

5 Diskussion

5.1 Telomerase als diagnostischer Marker

5.1.1 Diagnostik der Telomerase in Normal- und Tumorgeweben

Das Ribonukleoprotein Telomerase wird seit mehreren Jahren als eine wichtige Komponente bei der Tumorenstehung diskutiert. Aufgrund ihrer Bedeutung für die Immortalisierung von Tumorzellen wurden deshalb zahlreiche diagnostische Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, die Expression der Telomerase zu bestimmen. Die meisten bekannten malignen Tumoren des Menschen sind seit Mitte der 90er Jahre auf ihre Telomeraseaktivität hin untersucht wurden (Shay & Bacchetti, 1997).

Erstmals konnte 1994 die Aktivität des Enzyms Telomerase in einem menschlichen Tumor (Ovarialkarzinom) nachgewiesen werden (Counter *et al.*, 1994). Mit der Entwicklung der sensitiven, PCR-basierenden Methode zum Nachweis der Telomeraseaktivität, welche als TRAP- (Telomeric repeat amplification protocol) Assay bezeichnet wird, untersuchten Kim *et al.* eine Anzahl von humanen Geweben und Zelllinien (Kim *et al.*, 1994). Telomeraseaktivität wird in ca. 85 % aller malignen Tumoren beobachtet, in der Regel jedoch nicht in benignen Geweben und Zellen (Shay & Wright, 1996; Kim & Wu, 1997; Shay & Bacchetti, 1997). Eine Ausnahme bilden germinative Gewebe, wie Hoden und Ovar (Tanaka *et al.*, 1998b), die über die gesamte Lebensdauer des Organismus eine zelluläre Unsterblichkeit besitzen müssen. Aber auch in stark proliferierenden Zellen, wie hämatopoetischen Stammzellen und aktivierten Lymphozyten findet sich Telomeraseaktivität (Counter *et al.*, 1995). Durch verbesserte Nachweistechiken konnte auch geringfügig Telomeraseaktivität u.a. in Darmepithelien (Yasumoto *et al.*, 1996), in Basalzellen der Epidermis (Harle & Boukamp, 1996), in Lebergeweben (Tahara *et al.*, 1995) und während der Proliferationsphase im Endometrium (Tanaka *et al.*, 1998b) detektiert werden. Diese Gewebe sind ebenfalls stark von Zellen geprägt, die zur Erneuerung eine hohe Zellteilungsrate besitzen. Für Lymphozyten und uroepitheliale Zellen konnte gezeigt werden, dass durch Wachstumsstimulation in den telomerase-negativen Zellen die Telomeraseaktivität angeschaltet werden kann (Belair *et al.*, 1997).

Die Untersuchungen zur Detektion der Telomerase-RNA ergeben ein sehr uneinheitliches Bild. Von vielen Autoren wird der ubiquitäre Nachweis der hTR in einem Grossteil der Normal- und Tumorgewebe beschrieben. In einigen Geweben zeigt sich jedoch auch ein Anstieg der hTR-Expression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe (Feng *et al.*, 1995; Avilion *et al.*, 1996). Im normalen Bauchspeicheldrüsengewebe wurde mittels „Real-Time“ RT-PCR 50 % hTR gemessen, wohingegen die Tumorgewebe zu 90 % hTR-Expression

aufwiesen (Buchler *et al.*, 2001). Mittels in-situ Hybridisierung zeigten Park *et al.* eine Abhängigkeit von der Malignität; benigne Ovarialtumore wiesen eine geringe oder auch keine hTR-Expression auf, wohingegen in Grenzflächentumoren oder Ovarialkarzinomen eine durchschnittlich höhere hTR-Expression nachgewiesen werden konnte (Park *et al.*, 1999). Einige Autoren beschreiben auch eine prognostische Abhängigkeit der hTR vom Tumorstadium (Maitra *et al.*, 1999). Andere Autoren, wie z.B. Rohde *et al.* fanden dagegen nach hTR in-situ Hybridisierung im Nierengewebe eine höhere Expression in Normal- gegenüber Tumorgewebe (Rohde *et al.*, 2000). Eine Korrelation der hTR-Expression zur Telomeraseaktivität oder zum Tumorstadium in unterschiedlichen Tumorgewebe konnte von vielen Autoren nachgewiesen werden (Ito *et al.*, 1998a; Kyo *et al.*, 1999a; Wisman *et al.*, 2001).

Der Nachweis der katalytischen Untereinheit hTERT geht in den meisten Normalgeweben einher mit dem Auftreten von Telomeraseaktivität. Viele Autoren beschreiben eine Korrelation der beiden Parameter in Tumorgewebe (Meyerson *et al.*, 1997; Ramakrishnan *et al.*, 1998; Stanta *et al.*, 1999). In-situ Hybridisierungen der hTERT Expression zeigten aber auch eine Expression in einer Anzahl von Normalzellen und -gewebe mit hoher, proliferativer Kapazität, wie in unterschiedlichen Typen von Epithelzellen, hämatopoetischen Vorläuferzellen und Spermatogonien (Kolquist *et al.*, 1998). Quantitative RT-PCR Untersuchungen in Lebertumoren ergaben 83 % hTERT Expression in Tumorgewebe und 20 % in benignen Gewebe, sowie keine nachweisbare Expression in Normallebergewebe (Hisatomi *et al.*, 1999). Vergleichbare Ergebnisse wurden für den Nachweis der Telomeraseaktivität veröffentlicht. Untersuchungen mit einer quantitativen „Real-Time“ RT-PCR wurden auch in benignen und malignen Bauchspeicheldrüsengewebe veröffentlicht. Die Autoren beschrieben diese Methode als sensitiv zur Differenzierung von Bauchspeicheldrüsentumorgewebe von Normalgewebe und Pankreatitisgewebe (Buchler *et al.*, 2001).

5.1.2 Telomerase im Nierenzellkarzinom

Nierenzellkarzinome stellen eine sehr heterogene Tumorentität mit zum Teil unterschiedlichem Wachstumsverhalten und unterschiedlicher Prognose dar (Vogelzang & Stadler, 1998; Kovacs, 1999; Godley & Ataga, 2000). Diese Heterogenität wird deutlich in unterschiedlichen, genomischen Alterationen, wie 3p Verlusten, oder unterschiedlicher histologischer Subklassifizierung (Thoenes *et al.*, 1986; Pomer *et al.*, 1998). Auch die Veröffentlichungen zur Telomeraseaktivität beim Nierenkarzinom spiegeln dieses wider.

Mehrere Gruppen haben bisher ihre Ergebnisse zur Bestimmung der Telomeraseaktivität im Nierenzellkarzinom publiziert (Mehle *et al.*, 1996; Paradis *et al.*, 2001; Kinoshita *et al.*, 1998;

Rohde *et al.*, 1998; Dahse *et al.*, 1999; Fujioka *et al.*, 2000). Der Anteil telomerase-positiver Nierenzellkarzinome wurde von diesen Autoren zwischen 58 und 74 % bestimmt. Im Kontrast dazu berichten Fiedler *et al.* und Kanaya *et al.* von einer nachweisbaren Telomeraseaktivität bei 93 % bzw. 82 % der untersuchten Nierenzellkarzinome (Fiedler *et al.*, 1996; Kanaya *et al.*, 1998). Einzig Rohde *et al.* beschrieben Telomeraseaktivität in 17 % der normalen korrespondierenden Nierengewebe, alle anderen Veröffentlichungen fanden keine Telomeraseaktivität in den Nierennormalgeweben (Rohde *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Serien von Nierengeweben zur Bestimmung der Telomeraseaktivität aufgearbeitet (siehe unter 4.1.2.1). In der ersten Serie wurden 48 maligne Nierentumoren und Nierennormalgewebe, sowie 4 benigne Tumoren untersucht. Telomeraseaktivität wurde hier in 25 der 40 (63 %) Nierenzellkarzinome gemessen. In keinem Fall fand sich Telomeraseaktivität in normalen Nierengeweben. Zudem konnte in allen 4 untersuchten Urothelkarzinomen, die eine gänzlich andere Tumorentität als Nierenzellkarzinome darstellen, Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden 1999 veröffentlicht (Müller *et al.*, 1999).

Um insbesondere eine Korrelation zwischen Telomeraseaktivität und Expression der Telomeraseuntereinheiten aufzuweisen, wurde eine zweiten Serie von 35 klarzelligen Nierenkarzinomen zusätzlich untersucht. Hierbei konnte Telomeraseaktivität mit Hilfe des TRAP-Assays in 16 von 35 (46 %) Klarzelltumoren und in keinem Normalgewebe gemessen werden. Die Untersuchung mittels des Telomerase-PCR-ELISAs ergab 15 von 26 (58 %) telomerase-positiv Klarzelltumoren. Diese Werte decken sich mit Ergebnissen der anderen Autoren, die Telomeraseaktivitäten im unteren Bereich der Häufigkeit nachwiesen. Aufgrund der sofortigen Aufarbeitung von frischen Gewebeproben, der histologischen Kontrolle der untersuchten Areale, der Untersuchung von unterschiedlichen Tumorarealen sowie der Verwendung eines internen Standards konnten (falsch-)negative Ergebnisse bedingt durch Degradation des Enzyms oder Inhibitoren auf ein Minimum reduziert werden.

In allen sechs untersuchten immortalen humanen Nierenkarzinomzelllinien wurde Telomeraseaktivität nachgewiesen (siehe unter 4.1.1). Eine Semi-Quantifizierung zeigte Unterschiede in der Stärke der Telomeraseaktivität. Die Zelllinie Caki-1, welche aus einem klarzelligen, metastasierenden Nierenkarzinom etabliert wurde, wies die höchste Telomeraseaktivität auf. Die Aktivität der Nierenkarzinomzelllinie SN12L1 war im Verhältnis zu Caki-1 zu 50% geringer.

Insgesamt wurden in beiden Serien 5 benigne Nierentumoren untersucht. Diese 5 Angiomyolipome besaßen keine nachweisbare Telomeraseaktivität. Dies stimmt mit den

Ergebnissen von Rohde *et al.* überein, die in 2 Angiomyolipomen ebenfalls keine Telomeraseaktivität nachweisen konnten (Rohde *et al.*, 1998).

Von besonderem Interesse waren auch die 5 Onkozytome, die erstmals in diesem Kontext untersucht wurden. Die Onkozytome stellen eine Sonderform der Nierenzellkarzinome dar und werden auch als Nierenzelladenome geführt. Sie zeigen einerseits infiltrierendes Tumorwachstum, andererseits metastasieren sie jedoch nicht. Die 5 Onkozytome besaßen keine nachweisbare Telomeraseaktivität. Das Fehlen von Telomeraseaktivität könnte ein Hinweis darauf sein, dass Onkozytome eher als benigne zu klassifizieren sind.

Die Daten der ersten Serie (Tabelle 4-6) sowie die Ergebnisse einiger Autoren geben Hinweise auf eine Stadienabhängigkeit der Telomeraseaktivität (Yoshida *et al.*, 1998; Hara *et al.*, 2001; Paradis *et al.*, 2001). Diese Autoren beschrieben sowohl eine steigende Telomeraseaktivität mit dem Nukleargrad, als auch mit dem Tumorstadium. Auffällig an unseren Untersuchungen war, dass alle vier Proben von fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen, mit bereits nachweisbarer Metastasierung, Telomeraseaktivität zeigten (Tabelle 4-4). In der zweiten Serie der untersuchten Nierenkarzinome bestätigte sich der Trend der Stadienabhängigkeit nicht. Hier wurde nur in 35 % der pT3/pT4 Tumoren Telomeraseaktivität analysiert (Tabelle 4-7). Innerhalb der 14 telomerase-positiven Nierenzellkarzinome waren 5 (36 %) als G2 und 8 (57 %) als G3 einzuordnende Tumoren. Diese Ergebnisse zeigen eine geringe Korrelation zum Tumorgrading, was aufgrund der geringen Fallzahl jedoch nicht statistisch signifikant ist. Die Mehrzahl der anderen Autoren beschrieben keine Abhängigkeit der Telomeraseaktivität von Tumorstadium, Tumorgröße, histopathologischem Subtyp oder Aneuploidie (Mehle *et al.*, 1996; Rohde *et al.*, 1998; Kanaya *et al.*, 1998; Sugimura *et al.*, 1999; Fujioka *et al.*, 2000).

Vergleicht man die Telomeraseaktivität in Nierenkarzinomen mit der anderer Malignome (85 % Vorkommen von Telomeraseaktivität), so ist diese mit 46-74 % deutlich geringer (siehe Abschnitt 5.1.1). Alternative Mechanismen zur Telomererhaltung scheinen daher, in Nierenkarzinomen eine größere Rolle zu spielen (Abschnitt 2.2.3). Der Anteil der nachweisbaren Telomeraseaktivität in den Nierenzellkarzinomen korreliert zahlenmäßig gut mit der, in der Literatur berichteten Anzahl an 3p-Verlusten bei Nierenzellkarzinomen (Brooks *et al.*, 1993). In Klarzellkarzinomen geht man in 85 % der Fälle von einem Verlust des 3p-Chromosoms aus. Anhand von Mikrosatellitenanalysen konnten Mehle *et al.* eine signifikante Korrelation zwischen einem LOH (loss of heterozygosity) in der chromosomalen Region 3p14.2-3p21.2 und der Telomeraseaktivität in Nierenzellkarzinomen nachweisen (Mehle *et al.*, 1998). Die Autoren vermuten mindestens zwei Gene mit regulatorischen Funktionen in dieser Chromosomenregion, die auf die Expression der Telomerase wirken. Diese Annahme

wird unterstützt durch Daten, die mittels Mikrozell-vermitteltem Chromosomen-Transfer eines normalen Chromosoms 3 in die Nierenzellkarzinom-Zelllinien RCC23 (Oshimura & Barrett, 1997) und KC12 (Tanaka *et al.*, 1998a) gewonnen wurden. Vor dem Transfer des normalen Chromosoms waren die Zelllinien RCC23 und KC12, die einen 3p Verlust aufweisen, immortal und zeigten Telomeraseaktivität. Nach Transfer des Chromosoms 3 war keine Telomeraseaktivität mehr nachweisbar, Telomere verkürzten sich und die Zellen gingen einen apoptotischen Zelltod ein. Diese Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, dass ein potentieller Repressor der Telomeraseaktivität auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p14.2.-p21.1) liegt (Tanaka *et al.*, 1998a; Cuthbert *et al.*, 1999). Ein Repressor der Telomeraseaktivität auf dem Chromosom 3 wurde nicht nur in Nierenkarzinomzellen, sondern u.a. auch in Keratinozyten und Brustkrebszellen beschrieben (Steenbergen *et al.*, 1996; Cuthbert *et al.*, 1999). Dieser potentielle Repressor der Telomeraseaktivität scheint direkt oder indirekt die Genexpression der hTERT zu kontrollieren (Horikawa *et al.*, 1998). Auf dem Abschnitt 3p14-21 ist das Gen wnt-5a lokalisiert worden. Eine Transfektion von RCC23-Zellen mit wnt-5a resultierte in einer Hemmung der Proliferation und der Telomeraseaktivität (Olson *et al.*, 1998). Eine direkte Interaktion des Proto-Onkogens wnt-5a mit der Telomerase im Rahmen des WNT-Signaltransduktionsweges wurde bisher (noch) nicht gefunden (Clark *et al.*, 1993). Die Suche nach einem Telomeraserepressor auf 3p geht weiter, denn ein endgültiger Beweis für den Zusammenhang zwischen dem Verlust des 3p Chromosoms und der Telomeraseaktivität steht somit noch aus. Kürzlich wurde eine weitere Region auf dem Chromosom 10p15.1 beschrieben, welche eine starke Korrelation zu Telomeraseaktivität und Expression der hTERT besitzt (Nishimoto *et al.*, 2001).

5.1.3 Expression der Telomeraseuntereinheiten

Nach der Beschreibung der Telomeraseuntereinheiten hTR und hTERT beschäftigten sich eine Vielzahl von Autoren mit der Diagnose dieser Komponenten und ihrer Bedeutung für die Regulation der Telomeraseaktivität in Tumoren. Im Hinblick auf den eher geringen Anteil telomerase-positiver Nierenzellkarzinome war die Untersuchung der hTR- und hTERT-Expression besonders interessant, um einen tieferen Einblick in die Regulation der Telomeraseaktivität beim Nierenzellkarzinom zu erlangen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst der Nachweis der Telomerasekomponenten hTR und hTERT mit den RT-PCR ELISAs begonnen, später ist eine Quantifizierung mittels der „Real-Time“ RT-PCR auf dem LightCycler weitergeführt worden (siehe 4.1.2.2).

Im RT-PCR ELISA wurden alle 35 untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinome für hTR positiv getestet, jedoch nur 85 % der Normalnierengewebe. Für hTERT wurden im RT-PCR ELISA 40 % der Nierenzellkarzinome und 14 % der Normalnierengewebe positiv getestet

(Tabelle 4-10). Diese Ergebnisse zeigen eine geringe spezifische Expression der hTR und hTERT im Tumorgewebe. Die hTERT wird ca. 3 mal stärker in Tumor- gegenüber dem Normalgewebe exprimiert. Die Telomerase-RNA wird jedoch ubiquitär, in allen Nierennormalgeweben sowie in fast allen Nierenkarzinomgeweben exprimiert. Diese Beobachtungen stimmen mit anderen Veröffentlichungen überein (Kanaya *et al.*, 1998). Die Autoren beschrieben ebenfalls eine konstitutive Expression der hTR in den von ihnen untersuchten Nierenkarzinomen. Mit einer Quantifizierung der Daten sollte deshalb die Expression der beiden Parameter besser spezifiziert werden.

Die Auswertungen der „Real-Time“ RT-PCRs für hTR und hTERT auf dem LightCycler-PCR-System führten, aufgrund der hier möglichen Quantifizierung und Normierung über die Expression der ubiquitär exprimierten PBGD zu weiteren interessanten Ergebnissen. Die Mediane der hTERT-Expressionseinheiten für die 35 Klarzellkarzinome betragen 96 E.E. und 12 E.E. für die Normalgewebe (Abbildung 4-3). Dies zeigt eine deutlich höhere Expression der hTERT in den Nierenkarzinomgeweben. Wird die Stärke der Expression der hTERT in den Nierengeweben betrachtet, so zeigt sich aber ein sehr variables Bild. Die erhaltenen Expressionseinheiten bewegen sich zwischen 0 und 1485 E.E.. Dabei finden sich nur 5 Nierenkarzinome und 2 Normalgewebe von jeweils 35 Proben mit einer Expression über 50 E.E.. Setzt man einen Schwellenwert bei 10 E.E., so erhält man 34 % hTERT-positive Tumorgewebe und 31 % hTERT-positive Normalgewebe. Dies stellt einen sehr geringen Prozentsatz von hTERT-positiven Nierenkarzinomen, sowie keinen Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe dar. Andere Autoren beschreiben einen viel höheren Anteil an hTERT-positiven Nierenkarzinomen. Paradis *et al.* analysierten 77 % hTERT-positive Nierenkarzinome mit einer quantitativen RT-PCR auf dem TaqMan System (Paradis *et al.*, 2001). Rohde *et al.* untersuchten 20 Nierenzellkarzinome mit einer semi-quantitativen RT-PCR und fanden zu 90 % hTERT mRNA Expression in Tumor- und zu 75 % in Nierennormalgeweben (Rohde *et al.*, 2000). In den Untersuchungen von 36 Nierenkarzinomen und Normalgeweben fanden Kanaya *et al.* in 86 % der Tumor- und in 16 % der Normalgewebe hTERT-Expression (Kanaya *et al.*, 1998). Eine quantitative Analyse mittels einer radioaktiven RT-PCR für hTERT beschrieben Dome *et al.* für renale Wilms-Tumoren (Dome *et al.*, 1999). Diese Autoren analysierten zu 97 % hTERT mRNA in den Tumorproben von 78 Patienten.

Auffällig sind die starken Schwankungen der hTERT-Expression in den Nierenzellkarzinomen von 0 bis zu 1485 E.E.. Ähnlich starke Schwankungen in der Expression beschrieben auch Paradis *et al.* in ihren quantitativen Untersuchungen (Paradis *et al.*, 2001). Eine Erklärung dazu könnte die Arbeit von Zhang *et al.* geben, die die Amplifikation des hTERT-Gens

untersuchten (Zhang *et al.*, 2000). Die Autoren beschrieben eine Genamplifikation in 31 % der Tumorzelllinien und in 30 % der untersuchten primären Tumoren. Dabei variierte die Kopienanzahl bis über 50 Kopien pro Zelle, im Durchschnitt besaßen die Zellen jedoch 3-4 Kopien des hTERT-Gens. Untersuchungen zur Abhängigkeit der hTERT-Genamplifikation von hTERT-Expression und Telomeraseaktivität waren abhängig vom Zelltyp. In Neuroblastom- und Brustkrebszellen wurde eine Korrelation der hTERT-Expression und der hTERT-Genamplifikation beobachtet. Eine Korrelation der Genamplifikation mit Tumorgröße, Tumorstatus, Metastasierung, sowie Onkogenaktivierung wurde nicht gefunden.

Nach der Quantifizierung der hTERT-Expression wurden die Ergebnisse der untersuchten Nierenkarzinome mit dem Mann-Whitney-Test, der einen Vergleich der Mediane durchführt, statistisch ausgewertet. Die Auswertung der Ergebnisse ergab eine signifikante Abhängigkeit ($p=0,031$) der hTERT-Expression vom Auftreten der Telomeraseaktivität (Abbildung 4-5). Mit den 16 telomerase-positiven Nierenzellkarzinomen wurde für die hTERT-Analyse ein mittlerer Rankwert von 22,03 erreicht. Die Analyse der 19 telomerase-negativen Tumoren ergab nur einen mittleren Rankwert von 14,61. Dies weist deutlich auf eine Korrelation der hTERT-Expression zur Telomeraseaktivität in den klarzelligen Nierenkarzinomen hin.

Im Gegensatz dazu zeigen die quantitativen Untersuchungen zur Abhängigkeit der Expression der Telomerase-RNA von der Telomeraseaktivität der Tumoren eine nicht mehr statistisch signifikante Korrelation der beiden Parameter mit dem Mann-Whitney-Test ($p=0,71$). Die Mediane sind 55 E.E. für die Tumorproben und 22 E.E. für die Nierennormalgewebe.

Die Expression der hTR variiert in den Nierenkarzinomen ebenfalls sehr stark zwischen 0 und 228 E.E.. Die Werte in den Normalgeweben liegen aber nur bei höchstens 60 E.E.. Führt man einen Schwellenwert von 10 E.E. ein, so sind 56 % der Normalgewebe und 83 % der Nierenkarzinome positiv für hTR. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Quantifizierung der hTR-Expression auch für hTR eine tumorspezifische Expression sichtbar wird. Währenddessen die Ergebnisse mit dem nicht-quantitativen RT-PCR-ELISA Test keine diagnostische Relevanz besitzen. Eine höhere hTR-Expression in Tumoren erklären Soder *et al.* durch Amplifikation des hTR-Gens in 97 % aller Tumoren (Soder *et al.*, 1997a).

Drei Arbeitsgruppen beschreiben in ihren Ergebnissen, dass die hTR ubiquitär und unabhängig von der Telomeraseaktivität in Normal- und Tumorgewebe der Niere exprimiert wird (Kanaya *et al.*, 1998; Rohde *et al.*, 2000; Dome *et al.*, 1999). Mit in-situ Hybridisierungen der hTR zeigten Rohde *et al.* außerdem, dass die hTR sowohl in Tumor- als auch in Normalgeweben nur in Epithelzellen des Nierentubulus nachzuweisen war. Glomeruluszellen, Zellen der Henleschen-Schleife, sowie Stromazellen und ausgereifte

Lymphozyten waren alle hTR negativ. Die Autoren beschrieben im Normalgewebe eine stärkere hTR-Expression als im Tumorgewebe und spekulierten deshalb über gewebespezifische Mechanismen der hTR-Regulation im Nierengewebe. Auch in den hier vorgestellten quantitativen Untersuchungen wurde in 5 von 35 korrespondierenden Nierengeweben eine höhere hTR-Expression in den Normalgeweben gegenüber Tumorgeweben analysiert. Weiterhin ist auffällig, dass in zwei Nierenkarzinomgeweben (338 und 388) und in einem Normalgewebe (338), in welchen mit dem hTR RT-PCR ELISA eine hohe hTR-Expression nachgewiesen wurde, mit dem LightCycler RT-PCR Assay keine hTR-Expression zu analysieren war.

Der Nachweis der hTR-Expression steht vor dem Problem, dass das Gen der hTR RNA intronfrei ist und somit DNA-Kontaminationen, die bei der RNA Isolierung entstehen, zu Ergebnisverfälschungen führen können. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine zusätzlich durchgeführte DNase Reaktion vor der Analyse der Proben mit der „Real-Time“ RT-PCR verhindert. Weiterhin ist bekannt, dass es eine sehr hohe Expression an hTR-Molekülen in der Zelle gibt. Eine Analyse der Expression mit nicht-quantitativen RT-PCRs sowie auch dem RT-PCR ELISA, die Endpunktanalysen darstellen, ist deshalb nicht quantitativ auswertbar, da es schnell zu einer Sättigung der PCR-Reaktion kommen kann. Aus diesen Gründen wurde in den hTR RT-PCR ELISA Analysen eine ubiquitäre Expression der hTR gefunden, die sich erst mit der quantitativen RT-PCR spezifizieren ließ. In der LightCycler RT-PCR wird keine Endpunktanalyse durchgeführt, sondern die Expression schon während des Laufs vor der Sättigungsphase der Reaktion gemessen. Deshalb wird angenommen, dass die vorliegenden Ergebnisse der „Real-Time“ RT-PCR eher den natürlichen Bedingungen entsprechen. Dies bedeutet dann, dass die hTR, wie für andere Gewebe beschrieben, auch im Nierengewebe differenziell exprimiert wird (Avilion *et al.*, 1996; Yi *et al.*, 1999; Buchler *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse der hTR- und hTERT-Expression in den Nierenkarzinomzelllinien zeigen ebenfalls ein differenziertes Bild auf (siehe Abschnitt 4.1.1). In den Nierenkarzinomzelllinien war unterschiedlich hohe Telomeraseaktivität nachweisbar; Caki-1, ACHN und Caki-2 zeigten die höchste Telomeraseaktivität. Die Expression der hTERT ist, bestimmt mit dem RT-PCR ELISA und quantifiziert per LightCycler RT-PCR, in den Zelllinien Caki-1 und Caki-2 sehr hoch. ACHN dagegen besitzt eine eher geringere hTERT-Expression. Dafür wurden für die hTR-Expression in ACHN, Caki-2 und SN12L1 hohe Werte gemessen. Caki-1 zeigt eine eher mittlere hTR-Expression. Zu bemerken ist die ähnliche Charakteristik für die Zelllinien Caki-1 und Caki-2, welche aus einem primären Nierenkarzinom und aus dessen Metastase generiert wurden sind. In A 498 wurde eine vergleichbar mittlere Telomeraseaktivität und sehr geringe

hTR- bzw. hTERT-Expressionen gemessen. Die geringen Expressionen können möglicherweise vom papillärem epidermoiden Ursprung der Nierenkarzinomzelllinie herführen. Die Zelllinie A 704 war in der Zellkultur wegen ihrer sehr geringen Proliferationsrate auffällig. Sie besitzt eine mittlere Telomeraseaktivität und eine mittlere hTR- und hTERT-Expression. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass auch Nierenkarzinomzelllinien bezüglich ihrer Telomeraseaktivität und Expression der Telomerasekomponenten zu unterscheiden sind. Dies ist vor allem, bei der Verwendung der Zelllinien für Zellkulturversuche und/oder in-vivo Versuchen zur Hemmung der Telomerase zu beachten.

Die Untersuchungen der Telomeraseaktivität, sowie der Expression von hTERT und hTR ergeben für die Nierenkarzinome ein sehr heterogenes Bild. Dieses wird auch von den anderen Autoren kontrovers diskutiert (Rohde *et al.*, 2000; Kanaya *et al.*, 1998). Kanaya *et al.* beschrieben eine starke Abhängigkeit von hTERT und Telomeraseaktivität und wiesen damit der hTERT im Nierenkarzinom eine bedeutende Rolle in der Telomeraseaktivierung zu. Sie fanden keine Assoziation zwischen der Telomeraseaktivität und der hTR-Expression, sowie der Expression des Telomerase-assoziierten Proteins TP1 (Kanaya *et al.*, 1998). Auch die neuesten quantitativen Ergebnisse von Paradis *et al.* zeigen eine Korrelation von hTERT-Expression und Telomeraseaktivität in Nierenzellkarzinomen auf (Paradis *et al.*, 2001). Demgegenüber schlussfolgerten Rhode *et al.* aus ihren Ergebnissen, dass die Expression der hTERT in Nierenkarzinomen nicht abhängig ist von der Telomeraseaktivität. Sie stellten die Hypothese auf das andere Mechanismen, wie posttranskriptionale Modifikationen der hTERT oder Inaktivierung durch hTERT-Inhibitoren eine große Bedeutung für die Telomeraseaktivität in Nierenkarzinomen besitzen. Auch Hara *et al.* fanden keinen Zusammenhang von Telomeraseaktivität und hTERT mRNA Expression in ihren untersuchten Nierenkarzinomen (Hara *et al.*, 2001). Trotz der signifikanten Korrelation der Rankwerte der hTERT-Expression und Telomeraseaktivität, ist auch in den vorliegenden Ergebnissen deutlich, dass die Telomeraseaktivität nicht zwingend mit der hTERT-Expression in den Nierenkarzinomen verbunden ist. Die ausgewählten Beispiele in Tabelle 4-12 zeigen auf, dass in den hier untersuchten Nierenkarzinomproben unterschiedliche Expressionsmuster auftraten und hTERT Expression auch ohne Telomeraseaktivität nachgewiesen werden konnte.

In den untersuchten Nierenzellkarzinomen wurden unterschiedliche Expressionsmuster der Telomerasekomponenten analysiert. In 7 von 16 telomerase-positiven Tumoren wurde eine geringe hTERT-Expression mit kleiner als 10 E.E. gemessen. Von den 19 telomerase-negativen Tumoren besaßen 5 eine hTERT-Expression höher als 10 E.E., wobei die Tumoren 394 und 415 mit 134 bzw. 360 E.E. sogar sehr hohe Expressionen zeigten. In Tumor 415

wurde eine hTERT und hTR-Expression, aber keine Telomeraseaktivität nachgewiesen (Tabelle 4-12). In drei Tumorproben konnte keine Telomeraseaktivität im TRAP-Assay und im Telomerase-PCR-ELISA, sowie keine Expression von hTR und hTERT mit der „Real-Time“ RT-PCR bestimmt werden. Auch der hTERT RT-PCR ELISA ergab negative Resultate für diese drei Tumoren. In keinem Nierennormalgewebe wurde Telomeraseaktivität nachgewiesen, jedoch in 31 % wurde eine hTERT-Expression oberhalb von 10 E.E. gefunden.

Eine Abhängigkeit der hTR und hTERT Expression von Tumorstadium und Tumorgrading konnte in den durchgeführten Untersuchungen nicht gefunden werden. Auch die anderen Autoren beschrieben für die Nierenkarzinome keine Korrelation zu Tumorstaging und Grading (Kanaya *et al.*, 1998; Rohde *et al.*, 2000; Hara *et al.*, 2001).

5.1.4 Telomerlängen in Nierenkarzinomen

In Normalgeweben kommt es pro Zellteilung zu einer Telomerverkürzung von 25-200 bp (Harley *et al.*, 1990). Zur Geburt besitzen menschliche Zellen ungefähr 15 kb Telomersequenzen. Nach ca. 100 Zellteilungen haben sich die Telomere so stark verkürzt, dass die Zellen sich nicht weiter teilen können; normale Körperzellen haben eine begrenzte Lebensspanne. Im Gegensatz dazu müssen Tumorzellen und andere langlebende Körperzellen ihre Telomere über eine hohe Anzahl an Zellteilungen erhalten (siehe Abschnitt 2.1.1). Tumorzellen sind charakterisiert durch eine ansteigende Proliferationsrate, daher müssen sie an einem kritischen Punkt dem Verlust der Telomere pro Zellteilung entgegenwirken. Neben der Reaktivierung der Telomerase werden in ca. 15 % der Tumorzellen alternative Wege zur Telomererhaltung verwendet (siehe Abschnitt 2.2.3). Ein Mechanismus, der zu einer Verlängerung von Telomeren führen kann, wird ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) genannt (Bryan *et al.*, 1995; Bryan *et al.*, 1997a). Aufgrund des hohen Anteils von telomerase-negativen Nierenkarzinomen spielt ALT hier eine besondere Rolle (Mehle *et al.*, 1996).

Eine Bestimmung der Telomerlängen wurde an 12 Nierentumoren, davon 7 telomerase-positiven und 5 telomerase-negativen, sowie an 2 Nierenkarzinomzelllinien durchgeführt (Abschnitt 4.1.3). In der Literatur wurde die Telomerlänge in einer fetalen Niere mit 20 kb beschrieben, Nierentumore hingegen besitzen nur eine Telomerlänge von 4-10 kb (Dahse *et al.*, 1997). Unsere Untersuchungen zeigen im Durchschnitt kürzere Telomere (11,4 kb +/- 3 kb) in den Nierenkarzinomen als in den Nierennormalgeweben (19,8 kb +/- 8 kb) auf. Auffallend ist eine noch stärkere Verkürzung der Telomere in telomerase-positiven Tumoren (8,2 kb +/- 1,75 kb) gegenüber den telomerase-negativen Tumoren (17 kb +/- 2,8 kb) (siehe Abbildung 4-6). Es ist zu vermuten, dass diese telomerase-negativen Nierenkarzinome ihre Telomerlängen über ALT-Mechanismen, wie Rekombination der Chromosomen, erhalten

haben. Neuere Ergebnisse zeigen, dass in ALT-Zellen durch hTERT-Transfektion Telomerase aktiviert werden kann und der ALT-Mechanismus dadurch unterdrückt wird. Es scheint aber auch möglich zu sein, dass der ALT-Mechanismus gleichzeitig mit der Telomeraseaktivität in der Zelle existiert (Perrem *et al.*, 2001).

Beim Vergleich der Telomerlängen von Nierennormalgeweben ist es auffällig, dass die Normalgewebe der telomerase-negativen Tumoren längere Telomere als die der telomerase-positiven Nierentumore besitzen. Innerhalb der telomerase-negativen Gruppe finden sich zwei Normalgewebe mit äußerst langen Telomeren von 54 kb, die sich in den Tumoren auf jeweils 14 kb verkürzt haben. Diese langen Telomere weisen ebenfalls auf alternative Mechanismen in der Regulation der Telomerlänge hin. Ein Zusammenhang der Telomerlängen mit Tumorstadium und Metastasierung war nicht zu beobachten; es wurden Tumoren im Stadium T3 analysiert, welche telomerase-negativ waren, aber unterschiedlich lange Telomere besaßen.

Die zwei untersuchten Nierenkarzinomzelllinien zeigen sehr unterschiedliche Telomerlängen. Für SN12L1 wurden 22 kb, für Caki-1 5,4 kb berechnet (Abbildung 4-7). Auch Kinoshita *et al.* berichten, dass die Telomerlänge von Caki-1 zwischen 2,3 und 5 kb liegt (Kinoshita *et al.*, 1998). Zu beachten ist, dass die Zelllinie SN12L1 die geringste, untersuchte Telomeraseaktivität besitzt und Caki-1 die höchste. Dies reiht sich ein in die Ergebnisse der Nierengewebe, wo Zellen mit langen Telomeren keine oder nur eine geringe Telomeraseaktivität besitzen.

Diese Ergebnisse gehen einher mit den Veröffentlichungen anderer Autoren. Alle Autoren beschrieben eine Verkürzung der Telomere in Nierentumoren gegenüber den Normalnierengeweben (Mehle *et al.*, 1994; Fiedler *et al.*, 1996; Kinoshita *et al.*, 1998; Dahse *et al.*, 1999). Keiner der Autoren fand eine Korrelation der Telomerlänge zu Tumorstadium und Tumorgröße. Auch Mehle *et al.* untersuchte telomerase-negative Tumoren und fand ebenfalls eine Verringerung der Telomerlänge in Tumoren gegenüber dem Normalgewebe. Zwei seiner Proben zeigten aber auch eine Verlängerung der Telomere, für die die Autoren als Erklärung eine telomerase-unabhängige Erhaltung der Telomere vorschlugen (Mehle *et al.*, 1996). Für die Heterogenität in Nierenkarzinomen interessierten sich Fiedler und Dahse (Dahse *et al.*, 1996; Fiedler *et al.*, 1996). Sie untersuchten die Telomerlängen in verschiedenen Tumorarealen von Nierenkarzinomen, sowie in Metastasen und fanden telomerase-negative Primärtumoren mit telomerase-positiven Tumorarealen, sowie unterschiedliche Telomerverkürzungen in den untersuchten Arealen.

5.1.5 Regulation der Telomerase in Tumor- und Normalgewebe

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Telomeraseaktivität und der Telomerlängen, sowie der Expression der Telomerase-RNA und der katalytischen Untereinheit im Nierenzellkarzinom zeigen, dass die Aktivität der Telomerase im Nierenzellkarzinom stark gewebe- und tumorabhängig ist. In nur 63 % bzw. 46 % der hier untersuchten Nierenzellkarzinome wurde Telomeraseaktivität nachgewiesen; hTERT-Expression zeigten nur 34 % der klarzelligen Nierenzellkarzinome. Nierenzellkarzinome können, wie hier nachgewiesen, auch ohne Telomeraseaktivität, Telomerase-RNA und katalytischer Untereinheit proliferieren. Diese vielfältigen Expressionsmuster der Telomerasekomponenten weisen auf eine komplexe Regulation der Telomerase hin, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll.

Die Telomerlängen der Nierentumore sind kürzer als die der Normalgewebe. Da telomerase-negative Tumoren immer noch längere Telomere als telomerase-positive Tumoren besitzen ist es vorstellbar, dass in den Tumoren mit längeren Telomeren noch nicht die kritische Länge zur Reaktivierung der Telomerase erlangt wurde und deshalb bis dahin noch andere oder keine Mechanismen zur Telomerverlängerung in den Tumorzellen wirkten. Die Telomeraseaktivität in den Nierenkarzinomen ist somit nicht der einzige Mechanismus für die Erhaltung der Telomerlänge. Alternative Mechanismen zur Erhaltung der Telomerlängen wurden in 7-10 % aller Tumoren beobachtet und haben besonders in Nierenkarzinomen eine Bedeutung (Bryan *et al.*, 1997a) (siehe hierzu Abschnitt 2.2.3).

Die benignen Nierenkarzinome, wie Angiomyolipome, besitzen keine Telomeraseaktivität und keine Expression von hTR und hTERT. Auch in den Onkozytomen war keine Telomeraseaktivität, hTERT- und hTR-Expression nachweisbar (Abschnitt 4.1.2.). In den klarzelligen Nierenzellkarzinomen hingegen wurde eine signifikante Abhängigkeit der hTERT-Expression von der Telomeraseaktivität bestimmt. Tumoren, die eine hoch regulierte hTERT-Expression besitzen, scheinen diese für ihre Enzymaktivität zur de-novo Synthese von Telomersequenzen zu benötigen. Andere regulieren ihre Telomerlänge wahrscheinlich über alternative Mechanismen und benötigen dafür keine Telomeraseaktivität. In einer weiteren Gruppe wurden hTR und/oder hTERT nachgewiesen, aber ein aktives Enzym Telomerase konnte nicht bestimmt werden (siehe Tabelle 4-12). Die Expression der hTERT ist hier somit nicht der limitierende Faktor für die Telomeraseaktivität, sondern die Regulation untersteht noch anderen Mechanismen. In Normalnierengewebe war die Telomerase, obwohl z.T. auch eine Expression der Telomerasekomponenten nachweisbar ist, nicht aktiv. Warum es teilweise trotzdem zu einer hTERT- und hTR-Expression kommt, ist nicht geklärt.

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen zur Regulation der hTERT diskutiert (Tabelle 5-1). Die Unterschiede in der hTERT-Expression können z.B. durch die Wirkung von **Transkriptionsfaktoren** am Promotor hervorgerufen werden (Tollefsbol & Andrews, 2001). Das Wilms-Tumor Protein WT-1 wurde als ein Repressor der hTERT-Expression in Nierenkarzinomzellen beschrieben (Oh *et al.*, 1999a). Das Protein WT-1 unterdrückte zelltypabhängig die Genexpression der hTERT in A 293 humanen Nierenkarzinomzellen, aber nicht in Hela-Zellen, die kein WT-1 exprimieren. Weiterhin besitzt die Promotorsequenz von hTERT mehrere c-myc Bindungsstellen. Einige Gruppen haben gezeigt, dass durch Überexpression von c-myc hTERT-Expression induziert werden kann (Wu *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 1999b). Eine Deregulation des Onkogens c-myc, durch Überexpression, Amplifikation, Translokation oder Mutationen des c-myc Gens, ist ein weit verbreitetes Phänomen in Tumorgewebe. Andere beschriebene Regulatoren der hTERT-Expression sind Östrogene, welche ebenfalls über den c-myc Weg agieren (Kyo *et al.*, 1999b), der Transkriptionsfaktor Sp-1, der mit c-myc kooperiert (Kyo *et al.*, 2000), sowie das HPV E6 Protein (Klingelhutz *et al.*, 1996).

Tabelle 5-1 Mögliche pre- und posttranskriptionelle Regulationsmechanismen der Telomerase (Kyo & Inoue, 2002).

1. Transkriptionelle Regulation der TERT
2. Alternatives Splicing der TERT Transkripte
3. Epigenetische Regulation der TERT (Methylierung)
4. Phosphorylierung des TERT Proteins
5. Chaperon-vermittelte Regulation der TERT

Möglicherweise besitzen die Tumoren mit Telomeraseaktivität, aber ohne nachweisbare hTERT, **alternative Splicevarianten** der hTERT, die hier nicht nachgewiesen werden konnten. Sechs verschiedene Splicevarianten, welche gewebespezifisch und hormonabhängig vorkommen, sind bisher beschrieben worden (Kilian *et al.*, 1997). Die Überexpression der hTERT α -Deletion-Splicevariante hemmt die endogene Telomeraseaktivität als dominant-negative Mutante und verursacht Telomerverkürzungen, sowie chromosomale „End-to-End“ Fusionen (Colgin *et al.*, 2000) Ulaner *et al.* untersuchten die Splicevarianten während der Embryonalentwicklung u.a. in der fetalen Niere und beschrieben ein gewebespezifisches und entwicklungsstadium-spezifisches Auftreten der hTERT mRNA und ihrer Splicevarianten (Ulaner *et al.*, 1998). Sie fanden in der fetalen Niere das vollständige Transkript, sowie die Splicevarianten mit der α - und β -Deletion. In der 17. Entwicklungswoche war in der fetalen Niere keine Telomeraseaktivität mehr, aber noch das vollständige Transkript der hTERT und die Splicevariante mit der β -Deletion nachweisbar. Die Autoren vermuten, dass es trotz

Nachweis des vollständigen hTERT-Transkriptes zu noch weiteren Splicereaktionen oder anderen Modifikationen kommt, die die Bildung eines aktiven Enzyms Telomerase verhindern (Ulaner *et al.*, 2000). Hara *et al.* dagegen, untersuchten die Splicevarianten in 5 Nierenkarzinomproben, fanden aber keine Korrelation zur Telomeraseaktivität (Hara *et al.*, 2001).

Ein weiterer Regulationsmechanismus, welcher möglicherweise eine Rolle bei der Inaktivierung der katalytischen Untereinheit, sowie der Telomerase RNA spielt, ist die **Methylierung**. Nach Promotoruntersuchungen des hTERT-Gens wurden in einer Anzahl von Zelllinien bis zu 72 CpG-Inseln beschrieben. Die meisten hTERT-negativen normalen Zellen, sowie ein Drittel der hTERT-exprimierenden Zellen besitzen einen unmethylierten bzw. hypomethylierten hTERT-Promotor. Wohingegen in hTERT-exprimierenden Zellen der hTERT-Promotor teilweise oder vollständig methyliert ist (Devereux *et al.*, 1999). Die Autoren schlussfolgern aus ihren Experimenten, dass es verschiedene Methylierungszustände der CpG-Inseln des hTERT-Promotors gibt, welche die hTERT-Expression über Methylierungen und Demethylierungen zu regulieren scheinen. Weitere Studien an telomerase-positiven und telomerase-negativen Tumoren veröffentlichten Dessain *et al.* (Dessain *et al.*, 2000). Obwohl auch diese Autoren in einigen telomerase-positiven Zelllinien und Tumoren partielle Methylierungen gefunden haben, wurde von ihnen keine Korrelation zwischen Methylierung und Telomeraseaktivität nachgewiesen. Diese Autoren fassten zusammen, dass die Methylierungen für das Fehlen der hTERT-Expression in telomerase-negativen Zellen nicht verantwortlich sind, jedoch die Methylierungen unter anderen dazu beitragen, dass keine Expression der hTERT möglich ist. Die Methylierung scheint kein genereller Mechanismus für die Regulation der hTERT-Expression zu sein, aber sie spielt eine Rolle in bestimmten Zelltypen, in bestimmten Entwicklungsstadien oder zu bestimmten Zeitpunkten der Karzinogenese.

Posttranslationale Mechanismen, wie Phosphorylierungen, haben ebenfalls eine Bedeutung für die Regulation der hTERT-Expression. So beschrieben Li *et al.* Phosphorylierungen der hTERT durch die Proteinkinase $C\alpha$, welche direkt oder indirekt die Telomeraseaktivität erhöhten (Li *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu wird die Telomeraseaktivität durch Proteinkinase C - Inhibitoren oder die Proteinphosphatase 2A gehemmt (Ku *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998). Proteinkinase B oder Akt ist ebenfalls durch Phosphorylierung eines Serinrestes der hTERT und Aktivierung des PI3-Kinase Signaltransduktionsweges an der Hochregulierung der Telomeraseaktivität beteiligt (Kang *et al.*, 1999). Proteinphosphorylierungen und Dephosphorylierungen sind ein bekannter

Regulationsmechanismus der Signaltransduktion und spielen auch in der Regulation der Telomeraseaktivität eine Rolle.

Der Telomerasekomplex ist assoziiert mit dem Hitzeschockproteinkomplex Hsp90 (**Chaperonen**), bestehend aus Hsp90, Hsp70 und p23 (Tabelle 2-4), welcher Hilfestellung bei der Proteinfaltung von verschiedenen Proteinen gibt (Holt *et al.*, 1999). Für einen funktionellen Telomerasekomplex ist es notwendig, im Gegensatz zu anderen Hsp90-abhängigen Proteinkomplexen, dass die Telomerase ständig mit dem Hsp90-Komplex assoziiert ist. In einer in-vivo Rekonstitution der Telomerase wurde gezeigt, dass nach Zugabe des Hsp90-Komplexes zu Zellen mit geringer Telomeraseaktivität die Telomeraseaktivität bedeutend angestiegen ist (Akalin *et al.*, 2001).

Neuere Untersuchungen fanden heraus, dass der Telomerasekomplex aus Dimeren oder Multimeren von hTERT und/oder hTR bestehen kann. Es ist möglich, dass zwei katalytisch inaktive hTERT-Moleküle zusammen eine katalytische Aktivität entwickeln, oder dass ein rekonstituierter Telomerasekomplex aus einem Wildtyp- und einem mutierten Molekül hTR eine verringerte Telomeraseaktivität zeigt (Beattie *et al.*, 2001; Wenz *et al.*, 2001).

Für den hTR-Promotor wurden ebenfalls einige Regulationsmechanismen, wie Hypermethylierung und Amplifikation, beschrieben (Soder *et al.*, 1997a). Transkriptionsfaktoren, wie Sp-1 und Rb aktivieren die Genexpression, wohingegen Sp3 als Repressor wirkt und NF-Y als essentiell nachgewiesen wurde (Zhao *et al.*, 2000). Promotormethylierungen wurden besonders in ALT-Zellen ohne hTR-Expression beobachtet (Hoare *et al.*, 2001). In normalen Geweben und mortalen Zelllinien wurden jedoch keine Methylierungen gefunden, d.h. für eine gehemmte hTR Expression scheint die Methylierung nicht verantwortlich zu sein. Die Behandlung von ALT-Zelllinien mit demethylierenden Agenzien ermöglichte eine partielle Demethylierung des Promotors und induzierte daraufhin eine Expression der hTR. Die Autoren fanden, dass der hTR-Promotor in 5 % aller Tumoren, sowie 27 % der immortalen Zelllinien partiell methyliert ist und diese Zellen hTR exprimieren. Einige Mechanismen, deren Rolle in der Regulation der Telomerase und Telomerlänge diskutiert werden, konnten hier zusammengefasst werden. Alle diese Regulationsmechanismen der Telomeraseaktivität sind sicherlich auch im Nierengewebe vorhanden, bedürfen aber gewebespezifisch noch einer Aufklärung. Viele Fragen, speziell zur Signaltransduktion, gewebespezifischen Expression und Regulation der Telomerasekomponenten bleiben offen und sind Schwerpunkte weiterer Forschungsprojekte zur Bedeutung der Telomerase.

5.2 Telomerase als therapeutisches Target

Drei verschiedene Strategien mit unterschiedlichen Angriffspunkten zur Hemmung der Telomeraseaktivität wurden in dieser Arbeit untersucht. In den ersten Experimenten wurde die RNA-Komponente der Telomerase in der Nierenkarzinomzelllinie der Maus RENCA angegriffen (Murphy & Hrushesky, 1973). Die RENCA-Zellen besitzen eine hohe Telomeraseaktivität und den humanen Zellen vergleichbar kurze Telomere. Mit Hilfe von antisense Molekülen, welche gegen die Telomerase-RNA gerichtet waren, konnte eine Hemmung der Telomeraseaktivität hervorgerufen werden. Das Konzept beruht auf dem Prinzip der Interaktion von intrazellulär synthetisierten antisense Telomerase-RNA Molekülen mit den natürlich vorkommenden Molekülen der Telomerase-RNA. Es wird angenommen, dass mit einer Blockade der Telomerase-RNA die Bildung eines aktiven Telomerasekomplexes verhindert werden kann. Die selektive Repression von Genen durch artifizielle Nukleinsäuren in antisense Orientierung ist experimentell oft gezeigt worden und findet Anwendung zur Untersuchung einer Vielzahl von zellulären Funktionen (Weintraub, 1990). Die Experimente von Feng *et al.* zeigten im humanen System eine Wirkung der antisense Telomerase-RNA Moleküle in HeLa-Zellen (Feng *et al.*, 1995). Daraufhin war eine Untersuchung in den murinen Tumorzellen RENCA vor allem für den Vergleich der Wirkungsweise der Telomerase in den verschiedenen Geweben von Maus und Mensch interessant (Abschnitt 4.2.1).

Mit der Beschreibung der katalytischen Untereinheit der Telomerase (TERT) ergab sich die Möglichkeit des Angriffs direkt am Protein. Die direkte Beeinflussung der katalytischen Untereinheit der Telomerase, anstatt der RNA-Komponente, schien effektiver zu sein, da die Expression der TERT in Tumorzellen geringer ist und als ein limitierender Faktor für die Aktivität des Enzyms beschrieben wurde (Nakamura *et al.*, 1997). Nach der Klonierung der katalytischen Untereinheit der Telomerase wurde auch deren Sequenz und Struktur als Mitglied der Familie der Reversen Transkriptasen weiter aufgeklärt (Lingner *et al.*, 1997). 1998 wurde die vollständige Sequenz der murinen Telomerase Reversen Transkriptase (mTERT) mit ihrem katalytischen Zentrum veröffentlicht, womit es möglich war, diese Information für die Arbeiten zu nutzen (Greenberg *et al.*, 1998). Die Verwendung einer dominant-negativen Mutante der mTERT war daher eine weitere interessante und neue Möglichkeit zur Beeinflussung der Telomeraseaktivität (Abschnitt 4.2.2).

Nach den Ansätzen zur Hemmung der Telomerase an der Telomerase-RNA und an der katalytischen Untereinheit ermöglichte die Anwendung synthetisch hergestellter Oligonukleotide einen Angriff an beide Komponenten der Telomerase. Modifizierte Oligonukleotide, wie Phosphorthioate, Phosphoamidate oder Ribosylmodifizierungen, wurden als stabil und wirksam beim Einsatz in-vivo beschrieben. Diese Oligonukleotide eröffneten

eine dritte zu untersuchende Möglichkeit zur Hemmung der Telomeraseaktivität und wurden deshalb an verschiedenen humanen und murinen Zelllinien untersucht (Abschnitt 4.2.3).

5.2.1 Antisense Strategien gegen die Telomerase-RNA

Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse ähnlicher antisense Telomerase-RNA Transfektionen an humanen Zelllinien, wie z.B. an Darmtumorzellen (Naka *et al.*, 1999), HeLa und Nierenkarzinomzellen (Bisoffi *et al.*, 1998) oder Gliomzellen (Kondo *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 1999) zeigen alle eine zumindest zeitweise Hemmung der Telomerase und Verkürzung der Telomere. Schon gleichzeitig mit der Beschreibung der Telomerase-RNA wurde von der erfolgreiche Anwendung der antisense Moleküle, die gerichtet waren gegen die humane Telomerase-RNA, berichtet (Feng *et al.*, 1995). Die Autoren beschreiben aber auch zellspezifische Unterschiede in der Wirksamkeit der antisense Konstrukte gegen die Telomerase-RNA. Nach konstitutiven und induzierten antisense Telomerase-RNA Transfektionen in zwei humane Brustkrebszelllinien wurde eine teilweise Hemmung der Telomeraseaktivität, aber keine Veränderung der Telomerlänge nachgewiesen (Muller *et al.*, 1998). Naka *et al.* transfizierte drei verschiedene Darmtumorzelllinien mit antisense Telomerase-RNA, jedoch nur zwei der Zelllinien reagierten mit morphologischen Veränderungen und Zelltod. Die dritte Zelllinie überlebte trotz Verkürzung der Telomere bis über 50 Verdopplungen (Naka *et al.*, 1999). Eine Induzierung von zwei unterschiedlichen Wegen entweder Apoptose oder Differenzierung beschreiben Kondo *et al.* in Gliomzellen nach einer Transfektion mit antisense Telomerase-RNA (Kondo *et al.*, 1998). Die Autoren spekulierten darüber, dass die Regulation der beiden Wege über die Expression des Interleukin-1 β -converting Enzyms (ICE) oder der Cyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKIs), p21 und p27, vermittelt wird. Sie vermuten einerseits, dass die Hemmung der ICE-Protein Expression durch die Telomerase in eine Resistenz gegenüber der Apoptose mündet. Andererseits beobachteten sie nach Inhibierung der Telomerase eine Induktion der Proteine p21 und p27, welche die Differenzierung der Neuroblastomzellen befördern.

Die antisense Telomerase-RNA zeigte in den murinen Nierenkarzinomzellen RENCA, ähnlich den Anwendungen in den humanen Zellen, eine Wirkung auf Proliferation, Telomeraseaktivität und Telomerlänge. Nach der Transfektion von antisense Telomerase-RNA wurden in allen transfizierten Zellklonen ungefähr 35 Populationsverdopplungszeiten später morphologische Veränderungen, in große seneszierende, multinukleare Zellen, beobachtet (Abschnitt 4.2.1.1). Auch Naka *et al.* beschrieben solche morphologischen Veränderungen nach 20 Tagen für humane Darmtumorzellen (Naka *et al.*, 1999). Die großen multinuklearen Zellen waren besonders, in antisense Telomerase-RNA transfizierten Zellklonen mit stark verringerter Proliferation zu finden. Zehn der insgesamt dreizehn

antisense-mTR transfizierten RENCA-Klone zeigten eine verringerte Proliferation, zwei der Klone starben sogar vollständig (20 %). Zwei der von Naka *et al.* verwendeten Darmtumorzelllinien TMK-1 und MKN-1 stellten ebenfalls nach 10-40 Tagen ihre Proliferation vollständig ein. Auch Feng *et al.* berichteten von einer vollständigen Hemmung der Proliferation in HeLa-Zellen (Feng *et al.*, 1995). Bisoffi *et al.* beobachtete, dass nur einer von 56 HeLa- und A 498 Nierenkarzinomzellklonen in die Apoptose ging (Bisoffi *et al.*, 1998).

In den antisense-mTR transfizierten RENCA-Zellen wurde bis zur 35. PD eine sich verringerende Telomeraseaktivität gemessen (Abschnitt 4.2.2.3). Dies war genau der Zeitpunkt der beobachteten Proliferationskrise, sowie des Absterbens der zwei Zellklone. Die mittlere Telomeraseaktivität sank zu diesem Zeitpunkt bis auf ein Siebentel der Telomeraseaktivität der unbehandelten RENCA-Zelllinie. Nach der Proliferationskrise stieg die Telomeraseaktivität in den Zellklonen wieder an und war in der 60. PD der der RENCA-Zelllinie gleich. Keiner der Kontrollvektor-transfizierten Klone zeigte eine veränderte Proliferation oder Telomeraseaktivität.

In den sense-mTR transfizierten Zellklonen war über den gesamten Zeitraum, eine leicht reduzierte Telomeraseaktivität nachzuweisen, die sich aber nicht in einer veränderten Proliferation äußerte. Dies war erstaunlich und wurde bisher noch nicht beschrieben. Eine mögliche Bildung von hTR-Dimeren aus wildtyp und mutierten hTR-Molekülen und darauffolgender, verringerter Telomeraseaktivität wurde erst vor kurzem berichtet und könnte hier eine Rolle spielen (Wenz *et al.*, 2001).

Eine unspezifische Wirkung von Oligonukleotiden ist jedoch auch ein allgemein zu beobachtendes Phänomen bei der Behandlung von Zellen mit Oligonukleotiden, welches nur durch genaue Untersuchung der anzugreifenden Sequenzen und Austestung verschiedener Oligonukleotide gelöst werden kann (Branch, 1998). Hier wurde beschrieben, dass sense Oligonukleotide einerseits im Vergleich zu „Random“ Kontrolloligonukleotiden unerwartet hohe Homologien zu unspezifischen Genen besitzen können, daher auch an andere Targets in der Zelle binden und somit ebenfalls biologische Effekte hervorrufen können. Andererseits wird vermutet, dass auch sense Oligonukleotide eine Interaktion mit dem endogenen antisense-Strang eingehen und somit einen Effekt auf die Gentranskription ausüben können (Schlingensiepen *et al.*, 1997). Dies scheint im Fall der sense Telomerase-RNA ebenfalls möglich, da auch hier, ein wenn auch geringerer, spezifischer Effekt auf die Telomeraseaktivität zu beobachten war.

Es wurde deutlich, dass es nach der anfänglichen Hemmung der Telomerase in den antisense-mTR transfizierten Zellen zu einer Reaktivierung der Telomerase gekommen ist. Ähnliches beschrieb auch Yamaguchi nach den Experimenten mit Gliomzellen (Yamaguchi *et*

al., 1999). Sie beobachteten 3 Wochen nach Hemmung der Telomerase mit antisense-hTR ebenfalls eine Reaktivierung der Telomerase und ein Überleben von 60 % der transfizierten Zellklone. Da unter den antisense-mTR transfizierten RENCA-Zellen morphologisch mehrere Zelltypen erkennbar waren, kann von mehreren Reaktionsmechanismen, mit denen die Zellen auf die Transfektion reagierten, ausgegangen werden. Möglicherweise überlebten einige Zellen die antisense Telomerase-RNA Behandlung durch die sofortige Induktion von alternativen Regulationsmechanismen der Telomerlänge. Andere Zellen erreichten noch den Zustand der Seneszenz, was in den morphologischen Veränderungen zu beobachten war, und stellten dann ihre Proliferation ein. In einigen Zellen kam es möglicherweise zuerst zu einer Hemmung der Telomeraseaktivität, in denen dann durch eine Rückkopplungsreaktion, eventuell mit einer alternativen Telomertrize, wieder Telomeraseaktivität induziert wurde. Dies beschrieb auch Naka *et al.* in der einen untersuchten Darmtumorzelllinie, die keine veränderte Proliferation und Apoptose zeigte. Dort beobachteten sie einen Anstieg der Telomeraseaktivität um das 2-3fache und gleichzeitig eine Konstanz der Telomerlänge (Naka *et al.*, 1999).

Mit den Bestimmungen der Telomerlängen in den unterschiedlich transfizierten RENCA-Zellen sollte die Wirkung der Oligonukleotide auf die Telomerlänge untersucht werden (Abschnitt 4.2.2.4). Hierbei zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Telomerlänge in den sense-mTR, den Kontrollvektor, sowie den antisense-mTR transfizierten RENCA-Zellen. Die untersuchten antisense-mTR Klone besaßen in den ersten PDs nach der Transfektion kaum nachweisbare Telomersequenzen. Dies wurde in der Detektion von sehr schwachen Telomersignalen deutlich. Unterschiedlich starke Telomersignale wurden nur in den antisense-mTR Klonen, trotz des Einsatzes gleicher Mengen DNA, gefunden. In den Kontrollklonen und in den sense-mTR transfizierten RENCA-Zellen sind eindeutig über den gesamten Zeitraum Telomersequenzen nachweisbar. Hier ist auch kein Signalverlust zu beobachten.

In den antisense-mTR Klonen waren wieder Telomersequenzen nach der 43. PD nachweisbar. Nach der Krise der Telomeraseaktivität zeigten die Telomere sogar wieder eine Telomerverlängerung von 7 kb, der Telomerlänge der RENCA-Zelllinie, bis zu 13 kb im antisense-mTR Klon 3. Der Verlust der Telomersignale hängt möglicherweise mit einer Telomerverkürzung in einem Teil der Zellen zusammen. Ausgehend von einer starken Hemmung der Telomerase in den antisense transfizierten RENCA-Zellen, kann angenommen werden, dass es innerhalb von 30 PDs, bei einem möglichen Verlust von 200 bp pro Zellteilung, zu einer Telomerlänge von nun weniger als 2 kb gekommen ist. Eine Telomerlänge von 2 kb ist mit dem TRF-Assay nicht mehr nachweisbar. Somit ist zu

vermuten, dass zu diesem Zeitpunkt nur die Telomere der Zellen, die nicht so stark auf die Hemmung der Telomerase reagierten, bestimmt werden konnten. Von dem Teil der Zellen, deren Telomere sich verkürzten, waren keine Telomersequenzen detektierbar. Nach der Reaktivierung der Telomerase und dem Absterben der seneszierenden Zellen waren dann nur noch die Telomere, der die Hemmung überlebenden Zellen, nachzuweisen.

Interessanterweise sind die Telomerlängen nach der 45. PD teilweise länger als in der untransfizierten Zelllinie. Dies ist z.B. mit rekombinanten Mechanismen zu erklären, die während der Hemmung der Telomeraseaktivität in einigen Zellen zur Erhaltung der Telomerlänge induziert wurden. Möglicherweise kam es auch nach der Hemmung der Telomeraseaktivität zu einer übermäßigen de-novo Telomersynthese, um den Verlust auszugleichen. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Telomerlängen nach der Telomerasehemmung gehen einher mit den Beobachtungen von Mehle *et al.* in Nierentumoren. Die Autoren fanden große Heterogenitäten in den Telomerlängen innerhalb des Tumors, welche abhängig von der Proliferationsrate und der Telomeraseaktivität in den untersuchten Zellarealen waren (Mehle *et al.*, 1994).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen auf, dass eine Behandlung mit antisense Telomerase-RNA eine temporäre Hemmung der Telomerase und eine Verminderung der Proliferation in den Nierenkarzinomzellen der Maus hervorruft. Obwohl die Hemmung der Telomerase durch eine Reaktivierung der Telomerase und anderen Regulationsmechanismen aufgehoben wurde, weisen die Experimente daraufhin, dass auch in Tumorzellen der Maus, mit kurzen Telomeren, eine Beeinflussung der Telomerase-RNA mit antisense-mTR Molekülen möglich ist. Ein Unterschied zwischen der Telomerase in Maus und Mensch scheint dabei ebenso, wie unterschiedliche gewebespezifische Regulationsmechanismen, eine Rolle zu spielen.

5.2.2 Dominant-negative Mutante

Nach den Experimenten mit der Telomerase-RNA war es möglich durch die mittlerweile beschriebene, katalytische Untereinheit der murinen Telomerase direkt am Telomerase Protein anzugreifen (Greenberg *et al.*, 1998). Als Ansatz wurde das Prinzip einer dominant-negativen Mutation des Proteins gewählt (Shamah & Stiles, 1995). In die murinen Nierenkarzinomzellen RENCA wurde deshalb eine mutierte Telomerasesequenz transduziert, welche aufgrund der eingebrachten Mutation in der Zelle ein inaktives Protein bildete. Dieses inaktive Protein mit einer Mutation im katalytischen Zentrum trat dann in Konkurrenz zu dem endogenen, aktiven Telomeraseprotein. Durch den produzierten Überschuss wirkt diese inaktive Form als Inhibitor auf die Aktivität des Telomeraseproteins. Die Ergebnisse dieser

Experimente wurden mittlerweile gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von Dr. Maria Blasco publiziert (Sachsinger *et al.*, 2001).

Nach Einbringen der Mutation in die katalytischen Untereinheit wurde die dominant-negative Mutante mit einem retroviralen Vektor in die RENCA-Zellen transduziert. Anschließend wurde die Entwicklung der dominant-negativ transduzierten Zellen mit den Vektorkontrollen verglichen. Nach der Selektion konnten nur 33 % der dominant-negativ transduzierten Zellklone weiter kultiviert werden, d.h. dass schon frühzeitig eine Hemmung der Proliferation eingetreten war. In einigen Zellklonen wurden morphologische Veränderungen, ähnlich denen seneszierender Zellen, beobachtet (Abschnitt 4.2.2.1). Es war deutlich, dass Zellklone mit einem großen Anteil an veränderten Zellen eine geringe Proliferationsrate besaßen. Die Untersuchungen zeigten eine starke Hemmung der Telomeraseaktivität in allen mit dem dominant-negativen Konstrukt transduzierten Zellklonen. Die Kontrollen besaßen keine veränderte Telomeraseaktivität (Abschnitt 4.2.2.3).

Die Zellklone wurden weiter kultiviert und nach ca. 30-40. PDs war in allen dominant-negativen Zellklonen ein Anstieg der Telomeraseaktivität, wenn auch nicht immer vollständig, zu beobachten. Im Klon pDN5 war immer noch nach 60. PDs eine geringe Hemmung der Telomerase nachzuweisen. Dies zeigt, dass das dominant-negative Konstrukt weiterhin eine Wirkung hervorrief. Die Bestimmungen der Telomerlänge bestätigten dies. Der Nachweis der Telomerlängen mittels der TRF-Analyse ergab in allen untersuchten dominant-negativen Klonen im Vergleich mit den Kontrollen eine Verkürzung der Telomere bis auf 2 kb (Abschnitt 4.2.2.4). Diese Ergebnisse zeigten, dass in den dominant-negativ transduzierten Zellen eine Telomerverkürzung von ca. 100-160 bp pro Populationsverdopplung stattfand. Die Reaktivierung der Telomeraseaktivität ist jedoch nicht vollständig, wie im Klon pDN27 in Abbildung 4-20 zu sehen ist; hier ist eine weitere Telomerverkürzung bis zur 65. PD zu beobachten. Die Messungen der Telomerlänge mit der Flow-FISH Methode bestätigten diese Beobachtungen. Hier zeigt sich, dass es z.B. im Klon pDN1 bis zur 82. PD zu einer messbaren Telomerverkürzung von bis zu 3,9 kb kam. Auch der Nachweis der Telomersequenzen an Metaphasechromosomen bestätigte eine Verkürzung der Telomere in den dominant-negativ transduzierten RENCA-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, sowie der RENCA-Zelllinie.

Trotz durchgehender Selektion der Zellklone mit dem Antibiotika kam es zu einer Reaktivierung der Telomeraseaktivität. Um den Nachweis des mutierten Konstruktes der katalytischen Untereinheit in den Zellklonen zu führen, wurde eine quantitative RT-PCR entwickelt (Abschnitt 4.2.2.5). Mit dieser Analyse konnte spezifisch das mutierte Transkript in allen 11 untersuchten dominant-negativ transduzierten Zellklonen, sowie in 3 Tumorzelllinien, aus den in-vivo Versuchen mit den dominant-negativen Zellklonen,

nachgewiesen werden. Somit wurde der Nachweis geführt, dass das mutierte Transkript während der gesamten Kultivierung der Zellklone und sogar während des in-vivo Wachstums nicht abgebaut worden ist, sondern über den gesamten Zeitraum stabil von den Zellen exprimiert wurde.

Durch Verwendung verschiedener Annealing-Temperaturen konnte genau zwischen dem Nachweis der Wildtyp mTERT und der mTERT Mutante unterschieden werden. Erstaunlicherweise wurde eine erhöhte Expression der Wildtyp mTERT in den dominant-negativ transduzierten Zellklonen beobachtet. Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurde ein weiteres Primerpaar zur Analyse der endogenen mTERT verwendet und mit diesen ebenfalls eine stark erhöhte Expression der endogenen mTERT gemessen. Im Klon pDN10 war eine mehr als 2,5fach erhöhte Expression der mTERT nachzuweisen. In den Kontrollklonen, sowie in der RENCA-Zelllinie konnte, aufgrund der normalerweise sehr geringen Expression der mTERT, mit diesen Primern gar keine endogene mTERT nachgewiesen werden (Abbildung 4-29).

Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal einen Mechanismus auf, durch den es nach der Hemmung der Telomerase zu einer Reaktivierung der Telomerase gekommen ist. Die Induzierung der Expression der endogenen, katalytischen Untereinheit durch die hemmende Wirkung der dominant-negativen Mutante erklärt die Reaktivierung der Telomeraseaktivität. Aufgrund des nun vorliegenden Überschusses an endogener mTERT ist somit auch die geringere Wirkung des dominant-negativen Konstruktes zu erklären. Es ist vorstellbar, dass der Druck in den Zellen zur Erhaltung der Telomere so hoch war, dass es zu dieser Überregulation der Expression der endogenen mTERT gekommen ist. Neueste Ergebnisse von Delhommeau *et al.* bestätigen genau die Beobachtungen der Reaktivierung der endogenen Telomeraseaktivität (Delhommeau *et al.*, 2002). Sie untersuchten die Wirkung der dominant-negativen Mutante von hTERT in humanen Leukämiezellen. Nach Telomeraseinhibierung beschrieben sie eine Telomerasereaktivierung in allen untersuchten Klonen zwei verschiedener Zelllinien. Sie konnten nachweisen, dass zwei unterschiedliche Mechanismen Ursache für die Telomerasereaktivierung sein können. Einerseits kam es in der Mehrheit der transfizierten Zellen zum Verlust der Genexpression der dominant-negativen Mutante als eine mögliche Konsequenz aus dem Selektionsdruck der Langzeitkultur der Zellklone, der Telomerdysfunktion, die durch die Telomerverkürzung hervorgerufen wurde, und der Telomerinstabilität. Andererseits zeigte ein untersuchter Zellklon eine sehr starke Reaktivierung der Telomerase trotz nachweisbarer Expression des dominant-negativen Transgens. In diesem Fall nahm die Überexpression der endogenen hTERT überhand gegenüber dem dominant-negativen Mechanismus der Telomeraseinaktivierung. Diese

Ergebnisse zeigen, dass der in dieser Arbeit beschriebene Mechanismus der Telomerasereaktivierung in den Zellen der Maus auch in humanen Zellen eine Rolle spielt.

Der genaue Weg der Reaktivierung der Telomerase ist bisher unbekannt, möglicherweise kam es zu einer Amplifikation des mTERT Gens. Dies wurde erst kürzlich für Tumoren beschrieben (Zhang *et al.*, 2000). Delhommeau *et al.* untersuchten dies und konnte keine Amplifikation des hTERT-Gens nach Reaktivierung der Telomerase nachweisen (Delhommeau *et al.*, 2002). Über andere, mögliche Veränderungen oder Aktivierung anderer telomerase-assoziiertes Komponenten durch das dominant-negative Konstrukt kann nur spekuliert werden. Vorstellbar wäre auch eine Regulation über das alternative Splicing oder die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie c-myc oder Sp1 (Wu *et al.*, 1999; Ulaner *et al.*, 2000; Kyo *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1999).

Eine Hemmung der Telomeraseaktivität mittels einer dominant-negativen Mutante der katalytischen Untereinheit wurde zuerst für das humane System beschrieben (Hahn *et al.*, 1999b; Zhang *et al.*, 1999). Die Ergebnisse im murinen System verhalten sich jedoch teilweise konträr zu den veröffentlichten Ergebnissen in humanen Zellen. In der Arbeit von Hahn *et al.* wird die Hemmung der Telomerase mit dem dominant-negativen Konstrukt in der humanen, ovarialen Tumorzelllinie 36M beschrieben. Auch Zhang *et al.* beobachteten in ihren Experimenten nach Induktion der dominant-negativen Mutante eine Hemmung der Telomerase. Sie verwendeten für ihre Experimente zwei verschiedene Zelllinien. Die Zelllinie A 431 ist eine epidermoide Tumorzelllinie mit sehr kurzen Telomeren (1-4 kb), wohingegen die immortalisierte embryonale Nierenzelllinie 293 starke Variationen der Telomerlängen zwischen 3 und 12 kb zeigte. Die A 431 Zellen unterlagen einer starken Hemmung der Proliferation und Telomeraseaktivität, sowie bis zum 32. Tag einem vollständigen apoptotischen Zelltod. Diese Zellen zeigten starke, chromosomale Instabilitäten, die sofort zur Apoptose führten. Im Kontrast zum humanen System wurde in den RENCA-Zellen kein apoptotischer Zelltod beobachtet. Die Zelllinie 293 mit den längeren Telomeren war ohne Telomeraseaktivität und mit den sich verkürzenden Telomeren weiter vital. In dieser erfolgte dann, nach der Hemmung der Telomerase, eine Telomerasereaktivierung, trotz Vorhandensein des dominant-negativen Konstruktes. Diese Ergebnisse sind ähnlich den Untersuchungen in den murinen RENCA-Zellen und in den humanen Leukämiezellen (Delhommeau *et al.*, 2002).

In den mit dem dominant-negativen Konstrukt transfizierten RENCA-Zellen konnte in den in-vivo Versuchen kein Effekt auf das Tumorwachstum beobachtet werden (Abschnitt 4.2.2.6). Direkt nach der Isolation der Zellklone wurden Zellen von vier mit dem dominant-negativen Konstrukt transfizierten Klonen in immundefiziente Mäuse injiziert. Hier konnte kein

Unterschied im Tumorwachstum der mTERT dominant-negativen Zellklone und der Kontrollzellen festgestellt werden. Das ungehemmte Tumorwachstum ist auch, mit der Reaktivierung der Telomerase in-vivo zu begründen. Dies steht im Gegensatz zum humanen System. Die humanen, ovarialen Tumorzellen, welche die dominant-negative Mutante exprimierten, zeigten im Verhältnis zu Kontroll- und Wildtypzellen, nach Injektion in immundefiziente Mäuse, kein Tumorwachstum mehr (Hahn *et al.*, 1999b).

Zusammenfassend weisen diese Experimente zur Hemmung der murinen Telomerase mittels einer dominant-negativen Mutante der katalytischen Untereinheit im Vergleich zu den Untersuchungen im humanen System auf einen Unterschied in der Telomeraseregulation zwischen den Spezies hin. Schon 1983 wurden von der Arbeitsgruppe um Robert Weinberg Unterschiede im Prozess der Immortalisierung von Zellen der Maus und des Menschen beschrieben (Weinberg, 1983). Murine Zellen sind im Gegensatz zu humanen Zellen einfach zu immortalisieren, indem mindestens zwei kooperierende Onkogene, wie z.B. *ras* und *myc*, in die Zellen eingebracht werden müssen. Sie besitzen ebenfalls eine hohe spontane Immortalisierungsrate (Land *et al.*, 1983). Humane Zellen dagegen können nicht so einfach immortalisiert werden, sie benötigen mehrere Schritte zur Transformation, zur Überwindung der zellulären Seneszenz und Krisis. Erst durch sequentielle Transfektion von humanen Zellen mit dem SV40 Large T-Antigen, der katalytischen Untereinheit der Telomerase und dem H-ras Onkogen wurde eine vollständige Immortalisierung erreicht (Hahn *et al.*, 1999a). Weitere Unterschiede zeigen sich nicht nur in der verschiedenen Länge der Telomere, sondern auch in der Prozessivität der Telomerase. Es wurde gefunden, dass die humane Telomerase pro Zellteilung Hunderte von Telomerasequenzen synthetisieren kann, die murine Telomerase dagegen nur ein bis zwei (Prowse *et al.*, 1993). Dies ist verständlich aufgrund der langen Telomere der Maus. Sie sind stabiler und erreichen normalerweise nicht so schnell eine kritische Länge. Die Telomerase-RNA „knock-out“ Maus benötigte auch sieben Generationen, in denen sich die Telomere so verkürzten und phänotypische Effekte in hoch proliferierenden Geweben, wie Hoden, Keimzellen, Darmepithelien, sichtbar wurden (Blasco *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998).

5.2.3 Synthetische Oligonukleotide

Als dritte Strategie zur Hemmung der Telomeraseaktivität wurden synthetisch modifizierte Oligonukleotide in verschiedenen humanen und murinen Zelllinien untersucht. Diese chimären Oligonukleotide bieten die Möglichkeit eines gleichzeitigen Angriffs an die Telomerase-RNA und an die katalytische Proteinuntereinheit der Telomerase (Abschnitt 4.2.3).

Synthetische Oligonukleotide besitzen eine hohen Löslichkeit in wässrigen Lösungen. Außerdem erreichen sie, aufgrund der negativen Ladung der Phosphordiesterstrukturen, eine gute Hybridisierung an ein natürliches Oligonukleotid. Ein bedeutender Nachteil ihres Einsatzes im zellulären Milieu ist jedoch ihre schnelle Degradation innerhalb von Stunden durch Exo- und Endonukleasen der Zelle. In phosphorthioat-modifizierten Oligonukleotiden wird ein Sauerstoffatom der Phosphatbrücke zwischen den Nukleotiden durch ein Schwefelatom ersetzt (Abbildung 4-32). Die neuen synthetischen Oligonukleotide behalten dabei ihre Charakteristik, wie Spezifität, Ladung und Löslichkeit, besitzen aber eine bedeutend erhöhte Stabilität in-vitro und in-vivo. Sie zeigen gute pharmakokinetische Eigenschaften und eine geringe Toxizität. Diese Moleküle sind gut charakterisiert und werden häufig für antisense Strategien zur Hemmung der Genexpression verwendet (Schlingensiepen *et al.*, 1997).

Bei direkten Untersuchungen von Oligonukleotiden konnte eine Hemmung durch synthetische antisense Moleküle gegen die Template-Sequenz der Telomerase gezeigt werden (Glukhov *et al.*, 1998). Die Anwendung von hexameren phosphorthioat-modifizierten Telomerasequenzen in Lymphom-Zellen bewirkte eine Hemmung der Telomerase und der Proliferation, sowie induzierte Apoptose. Mit dem Einsatz in einem Xenograft-Mausmodell gelang sogar eine signifikante Reduzierung der Tumorgroße durch Verwendung des 6-Basen Oligonukleotids (Mata *et al.*, 1997).

Phosphorthioat-modifizierte Oligonukleotide zeigen eine hohe Proteinbindungsfähigkeit, vor allem an Serumproteine, was somit ihre Bioverfügbarkeit verringert. Diese Eigenschaft ermöglicht gleichzeitig eine Depotwirkung bei Anwendungen in-vivo, sowie verstärkt durch Bindung an Zelloberflächenproteine ihre endozytische Aufnahme in die Zellen. Diese starke Proteinbindung wird durch die Kürze der Moleküle, geringer als 20 Basen, signifikant reduziert. Kürzlich wurde gezeigt, dass phosphorthioat-modifizierte Oligonukleotide nicht nur komplementär an die Telomerase-RNA binden können, sondern eine hohe Affinität zu einem besonderen Motiv des Telomeraseproteins, der Primerbindungsstelle, besitzen, an dem die zu verlängernde Telomer-DNA zusätzlich zur RNA fixiert ist. Die feste Bindung von Phosphorthioaten an die Primerbindungsstelle führte zu einer Hemmung der Telomerase im subnanomolaren Bereich und macht diese zu wirksamen Hemmstoffen der Telomerase (Matthes & Lehmann, 1999).

Auch PNAs (peptid nucleic acid) wurden bisher erfolgreich zur Hemmung der Telomerase eingesetzt (Norton *et al.*, 1996). In PNAs wird der Phosphatrücken der DNA-Sequenz durch Aminoglycingruppen ersetzt. Dadurch werden die Moleküle extrem stabil, resistent gegen Nukleaseverdau und können starke Bindungen zu RNA und DNA eingehen. Deshalb werden

diese Moleküle auch gern für Hybridisierungen, wie auch in dieser Arbeit für die Detektion und Quantifizierung der Telomerenden, verwendet. Ein Nachteil der PNAs zum Einsatz in-vitro oder in-vivo ist die schlechte Löslichkeit und der Verlust der negativen Ladung der Phosphatverbindungen.

Eine andere Modifizierung der Oligonukleotide sind die Phosphoramidate (Abbildung 4-32). Diese neuartigen Verbindungen bilden sehr stabile Duplexe mit Einzelstrang-DNA oder RNA, sowie Triplexe mit Doppelstrang-DNA. Weiterhin sind sie resistent gegen Nukleasedegradation in der Zelle. Diese Eigenschaften machen Phosphoramidate zu interessanten und auf ihren Einsatz zu überprüfenden Oligonukleotiden.

Aufbauend auf diesen Befunden steht die Entwicklung von chimären Oligonukleotiden. Diese bestehen aus unterschiedlich modifizierten Teilen und kombinieren die positiven Eigenschaften der verschiedenen modifizierten Oligonukleotide. Die hier verwendeten chimären Oligonukleotide sind Phosphorthioat-modifiziert und binden sich mit hoher Affinität an die Primerbindungsstelle des Telomeraseproteins. Der andere Teil dagegen ist so modifiziert worden, dass eine optimale Bindung zur Telomerase-RNA gewährleistet wird (Abbildung 4-31). Der Einbau von Phosphoramidat-Modifizierungen verstärkt hierbei die Bindung und Stabilität der Oligonukleotide. Damit sollte es möglich sein, mit einem Oligonukleotid zwei Targets der Telomerase zu treffen, und die Effizienz und Selektivität bisheriger Oligonukleotide wesentlich zu erhöhen (Janta-Lipinski *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden chimäre Oligonukleotide an verschiedenen Zelllinien, insbesondere an Nierenkarzinomzelllinien, auf ihre Wirksamkeit gegen die Aktivität der Telomerase in-vitro getestet. Die telomerase-spezifischen Oligonukleotide zeigten dabei eine sehr gute Wirksamkeit. Auffällig ist die unterschiedliche Sensitivität der Nierenkarzinomzelllinien auf den Einsatz der Oligonukleotide. Bemerkenswert ist die Zelllinie A 704. Sie besitzt eine sehr geringe Proliferationsrate und reagierte sehr stark auf alle eingesetzten Oligonukleotide. Mit drei Oligonukleotiden (T 166, T 319, T 309) wurde eine vollständige Hemmung erreicht, aber auch in den Kontrollen kam es zu einer Hemmung der Telomeraseaktivität. Über die Ursachen für dieses Phänomen kann nur spekuliert werden, möglicherweise ist die Telomeraseaktivität sehr instabil, so dass es nach einer Bindung der Phosphorthioate an andere Proteine zu einer unspezifischen Hemmung des Telomerasekomplexes kommen konnte. In der Zelllinie Caki-1 hingegen wurde mit den telomerase-unspezifischen Oligonukleotiden keine bzw. nur eine schwache Hemmung der Telomerase gemessen. Aber mit den methylierten Phosphorthioaten T 319 und T 309 konnte eine Hemmung ab 10 bzw. 50 nM erreicht werden. Dies beweist, dass hier eine spezifische Wirkung der Inhibitoren auf die Telomeraseaktivität vorliegt. Bei Einsatz, des in den anderen

Zelllinien am stärksten wirksamen Oligonukleotids T 166, zeigt die Caki-1 Zelllinie nur noch bei 10 nM eine geringe Telomeraseaktivität. Da Caki-1, die Nierenkarzinomzelllinie mit der höchsten gemessenen Telomeraseaktivität darstellt, ist dies möglicherweise ein Dosis-Wirkungsproblem.

Im Vergleich der modifizierten Oligonukleotide zeigt sich eine besonders hohe Wirksamkeit der chimären Oligonukleotide aus Phosphorthioat und methylierten Phosphordiester Molekülen. Das wirksamste Oligonukleotid T 166 besteht aus einer nur 6 Nukleotiden langen methylierten Sequenz, welche an die Telomerase-Matrize bindet. Diese kurze Sequenz scheint völlig auszureichen, eine längere spezifische Sequenz von 11 Nukleotiden, wie in T 319 und T 309, ist nicht wirksamer. Die Phosphoramidatmodifikationen in den Oligonukleotiden T 252, T 321 und T 250 wurden nicht als so wirksam getestet, obwohl auch T 250 nur die 5 telomerase-spezifischen Nukleotide besitzt.

Trotz der deutlichen Wirkung der telomerase-spezifischen Oligonukleotide, ist auf ein Problem in den in-vitro Experimenten hinzuweisen. Möglicherweise erreicht man durch Zugabe der phosphorthioat-modifizierten Oligonukleotide eine falsch-positive Aussage aufgrund der hemmenden Wirkung des Inhibitors auf den TRAP-Assay an sich. Das Nachweisverfahren zur Telomeraseaktivität beruht auf einer Telomerverlängerung mit anschließender Amplifikation über den telomerase-spezifischen TS-Primer. Es ist deshalb vorstellbar, dass es durch Hybridisierung mit dem Oligonukleotid zu einer Hemmung des TS-Primers kommt, welche dann die verringerte, gemessene Telomeraseaktivität nach sich zieht. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von synthetischen, modifizierenden Oligonukleotiden eine wirksame selektive Möglichkeit zur Hemmung der Telomerase darstellt. Der Einsatz vor allem auch in Nierenkarzinomzellen ist über eine gerichtete Applikation der Oligonukleotide auch in-vivo vorstellbar. Diese Experimente verlangen jedoch noch weitere Untersuchungen in Zellkulturen und Tiermodellen, sowie weitere Spezifizierung aus dem großen Spektrum der chemischen Modifikationen. Der Einsatz synthetischer Oligonukleotide ist eine noch wenig untersuchte Strategie zur Hemmung der Telomeraseaktivität in Tumorzellen, die noch viele Optionen offen läßt.

5.3 Telomerase – ein Ausblick

Die Telomerase ist ein Ribonukleoproteinkomplex, dem in den letzten Jahren ein großes wissenschaftliches Interesse entgegengebracht wurde. Die Forschungen haben gezeigt, dass die Telomerase ein Schlüsselmolekül für die Immortalisierung von normalen Körperzellen darstellt. In Untersuchungen an unterschiedlichen Tumor- und Normalgeweben konnte für die Telomerase eine Spezifität von ca. 85 % in malignen Geweben gezeigt werden. Deshalb

gibt es viele Forschungsgruppen, die sich gewebespezifisch mit diagnostischen, therapeutischen und regulativen Problemen der Telomerase beschäftigen.

Die Verwendung der Telomerase als Marker in der Krebsdiagnostik wurde aufgrund ihrer hohen Spezifität in Tumorgeweben als sehr vielversprechend angesehen. Der TRAP-Assay entwickelte sich schnell als Standardnachweisverfahren zur Telomeraseaktivität, stellt aber aufgrund seiner Komplexität kein handhabbares Verfahren für einen breiteren, diagnostischen Einsatz dar. Die Euphorie ist durch das Auffinden von Telomeraseaktivität in einigen normalen Zellen (hämatopoetische Stammzellen, aktivierte Lymphozyten) und proliferierenden Geweben (Darmepithelzellen, Basalzellen der Epidermis) gemindert worden (Counter *et al.*, 1995; Yasumoto *et al.*, 1996; Harle & Boukamp, 1996).

Seit der Beschreibung der Telomerase-RNA hTR und der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT ist es auch möglich, diese Bestandteile nachzuweisen. Gängige Nachweisverfahren für die hTR und hTERT sind in-situ Hybridisierungen, sowie der RNA-Nachweis per Northernblot-Hybridisierungen und RT-PCR. Ein zufriedenstellender Nachweis auf der Proteinebene liegt für die Reverse Transkriptase hTERT bisher noch nicht vor. Einzelne immunohistochemische Nachweise und Westernblots mit Antikörpern gegen hTERT wurden veröffentlicht, scheinen jedoch für breitere diagnostische Anwendung bisher nicht sensitiv und verlässlich genug zu sein (Hiyama *et al.*, 2001).

In mehreren Studien ist bei der Diagnostik von Blasenkarzinomen die Bestimmung der hTERT im Urin als sensitiver als der bisherige Standard der Urinzytologie beschrieben worden (Ito *et al.*, 1998b; Müller, 2002). Die Anwendung von nicht-invasiven Nachweisverfahren zur Detektion von Blasenkarzinomen würde eine Vereinfachung im Rahmen der Erstdiagnose und Tumornachsorge im Gegensatz zu den bisher üblichen Verfahren darstellen. Auch die in unserem Labor durchgeführte Studie an 30 Urinproben von Tumorpatienten konnte in 83 % der Proben hTR nachweisen, in Proben von gesunden Patienten wurde in 15 % eine geringe Expression von hTR gemessen (Müller *et al.*, 1998). In der noch unveröffentlichten Studie unseres Labors zum quantitativen Nachweis der hTERT und hTR im Urin deutet sich ebenfalls eine gute Korrelation zwischen der gesunden Kontrollgruppe, sowie Patienten mit benignen oder malignen Blasentumoren an (Dr. M. Müller, persönliche Mitteilung). Diese Studien sind sehr verheißungsvoll, aber noch entfernt davon, die Telomerase in der diagnostischen Routine einzusetzen. Dafür werden noch weitere Studien zur Validierung der Spezifität und Sensitivität der Nachweise in Tumor- und Normalgeweben benötigt.

Vielversprechend, für den Einsatz der Telomerase als Marker für maligne Zellen, sind die Ansätze zum diagnostischen Einsatz in Blut und Plasma von Tumorpatienten (de Kok *et al.*, 2000) oder in Abstrichen von Zervixkarzinomen (Wisman *et al.*, 2001). Mit Messungen der

Telomeraseaktivität und der hTERT-Expression in Feinnadelbiopsien von thyroidalen Knoten oder Gallengewebe konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Telomerasebestimmung und die hTERT-Analysen zum Nachweis von malignen Zellen in schwer zugänglichen Geweben einsetzbar sind (Saji *et al.*, 1999). Relativ neu wurde der diagnostische Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen über eine RT-PCR für hTERT in Blut und Plasma entwickelt. Die Gruppe von Paul Anker von der Universität Genf fand in Brustkrebstumoren eine hTR- und hTERT-Expression in jeweils 94 %, im Serum konnten sie hTERT in 5 von 18 Proben (28 %), sowie hTR in 4 von 16 Proben (25 %) nachweisen (Chen *et al.*, 2000). Eine Quantifizierung mittels „Real-Time“ RT-PCR führten Dasi *et al.* in Plasma- und Blutproben von Darmkarzinom- und Lymphompatienten durch (Dasi *et al.*, 2001). Sie erreichten eine signifikante Korrelation der Mittelwerte beim Nachweis der hTERT im Plasma der Tumorpatienten im Vergleich zu Normalpatienten. Es bestand jedoch keine Korrelation zu Tumorstadium und zur Höhe der Expression. Dieses sind erste interessante Ergebnisse, die andeuten, dass es möglich ist, mit Hilfe der Telomerasebestimmung durch eine Markeranalyse im Blut Tumor- und Normalpatienten voneinander zu diskriminieren.

Die diagnostischen Untersuchungen an den Nierenzellkarzinomen in dieser Arbeit zeigten eine von der Telomeraseaktivität abhängige Expression der katalytischen Untereinheit des Telomeraseproteins. Jedoch waren nicht mehr als 63 % der Nierenkarzinome telomerase-positiv, sowie in nur 34 % der Nierenkarzinome konnte eine Expression der hTERT nachgewiesen werden. Generell wurde in den Nierenkarzinomen, ein sehr heterogenes Bild der Expression der Telomerasekomponenten beobachtet. Einerseits wurden Tumoren mit hoher Expression der katalytischen Untereinheit, der Telomerase-RNA und der Telomeraseaktivität gefunden, andererseits aber auch Tumoren mit hoher Expression der katalytischen Untereinheit, aber ohne Telomeraseaktivität und Telomerase-RNA Expression analysiert. Gewebespezifische Unterschiede scheinen besonders in den Nierenkarzinomen eine große Bedeutung zu haben, so dass sich hier die Verwendung der Telomerase nicht als nutzbringend für den diagnostischen Einsatz, aber als Beitrag zur Aufklärung der Rolle der Telomerase in den Nierenkarzinomen erweist.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zum therapeutischen Angriff der Telomerase zeigen, dass es möglich ist, in Nierenkarzinomzellen der Maus eine Hemmung der Telomerase mit daraus resultierender Hemmung der Zellproliferation hervorzurufen. Eine Verhinderung der Tumorentstehung in-vivo bzw. ein apoptotischer Zelltod, wie im humanen System beobachtet, konnte jedoch in den murinen Nierenkarzinomzellen nicht nachgewiesen werden. Wie auch in einigen humanen Zellen wurde eine Reaktivierung der Telomerase

beobachtet, was auf zellspezifische Regulationsmechanismen hinweist, die der Hemmung der Telomerase entgegenwirken.

In der Literatur sind sehr vielfältige Möglichkeiten zur Hemmung der Telomerase beschrieben und dabei unterschiedliche Auswirkungen in den Zellen beobachtet wurden. In allen Untersuchungen war sehr deutlich, dass zell- und gewebespezifische Unterschiede in der Regulation der Telomerase auftreten. Zelltypische Besonderheiten, Chromosomeninstabilitäten und alternative Mechanismen zur Telomererhaltung sind für einen therapeutischen Einsatz der Telomerase in einem Tumormodell in Betracht zu ziehen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse zur Hemmung der Telomerase in humanen Zellen im Vergleich zu murinen Zellen, die in unseren Experimenten auftraten, können einerseits mit der Besonderheit der verwendeten RENCA-Zelllinie zusammenhängen oder aber auf Unterschiede in den Regulationsmechanismen der Telomerasen von Maus und Mensch hinweisen (Kipling, 1997). In der RENCA-Zelllinie, die mit ihren kurzen Telomeren für murine Zellen eine Besonderheit darstellt, konnte in den FISH-Untersuchungen festgestellt werden, dass die Zellen einen vermehrten Chromosomensatz besitzen (Abbildung 4-24). Der veränderte Karyotyp und die verkürzten Telomere weisen auf starke Veränderungen im Zellteilungsprozess während der Tumorgenese der Nierenkarzinomzelllinie der Maus hin. Ein weiterer beschriebener Unterschied zwischen der Telomeraseaktivität in murinen und humanen Zellen ist die geringere Prozessivität der murinen Telomerase (Kipling, 1997). Das bedeutet, dass während der Telomersynthese der Telomerase in der Maus weniger Telomerwiederholungen pro Zellteilung synthetisiert werden, als in humanen Zellen. Eine hohe Anzahl von neusynthetisierten Telomerwiederholungen ist, bei normalerweise 40 kb langen Telomeren der Maus, für die Erhaltung der Telomerlängen nicht so notwendig. Auch die höhere Aktivität der Telomerase in Normalgeweben der Maus, sowie eine starke Aktivität in der Leber und geringere Aktivitäten in Niere und Milz stellen einen Unterschied zum humanen System dar (Prowse & Greider, 1995). Eine häufigere, spontane Immortalisierungsrate von normalen Zellen der Maus im Vergleich mit menschlichen Zellen weist ebenfalls auf unterschiedliche Regulation in den beiden Systemen hin. Die Unterschiede zwischen dem menschlichen und dem murinen System sind bei der Verwendung der Maus als Modell zur Untersuchung der Telomerase zu beachten. Die mTR knock-out Maus entwickelt z.B. erst ab der 4. Generation Tumoren und andere Pathologien, die mit dem menschlichen Altern vergleichbar sind, und stellt somit erst in den späten Generationen ein gutes Modell für die Tumorentstehung dar (Herrera *et al.*, 1999).

Bei der Evaluierung der Telomerase als Antitumortarget müssen einige Besonderheiten beachtet werden. Die Hemmung der Telomerase soll eine kritische Verkürzung der Telomere

hervorrufen, was nur nach einer entsprechenden „Lag“-Phase erfolgen kann. Neuere Forschungen zeigen, dass der Effekt der Telomerasehemmung in Zellen auch sehr schnell zu beobachten ist. Dies weist darauf hin, dass wenn die Telomere in Tumorzellen schon besonders verkürzt sind, eine Wirkung von Telomeraseinhibitoren auch früher auftreten kann. Jeweils nur ein paar Telomere müssen die kritische Länge erreichen, um die Stabilisierung der Chromosomen durch die Telomere aufzuheben (Nicol *et al.*, 2001). Die Detektion von Telomeraseaktivität in einigen besonders proliferativen Geweben (T- und B-Zellen, Hodenzellen) eröffnet ungewollte Nebeneffekte. Jedoch ist zumeist der Unterschied in der Telomeraseaktivität sehr groß, so dass der therapeutische Effekt auf die Tumorzellen eine größere Signifikanz besitzt. Weiterhin ist das Vorhandensein von alternativen Mechanismen zur Telomererhaltung zu beachten. Das Vorhandensein dieser Mechanismen kann einen Hinweis auf eine Resistenz in der Telomerasehemmung geben und sollte vor Einsatz eines Telomeraseinhibitors überprüft werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auf, dass eine therapeutische Anwendung der Telomerase am Tumor prinzipiell möglich ist. Vielversprechende anwendungsnahe Ansätze sind auf dem Gebiet der synthetischen Oligonukleotide (PNA, chimäre Oligonukleotide, Ribozyme, G-Quartettstrukturen) zu finden (Abschnitt 2.3). Möglicherweise können auch zwei oder mehrere Komponenten des Telomerasekomplexes synergistisch angegriffen werden. Ein potentieller Telomeraseinhibitor sollte insbesondere eine hohe Spezifität zur Telomerase besitzen und deren Reaktivierung unterdrücken. Aufgrund der zuerst abzuwartenden Verkürzung der Telomere bis zur Wirkung der Telomeraseinhibitoren auf die Proliferation erscheint die Anwendung der Telomerase als Target in Tumorzellen nicht geeignet für eine Primäranwendung. Jedoch ist es vorstellbar, Telomeraseinhibitoren nach chirurgischer Entfernung der Tumormasse zu applizieren, und in Kombination mit einem Immuntherapeutikum, Chemotherapeutikum oder mit Radiotherapie über eine längere Zeit zu verabreichen. Erste klinische Studien zum Einsatz von Telomeraseinhibitoren, z.B. beim kleinzelligen Lungenkarzinom, sind bereits in der Vorbereitung (Nicol *et al.*, 2001). Aufgrund der telomerase-spezifischen Besonderheiten benötigen die ersten klinischen Studien genaue und kritische Planungen in der klinische Anwendung (Kelland, 2001).