

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Urologische Klinik und Poliklinik
Direktor: Prof. Dr. K. Miller

**Untersuchungen zu diagnostischen und therapeutischen
Aspekten der Telomerase beim Nierenzellkarzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
Doctorum rerum medicarum
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Vorgelegt von
Jana Sachsinger
2003

Referent: PD Dr. M. Müller

Korreferent: Prof. Dr. St. Loening

Gedruckt mit Genehmigung der
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 12. Dezember 2003

Zusammenfassung

Aufgrund bisher mangelnder therapeutischer Möglichkeiten beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom boten sich Untersuchungen zur Telomerase in dieser chemoresistenten und heterogenen Tumorentität an. Die Telomerase ist ein Ribonukleoproteinkomplex bestehend aus einer RNA-Komponente (hTR) und einer katalytischen Proteinuntereinheit (hTERT).

In zwei verschiedenen Versuchsserien wurde Telomeraseaktivität von Nierenkarzinomen bestimmt, 63 % bzw. 46 % wurde Telomeraseaktivität nachgewiesen. Normales Nierengewebe zeigte keine Telomeraseaktivität. Mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR wurde in 34 % der Nierenkarzinome eine Expression der hTERT gefunden, Nierennormalgewebe waren zu 31 % hTERT positiv. Eine hTR-Expression wurde in 83 % der Nierenkarzinome gefunden, aber nur in 56 % der Nierennormalgewebe. In der Expression der Telomeraseuntereinheiten treten keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe auf. Es konnte aber eine statistisch signifikante Korrelation zwischen hTERT und der Telomeraseaktivität ($p=0,031$) aufgezeigt werden.

Für die Hemmung der Telomerase wurde als Modell die Nierenkarzinomzelllinie der Maus RENCA verwendet. Es wurden drei Angriffsstrategien an dem Enzymkomplex untersucht: (i) die Verwendung von antisense Telomerase-RNA gerichtet gegen die RNA; (ii) eine dominant-negative Mutante der katalytischen Untereinheit und (iii) der Einsatz von chimären Oligonukleotiden, die eine Bindung an die Telomerase-RNA und an die Proteinuntereinheit ermöglichen. In den murinen oder humanen Tumorzellen wurde eine zeitweise Hemmung der Proliferation und ein erhöhter Zelltod hervorgerufen. Ungefähr 35. Populationsverdopplungszeiten nach Behandlung der RENCA-Zellen mit antisense Telomerase-RNA wurde eine stark verringerte Proliferation, sowie eine gehemmte Telomeraseaktivität beobachtet. Dies war einhergehend mit der Verkürzung der Telomere. Bei der Verwendung einer dominant-negativen Mutante der katalytischen Untereinheit zeigte sich nach einer stark verringerten Selektionsrate der transduzierten Klone eine bis zu 30 % gehemmte Proliferation der veränderten Zellen. Weiterhin wurde auch in diesen Zellen eine verringerte Telomeraseaktivität, sowie eine Verkürzung der Telomere bis zur 86. PD gemessen. Nach der Hemmung der Telomeraseaktivität wurde eine Reaktivierung der Telomerase aufgrund einer gesteigerten Expression des endogenen Telomeraseproteins gemessen. Weiterhin konnte die Telomeraseaktivität durch den Einsatz von verschiedenen Phosphorthioat-modifizierten Oligonukleotiden in humanen und murinen Tumorzelllinien in-vitro gehemmt werden.

Diese hier vorgestellten Ergebnisse zeigen neue Möglichkeiten der Hemmung der Telomerase in Tumorzellen auf. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Telomerase einer komplexen Regulation in der Zelle unterliegt, bemerkenswert dabei sind, die unterschiedlichen Expressionsstärken und -muster, sowie die gewebe- und zellspezifischen Besonderheiten, besonders zwischen Maus und Mensch. Die Telomerase besitzt zusammen mit anderen alternativen Mechanismen eine Bedeutung für die Telomererhaltung, stellt aber kein diagnostisches Target dar. Die vorliegenden Untersuchungen zur Telomerase beim Nierenzellkarzinom weisen zusammenfassend auf mögliche neue Wege in der Tumordiagnostik und Tumorthherapie hin.

Abstract

The enzyme telomerase is a ribonucleoprotein DNA polymerase composed of an RNA molecule, TR (Telomerase RNA) and a catalytic subunit, TERT (Telomerase Reverse Transcriptase). Renal cell cancer is known as a chemo resistant and heterogeneous tumor entity. Examinations of telomerase were performed to investigate possible therapeutic paths against advanced renal cell cancer.

Telomerase activity was measured in two different series of renal carcinoma and were detected in 63% and 46% respectively. No samples of normal renal tissue showed telomerase activity. For real-time RT-PCR of hTR RNA and hTERT mRNA we used the LightCycler quantification technology. We detected expression of hTERT in only 34% of the carcinoma tissue, compared to normal tissue where we found expression in 31% of samples. For hTR expression 83% of clear cell carcinoma samples were positive while normal renal tissue showed expression of hTR in 56%. No correlation between the expression of telomerase subunits could be found but a statistically significant correlation ($p < 0.031$) between expression of the telomerase catalytic subunit hTERT with telomerase activity in renal cell carcinoma was established.

To investigate telomerase inhibition we used the murine renal cancer cell line RENCA. We used three different strategies to study the enzyme complexes: (i) antisense-RNA directed against the telomerase RNA, (ii) a dominant-negative mutant of the catalytic subunit TERT and (iii) a chimeric oligonucleotide which binds to telomerase-RNA and the telomerase protein subunit. Both human and murine tumor cells showed time-restricted inhibition of proliferation and an increased cell death in all three cases. After treatment of about 35 population doublings of RENCA cells we observed decreased proliferation as well as inhibition of telomerase activity. Telomerase inhibition leads to telomere shortening and telomere instabilities. Here we showed the effect of endogenous up regulation of the TERT protein resolved in overcoming telomerase inhibition through the dominant-negative mutant of TERT.

In summary, these results suggest that telomerase is the subject of complex cell regulation. We assume that different expression and expression patterns of all telomerase compounds as well as tissue and cell-specific features are responsible for the differences of telomerase in mice and humans. Especially for renal cell carcinoma alternative mechanisms for telomere stabilization are well described. The results indicate that telomerase will be a possible new and interesting target in tumor diagnostic and tumor therapy.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Stand der Forschung | 3 |
| 2.1 | Das Nierenzellkarzinom | 3 |
| 2.2 | Telomere und Telomerase | 9 |
| 2.2.1 | Telomere | 9 |
| 2.2.2 | Telomerase | 12 |
| 2.2.3 | Alternative Mechanismen zur Telomerase | 16 |
| 2.3 | Telomerase – Ein Antitumortarget? | 17 |
| 3 | Material und Methoden | 20 |
| 3.1 | Material | 20 |
| 3.1.1 | Geräte | 20 |
| 3.1.2 | Chemikalien und Feinreagenzien | 20 |
| 3.1.3 | Enzyme, Primer und Vektoren | 21 |
| 3.1.4 | Bakterien | 21 |
| 3.1.5 | Kits | 22 |
| 3.1.6 | Zelllinien, Medien und Zellkultur | 22 |
| 3.1.7 | Gewebeproben | 23 |
| 3.2 | Methoden | 24 |
| 3.2.1 | Bestimmung der Telomeraseaktivität | 24 |
| 3.2.1.1 | Probenvorbereitung | 24 |
| 3.2.1.2 | TRAP-Assay | 25 |
| 3.2.1.3 | Analyse der TRAP-Assay Produkte | 25 |
| 3.2.2 | Bestimmung der Telomerlänge | 27 |
| 3.2.2.1 | Analyse der Telomerlänge mit der „Southernblot“- Methode | 27 |
| 3.2.2.2 | Analyse der Telomerlänge mit der Flow-FISH Methode | 29 |
| 3.2.2.3 | Analyse der Telomerlänge mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) | 30 |
| 3.2.3 | Bestimmung der Expression der Telomerase-RNA hTR und der katalytischen Untereinheit hTERT | 31 |
| 3.2.3.1 | RNA-Extraktion | 31 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2.3.2 | Expressionsuntersuchungen von hTR und hTERT mit dem RT-PCR- ELISA | 32 |
| 3.2.4 | Das LightCycler PCR Analysesystem | 34 |
| 3.2.4.1 | Quantitative RT-PCR von hTR und hTERT mit dem LightCycler | 36 |
| 3.2.4.2 | Quantitative Bestimmung der dominant-negativen Mutante von mTERT per LightCycler PCR | 39 |
| 3.2.5 | Klonierungen und Konstruktion der Vektoren | 40 |
| 3.2.5.1 | Antisense-mTR Konstrukte | 40 |
| 3.2.5.2 | Dominant-negative Mutante der mTERT | 41 |
| 3.2.6 | Ligation, Transformation der Bakterien und Präparationen der Plasmide | 42 |
| 3.2.7 | Transfektion der Zelllinien | 43 |
| 3.2.7.1 | Elektroporation und Lipid-vermittelte Transfektion | 43 |
| 3.2.7.2 | Retrovirale Transduktion | 44 |
| 3.2.8 | Kultivierung stabil transfizierter RENCA-Klone | 45 |
| 3.2.9 | Proliferationsmessungen | 45 |
| 3.2.10 | In-vivo Versuche | 46 |
| 3.2.11 | Etablierung von Zelllinien aus den Tumoren, der in vivo-Versuche | 46 |
| 3.2.12 | Phosphorthioat-modifizierte Oligonukleotide zur Hemmung der Telomeraseaktivität | 46 |
| 4 | Ergebnisse | 48 |
| 4.1 | Diagnostische Aspekte der Telomerase beim Nierenkarzinom | 48 |
| 4.1.1 | Telomeraseaktivität, Expression von hTERT und hTR in Nierenkarzinomzelllinien | 48 |
| 4.1.2 | Telomeraseaktivität, Expression von hTERT und hTR in Nierengeweben | 50 |
| 4.1.2.1 | Telomeraseaktivität | 50 |
| 4.1.2.2 | Expression der hTR und der hTERT | 55 |
| 4.1.3 | Telomerlängen bei Nierentumoren, Normalgeweben und Zelllinien | 62 |
| 4.2 | Therapeutische Aspekte der Telomerase | 65 |
| 4.2.1 | Antisense RNA gerichtet gegen die Telomerase-RNA | 65 |
| 4.2.1.1 | Morphologie | 66 |
| 4.2.1.2 | Proliferation | 67 |
| 4.2.1.3 | Telomeraseaktivität | 68 |
| 4.2.1.4 | Telomerlänge | 71 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.2.2 | Einsatz einer dominant-negativen Mutante der katalytischen Untereinheit der Telomerase | 74 |
| 4.2.2.1 | Morphologie | 75 |
| 4.2.2.2 | Proliferation | 76 |
| 4.2.2.3 | Telomeraseaktivität | 76 |
| 4.2.2.4 | Telomerlänge | 79 |
| 4.2.2.5 | Quantitativer Nachweis der endogenen mTERT und der mTERT Mutante | 82 |
| 4.2.2.6 | In vivo Untersuchungen | 86 |
| 4.2.3 | Phosphorthioat-modifizierte Oligonukleotide zur Inhibition der Telomerase | 88 |
| 5 | Diskussion | 92 |
| 5.1 | Telomerase als diagnostischer Marker | 92 |
| 5.1.1 | Diagnostik der Telomerase in Normal- und Tumorgeweben | 92 |
| 5.1.2 | Telomerase im Nierenzellkarzinom | 93 |
| 5.1.3 | Expression der Telomeraseuntereinheiten | 96 |
| 5.1.4 | Telomerlängen in Nierenkarzinomen | 101 |
| 5.1.5 | Regulation der Telomerase in Tumor- und Normalgewebe | 103 |
| 5.2 | Telomerase als therapeutisches Target | 107 |
| 5.2.1 | Antisense Strategien gegen die Telomerase-RNA | 108 |
| 5.2.2 | Dominant-negative Mutante | 111 |
| 5.2.3 | Synthetische Oligonukleotide | 115 |
| 5.3 | Telomerase- ein Ausblick | 118 |
| 6 | Zusammenfassung | 123 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 125 |
| 8 | Anhang | 136 |
| 8.1 | Abkürzungen | 136 |
| 8.2 | Lebenslauf | 137 |
| 8.3 | Publikationen | 138 |
| 8.4 | Danksagung | 139 |