K, Hesselmann S, Braun Y, Frodermann B, Schafer KL, Diallo RI, Rube CE, Rube C, Dockhorn-Dworniczak B, Willich N (2002) Radiation-induced changes of telomerase activity in a human Ewing xenograft tumor. *Strahlenther Onkol.* 178(12):701-8.
211. Selvanathan SP, Graham GT, Erkizan HV, Dirksen U, Natarajan TG, Dakic A, Yu S, Liu X, Paulsen MT, Ljungman ME, Wu CH, Lawlor ER, Uren A, Toretsky JA (2015). Oncogenic fusion protein EWS-FLI1 is a network hub that regulates alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(11): 1307-1316.
212. Shammas MA, Koley H, Bertheau RC, Neri P, Fulciniti M, Tassone P, Blotta S, Protopopov A, Mitsiades C, Batchu RB, Anderson KC, Chin A, Gryaznov S, Munshi NC (2008) Telomerase inhibitor GRN163L inhibits myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Leukemia.* 22(7):1410-8.
213. Shammas MA, Qazi A, Batchu RB, Bertheau RC, Wong JY, Rao MY, Prasad M, Chanda D, Ponnazhagan S, Anderson KC, Steffes CP, Munshi NC, De Vivo I, Beer DG, Gryaznov S, Weaver DW, Goyal RK (2008) Telomere maintenance in laser

- capture microdissection-purified Barrett's adenocarcinoma cells and effect of telomerase inhibition in vivo. *Clin Cancer Res.* 14(15):4971-80.
214. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE (1991) A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res.* 196(1):33-9.
215. Shay JW, Tomlinson G, Piatyszek MA, Gollahon LS (1995) Spontaneous in vitro immortalization of breast epithelial cells from a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Mol Cell Biol.* 15(1):425-32.
216. Shay JW, Wright WE (1996) Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol.* 8(1):66-71.
217. Shay JW, Bacchetti S (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 33(5):787-91.
218. Shay JW, Keith WN (2008) Targeting telomerase for cancer therapeutics. *Br J Cancer.* 98(4):677-83.
219. Smith MA, Altekruze SF, Adamson PC, Reaman GH, Seibel NL (2014) Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer.* 120(16):2497-506.
220. Smith S, Gariat I, Schmitt A, de Lange T (1998) Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science.* 282(5393):1484-7.
221. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol.* 20(5):1659-68.
222. 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):1013-21.
223. Sotillo-Pineiro E, Sierrasesumaga L, Patinno-Garcia A (2004) Telomerase activity and telomere length in primary and metastatic tumors from pediatric bone cancer patients. *Pediatr Res.* 55(2):231-5.
224. Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98(3):503-17.
225. 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):301-6.
226. Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, Yoshida K, Itoh M, Kyo S, Ohno T, Taira T, Ariga H, Nakajima K, Hatta M, Kobayashi M, Sano H, Kohgo T, Shindoh M (2003) EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer Res.* 63(23):8338-44.
227. Tefferi A, Lasho TL, Begna KH, Patnaik MM, Zblewski DL, Finke CM, Laborde RR, Wassie E, Schimek L, Hanson CA, Gangat N, Wang X, Pardanani A (2015) A pilot study of the telomerase inhibitor Imetelstat for myelofibrosis. *N Engl J Med* 373(10):908-19.
228. Teng SC, Zakian VA (1999) Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 19(12):8083-93.
229. Teng SC, Chen YY, Su YN, Chou PC, Chiang YC, Tseng SF, Wu KJ (2004) Direct activation of HSP90A transcription by c-Myc contributes to c-Myc-induced transformation. *J Biol Chem.* 279(15):14649-55.
230. Thiel U, Wawer A, Wolf P, Badoglio M, Santucci A, Klingebiel T, Basu O, Borkhardt A, Laws HJ, Kodera Y, Yoshimi A, Peters C, Ladenstein R, Pession A,

- Prete A, Urban EC, Schwinger W, Bordigoni P, Salmon A, Diaz MA, Afanasyev B, Lisukov I, Morozova E, Toren A, Bielorai B, Korsakas J, Fagioli F, Caselli D, Ehninger G, Gruhn B, Dirksen U, Abdel-Rahman F, Aglietta M, Mastrodicasa E, Torrent M, Corradini P, Demeocq F, Dini G, Dreger P, Eyrich M, Gozdzik J, Guilhot F, Holler E, Koscielniak E, Messina C, Nachbaur D, Sabbatini R, Oldani E, Ottinger H, Ozsahin H, Schots R, Siena S, Stein J, Sufliarska S, Unal A, Ussowicz M, Schneider P, Woessmann W, Jurgens H, Bregni M, Burdach S (2011) No improvement of survival with reduced- versus high-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplants in Ewing tumor patients. *Ann Oncol.* 22 (7): 1614-1621.
231. Thompson PA, Drissi R, Muscal JA, Panditharatna E, Fouladi M, Ingle AM, Ahern CH, Reid JM, Lin T, Weigel BJ, Blaney SM (2013) A phase I trial of imetelstat in children with refractory or recurrent solid tumors: a Children's Oncology Group Phase I Consortium Study (ADVL1112). *Clin Cancer Res.* 19(23):6578-84.
232. Tokutake Y, Matsumoto T, Watanabe T, Maeda S, Tahara H, Sakamoto S, Niida H, Sugimoto M, Ide T, Furuichi Y (1998) Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 247(3):765-72.
233. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice 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):4168-72.
234. Ulaner GA, Hoffman AR, Otero J, Huang HY, Zhao Z, Mazumdar M, Gorlick R, Meyers P, Healey JH, Ladanyi M (2004) Divergent patterns of telomere maintenance mechanisms among human sarcomas: sharply contrasting prevalence of the alternative lengthening of telomeres mechanism in Ewing's sarcomas and osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 41(2):155-62.
235. Uziel O, Beery E, Dronichev V, Samocha K, Gryaznov S, Weiss L, Slavin S, Kushnir M, Nordenberg Y, Rabinowitz C, Rinkevich B, Zehavi T, Lahav M (2010) Telomere shortening sensitizes cancer cells to selected cytotoxic agents: in vitro and in vivo studies and putative mechanisms. *PLoS One.* 5(2): e9132. doi: 10.1371/journal.pone.0009132. PubMed PMID: 20161752; PubMed Central PMCID: PMC2817744.
236. van Doorninck JA, Ji L, Schaub B, Shimada H, Wing MR, Krailo MD, Lessnick SL, Marina N, Triche TJ, Spoto R, Womer RB, Lawlor ER (2010). Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 28(12):1989-94.
237. van Maldegem AM, Hogendoorn PC, Hassan AB (2012) The clinical use of biomarkers as prognostic factors in Ewing sarcoma. *Clin Sarcoma Res.* 2(1):7.
238. van Steensel B, de Lange T (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature.* 385(6618):740-3.
239. van Valen F, Winkelmann W, Jurgens H (1992) Expression of functional Y1 receptors for neuropeptide Y in human Ewing's sarcoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol.* 118(7):529-36.
240. van Valen F, Winkelmann W, Burdach S, Gobel U, Jurgens H (1993) Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha induce a synergistic antiproliferative

- response in human Ewing's sarcoma cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol.* 119(10):615-21.
241. van Valen F (1999) Ewing's Sarcoma Family of Tumors. In: Masters JRW, Palsson B (Hrsg). *Human Cell Culture: Cancer Cell Lines Part 1.* Springer Netherlands, Dordrecht, Bd 1, 1. Aufl. S 55-85.
242. 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(5):279-82.
243. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R (2001) Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol.* 75(9):4467-72.
244. Veldman T, Etheridge KT, Counter CM (2004) Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype. *Curr Biol.* 14(24):2264-70.
245. Vornicova O, Bar-Sela G (2016) Investigational therapies for Ewing sarcoma: a search without a clear finding. *Expert Opin Investig Drugs.* 25(6):679-86.
246. Wadhwa R, Kaul SC, Mitsui Y (2000) Cellular mortality and immortalization: a complex interplay of multiple gene functions. *Prog Mol Subcell Biol.* 24:191-204.
247. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ (1998) Myc activates telomerase. *Genes Dev.* 12(12):1769-74.
248. Ward RJ, Autexier C (2005) Pharmacological telomerase inhibition can sensitize drug-resistant and drug-sensitive cells to chemotherapeutic treatment. *Mol Pharmacol.* 68(3):779-86.
249. 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 hTRT. *Nat Genet.* 17(4):498-502.
250. Wen J, Cong YS, Bacchetti S (1998) Reconstitution of wild-type or mutant telomerase activity in telomerase-negative immortal human cells. *Hum Mol Genet.* 7(7):1137-41.
251. Wesbuer S, Lanvers-Kaminsky C, Duran-Seuberth I, Bolling T, Schafer KL, Braun Y, Willich N, Greve B (2010) Association of telomerase activity with radio- and chemosensitivity of neuroblastomas. *Radiat Oncol.* 5:66. Online im Internet: doi: 10.1186/1748-717X-5-66. [Abrufdatum: 27.08.2016]
252. Wick M, Zubov D, Hagen G (1999) Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene.* 232(1):97-106.
253. Wobser M (2006) Evaluation eines retroviralen Transfektionssystems zur Hemmung der Telomerase mittels DN-hTERT in Neuroblastomzellen [Dissertation]. Münster: Westfälische Wilhelms-Universität.
254. Wojtyla A, Gladych M, Rubis B (2011) Human telomerase activity regulation. *Mol Biol Rep.* 38(5):3339-49.
255. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW (1989) Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 9(7):3088-92.
256. Wright WE, Shay JW (1992) The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol.* 27(4):383-9.

257. Wright WE, Shay JW (1995) Time, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends Cell Biol.* 5(8):293-7.
258. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW (1996) Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* 18(2):173-9.
259. Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW (1997) Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.* 11(21):2801-9.
260. Wu G, Jiang X, Lee WH, Chen PL (2003) Assembly of functional ALT-associated promyelocytic leukemia bodies requires Nijmegen Breakage Syndrome 1. *Cancer Res.* 63(10):2589-95.
261. 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):220-4.
262. Wynford-Thomas D (1999) Cellular senescence and cancer. *J Pathol.* 187(1):100-11.
263. Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, Tahara H, Ohji H, Yamamoto H, Ide T, Utakoji T (1996) Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene.* 13(2):433-9.
264. Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR (1999) Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.* 59(17):4175-9.
265. 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.
266. Yin L, Hubbard AK, Giardina C (2000) NF-kappa B regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit. *J Biol Chem.* 275(47):36671-5.
267. Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM (1992) Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell.* 70(6):937-48.
268. Yoon KA, Ku JL, Yang JO, Park JG (2003) Telomerase activity, expression of Bcl-2 and cell cycle regulation in doxorubicin resistant gastric carcinoma cell lines. *Int J Mol Med.* 11(3):343-8.
269. Zakian VA (1995) Telomeres: beginning to understand the end. *Science.* 270(5242):1601-7.
270. Zanetti M. (2017) A second chance for telomerase reverse transcriptase in anticancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 14 (2):115-128.
271. Zhang R, Wang X, Guo L, Xie H (2002) Growth inhibition of BEL-7404 human hepatoma cells by expression of mutant telomerase reverse transcriptase. *Int J Cancer.* 97(2):173-9.
272. 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):2388-99.
273. Zhang X, Li B, de Jonge N, Bjorkholm M, Xu D (2015) The DNA methylation inhibitor induces telomere dysfunction and apoptosis of leukemia cells that is attenuated by telomerase over-expression. *Oncotarget.* 6(7):4888-900.

7. Danksagung

HERZLICHEN DANK...

an Herrn Prof. Dr. J. Boos für die Bereitstellung dieses vielseitigen Themas mit der Möglichkeit in der Arbeitsgruppe der „Experimentellen pädiatrischen Hämatologie und Onkologie“ selbständig wissenschaftlich zu arbeiten. Ganz besonders auch für die Bereitschaft und Unterstützung diese Arbeit zu Ende zu führen.

an Frau Dr. rer. nat. C. Lanvers-Kaminsky für die engagierte Betreuung und wissenschaftliche Unterstützung im Rahmen der experimentellen Arbeiten und Ausarbeitung der Ergebnisse, mit allzeit zügiger Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei anstehenden Fragen.

an Sandra Schulz, Petra Schulze-Westhoff und insbesondere Tanja Möllers für die ständige Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung beim Erlernen der angewandten Methoden.

an das „Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf“ (Arbeitskreis von Prof. C. Poremba) für die Bereitstellung der Zelllinien und insbesondere Yvonne Braun für wertvolle Tipps zum Gelingen des Southern Blots.

an Rainer Maatz, Svenja Baumstark und Björn Vogt für Korrekturen an Rechtschreibung und Grammatik sowie konstruktiver Kritik zu Formulierungen und schriftlicher Ausarbeitung.

an meine Familie und Freunde, die mich jederzeit bei meinem Vorhaben unterstützt und viel Verständnis gezeigt haben. Ganz besonders an meine Eltern, meinen Mann Tobias und unsere Kinder, die besonders in der letzten Phase dieser Arbeit mit viel Geduld und positiver Stimmung zum Gelingen beigetragen haben.

8. Lebenslauf

