

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Die Rolle der Telomerase in der Immortalisation und malignen Transformation von Nebennierenrindenzellen

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Birgit Zwermann, geb. Jacobmeier
geboren in Lübbecke

2012

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Felix Beuschlein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Günter Stalla

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2012

Für Linus und Marie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
1.1	Telomere.....	9
1.1.1	Struktur der Telomere	9
1.1.2	Funktion der Telomere	11
1.2	Seneszenz	12
1.2.1	Replikative Seneszenz.....	12
1.2.2	Prämaturre Seneszenz.....	13
1.2.3	Molekulare Mechanismen der Seneszenz	13
1.3	Telomerase	14
1.4	Alternative Telomer-Verlängerungsmechanismen (ALT).....	18
1.5	Die Nebennierenrinde	19
1.6	Tumore der Nebennierenrinde	21
1.7	Das ösophageale Plattenepithel.....	22
1.8	Das ösophagealen Plattenepithelkarzinom.....	22
1.9	Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung.....	23
1.10	Die Rolle der Telomerase in der Tumorentstehung	27
2	Zielsetzung.....	29
3	Material und Methoden.....	31
3.1	Material	31
3.1.1	Chemikalien	31
3.1.2	Enzyme und Antikörper	33
3.1.3	Zellkulturmedien	34
3.1.4	Puffer, Lösungen	34
3.1.5	Oligonukleotide.....	37
3.1.6	Geräte	37
3.1.7	Zellmaterial	38
3.2	Methoden.....	39
3.2.1	Zellbiologische Methoden.....	39
3.2.1.1	Medien.....	39
3.2.1.2	Kultivieren der Zellen	39
3.2.1.3	Passagieren der Zellen.....	39
3.2.1.4	Bestimmung der Zellzahl	40
3.2.1.5	Bestimmung der Populationsverdopplung	40
3.2.1.6	Bestimmung der SA- β -Galaktosidase	40
3.2.1.7	Bestimmung der Zellproliferation	41
3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	42
3.2.2.1	Agarosegel-Elektrophorese	42
3.2.2.2	Absorptionsmessungen.....	42
3.2.2.3	Bestimmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT).....	43
3.2.2.4	RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction)	44
3.2.2.5	Real-Time quantitative PCR	46
3.2.2.6	Bestimmung der Telomerlängen (TRF-Analyse).....	48
3.2.2.7	Bestimmung der Telomeraseaktivität.....	51
3.2.2.8	Western-Blot	54
4	Ergebnisse.....	58
4.1	Untersuchungen an oesophagealen Plattenepithelzellen.....	58
4.2	Untersuchungen an Nebennierenrindenzellen.....	62
4.2.1	Herstellen genetisch veränderter Nebennierenrindenzellen.....	62

4.2.2	Charakterisierung der Nebennierenrindenzellen	62
4.2.3	Wachstumseigenschaften der Nebennierenrindenzellen	67
4.2.4	Replikative Lebenszeit	67
4.2.5	Seneszenz	69
4.2.6	Bestimmung der Zellproliferation	70
4.2.7	hTERT mRNA-Expression	71
4.2.8	Telomeraseaktivität	72
4.2.9	Telomerlängenbestimmung	73
4.2.10	Untersuchungen von Zellzyklus-Proteinen	74
5	Diskussion.....	78
5.1	Ektope Expression der Telomerase führt in oesophagealen Plattenepithelzellen zur Immortalisierung	78
5.2	Charakterisierung von Nebennierenrindenzellen mit hTERT Überexpression.....	79
5.3	Trotz ektope Expression der Telomerase gehen Nebennierenrindenzellen in Seneszenz	80
5.4	Hinweise aus der Telomerbiologie für den Eintritt der NNR-hTERT-Zellen in die Seneszenz	81
5.5	Genetische Veränderungen in Signaltransduktionswegen von Nebennierenrindenzellen nach Überexpression von hTERT	82
5.6	Eine alleinige Aktivierung der Telomerase führt in humanen Nebennierenrindenzellen nicht zur Immortalisierung	84
5.7	Schlussfolgerungen	87
6	Zusammenfassung	88
7	Literaturverzeichnis	90
8	Veröffentlichungen	103
9	Danksagung	104
10	Lebenslauf.....	

Abkürzungsverzeichnis

ALT	<i>Alternative lengthening of telomeres</i> , alternativer Telomerverlängerungsmechanismus
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ACTH	Adrenocorticotropin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPE	Rinderhypophysenextrakt
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Albumin aus Rinderserum
cDNA	Copy DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propansulfonat
CPDL	Cumulative PD Level
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
EPC	<i>esophageal epithelial cell</i> , ösophageale Plattenepithelzellen
FCS	fötales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten Wachstumsfaktor
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HS	<i>Horseserum</i> , Pferdeserum
hTERT	menschliche katalytische Untereinheit der Telomerase
hTR	RNA-Komponente der Telomerase (<i>human telomerase RNA</i>)
IS	Interner Standard
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
M	molar
m	Milli
min	Minute(n)
M-MLV	Moloney-Maus-Leukemia-Virus
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
n	Anzahl der untersuchten Proben
nM	Nanomolar
Na-Acetat	Natriumacetat
nm	Nanometer
NNR	Nebennierenrinde
NP-40	Tergitol (Nonylphenolethoxylat mit MO=40)
OD	Optische Dichte
p14, p16	Protein 14, 16
p21, p53	Protein 21, 53
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung

PC	Phenol: Chloroform, Verhältnis 1:1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Populationverdopplung
pmol	Picomol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pRb	Protein Retinoblastom
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
RNase-Out	Ribonuklease-Inhibitor
RT	Reverse Transkriptase
rpm	Umdrehungen pro Minute
SA-β-Galaktosidase	<i>senescence associated</i> β-Galaktosidase
SCC	<i>side chain cleavage enzyme</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
SFM	<i>serum-free medium</i> , Serumfreies Medium
sek	Sekunde
SSC	<i>sodium salt citrate</i> , Natriumcitrat
StAR	<i>steroidogenic acute regulating protein</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N' N' N' N'-Tetramethylethylendiamin
TERT	<i>Telomerase reverse transkriptase</i>
TIN2	<i>TRF1-interacting nuclear protein 2</i>
TRF	Telomer-Restriktionsfragment
Tris	Tris- (hydroxymethyl) –aminomethan
TSR8	Telomerasesubstrat, verlängert um 8 repetitive Telomersequenzen
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Telomere

Als Telomere, abgeleitet aus den griechischen Worten (*telos*, Ende) und (*meros*, Ort), werden die Endabschnitte linearer Chromosomen bezeichnet. Die Grundlagen für die Telomerforschung wurden in den 30er und 40er Jahren durch die späteren Nobelpreisträger Hermann Müller (Nobelpreis 1946) und Barbara McClintock (Nobelpreis 1983) gelegt. Die Forscher fanden heraus, dass die Chromosomenenden eine spezielle Struktur aufweisen, die ihnen Stabilität und Schutz verleihen (Müller 1938; McClintock 1941). Anfang der 70er gelang es Blackburn und Gall, die Telomersequenz der Chromosomenenden des Ciliaten *Tetrahymena* aufzuklären, welche aus der repetitiven Sequenz TTGGGG besteht (Blackburn und Gall 1978).

Im Jahre 1988 konnte die Arbeitsgruppe von Moyzis die aus 6 Basen bestehende menschliche Telomersequenz TTAGGG identifizieren (Moyzis *et al.*, 1988). Die Telomere setzen sich aus einer großen Anzahl sich wiederholender Sequenzen (Repeats) doppelsträngiger DNA, einem überhängenden Einzelstrang sowie spezifischen telomerbindenden Proteinen zusammen und bilden einen Telomer-Komplex.

Die Anzahl der Telomer-Sequenzen variiert zwischen den einzelnen Spezies. So umfasst die Telomerlänge beim Mensch zwischen 2.000 und 10.000 Basenpaaren (bp) (Engelhardt und Martens, 1998), während die Maus bis zu 10-mal längere Telomere aufweist (Forsyth *et al.*, 2002).

1.1.1 Struktur der Telomere

Die Telomer-DNA und die spezifischen Telomerbindeproteine bilden eine Art „Schutzkappenstruktur“. Dabei bildet der guanosinreiche Strang der telomeralen DNA, der in 5'-3' Richtung orientiert ist (Zakian, 1995), durch Faltung seines 3'-Endes mit ca. 100-200 Basenpaaren über den komplementären Strang den T-Loop (telomere loop) (Griffith *et al.*, 1999, s. Abb. 1).

Durch weiteres Annealing des einzelsträngigen 3'-Überhangs mit Teilen der Doppelstrang-DNA des Telomers, das den D-Loop (displacement loop) formiert, ergibt sich insgesamt an den Chromosomenenden statt eines freiliegenden DNA-Endes eine Schleifenstruktur (Neumann und Reddel, 2002).

Für die Bildung und Stabilisierung dieser Schutzkappen-Formation sind die telomerbindenden Proteine verantwortlich. Die wichtigsten humanen telomerbindenden Proteine sind TRF1 (telomeric repeat binding factor 1) und TRF2 (telomeric repeat binding

factor 2). TRF1 und TRF2 verfügen beide über eine DNA-Bindedomäne, mit der sie am Doppelstrang der Telomere binden können. Des Weiteren bilden TRF1 und TRF2 mit anderen Proteinen Komplexe, die wichtige Funktionen für die Bildung und die Stabilisierung der Loop-Formation ausüben. Die Hauptfunktion des TRF 1-Protein-Komplexes ist vermutlich die Kontrolle der Telomerlänge über einen negativen Feedback-Mechanismus (van Steensel, B. und de Lange, T. 1997). Bisher bekannte telomerspezifische Proteine, die mit dem TRF1-Protein einen Komplex bilden, sind Tankyrase 1 und 2, TIN2 und PINX1 (s. Abb. 1). *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass die Bindung von TRF1 an der Telomer-DNA durch die Enzyme Tankyrase 1 und Tankyrase 2, zwei poly ADP-Ribose Polymerasen (PARPs), gehemmt werden kann (Smith *et al.*, 1998). Dagegen schützt TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2) vermutlich durch Bindung an TRF1 dieses vor Modifikation durch die Tankyrase (Ye *et al.*, 2004). Das vierte Protein, das an TRF1 bindet, ist PINX1 (PIN2-interacting protein 1). Möglicherweise beeinflusst PINX1 den Telomerlängenmechanismus durch Hemmung der Telomeraseaktivität (Smogorzewska, A und de Lange, T. 2004).

Die primäre Funktion des TRF2-Proteins besteht darin, humane Telomere durch die Bildung der T-Loop-Formation vor der Fusion mit anderen Chromosomenenden zu schützen (van Steensel *et al.*, 1998). Bei Experimenten mit Hemmung von TRF2 kam es zu Telomer-Dysfunktionen, die zur unmittelbaren Induzierung von Apoptose führten (Karlsleder *et al.*, 1999). Als interagierender Partner wurde hRap1 (TRF2-interacting telomeric protein Rap1) beschrieben, welcher an der Regulation der Telomerlänge beteiligt ist (Li *et al.*, 2000). Als zweiter interagierender Partner wurde der Mre11 Komplex, bestehend aus Mre11 (meiotic recombination 11), Rad50 (DNA double-strang break repair protein) und Nbs1 (nijmegen breakage syndrom1), beschrieben (Zhu *et al.*, 2000), der eine Bedeutung bei der Generierung und Erhaltung der T-Loop-Formation haben könnte. Vermutlich sind WRN (Werner syndrome helicases) und BLM (Bloom syndrome helicases) als proteinbindende Enzyme von TRF2 ebenfalls in der T-Loop-Formation involviert (de Lange 2004). Ein Zusammenhang wurde zwischen der Struktur-spezifischen Endonuklease ERCC1/XPF und TRF2 beschrieben. So führt die Abwesenheit von TRF2 zu einem ERCC1/XPF-abhängigen Verlust des telomerischen 3'-Überhangs (Zhu *et al.*, 2003).

Diskutiert wird ein weiteres Telomerbindendes Protein - POT1 (protection of telomeres 1), welches sowohl am Einzelstrang der Telomere bindet und an der D-Loop Konfiguration beteiligt ist (Palm und de Lange 2008) als auch mit TRF1 einen Komplex eingeht und vermutlich entscheidend für die Kontrolle der Telomerlängen ist (Loayza und de Lange 2003).

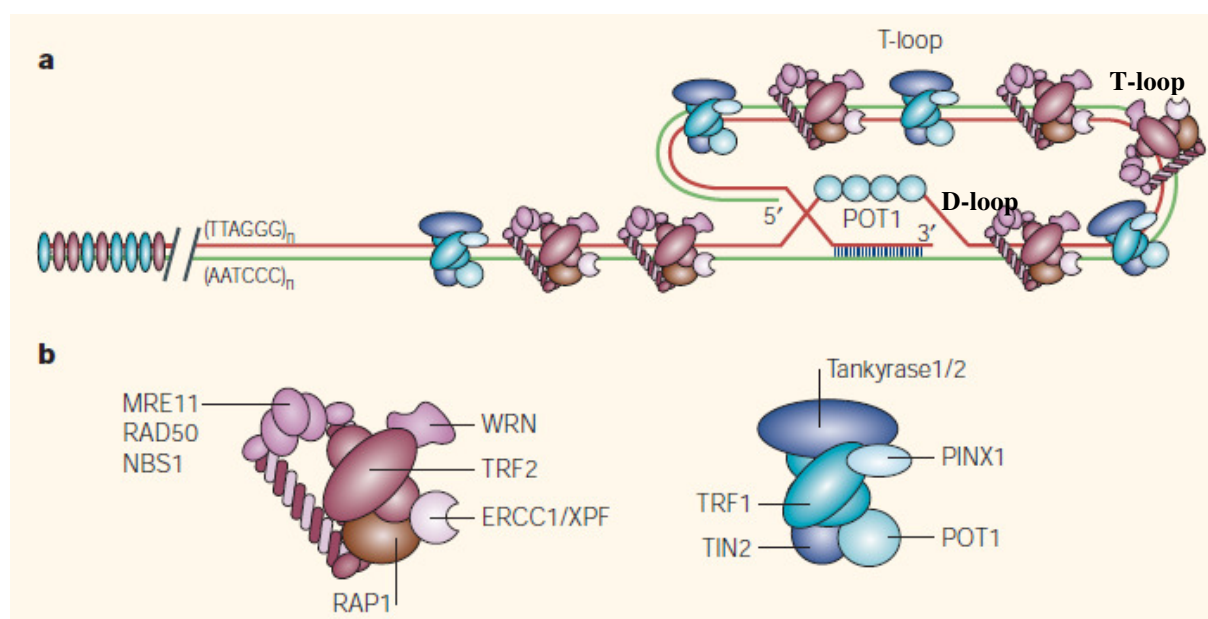


Abb. 1: Humane Telomer-Struktur. a: Humane Telomere bestehen zu 2-30 kbp aus Duplex-TTAGGG Wiederholungen, die am Ende 100-200 Single-Strang TTAGGG Repeats aufweisen, die den T- und D-Loop bilden. b: TRF1 und TRF2-Komplexe. (modifiziert nach de Lange 2004)

Weitere Telomerbindeproteine, die zum Schutz der Telomere beitragen, sind die Untereinheiten Ku70, Ku80 (ATP-dependent DNA helicase II subunit 70kDa and 80kDa) und die katalytische Untereinheit der DNA abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) (Hsu *et al.*, 2000; Samper *et al.*, 2000).

1.1.2 Funktion der Telomere

Die wichtigste Aufgabe der Telomere besteht darin, die Stabilität und Integrität der Chromosomen zu wahren (Müller, 1938). Telomere schützen die Chromosomenenden vor enzymatischer Degradation, Rekombination und Fusion mit anderen Chromosomenenden (Blackburn, 1991; Vaziri und Benchimol, 1996). Dieses wird durch die spezielle Architektur der Telomere, der T-Loop-Formation, die den Chromosomenenden wie „Kappen“ aufsitzen, gewährleistet (Griffith *et al.*, 1999). Die Kappenfunktion ermöglicht es der Zelle, zwischen intakten Chromosomenenden und freiliegenden DNA-Enden z.B. infolge von Strangbrüchen oder anderen DNA-Schäden zu unterscheiden (Zakian, 1995). Ein Verlust der Kappenfunktion hat schwerwiegende Auswirkungen, denn die Fusion von ungeschützten Chromosomen führt zu dizentrischen und multizentrischen Chromosomen, welche während der Mitose instabil sind und zu genomischen Schäden führen können (Smogorzewska, A und de Lange, T, 2004, van Steensel, B., 1998). Zellen verfügen über spezielle Kontrollmechanismen (DNA damage checkpoints), die durch freiliegende DNA-Enden

Signalkaskaden wie p53 aktivieren und zur DNA-Reparatur, zum Zellzyklus-Arrest, Seneszenz oder sogar zur Apoptose der Zelle führen können (de Lange, 2002).

Telomere sind auch für die Positionierung der Chromosomen innerhalb des Zellkerns bei der Paarung homologer Chromosomen in der Mitose und Meiose verantwortlich (Blackburn 1994).

1.2 Seneszenz

Die Theorie, dass humane Zellen in Kultur eine unbegrenzte Lebensspanne haben, wurde 1961 von Hayflick & Moorehead widerlegt, die herausfanden, dass Fibroblasten über eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen hinweg proliferieren und anschließend in einer stabilen und langfristigen Arretierung des Zellzyklus enden (Hayflick und Moorehead, 1961). Dieses „Ruhe-Stadium“ wird als Seneszenz (lat. *senescere* = altern) oder Hayflick Limit bezeichnet. Seneszente Zellen sind in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretiert und nicht in der Lage, nach mitogener Stimulation in die S-Phase einzutreten (Sherwood *et al.*, 1988).

Inzwischen lassen sich zwei Formen der zellulären Seneszenz unterscheiden: die replikative und die prämatüre Seneszenz.

1.2.1 Replikative Seneszenz

Auslösender Faktor der replikativen Form ist die progressive Telomerverkürzung. Diese wird auch als Mortalitätsstadium 1 (M1) bezeichnet und ist von der Anzahl der Zellteilungen abhängig. Olovnikov beschrieb als erster, dass die Telomerverkürzung nach jeder Zellteilung aufgrund des so genannten Endreplikationsproblems eine Art Zählmechanismus für den Eintritt in die replikative Seneszenz darstellt (Olovnikov, 1973).

Das Endreplikationsproblem ergibt sich durch die semikonservative DNA-Replikation, bei der die DNA-Synthese in 5`-3` und 3`-5`-Richtungen erfolgen müsste, jedoch DNA-Polymerasen nur in 5`-3`-Richtung synthetisieren. Okazaki fand heraus, dass zunächst kurze Fragmente (Okazaki-Fragmente) am Folgestrang (Lagging Strang) in 5`-3`-Richtung mit Hilfe von RNA-Primern synthetisiert werden. Nach Entfernung der RNA-Primer katalysieren DNA-Ligasen die Verknüpfung der Fragmente. Jedoch bleibt nach Entfernung des letzten RNA-Primers am Lagging Strang ein Tochter-DNA-Molekül mit einem unvollständigen 5`-Ende zurück.

Ohne Kompensation durch die Telomere würde daraus ein Verlust kodierender Chromosomensequenzen nach jeder Replikation resultieren. Die Chromosomenenden normaler somatischer Zellen verlieren bei jeder Zellteilung 30–150bp schützender Telomer-DNA.

Diese Telomerverkürzung stellt ein Maß für die replikative Kapazität einer Zelle dar. Ihr wurde die Funktion einer „mitotischen Uhr“ zugeschrieben, welche durch fortschreitenden

DNA-Verlust die Anzahl der Zellteilungen „zählt“ und bei Erreichen einer kritischen Telomerlänge von 1500-4000bp über die Zellzyklus kontrollierenden Proteine die replikative Seneszenz auslöst (sogenannte Telomerhypothese) (Harley *et al.*, 1990; Harley, 1991; Zakian, 1989).

Seneszente Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht mehr teilungs-, aber weiterhin noch lebensfähig sind. Sie zeigen Veränderungen in ihrem Genexpressionsmuster, ihrer Morphologie und Funktionalität (Campisi, 1997).

Außerdem exprimieren seneszente Zellen im sauren pH-Optimum β -Galaktosidase (Seneszenz-assoziierte SA- β -Gal-Aktivität), einen biochemischen Marker, der in sich teilenden Zellen (und auch in „quieszenten“ Zellen in der G0-Phase) nicht gefunden wird (Dimri, *et al.*, 1995).

1.2.2 Prämatüre Seneszenz

Phänotypisch von der replikativen Seneszenz nicht zu unterscheiden ist die akut induzierbare Seneszenz. Diese Form wird als prämatüre Seneszenz bezeichnet. Diese telomer-unabhängige Form kann durch zelluläre Stressfaktoren angestoßen werden, wie aktivierte Onkogene, reaktive Sauerstoff-Spezies, Strahlenexposition oder andere Stimuli, die DNA-Schädigungen auslösen (Serrano, M. *et al.*, 1997, Collado *et al.*, 2007).

1.2.3 Molekulare Mechanismen der Seneszenz

Bei den molekularen Mechanismen zellulärer Seneszenz sind die p14/p53/p21 und die p16/Rb vermittelten Signaltransduktionskaskaden von großer Bedeutung. p14 gehört mit p16 zur INK4- Tumorsuppressorgen-Familie (INK4, cyclin-dependent kinase inhibitor) mit p16^{INK4A} sowie p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p14^{ARF/INK4d} (beim Menschen). In der Maus wird das entsprechende Homolog als p19^{ARF} bezeichnet. Eine Überexpression von p16 führt zum G1-Arrest und zur zellulären Seneszenz (Alcorta, *et al.*, 1996). p16 bindet und inhibiert die D-Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6, so dass die Phosphorylierung von pRB (Retinoblastom) verhindert wird. Hypophosphoryliertes pRB bindet und inaktiviert E2F-Transkriptionsfaktoren, wodurch die Expression von S-Phase- Induktoren gehemmt wird. Hierdurch erfolgt keine Progression aus der G1-Phase in die S-Phase des Zyklus (Sherr und Roberts, 1999).

Mutationen in Genen, die für pRb und p16 kodieren oder Ereignisse, die das Gen inaktivieren, können zur Umgehung der Seneszenz und letztlich zur malignen Tumorformation führen (Narita *et al.*, 2003). Seneszenz-induzierte p16-Expression ist unabhängig von einer Telomerverkürzung, denn durch die ektope Expression von hTERT (human telomerase reverse transcriptase), der katalytischen Untereinheit der Telomerase,

wird die p16-Induktion nicht verhindert (Forsyth *et. al.*, 2003). Des Weiteren steigt die p16-Expression bei stressinduzierter Seneszenz stark an (Lin *et al.*, 1998). Dies legt die Vermutung nahe, dass die stressinduzierte, prämaturne Seneszenz pRb-p16-vermittelt verläuft.

Dagegen wird die replikative Seneszenz durch die Induktion von p53 und p21 vermittelt (McConnell *et. al.* 1998, Ithahana *et. al.*, 2001). So steigt die Phosphorylierung und damit die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor während der Seneszenz stark an (Webley *et al.*, 2000). p53 ist das wichtigste Zellzyklus-kontrollierende Protein. p53 überwacht mehrere Zellzyklus-Checkpoints, wie beispielsweise den G1-, G2- Checkpoint und ist zentral an der Induktion von Zellzyklus-Arrest, Apoptose und Seneszenz beteiligt (Vogelstein, *et. al.* 2000). Ein wichtiger Vermittler onkogener Signale zu p53 stellt p14^{ARF} (ARF: alternative reading frame) dar, welches im alternativen Leseraster überlappende Regionen des INK4a Genlokus mit p16 teilt. p14 wird durch Ras- c-myc und E2F- vermittelte Signale induziert. p14 bindet HDM2 (humane double minute 2) und hemmt damit dessen Funktion als p53-ubiquitinierendes Enzym (Kubbutat *et al.*, 1997). p53 kann nun als transkriptioneller Aktivator von Zellzyklus-hemmenden Genen wie beispielsweise p21^{Cip/WAF-} wirken. Durch die verstärkte Expression von p21 wird über cdk2-Inhibierung der Zellzyklus arretiert (Sherr und Roberts, 1999).

Neben onkogenen Signalen über p14 führen beispielsweise DNA-Schädigungen durch ionisierende Strahlung über Proteinkinasen wie ATM (ataxia telangiectasia mutated) und Chk2 (Checkpoint Kinase) zur Induktion und Aktivierung von p53 (Carr AM., 2000). Eine weitere Aktivierung von p53 durch chemotherapeutische Medikamente, UV-Licht und Proteinkinaseninhibitoren verläuft p14 und ATM unabhängig über Kinasen wie ATR (ataxia telangiectasia related) und Casein Kinase II (Meek D.W., 1999). Mittlerweile ist klar, dass p14 und p53 ebenfalls eine entscheidende Rolle in der genetischen Kontrolle von prämaturner Seneszenz spielen (Dimri, *et. al.*, 2000).

1.3 Telomerase

Für die Entdeckung der Telomerase und die Entschlüsselung seiner Funktion im Jahr 1984 wurden Elizabeth Blackburn, Carol Greider und Jack Szostak 2009 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (Greider, C. W. und Blackburn, E. H., 1985).

Die Telomerase ist ein Ribonucleoproteinkomplex, der aus einer RNA-Untereinheit, einer katalytischen Untereinheit und aus multiplen assoziierten Proteinen besteht.

Da die Telomerase die RNA-Untereinheit zur Telomersynthese als Template nutzt, gehört sie zur Gruppe der Reversen Transkriptasen (Yu *et al.*, 1990) mit der Besonderheit, dass die benötigte RNA bereits im Enzym integriert ist.

Feng und seinen Mitarbeitern gelang es, 1995 die Struktur der RNA-Komponente der menschlichen Telomerase hTR (human telomerase RNA) aufzuklären sowie das kodierende Gen zu identifizieren.

Das Gen für die RNA-Untereinheit ist auf Chromosom 3q26.3 lokalisiert und umfasst 451 Nukleotide, die wiederum eine 11 bp umfassende RNA-Matrize (5`-CUAACCCUAAC-3`), die komplementär zur humanen Telomerasequenz (TTAGGG)_n ist, beinhalten (Soder *et al.*, 1997, Feng *et al.*, 1995).

Bei der Telomersynthese ist das 5'-Ende der RNA-Matrize fest mit der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) assoziiert, während Nukleotide des 3'-Endes der RNA-Matrize sich zur korrekten Positionierung an die Telomer-DNA binden (Mergny *et al.*, 2002, Autexier und Greider, 1994).

Die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase hTERT (human telomerase reverse transcriptase), wurde erstmalig 1997 identifiziert und kloniert (Kilian *et al.*, 1997; Meyerson *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1997). Das hTERT-Gen ist auf Chromosom 5 (5p15.33) lokalisiert, umfasst mehr als 37 kb und besteht aus 16 Exons und 15 Introns (Bryce *et al.*, 2000, Cong *et al.*, 1999; Wick *et al.*, 1999). Die katalytische Untereinheit der Telomerase ist ein 127 kDa großes Protein mit spezifischem Reverse Transkriptase Motiv am C-Terminus. Des Weiteren verfügt das hTERT-Protein über ein Telomerase-spezifisches T-Motiv, das vermutlich zur Bindung der katalytischen Untereinheit an die RNA-Untereinheit beiträgt (Meyerson *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1997, Lai *et al.*, 2001).

Während die hTR-Komponente der humanen Telomerase ein konstantes Expressionslevel aufweist, ist die Expression der hTERT-Untereinheit in humanen somatischen Zellen unterdrückt (Feng *et al.*, 1995).

Eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren ist an der Regulation der hTERT Genexpression beteiligt. So korrelieren beispielsweise erhöhte Expressionslevel von Myc und Sp1 mit erhöhter Genexpression von hTERT (Wang *et al.*, 1998). Der Einfluss weiterer Transkriptionsfaktoren wie E2F-1, WTA, NF-RB und MZF-2 werden diskutiert. Weitere Regulationsmechanismen scheinen die Methylierung von CpG-Inseln und zwei Deletionstellen innerhalb des hTERT Promoters (α und β) zu sein (s. Abb. 2, Zhao *et al.*, 1998). Des Weiteren ist die Transkription der hTERT-Untereinheit in Zellen, die ubiquitär Telomeraseaktivität zeigen mit dem hTR-Expressionslevel eng verbunden (Yi, *et al.*, 1999). Bindeproteine La, hStau und L22 interagieren mit hTR und könnten eine Rolle beim hTR-Processing, beim Assemblieren des Telomerase-Komplexes sowie der Lokalisation eine Rolle spielen (Ford *et al.*, 2001; Le *et al.*, 2000; Bachand *et al.*, 2001).

Weitere wichtige Bindeproteine, die vermutlich essentiell für die hTR Akkumulation, das hTR 3'-End Processing und für die Aktivität der Telomerase sind, binden am Telomerase RNA

H/ACA-Motiv sowie an hTR selbst: Diese sind hGAR1, NAP57/Dyskerin, hNOP10 und hNHP2 (Mitchell *et al.*, 1999; Dragon *et al.*, 2000; Dez *et al.*, 2001) (s. Abb. 2).

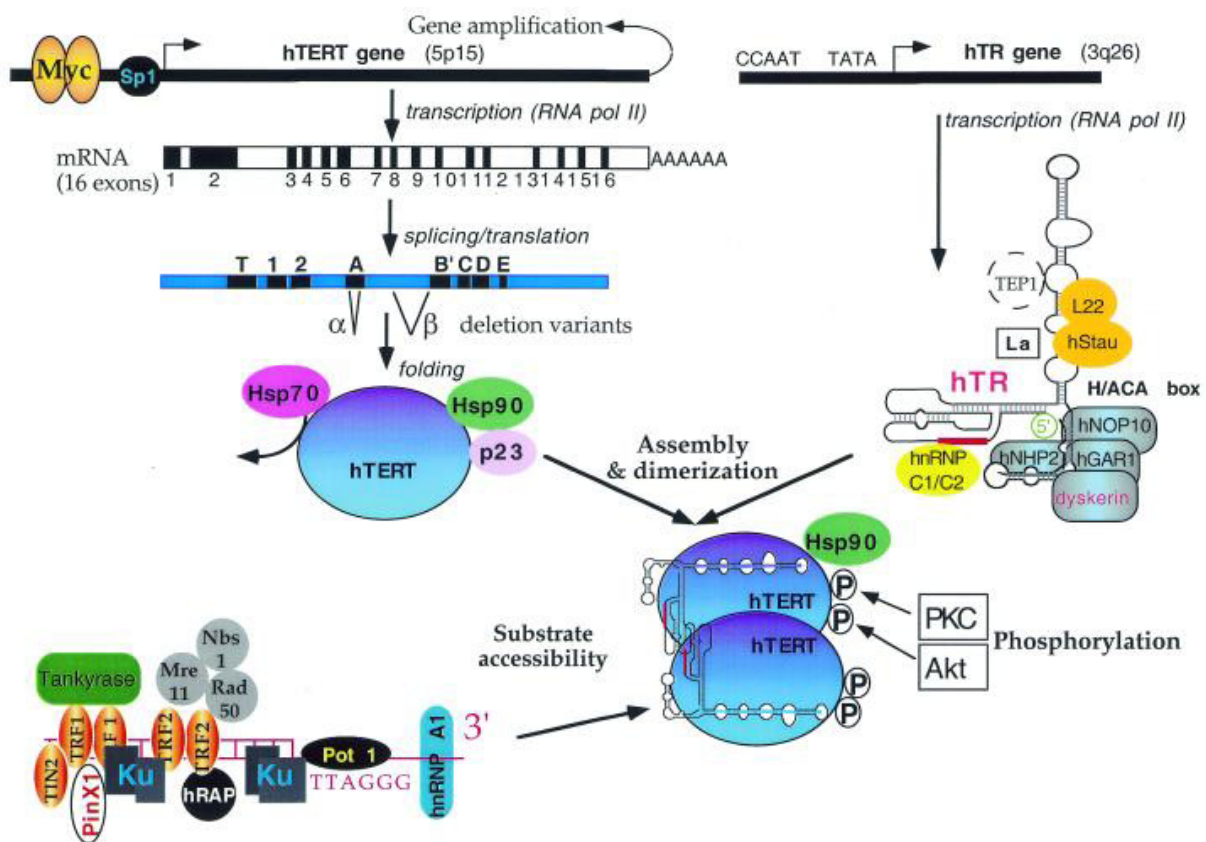


Abb.2: Komponenten der Telomerase. Telomerase besteht aus zwei Komponenten: einer katalytischen Untereinheit (hTERT) und einer RNA-Untereinheit (hTR) als Template. Verschiedene Proteine sind mit hTERT und hTR verbunden (nach Mergny *et al.*, 2002)

Zur funktionsfähigen humanen Telomerase assemblieren sich zwei hTR-Moleküle und zwei hTERT-Untereinheiten zu einem Komplex (Beattie *et al.*, 1998). Dabei wird den Proteinen p23 und hsp90 zumindest in in vitro Modellen eine essentielle Funktionen zugeschrieben (Forsythe *et al.*, 2001). Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass hsp90 und p23 spezifisch an das hTERT-Protein binden und Einfluss auf die korrekte Assemblierung der hTR-Untereinheit an die Template RNA nehmen (s. Abb. 2). Das hsp70 Chaperon ist ebenfalls an der hTERT-Untereinheit assoziiert. Es dissoziiert nach der Faltung in die aktive Form (Mergny *et al.*, 2002).

Zur Verlängerung der Telomere bindet das Telomerase Holoenzym an die Telomer-DNA, indem sich vermutlich das freie 3'-Ende des Chromosoms mit Nukleotiden des 3'-Endes der Matrizen-Region der RNA-Komponente zusammenlagert (s. Abb. 3). Die Telomerase fügt dem Telomer am überhängenden G-reichen Einzelstrang TTAGGG-Repeats an. Die

Telomerpolymerisation schreitet in Richtung 5'-Ende der Template Region fort. Nach Translokation der Telomerase kann eine neue Elongationsrunde starten. Der C-reiche Strang am 5'-Ende der Telomer-DNA wird mit Hilfe konventioneller DNA Polymerasen verlängert (Greider, 1996).

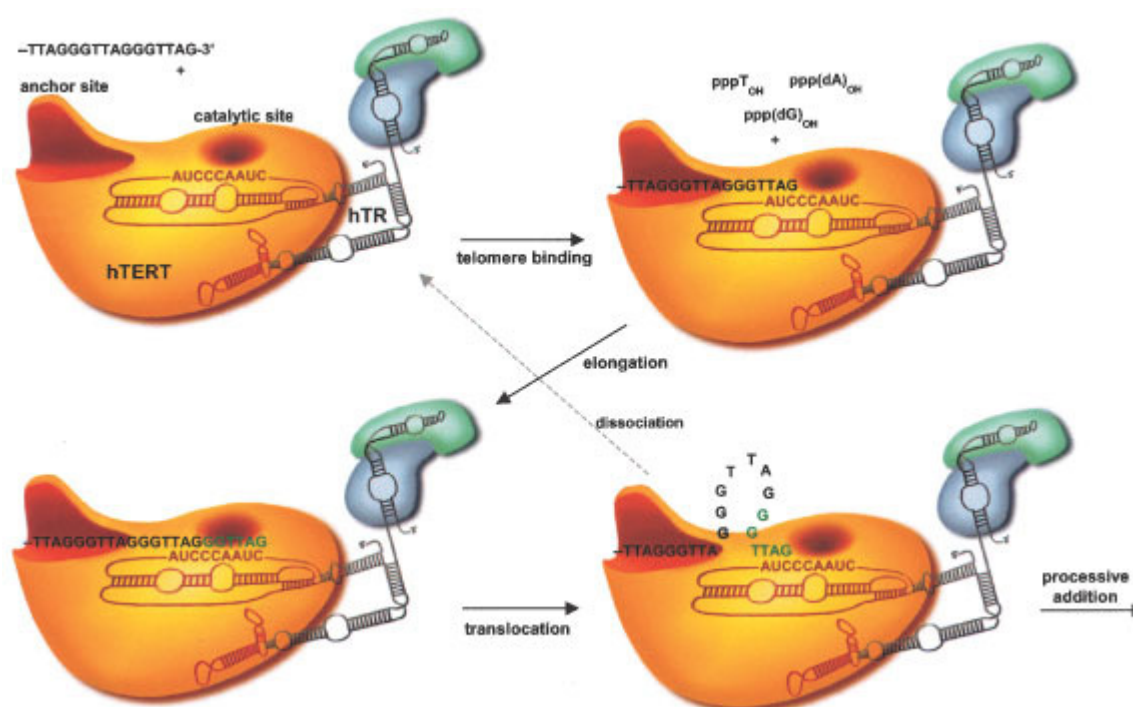


Abb. 3: Schematische Darstellung der Telomerverlängerung durch die Telomerase (Harley CB 2002)

Die Telomerase ist während der Embryonalentwicklung in allen Geweben aktiv, wird jedoch nach Abschluß der Organogenese weitestgehend inaktiviert (Harley, C. B., 2002; Wright *et al.*, 1996). So weisen die meisten somatischen Zellen des erwachsenen Menschen keine Telomerase-Aktivität auf. Zellen mit geringer Telomerase-Aktivität besitzen meist ein selbsterneuerndes Potential, wie die hämatopoetischen Stammzellen oder proliferierende Epithelzellen in der Basalschicht der Haut, sowie aktivierte Lymphozyten, bei welchen die Aktivierung der Telomerase jedoch nur vorübergehend erfolgt (Harle-Bachor und Boukamp, 1996, Weng *et al.*, 1998). Untersuchungen an Fibroblasten haben gezeigt, dass normales Gewebe Zellzyklus abhängige basale Telomeraseaktivität zeigen kann, die jedoch nicht zur Telomereverlängerung führt (Masutomi *et al.*, 2003).

Im Gegensatz dazu ist in Zellen der Keimbahn und in nahezu 90% humaner Tumorzellen eine hohe Telomerase-Aktivität nachweisbar (Allsopp *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1994; de Lange, 1994).

1.4 Alternative Telomer-Verlängerungsmechanismen (ALT)

Einige immortalisierte menschliche Zelllinien und Tumore sind in der Lage, ihre Telomere in Abwesenheit von nachweisbarer Telomerase-Aktivität zu verlängern. Dieser Mechanismus wurde erstmalig 1995 von Bryan und Mitarbeiter beschrieben und wird als ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) bezeichnet (Bryan *et al.*, 1995).

Man geht, analog zu Beobachtungen an Telomerase-negativen Hefezellen, davon aus, dass ALT auf homologer Rekombination zwischen den einzelnen Telomeren basiert (Lundblad und Blackburn 1993, Dunham *et al.*, 2000).

Zellen, die ALT zur Telomerverlängerung nutzen, zeichnen sich durch ein typisches TRF (Terminal- Restriction-Fragment)-Muster aus, d.h. die Telomerlängen sind sehr heterogen, es zeigen sich Telomerlängen von 3-50 kbp. Weitere Charakteristika sind die ALT assoziierten PML-Körperchen, genannt APBs. PML ist involviert in der chromosomalen Translokation der akuten promyeloischen Leukämie (PML). PML-Kernkörperchen sind subnukleare makromolekulare Strukturen, die an die Kernmatrix gebunden sind. Die Lage, Anzahl und Funktion könnten Einfluss haben beim alternativen Splicen oder bei der Expression. Diese PML-Kernkörperchen sind in ALT-Zellen mit den Telomer-assoziierten Proteinen TRF1 und TRF2 kolokalisiert (Griffith *et al.*, 1999).

Humane Tumore nutzen zu 85% eine aktive Telomerase zur Telomerverlängerung (Shay und Bacchetti, 1997). Es kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass die restlichen 15% einen ALT zur Telomerverlängerung nutzen, denn in einigen Tumoren können beide Mechanismen, ALT und eine aktive Telomerase, coexistieren (Bryan *et al.*, 1997). So zeigen Zellkultur-Experimente, dass der Telomererhaltungsmechanismus nicht nur von einer aktiven Telomerase zum ALT-Mechanismus wechseln kann (Cerone 2001), sondern dass die Telomerase in der Lage ist den ALT-Phänotyp zu unterdrücken (Ford, 2001A).

Insgesamt ist der ALT weiter Gegenstand intensiver Forschungen, die zu einem besseren Verständnis dieses interessanten Mechanismus beitragen werden.

1.5 Die Nebennierenrinde

Die Nebennieren sind paarig angelegte Organe, die den Nieren polkappenartig aufliegen. Bereits makroskopisch lassen sich zwei funktionell und entwicklungsgeschichtlich unterschiedliche Anteile differenzieren, das Nebennierenmark und die Nebennierenrinde. Die Nebennierenrinde entsteht in der Embryogenese aus dem Coelomepithel an der hinteren Bauchwand, hat einen mesodermalen Ursprung, und entspricht dem Bildungsort von Steroidhormonen. Das Nebennierenmark wird durch vom Sympathikusgrenzstrang eingewanderte, neuroektodermale Ganglienzellen gebildet, die in der Lage sind, Katecholamine, vor allem Adrenalin und Noradrenalin, zu bilden und ins Blut zu sezernieren (Riede und Saeger, 1993). Das Nebennierenmark ist somit Teil des vegetativen Nervensystems. Die Nebennierenrinde dagegen besteht aus lipidreichen Zellen, die sich histologisch in drei Schichten unterteilen lassen. Die subkapsuläre Schicht wird als Zona glomerulosa bezeichnet, die vorwiegend für die Mineralokortikoidsynthese (Aldosteron) zuständig ist. Die nestartig angeordneten Zellen der Zona glomerulosa spielen durch ihre Fähigkeit zur Sekretion von Aldosteron eine entscheidende Rolle in der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts durch Natrium-Retention und Kalium Exkretion im distalen Tubulus der Niere. Angrenzend an die Zona glomerulosa findet sich die Zona fasciculata, in der die Zellen säulenartig, radiär ausgerichtet sind. Hier befindet sich der Bildungsort der Glukokortikoide (Cortisol bzw. Corticosteron bei Nagern). Sie beeinflussen unter anderem die Stoffwechsellage durch Proteinkatabolismus und Förderung der Glukoneogenese. Die Folge eines Kortisolexzesses ist eine diabetische Stoffwechsellage, Osteoporose und Muskelatrophie. Weiterhin wirken Glukokortikoide immunsuppressiv und entzündungshemmend, ein Effekt, der mit Hilfe synthetischer Derivate therapeutisch ausgenutzt wird. An das Nebennierenmark angrenzend liegt die Zona reticularis, deren Zellen ein irreguläres Netzwerk bilden. Hier werden vor allem adrenale Androgene synthetisiert, deren wichtigstes Produkt Dihydroepiandrosteron (DHEA) ist. Dieses wird in anderen Organen, wie dem Ovar, den Hoden oder dem Fettgewebe zu wirksameren Androgenen konvertiert (Orth *et al.*, 1992).

An der Steroidbiosynthese der Nebennierenrinde sind viele spezifische Enzyme beteiligt (s. Abb. 4).

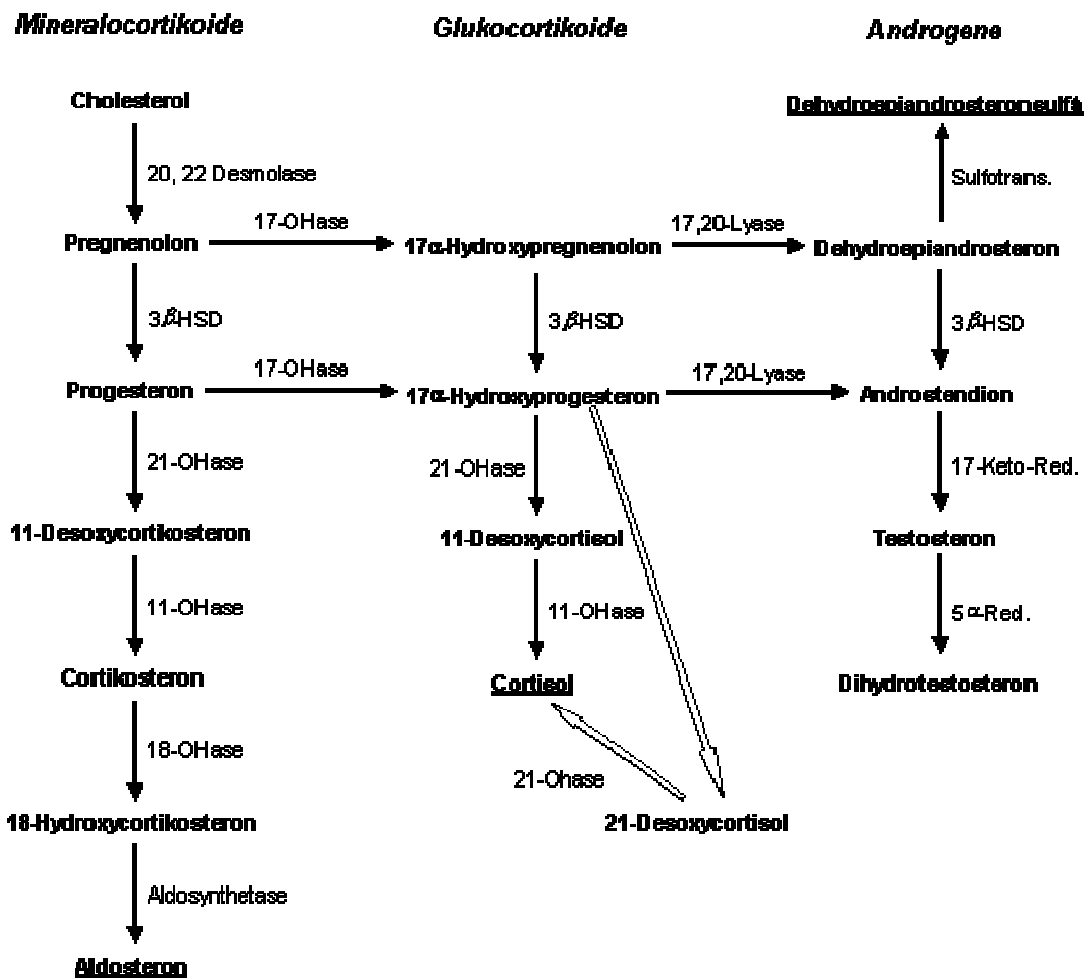


Abb. 4: Schematische Darstellung der Steroidbiosynthese (Müller, S. 2004)

Die Enzyme P450 SCC (sight chain cleavage enzyme) und StAR (steroid agenic acut regulating protein) sind Schlüsselenzyme der Steroidbiosynthese. StAR ist dafür verantwortlich Cholesterin in die Mitochondrien zu transportieren. SCC ist einer der ersten Schritte in der Steroidbiosynthese, über den der Umfang der Synthese reguliert wird.

Das im Hypophysenvorderlappen gebildete Peptidhormon Adrenocorticotropin (ACTH) stellt den wichtigsten stimulierenden Faktor der Glukokortikoid- und Adrogenproduktion dar.

1.6 Tumore der Nebennierenrinde

Tumore der Nebennierenrinde lassen sich nach ihrem Wachstumsverhalten in benigne Adenome und das adrenokortikale Karzinom unterteilen. Beide Formen können endokrin inaktiv oder aktiv sein. Endokrin aktive Tumore können alle in der Nebennierenrinde produzierten Hormone inklusive der entsprechenden Vorstufen sezernieren, dabei sind die Aldosteron- und Kortisol-produzierenden Adenome am häufigsten vertreten. Reine Androgen-produzierende Nebennierenrindentumore sind hingegen sehr selten. Das Karzinom der Nebennierenrinde ist ein seltener, hochmaligner Tumor mit einer Inzidenz von einem Fall auf 1,7 Millionen Einwohner pro Jahr. Die Altersverteilung ist bimodal mit einem ersten Gipfel im Kindesalter und einer zweiten im 5.-6. Lebensjahrzehnt. Das weibliche Geschlecht ist mit 57% der Fälle etwas häufiger betroffen. Die Prognose des adrenokortikalen Karzinoms im Kindesalter ist günstiger als beim Erwachsenen, bei dem die Prognose als sehr schlecht eingestuft wird (Allolio, *et al.*, 2002). Ohne Operation beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit 3 Monate (Arlt *et al.*, 1990). Nach einer Operation hängt sie wesentlich vom Zeitpunkt des Nachweises von Metastasen ab. Die 5-Jahres-Überlebensrate wird mit 20-45% angegeben (Icard, *et al.*, 2001).

Zu den genetischen Veränderungen in Nebennierenkarzinomen gehören Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen (Reincke *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1994; McNicol *et al.*, 1997). Weitere Studien haben gezeigt, dass in 93% der untersuchten Nebennierenkarzinomen der Wachstumsfaktor IGF-II (insulin-like growth factor-II) deutlich überexprimiert ist (Gicquel *et al.*, 1994; Boulle *et al.*, 1998). Auch der ACTH-Rezeptor spielt möglicherweise eine Rolle, da sein Expressionsverlust mit einem aggressiveren Wachstum vergesellschaftet ist. Eventuell geht die ACTH Rezeptorexpression aber auch sekundär verloren, wobei sie einen Differenzierungsmarker darstellen könnte (Reincke *et al.*, 1997a; Reincke *et al.*, 1997b; Reincke *et al.*, 1998a; Zwermann *et al.*, 2005).

Uneinheitlich sind die Daten über die Rolle der Telomeraseaktivität in Nebennierenrindenkarzinomen. In einigen Studien wurde in allen untersuchten Gewebeproben der Nebennierenrindenkarzinome Telomeraseaktivität gefunden (Manelli *et al.*, 2000, Sticchi *et al.*, 2006). In anderen Arbeiten konnte dagegen nur zu einem geringen Prozentsatz positive Telomeraseaktivität in Nebennierenrindenkarzinomen gefunden werden (Hirano *et al.*, 1998, Kinoshita *et al.*, 1998). In einer aktuellen Arbeit von Else *et al.* fanden sich zu 79% positive Telomeraseaktivität, 8% der untersuchten Gewebeproben zeigten Telomeraseaktivität mit positivem ALT (Else *et al.*, 2008). In der Diskussion wird näher auf die Rolle der Telomerase im Nebennierenrindenkarzinom eingegangen (s. Abschnitt 5.6.).

1.7 Das ösophageale Plattenepithel

Der *Ösophagus gr.*; die Speiseröhre ist ein dehnbarer Schlauch, der als Teil des Verdauungskanals dem Transport der Nahrung aus dem Mund und Rachen in den Magen dient. Er ist etwa 25cm lang und gliedert sich in *Pars cervicalis* (Halsteil), *Pars thoracica* (Brustteil) und *Pars abdominalis* (Bauchteil). Ontogenetisch geht der Ösophagus aus dem Vorderdarm hervor, hier liegt ein entodermaler Ursprung der Zellen zugrunde. Im Wandaufbau lassen sich histologisch drei Zellschichten unterscheiden: Die *Tunica mucosa* (Schleimhaut), die *Tela submucosa* (Submukosa) und die *Tunica muskularis* (Muskelwand). Die *Tunica mucosa* besteht aus dem 300-400µm dicken, unverhornten, mehrschichtigen Plattenepithel mit hohen Bindegewebspapillen, das der Auskleidung des Ösophagus dient. Es folgt die Bindegewebschicht aus kollagenen Fasern und einer relativen dicken Muskelschicht mit längsverlaufenden Muskelfasern. In der breiten und gefäßreichen *Tela submucosa* liegen zwei Drüsenpakete, *glandulae oesophagea*. Diese rein mukösen Drüsen liegen bevorzugt in der ventralen Wand im oberen und unteren Abschnitt der Speiseröhre. Es schließt sich die kräftige, bis zu 2mm dicke *Tunica muscularis* an, die im oberen Drittel des Ösophagus aus quergestreifter, im mittleren Drittel sowohl aus quergestreifter als auch aus glatter, und im distalen nur aus glatter Muskulatur besteht (Schiebler und Schneider, Histologie, Springer 1991).

1.8 Das ösophagealen Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom des Oesophagus ist ein aggressiver Tumor mit sehr schlechter Prognose, der zu den häufigsten Karzinomen weltweit gehört. Die jährliche Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus liegt bei 1,5-2,5 pro 100.000 Einwohner in der weiblichen und bei 2,5-5,0 pro 100.000 Einwohner in der männlichen Bevölkerung (Sons 1987). Auffällig ist, dass die Anzahl der Neuerkrankungen starke geographische Unterschiede zeigt. Die weltweit höchsten Inzidenzen werden für Regionen Chinas und des Iran beobachtet. In China lag die Inzidenz 1992 bei 17,4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Im Iran finden sich Inzidenzen von 144/100.000 für Männer und 48/100.000 für Frauen (Ghavamzadeh, A, *et al.*, 2001, Saidi, F. *et al.*, 2000, Ghadirian, P. 1987). Für die Ursachen der unterschiedlichen Inzidenzen werden neben genetischer Unterschiede und infektiösen Ursachen, wie die Infektion mit onkogenen humanen Papillomaviren (Suzuk, L, 1996), auch Karzinogenexposition über die Nahrung (Ghadirian, P. *et al.*, 1988; Ghadirian, P. *et al.*, 1992; Blot, W. J. 1994), Alkohol- (Macfarlane, G. J *et al.*, 1996; Ziegler, R. G., 1986) und Nikotinabusus (Ahsan, H.; 1997) diskutiert. Ungefähr 50% der Tumorerkrankten sterben

innerhalb von 5 Jahren. Die häufigste genetische Veränderung des oesophagealen Karzinoms ist die Überexpression von Cyclin D1 (Bartkova *et al.*, 1995), welches eine Rolle bei der Progression durch die G1-Phase des Zellzyklus spielt, gefolgt von der Überexpression des EGFR (*Epithelial Growth Factors Receptors*) (Grandis *et al.*, 1993). Weitere genetische Veränderungen sind z.B. Tumorsuppressorgen-Inaktivierungen, wie die p53 oder p16-Mutationen, und Onkogen-Aktivierungen. Durch diese genetischen Veränderungen können essentielle, zelluläre Funktionen, wie z.B. die Kontrolle der Proliferation, so gestört werden, dass sie zur Tumorentstehung führen.

1.9 Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung

Die Entstehung von Tumoren, d.h. die onkogene Transformation normaler Zellen zu einer autonom wachsenden Geschwulst, ist ein komplexer biochemischer und molekulargenetischer Prozess, der über Jahrzehnte hinweg bestehen kann. Während der Abfolge der malignen Transformation erwerben Zellen zunächst Mutationen in Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Zellwachstum- und Zellproliferation-kontrollierenden Genen (Hunter, T, 1997). Die zur Tumormanifestation notwendige Zahl der Defekte ist nicht nur von der genetischen Veränderung selbst, sondern auch vom Zelltyp (z.B. epithelial versus mesenchymal) abhängig. Lange Zeit war es nicht möglich, *in vitro* Untersuchungen zur malignen Transformation durchzuführen, da humane Zellen in Kultur aufgrund der bei jeder Zellteilung abnehmenden Telomerlänge replikative Seneszenz erleiden. Erst mit der Entdeckung, dass die Erhaltung der Telomere durch die Telomerase ein wichtiger Regulator in der Immortalisation und Transformation ist, waren *in vitro* Studien zur Immortalisation möglich geworden (Harley, *et al.*, 1994).

Obgleich viele Aspekte in der Entwicklung normaler Zellen zu immortalisierten Tumorzellen noch ungeklärt sind, lassen sich doch generelle molekularbiologische Mechanismen der Tumorgenese erkennen. Vergleichende Untersuchungen von verschiedenen Arten von humanen Tumorzellen konnten eine Reihe von genetischen und epigenetischen Veränderungen in Signaltransduktionskaskaden in den meisten Tumoren identifizieren.

Der pRB (Retinoblastom)-Signaltransduktionsweg, der eine zentrale Rolle in der G1-Phase im Zellzyklus spielt, und der p53-Pathway können durch mehrere alternative genetische und biochemische Mechanismen in humanen Tumoren gestört werden (s.Abb. 5). Der CDKN2A Genlocus kodiert für zwei Proteine sowohl in murinen als auch in menschlichen Zellen (Sherr, C. 2001). Eines dieser Proteine ist p16, ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen, der spezifisch die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase 4 (CDK4) und CDK6, durch die Verhinderung ihrer Interaktion mit D-Typ-Cyclinen (Cyclin D1, D2 und D3), blockiert.

Die zellzykluskontrollierende Funktion von Rb-Proteinen beruht auf ihrer Fähigkeit, im unphosphorylierten Zustand reversibel an Transkriptionsfaktoren wie E2F zu binden. Die aktiven CyclinD/CDK4/6-Komplexe phosphorylieren das Retinoblastom-Tumorsupressorgen-Produkt (Rb-Protein). Das phosphorylierte und damit inaktivierte Rb ist nicht mehr in der Lage, Transkriptionsfaktoren wie E2F zu binden. Das nun freie E2F vermittelt Promotoraktivierung und aktiviert Gene, die eine S-Phase Progression des Zellzyklus auslösen (Johnson und Schneider-Broussard, 1998).

Das pRb (Rb-Protein) ist ein transkriptioneller Repressor, der durch die Interaktion mit E2F-Transkriptionsfaktoren spezifisch die Promotoraktivierung Zellzyklus-regulierender Gene hemmt. Durch diese inhibierten Gene, die u.a. für die Aktivierung der DNA-Synthese während der S-Phase benötigt werden, wird die Zelle im Zellzyklus in der G1-Phase arretiert. p16 bindet und inhibiert die D-Cyclin-abhängigen CDK4 und CDK6 und verhindert die Progression aus der G1-Phase in die S-Phase des Zyklus, indem p16 die Phosphorylierung von Rb verhindert.

Mutationen in pRB führen zur Deaktivierung des pRB Gens. Daneben können virale Onkoproteine zum Abbau des pRB-Proteins führen. Ebenso kann p16 durch genetische Läsionen oder durch Methylierung inaktiviert werden. Die Überexpression von Cyclin D1 oder Cyclin E führt zur funktionellen Inaktivierung von pRB.

Das andere Produkt des CDKN2A Genlocus ist p14^{ARF}, ein positiver Regulator des p53-Expressionslevels (Quelle, *et al.*, 1995). Das p53-Tumorsupressor-Protein ist, wie bereits erwähnt, das wichtigste Zellzyklus-kontrollierende Protein. p53 arretiert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schäden den Zellzyklus, bis der Schaden repariert ist und löst bei physiologischem Stress Apoptose aus, so dass geschädigte Zellen eliminiert werden (Levine A.J., 1997; Lowe, S.W., 1999; Jacks, T. und Weinberg, R.A., 1996). In fast der Hälfte aller humanen Tumore konnte eine Deletion eines der Allele (LOH-loss of heterozygosity) oder eine Mutation des p53-Gens nachgewiesen werden (Harris, C.C., 1996). In einigen Tumoren ist das Protein HDM2 (humane double minute 2) überexprimiert, das zu einer vorzeitigen Degradierung des p53-Proteins führt (Sanchez-Aguilera *et al.*, 2002; Polsky *et al.*, 2001; Freedman *et al.*, 1999). Alternativ ist das Gen für p14^{ARF} deletiert oder die Expression ist durch Methylierung unterdrückt, so das HDM2 zur Degradation von p53 führt (Sharpless und DePinho, 1999; Sherr, C.J., 2001). Die Protein-Produkte des CDKN2A Genlocus regulieren die Aktivität der Tumorsupressor-Pathways für p53 und pRB, die eine wichtige Funktion bei der Regulation der Zellproliferation und in der Stress-induzierten Apoptose haben und die in den meisten menschlichen Tumoren durch genetische und biochemische Mechanismen gestört sind (Sellers und Kaelin, 1997).

Verschiedene Hinweise zeigen, dass der pRB und der p53- Tumorsupressor-Pathway essentiell für die Überwindung der replikativen Seneszenz sind (Shay, J.W., *et al.*, 1991;

Rogan EM, *et al.*, 1995). So konnten einige Zellen der replikativen Seneszenz bzw. dem Mortalitätsstadium (M1) entkommen und sich weiter teilen. Voraussetzung ist eine Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p53 oder pRb durch die Einführung viraler Onkogene, wie des Simian Virus 40 T Antigen (LT) oder des humanen Papillomavirus E6 und E7 (Shay *et al.*, 1991; Counter *et al.*, 1992) (s. Abb. 5). Die weitere Zellteilung und fortschreitende Telomerverkürzung führt dann zur chromosomalen Instabilität, die schließlich durch Aktivierung entsprechender Signalkaskaden zur Auslösung massiven Zelluntergangs durch Apoptose führt. Dieses Zellstadium wird als Mortalitätsstadium 2 (M2) oder als *Crisis* bezeichnet (Wright und Shay, 1992).

Zellen in dieser zweiten Proliferationsbarriere (s. Abschnitt 1.2.) mit extrem kurzen Telomeren sind nicht mehr in der Lage, ihre Chromosomen vor Degradation zu schützen und im Fall eines p53 Verlustes erfahren sie genomische Instabilität (Stewart, N. und Bacchetti, S. 1991). Die wenigen überlebenden Zellen zeigen extensive karyotypische Veränderungen, aktive Telomeraseaktivität und somit stabile Telomerlängen (Counter, 1992). Nur wenigen humanen Zellarten gelingt es, durch die ektope Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase, die replikative Seneszenz bzw. das Mortalitätsstadium 1 zu umgehen (Yang, J. *et al.*, 1999; Vaziri und Benchimol 1998).

Andererseits gelingt es durch experimentelle Aktivierung der Telomerase in den meisten humanen Zellarten, das Mortalitätsstadium 2 (M2) bzw. *Crisis* zu umgehen und so eine Immortalisierung zu erreichen (Zhu, 1999; Halvorsen, *et al.*, 1999). In vielen Zellen ist mehr als ein genetisches Ereignis notwendig, wie die Inaktivierung Zellzyklus regulierender Gene, um eine Immortalisierung dieser Zellen zu induzieren (Kiyono, 1998). Somit stellen die Seneszenz und die *Crisis* wichtige Barrieren für die unbegrenzte Proliferation der Zellen dar und ihnen wird die Funktion als Tumorsuppressor-Mechanismus zugeschrieben (Stewart und Weinberg, 2002).

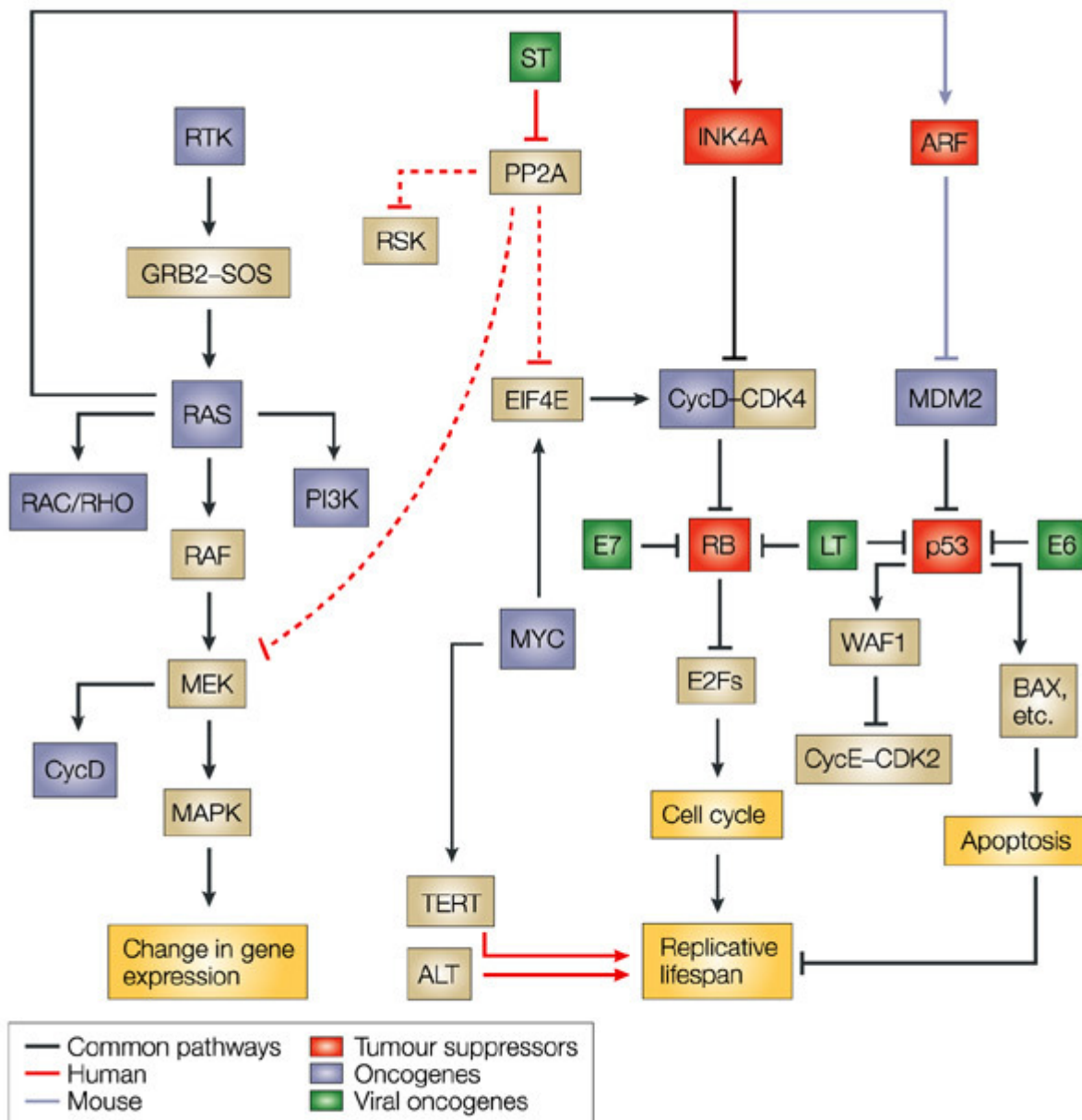
Die Verkürzung der Telomere hat eine doppelte Rolle in der Entstehung von Krebs. Zum einen begrenzt die Telomerverkürzung die replikative Lebensspanne einer Zelle, was einer Überalterung der Zellen und damit malignen Transformation vorbeugt. Zum anderen führt eine Verkürzung der Telomere schließlich dazu, dass die Chromosomenenden nicht mehr ausreichend geschützt sind, so dass weitere genetische Veränderungen mit potentieller maligner Transformation resultieren können (Hahn und Weinberg, 2002).

Weitere Studien haben gezeigt, dass genetische Veränderungen im RAS-Pathway bei der malignen Transformation eine wichtige Rolle spielen, indem konstitutive mitogene Signalwege aktiviert werden, die zu einer Unabhängigkeit der Tumorzellen von äußeren Wachstumsfaktoren führen (McCormick, 1999).

Die Signaltransduktionskaskaden für Ras, pRB, p53 und hTERT zeigen die fünf häufigsten beobachteten Veränderungen in den Genomen von spontan entstehenden menschlichen

Tumoren. Noch nicht identifiziert sind die genetischen Elemente, die die letzten Schritte in der Tumorpheression kontrollieren, Invasion und Metastasierung (Hahn und Weinberg, 2002).

Trotz dieser Erkenntnisse sind grundlegende Prozesse für die Entstehung von Tumoren nicht vollständig geklärt und es sind weitere Studien für das Verständnis der Immortalisierung und malignen Transformation von normaler Zelle zur Tumorzelle notwendig.



Nature Reviews | Cancer

Abb. 5: Molekulare Schaltkreise der Tumorenstehung (Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. 2002A)

1.10 Die Rolle der Telomerase in der Tumorentstehung

Eine grundlegende Eigenschaft maligner Zellen ist die uneingeschränkte Proliferationsfähigkeit bzw. Immortalität. Eine Voraussetzung dafür ist die Erhaltung stabiler Telomerlängen.

Die Feststellung, dass 85% der humanen malignen Tumoren die Telomerase zur Telomerverlängerung exprimieren, unterstreicht die herausragende Rolle der Aktivierung der Telomerase in der Tumorentstehung (Shay und Bacchetti, 1997; de Lange, 1994; Kim *et al.*, 1994). Die ektope Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) verleiht Telomerase-negativen Zellen aktive Telomerase und ermöglicht ihnen, die Telomerlängen stabil zu halten (Bodnar, *et al.*, 1998; Vaziri and Benchimol 1998). Entsprechend bedeutet positive Telomeraseaktivität einen Überlebensvorteil und verminderten Zelltod für die Zelle. In den meisten Zelltypen in Kultur, wie beispielsweise bei Fibroblasten, führt die Stabilisierung der Telomerlängen in frühen Passagen zur Immortalisierung (Bodnar, *et al.*, 1998). So konnten wir in vorausgehenden Studien in einer Kooperation mit der Universität Pennsylvania, Philadelphia zeigen, dass die Expression der Telomerase normale humane oesophageale Plattenepithelzellen immortalisiert (Harada *et al.*, 2003). Daneben haben auch andere Faktoren, wie Kulturbedingungen Einfluss auf den Immortalisierungsprozeß (Ramirez, *et al.*, 2001). Die Beobachtungen zur Immortalisierung zeigen, dass die Telomererhaltung die replikative Lebensdauer der verschiedenen Arten von menschlichen Zellen steuert. Außerdem verdeutlichen diese Ergebnisse, dass der Immortalisationsprozess auf molekularer Ebene ein relativ einfacher Vorgang sein kann, der ausschließlich in der Derepression eines einzelnen Gens, *TERT*, bestehen kann (Hahn und Weinberg, 2002A).

Die alleinige Telomerase-Aktivierung führt in einigen Zellarten zwar zur Immortalisierung, aber noch nicht zur malignen Entartung einer Zelle (Bodnar *et al.*, 1998), wie das physiologische Vorkommen Telomerase-positiver Zellen im menschlichen Organismus zeigt. Für die Entstehung maligner Zellen sind weitere genetische Veränderungen notwendig. Weitere Studien zeigen, dass Zellen auch in Abwesenheit von Telomerase immortal werden und maligne entarten können. Dies zeigt sich in der Entstehung maligner Tumore in Telomerase-defizienten Mäusen (Blasco *et al.*, 1997). Weiterhin ist dies der Fall in 15% der humanen Tumore, die keine Telomerase exprimieren. Somit ist die Telomerase-Aktivierung nicht der einzige Mechanismus, mit dem Zellen ihre Telomere stabilisieren können. So nutzen 15% der humanen Tumore einen alternativen Mechanismus (s. Abschnitt 1.4.) zur Telomererhaltung. Darüber hinaus führt die Hemmung der Telomerase-Aktivität in Telomerase-positiven menschlichen Tumorzellen zum Absterben der Tumorzellen (Hahn WC, *et al.*, 1999).

Ob durch Telomerase oder ALT, die Telomererhaltung in humanen Tumorzellen scheint ein wesentlicher und unverzichtbarer Bestandteil des neoplastischen Wachstums zu sein (Bodnar, *et al.*, 1998; Vaziri und Benchimol, 1998). Diese Ergebnisse verdeutlichen die herausragende Rolle der Telomerase-Aktivität im Überleben von Tumorzellen. In Zell-Transformations-Assays wurde festgestellt, dass der alternative Mechanismus nicht zur Zelltransformation führte, sondern erst die Expression der Telomerase eine Tumorprogression ermöglichte. Diese Resultate lassen neben Erhaltung der Telomere, zusätzliche Aufgaben der Telomerase in der Tumorprogression vermuten (Stewart, *et al.*, 2002A).

In anderen Zellen trägt der ALT-Mechanismus zur Tumorentstehung auch in Abwesenheit von Telomerase-Expression bei (Gollahon *et al.*, 1998). In einigen Tumoren können beide Mechanismen, ALT und eine aktive Telomerase, coexistieren (Bryan *et al.*, 1997). So zeigen Zell-Kultur-Experimente, dass der Telomererhaltungsmechanismus nicht nur von aktiver Telomerase zum ALT-Mechanismus wechseln kann (Cerone 2001), sondern dass die Telomerase in der Lage ist den ALT-Phänotyp zu unterdrücken (Ford, 2001). Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass der ALT-Mechanismus nicht vollständig die Telomerase-Funktion während des Prozesses der Tumorprogression ersetzen kann. Zytogenetische Studien haben nachgewiesen, dass der ALT-Mechanismus zu Telomer Dysfunktion und chromosomaler Instabilität führt, welche erhebliche Folgen für die Tumorprogression haben können. Somit ist der ALT-Mechanismus in der Telomererhaltung nicht mit der Telomerase-Aktivität gleichzusetzen (Scheel *et al.*, 2001).

Trotz Fortschritten in der Klärung der Telomerase in der Tumorgenese, ist der absolute Beweis, dass die hTERT-Reaktivierung für die Tumorgenese notwendig ist, bisher nicht geführt worden (Newbold, 2002).

Nur ein genaueres Verständnis der Rolle der Telomerase in der Tumorentstehung wird es in der Zukunft erlauben, präventiv oder therapeutisch in für die Tumorentstehung relevante Prozesse eingreifen zu können.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Telomerase in der Immortalisierung und malignen Transformation von Nebennierenrindenzellen näher zu charakterisieren. Dazu wurde die Telomerase in normalen primären humanen Zellen aktiviert und schrittweise in einer kontinuierlich wachsenden Zellpopulation hinsichtlich replikativer Lebensdauer, Telomerlänge und hTERT Expression untersucht. Es sollte darüber hinaus über Western-Blots die Existenz mögliche genetische Veränderungen im p53 und im pRB-Signaltransduktionsweg im Hinblick auf die Tumprogression von Nebennierenrindenzellen ermittelt werden.

In vorausgehenden Studien über die Immortalisierung von oesophagealen Plattenepithelzellen durch die Telomerase wurde gezeigt, dass die Telomeraseaktivierung auch ohne Alteration der p16 und/oder p53-Signaltransduktionskaskade alleinige Voraussetzung für die Immortalisierung humaner, plattenepithelialer Zellen war (Harada *et al.*, 2003).

Die in den letzten Jahren durchgeführten Studien zu Telomerbiologie, Telomeraseaktivität und hTERT-Expression in Nebennierenrindenzellen basierten hauptsächlich auf Untersuchungen von Zellen und Gewebe im Tumorstadium, welches eine heterogene Zusammensetzung aus Tumor-, Endothel- und Entzündungszellen darstellte. In diesen waren bereits genetische Veränderungen vorhanden, die zur malignen Transformation geführt hatten. Unter anderem könnte die aktive Telomerase selbst zur Immortalisation beigetragen haben, so dass die Ergebnisse in Bezug auf die Fragestellung der Telomerase in der Tumorentstehung schwierig zu analysieren sind. Bislang gibt es jedoch keine systematischen Untersuchungen zum Verlauf der hTERT-Expression in der Tumorgenese in normalen primären Nebennierenrindenzellen.

Das spezifische Ziel dieser Arbeit war die schrittweise Analyse der Telomerase in der Tumorgenese in primären normalen Nebennierenrindenzellen. Dabei sollte herausgefunden werden, ob die Expression der Telomerase zur Verlängerung der Lebensdauer und eventuell zur Immortalisierung der Nebennierenrindenzellen führt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die primären humanen Nebennierenrindenzellen hinsichtlich folgender Fragestellung untersucht werden:

- 1.** Führt die ektope Expression der Telomerase in Nebennierenrindenzellen zur Lebenszeitverlängerung der Zellklone?
- 2.** Führt die ektope Expression der Telomerase in Nebennierenrindenzellen zur Immortalisierung?
- 3.** Ergeben sich im Verlauf der schrittweisen Analyse der hTERT-exprimierenden Zellen Inaktivierungen oder Überexpressionen in der p53- oder pRB-Signaltransduktionskaskade?
- 4.** Verhalten sich Zellen unterschiedlichen entwicklungsgeschichtlichen Ursprungs unterschiedlich hinsichtlich einer Telomerase-abhängigen Immortalisierung?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die im Verlauf dieser Promotion verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Bestimmung der SA- β -Galaktosidase:

Formaldehyd	Merck
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich
PBS pH7,3	Gibco BRL
Kaliumferricyanid	Sigma Aldrich
Kaliumferrocyanid	Sigma Aldrich
X-Gal	Sigma Aldrich
MgCl ₂	Merck

Telomeranalytik (TRF-Assay):

Gentra-DNA-Isolierungskit	Biozym bzw. Qiagen
Isopropanol	Sigma Aldrich
Ethanol	Prolab
Agarose	Peq-Lab
DNA Sizer III	Promega
Lambda Ladder	Promega
DNA-Ladepuffer	Promega
NaCl	Merck
NaOH	Merck
HCl	Merck
Na-Citrat	Merck
Tris	Sigma Aldrich
Papier-Filter	Whatman
Nitrocellulosemembran	Amersham Pharmacia
QuickHyb	Stratagene
Lachssperma-DNA	Stratagene
SDS	Appli Chem

Bestimmung der Telomeraseaktivität (TRAP-Assay):

Telomerase Detection Kit	CHEMICON bzw. Intergen
--------------------------	------------------------

[γ - ³² P]ATP	Amersham, bzw. Perkin Elmer
dNTP-Mix	Amersham Pharmacia, bzw. Promega
Nucleotid-Removal-Kit	Qiagen
Polyacrylamid	BioRad
APS	BioRad
TEMED	BioRad
Glycerol	Merck
Bromphenolblau	Riedel-de-Haen

Proteinbestimmung:

Bradford	BioRad
BSA	Sigma

Bestimmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase:

TRIzol	Gibco BRL
RNAsin	Promega
Chloroform	IT Baker
Isopropanol	Merck
RNase out	Gibco BRL
dNTP10 mM	Amersham Pharmacia, bzw. Promega
DNA-Marker	Promega

Bestimmung der Enzyme SCC und StAR:

iQ SYBR green Supermix	BioRad
------------------------	--------

Zellbiologische Arbeiten:

DMSO	Gibco BRL
DMEM	Gibco BRL
DMEM F12	Gibco BRL
Keratinocyten SFM	Gibco BRL
BPE (Rinderhypophysenextrakt)	Gibco BRL
EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)	Gibco BRL
Adventure DMEM F -12 (1:1)	Gibco BRL
HS	Gibco BRL
FGF (Fibroblasten Wachstumsfaktor)	Invitrogen
Ultroser G	PALL
Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit	Roche

Collagen I beschichtete Zellkulturschalen	Becton Dickinson
Primaria Zellkulturschalen	Becton Dickinson
PBS (pH 7,4)	Gibco BRL
Trypsin-EDTA	Gibco BRL
Trypsin	Gibco BRL
FCS	Gibco BRL
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL
L-Glutamin	Gibco BRL

Western-Blot:

HEPES	Sigma Aldrich
EDTA	Sigma Aldrich
NP-40	Fluka
Complete protease inhibitor	Roche
MicroBradford	BioRad
Prestained Protein Ladder	Fermentas
Methanol	J.T. Baker
Milchpulver	BioRad

3.1.2 Enzyme und Antikörper

Die verwendeten Enzyme und Antikörper wurden von folgenden Herstellern bezogen und nach deren Angaben eingesetzt:

Hinf I	Promega
Rsa I	Promega
Go-Taq-Polymerase	Promega
Taq-DNA-Polymerase	Promega
M-MLV-Reverse Transkriptase	Promega
Superscript Reverse Transkriptase	Gibco
T4-Polynucleotid-Kinase	Promega
Humanes p16 (551153)	BD Pharmingen
Humanes p21 (H-164)	Santa Cruz Biotechnologie
Humanes Cyclin D1 (H-295)	Santa Cruz Biotechnologie
Humanes p53 (FL-393)	Santa Cruz Biotechnologie
Anti-mouse und Anti-rabbit IgF	GE Healthcare UK Limited

3.1.3 Zellkulturmedien

Medium zum Auftauen und Splitten:

DMEM

10% FCS (fetales Kälberserum)

1% Penicillin/Streptomycin

1% L-Glutamin

Einfriermedium:

DMEM F12

20% FCS (fetales Kälberserum)

20% DMSO

Plattenepithelzell-Medium:

Keratinocyten SFM

40 µg/ml BPE (Rinderhypophysenextrakt)

1,0 ng/ml EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)

1% L-Glutamin

1% Penicillin/Streptomycin

Nebennierenrindenzell-Medium:

Adventure DMEM F -12 (1:1)

10% FCS (fetales Kälberserum)

10% HS (Pferdeserum)

0,1 ng/ml FGF (Fibroblasten Wachstumsfaktor)

1% Ultrosor G

1% L-Glutamin

1% Penicillin/Streptomycin

3.1.4 Puffer, Lösungen

Bestimmung der SA-β-Galaktosidase:

Fixierlösung

2,7ml 37% Formaldehyd

400µl 25% Glutaraldehyd

5ml 10x PBS pH7,3

add dH₂O auf 50ml

Lagerung bei 4°C

Farblösung pH 6,0

2,5ml 50mM Kaliumferricyanid

Lagerung bei -20°C

2,5ml 50mM Kaliumferrocyanid

Lagerung bei -20°C

50µl 1M MgCl₂

2,5ml 10xPBS

625µl X-Gal (40 mg/ml) Lagerung bei -20°C

add dH₂O auf 25ml

Lagerung im dunklen bei 4°C

für 1 Woche halbar

Telomerlängenbestimmung (TRF-Assay):

Denaturierungslösung

1,5M NaCl

0,5M NaOH

Neutralisierungslösung

1,5M NaCl

1M Tris/HCl pH 7,0

20 x SSC

3M NaCl

0,3M Na-Citrat

pH 7,0

Bestimmung der Telomeraseaktivität:

CHAPS-Lysepuffer (Bestandteil im TRAPeze®) CHEMICON bzw. Intergen

10x TBE-Puffer

0,89M Tris-Base

0,89M Borsäure

10mM EDTA

Western-Blot:

ELB-Puffer	0,05M HEPES 0,25M NaCl 0,005M EDTA autoklavieren 0,1% NP-40 steril dazupipettieren Lagerung bei 4 °C 1Tablette Complete protease inhibitor
Probenauftragspuffer (4X)	4% SDS 40% β -Mercaptoethanol 20% Glycerin 0,01% Bromphenolblau Lagerung bei -20 °C
Transferpuffer	0,025M TrisBase 2,2M Glycine 20% Methanol Lagerung bei 4 °C
Tris/SDS (4X, pH 6,8)	0,5M TrisBase 0,4% SDS Lagerung bei 4 °C
Tris/SDS (4X, pH 8,8)	1,5M TrisBase 0,4% SDS Lagerung bei 4 °C
TBS (4X, pH 7,6)	0,08M TrisBase 0,5M NaCl
TTBS (pH 7,6)	1XTBS, pH 7,6 0,1% Tween 20
Laufpuffer (5X)	0,125M TrisBase 1M Glycerin 0,5% SDS

Blockpuffer	1XTTBS 5% Milchpulver
Stripping-Puffer	0,025M Glycerin (pH 2) 1% SDS

3.1.5 Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide (Tab. 1) dienen als Primer für die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) und als Sonde für die Hybridisierungsreaktionen. Die Primer und die TRF-Sonde wurden bei der Firma TIB MOLBIOL/ Berlin und bei Metabion/ Martinsried synthetisiert.

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Basensequenz/(Anzahl Basenpaare)
hTERT-Primer (forward)	5'-GAC ACA CAT TCC ACA GGT CG- 3' (20)
hTERT-Primer (reverse)	5'-GAC TCG ACA CCG TGT CAC CTA C- 3' (22)
TRF-Sonde	5'-CCC TAA CCC TAA CCC TAA- 3' (18)
hSCC (forward)	5'-GCA ACG TGG AGT CGG TTT AT- 3' (20)
hSCC (reverse)	5'-TCC TCG AAG GAC ATC TTG CT- 3' (20)
hSTAR (forward)	5'-CAG GAC AAT GGG GAC AAA GT- 3' (20)
hSTAR (reverse)	5'-ATG AGC GTG TGT ACC AGT GC- 3' (20)

3.1.6 Geräte

Lichtmikroskop für die Zellkultur	Zeiss
Vertikale Gelelektrophoreseapparatur	BioRad
Geltrockner	BioRad
PCR-Cycler	Perkin-Elmer
Real-Time-PCR-Cycler Mx3000	Stratagene
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia
Röntgen Kassette	Amersham Pharmacia
Werkbank (Steril)	REWA
Zentrifuge	Heraeus, Hettich, Eppendorf

Brutschrank	Heracell
Horizontale Gelelektrophoreseapparatur	BioRad
Semi-Dry-Blotter	BioRad, Transblot SD
Gel-Imager	Intas
Hybridisierungssofen	UVP Laboratory Produkt
Inkubator	Eppendorf
Photometer	Eppendorf
ELISA-Reader	Perkin Elmer
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus
Geltrockner	BioRad
Digitalkamera	Olympus

3.1.7 Zellmaterial

EPC-hTERT-Zellen:

Normale, oesophageale, humane Plattenepithelzellen („esophageal epithelial cell“ EPC) wurden aus chirurgischem Operationsmaterial kultiviert und charakterisiert. Anschließend wurde die katalytische Untereinheit der Telomerase (hTERT) mit Hilfe des pBABE-hTERT Vektor von Robert Weinberg (Whitehead Institute, Massachusetts) retroviral transduziert (Harada *et al.*, 2003). In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Oliver Opitz (Universitätsklinik Freiburg) standen mir die untransfizierten EPC-Zellen und die EPC-hTERT-Zellen zur Verfügung.

NNR-hTERT-Zellen:

Die mit der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) retroviral transduzierten Nebennierenrindenzellen (NNR) wurden mir in Kooperation mit Prof. Dr. PJ Hornsby (Universität Houston, Texas) zur Verfügung gestellt.

Die normalen humanen Nebennierenrindenzellen (NNR) stammten von Nieren- oder Organspendern mit Resektion der Niere bei Nieren-Tumoren (Hornsby und Aldern, 1984).

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Medien

Normale Nebennierenrindenzellen (NNR) und mit hTERT transduzierte Nebennierenrindenzellen (NNR-hTERT-Zellen) wurden in einem speziellen Medium kultiviert. Mit diesem Medium, welches mit den Wachstumsfaktoren FGF und Ultrosor G supplementiert wurde, konnte ein optimales Wachstum über einen längeren Zeitraum, demonstriert werden (Mc Allister und Hornsby 1987).

Normale und hTERT transduzierte ösophageale Plattenepithelzellen (EPC) wurden in einem speziell modifizierten "keratinocyte serum-free medium" (ker-sfm) kultiviert. Dieses Medium erlaubt eine Subkultivierung von primären ösophagealen Plattenepithelzellen ohne sog. „Feeder-Layer-System“ und wurde mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, einschließlich BPE und EGF supplementiert. Zusätzlich ist eine Kalziumkonzentration von 0,4mM notwendig, um der Zelle die Ausbildung von Cadherinen und Desmosomen vermittelten Zell-Zell-Kontakten zu erlauben (Boyce, S. T. und R. G. Ham 1983).

3.2.1.2 Kultivieren der Zellen

Die adhärent wachsenden EPC-hTERT- und NNR-hTERT-Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zum Mediumwechsel unter sterilen Bedingungen wurde das alte Medium alle 2-3 Tage abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit frischem, auf 37°C vorgewärmtem Medium aufgefüllt. Die EPC Zellen wuchsen auf nicht beschichteten Zellkulturschalen (100mm). Die NNR-Zellen wuchsen auf Zellkulturschalen (100mm), die mit Collagen I beschichtet waren.

Die Vitalität und Morphologie der Zellen wurde lichtmikroskopisch vor jedem Mediumwechsel überprüft.

3.2.1.3 Passagieren der Zellen

Das Intervall zum Subkultivieren der kontinuierlich wachsenden Zellpopulationen betrug sowohl für die EPC als auch für die NNR-Zellen 7 Tage. Dazu wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 50% (EPC-hTERT-Zellen) und 70% (NNR-hTERT-Zellen) wachsen gelassen und dann verdünnt (Passagieren). Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit Trypsin bzw. Trypsin-EDTA unverdünnt (NNR-hTERT-Zellen) oder 1:2 verdünnt mit Medium (EPC-hTERT-Zellen) für ca. 5min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch dieses proteolytisch

aktive Enzym von der Kulturschale gelöst. Der Trypsinierungsprozess wurde dabei lichtmikroskopisch überprüft und der Aktivierungsprozess des Trypsins mit DMEM-Medium inaktiviert. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 800-1000rpm zentrifugiert, um Reste des EDTAs zu entfernen, um eine Verzögerung der Anheftung der Zellen zu vermeiden. Schließlich wurden die Zellen 1:5 oder nach Bedarf verdünnt, in neue Zell-Kulturschalen ausgesät und frisches, auf 37°C erwärmtes Medium zugefügt.

3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in Suspension gebracht. Ein definiertes Aliquot wurde entnommen und mit einer bestimmten Menge Trypanblau vermischt. Ein 10µl Aliquot wurde in einer Neubauer-Zählkammer unter das aufgesetzte Deckglas pipettiert und alle vitalen Zellen der vier großen Quadranten wurden mäanderförmig ausgezählt.

Die Zellzahl (bzw. zunächst Zelldichte) der Zellsuspension wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{ausgezählte Zellzahl aus 4 Quadranten} / 4) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.2.1.5 Bestimmung der Populationsverdopplung

Um ein Maß für die Teilungsrate der Zellen über die gesamte Kulturzeit zu erhalten, wurde die mittlere Populationsverdopplung (PD) über bestimmte Zeitabschnitte bestimmt. Daraus kann der kumulative Populations-Verdopplungs-Level (CPDL) nach folgender Formel berechnet werden:

$$PD = (\log \text{Endzahl} - \log \text{Ausgangszahl}) / \log 2$$

$$CPDL = \sum PD$$

3.2.1.6 Bestimmung der SA-β-Galaktosidase

Mit der Bestimmung der prozentualen β-Galaktosidase in Zellen kann auf das Stadium der Seneszenz in den Zellen geschlossen werden, da seneszente Zellen saure β-Galaktosidase-Enzymaktivität zeigen.

Die Bestimmungsmethode beruht darauf, dass die SA-β-Galaktosidase (senescence associated β-Galaktosidase) X-Gal zu einem bläulichen Farbpräzipitat in den Zellen oxidiert.

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch sterilfiltriert. Aufgrund der hohen Lichtempfindlichkeit von X-Gal wurde die Farblösung in einem dunklen Gefäß angesetzt.

Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen, in den Kulturschalen für 5min bei Raumtemperatur fixiert und 2x mit PBS gewaschen. Nach Zugabe der Färbelösung wurden aufgrund der Lichtempfindlichkeit von X-Gal die Kulturschalen in Alufolie eingepackt und für 8 - 12h bei 37°C inkubiert.

Die Zellen mit dem bläulichen Farbpräzipitat wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und bezogen auf die Gesamtzellzahl in Prozent ausgedrückt. Je eine frühe Passage der Zellen, die keine morphologischen Anzeichen einer Seneszenz aufwies, wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

3.2.1.7 Bestimmung der Zellproliferation

Mit Hilfe des „Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“ Kit der Firma Roche wurde der Anteil proliferierender Zellen bestimmt. Dieser Test wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Zellproliferation gegenüber dem prozentualen Vorhandensein der Seneszenz in verschiedenen Passagen zu überprüfen.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Einbau des Thymidinanalogons 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen. BrdU wurde durch spezifische BrdU-Antikörper mit konjugierter Meerrettichperoxidase (POD) detektiert, welche das zugegebene Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Farbstoff umsetzt.

Die Durchführung des Assays erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers in 96-Well-Platten.

Zur Ermittlung der ausreichenden Konzentration der adhaerent wachsenden Nebennierenrindenzellen wurde zu Beginn eine Testreihe mit Konzentrationen von 5×10^3 - 4×10^4 durchgeführt. Für den BrdU-Assay wurden in einem Dreifachansatz 5×10^3 Zellen/100µl/well ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurde BrdU zugeführt und 24h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und denaturiert, bevor der Antikörper für 120min zugesetzt wurde. Nachdem 3x gewaschen wurde, erfolgte die Zugabe des TMB-Substrats mit einer 10-minütigen Inkubation zur Farbentwicklung. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt. Die Absorption wurde schließlich im ELISA-Reader bei 405nm gemessen, wobei die Intensität der Farbentwicklung im direkten Verhältnis zur Anzahl proliferierender Zellen steht.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Agarosegel-Elektrophorese

DNA-Fragmente können aufgrund ihrer negativen Ladung in Agarosegelen durch ein elektrisches Feld voneinander getrennt werden. In der Polymermatrix der Agarose trennen sich dabei kleinere DNA-Fragmente aufgrund ihrer besseren Beweglichkeit von größeren Fragmenten, die sich langsamer in der Matrix bewegen. Die Gelelektrophorese erfolgte in Agarosegelen unterschiedlicher Konzentration, die sich nach dem aufzutrennenden Größenbereich der DNA richtet:

Agarosekonzentration(%)	Trennbereich lineare DNA (kb)
0,3	5-60
0,9	0,5-7
1,5	0,2-4
2,0	0,1-3

Agarose wurde im entsprechenden Volumen mit 1 x TBE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurde Ethidiumbromidlösung in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Die Gellösung wurde in eine vorbereitete Gelapparatur luftblasenfrei gegossen. Nach dem Erstarren wurden die mit den beiden Farbstoffen Bromphenolblau und Xylen Cyanol versetzten Proben aufgetragen. Der Auftragspuffer enthielt Glycerin, das die Dichte der Probe erhöht und sie in die Taschen des Gels sinken läßt.

Die Gelelektrophorese erfolgte in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur bei einer konstanten Spannung mit 5 V/cm, so lange, bis die Bromphenolblaufront das letzte Drittel des Gels erreicht hatte. DNA und RNA wurden unter UV-Licht ($\lambda=312\text{nm}$) durch Fluoreszenz sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Videodokumentationssystems aufgenommen. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein DNA-Längenstandard der Firma Promega verwendet.

3.2.2.2 Absorptionsmessungen

Absorptionsmessungen erfolgen zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.

Die UV-Absorption der Nukleinsäuren wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260nm in einer Quarz-Küvette bestimmt. Der Abgleich erfolgte gegen H₂O. Aus dem erhaltenen Absorptionswert wird die Konzentration nach Angaben von Sambrook *et al.*, 1989 errechnet:

$A_{260} = 1,0$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ für doppelsträngige (ds) DNA

$A_{260} = 1,0$ entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$ für einzelsträngige (ss) DNA bzw. RNA

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades von RNA und DNA siehe Punkt 3.2.2.3 und 3.2.2.6.

3.2.2.3 Bestimmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT)

Arbeiten unter RNasen freien Bedingungen:

Um RNase-Kontaminationen beim Arbeiten mit RNA zu vermeiden, wurden neben dem Tragen von Einmal-Handschuhen weitere Vorsichtsmaßnahmen eingehalten: Alle verwendeten Geräte, Pipetten und Plastikmaterialien wurden mit RNasin (Firma Promega), einem Inhibitor von RNasen, behandelt. Die Isolierung erfolgte an einem RNA-freien Arbeitsplatz mit Pipetten, die ausschließlich für Arbeiten mit RNA benutzt wurden.

Isolierung von RNA:

Das Grundprinzip der RNA-Isolierung besteht darin, Zellen zu lysieren, zelluläres Protein mittels Phenol/Chloroform-Extraktion zu entfernen und anschließend RNA mittels Isopropanol zu präzipitieren. Es wird Gesamt-RNA erhalten, die ein Gemisch aus rRNA, mRNA, tRNA und snRNA darstellt, wobei rRNA ca. 80-90% und mRNA nur einen Anteil von ca. 2% der Gesamt-RNA ausmacht.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Isolierung der RNA mit TRIzol der Firma Gibco und wurde nach deren Angaben durchgeführt.

Vor der Homogenisierung der Zellen wurden diese 2X mit PBS gewaschen und anschließend entsprechend den Angaben der Herstellerfirma durch Zugabe von 0,75ml TRIzol zur Zellkulturplatte lysiert. Die Zellen wurden mit einem Zellspatel von der Zellkulturschale in ein Reaktionsgefäß überführt und 5min bei 15-30°C inkubiert. Zur Phasen-Trennung wurde die Zellsuspension mit 0,2ml Chloroform 15sek. ausgeschüttelt, 15 min bei 15-30°C inkubiert und abzentrifugiert (15min bei 11600rpm bei 4°C). In der oberen flüssigen Phase sind die Nukleinsäuren enthalten, die organische Phase mit den Proteinen wurde verworfen. Die RNA wurde mit 0,5ml Isopropanol für 10min bei 15-30°C und einem Zentrifugationschritt für 10min bei 11600rpm bei 4°C präzipitiert. Das enthaltende gelartige RNA-Pellet wurde mit 1ml 75%iges Ethanol gereinigt und 5-10min bei Raumtemperatur getrocknet. Das isolierte RNA-Pellet wurde nach der Lufttrocknung in 50 μl RNase-freiem H₂O gelöst und bei -80°C gelagert.

Qualitätskontrolle der RNA-Präparation:

Die Mengenbestimmung isolierter RNA erfolgte wie unter Punkt 3.2.2.2 (Absorptionsmessungen) beschrieben. Bei sauberen RNA-Präparationen sollte das Verhältnis von A_{260}/A_{280} zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

Zur Qualitätskontrolle wurde 1µg der Gesamt-RNA auf denaturierende 1% igen Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die 28S rRNA- und die 18S rRNA-Bande der Proben sollten als scharfe Banden im Gel zu detektieren sein, wobei die 28S rRNABande zweimal intensiver sein sollte als die 18S rRNA-Bande.

3.2.2.4 RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction)**Erst-Strang-cDNA-Synthese:**

Die Erst-Strang-cDNA-Synthese erfolgte bei den NNR-hTERT-Zellen mit der M-MLV-Reverse Transkriptase (RT) der Firma Promega.

Je 1µg der isolierten Gesamt-RNA der NNR-hTERT-Zellen wurden in die Erststrang-cDNA-Synthese mit 0,5µg Oligo(dT)18-Primer mit Aqua dest. 5min bei 65°C inkubiert und 5min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden folgende Komponenten zugesetzt (s.Tab. 2):

Tab. 2: Komponenten der RT-PCR

Reagentien	pro Ansatz
5XPuffer M-MLV RT	5µl
10mM dNTP	1,25µl
M-MLV RT	1µl (50-100 U)
RNasin	4µl (1U/µl)
RNase-freies Aqua dest	add. auf 25µl

Die Hybridisierung der poly(dT)-Sequenz der Oligonukleotide an die RNA wurde für 10min bei 40°C durchgeführt, anschließend erfolgte die Synthese des ersten cDNA-Stranges für 50min bei 48°C, bevor im letzten Schritt die Reverse Transkriptase für 15min bei 70°C inaktiviert wurde.

Die Erst-Strang-cDNA-Synthese der EPC-hTERT-Zellen wurde mittels Superscript™ RNase H-Reverse Transkriptase System von der Firma Gibco unter Verwendung des beiliegenden Protokolls durchgeführt. Für die Hybridisierung wurden je 3µg Gesamt-RNA in Gegenwart

von 0,5µg Oligo p(dT)18-Primer und 1µl 10mM dNTP's für 5min bei 65°C inkubiert. Danach wurde mit 5 x Erststrang-Puffer, 2µl 0,1M DTT und 4U RNase-Out für 2min bei 37°C inkubiert. Die cDNA-Erststrangsynthese wurde durch Zugabe von 100U Superscript Reverse Transkriptase und 50min Inkubation bei 37°C durchgeführt.

Die Synthese des zweiten cDNA-Stranges erfolgte bei den EPC-hTERT-Zellen als auch bei den NNR-hTERT-Zellen in Anwesenheit der DNA-Polymerase I in einer PCR-Reaktion.

PCR-Reaktion:

Die PCR ist eine Methode zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Abschnitten zwischen zwei synthetischen Oligonukleotiden (Saiki *et al.*, 1987; Mullis und Faloona, 1987), die sich an den beiden Enden der zu amplifizierenden DNA-Sequenz befinden. Diese Oligonukleotide dienen als Primer für die DNA-Synthesereaktion. Ein Reaktionszyklus besteht aus einer Abfolge verschiedener Temperaturschritte: Während der thermischen Denaturierung bei Temperaturen zwischen 92-96°C wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgetrennt. In der Annealingphase lagern sich die Primer bei entsprechender Hybridisierungstemperatur (ca. 37-68°C, in Abhängigkeit von der Basensequenz) an. Anschließend erfolgt die Polymerisationsphase, in der durch eine DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung der komplementäre Strang durch Einbau freier dNTPs aus der Lösung synthetisiert wird. Die Synthesereaktion erfolgt beim Temperaturoptimum der hitzestabilen DNA-Polymerase. Bei der *Taq* Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* liegt die Temperatur bei 72°C. Ein Reaktionszyklus hat somit eine Verdoppelung der Template-DNA-Sequenz zur Folge. Das erneute Durchlaufen des Reaktionszyklus im Thermo-Cycler führt nach Beendigung der Polymerisationsphase wiederum zu einer Verdoppelung der zuvor duplizierten DNA-Sequenz.

In dieser Arbeit wurde die PCR zur Synthese des zweiten cDNA-Stranges und zur nachfolgenden Amplifikation genutzt.

Die Sequenzen der eingesetzten Primer und der verwendeten Sonde sowie deren Länge sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Der PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

Komponente	Konzentration im Reaktionsansatz
dNTP-Mix 10mM	0,2mM je dNTP
PCR-Puffer 10 x	1x
MgCl ₂ 10mM	1mM
hTERT forward	10pmol/µl
hTERT reverse	10pmol/µl
Erststrang cDNA	1-10µl
Taq-DNA-Polymerase	1,25U
bzw.	
Go-Taq-DNA-Polymerase	2,5U
add. Aqua dest auf 50µl	

Im Rahmen der PCR wurden folgende Temperatur-Zyklen und Zeiten durchlaufen:

PCR Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1	94 °C	5min
Denaturierung der DNA	30	94 °C	45sek
Annealing der Primer	30	60 °C	45sek
Extension (DNA-Synthese)	30	72 °C	30sek
Komplettierung der DNA-Synthese	1	72 °C	15min
Kühlung des Reaktionsansatzes	1	4 °C	

Zur Vermeidung einer DNA-Kontamination wurde mit speziell für die PCR-Reaktion vorgesehenen Reaktionsgefäßen, Pipettenspitzen und Lösungen gearbeitet. Eine Negativkontrolle wurde stets mitgeführt, die alle Komponenten bis auf das DNA-Template enthielt. Die Annealingtemperatur wurde nach der empirischen Formel: $T_{ann} = 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) - 5^{\circ}\text{C}$ abgeschätzt (Lion und Haas, 1990). Ergaben sich für die verwendeten Primer unterschiedliche Annealingtemperaturen, wurde der niedrigere Wert für die Programmierung des PCR-Programms verwendet.

Visuelle Auswertung:

Zur visuellen Auswertung der Bandenmuster wurden (wie in Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben) 20µl des PCR-Produktes auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Beurteilung erfolgte unter UV Licht anhand der Größe mit Hilfe eines DNA-Markers. Zur Dokumentation wurden die Bandenmuster mit einer Videokamera dokumentiert.

3.2.2.5 Real-Time quantitative PCR

Für die Quantifizierung wichtiger Enzyme der Steroidbiosynthese wurde die real-time quantitative PCR eingesetzt.

Das Real Time PCR-System bietet die Möglichkeit PCR-Produkte während ihrer Amplifikation mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen zu detektieren und die gewonnene DNA dabei zu quantifizieren. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts steigt die Fluoreszenz mit jedem PCR-Zyklus an, d.h. der Anstieg der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Anreicherung des Amplifikats. Eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgt mit Hilfe einer Kalibriergeraden eines gewählten Standards.

Die Methode basiert auf der Bindung von DNA-Farbstoffen (SYBR-Green) an doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der

Ziel-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

Um die Spezifität zu bestimmen, wurde nach Abschluß der Amplifikationszyklen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei der für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wird SYBR-Green freigesetzt und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert. Doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten hat einen höheren Schmelzpunkt als unspezifisch entstehende Primerdimere. Als Messwert erhält man den so genannten CT-Wert (Threshold Cycle), welcher der Zyklenzahl entspricht, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporterfluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird.

Gesamt-RNA wurde wie unter Abschnitt 3.2.2.3 beschrieben, mit Hilfe von TRIzol isoliert. Je 1 µg der isolierten Gesamt-RNA wurde durch M-MLV Reverse Transkriptase in Gegenwart von Oligo(dT)₁₅-Primern in die Erst-Strang cDNA synthetisiert. Die Synthese des zweiten cDNA-Stranges erfolgte in der PCR-Reaktion (s. Abschnitt 3.2.2.4). Die Primer-Sequenzen sind in Tab. 1 Oligonukleotide aufgeführt. Für die PCR wurden 100ng cDNA der zu bestimmenden Proben mit dem Reaktionsmix zu 25µl ergänzt, der 1x Master Mix und je 400nM der Primer enthielt. Jeder real-time quantitative PCR-Lauf erfolgte in einer Dreifachbestimmung mit einer initialen Denaturierung 10min bei 95°C und folgenden Temperatur-Zyklen und Zeiten: 40 Zyklen 95°C für 20sek., 54°C für 30sek. und 72°C für 30sek. Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle (anstelle der cDNA-Probe wurde Wasser zum RT-Reaktionsmix gegeben) und eine Positivkontrolle, die cDNA-Probe eines aldosteronproduzierenden Nebennierenrindenadenoms (Conn-Adenom), mitgeführt. Die Ergebnisse wurden mit MxPro (Stratagene) und mit Excel Software (Microsoft) ausgewertet.

3.2.2.6 Bestimmung der Telomerlängen (TRF-Analyse)

Folgende Arbeitsschritte waren für die TRF-Analyse notwendig:

- Isolierung genomischer DNA
- Restriktionsanalyse
- Gel-Elektrophorese
- Southern-Blot
- Kapillarer Transfer
- Herstellung radioaktiv markierter Hybridisierungssonden
- Southern-Hybridisierung
- Detektion und Auswerten der Telomerlängen:

Isolierung genomischer DNA:

Die Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen erfolgte nach der Alkoholfällung mit dem Gentra-DNA-Isolierungskit der Firma Biozym bzw. Qiagen und wurde nach deren Angaben angewendet. Diese Standardmethode ermöglichte eine hohe Ausbeute an DNA, die für die Bestimmung der Telomerlänge mittels Southernblot-Analyse erforderlich war.

Die Zellpellets wurden in Abhängigkeit der Zellzahl im Zellysepuffer (0,3ml Puffer für 10^5 - 10^6 Zellen) resuspendiert. Es folgte ein RNA-Verdau durch die Zugabe von 1,5µl RNase A Lösung. Die Proben wurden 25mal invertiert und nach 5-minütiger Inkubation bei 37°C für mindestens 1min auf Eis abgekühlt. Die Proteine wurden mit 100µl Proteinpräzipitationlösung ausgefällt und durch Zentrifugation (1min bei 13000rpm) pelletiert. Anschließend erfolgte die Fällung der Gesamt-DNA nach der Standardmethode der Alkohol-Fällung durch Zugabe von 300µl Isopropanol. Die anschließende Zentrifugation für 1min bei 13000rpm ergab ein schmales weißes DNA-Pellet, dass schließlich mit 300µl 70%igem Ethanol gereinigt und abzentrifugiert (1min bei 13000rpm) wurde.

Das 10min getrocknete DNA-Pellet wurde in 50µl Tris-EDTA (TE) -Puffer vorsichtig aufgenommen und schließlich über Nacht bei Raumtemperatur rehydriert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

Zur Bestimmung der Menge (siehe 3.2.2.2.) und des Reinheitsgrades der isolierten DNA wurde die Absorption bei 260nm und 280 nm gemessen. Aus dem Quotienten von A_{260}/A_{280} wurde die Reinheit der DNA ermittelt. Bei Werten $<1,70$ ist die DNA zu stark mit Proteinen und bei Werten $>1,90$ ist die DNA mit RNA verunreinigt.

Restriktionsanalyse:

Bei dieser Methode handelt es sich um das gezielte Schneiden doppelsträngiger DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen, die spezifische, kurze palindrome DNA-Sequenzen erkennen. Die Spaltung der kovalenten Bindung erfolgt zwischen dem Desoxyribose- und dem Phosphat-Anteil der DNA. Um eine möglichst vollständige enzymatische Spaltung hochmolekularer genomischer DNA und keine Spaltung telomerischer DNA zu erreichen, wurden die Enzyme HinfI und RsaI gewählt, die aufgrund ihrer Erkennungssequenzen mit häufigen Schnittstellen im subtelomerischen, genomischen Bereich liegen. Die Zusammensetzung des Restriktionsansatzes erfolgte nach Angaben des Herstellers; 5µg DNA wurden mit 3U HinfI und RsaI in einem Volumen von 50µl verdaut.

Nachdem der Restriktionsansatz über Nacht bei 37°C inkubiert wurde, wurde 1µl des Restriktionsverdauens in einem 1% Agarosegel mit ungeschnittener gDNA verglichen. Anschließend wurde das Volumen des Verdauens in einer Speedvac auf ein Volumen von 20µl eingeeengt. Die ungeschnittenen Telomere konnten nun von den zahlreichen kurzen DNA-Fragmenten im Agarosegel getrennt werden.

Gel-Elektrophorese:

Die DNA-Fragmente wurden in einem 0,5% Agarosegel aufgetrennt. Als Größenmarker wurde 1,5µg DNA Sizer III oder 1µg Lambda Ladder eingesetzt. Der anschließende Gellauf zur Auftrennung der Telomere erfolgte 6-8h bei 40V. Bromphenolblau und Xylen Cyanol des Probenpuffers ermöglichten eine Abschätzung der Auftrennung der DNA-Fragmente während des Gellaufs. Um die Größen der Telomerlängen zu bestimmen, wurde der DNA-Längenstandard unter UV mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert.

Southern-Blot:

Beim Southern-Blot werden genomische DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht in einem Agarosegel getrennt (Southern 1975), auf eine Trägermembran (Nitrocellulose oder Nylon) transferiert, fixiert und mit einer markierten DNA-Sonde hybridisiert. Mittels anschließender Detektion kann die Markierung nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde das Verfahren zur Identifizierung von Telomerlängen angewandt.

Kapillarer Transfer:

Der Transfer der DNA-Fragmente vom Gel auf die Trägermembran erfolgte mittels der Kapillar-Methode: Für genomische Southern-Blots wurden dazu 5µg DNA verdaut und in einem 0,5%igen Agarosegel aufgetrennt (s. Punkt 3.2.2.1.). Falls Fragmente >5kb zu erwarten waren, wurde das Gel 10min in 0,25M HCl auf einem Schüttler inkubiert, wodurch später Strangbrüche induziert werden (Depurinierungsschritt). Das Gel wurde mit H₂O

gespült und 3 x 15min in Denaturierungslösung inkubiert, welches gewährleistet, daß die DNA einzelsträngig vorliegt. Wurde die DNA zuvor depurinert, führt dieser Schritt zusätzlich zu einer Hydrolyse des Phosphodiester-Rückrats an den Depurinierungsstellen. Das Gel wurde erneut mit H₂O gespült und 3 x 15min in Neutralisierungslösung unter leichtem Schütteln neutralisiert.

Eine auf Gelgröße zurechtgeschnittene, positiv geladene Nitrocellulosemembran wurde 5min in 20x SSC und zwei genauso große Whatman-Filter wurden 5min in 2x SSC präinkubiert.

Ein 1cm hoher Plexiglasblock wurde in Whatman-Papier eingeschlagen und in eine Glasschale gestellt, die mit 20x SSC gefüllt war. Das 20x SSC reichte dabei knapp an die Oberkante des Blocks. Zuunterst wurde das Gel auf das Whatmanpapier gelegt und die Ränder des Gels mit Parafilm abgedeckt, um den Kontakt zwischen dem ober- und unterhalb des Gel-Membran-Komplexes befindlichen Whatman-Papier zu vermeiden. Anschließend wurde die Trägermembran luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Auf die Membran wurden die angefeuchteten Whatman-Filter und ein Stapel saugfähige Papiere gelegt, welches mit einem etwa 1kg schweren Gewicht beschwert wurde. Durch die Saugwirkung des Papiers wurde der 20x SSC-Puffer aus der Schale nach oben gesaugt und damit die DNA aus dem Gel auf die Membran transferiert. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dem Transfer wurde die Blot-Membran markiert und an der Luft getrocknet.

Die Immobilisierung erfolgte durch UV-Bestrahlung mit 1200 μ Joule im UV-Stratalinker 1200 der Firma Stratagene. Die Membran wurde direkt in die Hybridisierung eingesetzt.

Herstellung radioaktiv markierter Hybridisierungssonden:

Mit Hilfe einer radioaktiv-markierten DNA-Hybridisierungssonde ist es möglich bestimmte Sequenzen eines Southern-Blots sichtbar zu machen.

Um Telomerlängen zu bestimmen, wurde als spezifische Telomersonde (TRF-Sonde) ein Oligonukleotid bestehend aus 3 Telomer-Repeats [(TTAGGG)₃] (s. Tab. 1) eingesetzt.

Die radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde erfolgte mit Hilfe von [γ -³²P]ATP. Dabei wird in einer durch das Enzym T4-Polynucleotid-Kinase katalysierten Reaktion die γ -Phosphatgruppe des ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe der DNA übertragen. Für diesen Reaktionsschritt wurden 5pmol Oligonukleotid, [γ -³²P]ATP, T4- Polynucleotid-Kinase und Puffer der Firma Promega nach deren Angaben 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden überschüssige DNA Reste mit dem Nucleotid Removal Kit der Firma Qiagen entfernt. Die spezifische Telomersonde wurde mit 200 μ l Lachssperma-DNA (10 mg/ml) versetzt, um unspezifische DNA auf der Nitrocellulosemembran zu binden.

Southern-Hybridisierung:

Nachdem die DNA, wie oben beschrieben, an die Membran gebunden wurde, wurde diese in einem Hybridisierungsröhrchen in einem Hybridisierungssofen unter Rotieren für mind. 30min bei 37°C mit dem Hybridisierungsmix vorinkubiert. Diese Prähybridisierung diente dazu, noch verbliebene freie Bindungsstellen zu blockieren.

Damit sich DNA-Hybride bei der Hybridisierung bilden können, müssen beide Reaktionspartner einzelsträngig vorliegen. Dieses geschieht für die immobilisierte DNA-Sequenz durch alkalische, für die DNA-Sonde durch thermische Denaturierung. Die radioaktiv markierte Telomersonde wurde dazu 10min bei 95°C denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt und zum Prähybridisierungsmix gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 4h bei 37°C. Außerdem mußten für spezifische Basenpaarungen stringente Waschbedingungen eingehalten werden, wodurch Hybride mit Fehlpaarungen getrennt und die überschüssigen DNA-Sonden herausgewaschen wurden. Die Temperatur für die Hybridisierung errechnete sich aus folgender empirischer Formel (Bolton und McCarthy, 1962):

$$T_{\text{opt}} = [81,5^{\circ}\text{C} + 16,61 \times \log (\text{mol Na}^+/\text{L}) + (\% \text{ G/C-Gehalt}) - (600/\text{N})] - 25^{\circ}\text{C}$$

Das stringente Waschen erfolgte dann mit 2X SSC/0,1% SDS für 30min bei T_{opt} 32°C und 2x 8min mit 0,2X SSC/0,1% SDS.

Detektion und Auswerten der Telomerlängen:

Zur Detektion der radioaktiv markierten Telomersonde wurde die Nitrocellulosemembran feucht in Haushaltsfolie eingeschlagen und bei -80°C unter einem Röntgenfilm in einer Expositionsbox mit Verstärkungsfolie über Nacht oder bis zu mehreren Tagen inkubiert. Der Röntgenfilm wurde im Entwickler der Firma Agfa entwickelt. Die Telomerlängen wurden anhand des DNA-Sizer III ermittelt.

3.2.2.7 Bestimmung der Telomeraseaktivität**Proteinextraktion:**

Die Proteinextraktion der Zellen erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers des TRAPEZE Telomerase Detection Kit. Dazu wurden 10^5 - 10^6 Zellen in 200µl CHAPS-Lysepuffer resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20min, 12.000rpm, 4°C) wurde ein Aliquot des Überstands für die Proteinbestimmung entnommen. Für den Telomeraseassay wurde ein Aliquot des Proteinüberstandes in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Bestimmung der Proteinkonzentration:

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der jeweiligen Proben erfolgte nach der Bradfordmethode mit dem Farbstoff Coomassie-Blau. Der Farbstoff ist kompatibel mit dem CHAPS-Lysepuffer des TRAP-Assay und bindet unspezifisch Proteine, die als blauer Farbkomplex nachweisbar sind. 1-5µl der Proteinlösung wurden in einem Reaktionsgefäß mit 1ml Coomassie-Blau Lösung versetzt. Nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur wurde innerhalb von 30-60min die Absorption Proben bei 595nm gemessen.

Zur Erstellung einer Standardkurve wurden bekannte Mengen (0-20µg) Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. In den TRAP-Assay wurde eine Proteinmenge von 0,4 – 1,5µg eingesetzt.

Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP):

Die Methode des „Telomeric Repeat Amplification Protocol“ (TRAP) zur Bestimmung der Telomeraseaktivität *in vitro* wurde von Kim und Mitarbeiter (Kim *et al.*, 1994) entwickelt. Der verwendete TRAPEZE® Telomerase Detection Kit der Firma Intergen und CHEMICON ist eine auf der Basis einer PCR-Reaktion beruhende, sehr sensitive Methode zum Nachweis der Telomeraseaktivität.

Der TRAP-Assay erfolgte in zwei Schritten:

Im ersten Schritt werden in telomerasepositiven Proben immer ein oder mehrere Hexanukleotide der Sequenz (GGTTAG) an das freie 3'-Ende des Telomerasesubstrats (TS), einem telomerähnlichen Oligonukleotid angehängt. Im zweiten Schritt dienen die gebildeten Telomeraseprodukte als Matrize für die PCR-Reaktion, bei welcher der TS-Primer nun als „forward primer“ und der RP-Primer als „reverse primer“ fungiert.

Die so entstehende, um jeweils 6 Basen verlängerte, typische „Telomeraseleiter“ startete aufgrund der PCR-Bedingungen bei 50 Basen. In der folgenden Abb. 6 sind beispielhaft typische Telomeraseleitern dargestellt.

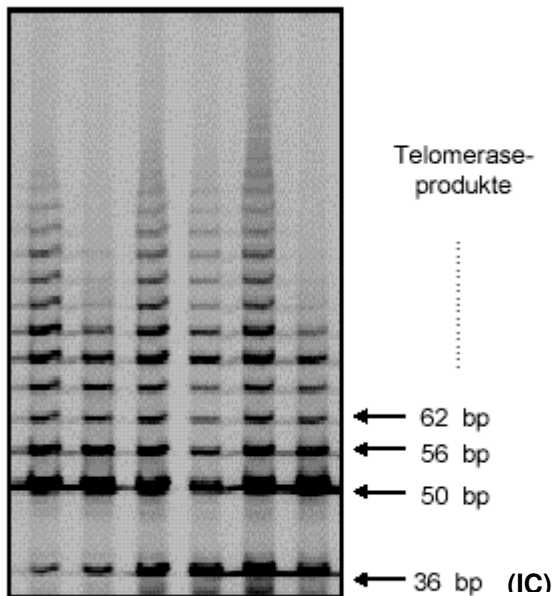


Abb. 6: Darstellung der mittels Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) gebildeten Telomeraseprodukte.

Telomeraseprodukte beginnen aufgrund der PCR-Bedingungen bei 50bp und bilden die typische Telomeraseproduktleiter. Die 36bp-Bande stellt eine interne Kontrolle dar, der im Mastermix zugeführten Primer K1 und dem Template TSK1, IC: interne Kontrolle. (Abbildung aus Versuchsanleitung der Firma Intergen).

Alle Arbeitsschritte des TRAP-Assays wurden auf Eis durchgeführt. Der Proteinüberstand der Proben wurde sofort nach Herstellung der jeweiligen Verdünnung wieder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle weiteren Arbeiten wurden aufgrund der radioaktiven Nachweismethode hinter einem Plexiglasschirm durchgeführt. Um eine Kontaminationsgefahr zu minimieren wurden beim Pipettieren Filterspitzen eingesetzt.

Die radioaktive Markierung des TS-Primers erfolgte mit Hilfe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in einer durch das Enzym T4-Polynukleotid-Kinase katalysierten Reaktion die γ -Phosphatgruppen des ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe des Oligonukleotides überträgt. Die überschüssigen Nukleotide wurden aus der Reaktion mit dem Nukleotid-Removal-Kit der Firma Qiagen entfernt und in 100 μl Elutionspuffer eluiert. Diese wurden direkt in den TRAP-Assay eingesetzt. Für den anschließenden TRAP-Assay und die PCR-Reaktion enthält der TRAPEZE® Telomerase Detection Kit alle bis auf $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und Taq-Polymerase notwendigen Reagenzien um Telomeraseaktivität in Zellen nachzuweisen. Der Assay wurde nach Herstellerangaben eingesetzt.

Als Positivkontrolle zur Überprüfung der Effizienz der PCR-Reaktion und der Detektion der PCR-Produkte dienten in jeder PCR-Reaktion Telomerase positive Zellextrakte, die dem Kit beigelegt waren. Da die Telomerase ein hitzesensitives Enzym ist, wurde als Negativkontrolle jede zu untersuchende Probe auf Hitzesensitivität geprüft. Dazu wurde einer der zu untersuchenden Zellextrakte gleicher Passage auf Telomeraseaktivität und ein zweiter auf Hitzesensitivität (Hitzebehandelter Test) geprüft. Die Zellextrakte wurden dafür für 10min bei 85°C zur Inaktivierung der Telomerase inkubiert. Zur Überprüfung von Primer-

Dimeren, PCR-Artefakten und PCR-Kontaminationen diene eine Leerkontrolle mit 2µl CHAPS-Lysepuffer.

Als Standard für die Abschätzung der Menge des TS Primers war dem Kit das Kontrolltemplate TSR8 zugesetzt, das das Telomerase substrat um 8 Telomer-Repeats verlängert.

Nachweisreaktion der TRAP-Produkte:

Nach der PCR-Reaktion wurden die PCR-Produkte in einem nicht denaturierenden 10%igen Polyacrylamidgel in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur der Firma BioRad aufgetrennt. Die PCR-Proben wurden mit 5µl Ladebuffer versetzt und 25µl Gesamtvolumen auf das 10%ige Polyacrylamidgel geladen und über Nacht bei 30-40V aufgetrennt. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel auf Whatmann-Papier gelegt, mit Klarsichtfolie abgedeckt und für 1h im Geltdrockner bei einer Temperatur von 80°C getrocknet und schließlich autoradiographiert. Die Expositionszeiten auf Röntgenfilm lagen bei Raumtemperatur zwischen 1h und 3 Tage. Anschließend wurden die Proben analysiert.

Die Auswertung der Telomeraseaktivität erfolgte visuell durch Beurteilung der Intensität der Banden und der Anzahl der Sprossen der Telomeraseleitern unter Berücksichtigung der Kontrollen.

3.2.2.8 Western-Blot

Der Western-Blot dient der spezifischen Nachweisreaktion von Proteinen. Beim Western-Blotting werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Trägermatrix überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen. Indem man spezifische Proteine auf der Trägermatrix durch Bindung mit einem spezifischen Antikörper gegen das Protein markiert, kann man auf die Expression dieses Proteins schließen.

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgt über die Immunfärbung. Dazu wurde primär ein unkonjugierter, spezifischer Antikörper an das transferierte Protein gebunden. Zum Nachweis des entstandenen Immunkomplexes war die Bindung eines sekundären Antikörpers erforderlich. Dieser spezies-spezifische sekundäre Antikörper erkannte den primären Antikörper als Antigen und war an alkalische Phosphatase konjugiert, über welche die Bindung sichtbar gemacht wurde.

Proteinisolierung:

Die Proteinisolierung erfolgte durch Fällung mit einem Reagenz mit hoher Salzkonzentration. Die Extraktion der Proteine wurde auf Eis durchgeführt. Das Zellmaterial wurde dazu mit eiskühlten PBS gewaschen. Unter Zugabe von 1ml ELB-Puffer wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst. Anschließend wurde die Zellslösung in ein 1,5ml Röhrchen überführt und für 1h bei 4°C rotiert. Nach der Zentrifugation (5min für 13.000rpm bei 4°C) wurde ein Aliquot des Überstands für die Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen.

Bestimmung der Proteinkonzentration:

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der jeweiligen Proben erfolgte nach der Micro-Bradfordmethode mit dem Farbstoff Coomassie-Blau. Der Farbstoff bindet unspezifisch Proteine, die als blauer Farbkomplex nachweisbar sind.

1µl der Proteinlösung wurde dazu 1:100 mit Aqua dest. verdünnt und in einem Reaktionsgefäß mit 25µl Coomassie-Blau Lösung versetzt. Nach Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben bei 595nm gemessen. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden bekannte Mengen (0-20µg) Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt.

In Gegenwart von SDS werden die Proteine denaturiert und gemäß ihres Molekulargewichtes während ihrer Wanderung im elektrischen Feld durch die Gelmatrix getrennt. Dabei durchläuft die Probe ein Sammelgel, in dem die Proteine zu einer scharfen Bande fokussiert werden und dann ein Trenngel, in dem sie nach ihrer Größe getrennt werden. Die Proteine werden zunächst bei der Probenvorbereitung in SDS-Probenpuffer hitzedenaturiert. Durch den Zusatz des anionischen Detergenz SDS wird die Eigenladung der Proteine so effektiv überdeckt, daß anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. β -Mercaptoethanol im Probenpuffer bewirkt eine Reduzierung von Disulfidbrücken in den Polypeptidketten.

Tab.3: Zusammensetzung der Gele für die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

	10%iges Sammelgel	3,9%iges Trenngel
40% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid (ml)	1,19	0,137
H ₂ O (ml)	1,35	0,90
Tris/SDS 4X (ml)	0,91 (pH 8,8)	0,35 (pH 6,8)
10% APS (µl)	35	7
TEMED (µl)	1,40	1,40

Eine Proteinmenge von 10µg wurden mit 1/4 Volumen 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben 5-10min bei 98°C hitzedenaturiert. Hitzedenaturierte Proben wurden an zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen und anschließend auf das 10%ige diskontinuierliche Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Gelkammern von Biorad, wobei die Stromstärke für den Probenlauf im Gel auf konstante 100V eingestellt wurde. Die elektrophoretische Auftrennung wurde beendet, kurz nachdem die Bromphenolblaufront aus dem Trenngel herausgelaufen war. Die Molekulargewichtsbestimmungen erfolgten mit Hilfe eines Proteinstandards.

Western-Blot:

Unmittelbar nach der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran (Trägermatrix). Das Standardverfahren des Protein-Blottings nach Towbin (1989) und Khyse-Anderson (1984) wurde durch die Zugabe von 20% Methanol Transfer-Puffern modifiziert.

Für die Bindung der Proteine auf eine Trägermembran wurde eine PVDF-Membran benutzt, die eine hohe Bindekapazität für Proteine besitzt. PVDF-Membran und 6 Filterpapiere wurden auf die entsprechende Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran wurde für 1 min mit 100% Methanol benetzt. Das SDS-Gel nach der Elektrophorese, die Filter und die PVDF-Membran wurden 5 min im Transferpuffer äquilibriert. Zum Semi-Dry-Blottingverfahren wurden auf die untere Platinelektrode des Semi-Dry-Blotters 3 Filterpapiere, darauf die Blotmembran, darüber luftblasenfrei das SDS-Gel und schließlich 3 Filterpapiere aufgeschichtet. Luftblasen wurden aus dem Sandwich durch vorsichtiges Rollen mit einem Glasstab entfernt. Der Transfer erfolgte 60-80min bei 2 mA/cm².

Nachweisreaktion durch Immunfärbung:

Der spezifische Nachweis der transferierten Proteine erfolgte mittels Immunfärbung durch Bindung der Primär- und Sekundärantikörper.

Vor Beginn der Nachweisreaktion musste der Protein-Blot abgesättigt werden. Dieses „Blocken“ diente dazu, überschüssige Proteinbindestellen der Membran zu überdecken, und eine unspezifische Bindung der Nachweisreaktion zu verhindern. Der Blot wurde für 1 h mit Blockpuffer bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung inkubiert.

Anschließend wurde der Blot über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper verdünnt in Blockingpuffer rotiert. Nach Bindung der primären Antikörper wurde die Reaktion für 4x 15min mit TTBS gewaschen, um anschließend den Blot mit Blockingpuffer zu äquilibrieren. Danach wurde für 1h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert. Es folgten drei Waschschrte in TTBS von jeweils 15min.

Nach einer Äquilibration in 1ml Reaktionspuffer wurden die immunreaktiven Proteinbanden über die konjugierte Alkalische Phosphatase visualisiert. Dazu wurde dem Reaktionspuffer ein Substrat zugegeben, das mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase ein Produkt liefert, das Licht emittiert (Chemilumineszenz). Dokumentiert wurden die Lichtsignale durch Exposition eines Röntgenfilms. Am Ort des Lichtsignals konnte damit direkt auf die Position der spezifischen Proteine geschlossen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen an oesophagealen Plattenepithelzellen

In vorausgehenden Studien beschäftigten wir uns mit den molekularen Mechanismen der Tumorgenese des oesophagealen Plattenepithelkarzinoms. Um die oesophageale Tumorgenese schrittweise nachzuvollziehen und um herauszufinden, ob die Telomeraseaktivierung alleinige Voraussetzung für die Immortalisierung ist, wurde in normale, oesophageale, humane Plattenepithelzellen („oesophageal epithelial cell“ EPC) die katalytische Untereinheit der Telomerase (hTERT) retroviral transduziert. Diese Arbeit ist teilveröffentlicht in einer Kooperationsarbeit mit der Universität Pennsylvania, Philadelphia (Harada *et al.*, 2003). Dazu sind im Folgenden die Ergebnisse kurz zusammengefasst.

Beim Vergleich der untransfizierten mit den hTERT exprimierenden Plattenepithelzellen wurde festgestellt, dass normale EPC-Zellen ca. 16 Passagen (1 Passage entspricht ungefähr 3-4 Populationsverdoppelungen) wachsen, um anschließend in replikative Seneszenz zu gehen. Normale EPC-Zellen haben unter Kulturbedingungen damit eine begrenzte Lebensdauer.

Bei den Telomerase exprimierenden Plattenepithelzellen (EPC-hTERT-Zellen) wurde im Rahmen dieser Arbeit hingegen Passage 94 erreicht (5-fach verlängert gegenüber den EPC-Zellen), ohne dass die Zellen zu irgendeinem Zeitpunkt mehr als 10% Seneszenz zeigten (s. Abb. 7). Seneszenz wurde durch den Nachweis aktiver saurer β -Galaktosidase mittels x-Gal-Anfärbung dargestellt (s. Abschnitt 3.2.1.6.). Die Lebensdauer der EPC-Zellen wurde durch die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT deutlich verlängert, so dass diese als immortalisiert bezeichnet werden können.

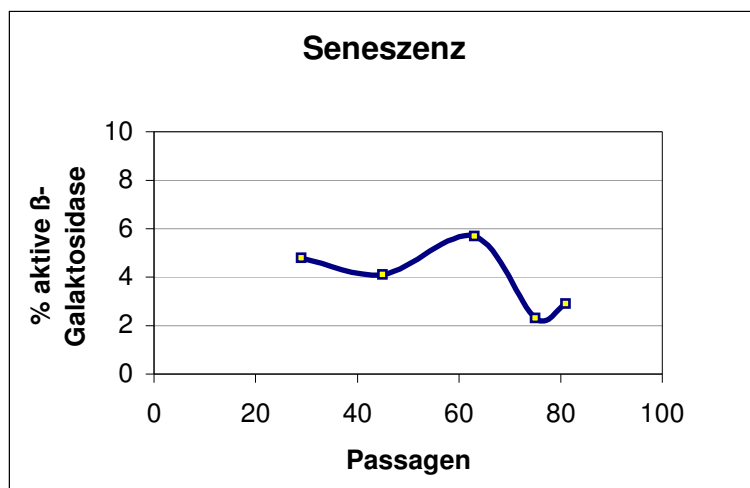


Abb.7:
Seneszenzbestimmung. EPC-hTERT-Zellen in Seneszenz zeigen aktive saure β -Galaktosidase. Der Nachweis der sauren β -Galaktosidase erfolgte über die Anfärbung mit x-Gal. Angefärbte Zellen wurden morphologisch unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Die Analyse der Telomerase Expression in den EPC-hTERT-Zellen auf mRNA-Ebene erfolgte mittels RT-PCR (Daten nicht gezeigt). Um nachzuweisen, dass hTERT in den Zellen aktiv ist, wurde die Telomerase-Aktivität in Extrakten der transduzierten Zellen mittels „Telomeric Repeat Amplification Protocol“ (TRAP) (siehe Abschnitt 3.2.2.7) bestimmt. Zu jeder Passage diente eine hitzeinaktivierte Probe als Negativ-Kontrolle. Insgesamt wurde der TRAP-Assay bei jeder 5.-8. Passage von Passage 25 bis Passage 93 durchgeführt. Die Ergebnisse des TRAP-Assays sind in einem repräsentativen Gel in Abbildung 8 dargestellt. Wie in Abbildung 8 zu erkennen, war in der kontinuierlich wachsende Zellpopulation von EPC-hTERT in den Passagen 26, 50 und 55 eine positive Telomeraseaktivität zu verzeichnen.

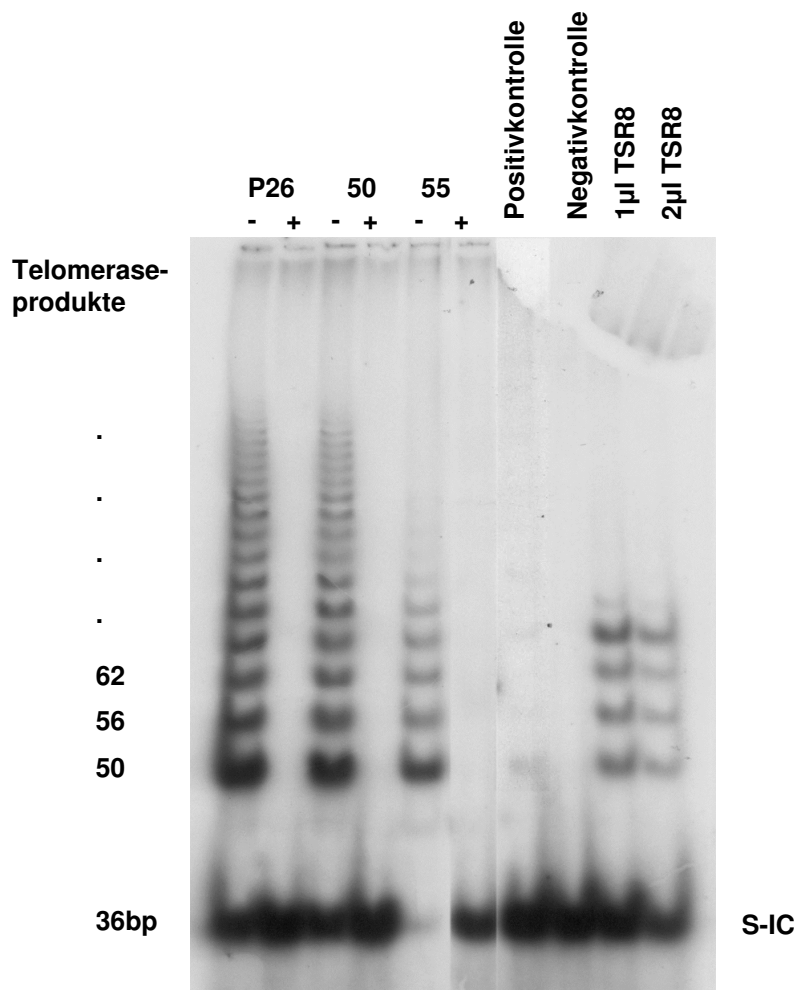


Abb. 8: TRAP-Assay. EPC-hTERT-Zellextrakte der oben angegebenen Passagen (P) wurden mit Telomer-spezifischen Oligonukleotiden inkubiert und dann mittels PCR amplifiziert. Die Proben wurden anschließend auf ein 10% nicht-denaturierendes PAGE aufgetragen. Die rechte Bahn (mit + gekennzeichnet) der jeweiligen Passage ist eine hitzeinaktivierte Negativkontrolle. Positivkontrolle ist ein Zellextrakt der Firma Intergen. Negativkontrolle (CHAPS-Lysepuffer), Kontrolltemplate (TSR8). *Links:* Größenangaben der Telomeraseprodukte in bp. Die 36bp Bande (S-IC) ist eine interne Kontrolle der Firma Intergen.

Im nächsten Schritt wurden die Telomerlängen der EPC-hTERT-Zellen bestimmt. Die Telomerlängen-Bestimmung der verschiedenen Proben wurde wie in Abschnitt 3.2.2.6. beschrieben durchgeführt. Insgesamt wurden die Telomerlängen wiederum bei jeder 5.-8. Passage von Passage 25 bis Passage 90 analysiert. Die Bestimmung der Telomerlängen ist in einem repräsentativen Southern Blot in Abb. 9 dargestellt. Die Untersuchung in den Passagen 26, 50, 55, 72, 76 und 80 zeigten extrem lange Telomere in Form einer scharfen Bande bei ca. 21kbp (s. Abb.9). Diese scharfe Bande stammt von der aktiven Telomerase, denn die Telomerase verlängert Telomere homogen (Bryan *et al.*, 1995).

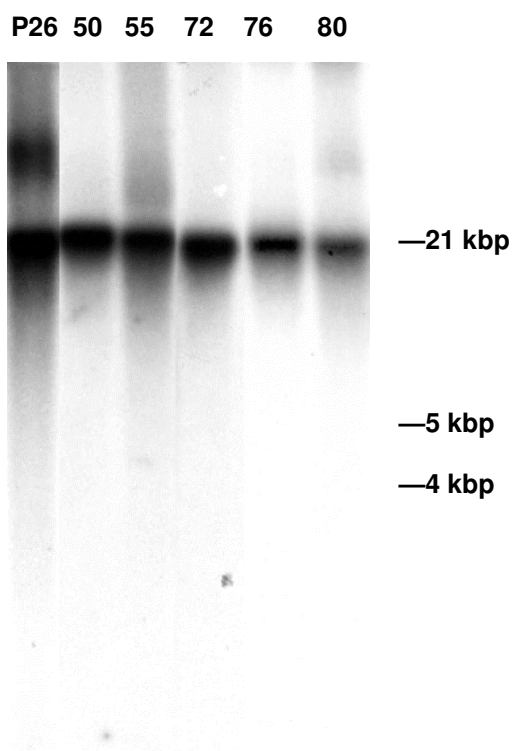


Abb. 9: Telomerlängenbestimmung: Southern Blot-Hybridisierung genomischer DNA der oben angegebenen Passagen (P) von EPC-hTERT. Die genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *HinI* und *RsaI* geschnitten und mit zu den Telomeren komplementärer DNA hybridisiert.

Um mögliche genetische Veränderungen im p53 Tumorsuppressorgen herauszufinden, die für die Verlängerung der Lebensspanne bzw. für die Immortalisierung von Bedeutung sind, wurde die Expression im Western-Blot ermittelt. Ähnlich zu den vorangegangenen Experimenten wurde jede 5.-8. Passage von Passage 25 bis 76 analysiert. In der folgenden Abbildung ist exemplarisch die Expression von p53 im Western-Blot in einer frühen, zwei mittleren und zwei späten Passagen dargestellt. Die p53 Expression war in allen untersuchten Passagen gleichbleibend, es zeigte sich keine Überexpression oder Inaktivierung von p53.

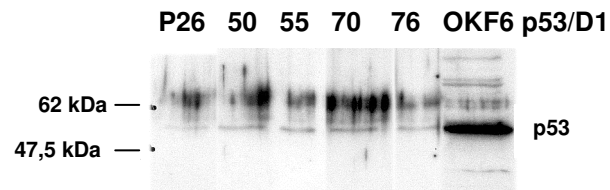


Abb. 10: Expression von p53: Western-Blot von Proteinextrakten der oben angegebenen Passagen (P) von EPC-hTERT-Zellen. Positivkontrollzellen sind orale Keratinocyten retroviral transduziert mit p53 und CyclinD1 (OKF6 p53/D1).

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass die ektope Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase in oesophagealen Plattenepithelzellen die Lebensdauer der EPC-hTERT Zellen deutlich verlängert und zu deren Immortalisation führt. Die Telomerase ist anhand der TRAP-Assay-Analyse aktiv und verlängert Telomere in allen untersuchten Passagen lang und homogen. Das Tumorsupressorgen p53 zeigte im Verlauf der kontinuierlich wachsenden Zellpopulation in hTERT-exprimierenden EPC-Zellen einen gleich bleibenden Expressionslevel.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression der Telomerase normale humane oesophageale Plattenepithelzellen immortalisiert ohne Aufhebung des p53 Signalweges und ohne Inaktivierung des p16 INK4a/pRb Weges (Harada *et al.*, 2003).

4.2 Untersuchungen an Nebennierenrindenzellen

4.2.1 Herstellen genetisch veränderter Nebennierenrindenzellen

Als Grundlage für die schrittweise Analyse der Telomerase in der Tumorgenese in Nebennierenrindenzellen und um herauszufinden, ob die Expression der Telomerase zur Verlängerung der Lebensdauer und eventuell zur Immortalisierung der Nebennierenrindenzellen führt, wurde in normale, humane Nebennierenrindenzellen die katalytische Untereinheit der Telomerase (hTERT) retroviral transduziert. Dieses Modell genetisch alterierter Nebennierenrindenzellen sollte dazu dienen, die Rolle der humanen Telomerase im Prozess der malignen Transformation des Nebennierenrindenkarzinoms zu untersuchen.

Dazu wurden normale humane Nebennierenrindenzellen aus chirurgischem Material gewonnen und durch ihre morphologischen Eigenschaften als normale primäre Nebennierenrindenzelle identifiziert. Anschließend wurde hTERT retroviral in die Nebennierenrindenzellen transduziert. Die Transduktion wurde in Kooperation mit Professor Peter J. Hornsby in Texas durchgeführt. Die im Weiteren untersuchten Zellen befanden sich in der 3. Passage.

4.2.2 Charakterisierung der Nebennierenrindenzellen

Zur Charakterisierung der hTERT-NNR-Zellen wurden für die Steroidbiosynthese wichtige Enzyme mittels Real-Time PCR ermittelt.

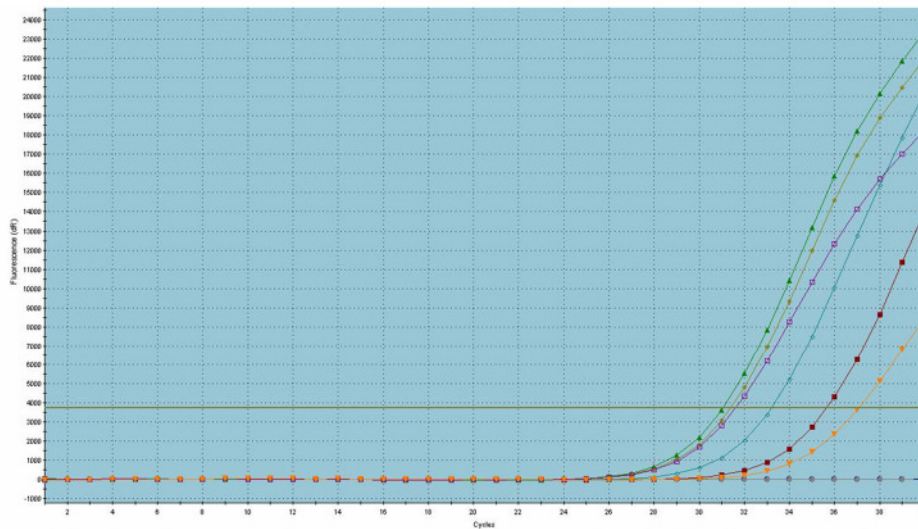
Zu Beginn wurde P450 SCC (side chain cleavage enzyme), welches in der Steroidbiosynthese aus Cholesterol Pregnenolon bildet, in ausgesuchten Passagen kontinuierlich wachsender NNR-hTERT-Zellen nachgewiesen. Hier war ein rein qualitativer Nachweis ohne direkte Quantitätsbestimmung geplant, so dass keine Standardkurve angefertigt wurde. Als Positivkontrolle diente die cDNA-Probe eines aldosteronproduzierenden Nebennierenrindenadenoms (Conn-Adenom). Die PCR mit der SCC -Primer-Kombination (s. Tab. 1) zeigte bei den NNR-hTERT-Zellen spezifische Amplifikations- (s. Abb. 11A) sowie Schmelzkurven (s. Abb. 11B). Die Ct-Werte, die im Wachstumsverlauf der hTERT-NNR Zellen ermittelt wurden, lagen sogar um 2,0 bis 4,0 unterhalb der Positivkontrolle, so dass bei annähernd gleichem cDNA-Einsatz sogar eine

stärkere mRNA Expression als im aldosteronproduzierenden Adenom angenommen werden kann. Die SCC-mRNA konnte damit in den Passagen 12, 20, 22, 25 und 29 zweifelsfrei amplifiziert werden.

Well	Ct (dR)	Farbe d. Kurve
A1/ Negativkontrolle	No Ct	blau
B1/Positivkontrolle	35,69	braun
C1/Passage 12	31,08	grün
D1/Passage 17	No Ct	grau
E1/Passage 20	31,44	oliv
F1/Passage 22	33,22	hellblau
G1/Passage 25	31,65	violett
H1/Passage 29	37,1	orange

Tab. 4: Real-Time PCR für SCC

A



B

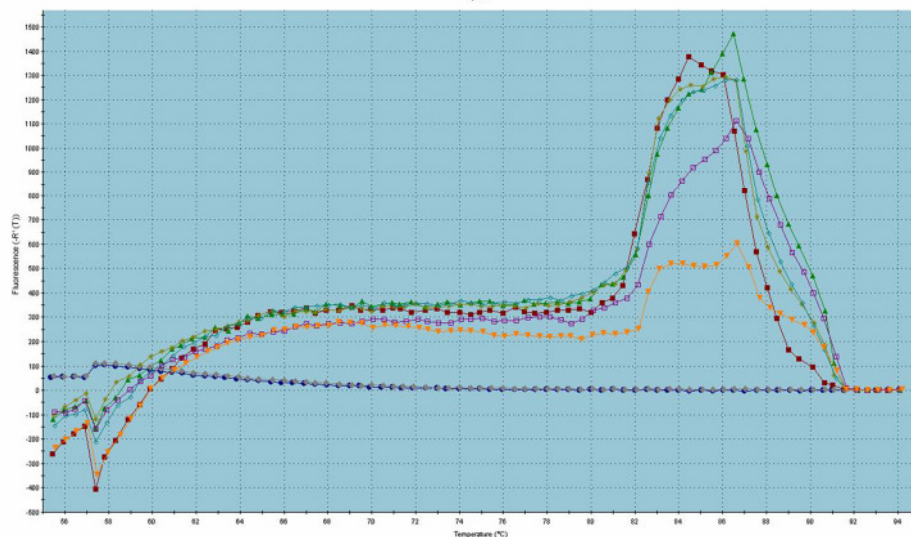


Abb. 11: Darstellung der Real-Time PCR für SCC. A: SCC-Amplifikationskurven: auf der X-Achse ist der Zyklus und auf der Y-Achse die Stärke der Fluoreszenz angegeben.

B: SCC-Schmelzkurven: auf der X-Achse ist die Temperatur und auf der Y-Achse die Stärke der Fluoreszenz angegeben. Positivkontrolle braune Linie, Negativkontrolle blaue Linie, weitere Linien siehe Tabelle.

Ein weiterer Nachweis der NNR-Zellen-Differenzierung ergab sich durch die Real-Time PCR mit StAR (steroidogenic acute regulating protein), ein weiteres Enzym der Steroidbiosynthese.

Die Ct-Werte der PCR sind in Tabelle 5 angegeben. Die PCR zeigte ebenfalls spezifische Amplifikations- und Schmelzkurven in den Passagen 12, 20, 22, 25 und 29, so dass auch die Expression des StAR-Gens zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 12). Auch hier lagen die Ct-Werte teilweise unter der der Positiv-Kontrolle, so dass auch hier von einer eher kräftigen mRNA-Expression ausgegangen werden kann.

In der Passage 17 der NNR-hTERT-Zellen war bei der Amplifikations- als auch bei der Schmelzkurve in der SCC- und StAR-PCR keine Emission messbar. Als Ursache ist zu vermuten, dass die verwendete cDNA-Probe nicht intakt war.

Well	Ct (dR)	Farbe d. Kurve
A1/ Negativkontrolle	No Ct	blau
B1/ Positivkontrolle	28,6	braun
C1/ Passage 12	25,5	grün
D1/ Passage 17	No Ct	grau
E1/ Passage 20	26,67	oliv
F1/ Passage 22	27,9	hellblau
G1/ Passage 25	27,29	violett
H1/ Passage 29	30,89	orange

Tab. 5: Real-Time PCR für StAR

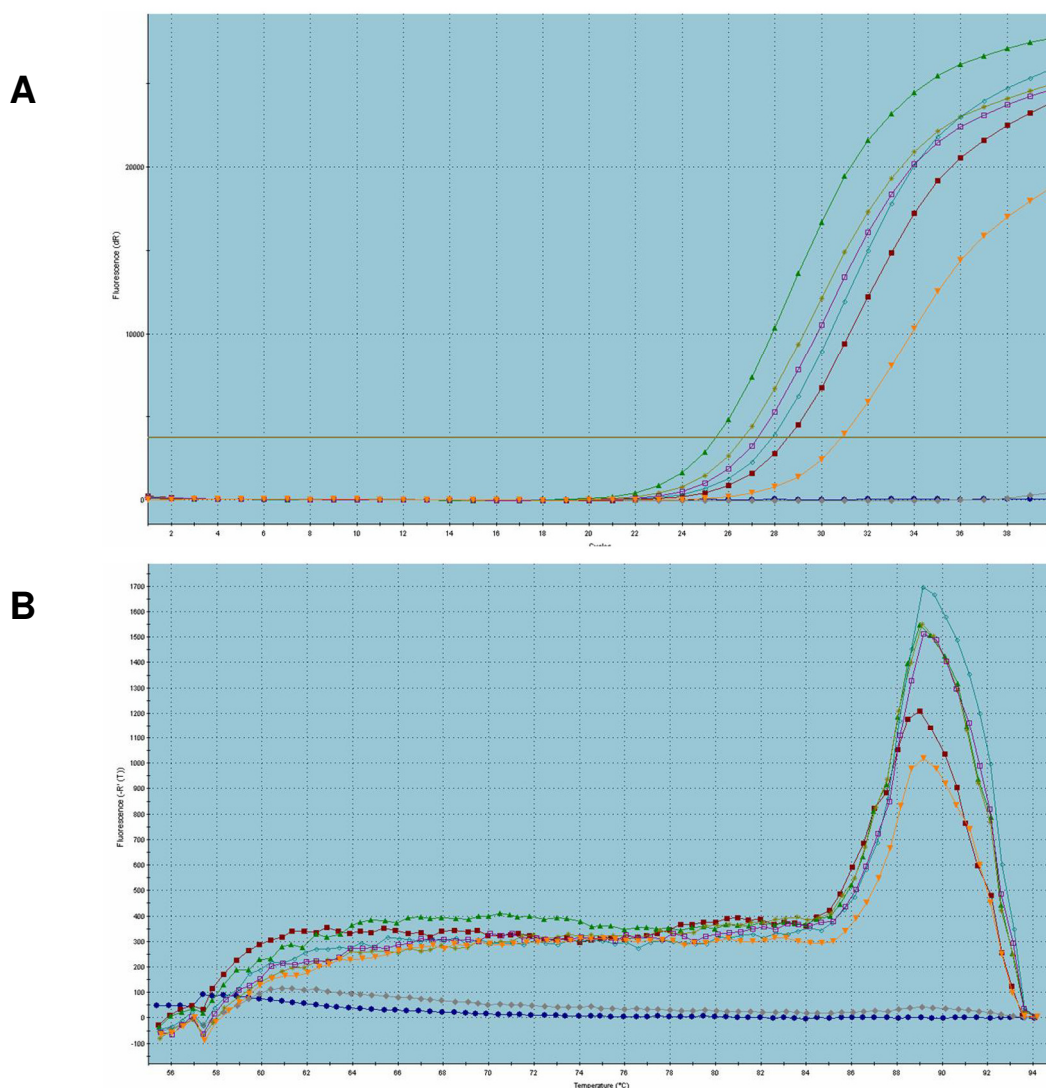


Abb. 12: Darstellung der Real-Time PCR für StAR. A: StAR-Amplifikationskurve: auf der X-Achse ist der Zyklus und auf der Y-Achse die Fluoreszenz angegeben.
B: StAR-Schmelzkurven: auf der X-Achse ist die Temperatur und auf der Y-Achse die Fluoreszenz angegeben.

Durch den Nachweis der Gene für SCC und StAR war es offensichtlich gelungen, die NNR-hTERT-Zellen ihrem Ursprung nach als differenzierte, steroidhormonproduzierende Nebennierenrindenzelle zu erhalten.

4.2.3 Wachstumseigenschaften der Nebennierenrindenzellen

Im Verlauf der Kultivierung der kontinuierlich wachsenden Zellpopulationen der NNR-hTERT-Zellen konnte ein exponentielles Wachstum beobachtet werden (s. Abb. 13). Die Wachstumskurven sind hier in Populationsverdopplung angegeben. Die mittlere Populationsverdopplung (PD) der NNR-hTERT-Zellen lag bei ca. 3 Verdopplungen pro Passage. Die NNR-hTERT-Zellen zeigten allerdings ab Populationsverdopplung 84 ein deutlich langsames Wachstum.

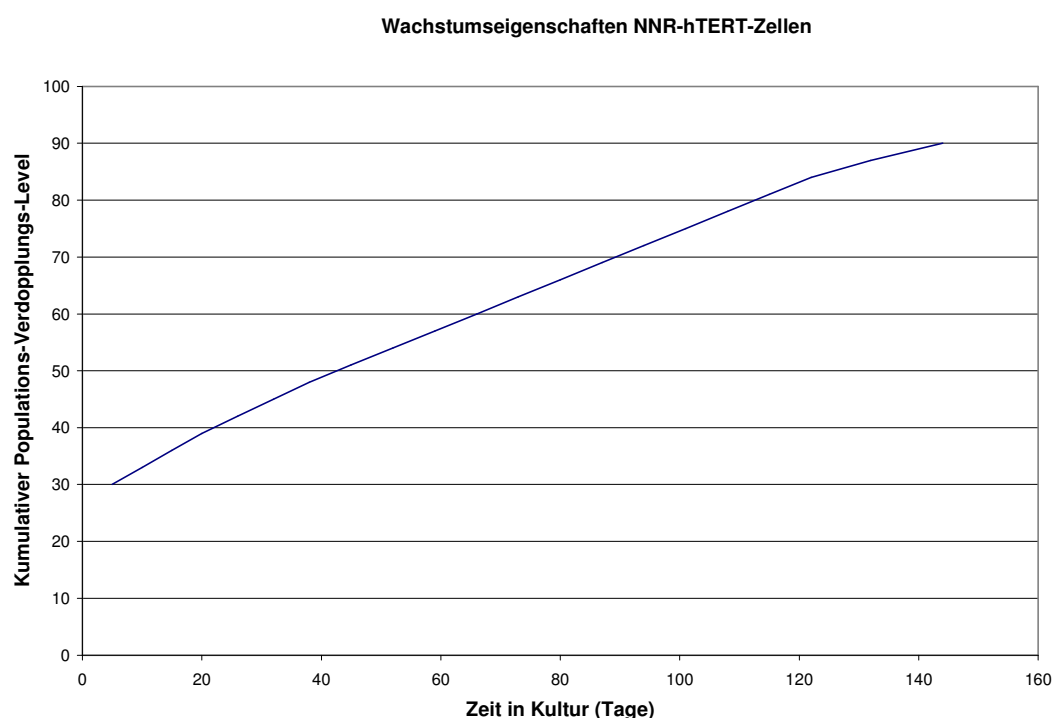


Abb. 13: Wachstumseigenschaften der NNR-hTERT-Zellen in einer kontinuierlich wachsenden Zellpopulation. Angaben in CPDL (s.Abschnitt 3.2.1.5).

4.2.4 Replikative Lebenszeit

Beim Vergleich der replikativen Lebenszeit der untransfizierten mit den hTERT exprimierenden Zellen wurde festgestellt, dass fetale primäre NNR-Zellen 10-14 Passagen (entspricht 30-40 Populationsverdopplungen [PD]) und adulte NNR-Zellen 0-10 Passagen (entspricht 0-30 PD) wachsen. Anschließend gehen die Zellen in Seneszenz. Aus diesen Ergebnissen aus der Literatur ist zu folgern, dass normale humane Nebennierenrindenzellen eine begrenzte Lebensdauer in Kultur aufweisen (Hornsby *et. al.*, 1992, Suwa, *et. al.*, 2001).

Im Vergleich hierzu wurde die replikative Lebensdauer der in dieser Arbeit untersuchten NNR-Zellen durch die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT mit Erreichen einer Passage 31 (PD von 93) verdreifacht.

Bei den untersuchten NNR-hTERT-Zellen war jedoch, wie oben beschrieben, ab Passage 28 (PD von 84) ein deutlich langsames Wachstum zu beobachten. In der zellmorphologischen Betrachtung zeigten die NNR-hTERT-Zellen in frühen Passagen einen lang gezogenen, granulierten Zellkörper mit einem, im Vergleich zum Cytoplasma, relativ kleinen Zellkern (s. Abb. 14A). Die Zellen wurden im Verlauf der Passagen flacher und zeigten immer mehr zytoplasmatische Fortsätze als morphologisches Zeichen der Seneszenz (s. Abb. 14B). Die Zellen überlebten noch ca. 2-4 Wochen und gingen schließlich zugrunde.

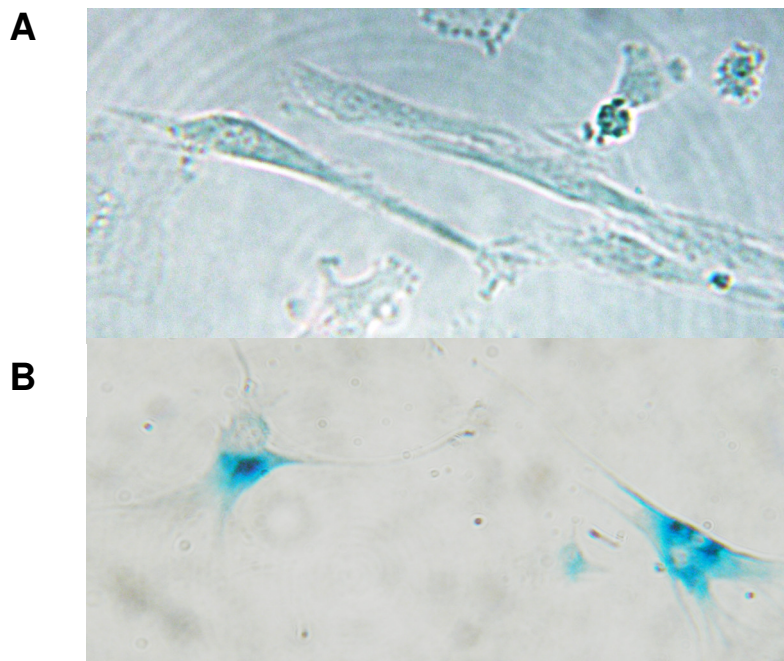


Abb. 14: Darstellung der NNR-hTERT-Zellen in Kultur (10-fache Vergrößerung). A.: NNR-hTERT-Zellen in früher Passage. **B.:** NNR-hTERT-Zellen in Seneszenz mit angefärbter saure β -Galaktosidase.

4.2.5 Seneszenz

Um replikative Seneszenz nachzuweisen und um feststellen zu können, in welcher Passage die NNR-hTERT-Zellen in das Stadium der Seneszenz eintreten, wurde der prozentuale Anteil der für aktive saure β -Galaktosidase positiven Zellen in der kontinuierlich wachsenden Population bestimmt (s. Abschnitt: 3.2.1.6.). Die Analyse wurde in vier verschiedenen Zellpopulationen über 20 Passagen hinweg beobachtet. Die Ergebnisse einer repräsentativen Passage sind in Abbildung 15 dargestellt.

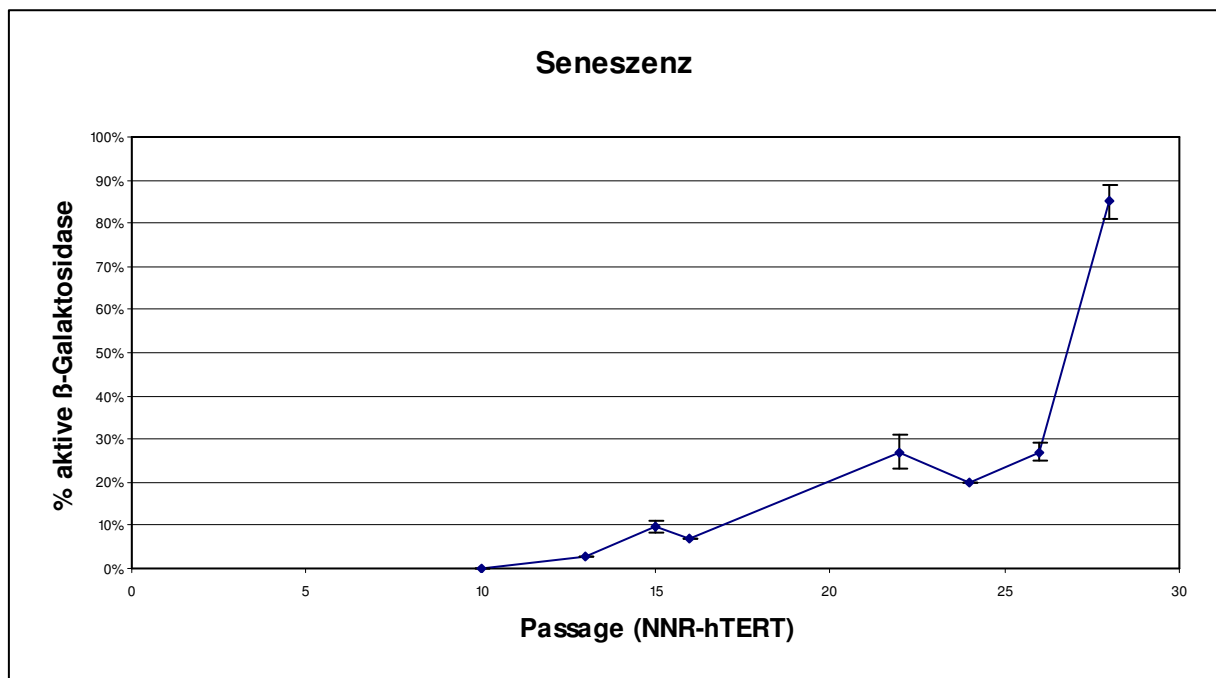


Abb. 15: Seneszenzbestimmung. NNR-hTERT-Zellen in Seneszenz zeigen aktive saure β -Galaktosidase. Der Nachweis der sauren β -Galaktosidase erfolgte über die Anfärbung mit x-Gal. Angefärbte Zellen wurden morphologisch unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Die NNR-hTERT-Zellen zeigten bis zum Erreichen der Passage 26 nie mehr als 30% β -Galaktosidase- Aktivität. Ab Passage 26 stieg der prozentuale Anteil saure β -Galaktosidase positiver Zellen hingegen exponentiell bis auf 85% an. Aufgrund dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass die NNR-hTERT-Zellen zu diesem Zeitpunkt gehäuft in das Stadium der Seneszenz übertreten.

4.2.6 Bestimmung der Zellproliferation

Um festzustellen, ob der prozentuale Anstieg der sauren β -Galaktosidase mit einer Verminderung der Zellproliferation einhergeht, wurde ein ELISA mit BrdU, wie unter Punkt 3.2.1.7. beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden die NNR-hTERT-Zellen des gleichen Zellklons, die zu verschiedenen Zeitpunkten eingefroren worden waren, wieder aufgetaut und über 18 PD (6 Passagen) kultiviert.

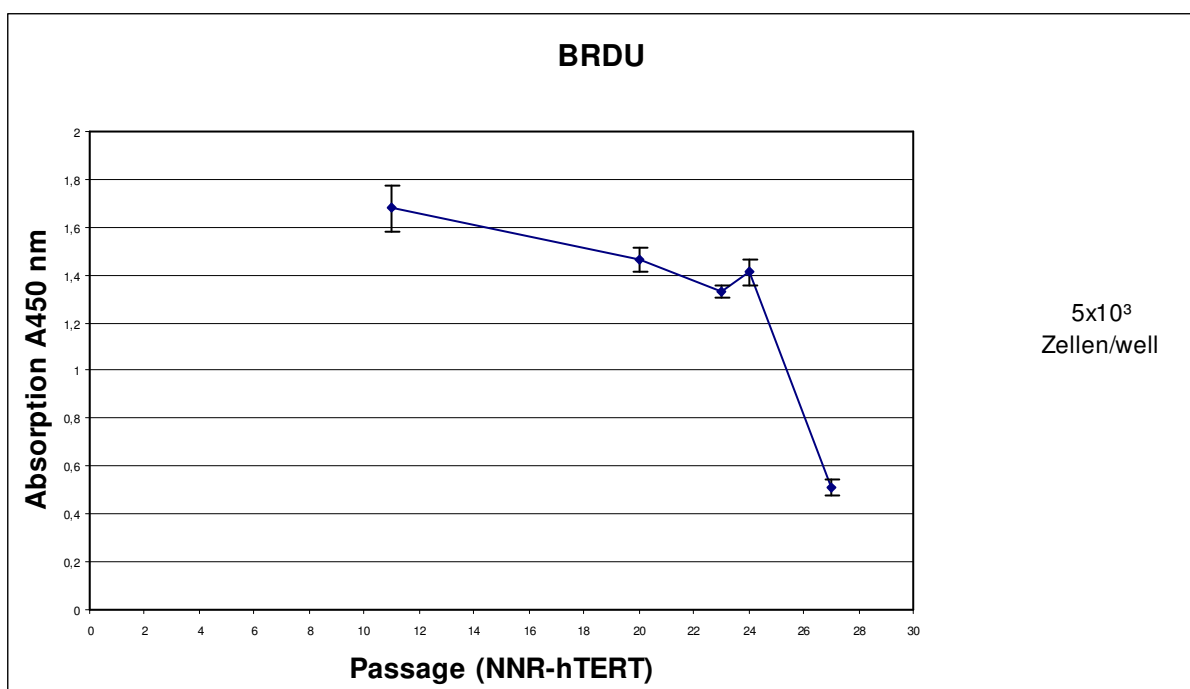


Abb.16: Bestimmung der Zellproliferation: BrdU wird anstelle von Thymin in proliferierende Zellen verschiedener Passagen eingebaut und die Absorption im ELISA-Reader gemessen.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen, zeigten die NNR-hTERT-Zellen eine langsame kontinuierliche Abnahme der Zellproliferation bis zum Erreichen der Passage 24. Mit Erreichen der Passage 27 war ein deutliches Absinken des BrdU-Einbaus und damit der Proliferation zu erkennen, passend zum Anstieg der sauren β -Galaktosidase positiven Zellen (s. Abb.15). Somit konnten wir zeigen, dass der Anstieg der seneszenten Zellen mit einem Abfall der Proliferationsrate einhergeht.

4.2.7 hTERT mRNA-Expression

Wie oben dargestellt hat die ektope Expression von hTERT in Nebennierenrindenzellen eine dreifache Verlängerung der replikativen Lebenszeit zur Folge, wobei die Zellen jedoch in das Stadium der Seneszenz übergegangen, nachgewiesen durch den Anstieg der aktiven β -Galaktosidase, sowie durch die Abnahme der Teilungsfähigkeit.

Um zu klären, warum die NNR-hTERT-Zellen in das Stadium der Seneszenz eintreten, untersuchten wir zunächst die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) in diesen Passagen. Die hTERT-Expression auf mRNA-Ebene ließ sich mit der Reversen Transkription von RNA, gefolgt von einer PCR (RT-PCR, wie unter Abschnitt 3.2.2.4. dargestellt) detektieren.

Ausgehend von dieser RT-PCR ließ sich eine kontinuierlich und unveränderte Expression von hTERT über die Passagen 12 bis 29 nachweisen (s. Abb.17).

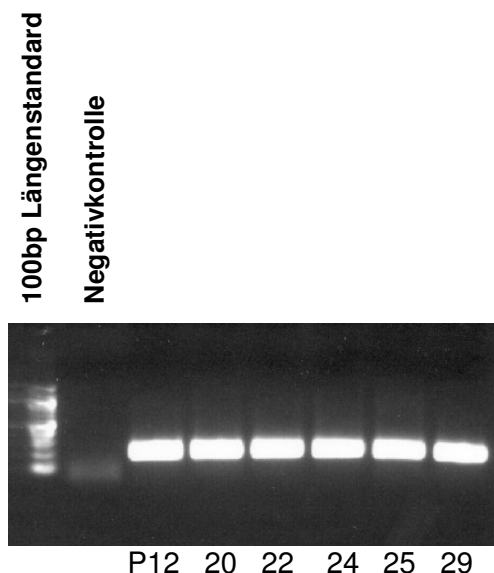


Abb. 17: Reverse Transkriptase-PCR für die hTERT-Expression auf mRNA-Ebene in einem 1% Agarosegel. Die spezifische Bande für hTERT ist in allen oben angegebenen Passagen (P) für die NNR-hTERT-Zellen nachweisbar.

4.2.8 Telomeraseaktivität

Nachdem auf mRNA-Ebene die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage nach der Aktivität der Telomerase. Diese wurde mittels TRAP-Assay (s. Abschnitt. 3.2.2.7.) in Extrakten der NNR-hTERT-Zellen analysiert.

Aufgrund der geringen Proteinmenge, die im TRAP-Assay eingesetzt wird, konnten auch Zellen der Passage 31, die sich bereits im Stadium der Seneszenz befanden, untersucht werden. Der Nachweis der Telomeraseprodukte in allen untersuchten Passagen ließ auf eine erhaltene Aktivität der Telomerase schließen. Alle untersuchten Passagen zeigen deutliche Telomeraseaktivität, einschließlich der seneszenten NNR-hTERT-Zellen der Passage 31 (s. Abb. 18).

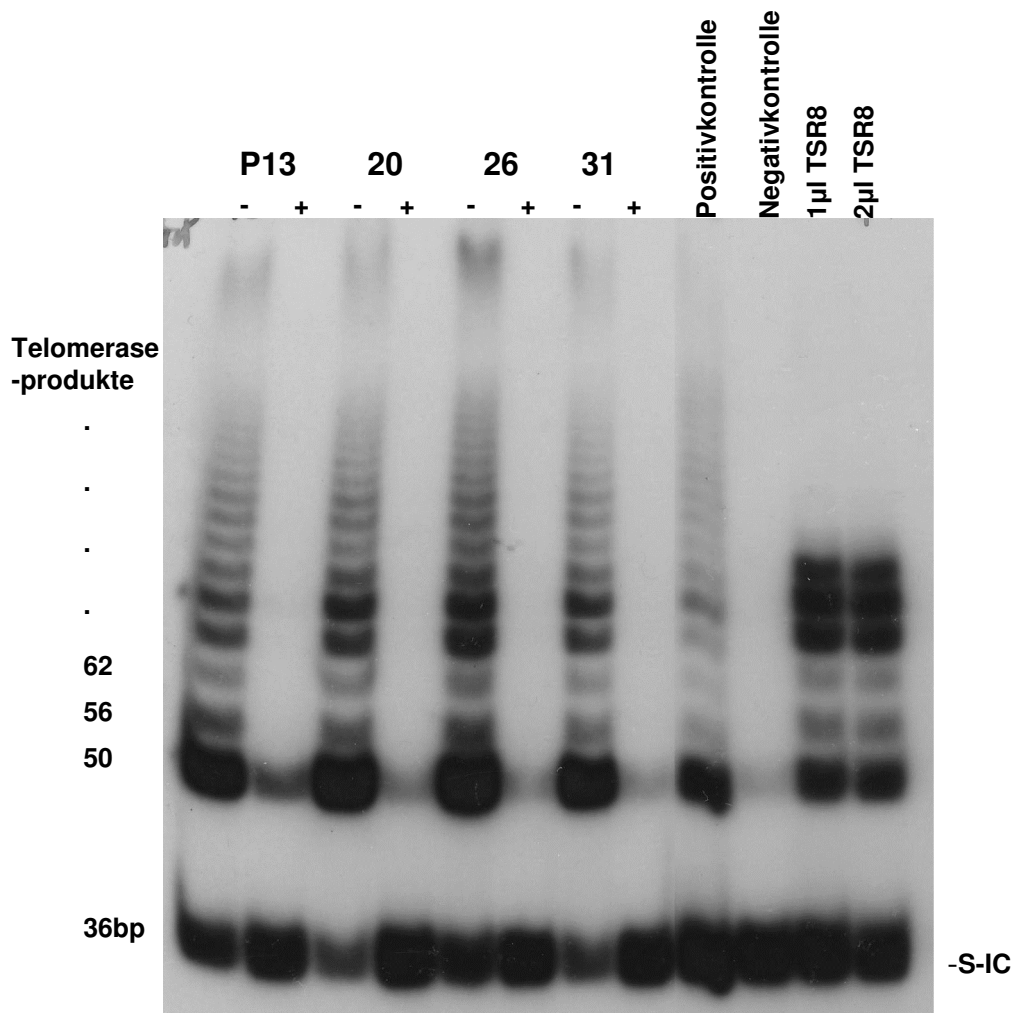


Abb. 18: TRAP-Assay: Zellextrakte der oben angegebenen Passagen (P) wurden mit Telomer-spezifischen Oligonukleotiden inkubiert und dann mittels PCR amplifiziert. Die Proben wurden anschließend auf ein 10% nicht-denaturierendes PAGE aufgetragen. Die rechte Bahn (mit + gekennzeichnet) der jeweiligen Passage ist eine hitzeinaktivierte Negativkontrolle. Positivkontrolle ist ein Zellextrakt der Firma CHEMICON. Negativkontrolle (CHAPS-Lysepuffer), Kontrolltemplate (TSR8). Links: Größenangaben der Telomeraseprodukte in bp. Die 36bp Bande (S-IC) ist eine interne Kontrolle der Firma CHEMICON.

4.2.9 Telomerlängenbestimmung

Nachdem wir zeigen konnten, dass im Verlauf der Passagen die hTERT-Expression auf mRNA-Ebene vorhanden war und die Telomerase als Holoenzym aktiv war, untersuchten wir in der Folge, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT, der Telomeraseaktivität und den Telomerlängen bestand. Darüber hinaus untersuchten wir, ob sich die Telomerlängen im Verlauf der Zellpopulation in Abhängigkeit zum Eintritt in die Seneszenz veränderten.

Dazu wurde aus ausgesuchten Passagen der kontinuierlich wachsenden Zellpopulation genomische DNA isoliert und eine Southern-Blot-Hybridisierung mittels spezifischer Telomer-DNA-Sonde durchgeführt. Ein repräsentativer Southern-Blot ist in Abb.19 dargestellt.

Die Bandenbreite gibt die Verteilung der Telomerlängen innerhalb des Genoms der einzelnen Zellen an. Als Positivkontrolle diente die Nebennierendendrokarzinom-Zelllinie NCI H295A, mit einer mittleren Telomerlänge um 23kbp was in guter Übereinstimmung mit publizierten Befunden steht (Vergleiche hierzu Else *et al.*, 2008). Passage 11 der NNR-hTERT-Zellen zeigte ebenfalls lange Telomerlängen mit einer mittleren Telomerlänge von 21kbp. Die untersuchten Passagen 16, 18, 22, 24, 29 zeigten eine homogene Bandenbreite der Telomerlängen von 10 - 21kbp mit einer mittleren Telomerlänge von 20kbp. Die Telomerlängen der Passage 21 ergaben etwas kürzere Telomerlängen von 8 – 20kbp. Schließlich zeigte die Bandenbreite bei allen untersuchten Passagen ein homogenes Muster, was auf die Verlängerung der Telomere durch die aktive Telomerase hindeutete (Bryan *et al.*, 1995). Die insgesamt sehr große Telomerlänge zusammen mit der fehlenden Verkürzung über die Passagen hinweg bestätigte die fortbestehende Telomerase-Aktivität in NNR-hTERT-Zellen. Da im Verlauf der kontinuierlich wachsenden Zellpopulation keine Telomerverkürzung stattfindet, obwohl die NNR-hTERT-Zellen in Seneszenz gehen, lag die Vermutung nahe, dass es sich nicht um replikative Seneszenz sondern um prämatüre Seneszenz handelte.

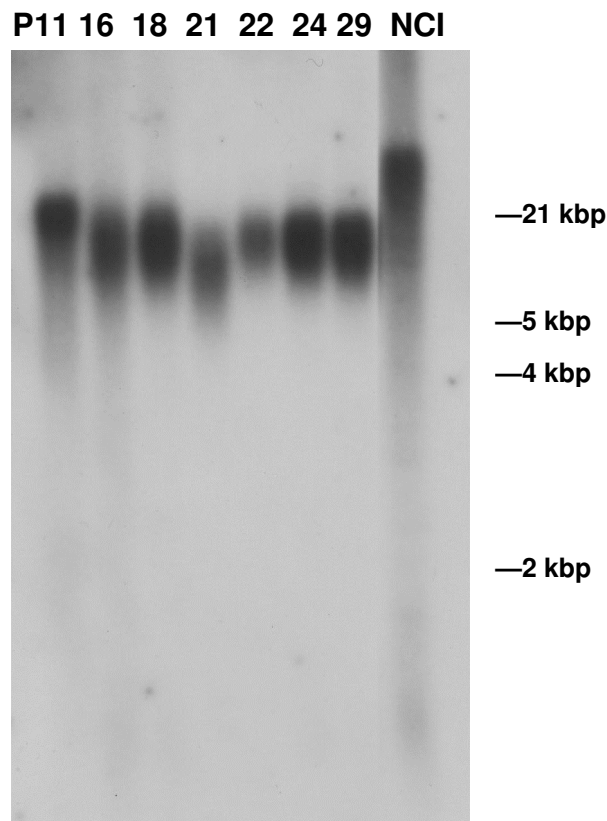


Abb. 19: Telomerlängenbestimmung: Southern Blot-Hybridisierung genomischer DNA der oben angegebenen Passagen (P) von NNR-hTERT und NCI H295A Zellen als Kontrolle. Die genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *HinfI* und *RsaI* geschnitten.

4.2.10 Untersuchungen von Zellzyklus-Proteinen

Mit den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Expression von hTERT in NNR-Zellen zur Lebenszeitverlängerung, jedoch nicht zu deren Immortalisierung führt. Vielmehr gehen die Zellen in das Stadium der Seneszenz über, obwohl sich die Telomere nicht verkürzen. Um herauszufinden, welche Faktoren für das Auslösen der Seneszenz verantwortlich sein könnten und um mögliche genetische Veränderungen im p53- und im pRB-Signaltransduktionsweg zu ermitteln, wurde die Expression ausgesuchter Zellzyklus-kontrollierender Proteine bestimmt (s. Abschnitt 3.2.2.8.).

Dazu wurde aus den NNR-hTERT-Zellen einer kontinuierlich wachsenden Zellpopulation Protein isoliert, über SDS-Page aufgetrennt, geblottet und mit polyklonalen Antikörpern

gegen ausgesuchte Zellzyklus kontrollierende Proteine gefärbt. Insgesamt wurde in den Passagen 14, 21, 23, 26 und 27 (29) der p16/pRB und der p14/p53-Signaltransduktionsweg analysiert. Die Ergebnisse sind in repräsentativen Western-Blots in Abb. 20 und 21 dargestellt. Die Beurteilung der Proteinexpression „negativ“ (-), „schwach-positiv“ (+), „positiv“ + und „stark-positiv“ (++) basiert auf dem Vergleich der Expressionsstärke der Proben untereinander, indem die Intensität der Banden selbst und gegenüber der β -Actin-Bande berücksichtigt wurden.

Die Expression von p16 war in den Passagen 14 und 21 schwach (+), in den Passagen 23, 26 und 27 positiv +. Insgesamt ließ sich eine leichte Expressionserhöhung mit Zunahme der Passagen erkennen.

Cyclin D1, das mit CDK 4/6 interagiert und durch p16 spezifisch gehemmt wird, war unter Berücksichtigung der β -Aktin-Expression in den untersuchten Passagen (+) gleichmäßig schwach vorhanden.

p53-Tumorsuppressorgen war in allen Passagen überexprimiert. Außerdem war eine deutliche Expressionszunahme im Verlauf der Passagen zu erkennen. Als Positivkontrolle diente ein Proteingemisch aus NCI H295A und andere Nebennierenrindentumorzellen. p21 zeigt in allen untersuchten Passagen eine gleich bleibende Expression, lediglich in Passage 27 war eine stärkere Expression festzustellen.

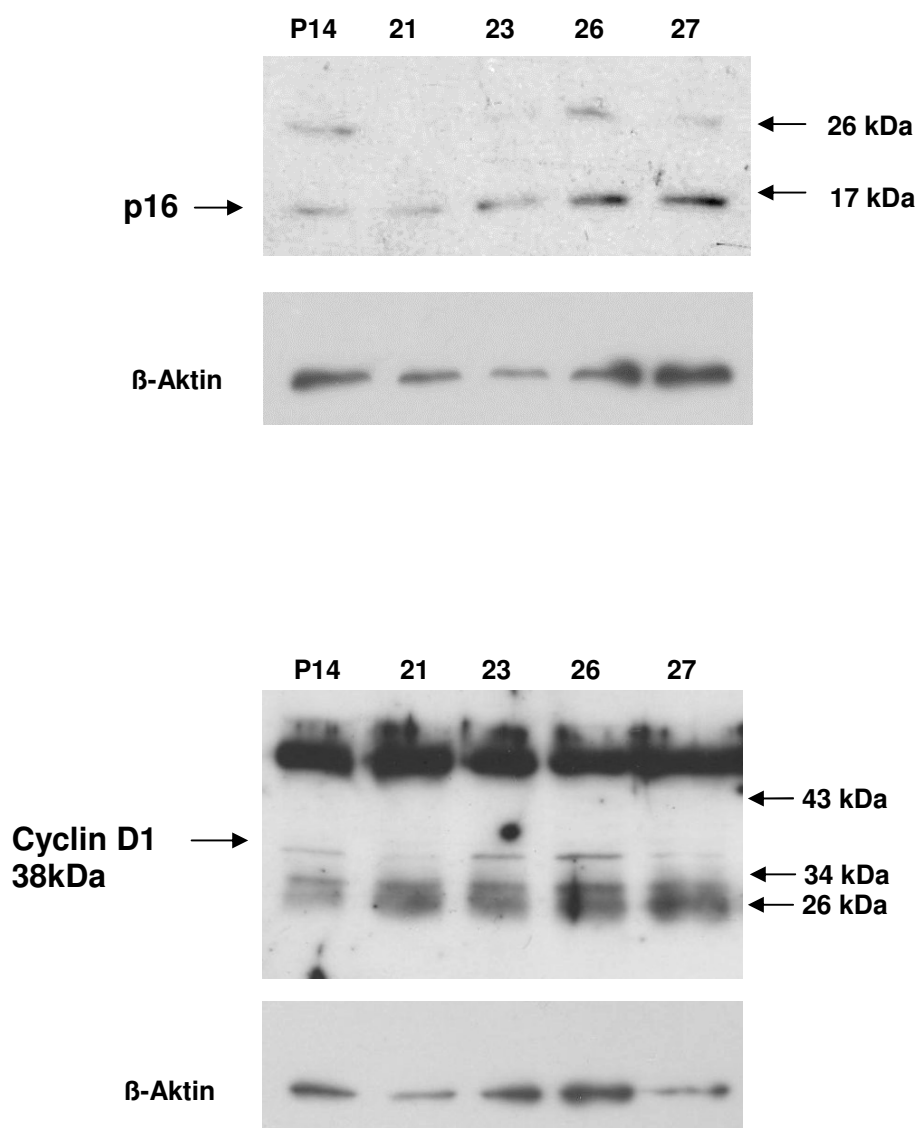


Abb. 20: Expression von p16 und Cyclin D1: Western-Blot von Proteinextrakten der oben angegebenen Passagen (P) von NNR-hTERT-Zellen.

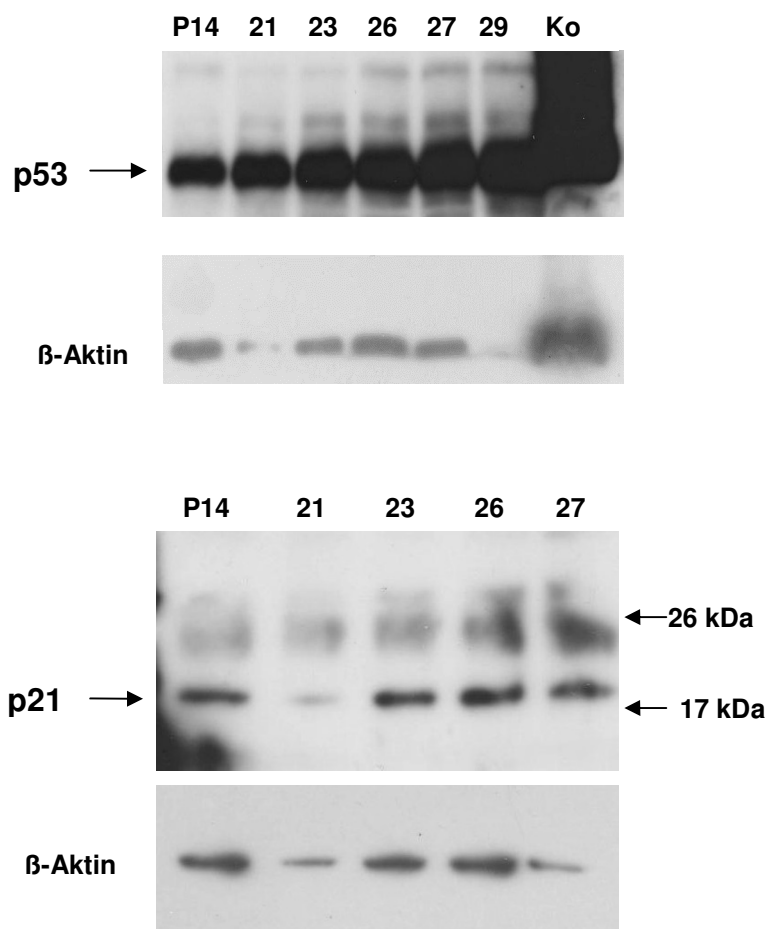


Abb. 21: Expression von p53 und p21: Western-Blot von Proteinextrakten der oben angegebenen Passagen (P) von NNR-hTERT-Zellen und Positivkontrolle bei p53.

5 Diskussion

Tumorgenese, die maligne Transformation normaler Zellen zu einem autonom wachsenden Tumor beinhaltet eine über Jahrzehnte hinweg entstehende komplexe Abfolge biochemischer und molekulargenetischer Ereignisse. Während dieses mehrstufigen Prozesses, der malignen Transformation, erwerben Zellen Mutationen in Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Zellwachstum- und Zellproliferation-kontrollierenden Genen (Hunter, T., 1997). Dabei ist die zur Tumormanifestation notwendige Zahl der Defekte nicht nur von der genetischen Alteration sondern auch vom Zelltyp (z.B. epithelial versus mesenchymal) abhängig. Obgleich viele Aspekte in der Entwicklung von normalen Zellen zu immortalisierten Tumorzellen noch ungeklärt sind, lassen sich doch generelle molekularbiologische Mechanismen der Tumorgenese erkennen. Ein Kontrollmechanismus, der die Lebensdauer von Zellen mitbestimmt und dem sich die Tumorzellen entziehen können, ist die bei jeder Zellteilung abnehmenden Telomerlänge. Nur wenigen humanen Zellarten gelingt es, die replikative Seneszenz bzw. das Mortalitätsstadium 1 zu umgehen und in das Stadium der Immortalität einzutreten (Counter *et al.*, 1992). Voraussetzung für die Immortalisierung ist der Erhalt der Telomere durch die Aktivierung der Telomerase oder durch einen alternativen Mechanismus. Die Aktivierung der Telomerase mit der Verlängerung der Telomere spielt eine herausragende Rolle in der Tumorgenese also in der malignen Transformation normaler Zellen zu einem autonom wachsenden Tumor. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, die Rolle der Telomerase in der Immortalisierung und malignen Transformation von Nebennierenrindenzellen zu beleuchten und mit oesophagealen Plattenepithelzellen zu vergleichen.

5.1 Ektope Expression der Telomerase führt in oesophagealen Plattenepithelzellen zur Immortalisierung

Im Rahmen vorausgehender Arbeiten konnte festgestellt werden, dass die alleinige ektope Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase in primären oesophagealen Plattenepithelzellen (EPC) zur Verlängerung der Lebensdauer und zur Immortalisation führt. Diese Arbeit ist teilveröffentlicht in einer Kooperationsarbeit mit der Universität Pennsylvania, Philadelphia (Harada *et al.*, 2003). Hinweise, dass die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) normale menschliche Körperzellen immortalisieren kann, ergaben sich aus hTERT-Expressionsstudien an Fibroblasten, Mesothelzellen und

retinalen Pigmentepithelzellen (Bodnar *et al.*, 1998), Endothelzellen (Yang, J. *et al.*, 1999) und Mamma-Epithelzellen (Herbert *et al.*, 2002). Allerdings ist umstritten, ob die Aktivität der Telomerase alleine ausreicht, um eine Immortalisierung humaner Keratinozyten zu induzieren. Einige Untersuchungen hatten ergeben, dass neben der Expression von Telomerase die Inaktivierung des p16^{INK4a}/ pRb Signalweges für die Immortalisierung humaner Keratinozyten erforderlich ist (Kiyono *et al.*, 1998; Dickson *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass humane Keratinozyten in Kulturbedingungen mit einem speziellen Fibroblasten-Feeder-Layer-System keine Inaktivierung des p16^{INK4a}/ pRb Signalweg zur Immortalisierung benötigen (Ramirez *et al.*, 2001).

In der beschriebenen Kooperationsarbeit konnte gezeigt werden, dass EPC-Zellen nur eine begrenzte Lebensdauer haben, während die retrovirale Einführung von hTERT EPC-Zellen bei intaktem p16^{INK4a} immortalisiert, unter Standard-Keratinozytenwachstumsfaktor Bedingungen und auch ohne Benutzung eines Fibroblasten-Feeder-Layer-Systems. Ferner war die Telomeraseaktivität in einer frühen, einer mittleren und einer späten Passage gleichbleibend aktiv. Darüber hinaus waren die Telomerlängen in allen untersuchten Passagen lang und homogen (Harada *et al.*, 2003).

Obwohl die Inaktivierung des Tumorsupressorgens p53 bei der Immortalisierung der humanen Keratinocyten nicht notwendig war (Kiyono *et al.*, 1998; Dickson *et al.*, 2000), gibt es trotzdem Hinweise, dass in Zellen von Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom der Verlust des Wildtyp-p53-Allels zu einer spontanen Immortalisierung führen kann (Shay *et al.*, 1995). Darüber hinaus verlängerte die Expression von dominant negativem p53 die Lebensspanne von humanen Keratinozyten (Opitz *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Daten ergab sich die Frage, ob die Aufhebung des p53 Signalweges in hTERT exprimierenden EPC-Zellen bei der Immortalisierung beteiligt war. Der Verlauf der kontinuierlich wachsenden Zellpopulation von EPC-hTERT zeigte jedoch einen äquivalenten Expressionslevel von p53. Es gab keinerlei Hinweise auf Veränderungen im p53 Tumorsupressorgen. Somit kann weitestgehend eine Korrelation zwischen hTERT und dem p53 Protein in diesem Zellmodell ausgeschlossen werden.

5.2 Charakterisierung von Nebennierenrindenzellen mit hTERT Überexpression

Bislang basierten Studien zu Telomerbiologie, Telomeraseaktivität und hTERT-Expression in Nebennierenrindenzellen hauptsächlich auf Untersuchungen von Zellen und Gewebe

im Tumorstadium. Es gab keine systematischen Untersuchungen zum Verlauf der hTERT-Expression in der Tumorentstehung in normalen primären Nebennierenrindenzellen.

Ausgangspunkt für die Untersuchungen waren normale, humane Nebennierenrindenzellen, die im Rahmen einer Nierentumoroperation gewonnen worden waren (Hornsby und Aldern, 1984). Nach Kultivierung der NNR-Zellen wurde hTERT retroviral transduziert (Sun *et al.*, 2004). Die Transduktion wurde in Kooperation mit Professor Peter J. Hornsby in Texas durchgeführt.

Die hTERT retroviral transduzierten Nebennierenzellen konnten wir anhand ihrer spezifischen Expressionsmuster als differenzierte Nebennierenrindenzelle identifizieren. Dazu wurden Enzyme aus der Steroidbiosynthese ermittelt. Die spezifische mRNA für das Enzym P450 SCC (side chain cleavage), welches in der Steroidbiosynthese aus Cholesterol Pregnenolon bildet, war in allen repräsentativen Passagen kontinuierlich wachsender NNR-hTERT-Zellen nachweisbar. Ein weiterer Nachweis der NNR-Zellen-Differenzierung ergab sich durch die Real-Time PCR mit StAR (steroidogenic acute regulating protein), einem weiteren Enzym der Steroidbiosynthese. So konnte die StAR mRNA-Expression zweifelsfrei in allen untersuchten Passagen identifiziert werden. Durch den Nachweis der Expression von SCC und StAR war es damit offensichtlich gelungen, die NNR-hTERT-Zellen als differenzierte, Nebennierenrindenzellen mit steroidogenem Potential zu kultivieren.

5.3 Trotz ektopter Expression der Telomerase gehen Nebennierenrindenzellen in Seneszenz

Im Verlauf der Kultivierung der kontinuierlich wachsenden Zellpopulationen der hTERT-exprimierenden Nebennierenrindenzellen konnte ab der Passage 28 ein deutlich langsames Wachstum festgestellt werden. Die replikative Lebensdauer der NNR-hTERT-Zellen war unter Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT auf 31 Passagen (PD 93) begrenzt. Im Vergleich zu nicht transduzierten primären NNR-Zellen mit einer replikativen Lebenszeit von bis zu 10 Passagen (PD 30) und anschließender Seneszenz (Hornsby *et al.*, 1992, Suwa *et al.*, 2001) zeigte sich damit, dass eine Überexpression von hTERT mit einer verlängerten Lebensdauer assoziiert ist.

Der direkte Nachweis der Seneszenz über aktive saure β -Galaktosidase ergab allerdings, dass die NNR-hTERT-Zellen ab der Passage 26 trotzdem in das Stadium der Seneszenz übertreten. Ebenso ergab sich im Proliferationsassay für die NNR-hTERT-Zellen, dass die Proliferation mit Erreichen der Passage 27 deutlich absinkt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine ektopische Expression von hTERT in Nebennierenrindenzellen alleine nicht ausreicht um eine Immortalisation dieser Zellen zu erreichen. Die NNR-hTERT-Zellen zeigen zwar eine dreifach längere replikative Lebenszeit, gehen jedoch in das Stadium der Seneszenz über und stellen dann die Proliferation ein.

5.4 Hinweise aus der Telomerbiologie für den Eintritt der NNR-hTERT-Zellen in die Seneszenz

In normalen Nebennierenrindenzellen findet sich keine relevante Telomeraseaktivität und folgerichtig nehmen die Telomerlängen altersabhängig ab. Hinweise darauf zeigte die Arbeitsgruppe von Hornsby, die herausfand, dass normale humane NNR-Zellen eine nur schwach positive Telomeraseaktivität aufweisen und diese im Verlauf von ca. 10 Populationsverdoppelungen nicht mehr detektierbar war (Suwa *et al.*, 2001). Demnach können auch normale somatische NNR-Zellen zumindest eine leichte basale Telomeraseaktivität aufweisen. In der Literatur wurde u.a. beschrieben, dass normales Gewebe Zellzyklus-abhängige basale Telomeraseaktivität zeigen kann, hier untersucht an Fibroblasten (Masutomi *et al.*, 2003). In einer weiteren Arbeit von Hornsby war die Telomeraseaktivität in frisch isolierten normalen primären NNR-Zellen allerdings negativ (Yang *et al.*, 2001). Vergleichbare Studien an normalem Nebennierenrindengewebe zeigten ebenfalls keine Telomeraseaktivität (Else *et al.*, 2008).

Die beschriebenen Telomerlängen in normalen Nebennierenrindengeweben liegen zwischen 7 und 14kbp (Else *et al.*, 2008). Die Ergebnisse einer altersabhängigen Telomerlängen-Analyse in normalen Nebennierenrindenzellen konnte eine klare Verkürzung der Telomerlängen von fetalen NNR-Zellen mit 12kbp bis zum Gewebe eines 76jährigen Patienten mit 7kbp zeigen (Yang *et al.*, 2001).

Im Vergleich hierzu zeigten Gewebeproben von Nebennierenrindenzellkarzinomen bei Else *et al.* zu 79% Telomeraseaktivität, 8% zeigte Telomeraseaktivität und einen alternativen Mechanismus. Dies ist ein geringerer Prozentsatz als bei anderen Tumoren, die in der Regel in fast 90% der Fälle nachweisbare Telomeraseaktivität zeigen (Shay und Bacchetti, 1997; Kim, 1997). Die Telomerlängen der Gewebeproben der Nebennierenkarzinome variiert von 3-78kbp mit einer mittleren Telomerlänge von 19kbp (Else *et al.*, 2008). Diese breite Variation der Telomerlängen deutet auf einen ALT hin.

Weitere Autoren beschrieben Telomeraseaktivität in Gewebe von malignen Nebennierenrindentumoren (Hirano *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 1998, Manelli *et al.*, 2000,

Sticchi *et al.*, 2006). Außerdem ergab sich in der Nebennierenrindencarcinom-Zelllinie NCI H295A Telomeraseaktivität und eine mittlere Telomerlänge von 23kbp. Die Nebennierenrindencarcinom-Zelllinien SW13 und RL251 zeigten ebenfalls beide Telomeraseaktivität, dagegen sind die mittleren Telomerlängen nur 10 bzw. 4kbp lang (Else *et al.*, 2008).

In der vorgelegten Arbeit wurde in allen untersuchten Passagen der hTERT-NNR-Zellen die Expression der Telomerase auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Weiter konnte eine gleichbleibende deutliche Aktivität der Telomerase über die kontinuierlich wachsenden Zellpopulationen der NNR-hTERT-Zellen ermittelt werden (s. Abb. 18), zumal sich die langen (um 20kbp) und homogen angeordneten Telomerlängen im Verlauf der Zellpopulation nicht verkürzten (s. Abb. 19).

Es bleibt die Frage offen, warum die hTERT exprimierenden NNR-Zellen in zelluläre Seneszenz gehen, obwohl die Telomerase exprimiert wird, stabile Telomeraseaktivität zeigt und die Telomerlängen sich nicht verkürzen. Nach der Telomerhypothese sollte erst bei Erreichen einer kritischen kurzen Telomerlänge replikative Seneszenz ausgelöst werden (Harley *et al.*, 1990; Harley 1991). Dies legt zumindest die Vermutung nahe, dass es sich in den untersuchten NNR-hTERT-Zellen nicht um die replikative, sondern wahrscheinlicher um eine prämaturne Seneszenz handelt. Wie bereits erwähnt, wird diese Telomer-unabhängige Form der Seneszenz durch zelluläre Stressfaktoren wie aktivierte Onkogene, reaktive Sauerstoff-Spezies, Strahlenexposition oder andere Stimuli, die DNA-Schäden auslösen, induziert (Serrano *et al.*, 1997, Collado *et al.*, 2007). Auch nicht optimale Zellkulturbedingungen können zur prämaturnen Seneszenz führen.

5.5 Genetische Veränderungen in Signaltransduktionswegen von Nebennierenrindenzellen nach Überexpression von hTERT

Um herauszufinden, welche Faktoren am Auslösen der zellulären Seneszenz beteiligt sind, wurden Proteine der Signaltransduktionswege, die typischerweise in seneszenten Zellen verändert sind, untersucht. Es wurde die Expression von p16, Cyclin D1, p53 und p21 analysiert.

Interessant ist die leichte Expressionszunahme des Tumorsuppressorgen p16 in den NNR-hTERT-Zellen. Dieses Ergebnis könnte eine Erklärung für die Seneszenz sein, denn erhöhte p16 Expression führt zum G1-Arrest und zur zellulären Seneszenz (Alcorta *et al.*, 1996). Ein

weiteres Indiz für diese These ist, dass die Seneszenz-induzierte p16-Expression unabhängig von einer Telomerverkürzung verläuft (Forsyth *et al.*, 2003). In unseren Untersuchungen sind die Telomere ebenfalls nicht verkürzt und die p16-Expression steigt leicht an, so dass sich die Vermutung nach der prämaternen Seneszenz erhärtet.

Wie bereits erwähnt, führt in einigen Zellarten erst die Inaktivierung des p16/ pRb Signalweges neben der Expression von Telomerase zur Immortalisierung von humanen Zellen (Kiyono *et al.*, 1998; Dickson *et al.*, 2000). Darüber hinaus führen Mutationen in p16/ pRb Genen zur Überwindung der Seneszenz und zur Tumorprogression (Narita *et al.*, 2003). Dies könnten Hinweise darauf sein, warum eine alleinige Expression von hTERT in NNR-Zellen nicht zur Immortalisierung führt. Passend dazu zeigen LOH- und immunhistochemische-Studien an Nebennierenrindentumoren eine Inaktivierung von p16 (Pilon *et al.*, 1999). Dies legt die Vermutung nahe, dass neben der ektopen Expression von hTERT die Inaktivierung von p16 zur Immortalisierung und malignen Transformation von NNR-Zellen notwendig ist.

Dagegen zeigte Cyclin D1 eine schwache Expression in allen untersuchten NNR-hTERT-Zellen. Cyclin D1 bildet mit den D-Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 einen Komplex, der für die Phosphorylierung und damit Inaktivierung von pRB verantwortlich ist. So kann der E2F-Transkriptionsfaktor, der durch hypophosphoryliertes pRB gebunden und inaktiviert worden wäre, agieren und die Progression aus der G1-Phase in die S-Phase des Zyklus einleiten (Sherr und Roberts, 1999). Cyclin D1 spielt also eine wichtige Rolle im Fortschreiten des Zellzyklus in der G1- Phase. Daher korreliert eine nur schwache Expression von Cyclin D1 mit der verminderten Proliferation der NNR-hTERT-Zellen.

In den untersuchten hTERT exprimierenden NNR-Zellen war der Tumorsupressor p53 sehr stark exprimiert und stieg im Verlauf der Passagen weiter an (s. Abb. 21). Wie bereits erwähnt überwacht p53 mehrere Zellzyklus-Checkpoints, wie beispielsweise den G1-, G2-Checkpoint und ist zentral an Zellzyklus-Arrest, Apoptose und Seneszenz beteiligt (Vogelstein *et al.*, 2000). Der wichtigste Effekt der p53 Expression liegt darin, den Zellzyklus zu blockieren. Dies geschieht über die Stimulation der p21 Expression, einem CDK Inhibitor, der durch verstärkte Expression über cdk2-Inhibierung den Zellzyklus arretiert (Sherr und Roberts, 1999). Dieser Zellzyklusarrest und die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen ermöglichen Zellen, sich von der auslösenden Schädigung zu erholen und zu überleben (Zhou und Elledge, 2000). Da die NNR-hTERT-Zellen in Kultur 4 Wochen in Seneszenz verblieben und anschließend apoptotisch zugrunde gingen, ist zu vermuten, dass die Reparaturmechanismen versagten, dann die ebenfalls von p53 aktivierten Zelltodsignale überwogen und die Zelle starb. Der p53 Signalweg und der Effekt der p21 Stimulation korrelierte mit der Expressionszunahme von p21 in Passage 27 in dieser

Studie (s. Abb. 21). Gleichzeitig gingen die Zellen im Verlauf der Passage 27 in zelluläre Seneszenz (s. Abb. 15) und stoppten ihre Proliferation (s. Abb. 16), so dass der p53 Pathway trotz hTERT-Expression intakt zu sein scheint.

Der p53 Signalweg wird durch onkogene Signale über p14, bei DNA-Schädigungen durch ionische Strahlung über Proteinkinasen wie ATM und Chk2, sowie durch chemotherapeutische Medikamente, UV-Licht und Proteinkinaseninhibitoren über Kinasen wie ATR und Casein Kinase II induziert und aktiviert (Carr, 2000; Meek, 1999). Zur Bestimmung der Auslöser der Aktivierung des p53 Tumorsupressor in den hTERT exprimierten NNR-Zellen wären weitere Expressions-Analysen einschließlich p14, ATM und ATR notwendig.

Überdies wurden in Tumorgeweben von Nebennierenrindenzellkarzinomen von mehreren Arbeitsgruppen Mutationen im p53 Tumorsupressor nachgewiesen (Reincke *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1994; McNicol *et al.*, 1997). Somit könnte p53 ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung von NNR spielen. Die Eliminierung von p53 ist in vielen Tumoren für die Inaktivierung der Apoptosemaschinerie unerlässlich (Shen Y und White E., 2001). Dies lässt die Vermutung zu, dass neben der ektopen Expression von hTERT p53 zur Immortalisierung und malignen Transformation von NNR-Zellen inaktiviert werden müsste.

5.6 Eine alleinige Aktivierung der Telomerase führt in humanen Nebennierenrindenzellen nicht zur Immortalisierung

Eine grundlegende Eigenschaft maligner Zellen ist die uneingeschränkte Proliferationsfähigkeit bzw. Immortalität und eine Voraussetzung hierfür liegt im Erhalt stabiler Telomerlängen. Diese wird in 85% der humanen malignen Tumore durch die Expression der Telomerase erreicht. Die Aktivierung der Telomerase zeigt somit eine herausragende Rolle in der Tumorentstehung (Shay und Bacchetti, 1997; de Lange, 1994; Kim *et al.*, 1994). Die ektopische Expression von hTERT induziert in normalen Telomerase-negativen humanen Zellen Telomeraseaktivität und gibt diesen Zellen die Möglichkeit, ihre Telomerlängen zu erhalten bzw. zu verlängern (vorausgegangenen Studien, Bodnar *et al.*, 1998; Vaziri, H. und Benchimol, S., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde die Folge einer alleinigen Expression der Telomerase erstmals in primären NNR-Zellen schrittweise analysiert.

Wie bereits oben erwähnt, führte in vorausgegangenen Arbeiten in Kooperation mit Herada *et al.*, an oesophagealen Keratinocyten die Stabilisierung der Telomerlängen durch die

alleinige Expression der Telomerase in frühen Passagen zur Immortalisierung dieses Zellmodells.

Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse in primären NNR-Zellen, dass die alleinige Expression der Telomerase zur repräsentativen Lebensverlängerung, jedoch nicht zur Immortalisierung der Zellen führt. Hinweise für zusätzliche genetische Veränderungen, die in diesem Modell in NNR-hTERT-Zellen für die Immortalisation notwendig waren, ergeben sich aus der Western-Blot-Analyse (siehe Abschnitt 5.5). Überdies zeigte Hornsbys Arbeitsgruppe, dass Telomeraseaktivität in primären NNR Zellen, die durch SV40 T Antigen (führt zur Inaktivierung vom p53- und pRB-Pathway) und Ras maligne transformiert wurden, nicht nachgewiesen werden konnte. hTERT war ebenfalls für die Tumorprogression in diesem Modell der NNR-Zellen nicht notwendig. Jedoch war, nachdem die Telomere verkürzt waren, hTERT-Expression für das kontinuierliche Wachstum des Tumors notwendig (Chen *et al.*, 2004). Es zeigte sich darüber hinaus in der Arbeitsgruppe von Hammer, dass NNR-Karzinome nur zu 4% einen ALT und zu 79% die Telomerase für die Telomererhaltung nutzen (Else *et al.*, 2008). Folglich scheint die Telomeraseaktivierung und weniger ein alternativer Telomererhaltungsmechanismus für das Überleben der Tumorzellen in der NNR unerlässlich zu sein.

In der vorgelegten Studie ergibt sich, dass hTERT alleine für die Immortalisierung bzw. die Tumorentstehung des NNR-Karzinoms nicht ausreicht. Andere genetische Veränderungen wie p16 und p53 Alterationen sind vermutlich notwendig, um NNR-Zellen zu immortalisieren bzw. maligne zu transformieren. Andererseits scheint die Telomerase im Zusammenspiel mit anderen genetischen Veränderungen doch unerlässlich zu sein, um eine fortgesetzte Proliferation von NNR-Karzinom-Zellen zu ermöglichen.

Ob die alleinige Expression von hTERT zur Immortalisierung führen kann, wird immer wieder kontrovers diskutiert. So führt hTERT-Expression wie bereits oben erwähnt in einigen Zellarten zur Immortalisierung. Dagegen ist die hTERT-Expression in anderen Zellen insuffizient um zur Immortalisation zu führen. In einigen Zellpopulationen waren zusätzliche genetische Veränderungen notwendig. Dies ist anhand der vorgelegten Daten auch für NNR-Zellen der Fall. Die kontroversen Ergebnisse der Immortalisierung durch hTERT zeigen, dass die Induktion zur Immortalisierung durch verschiedene Wege oder verschiedene Kombinationsmöglichkeiten der genetischen Veränderungen mit und ohne hTERT Expression erreicht werden kann.

Ungeachtet dieser Ergebnisse wurde immer wieder gezeigt, dass hTERT in verschiedenen Tumorzellen durch die Notwendigkeit, die Telomere zu verlängern, exprimiert wird. So wurde hTERT hochreguliert beispielsweise durch die Expression von Proteinen, die an der

Hemmung der Apoptose beteiligt sind. In Kolonkarzinomzellen wurde Survivin, das eine wichtige Rolle in der Inhibierung der Apoptose spielt, exprimiert mit der Folge, dass hTERT Expression hochreguliert wurde, um die Telomere zu verlängern (Furuya *et al.*, 2009).

Basierend auf Transformationsstudien konnte außerdem gezeigt werden, dass die Telomeraseaktivität mit den malignen Eigenschaften eines Tumors korreliert. So konnten Untersuchungen zur Immortalisierung und malignen Transformation feststellen, dass die Telomerase im Prozess der malignen Transformation in Zellen nicht notwendig war, jedoch *in vivo* im Tumorstadium hochreguliert wird. Epidermale Keratinocyten konnten durch Expression von cdk4 und Ras maligne transformiert werden ohne hTERT-Induktion. Obwohl diese Zellen eine begrenzte replikative Lebensspanne in Kultur aufweisen, wurden in Mäusen effizient Tumore gebildet. Interessanterweise zeigten diese Tumorzellen nach Entnahme hTERT Expression, obwohl die Telomerase nicht induziert wurde (Lazarov *et al.*, 2002).

Es zeigt sich, dass die Telomerase, in einigen Zellarten auch der ALT, für die Immortalisierung von Zellen notwendig aber nicht hinreichend ist, dass aber die Aktivierung der Telomerase für das Überleben eines Tumors unerlässlich sein kann. Der zentrale Punkt bleibt, dass die Aktivierung der Telomerase eine herausragende Rolle in der Tumorentstehung spielt (Shay und Bacchetti, 1997; de Lange, 1994; Kim *et al.*, 1994). Die meisten Daten unterstützen die Hypothese, dass hTERT das wichtigste Gen ist, um normale humane Zellen zu Tumorzellen zu konvertieren. Letztendlich bleibt die Erhaltung der Telomerlänge für die Tumorentstehung *in vitro* und *in vivo* eine unerlässliche Komponente.

Vergleicht man die Ergebnisse bei den Keratinozyten mit den Ergebnissen der Nebennierenrindenzellen, besteht die Möglichkeit, dass Zelltypen je nach entwicklungsgeschichtlichem Ursprung und Aufgabe Unterschiede in der Entstehung der Immortalisierung und malignen Transformation zeigen können.

Zellen der Nebennierenrinde sind hochdifferenzierte Zellen mesodermalen Ursprungs, die sehr langsam proliferieren. Ihre Aufgabe besteht in der Steroidhormonbildung. In diesen führte die alleinige Expression der Telomerase lediglich zur Lebensverlängerung, aber nicht zur Immortalisierung.

Im Gegensatz dazu gehören die Plattenepithelzellen dem entodermalen Ursprungsgewebe an und bilden eine Barriere gegenüber der Umgebung. Demgegenüber geht die Proliferation dieser Zellen schneller voran. Hier war eine Immortalisierung durch die alleinige Expression der Telomerase *in vitro* möglich.

5.7 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Rolle der Telomerase in humanen Nebennierenrindenzellen untersucht und damit die Bedeutung der Telomerase in der Tumorgenese von Nebennierenrindenzellen analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die alleinige Expression der Telomerase zur Verlängerung der Lebensdauer, jedoch nicht zur Immortalisierung der Nebennierenrindenzellen führt, sondern dass diese in Seneszenz gehen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass vermutlich weitere genetische Veränderungen wie p16 und p53 Alterationen notwendig sind, um zur Immortalisierung der NNR-Zellen zu führen.

Die gewonnenen neuen Erkenntnisse zur Rolle der Telomerase im Prozess der Tumorgenese in Nebennierenrindenzellen sowie die Etablierung und Charakterisierung geeigneter Modellsysteme können einen Beitrag zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen im Nebennierenrindenzellkarzinom leisten.

6 Zusammenfassung

In vorausgehenden Studien zur malignen Transformation und Immortalisation von primären oesophagealen Plattenepithelzellen konnte gezeigt werden, dass die alleinige ektopische Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase zur Verlängerung der Lebenszeit und zur Immortalisation führt. Eine Beteiligung des p53 Tumorsuppressorgens bei der Immortalisation konnte ausgeschlossen werden. Des Weiteren war die Inaktivierung des p16/ pRb Signalwegs nicht notwendig.

Während der malignen Transformation von Nebennierenrindenzellen in ein autonom wachsendes Nebennierenrindenzellkarzinom sind neben Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen und Überexpression des IGF-II Wachstumsfaktors auch der Expressionsverlust des ACTH-Rezeptors beschrieben (Reincke *et al.*, 1994, Gicquel *et al.*, Zwermann *et al.*, 2005). Eine Voraussetzung zur Immortalisierung stellt die Verlängerung der Telomere durch die Aktivierung der Telomerase dar. Die bisherigen Daten zur Telomeraseaktivität in Nebennierenrindenzellkarzinomen sind jedoch uneinheitlich. Außerdem basieren die Studien zur Telomeraseaktivität in Nebennierenrindenzellkarzinomen hauptsächlich auf Zellen und Geweben, die sich bereits im Tumorstadium befanden. Welche Faktoren zur malignen Transformation geführt haben, ist dabei schwierig zu analysieren. Es gab bislang keine systematischen Untersuchungen zum Verlauf der Telomerase-Expression in der Tumorgenese von Nebennierenrindenzellkarzinomzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Rolle der Telomerase in normalen humanen Nebennierenrindenzellen untersucht und damit schrittweise die Bedeutung der Telomerase in der Tumorgenese von Nebennierenrindenzellen analysiert. Dazu wurden normale primäre humane Nebennierenrindenzellen mit retroviraler Überexpression von hTERT als Modellsystem verwendet. Diese kontinuierlich wachsende Zellpopulation wurde schrittweise hinsichtlich Wachstumseigenschaften, replikativer Seneszenz durch β -Galaktosidasenachweis, Proliferation mittels BrdU-ELISA, hTERT-Genexpression durch RT-PCR, Telomerlänge durch TRF-Assay und Telomeraseaktivität mittels TRAP untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die alleinige Expression der Telomerase zur Verlängerung der Lebensdauer, jedoch nicht zur Immortalisierung der Nebennierenrindenzellen führt. Die hTERT transfizierten Nebennierenrindenzellen gehen nach etwa 26 Passagen in das Stadium der Seneszenz über, obwohl die Telomerase exprimiert wird, stabile Telomeraseaktivität zeigt und die Telomerlängen sich nicht verkürzen. Der Anstieg der seneszenten Zellen geht mit einem Abfall der Proliferationsrate einher.

Western-Blot-Bestimmungen für die Signaltransduktionsproteine p16, p21, Cyclin D1 und p53 konnten zeigen, dass vermutlich weitere genetische Veränderungen in p16 und/oder p53 notwendig sind, um eine Immortalisierung und maligne Transformation der Nebennierenrindenzellen zu Karzinomzellen zu erreichen.

7 Literaturverzeichnis

- Ahsan, H.; Neugut, A. I. and Gammon, M. D. (1997). Association of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus with tobacco-related and other malignancies, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **6**, (10), 779-82.
- Alcorta, D. A., Xiong, Y. Phelps, D., Hannon, G., Beach, D. and Barrett, J. C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13742-13747.
- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W. & Harley, C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**, 10114-10118.
- Allolio, B., Fassnacht, M., Arlt, W., (2002). Maligne Tumoren der Nebennierenrinde, *Internist* **43**, 186-195
- Arlt W, Reincke M, Winkelmann W und Allolio B., (1990). Klinik und Therapie des Nebennierenrindenzarzinoms. *Therapiewoche* **40**, 2400-2406
- Autexier C., Greider, C.W. (1994). Funktional reconstruction of wild-type and mutant Tetrahymena Telomerase. *Genes. Dev.* **8**, 563-75.
- Bachand, F., Triki, I. and Autexier, C. (2001). Human telomerase RNA–protein interactions. *Nucleic. Acids. Res.* **29**, 3385–3393.
- Bartkova, J., Lukas, J. et al. (1995). Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer. *Cancer Res.* **55**(4), 949-56.
- Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O. and Harrington, L. (1998). Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr. Biol.* **8**, 177–180.
- Blackburn, E. H., and Gall, J. G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J. Mol. Biol.* **120**, 33-53.
- Blackburn, E.H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* **350**, 569-573.
- Blackburn, E.H. (1994). Telomeres: no end in sight. *Cell* **77**, 621-623
- Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A. and Greider, C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**, 25-34.
- Blot, W. J. (1994). Esophageal cancer trends and risk factors, *Semin. Oncol.* **21**, (4), 403-10
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349–352.

- Boulle, N., Logie, A., Gicquel, C., Perin, L. und Le Bouc, Y. (1998). Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 1713-1720
- Boyce, S. T., und Ham, R. G. (1983). Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* **81**, 33s-40s.
- Bryce, L.A., Morrison, N., Hoare, S.F., Muir, S., und Keith, W. N. (2000). Mapping of the gene for the human Telomerase reverse transkriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridisation, *Neoplasia*. **2**, 197-202.
- Bryan, T.M., Englezou A., Gupta J., Bacchetti, S. and Reddel, R.R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo. J.* **14**, 4240-4248.
- Bryan, T. M., Englezou A., Dalla-Pozza, L., Dunham; M. A. und Reddel, R. R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat. Med.* **3**(11), 1271-4.
- Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *Eur. J. Cancer* **33**, 703-709.
- Carr, A.M., (2000). Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle. *Science* **10**; (287),1765-6.
- Cerone, M.A., Londono-Vallejo, J.A. und Bacchetti, S. (2001). Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1945-1952.
- Chen, M., Hawks, C.L., Huang, Q., Sun, B., Hornsby, P.J. (2004). Telomerase is not required for experimental tumorigenesis of human and bovine adrenocortical cells. *Endocr. Res.* **30**(4):555-65.
- Collado, M., Blasco, M. A. und Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* **130**, 223–233
- Cong, Y. S., Wen, J., und Bacchetti, S. (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 137-142.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B. und Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome Instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* **11**, 1921-1929.
- De Lange, T. (1994). Activation of telomerase in a human tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 2882-2885.
- De Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21**, 532-540.
- De Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nature Rev.* **5**, 323-29.

- Dez, C., Henras, A., Faucon, B., Lafontaine, D.L.J., Caizergues-Ferrer, M. and Henry, Y. (2001). Stable expression in yeast of the mature form of human telomerase RNA depends on its association with the box H/ACA small nucleolar RNP proteins Cbf5p, Nhp2p and Nop10p. *Nucleic. Acids. Res.* **29**, 598–603.
- Dickson, M. A., Hahn, W.C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J.Y., Weinberg, R.A., Louis, D.N., Li, F.P. and Rheinwald, J.G. (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also evade a p16^{INK4A}-enforced lifespan limit become immortal while retaining normal growth and differentiation characteristics. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1436–1447.
- Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O. et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo, *Proc Natl Acad Sci. U S A* **92**, (20), 9363-7.
- Dimri, G. P.; Itahana, K.; Acosta, M. und Campisi, J. (2000). Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor, *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1, 273-85.
- Dragon, F., Pogacic, V. and Filipowicz, W. (2000). In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3037–3048
- Dunham, M.A, Neumann AA, Fasching CL & Reddel RR (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat. Genet.* **26**, 447-450.
- Engelhardt, M. und Martens, U.M. (1998). The implication of telomerase activity and telomere stability for replicative aging and cellular immortality. *Oncol. Rep.* **5**, 1043-52.
- Else, Tobias, Thomas J. Giordano, Gary D. Hammer (2008). Evaluation of Telomere Length Maintenance Mechanisms in Adrenocortical Carcinoma. *J. Clin. Endocrin. Metab.* **10** 2007-1840
- Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J., et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* **269**, 1236-41.
- Ford, L.P., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2001). The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. *RNA* **7**, 1068–1075.
- Ford, L. P., Zou, Y., Pongracz, K., Gryaznov, S.M., Shay, J.W., Wright, W.E. (2001A). Telomerase can inhibit the recombination-based pathway of telomerase maintenance in human cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 32198-203.
- Forsyth, N.R., Wright, W.E. und Shay, J.W. (2002). Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on and turn it off again. *Differentiation* **69**, 188–197.
- Forsyth, N.R., Evans, A.P., Shay, J.W., Wright, W.E. (2003). Developmental differences in the immortalisation of lung fibroblasts by telomerase. *Aging Cell.* **5**, 235-43.
- Forsythe, H.L., Jarvis, J.L., Turner, J.W., Elmore, L.W., Holt, S.E. (2001). Stable association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with active human telomerase. *J Biol Chem.* **276**(19), 15571-4.

- Freedman, D.A., Wu, L., Levine, A.J. (1999). Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 96-107
- Furuya M, Tsuji N, Kobayashi D, Watanabe N. (2009). Interaction between survivin and aurora-B kinase plays an important role in survivin-mediated up-regulation of human telomerase reverse transcriptase expression. *Int. J. Oncol.* **34**,(4), 1061-8.
- Gollahon LS, Kraus E, Wu TA, Yim SO, LC Strong, Shay JW, Tainsky M A. (1998). Telomerase activity during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome skin fibroblasts. *Oncogene* **17**, 709-717.
- Ghadirian, P. (1987). Food habits of the people of the Caspian Littoral of Iran in relation to esophageal cancer. *Nutr. Cancer* **9**, (2-3), 147-57.
- Ghadirian, P.; Vobecky, J. and Vobecky, J. S. (1988). Factors associated with cancer of the oesophagus: an overview, *Cancer Detect. Prev.* **11**, (3-6), 225-34
- Ghadirian, P.; Ekoe, J. M. and Thouez, J. P. (1992). Food habits and esophageal cancer: an overview, *Cancer Detect. Prev.* **16**, (3) 163-8
- Ghavamzadeh, A.; Moussavi, A.; Jahani, M.; Rastegarpanah, M. and Iravani, M. (2001). Esophageal cancer in Iran, *Semin: Oncol.* **28**, (2), 153-7.
- Gicquel, C., Bertagna, X., Schneid, H., Francillard-Leblond, M., Luton, J.P., Girard, F. und Le Bouc, Y. (1994). Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**, 1444-1453
- Grandis, J.R., und Tweardy, D.T. (1993). Elevated Levels of Transforming Growth Factor a and Epidermal Growth Factor Receptor Messenger RNA Are Early Markers of Carcinogenesis in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* **53**, 3579-3584
- Greider, C. W., und Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405-413.
- Greider, C. W. (1996). Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 337-365.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H. und de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, **97**, 503-514.
- Hahn, W.C., Stewart, S.A., Brooks, M.,W., York, S., G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R.mL., Knoll, J., H., Meyerson, M., Weinberg, R., A., (1999). Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Med.* **10**, 1164-70.
- Hahn, W. C., Weinberg, R.A. (2002). Rules for making human tumor cells. *N. Engl. J. Med.* **347**, (20), 1593-603.
- Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. (2002A). Modelling the molecular Circuitry of Cancer *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 331-41.
- Halvorsen, T. L., Leibowitz, G. & Levine, F. (1999). Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1864–1870

- Harada, H., Nakagawa, H., Oyama, K., Takaoka, M., Andl, C.D., Jacobmeier, B., von Werder, A., Enders, G.H., Opitz, O.G., Rustgi, A.K., (2003). Telomerase induces immortalization of human esophageal keratinocytes without p16INK4a inactivation. *Mol. Cancer Res.* **1**(10), 729-38.
- Harle-Bachor, C., und Boukamp, P., (1996). Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 6476-6481.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. und Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-460.
- Harley, C.B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat. Res.*, **256**, 271-282.
- Harley, C. B., Kim, N. W., Prowse, K. R., Weinreich, S. L., Hirsch, K. S., West, M. D., Baccetti, S., Hirte, H. W., Counter, C. M., Greider, C. W. et al. (1994). Telomerase, cell immortality and cancer. *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **59**, 307-15.
- Harley, C.B. (2002). Telomerase is not an oncogene. *Oncogene* **21**,(4), 494-502.
- Harris, C. C. (1996). p53 Tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic -- an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* **17**, 1187-1198.
- Hayflick, L., and Moorhead, P. (1961). The serial activation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Research* **25**, 285-621
- Herbert, B. S., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2002). p16(INK4a) inactivation is not required to immortalize human mammary epithelial cells. *Oncogene* **21**, 7897–7900
- Hirano, Y., Fujita, K., Suzuki, K., Ushiyama, T., Ohtawara, Y., Tsuda, F. (1998). Telomerase activity as an indicator of potentially malignant adrenal tumors. *Cancer* **83**,(4), 772-6.
- Hornsby, P.J., Yang, L.Q., Raju, S.G., Cheng, C.Y. (1992). Changes in gene expression and DNA methylation in adrenocortical cells senescing in culture. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **43**, (8), 951-60.
- Hornsby, P.J., Aldern, K.A. (1984). Steroidogenic enzyme activities in cultured human definitive zone adrenocortical cells: Comparison with bovine adrenocortical cells and resultant differences in adrenogen synthesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **58**, 121-130
- Hsu, H. L., Gilley, D., Galande, S. A., Hande, M. P., Allen, B., Kim, S. H., Li, G. C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T., and Chen, D. J. (2000). Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes. Dev.* **14**, 2807-2812.
- Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell* **88**, 333-346
- Icard, P., Goude, P., Charpenay, C., Andreassian, B., Carnaille, B., Chapuis, Y., Cougard, P., Henry, J.F., Proye, C. (2001). Adrenocortical carcinomas: Surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J. Surg.* **25**, 891–897
- Itahana, K., Dimri, G., Campisi, J. (2001). Regulation of cellular senescence by p53. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2784-2791
- Jacks, T., Weinberg, R.A. (1996) Cell-cycle control and its watchman. *Nature* **381**, 643-644

- Johnson, D. G. and Schneider-Broussard, R. (1998). Role of E2F in cell cycle control and cancer, *Front. Biosci*, **3**, d447-8.
- Karlsleder, J; Broccoli, D; Dai, Y; Hardy, S and de Lange, T. (1999). p53- and ATM dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2 . *Science* **283**, 1321-1325.
- Keith, W.N., Bilsland, A. (2008). Targeting telomerase: therapeutic options for cancer treatment *Telomeres and Telomerase in Ageing, Disease, and Cancer*. 247–284. Rudolph KL (ed) Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, Germany ISBN: 978-3-540-73708-7.
- Khyse-Anderson, J. (1984). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- Kilian, A., Bowtell, D. D., Abud, H. E., Hime, G. R., Venter, D. J., Keese, P. K., Duncan, E. L., Reddel, R. R., and Jefferson, R. A. (1997). Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 2011-2019.
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. (1994). Specific association of human Telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011-2015.
- Kim, N.W. and Wu, F. (1997). Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic. Acids. Res.* **25** 2595-2597.
- Kinoshita, H., Ogawa, O., Mishina, M., Oka, H., Okumura, K., Yamabe, H., Terachi, T., Yoshida, O. (1998). Telomerase activity in adrenal cortical tumors and pheochromocytomas with reference to clinicopathologic features. *Urol. Res.* **26**, (1) 29-32.
- Kiyono, T., Foster, S. A., Koop, J. L., McDougall, J. K., Galloway, D. A., Klingelhutz, A. J., (1998). Both Rb/p16^{INK4A} inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature (Lond.)*, **396**, 84-88
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303.
- Laemmli, K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, C. K., Mitchell, J. R., and Collins, K. (2001). RNA binding domain of telomerase reverse transcriptase. *Mol. Cell Biol.* **21**, 990-1000.
- Lazarov, M., Kubo, Y., Cai, T., Dajee, M., Tarutani, M., Lin, Q., Fang, M., Tao, S., Green, C.L., Khavari, P.A. (2002) CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nat. Med.* **10**, 1105-14. Epub
- Le, S.Y., Sternglanz, R. and Greider, C.W. (2000). Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 999–1010

- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, (3), 323-31.
- Li, B., Oestreich, S., and de Lange, T. (2000). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**, 471-483.
- Lin, S., Lee, Y., Tsai, J. (1994). Mutations of the p53 gene in human functional adrenal neoplasms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **78**, 483-491.
- Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., van Aelst, L., Serrano, M., Lowe, S.W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* **12**(19), 3008-19.
- Lion, T. and Haas, O.A. (1990). Non radioactive labeling of probes with Digoxigenin by polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **188**, 335-337.
- Loayza, D, de Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* **423**, 1013–18
- Lowe, S. W. (1999). Activation of p53 by oncogenes. *Endocr. Relat. Cancer* **6**, 45-48.
- Lundblad, V. and Blackburn, E.H. (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell*, **73**, 347-360.
- Masutomi, K., E. Y. Yu, Ben-Porath, I., Currier, J.L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J.A., Weinberg, R.A., Stewart, S.A., Hahn, W.C. (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* **114** (2), 241-53.
- McCormick, F. (1999). Signalling networks that cause cancer. *Trends. Cell Biol.* **9**, 53-56
- McNicol, A.M., Nolan, C.E., Struthers, A.J., Farquharson, M.A., Herman, J., Haak, H.R. (1997). Expression of p53 in adrenocortical tumours: clinicopathological correlations. *J. Pathol.* **181**, 146–152.
- Macfarlane, G. J.; Macfarlane, T. V. and Lowenfels, A. B. (1996). The influence of alcohol consumption on worldwide trends in mortality from upper aerodigestive tract cancers in men, *J. Epidemiol. Community Health*, **50** (6), 636-9
- Mc Allister, J. M. and Hornsby, P. J. (1987). Improved clonal and nonclonal growth of human, rat and bovine adrenocortical cells in culture. *In vitro cellular & Development Bio.* **23** (10), 677-85
- McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**, 234-282.
- McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Peters, G. (1998). Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr. Biol.* **8**, 351-354
- Meek, D. W., (1999). Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* **18**(53), 7666-75.
- Mergny, J.L., Riou, J.F., Mailliet, P., Teulade-Fichou, M.P. and Gilson, E. (2002). Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic. Acids. Res.* **30**, 839-865.

- Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q. (1997). hEST2, the putative human Telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**, 785-795.
- Mannelli, M., Gelmini, S., Arnaldi, G., Becherini, L., Bemporad, D., Crescioli, C., Pazzagli, M., Mantero, F., Serio, M., Orlando, C. (2000). Telomerase activity is significantly enhanced in malignant adrenocortical tumors in comparison to benign adrenocortical adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 468-470.
- Mitchell, J.R., Wood, E. and Collins, K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402**, 551–555
- Mullis, K. and Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods. Enzymol.* **155**, 335-350.
- Müller, H. J. (1938). The remaking of the chromosomes. *The Collecting Net.* **13**, 181-195.
- Müller, S. (2004). Molekulargenetische, endokrinologische und klinische Untersuchungen bei Patientinnen mit Polyzystischem Ovar Syndrom und Ovariellem Überstimulationssyndrom. Dissertation Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., and Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6622-6626.
- Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., and Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**, 955-959.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W. Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J. and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703-16.
- Neumann, A.A. and Reddel, R.R. (2002). Telomere maintenance and cancer - look, No telomerase. *Nat. Rev. Cancer.* JID - 101124168, **2**, 879-884.
- Newbold, Robert F., (2002). The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer Mutagenesis. **17**(6), 539–550.
- Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* **41**, 181-190.
- Opitz, O. G., Suliman, Y., Hahn, W. C., Harada, H., Blum, H. E., and Rustgi, A. K. (2001). Cyclin D1 overexpression and p53 inactivation immortalize primary oral keratinocytes by a telomerase-independent mechanism. *J. Clin. Invest.*, **108**, 725–732.
- Orth, D., Kovacs, W. und DeBold, C. (1992). The adrenal cortex. In Wilson J und Foster D (Hrsg.): *Williams Textbook of endocrinology*. 8. Auflage, Saunders; Philadelphia; 489-621.

- Palm, W and de Lange, T (2008). How Shelterin Protects Mammalian Telomeres *Annu. Rev. Genet.* **42**, 301–34.
- Pilon, C., Pistorello, M., Moscon, A., Altavilla, G., Pagotto, U., Boscaro, M., Fallo, F. (1999). Inactivation of the p16 tumor suppressor gene in adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**(8), 2776-9
- Polsky, D., Bastian, B.C., Hazan, C., et al. (2001). HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. *Cancer Res.* **61**, 7642-7646.
- Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A. & Sherr, C. J. (1995). Alternative reading frames of the INK4A tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**, 993–1000.
- Ramirez, R. D., Morales, C.P., Herbert, B.S., Rohde, J.M., Passons, C., Shay, J.W. und Wright, W.E. (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes. Dev.* **15**, 398–403.
- Reincke, M., Karl, M., Travis, W.H., Mastorakos, G., Allolio, B., Linehan, H.M. und Chrousos, G.P. (1994). p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immuno-histochemical and molecular studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**, 790-794.
- Reincke, M., Mora, P., Beuschlein, F., Arlt, W., Chrousos, G.P. und Allolio, B., (1997a). Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 3054-3058.
- Reincke, M., Beuschlein, F., Latronico, A.C., Arlt, W., Chrousos, G.P. und Allolio, B., (1997b). Expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in human adrenocortical neoplasms: correlation with P450scc expression. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **46**. 619-626.
- Reincke, M., Beuschlein, F., Menig, G., Hofmockel, G., Arlt, W., Lehmann, R., Karl, M. and Allolio, B., (1998a). Localization and expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex. *Journal of Endocrinology* **156** 415–423.
- Riede, U und Saeger, W. (1993). Nebennierenrinde. In Riede U und Schaefer H (Hrsg.): *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. 3.Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart, New-York, 975-985
- Rogan, E. M., Bryan, T. M., Hukku, B., Maclean, K., Chang, A. C., Moy, E. L., Englezou, A., Warneford, S. G., Dalla-Pozza, L., Reddel, R. R. (1995). Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **15**(9), 4745-53.
- Rohde, V., Sommerfeld, H. J., Sattler, H. P., and Wullich, B. (1998). Telomerase in tumors: facts and perspectives. *Urologe A* **37**, 386-394.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samper, E., Goytisolo, F. A., Slijepcevic, P., van Buul, P. P., and Blasco, M. A. (2000). Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G strand overhang. *EMBO Rep.* **1**, 244-252

- Sanchez-Aguilera A, Sanchez-Beato M, Garcia JF, Prieto I, Pollan M, Piris MA. (2002). p14(ARF) nuclear overexpression in aggressive B-cell lymphomas is a sensor of malfunction of the common tumor suppressor pathways. *Blood* **99**, 1411-1418.
- Saidi, F.; Sepehr, A.; Fahimi, S.; Farahvash, M. J.; Salehian, P.; Esmailzadeh, A.; Keshoofy, M.; Pirmoazen, N.; Yazdanbod, M. and Roshan, M. K. (2000). Oesophageal cancer among the Turkomans of northeast Iran, *Br. J. Cancer* **83** (9), 1249-54
- Saiki, K., Gelfand H., Stoffel S., Scharf J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K. and Ehlich A. (1987): Primer-Directed Enzymatic Amplifikation of DNA with a Thermostabile DNA Polymerase. *Science* **239**, 487-494.
- Scheel, C., Schaefer, K.L., Jauch, A., Keller, M., Wai, D., Brinkschmidt, C., van Valen, F., Boecker, W., Dockhorn-Dworniczak, B., Poremba, C. (2001). Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas. *Oncogene* **20**(29):3835-44.
- Schiebler, T.H. and Schneider, F. (1991). *Histologie*. Springer-Verlag. 3.Auflage.
- Sellers, W. R. and Kaelin, W. G. (1997). Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol.* **15**, 3301–3312
- Serrano, M.; Lin, A. W.; McCurrach, M. E.; Beach, D. and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a, *Cell* (**88**), 5, 593-602.
- Shay, J.W., Pereira-Smith, O.M. and Wright, W.E. (1991). A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res.* **196**, 33-39.
- Shay, J.W. and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* **33**, 787-791.
- Shay, J. W., G. Tomlinson, W. A. Piatyszek, and L. S. Gollahon. (1995). Spontaneous in vitro immortalization of breast epithelial cells from a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 425-432.
- Sharpless, N.E., DePinho, R.A. (1999). The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 22-30.
- Shen, Y., White, E. (2001). p53-dependent apoptosis pathways. *Adv. Cancer. Res.* **82**, 55-84.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes. Dev.* **13**(12), 1501-12.
- Sherr, C. J. (2001). The INK4A/ARF network in tumorsuppression. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 731-737.
- Sherwood, S.W., Rush, D., Ellsworth, J.L., Schimke, R.T. (1988). Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**(23), 9086-90.
- Smith, S., Giriati, I., Schmitt, A., and de Lange, T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* **282**, 1484-1487.

- Smogorzewska, A. and de Lange, T.; (2004). Regulation of Telomerase by Telomeric Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 177–208.
- Soder, A.I., Hoare, S.F., Muire, S., Balmain, A., Parkinson, E.K., Keith, W.N. (1997). Mapping of the gene for the mouse telomerase RNA component, *Terc*, to chromosome 3 by fluorescence in situ hybridization and mouse chromosome painting. *Genomics.* **41**(2), 293-4.
- Sons, H. U. (1987). Etiologic and epidemiologic factors of carcinoma of the esophagus. *Surg. Gynecol. Obstet.* **165**(2), 183-90.
- Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Stewart, S.A. and Weinberg, R.A. (2002). Senescence: does it all happen at the ends? *Oncogene* **21**, 627-630.
- Stewart, S.A., Hahn, W.C., O'Connor, B.F., Banner, E.N., Lundberg, A.S., Modha, P., Mizuno, H., Brooks, M.W., Fleming, M., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Weinberg, R.A. (2002A). Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**(20), 12606-11.
- Stewart, N. and Bacchetti, S. (1991). Expression of SV40 large T antigen, but not small T antigen, is required for the induction of chromosomal aberrations in transformed human cells. *Virology* **180**, 49–57.
- Sticchi, D., Fassina, A., Ganzaroli, C., Pasqualetto, C., Pessina, A.C., Nussdorfer, G.G., Rossi, G.P. (2006). Expression of telomerase (hTERT) in aldosterone-producing adrenocortical tumors. *Int. J. Mol. Med.* **17**, 469-474.
- Sun, B., Huang, Q., Liu, S., Chen, M., Hawks, C.L., Wang, L., Zhang, C., Hornsby, P.J. (2004). Progressive loss of malignant behavior in telomerase-negative tumorigenic adrenocortical cells and restoration of tumorigenicity by human telomerase reverse transcriptase. *Cancer Res.* **64**, (17), 6144-51.
- Suwa, T., Yang, L., Hornsby, P.J. (2001). Telomerase activity in primary cultures of normal adrenocortical cells. *J. Endocrinol.* **170**(3), 677-84.
- Suzuk, L.; Noffsinger, A. E.; Hui, Y. Z. and Fenoglio-Preiser, C. M. (1996). Detection of human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer* **78**(4), 704-10.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1989). Immunblotting in the clinical laboratory. *J. Clin. Chem. Biochem.* **27**, 495-501.
- Van Steensel, B., and de Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**, 740-743.
- Van Steensel, B., Smogorzewska, A., de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**, 401-13
- Vaziri, H. and Benchimol, S. (1996). From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp. Gerontol.* **31**(1-2), 279-301.

- Vaziri, H. and Benchimol, S. (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol.* **8**, 279-282.
- Vogelstein, B.; Lane, D. and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network, *Nature* **408** (6810), 307-10.
- Wang, J., Xie, L. Y., Allan, S., Beach, D. and Hannon, G.J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes. Dev.* **12**(12). 1769-74.
- Webley, K., Bond, J.A., Jones, C.J., Blaydes, J.P., Craig, A., Hupp, T., Wynford-Thomas, D. (2000). Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol. Cell Biol.* **20**(8), 2803-8.
- Weng, N. P., Hathcock, K. S., and Hodes, R. J. (1998). Regulation of telomere length and Telomerase in T and B cells: a mechanism for maintaining replicative potential. *Immunity* **9**, 151-157.
- Wick, M., Zubov, D., and Hagen, G. (1999). Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* **232**, 97-106.
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., and Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* **18**, 173-179.
- Wright, W.E. and Shay, J.W. (1992). The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp. Gerontol.* **27**, 383-389.
- Yang, J. , Chang, E., Cherry, A. M., Bangs, C. D., Oei, Y., Bodnar, A., Bronstein, A., Chiu, C. P., and Herron, G. S. (1999). Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 26141–26148
- Yang, L., Suwa, T., Wright, W.E., Shay, J.W., Hornsby, P.J. (2001). Telomere shortening and decline in replicative potential as a function of donor age in human adrenocortical cells. *Mech. Ageing Dev.* **122**(15), 1685-94.
- Ye, J.Z., Donigian, J.R., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A.N., Chait, B.T., de Lange, T. (2004). TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J. Biol. Chem.* **279**(45), 47264-71.
- Yi, X.M., Tesmer, V.M., Savre-Train, I., Shay, J.W. and Wright, W.E. (1999). Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 3989–3997.
- Yu, G.L., Bradley, J.D., Attardi, L.D. und Blackburn, E.H. (1990.) In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* **344**, 126-132.
- Zakian, V.A. (1989). Structure and Function of telomeres. *Annu. Rev. Genet.* **23**, 579-604.
- Zakian, V.A. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* **270**, 1601-1607.
- Zhao, J.Q., Hoare, S.F., McFarlane, R., Muir, S., Parkinson, E.K., Black, D.M. and Keith, W.N. (1998). Cloning and characterization of human and mouse telomerase RNA gene promoter sequences. *Oncogene* **16**, 1345–1350.

- Zhou, B. B. and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective, *Nature* **408** (6811), 433-9.
- Zhu, J., Wang, H., Bishop, J. M. and Blackburn, E. H. (1999). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 3723–3728.
- Zhu, X.D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J.H., de Lange, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat. Genet.* **25**, 347–52
- Zhu, X.D., Niedernhofer, L., Kuster, B., Mann, M., Hoeijmakers, J.H., de Lange, T. (2003). ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol. Cell* **12**, 1489–1498.
- Ziegler, R. G. (1986). Alcohol-nutrient interactions in cancer etiology, *Cancer* **58** (8), 1942-8.
- Zwermann, O. (2000) Das MEN 1 Gen bei sporadischen Nebennierenrindentumoren. Dissertation der Medizinischen Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg.
- Zwermann, O., Schulte, D.M., Reincke, M., Beuschlein, F. (2005). ACTH 1-24 inhibits proliferation of adrenocortical tumors in vivo. *Eur. J. Endocrinol.* **153**(3), 435-44.

8 Veröffentlichungen

Wesentliche Teile der Studien an Keratinocyten wurden veröffentlicht in:

Harada H, Nakagawa H, Oyama K, Takaoka m, Andl CD, Jacobmeier B, von Werder A, Enders GH, Opitz OG, Rustgi AK (2003). **Telomerase induces immortalisation of human esophageal keratinocytes without p16INK4a inactivation.** Mol Cancer Res 1(10):729-38.

Weitere Veröffentlichungen:

Merzendorfer H, Reineke S, Zhao XF, Jacobmeier B, Harvey WR, Wieczorek H (2000). **The multigene family of the tobacco hornworm V-ATPase: novel subunits a, C, D, H, and putative isoforms.** Biochim Biophys Acta 1467(2):369-79.

Steinlechner S, Jacobmeier B, Scherbarth F, Dermbach H, Kruse F and Albrecht U (2002). **Robust circadian rhythmicity of *Per 1* and *Per 2* mutant mice in constant light and dynamics of *Per 1* and *Per2* gene expression under long and short photoperiods.** J Biol Rhythms 17(3):202-9.

Magnone MC, Jacobmeier B, Bertolucci C, Foa A, Albrecht U (2005). **Circadian expression of the clock gene *Per2* is altered in the ruin lizard (*Podarcis sicula*) when temperature changes.** Brain Res Mol Brain Res 133(2):281-5.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2005 bis August 2009 an der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Beuschlein betreut. Die Vorarbeiten wurden in der Zeit von April 2001 bis August 2002 an der Medizinischen Klinik am Universitäts-Klinikum Freiburg unter Leitung von Prof. Dr. O. G. Opitz angefertigt.

9 Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mir das Durchführen und Gelingen meiner Dissertation ermöglicht, mich darin unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Beuschlein für die gute Betreuung und die schnelle Korrektur meiner Dissertation. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie seine ständige Bereitschaft, rasch und unkompliziert Hilfestellungen zu leisten, haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. M. Reincke danke ich für die großzügige Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. O. G. Opitz möchte ich für die Anregung des Themas und die hervorragende Betreuung der Vorarbeiten sowie für die exzellente wissenschaftliche Anleitung und Lehre, herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. P. J. Hornsby, Universität Houston in Texas danke ich für die Bereitstellung der mit hTERT transduzierten Nebennierenrindenzellen.

An dieser Stelle bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. M. Bidlingmaier für das stete Interesse an meiner Dissertation, die hervorragende Unterstützung im Labor und die Hilfestellung bei der Bestimmung der Zellproliferation.

Als technische Mitarbeiter standen mir Frau B. Mauracher und Herr I. Shapiro zur Seite, denen ich für die stets rasche Unterstützung im Labor sowie für Experimente herzlich danke.

Ein großes Dankeschön geht auch an Frau Natalie Wodrich für das hilfreiche Korrekturlesen dieser Arbeit sowie an Frau Marie-Eve Berthod und Frau Gabrielle Regnault für die Betreuung von Marie und Linus während der Dissertation.

Nicht zuletzt möchte ich mich sehr herzlich bei meinen Eltern, Geschwistern und Freunden bedanken, die mich während meines Studiums und der Anfertigung der Dissertation stets unterstützt und motiviert haben.

Oliver danke ich für sein Vertrauen, seine Geduld und Unterstützung, seine exzellente wissenschaftliche und methodische Anleitung, für seine auffangenden Worte während der letzten sechs Jahre und für die Durchsicht meiner Arbeit. Ohne ihn hätte ich diese Arbeit so nicht anfertigen können. Danke

