

4.2 Therapeutische Aspekte der Telomerase

Die Telomerase wird als vielversprechendes Target für eine spezifische Tumorthherapie angesehen, da in der Mehrzahl der untersuchten Tumoren Telomeraseaktivität in einem hohem Anteil nachweisbar ist. In der Einleitung sind verschiedene Angriffsstrategien zur Hemmung der Telomeraseaktivität in Tumorzellen vorgestellt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Strategien an Nierenkarzinomzellen verfolgt, deren Entwicklung sich während des Entstehens der Promotionsarbeit durch die weiteren Erkenntnisse in den Forschungen zur Telomerase ergaben. Dabei wurde zuerst der Telomerasekomplex mittels intrazellulär exprimierter antisense RNA an der Telomerase-RNA angegriffen (Abschnitt 4.2.1), als nächstes wurde ein mutiertes Konstrukt der katalytischen Untereinheit der Telomerase in die Zellen eingebracht, welches als dominant-negative Mutante wirken sollte (Abschnitt 4.2.2). Als drittes wurde versucht, mittels chimärer Oligonukleotide die Aktivität des Telomerasekomplexes durch gleichzeitigen Angriff an Telomerase-RNA und katalytischer Untereinheit zu beeinflussen (Abschnitt 4.2.3) In Abbildung 4-8 ist der Angriff der antisense-hTR, sowie die Bindung eines modifizierten Oligonukleotids an die Telomerase schematisch dargestellt.

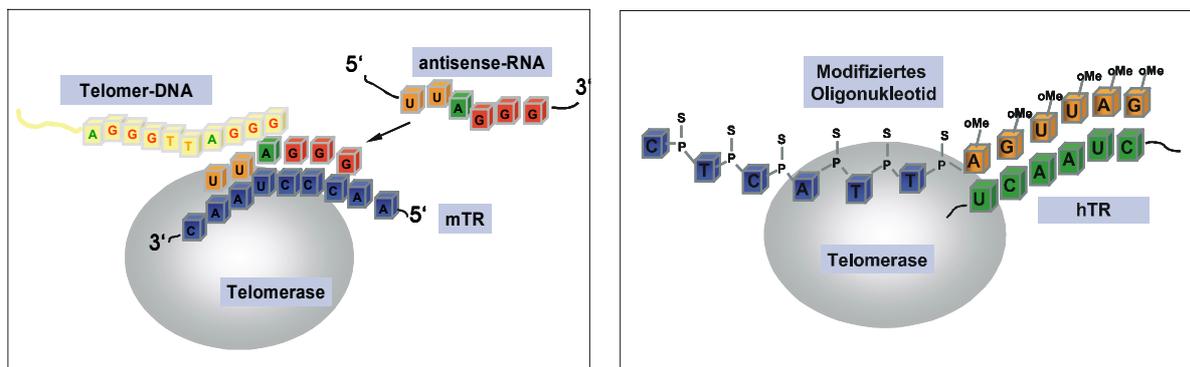


Abbildung 4-8 Hemmung der Neusynthese von Telomerasequenzen durch die Telomerase über Blockade der Telomerase-RNA Matrix mit antisense RNA (links) und über Bindung eines modifizierten Oligonukleotids an die Telomerase-RNA und an die katalytische Untereinheit (rechts)

Für die ersten beiden Versuche zur Hemmung der Telomeraseaktivität wurde die Nierenkarzinomzelllinie der Maus RENCA ausgewählt, welche ein in-vivo gut charakterisiertes Tumormodell für Nierenkarzinome darstellt (Murphy & Hrushesky, 1973). Da diese Zelllinie außerdem eine hohe Telomeraseaktivität zeigt und dem humanen System vergleichbar kurze Telomere von 7 kb besitzt, schien sie für die Experimente besonders geeignet (siehe Abbildung 4-2 C und Abbildung 4-14).

4.2.1 Antisense RNA gerichtet gegen die Telomerase-RNA

Um die RNA-Komponente der murinen Telomerase durch antisense Moleküle zu inhibieren, musste zunächst die murine Telomerase-RNA (mTR) kloniert werden (siehe unter Methoden

3.2.5.1). Diese ist auf einem kurzen Intron-freien Abschnitt des Mausgenoms kodiert (Blasco *et al.*, 1995). Aus der bekannten Sequenz von 430 bp wurde ein Fragment mit 412 bp Länge mittels Standard-PCR in den Vektor pCR™3 kloniert (siehe Abschnitt 3.2.5.1). Nach Erhalt der Vektoren pCR™3.mTRas mit antisense-mTR und pCR™3.mTRs mit der sense-mTR standen diese für die Transfektion in RENCA-Zellen zur Verfügung. Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporation (siehe Abschnitt 3.2.7.1). Die Zellen wurden ab zwei Tage nach der Transfektion unter G-418 (800 µg/ml) selektiert. Nach 10 Tagen konnten stabil transfizierte Zellklone isoliert werden. Eine Populationsverdopplungszeit (PD) von 2 Tagen zugrunde gelegt, entspricht der Isolationszeitpunkt der Klone der PD 20 (siehe Abschnitt 3.2.8). Nach der Selektion wurden 13 antisense-mTR transfizierte Klone (weiterhin bezeichnet mit as-mTR), 10 sense-mTR (s-mTR) transfizierte Klone und 10 Klone (Kontrollen), die nur mit dem Vektor pCR™3 transfiziert worden sind, isoliert. Die transfizierten Zellen zeigten in den ersten Passagen ein den untransfizierten RENCA-Zellen vergleichbare Proliferation. Veränderungen in der Morphologie der Zellen konnten nicht beobachtet werden. Bei 80 % Konfluenz wurden die Zellen jeweils in einem Verhältnis 1:10 umgesetzt. Je Passage wurden Zellaliquots für die Telomeraseaktivitätsbestimmung und für die Bestimmung der mittleren Telomerlänge abgenommen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proliferationstests durchgeführt.

4.2.1.1 Morphologie

Nach ungefähr 35 PDs zeigte sich bei der Hälfte der as-mTR transfizierten Klone eine deutlich verringerte Zellteilungsaktivität. Eine PD dauerte jetzt 6 Tage. Die Morphologie der Zellen wurde beobachtet und mit den s-mTR Klonen, der Kontrollgruppe und den untransfizierten RENCA-Zellen verglichen. Nach einigen Passagen wurde ein vermehrtes Absterben der Zellen im Vergleich zu den s-mTR transfizierten Klonen, den Kontrollklonen und den untransfizierten RENCA-Zellen erkennbar. Alle as-mTR Zellklone zeigten morphologische Veränderungen. Es wurden große, transparente, multinukleare Zellen beobachtet, die im Zusammenhang mit seneszierenden Zellen in der Literatur beschrieben sind. Die s-mTR transfizierten Klone, sowie die Kontrollklone besaßen keine Veränderungen in der Morphologie.

Abbildung 4-9 A und B zeigt den as-mTR Klon 2 in zwei verschiedenen Vergrößerungen. Neben unverändert aussehenden Zellen (links oben) sind vergrößerte transparente Zellen zu sehen. In Abbildung 4-9 C sind typisch aussehende RENCA-Zellen abgebildet. RENCA-Zellen sind adhärent wachsende, leicht spindelförmige Zellen. Ausgehend von einzelnen Zellen wachsen sie in Zellinseln bis sie einen dichten Zellrasen bilden. Abbildung 4-9 D zeigt den Zellklon as-mTR 10 in der letzten Passage vor dem Absterben. Es sind deutlich eine Vielzahl von Zellresten und nicht mehr anheftende Zellen zu sehen.

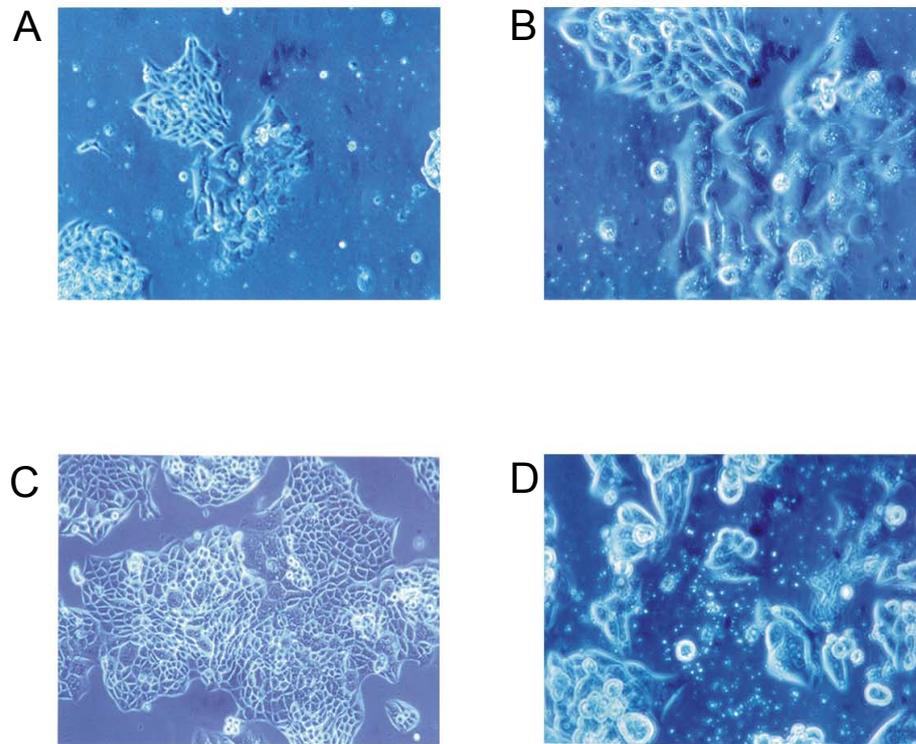


Abbildung 4-9 Phasenkontrastfotografien der RENCA-Zellen aus der Zellkultur. (A) as-mTR 2, seneszenz-ähnliche Morphologie (100fache Vergrößerung); (B) as-mTR 2, seneszenz-ähnliche Morphologie (200fache Vergrößerung); (C) Kontrolle, RENCA (100fache Vergrößerung); (D) as-mTR 10, abgestorben (200fache Vergrößerung)

4.2.1.2 Proliferation

In zehn der dreizehn as-mTR transfizierten Zellklone konnte eine veränderte Proliferation beobachtet werden. Die s-mTR, sowie die Kontrollklone zeigten keine Proliferationsveränderungen. Die Phase der Seneszenz, definiert mit einer PD pro Woche, wurde in allen as-mTR Zellklonen erreicht. In zwei der Zellklone as-mTR 10 und 13 wurde die Vermehrung mit der 35. PD und 38. PD vollständig gehemmt. In den weiteren acht as-mTR Zellklonen wurde über zwei verlängerte Dopplungszeiten eine starke Hemmung der Proliferation beobachtet.

Um die Ergebnisse zu erhärten, wurde mittels des Zellproliferations-ELISAs von Roche Diagnostics die Proliferation der transfizierten Zellklone an mehreren Zeitpunkten bestimmt (siehe unter Methoden Abschnitt 3.2.9). Mit diesem Test konnte in allen dreizehn as-mTR transfizierten Zellklonen eine gegenüber den unbehandelten RENCA-Zellen verminderte

Proliferation gemessen werden (Abbildung 4-10). Dies bestätigte, die schon visuell beobachtete gehemmte Vermehrung der Zellklone während der 32.-35. Populationsverdopplungszeit.

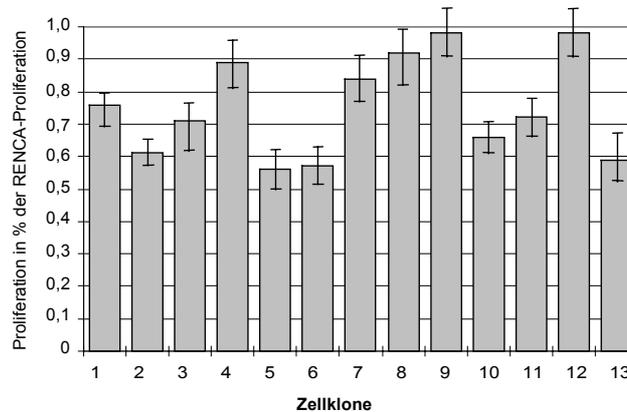


Abbildung 4-10 Proliferation der 13 as-mTR transfizierten Zellklone in der 32. bis 35. PD im Verhältnis zur Proliferation der untransfizierten RENCA-Zellen. Alle Zellklone zeigen eine den RENCA-Zellen verminderte Proliferation. Die Bestimmungen wurden mit dem Zellproliferations-ELISA durchgeführt.

Es gelang jedoch nicht, mit der antisense-mTR die Klone in einen dauerhaften Proliferationsarrest zu überführen. Nach der Krise in der 33.-35. PD stabilisierte sich die Vermehrung der as-mTR transfizierten Zellklone innerhalb der nächsten ca. 10 PDs wieder. Ab ca. der 50. PD waren keine Unterschiede zwischen as-mTR, s-mTR, Kontrollklonen und untransfizierten Zellklonen zu beobachten. Von allen überlebenden Zellklonen wurden Zellkulturen bis ca. zur 60. PD gehalten, um die Entwicklung der Telomeraseaktivität und der Telomerlänge zu beobachten.

4.2.1.3 Telomeraseaktivität

Parallel zur Messung der Proliferation wurde in jeder Zellpassage ein Aliquot zur Bestimmung der Telomeraseaktivität abgenommen. Die Telomeraseaktivitätsbestimmung wurde mit dem TRAP-Assay durchgeführt, einerseits mittels gelelektrophoretischer Auftrennung auf dem ABI 377-Sequencer und andererseits mit dem Telomerase-PCR-ELISA Kit von Roche Diagnostics detektiert (siehe unter Methoden Abschnitt 3.2.1).

Mit beiden Nachweisverfahren konnte bis ca. zur 35. PD in den as-mTR transfizierten Zellklonen eine sich verringernde Telomeraseaktivität gemessen werden. Dieser Zeitpunkt stimmt mit dem visuell beobachteten Zeitpunkt der massiven Hemmung des Zellwachstums überein. In Abbildung 4-11 sind die errechneten Mittelwerte der Telomeraseaktivitäten der 13 as-mTR transfizierten Zellklone gemessen mit dem Telomerase-PCR-ELISA dargestellt. Die Telomeraseaktivität ist von der 35. PD bis zur 38. PD stark verringert. Im Verhältnis zur RENCA-Zelllinie ist die Telomeraseaktivität zu diesem Zeitpunkt 7-fach geringer. Ab der 38. PD zeigten alle überlebenden as-mTR Zellklone eine wieder ansteigende Telomeraseaktivität, jedoch immer noch reduzierte Telomeraseaktivität. Erst in der 60. PD ist

ein den untransfizierten RENCA-Zellen vergleichbare Telomeraseaktivität nachzuweisen. In allen as-mTR transfizierten Zellklonen wurde eine gehemmte Telomeraseaktivität nachgewiesen, jedoch in keinem der Kontrollklone.

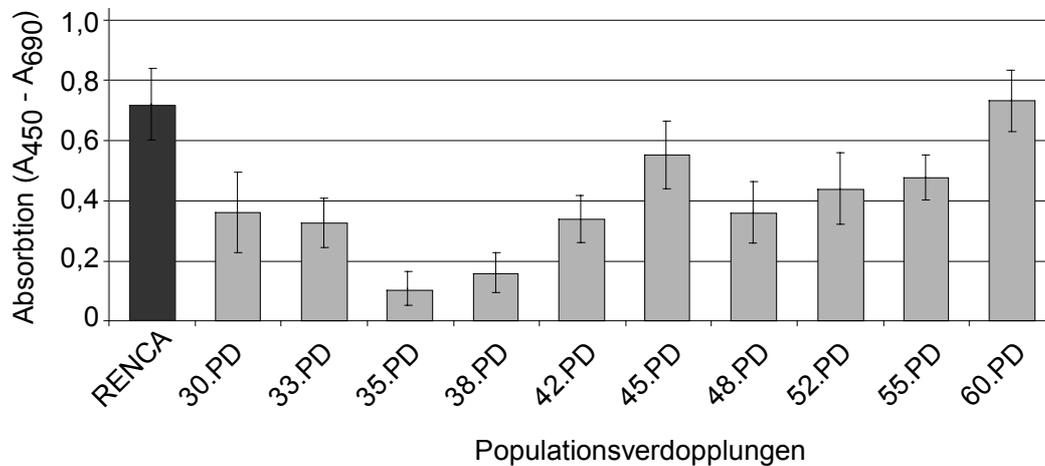


Abbildung 4-11 Telomeraseaktivität der Mittelwerte der as-mTR Zellklone zu verschiedenen Populationsverdopplungszeiten und der untransfizierten Zelllinie RENCA im Vergleich. Zum Nachweis wurden 0,03 µg Protein eingesetzt. Die as-mTR Klone zeigen in der 35. und 38. PD eine stark verminderte Telomeraseaktivität, danach nimmt die Telomeraseaktivität wieder zu.

In Abbildung 4-12 ist die Bestimmung der Telomeraseaktivität eines einzelnen as-mTR Klons gemessen mit dem TRAP-Assay und detektiert auf dem ABI 377 Sequenzierer dargestellt. Im as-mTR Klon 5 ist in der 35. PD keine Telomeraseaktivität nachzuweisen (Abbildung 4-12 B), während der Kontrollklon 1 Abbildung 4-12 E in der 35. PD eine Telomeraseaktivität ähnlich der untransfizierten RENCA-Zelllinie (siehe auch Abbildung 4-2 C) besitzt. Der im TRAP-Assay eingesetzte interne Standard mit der Größe von 212 bp, in Abbildung 4-12 zu sehen, ist eine Kontrolle der PCR. Der interne Standard zeigt eine Hemmung mit dem Einsatz der Proteinmenge im Assay und mit zunehmender Telomeraseaktivität in der Probe. Deshalb ist bei gehemmter Telomeraseaktivität in der Abbildung 4-12 A, B und C der interne Standard gut nachweisbar, bei hoher Telomeraseaktivität wie in Abbildung 4-12 D und E aufgrund der Hemmung jedoch nur noch ein geringes Produkt nachweisbar.

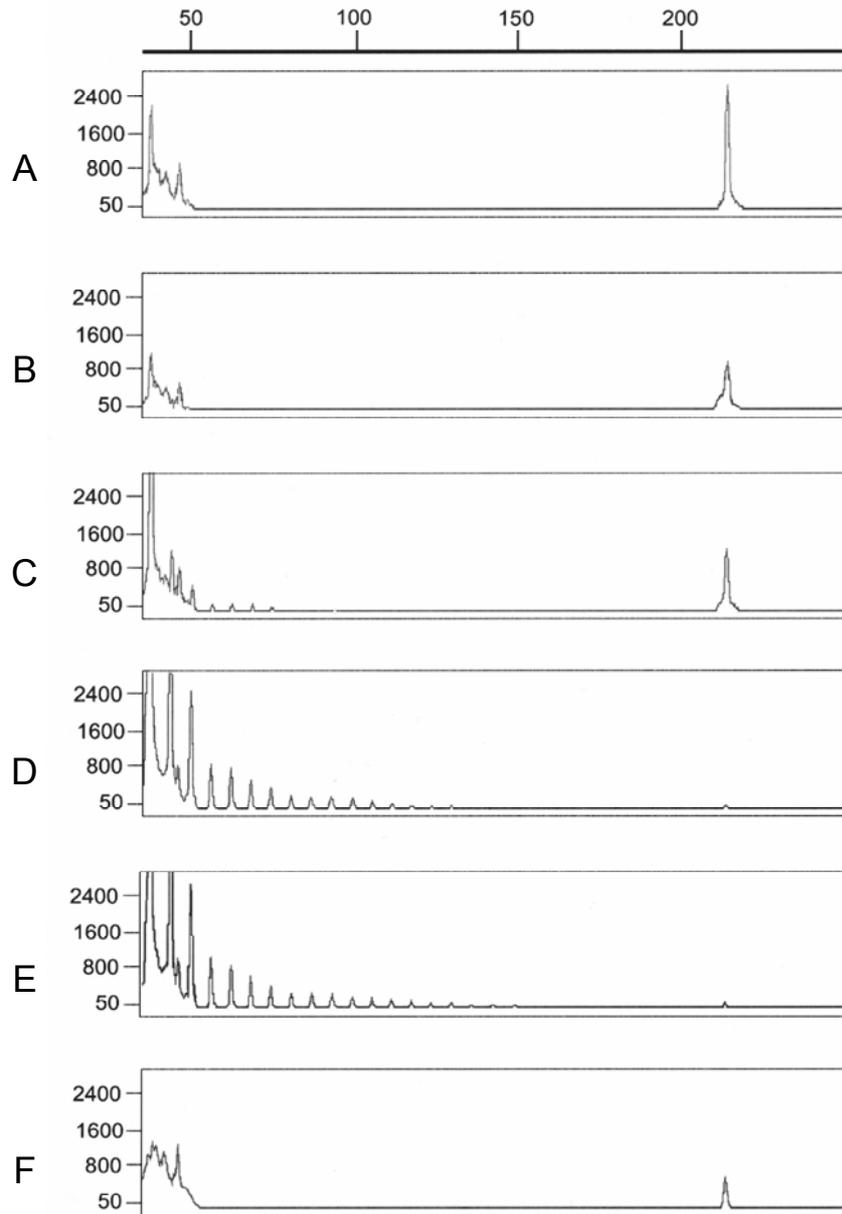


Abbildung 4-12 Telomeraseaktivität des as-mTR Klons 5 zu verschiedenen Populationsverdopplungszeiten und des Kontrollklons 1 bestimmt auf dem ABI 377. (A) 28. PD; (B) 35. PD; (C) 42. PD; (D) 50. PD; (E) Kontrollklon 1, 35. PD; (F) Wasser. Es wurden jeweils 0,3 µg Protein eingesetzt. In der Darstellung sind die Größe der Produkte in Basenpaaren gegen Fluoreszenzenheiten aufgetragen. Der Peak bei 212 bp stellt den zur PCR-Kontrolle eingesetzten internen Standard dar.

Die Mittelwerte der Telomeraseaktivität gemessen in den 10 s-mTR transfizierten Klonen mittels des Telomerase-PCR-ELISA sind in Abbildung 4-13 dargestellt. Hier zeigt sich vor allem in den ersten PDs der Kultivierung eine geringe Hemmung der Telomeraseaktivität im Vergleich zur RENCA-Zelllinie. In der 30. bis 33. PD ist die Telomeraseaktivität ungefähr zur Hälfte gegenüber der RENCA-Zelllinie reduziert. Weiterhin ist bis zur 48. PD eine geringere

Telomeraseaktivität in den s-mTR transfizierten Klonen als in der RENCA-Zelllinie nachzuweisen.

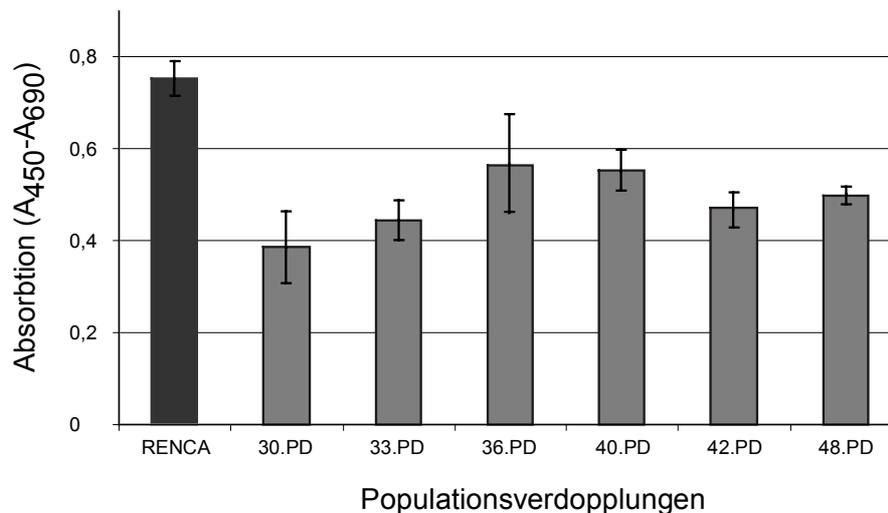


Abbildung 4-13 Telomeraseaktivität der Mittelwerte der s-mTR transfizierten Zellklone im Vergleich zur RENCA-Zelllinie. Zum Nachweis wurden jeweils 0,03 µg Protein eingesetzt.

Eine Hemmung der Telomeraseaktivität ist mit den s-mTR und as-mTR Konstrukten in den RENCA-Zellen, im Vergleich zu den Kontrollklonen und den untransfizierten RENCA-Zellen zu beobachten. Die Reduzierung der Telomeraseaktivität ist in den as-mTR transfizierten Zellen jedoch weitaus stärker als in den s-mTR transfizierten Klonen und führt zu morphologischen Veränderungen, sowie zur Hemmung der Proliferation bis zum Tod der Zellen.

4.2.1.4 Telomerlänge

Für die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Telomerlänge und der Telomeraseaktivität wurde die Länge der mittleren terminalen Restriktionsfragmente (TRF) mit der Southernblot-Methode in den Zellklonen bestimmt (siehe unter Methoden 3.2.2.1).

Die Telomer-Analysen der 13 antisense-mTR transfizierten Zellklone zeigten alle ein sehr ähnliches Bild. Die Bestimmung der Telomerlänge der RENCA-Zelllinie und der antisense-mTR Zellklone 3, 4 und 5 zwischen der 30. und 60. PD ist in Abbildung 4-14 zu sehen. Für die RENCA-Zelllinie wurde nach densitometrischer Auswertung des Southernblots mit dem Programm SCANPACK® eine mittlere TRF-Länge von 7 kb berechnet. In dem antisense-mTR Zellklon 3 sind bis zur 42. PD keine Telomersequenzen nachweisbar. In den antisense-mTR Klonen 4 und 5 sind ebenfalls vor der 44. bzw. 43. PD keine Telomersequenzen nachzuweisen. Erst ab der ca. 45. PD können wieder Telomere bestimmt werden. In allen antisense-mTR Zellklonen stellte sich ein ähnliches Bild dar, nur sehr schwache bis keine Signale sind bis ca. zur 38. PD auf dem Röntgenfilm sichtbar. In späteren PDs sind wieder Telomersequenzen nachweisbar.

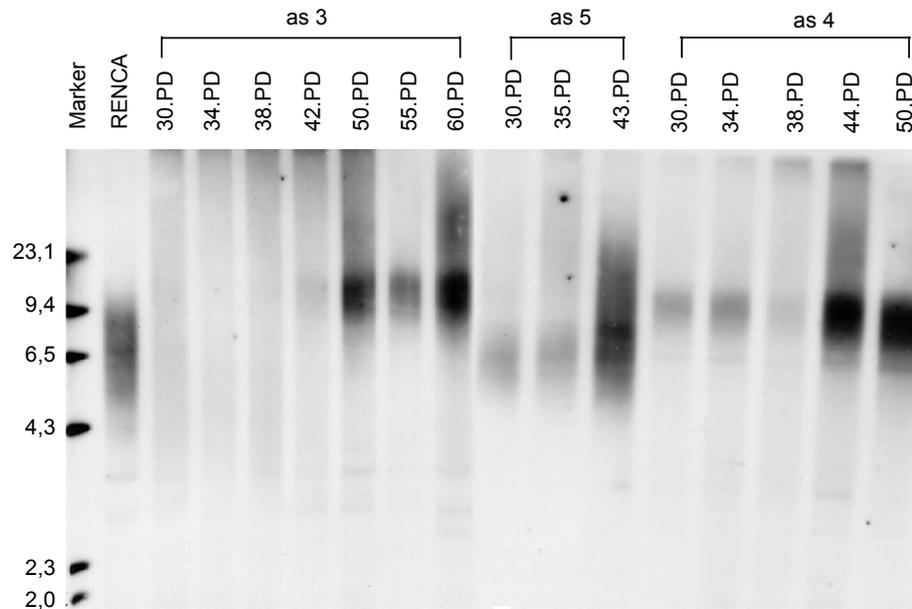


Abbildung 4-14 Bestimmung der mittleren Telomerlänge mit der Southernblot-Methode in den Zellklonen antisense-mTR 3, 4 und 5 zu verschiedenen Populationsverdopplungszeiten.

Die Abbildung 4-15 A und B stellen die Bestimmung der mittleren Telomerlängen in den Vektor-transfizierten Kontrollzellen und in den sense-mTR transfizierten Zellen dar. Hier sind im Gegensatz zu den antisense-mTR transfizierten Klonen Telomersequenzen in allen PDs nachzuweisen. Es sind keine Unterschiede zwischen der 30. PD und der 50. PD nachweisbar. Die Tabelle 4-14 fasst die densitometrische Bestimmung der mittleren TRFs mit dem Programm SCANPACK[®] für den as-mTR Klon 3 und zwei Kontrollklone 1 und 2 zusammen. Für den as-mTR Klon 3 ist auffällig, dass es nach dem Auftreten von Telomersequenzen zu einer Verlängerung der Telomere gekommen ist. Im Gegensatz zur Telomerlänge der RENCA-Zelllinie von 7 kb sind jetzt Telomerlängen von ca. 13 kb nachzuweisen. Auch in den anderen untersuchten antisense-mTR Klonen findet sich ein ähnliches Bild: eine Verlängerung der Telomere nach der Krise der Proliferation.

In dem Kontrollklon 1 ist eher eine Verkürzung der Telomere im Vergleich zu den RENCA-Zellen zu beobachten. Auch einige der untersuchten s-mTR Klone z.B. s-mTR 1 in Abbildung 4-15 B, zeigten in den ersten PDs eine geringe Verkürzung der Telomersequenzen, die sich mit Zunahme der Populationsverdopplungen wieder ausglich.

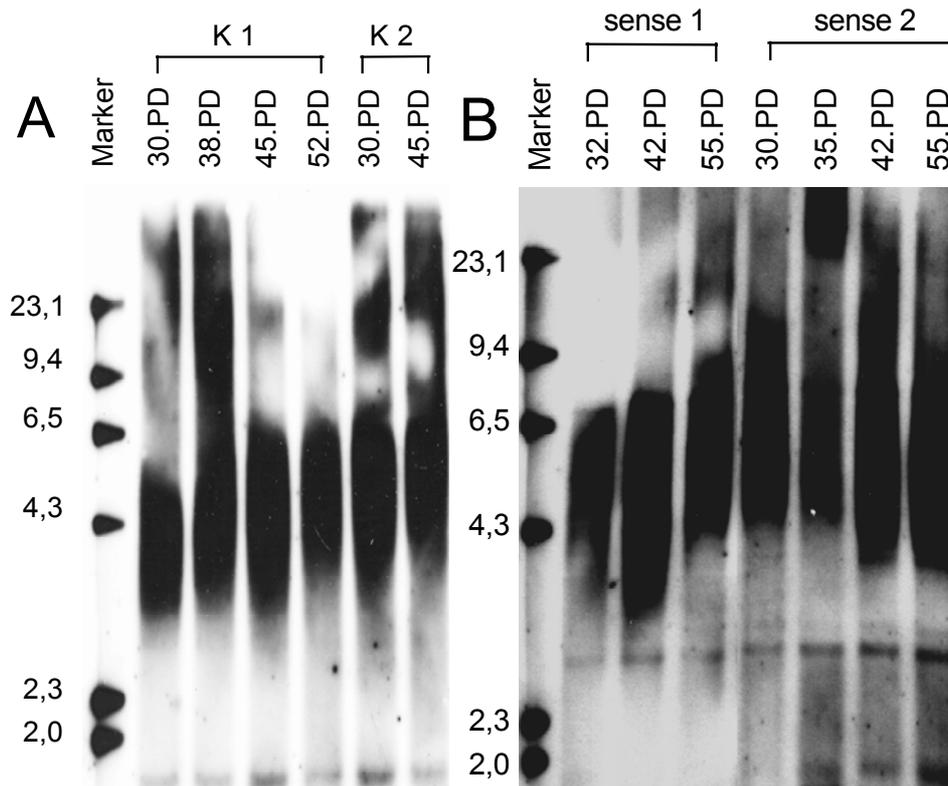


Abbildung 4-15 Mittlere Telomerlänge der Kontrollklone 1 und 2 (A) und der s-mTR Klone 1 und 2 (B) zu verschiedenen Populationsverdopplungszeiten. Telomersequenzen sind zu allen Zeitpunkten nachweisbar.

Tabelle 4-14 Vergleich der Telomerlängen der RENCA-Zelllinie, des as-mTR Klons 3 (vgl. Abbildung 4-14) und der Kontrollklone k1 und k2 (vgl. Abbildung 4-15 A) nach densitometrischer Auswertung mit dem Programm SCANPACK®

Zellen	mittlere TRF in bp	Zellen	mittlere TRF in bp
as3 30. PD	n.d.	RENCA	6,8
as3 34. PD	n.d.	k1 30. PD	4,2
as3 38. PD	n.d.	k1 38. PD	4,3
as3 42. PD	n.d.	k1 45. PD	4,8
as3 50. PD	13,0	k1 52. PD	4,9
as3 55. PD	13,2	k2 30. PD	6,9
as3 60. PD	13,2	k2 45. PD	7,1

Es ist zu beobachten, dass die Stärke der Telomersignale in den antisense-mTR transfizierten Zellen weit schwächer ist als in den sense-mTR oder Kontrollzellen. Das bedeutet, dass vor und während der Krise der Proliferation kaum Telomersequenzen, trotz gleicher aufgetragener DNA-Menge, nachgewiesen werden konnten. Mit der Zunahme der Zellvermehrung ab ca. 35. PD werden die Telomersignale deutlich stärker, Telomerlängen werden wieder messbar und zeigen eine Länge ähnlich oder länger der in den RENCA-Zellen.

4.2.2 Einsatz einer dominant-negativen Mutante der katalytischen Untereinheit der Telomerase

Die Telomerase Reverse Transkriptase gehört zu der Familie der DNA-Polymerasen (Joyce & Steitz, 1994). Den DNA-Polymerasen gemeinsam sind sieben stark homologe Motive. Zusätzlich dazu besitzen die Telomerasen Reversen Transkriptasen von Säugern bis zu Hefen ein telomerase-spezifisches Motiv. Das katalytische Zentrum der Polymerasen befindet sich im Motiv A und C, bestehend aus drei Molekülen Asparaginsäure, die durch Bindung eines zweiwertigen Metallions eine katalytische Triade bilden. Diese katalytische Triade ermöglicht eine de-novo Synthese der DNA. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen im katalytischen Zentrum der Enzyme die Aktivität von DNA-Polymerasen aufheben können (Joyce and Steitz, 1994). Das Prinzip der Hemmung mittels einer mutierten Sequenz beruht auf der Überexpression des daraus translatierten, katalytisch inaktiven Proteins, welches als dominant-negative Mutante bezeichnet wird. Durch das Überangebot der inaktiven Form wird die Funktion des endogenen Moleküls unterdrückt.

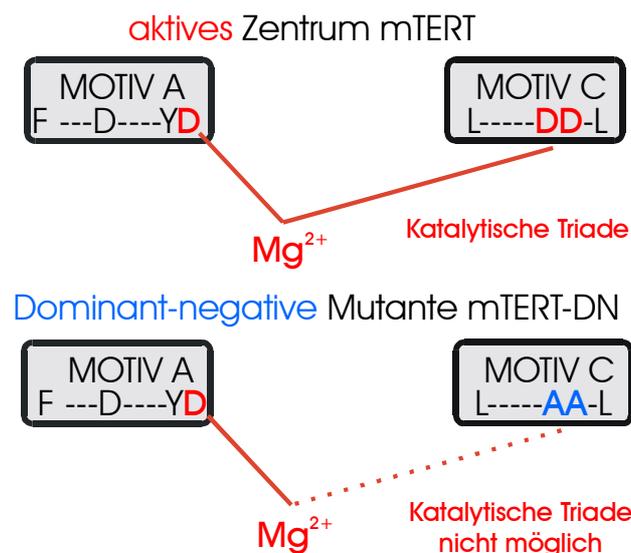


Abbildung 4-16 Schematische Darstellung der Mutation im katalytischen Zentrum der mTERT. Die drei Moleküle Asparaginsäure (D) in Motiv A und C bilden die katalytische Triade, die nach Einbringen der Mutation nicht mehr gebildet werden kann.

Durch die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Blasco am Nationalen Zentrum für Biotechnologie in Madrid/Spanien wurde die vollständig kodierende Sequenz der mTERT zur Verfügung gestellt. Die Arbeiten mit der dominant-negativen Mutante der mTERT wurden im Labor von Dr. Blasco durchgeführt.

Die katalytische Triade der mTERT wird durch drei konservierte Moleküle Asparaginsäure D⁷⁰² im Motiv A, D⁸⁶¹ und D⁸⁶² im Motiv C gebildet (Abbildung 4-16). Durch gerichtete Mutagenese erfolgte der Austausch der Aminosäuren D⁸⁶¹ und D⁸⁶² mit zwei Alaninresten

(Abkürzung A). Für den Austausch der zwei Aminosäuren war lediglich eine Mutierung zweier Nukleotide (C^{2510} , C^{2513} jeweils zu A) nötig. Die gerichtete Mutagenese ist in Abschnitt 3.2.5.2 unter Methoden beschrieben. Das mutierte Konstrukt wurde anschließend in einen retroviralen Expressionsvektor pBABE mit einer Puromycin-Resistenz kloniert und mit pDN, für dominant-negativ, bezeichnet.

Für diese Versuche wurde wiederum die murine Nierenkarzinomzelllinie RENCA verwendet, welche diesmal mit einem retroviralen Expressionssystem transduziert wurde. Die RENCA-Zellen wurden mit dem leeren Kontrollvektor pBABE und dem dominant-negativen Konstrukt pDN infiziert, nach zwei Tagen mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin selektiert und 14 Tage später konnten die ersten Zellklone isoliert werden. Die Zeitpunkte der Isolation der Zellklone lagen zwischen 15. und 20. PD (Populationsverdopplungszeit). Insgesamt konnten 41 pBABE transduzierte und 46 pDN transduzierte RENCA-Zellklone isoliert werden.

Nachdem genügend Zellen vorhanden waren, wurden Aliquots zur Bestimmung der Telomeraseaktivität und Telomerlänge abgenommen, sowie Proliferationstests durchgeführt.

4.2.2.1 Morphologie

In einigen pDN Klonen konnten morphologische Veränderungen beobachtet werden, die ähnlich denen in den antisense-mTR Experimenten (Abbildung 4-9) waren.

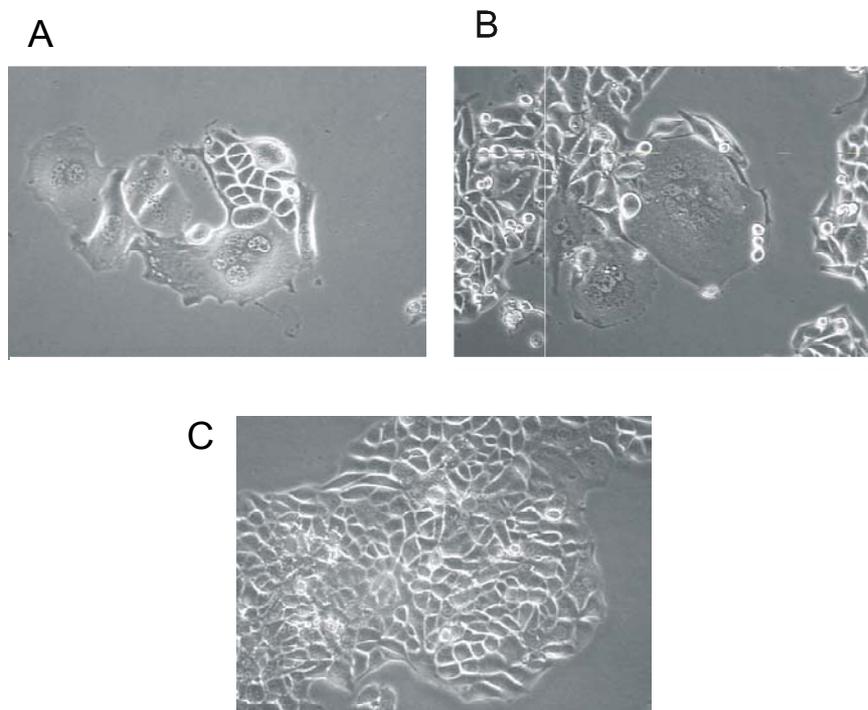


Abbildung 4-17 Beispiele für die Morphologie der transduzierten RENCA-Zellen in frühen PDs. (A) pDN2, 35. PD und (B) pDN7, 37. PD zeigen eine seneszenz-ähnliche Morphologie. Im Kontrollklon pBABE, 36. PD (C) sind keine Veränderungen, zur unveränderten RENCA-Zelllinie zu beobachten.

Innerhalb der Kulturen waren große, abgeflachte, multinukleare Zellen zu sehen, die in ihrer Zellteilung gehemmt waren und sich in einem ruhenden Zustand ähnlich dem der Seneszenz befanden. Abbildung 4-17 zeigt repräsentative Bilder zweier pDN transduzierter Zellklone, 2 und 7, sowie als Vergleich den Kontrollklon pBabe 4 zu ähnlichen Zeitpunkten. Der Kontrollklon zeigt eine den unveränderten RENCA-Zellen vergleichbare Morphologie, siehe dazu auch Abbildung 4-9 C.

4.2.2.2 Proliferation

Alle pBabe Kontrollklone zeigten nach der Selektion und während der Kultivierung ein gegenüber den untransfizierten RENCA-Zellen unverändertes Proliferationsverhalten. Von den 46 isolierten pDN Klonen konnten nur 31 Klone (67 %) weiter kultiviert werden. Das bedeutet einen frühzeitigen Verlust von 33 % der mit dem dominant-negativen Konstrukt transduzierten Zellen. Dies wurde durch die Proliferationsmessungen mittels Thymidineinbau bestätigt, welche in den ersten Passagen nach der Isolation Unterschiede zwischen den pDN und den pBabe transduzierten Zellklonen zeigten. Die pDN Klone besaßen eine ca. 30 % geringere Proliferation als die Kontrollklone (Abbildung 4-18), was auf einen vollständigen, irreversiblen Proliferationsarrest hindeutete.

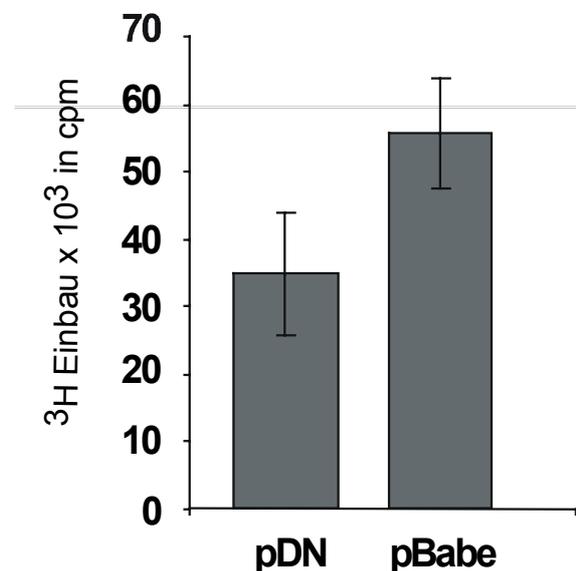


Abbildung 4-18 Bestimmung der Proliferation mittels Thymidineinbau in den pDN und den pBabe Klonen in der 16.-20. PD

4.2.2.3 Telomeraseaktivität

In den mit der dominant-negativen mTERT Mutante und den Vektorkontrollen transduzierten Zellklonen wurde in den ersten Passagen nach der Isolation der Zellklone (16. bis 22. PD) die Telomeraseaktivität, mit dem TRAP-Assay und anschließender Analyse der radioaktiv

markierten Produkte, gemessen. In späteren PDs wurde die Telomeraseaktivität ebenfalls mit dem Telomerase-PCR-ELISA bestimmt.

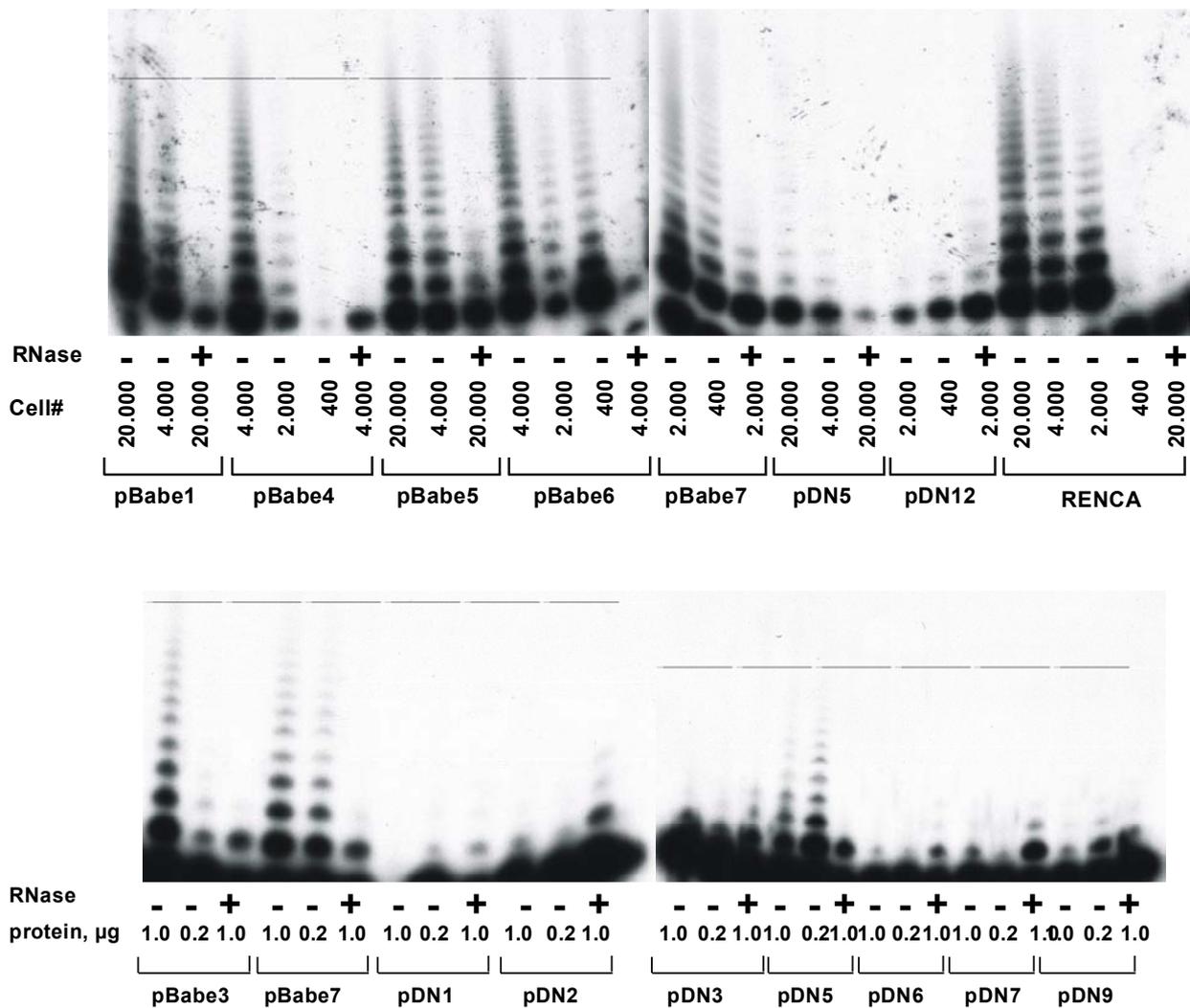


Abbildung 4-19 Telomeraseaktivität in 8 pDN und 6 pBABE Klonen in den ersten PDs nach der Isolation. Für die Bestimmungen wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen oder Anzahl von Zellen eingesetzt. Die Proteinlysate wurden mit (+) und ohne (-) vorherige RNase Behandlung im TRAP-Assay analysiert.

In allen pDN transduzierten Zellklonen war in den ersten PDs nach der Isolation Telomeraseaktivität nur sehr gering bis kaum nachweisbar (siehe Abbildung 4-19). Hier sind die Nachweise der Telomeraseaktivität in ausgewählten pDN und den pBABE Klonen, sowie unbehandelten RENCA-Zellen dargestellt. Die Telomeraseaktivität in den pBABE Kontrollen ist der, der unbehandelten RENCA-Zellen vergleichbar.

Zellklone mit einem hohen Anteil an morphologisch veränderten Zellen zeigten eine besonders geringe Telomeraseaktivität. Dies wird an den Zellklonen pDN 2 und pDN 7 deutlich (vergleiche mit der Abbildung 4-17).

Interessant waren auch die Untersuchungen der Telomeraseaktivität in den Zellklonen zu späteren Zeitpunkten. In Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21 sind Beispiele für die Entwicklung der Telomeraseaktivität über fortschreitende PDs dargestellt. Alle pDN Klone zeigten weiterhin eine verringerte Telomeraseaktivität. In den in Abbildung 4-20 dargestellten TRAP-Assays wird der Unterschied zwischen dem Klon pDN 2 und pBabe 4 deutlich. Die Telomeraseaktivität des pDN 2 ist anfangs annähernd null und nimmt bis zur PD 47 leicht zu. Der Zellklon pBabe 4 hingegen zeigt unveränderte Telomeraseaktivität in den PDs 26, 36 und 40.

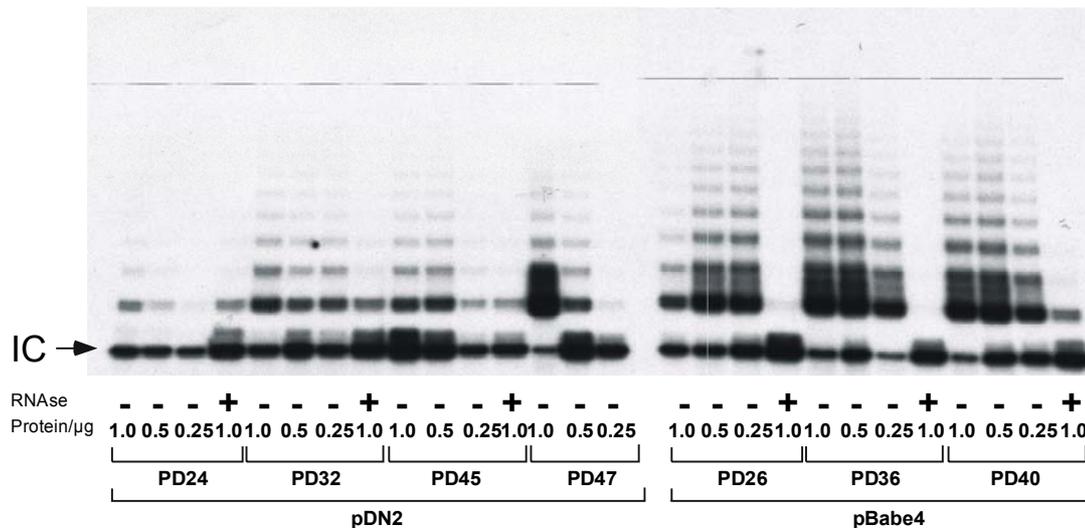


Abbildung 4-20 Telomeraseaktivität im pDN 2 und in pBabe 4 zu verschiedenen PDs. Es wurden drei unterschiedliche Proteinkonzentrationen und eine RNAse Kontrolle eingesetzt.

In Abbildung 4-21 ist die Telomeraseaktivität der Klone pDN 1 und pDN 5 bis zur PD 54 bzw. 60, gemessen mit dem Telomerase-PCR-ELISA, dargestellt. Der Klon pDN 1 besitzt in der PD 54 eine fast halb so hohe Telomeraseaktivität wie die unveränderte RENCA-Zelllinie. Auch die vom Tumor etablierten Zelllinien T1 und T2 des Klons pDN 1 zeigen eine stark verringerte Telomeraseaktivität (zur Generierung der Tumorzelllinien siehe unter Methoden 3.2.11). Ähnlich verhält es sich mit dem Klon pDN 5. Auch hier ist im pBabe 3 die Telomeraseaktivität von der PD 15 an stets höher als in der RENCA-Zelllinie nachzuweisen. Auch die Tumorzelllinie pBabe 4 T1 des Kontrollklons besitzt eine ähnlich hohe Telomeraseaktivität.

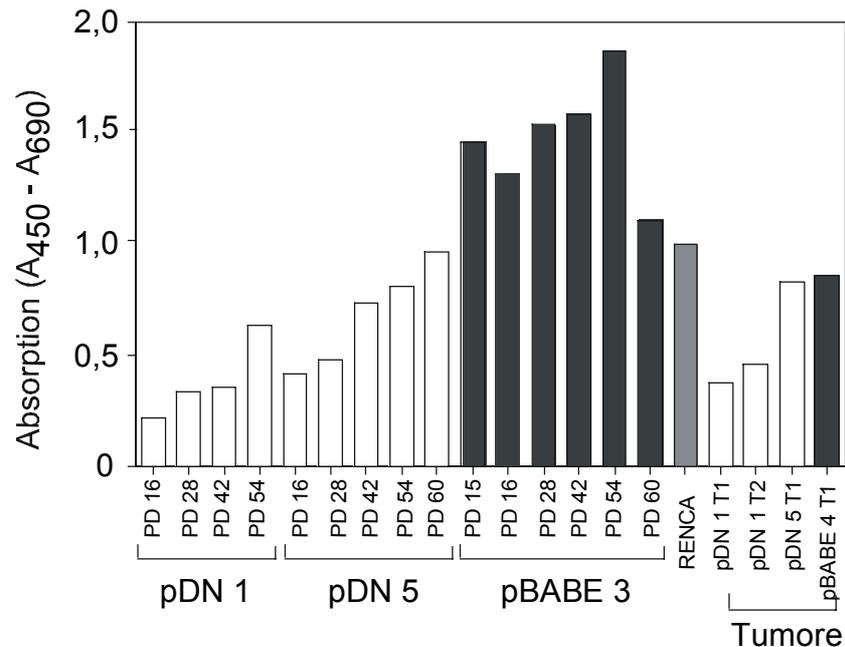


Abbildung 4-21 Telomeraseaktivität in den pDN Klonen 1, 5 und dem pBABE 3 zu verschiedenen PDs, sowie der RENCA Zelllinie und verschiedenen von den Tumoren etablierten Zelllinien gemessen mit dem Telomerase-PCR-ELISA. Es wurde jeweils 0,3 µg Protein eingesetzt.

Die Messungen der Telomeraseaktivität zeigen deutlich eine Wirkung des mutierten mTERT-Konstruktes auf die Telomeraseaktivität in den RENCA-Zellen. Nach einer anfänglichen fast vollständigen Hemmung der Telomeraseaktivität kommt es ähnlich wie bei den Experimenten mit dem antisense-mTR Konstrukt wieder zu einer Reaktivierung der Telomeraseaktivität. Die Reaktivierung der Telomeraseaktivität wurde in allen überlebenden pDN Zellklonen beobachtet.

4.2.2.4 Telomerlänge

Um den Effekt der Hemmung der Telomerase auf die Telomerlänge zu untersuchen, wurden Bestimmungen der Telomerlängen von Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Isolation durchgeführt. Für die Messung der Telomerlängen sind verschiedene Methoden verwendet worden. Einerseits wurde die mittlere Telomerlänge mittels der TRF-Analyse bestimmt (siehe unter Methoden 3.2.2.1) und andererseits die Flowzytometrieanalyse nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Flow-FISH) angewendet (siehe unter Methoden 3.2.2.2).

In Abbildung 4-22 sind die Analysen der Telomerlängen von den verschiedenen pDN Klonen, sowie der vom Klon pDN 7 etablierten Tumorzelllinie pDN 7-T1 dargestellt. Außerdem ist die Telomer-Analyse des pBABE 7 abgebildet, in welchem eine mittlere TRF von 7 kb, ähnlich der untransfizierten RENCA-Zellen (vergleiche auch Abbildung 4-14), über 27 PDs nachzuweisen ist. Die Telomerlängen der pDN Klone 7, 10, 23 sind mit steigender PD weiter verkürzt und nur leicht zunehmend. In pDN 12 und 27 dagegen ist eine deutliche Verkürzung der Telomere, mit zunehmender PD zu beobachten. Die Telomer-Analyse des pDN Klons 8 in

Abbildung 4-22 zeigt nur einen Schmier; dies ist in der Literatur als typisch für Zellen beschrieben, die ihre Telomere über den ALT-Mechanismus konstituieren.

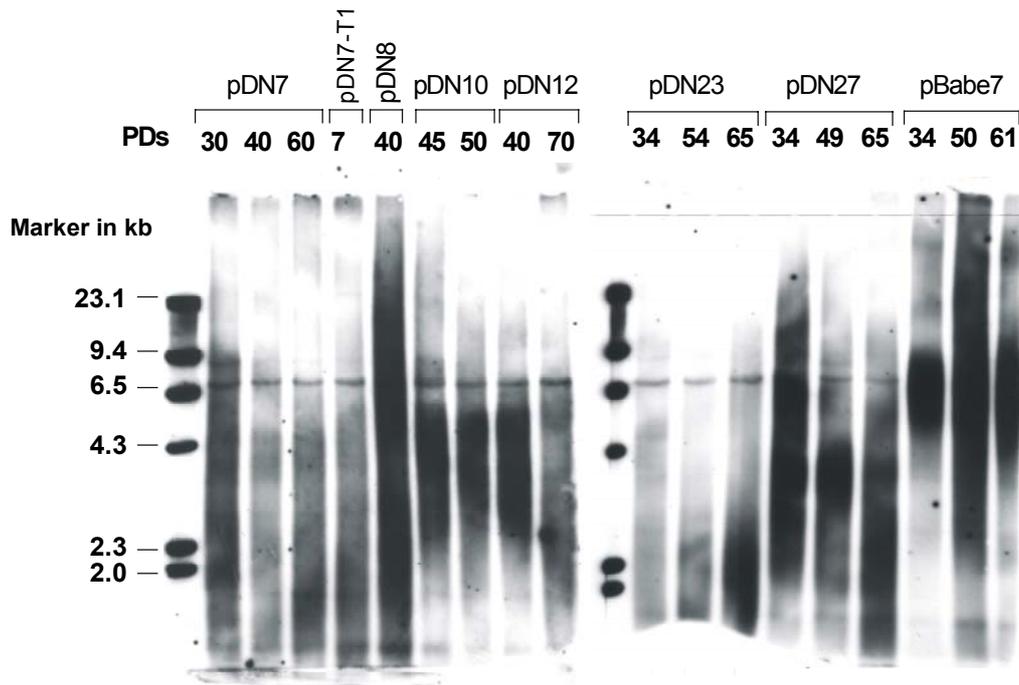


Abbildung 4-22 Bestimmung der Telomerlänge mittels der Southernblot-Methode in pDN Klonen 7, 8, 10, 12, 23 und 27 und dem pBABE Klon 7 zu verschiedenen PDs, sowie der vom pDN 7 Klon etablierten Tumorzelllinie pDN 7-T1.

Die Bestimmungen der mittleren TRF-Längen zeigten in den meisten der pDN Klone im Vergleich mit den pBABE-Kontrollen eine Verkürzung, was auf eine Wirkung des dominant-negativen Konstruktes nicht nur auf die Telomeraseaktivität, sondern auch auf die Telomerverkürzung schließen lässt. In den Kontrollklonen konnte eine mittlere TRF-Länge von 7 kb gemessen werden, wohingegen die mittleren TRF-Längen in unterschiedlichen pDN Klonen zwischen 2 und 4 kb variierten.

Gleiche Ergebnisse wurden auch in der Analyse der Telomere über die Fluoreszenz-in-situ Hybridisierungen (FISH) erhalten. Die Flow-FISH Methode ist vor allem zur quantitativen Bestimmung der Telomerlängen verwendet worden (siehe 3.2.2.2). In der Methode werden die TTAGGG Wiederholungen als Fluoreszenzintensitäten der Telomere in der Interphase nach Hybridisierung mit einer markierten PNA Telomersonde bestimmt. In Abbildung 4-23 sind die Ergebnisse der Flow-FISH Messung der pDN Klone 1, 2 und des pBABE Klons 3 zu unterschiedlichen PDs, sowie die der Kontroll-Zelllinie LY-S und der nichttransfizierten RENCA-Zellen dargestellt.

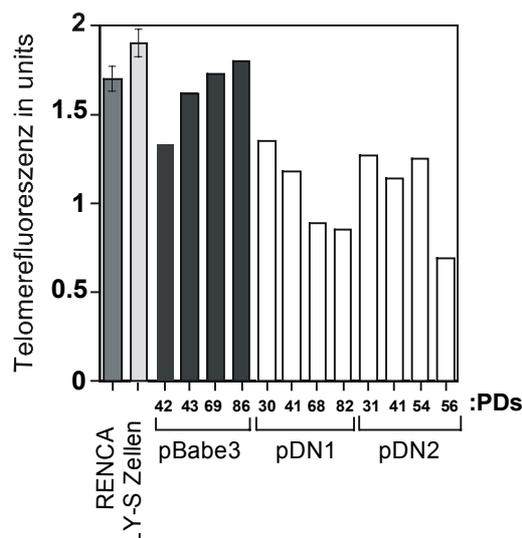


Abbildung 4-23 Bestimmung der Telomerlänge mit der Flow-FISH Methode von pDN Klon 1, 2 und des pBABE Klons 3 zu unterschiedlichen PDs, sowie der Kontroll-Zelllinie LY-S und der untransfizierten RENCA-Zellen. Die Ergebnisse sind in units Telomerfluoreszenzen dargestellt.

Die Kontroll-Zelllinie LY-S besitzt eine bekannte Telomerlänge von 9 kb und ist hier zur Standardisierung eingesetzt worden (siehe auch Abbildung 3-1). Die pDN Klone 1 und 2 zeigen eine deutliche Verkürzung der Telomere gegenüber der RENCA-Zelllinie. In der Tabelle 4-15 sind die berechneten Telomerlängen der Flow-FISH Messung zusammengestellt.

Tabelle 4-15 Zusammenfassung der Telomerlängenbestimmung mittels der Flow-FISH Methode

Zellen	Telomerfluoreszenz in units	Telomerlänge in kb
Ly-S	1,9	9,0
RENCA	1,65	7,8
pBABE 3 42. PD	1,34	6,2
pBABE 3 86. PD	1,85	8,5
pDN 1 30. PD	1,35	6,2
pDN 1 82. PD	0,84	3,9
pDN 2 31. PD	1,26	5,9
pDN 2 56. PD	0,69	3,2

Die Messungen begannen in der 30. PD. Hier zeigte sich für die pDN Klone im Vergleich zur unveränderten RENCA-Zelllinie schon eine Verkürzung um 1,6 bzw. 1,8 kb. Auch der pBABE 3 Klon besitzt um ca. 1,5 kb kürzere Telomere zu diesem Zeitpunkt. Die Länge der Telomere der pDN Klone nimmt jedoch weiterhin ab, wobei die Länge der pBABE Klone wieder zu nimmt und sich den unveränderten Zellen angleicht. In den pDN Klonen konnten Verkürzungen der Telomere bis auf 2 kb beobachtet werden.

Parallel durchgeführte Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen mit einer Telomersonde an Metaphasechromosomen (siehe unter Methoden 3.2.2.3) bestätigten die Verkürzung der

Telomere. Es konnte eine Abnahme der Telomerfluoreszenzen (siehe Abbildung 4-24) in den pDN Klonen mit zunehmender Passage (von 33. PD bis zu 86. PD), sowie im Vergleich zu den nichttransfizierten RENCA-Zellen und den pBABE Klonen beobachtet werden. In den Kontrollklonen konnte kein Unterschied in der Telomerfluoreszenz der 45. PD und 89. PD gemessen werden.

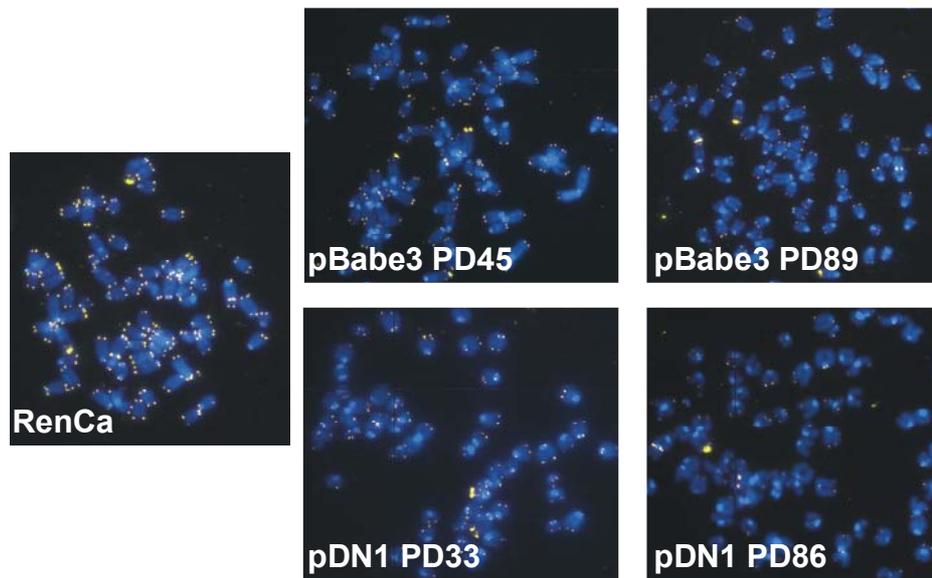


Abbildung 4-24 Metaphase-Hybridisierungen mit einer fluoreszenz-markierten Telomersonde (gelb) am pDN Klon 1 und dem pBABE 1 zu zwei verschiedenen PDs, sowie der RENCA-Zelllinie. Die Chromosomen sind mit DAPI (blau) gefärbt.

In den untersuchten Metaphasen ist deutlich sichtbar, dass die RENCA Zelllinie einen zumeist verdoppelten Chromosomensatz, manchmal auch dreifachen Chromosomensatz, besitzt. Zytogenetische Untersuchungen der pDN 1 und pBABE 3 Metaphasen ergaben keine Unterschiede in der Chromosomenstabilität (nicht dargestellt).

4.2.2.5 Quantitativer Nachweis der endogenen mTERT und der mTERT Mutante

Die Untersuchungen der Telomeraseaktivität in den späteren Passagen der dominant-negativ mTERT transduzierten Zellen deuten auf eine Reaktivierung der Telomerase ab der 32. PD hin (siehe Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21). Deshalb wurde eine Quantifizierung des mutierten mTERT Transkriptes mit dem LightCycler durchgeführt. Hierfür wurde die mutierte und endogene mTERT RNA mit einer RT-PCR unter Zugabe von SYBR Green und einer anschließenden Schmelzpunktanalyse nachgewiesen (siehe unter Methoden 3.2.4.2). Anschließend wurde der Flächeninhalt unter der Schmelzkurve bestimmt und die Flächeninhalts-Einheiten als Maß zur Quantifizierung verwendet.

Obwohl sich das mutierte mTERT Transkript vom Wildtyp-Transkript nur um 2 bp unterscheidet, konnte das dominant-negative Konstrukt der mTERT durch die Wahl

spezifischer Primer detektiert werden (Abbildung 4-25). Mit Hilfe der zwei Primerpaare, die direkt die Sequenz der mutierten Sequenz erfassten, konnte so zwischen mTERT Wildtyp und mTERT Mutante diskriminiert werden.

Mutante	Mt mTERT up	5'...TGC TGC ...3'	>>> ProteinA A...
Wildtyp	Wt mTERT up	5'...TGA TGA ...3'	>>> ProteinD D...

Abbildung 4-25 mTERT Mutante und mTERT Wildtyp detektierende Primern

Der reverse Primer mTERT low ist für beide Reaktionen gleich verwendet wurden. Das Mut-Primerpaar Mt mTERT up und mTERT low detektiert das mutierte Transkript. Das Primerpaar Wt mTERT up und mTERT low, hier bezeichnet als Wt-Primer detektiert nur das Wildtyp mTERT Transkript (siehe unter Material 3.1.3). Die Länge der beiden Produkte beträgt jeweils 260 bp.

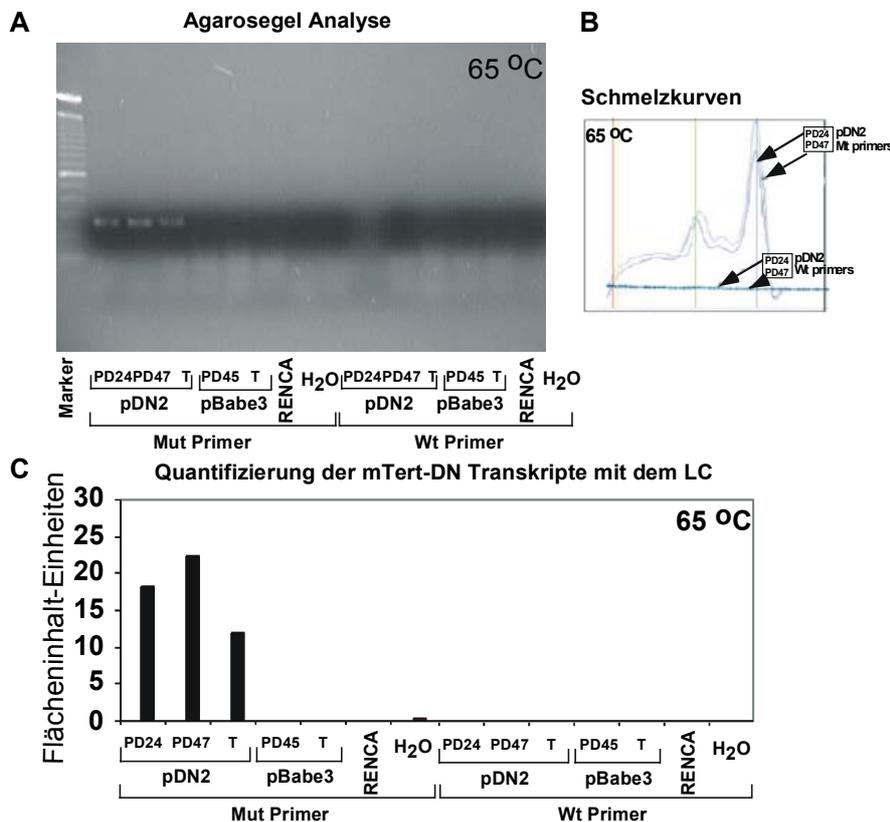


Abbildung 4-26 Detektion und Quantifizierung der endogenen mTERT- und mutierten mTERT mRNA per LightCycler RT-PCR. (A) Agarosegel Analyse nach LC RT-PCR mit Mutations-(Mut) spezifischen und mit Wildtyp-(Wt)- Primern in pDN und pBABA-Klonen bei 65°C. (B) Darstellung der Schmelzkurvenanalyse nach der SYBR Green Analyse auf dem LightCycler. (C) Quantitative Darstellung der Schmelzkurvenanalyse der LC RT-PCR. Hierfür wurden die Flächeninhalte unter der Schmelzkurve berechnet und als Flächeninhalt-Einheiten dargestellt.

Abbildung 4-26 zeigt die Spezifität der Mut- und Wt-Primer in den pDN transduzierten, pBABA Kontrollklonen und der RENCA-Zelllinie bei einer Annealing-Temperatur von 65°C. Mit

den Mut-Primern wird im pDN 2 in der PD 24 und 47, sowie in der etablierten Tumorzelllinie ein Produkt generiert, dass durch die Schmelzkurve, die Quantifizierung und im Agarosegel detektierbar ist. In Abbildung 4-26 C ist die quantitative Analyse der Fläche unter der Schmelzkurve dargestellt. In dem pBABE 3 Klon und in den unbehandelten RENCA-Zellen wird kein Produkt mit den Mut-Primern erhalten, das bedeutet, dass die Reaktion spezifisch für das mutierte mTERT Transkript ist. Abbildung 4-28 zeigt nochmals, dass es bei einer Annealing-Temperatur von 65°C nicht zu einer Reaktion der beiden Wt-Primer kommt. Während es bei der spezifischen Annealing-Temperatur des Wt-Primerpaars von 58°C noch zu einer Produktbildung in den unbehandelten RENCA-Zellen und den Kontrollklonen kommt, ist bei 65°C Annealingtemperatur keine endogene mTERT mehr nachweisbar. Das mutierte Konstrukt ist jedoch noch bei einer Annealingtemperatur von 65°C in den pDN-Klonen amplifizierbar. Das bedeutet, dass ein Nachweis der Wildtyp mTERT mRNA nur bis zu einer Temperatur von 58°C möglich ist und das mutierte Transkript spezifisch bei 65°C detektiert werden kann.

Das mutierte mTERT Konstrukt war über die gesamte Zeit der Kultivierung des pDN Klons 2 bis zur 57. PD nachweisbar (Abbildung 4-26). Sogar während des in-vivo Tumorversuches und der anschließenden Kultivierung wurde die dominant-negative Mutante der mTERT weiterhin exprimiert. Dies deutet daraufhin, dass das mutierte Konstrukt stabil eingebaut wurde und über den gesamten Kultivierungszeitraum parallel zur Wildtyp mTERT transkribiert wurde.

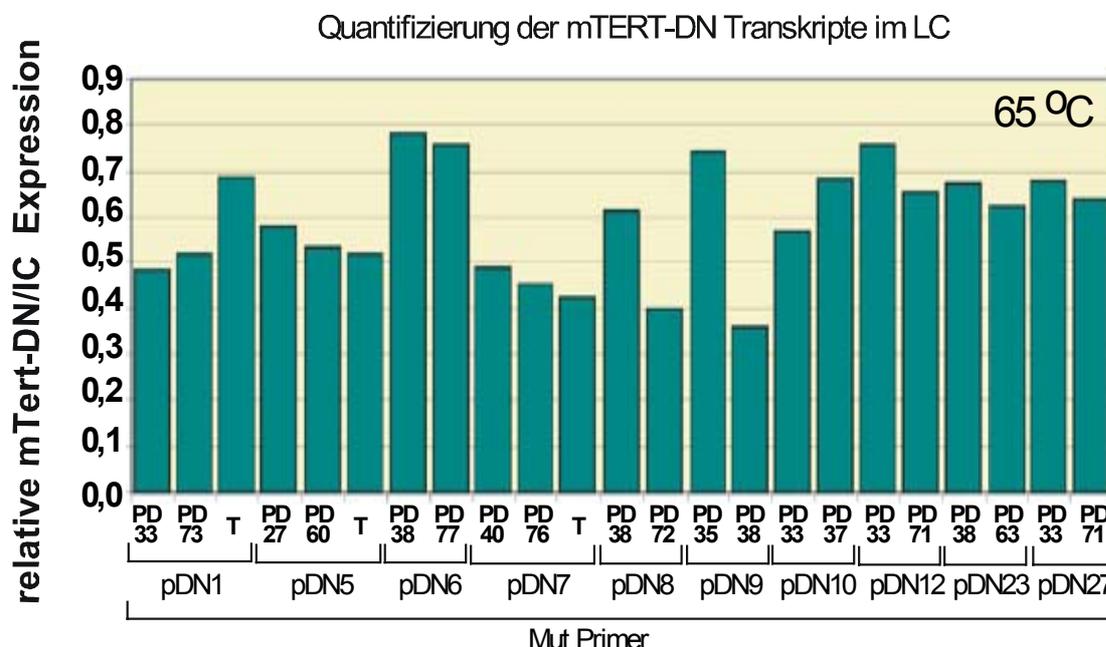


Abbildung 4-27 Quantifizierung der relativen mTERT-DN mRNA Expression zu unterschiedlichen PDs in pDN Zellklonen und den daraus etablierten Tumorzelllinien (T). In allen Reaktionen wurden die Mut-Primer bei 65°C in der LC RT-PCR eingesetzt und mit der Expression von beta-Aktin normalisiert.

In Abbildung 4-27 ist die Untersuchung zur mTERT-DN Expression zusammenfassend für 10 weitere Zellklone dargestellt. In allen Klonen konnte die mTERT-DN mRNA zu früheren und späteren Passagen nachgewiesen werden. Auch in, von den Tumoren etablierten, Zelllinien war das mTERT-DN Transkript in ähnlich hoher Expression nachweisbar. Die Expression des mTERT-DN Transkriptes ist in Abbildung 4-27 mit der Expression des „House-keeping“ Gens beta-Aktin normalisiert worden.

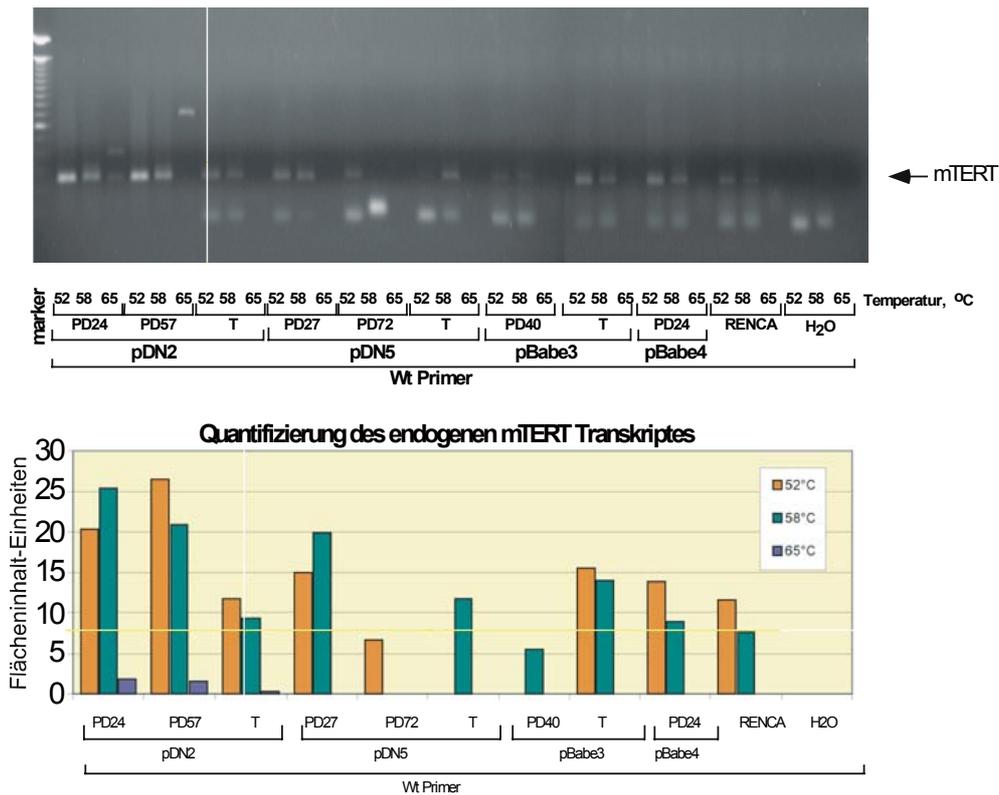


Abbildung 4-28 Quantifizierung der endogenen mTERT Expression mRNA zu unterschiedlichen PDs in zwei pDN, zwei pBABE Klonen und untransfizierten RENCA-Zellen. Die LC RT-PCR wurde mit den Wt-Primern bei drei verschiedenen Temperaturen (52°C, 58°C und 65°C) durchgeführt, quantifiziert über die Schmelzkurven und anschließend auf einem Agarosegel aufgetragen.

Die Auswertung der Quantifizierung der Wildtyp mTERT mRNA in den pDN Klonen, den pBABE Kontrollklonen, sowie den RENCA-Zellen ergab eine stark variierende Expression der Wildtyp mTERT. Dies wird in Abbildung 4-28 deutlich.

Die pBABE Klone 3, 4, die Tumorzelllinie von pBABE 3, sowie die RENCA-Zelllinie zeigen eine ähnlich hohe Expression der mTERT von ca. 10 bis 15 Flächeninhalt-Einheiten. In den pDN Klonen 2 und 5 dagegen wurde eine höhere Expression der Wildtyp mTERT gemessen. Hier liegen die Expressionshöhen zwischen 10 und 25 Flächeninhalt-Einheiten. Dies stellt eine fast verdoppelte Expression der mTERT nach Transfektion des mutierten mTERT-Konstruktes dar.

Um diese erhöhte Expression des Wildtyp mTERT Transkriptes zu bestätigen, wurde eine zweite unabhängige RT-PCR mit einem Primerpaar, das 1500 bp oberhalb der Mutation lokalisiert ist, zum Nachweis genutzt. Diese Sequenz steht in keiner Verbindung zur katalytischen Domäne der mTERT. Das Primerpaar mTERT endo up und mTERT endo down (siehe unter Material 3.1.3) wurde als endo mTERT bezeichnet und ergibt ein Produkt von 364 bp. Die Analyse der mTERT Expression mit dem endo mTERT Primern ist in Abbildung 4-29 abgebildet. Es wurden 10 pDN-, 3 pDN-Tumor-, 5 pBABE-Kontroll- und 3 pBABE-Tumorklonen, sowie die RENCA-Zelllinie untersucht. Mittels dieser zweiten RT-PCR konnte in 9 von 10 pDN-Klonen, sowie 1 von 3 pDN-Tumorzelllinien eine bis zu 2fach erhöhte Expression der mTERT mRNA bestimmt werden. Die pBABE-Klone, die pBABE-Tumorklone und die RENCA-Zellen zeigten mit diesen Primern kein Ergebnis. Es ist zu vermuten, dass in den unbehandelten Zellen die Primer nicht so spezifisch die gering exprimierte mTERT mRNA amplifizieren.

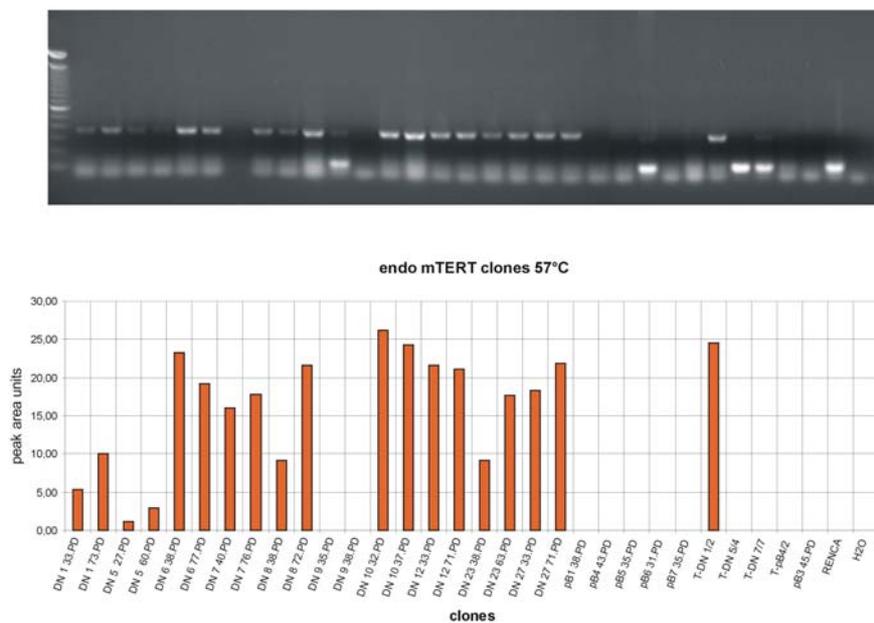


Abbildung 4-29 Quantitative Bestimmung der mTERT Expression per LC RT-PCR mit dem endo mTERT Primerpaar in 10 pDN, 3 pDN Tumor-, 5 pBABE Kontroll- und 3 pBABE Tumorklonen, sowie in unbehandelten RENCA-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass es durch die Überexpression des dominant-negativen mTERT-Konstruktes zu einer Erhöhung der Expression der Wildtyp-mTERT mRNA gekommen ist.

4.2.2.6 In vivo Untersuchungen

Für die Untersuchung des Effektes der Telomeraseinhibierung in den RENCA-Zellen wurden in-vivo Versuche zur Tumorinduktion an immundefizienten Mäusen durchgeführt (siehe unter

Methoden 3.2.10). Zellen von vier pDN und drei pBabe Zellklonen wurden unmittelbar nach der Isolation der Klone verwendet. Je 10^5 -Zellen wurden jeweils an zwei Stellen in die hinteren Oberschenkel subkutan injiziert. Das Tumorstadium wurde innerhalb von 32 Tagen verfolgt und ab Entstehung der Tumoren wurde ca. alle zwei bis drei Tage die Tumorgroße bestimmt. Die Größen der Tumoren je Tier wurde gemittelt und diese sind in Abbildung 4-30 dargestellt.

Im Tumorstadium der pDN transduzierten und der Kontrollzellen konnte kein Unterschied festgestellt werden. Ein Tier, welches den Tumor der Kontrollzellen pBabe 1 trug, verstarb, wahrscheinlich an der Tumormasse, vor Ende des Experimentes.

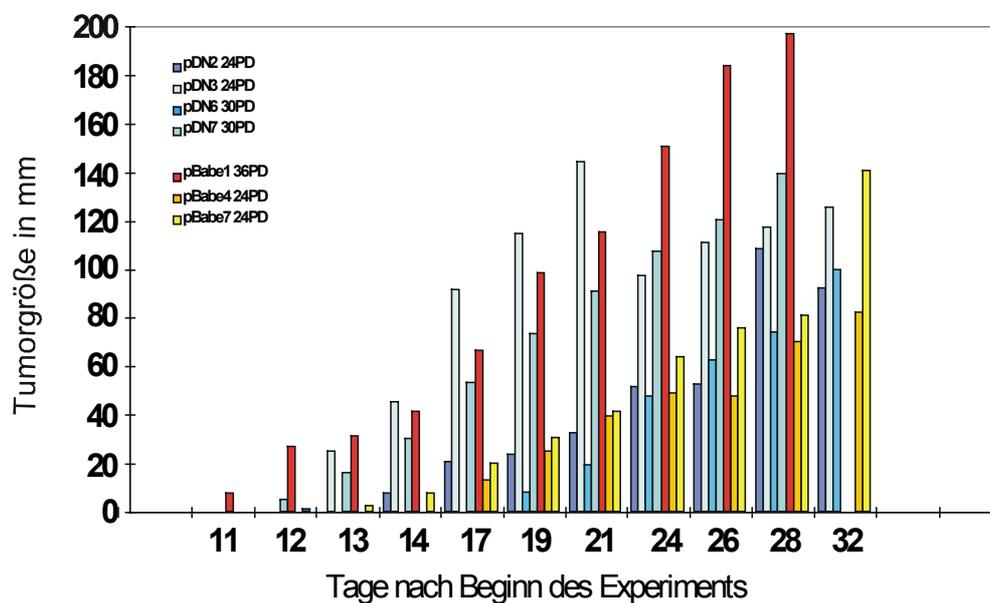


Abbildung 4-30 Messungen der Tumorentwicklung in immundefizienten Mäusen nach Inokulation mit 4 pDN und 3 pBabe transduzierten RENCA-Zelllinien. Das Tumorstadium wurde über den Zeitraum von 32 Tagen beobachtet.

4.2.3 Phosphorthioat-modifizierte Oligonukleotide zur Inhibition der Telomerase

Modifizierte synthetische Oligonukleotide besitzen den Vorteil einer hohen Stabilität und Resistenz gegen Degradation in der Zelle. Chimäre Oligonukleotide verbinden die Eigenschaften verschiedener Modifikationen in einem Molekül. Die verwendeten Modifizierungen sind in Abbildung 4-32 dargestellt. Einige Oligonukleotide wurden spezifisch für die Matrizensequenz der Telomerase-RNA konstruiert (Abbildung 4-31), andere stellen Kontrollen dar.

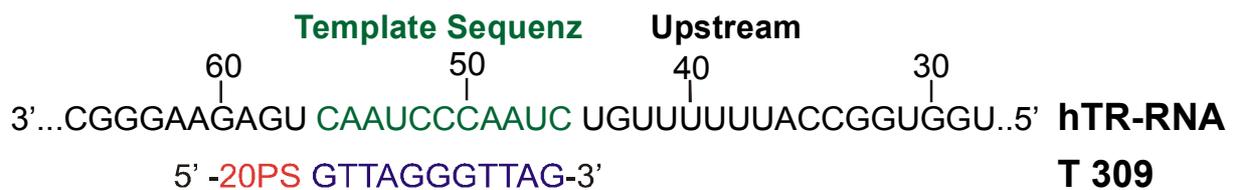


Abbildung 4-31 Sequenz der humanen Telomerase-RNA und Bindung des Oligonukleotids T 309

Es wurden entweder 11 Nukleotide der antisense Sequenz verwendet, hier mit T11 bezeichnet (T321, T 309, T319) oder eine verkürzte Sequenz von nur 5 Nukleotiden (T5), wie im Molekül T 250 (Tabelle 3-3). Das Oligonukleotid T 252 besitzt zur Kontrolle eine Nonsensesequenz mit 11 Nukleotiden. Jedes Oligonukleotid beginnt am 5' Ende mit einer unspezifischen Phosphorthioatsequenz aus 20 bzw. 18 Nukleotiden. Phosphorthioate binden gut an Proteine, deshalb sollen diese Sequenzen die Oligonukleotide an die Primerbindungsstelle der katalytischen Untereinheit vermitteln. Durch die gleichzeitige Bindung an die Telomerase-Matrize und die sogenannte Primerbindungsstelle oder Ankerstelle am katalytischen Protein soll die Spezifität und Effizienz des Oligonukleotids erhöht werden. Manche der Oligonukleotide sind nochmals durch Phosphoramidatstrukturen oder Methylierungen stabilisiert worden. Auch die terminalen Aminogruppen sollen die Moleküle vor Degradation schützen (Abbildung 4-32).

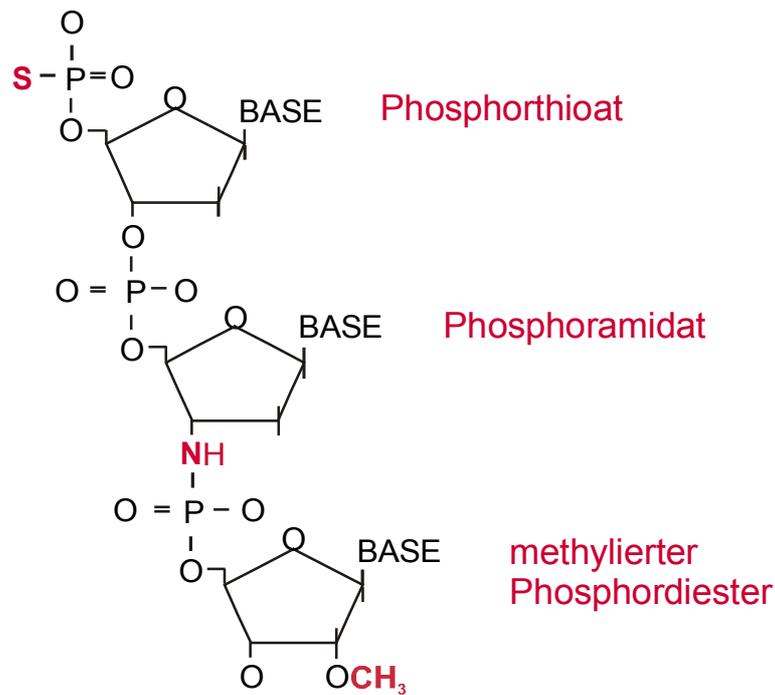


Abbildung 4-32 Chemische Strukturen der Grundbausteine für die modifizierten Oligonukleotide zur Hemmung der Telomerase

Die Oligonukleotide wurden zuerst an den humanen Nierenkarzinomzelllinien getestet. Die Bestimmung der Telomeraseaktivität in den Nierenkarzinomzelllinien ist in Abschnitt 4.1.1 beschrieben worden. Die Nierenkarzinomzelllinien zeigten ein sehr unterschiedliches Bild in der Expression der Telomerasekomponenten und Telomeraseaktivität. Dies äußert sich auch bei der Wirkung der Telomeraseinhibitoren, deren Wirkung auf die Telomeraseaktivität der Zelllinien in den 4 Konzentrationen (10 nM, 50 nM, 100 nM und 500 nM) getestet wurde und deren Ergebnisse in der Tabelle 4-16 zusammengestellt sind.

Tabelle 4-16 Wirksame Konzentrationen der synthetischen Oligonukleotide auf die Telomeraseaktivität in humanen Nierenkarzinomzelllinien

Es wurden 10 nM, 50 nM, 100 nM und 500 nM Oligonukleotid in einem Assay je Zelllinie verwendet. In der Tabelle ist die Konzentration, für die eine Hemmung der Telomerase nachgewiesen werden konnte, eingetragen. Der Kontroll-Oligo T 252 zeigte bei den Zelllinien SN 12L1, Caki-1 und Caki-2 in allen Konzentrationen keine Wirkung auf deren Telomeraseaktivität.

	T 252	T 321	T 250	T 116	T 166	T 319	T 309
ACHN	500 nM	100 nM	50 nM	500 nM	10 nM	50 nM	10 nM
A 498	100 nM	50 nM	10 nM	50 nM	10 nM	10 nM	10 nM
A 704	50 nM	10 nM	10 nM	10 nM	10 nM	10 nM	10 nM
SN 12L1	-	100 nM	10 nM	500 nM	10 nM	10 nM	10 nM
Caki-1	-	500 nM	50 nM	500 nM	50 nM	10 nM	50 nM
Caki-2	-	500 nM	50 nM	100 nM	10 nM	10 nM	10 nM

Eindeutig ist zu beobachten, dass das Kontroll-Oligonukleotid T 252 mit seinen Nonsense-Phosphoramidatmodifizierungen in den Zelllinien SN12L1, Caki-1 und Caki-2 nicht bzw. in ACHN nur in sehr hoher Konzentration auf die Telomeraseaktivität wirkt.

Hingegen zeigt das telomerase-spezifische Molekül T 321 mit 11 spezifischen Nukleotiden eine hemmende Wirkung in allen Zelllinien. In den Zelllinien SN12L1 und ACHN wird hier die Telomeraseaktivität ab einer Konzentration von 100 nM vollständig gehemmt. Für A 498 und A 704 liegt die hemmende Wirkung schon bei einer Konzentration von 50 bzw. 10 nM. Sehr gering ist die Hemmung der Telomeraseaktivität mit T 321 in Caki-1 und Caki-2.

Das Oligonukleotid T 250 besitzt im Gegensatz zu T 321 nur eine spezifische Sequenz mit 5 Nukleotiden und ist ebenfalls mit Phosphoramidaten modifiziert. Hiermit wird noch mal eine verstärkte Wirkung auf die Telomeraseaktivität sichtbar. T 250 hemmt in allen Zelllinien ab einer Konzentration von 10 bzw. 50 nM.

Das Oligonukleotid T 116 stellt die Kontrolle zum T 166 dar. T166 besitzt eine für die Telomerase-RNA spezifische methylierte Sequenz von 5 Nukleotiden. Eindeutig ist hier eine vollständig hemmende Wirkung schon in einer Konzentration von 10 nM, in allen Zelllinien außer in Caki-1, zu beobachten. Die sequenzspezifische Wirkung des Oligonukleotids ist sehr deutlich in den Zelllinien ACHN, SN12L1 und Caki-1 zu sehen, da in diesen Zelllinien der Kontrolloligonukleotid T116 erst bei 500 nM eine Hemmung der Telomeraseaktivität zeigt.

Die Oligonukleotide T 309 und T 319 bestehen beide aus der spezifischen Telomerase-Sequenz mit 11 Nukleotiden, welche in T 319 vollständig methyliert sind. T 309 unterscheidet sich durch eine zusätzliche Phosphorthioatmodifizierung an 3 der 11 Nukleotide (TTA). Das Oligonukleotid wird zusätzlich stabilisiert und bindet eventuell auch an andere Telomeraseproteine. Beide Oligonukleotide zeigen eine starke Wirkung in allen Zelllinien. T 319 hemmt die Telomeraseaktivität vollständig ab einer Konzentration von 10 nM in A 498, A 704, SN12L1 und Caki-2; Caki-1 zeigte nach Zugabe von 10 nM T 319 und ACHN nach Zugabe von 50 nM eine verringerte Telomeraseaktivität.

Nach Zugabe von 10 nM T 309 konnte keine Telomeraseaktivität in A 498 und A 704 gemessen werden. Die anderen Zelllinien zeigten ebenso eine stark verringerte Telomeraseaktivität nach Zugabe von 10 nM bzw. 50 nM T 309. Eine Verstärkung der Wirkung durch die zusätzliche Modifizierung von T 309 kann nicht beobachtet werden.

Die Zelllinie A 704 reagierte generell sehr stark auf die Zugabe der Oligonukleotide. Nach Zugabe von allen Oligonukleotiden wurde eine verringerte Telomeraseaktivität; unter T 166, T 319 und T 309 sogar eine vollständige Hemmung der Telomeraseaktivität, gemessen.

Aufgrund der nicht sehr deutlichen Unterschiede zwischen Kontroll- und spezifischen Oligonukleotiden ist hier, von einer starken unspezifischen Wirkung auszugehen.

Nach den Untersuchungen an den humanen Nierenkarzinomzelllinien wurde das besonders wirksame Oligonukleotid T 166, mit der methylierten Sequenz der Telomerase-RNA, an weiteren Zelllinien ausgetestet. In den Zelllinien HL-60 (Lymphom), Hep G2 (Leberkarzinom), MCF-7 (Mammakarzinom), J558 (murines Lymphom), RT4 (Blasenkarzinom), HT1376 (Blasenkarzinom), sowie der murinen Nierenkarzinomzelllinie RENCA wurde ebenfalls mit dem Oligonukleotid T166 ab einer Konzentration von 10 nM eine vollständige Hemmung der Telomeraseaktivität erreicht. Nur in der Nierenkarzinomzelllinie Caki-1 konnte erst bei einer Konzentration von 50 nM eine Hemmung der Telomerase gemessen werden.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig eine messbare Wirkung der modifizierten Oligonukleotiden auf die Telomeraseaktivität in den Proteinlysaten von Tumorzelllinien. Besonders auffällig hierbei sind die unterschiedlichen wirksamen Konzentrationen der verschiedenen Zelllinien.