

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