

**Telomerlänge und Telomeraseaktivität, sowie
deren pharmakologische Modulation in
myeloischen Leukämien**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Ulrike Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung:

15. September 2005

Dekan:

Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter:

PD. Dr. T. Brümmendorf

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. L. Heide

Für meinen Vater

"A vision without action is just a dream.
Action without vision is just a waste of time.
A vision with action is able to change the world"

Nelson Mandela

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| Abkürzungsverzeichnis | v |
|-----------------------|---|

1. Einleitung 1

| | |
|---|----|
| 1.1 Telomerbiologie | 1 |
| 1.1.1 Telomere | 1 |
| 1.1.2 Telomerase | 7 |
| 1.2 Messung der Telomerlänge | 18 |
| 1.2.1 Southern Blot | 18 |
| 1.2.2 Q-FISH | 19 |
| 1.2.3 Flow-FISH | 20 |
| 1.3 Chronisch Myeloische Leukämie | 20 |
| 1.3.1 Krankheitsbild | 20 |
| 1.3.2 Das Philadelphia-Chromosom | 21 |
| 1.3.3 BCR-ABL Signaltransduktion | 23 |
| 1.3.4 Therapie | 24 |
| 1.4 Akute Myeloische Leukämie | 26 |
| 1.4.1 Krankheitsbild | 26 |
| 1.4.2 Einteilung und Klassifikation | 26 |
| 1.4.3 Therapie | 27 |
| 1.5 Hemmung der Telomerase – ein neuer Therapieansatz | 27 |
| 1.5.1 Prinzip | 27 |
| 1.5.2 Tumorbologische Überlegungen und Perspektiven | 28 |
| 1.5.3 Selektive Hemmung der Telomerase - BIBR1532 | 29 |
| 1.5.4 Weitere Strategien | 30 |

2. Fragestellung 32

| | |
|--|----|
| 2.1 Telomerlängen-Dynamik der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) unter Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib | 32 |
| 2.2 Untersuchungen zum funktionellen Zusammenhang zwischen der BCR-ABL-Tyrosinkinaseaktivität und der Telomerase-Aktivität bzw. Telomerlänge <i>in vitro</i> | 32 |

| | | |
|-----|--|----|
| 2.3 | Telomerlänge und Telomerase-Aktivität als prognostischer und diagnostischer Marker myeloischer Leukämie----- | 33 |
| 2.4 | Telomere und Telomerase als Angriffspunkt für pharmakologische Modulation----- | 34 |

3. Material und Methoden -----36

| | | |
|--------|---|----|
| 3.1 | Chemikalien, Reagenzien und Kits----- | 36 |
| 3.2 | Antikörper und Wachstumsfaktoren----- | 38 |
| 3.3 | Oligonukleotide----- | 39 |
| 3.4 | Medien, Puffer und Lösungen ----- | 39 |
| 3.4.1 | Medien----- | 39 |
| 3.4.2 | Puffer und Lösungen----- | 40 |
| 3.5 | Geräte und Hilfsmittel----- | 44 |
| 3.6 | Software zur Auswertung----- | 46 |
| 3.7 | Verwendete Arzneistoffe----- | 46 |
| 3.8 | Biologisches Untersuchungsmaterial ----- | 47 |
| 3.8.1 | Zelllinien----- | 47 |
| 3.8.2 | Patientenkollektive----- | 48 |
| 3.9 | Zellbiologische Methoden----- | 52 |
| 3.9.1 | Kultivierung der Zellen----- | 52 |
| 3.9.2 | Bestimmung der Zellzahl----- | 52 |
| 3.9.3 | Einfrieren und Auftauen von Zellen----- | 52 |
| 3.10 | MTT-Assay ----- | 53 |
| 3.10.1 | Prinzip----- | 53 |
| 3.10.2 | Durchführung----- | 54 |
| 3.10.3 | Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung ----- | 54 |
| 3.11 | Apoptose-Assay nach Nicoletti ----- | 56 |
| 3.11.1 | Prinzip ----- | 56 |
| 3.11.2 | Durchführung ----- | 56 |
| 3.12 | Immunfluoreszenz----- | 57 |
| 3.12.1 | Prinzip----- | 57 |
| 3.12.2 | Durchführung----- | 57 |
| 3.13 | Telomerlängen-Analyse (Flow FISH)----- | 58 |
| 3.13.1 | Prinzip----- | 58 |
| 3.13.2 | Aufarbeitung des Probenmaterials----- | 59 |
| 3.13.3 | Weiterverarbeitung der Proben nach „altem Flow FISH Protokoll“ -- | 59 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.13.4 | Änderungen des „Neuen Flow FISH Protokolls“ | 61 |
| 3.13.5 | Automatisierung | 63 |
| 3.13.6 | Messung | 63 |
| 3.13.7 | Auswertung | 64 |
| 3.13.8 | Plausibilitätskontrolle | 67 |
| 3.14 | Bestimmung der Telomerase-Aktivität (TRAP-Assay) | 67 |
| 3.14.1 | Prinzip | 67 |
| 3.14.2 | Aufarbeitung des Probenmaterials | 70 |
| 3.14.3 | Polymerasekettenreaktion (PCR) | 70 |
| 3.14.4 | Detektion | 71 |
| 3.14.5 | Auswertung und Interpretation der Ergebnisse | 72 |
| 3.15 | Bestimmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) | 73 |
| 3.15.1 | RNA-Isolierung | 73 |
| 3.15.2 | Bestimmung der RNA-Konzentration | 74 |
| 3.15.3 | cDNA-Synthese | 74 |
| 3.15.4 | Real-Time TaqMan [®] PCR | 75 |
| 3.16 | Bestimmung der hTERT Splice-Varianten | 79 |
| 3.16.1 | PCR | 79 |
| 3.16.3 | Agarosegel - Elektrophorese | 81 |

4. Ergebnisse-----**82**

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.1 | Telomerbiologie der pathologisch gesteigerten Hämatopoese myeloischer Leukämien | 82 |
| 4.1.1 | Chronisch Myeloische Leukämie (CML) | 82 |
| 4.1.2 | Optimierung des verwendeten Flow-FISH-Protokolls | 90 |
| 4.1.3 | <i>in vitro</i> Untersuchungen zur Interaktion zwischen BCR-ABL und Telomerase | 91 |
| 4.1.4 | Akute Myeloische Leukämie (AML) | 101 |
| 4.2 | Einfluss des Telomeraseinhibitors BIBR1532 auf die Telomerdynamik | 118 |
| 4.2.1 | Untersuchung der Zytotoxizität von BIBR1532 | 118 |
| 4.2.2 | Untersuchungen des Proliferationsverhaltens der Zell-Linien unter Behandlung mit BIBR1532 <i>in vitro</i> | 119 |
| 4.2.3 | Telomerlänge nach Behandlung mit BIBR1532 <i>in vitro</i> | 121 |
| 4.2.4 | Telomeraseaktivität unter Langzeit-Behandlung mit BIBR1532 | 130 |
| 4.2.5 | Vergleich der Kerne behandelter und unbehandelter Zellen | 131 |
| 4.2.6 | Effekt von Imatinib auf BIBR1532 behandelte Zellen | 132 |

| | |
|--|------------|
| 5. Diskussion ----- | 135 |
| 5.1 Telomerlängen-Dynamik der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) unter Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib----- | 135 |
| 5.2 Untersuchungen zum funktionellen Zusammenhang zwischen der BCR-ABL-Tyrosinkinaseaktivität und der Telomerase-Aktivität bzw. Telomerlänge <i>in vitro</i> ----- | 140 |
| 5.3 Telomerlänge und Telomerase-Aktivität als prognostischer und diagnostischer Marker myeloischer Leukämie----- | 143 |
| 5.4 Telomere und Telomerase als Angriffspunkt für pharmakologische Modulation----- | 149 |
| | |
| 6. Zusammenfassung ----- | 156 |
| | |
| 7. Literatur ----- | 160 |
| | |
| Eigene Veröffentlichungen ----- | 184 |
| | |
| Danksagung ----- | 187 |
| | |
| Liste der akademischen Lehrer ----- | 189 |
| | |
| Lebenslauf ----- | 190 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| μ | mikro- |
| μM | Mikromolar |
| A | Absorption |
| A | Ampere |
| A/C/G/T/N | Adenin/Cytosin/Guanin/Thymin/Nukleotide |
| Abb. | Abbildung |
| ALT | alternative lengthening of telomeres |
| AML | Akute Myeloische Leukämie |
| APB | Charakteristikum für Alt: Kernkörperchen-Aggregate aus PML und anderen Proteinen |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| BCR-ABL | Philadelphia-Chromosom, (t(9;22)) |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| c-ABL | physiologische Tyrosinkinase der Hämatopoese |
| cDNA | Copy DNA |
| CML | Chronisch Myeloische Leukämie |
| C _T | Threshold cycle |
| Da | Dalton |
| DAPI | 4',6'-Diamidino-2-phenylindol |
| dest. | destilliert |
| D-Loop | displacement-loop |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzym-Immunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay) |
| FAB | French American British, Klassifizierung der AML |
| FACS | Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung |
| FAM | 6-Carboxyfluoreszein |
| FCS | fötale Kälberserum |
| FET | Fluoreszenzenergietransfer |
| FISH | Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung |

| | |
|------------------|--|
| FSC | forward light scatter |
| h | Stunde |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| HPV E6 | human papillomavirus E6 |
| HSC | hämatopoetische Stammzelle |
| hTERT | katalytische Untereinheit der Telomerase (human telomerase reverse transcriptase) |
| hTR | RNA-Komponente der Telomerase (human telomerase RNA) |
| IC ₅₀ | Konzentration, führt zur 50%-igen Hemmung der Zellen |
| kd | Kilo-Dalton |
| kMESH | kilo molecules of equivalent soluble fluorochrome |
| KMT | Knochenmarkstransplantation |
| MHC | engl. major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätsantigene |
| MNC | mononukleäre Zellen |
| mRNA | Boten (messenger)-RNA |
| MW | Mittelwert |
| n | Anzahl der untersuchten Proben |
| Na-Acetat | Natriumacetat |
| OD | optische Dichte |
| p | pico- |
| PBMC | mononukleäre Zellen des peripheren Bluts |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| PD | population doubling (Verdopplung der Zellpopulation) |
| Ph+ (-) | Philadelphia positiv (negativ) |
| PML | promyelozytische Leukämie |
| PNA | peptide nucleic acid |
| pRb | Retinoblastom-Protein |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RT | Reverse Transkriptase |
| RTA | relative Telomeraseaktivität |
| s | Sekunde |

| | |
|--------|--|
| S.D. | Standardabweichung |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SSC | Natriumcitrat (sodium salt citrate) |
| SSC | side scatter |
| SV40 | Simian Virus 40 |
| SZT | Stammzelltransplantation |
| Tab. | Tabelle |
| TAMRA | 6-Carboxytetramethylrhodamin |
| Taq | Polymerase <i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TBP | Telomerbindende Proteine |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin |
| t-Loop | telomeric loop |
| TMM | telomere maintenance mechanism |
| TRAP | Telomeric Repeat Amplification Protocol |
| TRF | Telomer-Restriktionsfragment (hier: Synonym für Telomerlänge) |
| TRF1 | Telomer-bindende Proteine 1 (telomeric repeat binding factor 1) |
| TRF2 | Telomer-bindende Proteine 2 (telomeric repeat binding factor 2) |
| Tris | Tris-(Hydroxymethyl-) Aminomethan |
| U | Einheit (unit) |
| u.a. | unter anderem |
| V | Volt |
| w/V | Masse/Volumen |

1. Einleitung

1.1 Telomerbiologie

1.1.1 Telomere

1.1.1.1 Telomere – Struktur und Funktion

Der Begriff Telomer, abgeleitet vom griechischen *telos* (Ende) und *meros* (Teil), wurde bereits 1938 von Hermann J. Müller eingeführt.

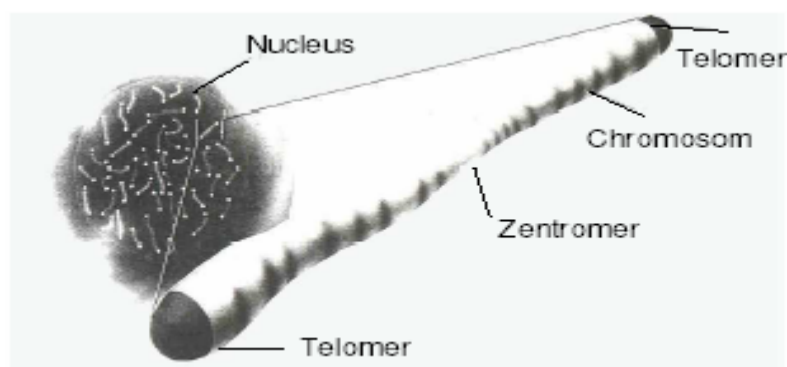


Abbildung 1 Schematische Darstellung eines Metaphasechromosoms mit Telomeren (aus „Spektrum der Wissenschaft“, April 1996)

Telomere setzen sich aus einer Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Komponente und verschiedenen Proteinen, u.a. den sogenannten „Telomer-bindenden Proteinen“ TRF1 (telomeric-repeat binding factor 1) und TRF2 zusammen (Blackburn, 1991; Smogorzewska et al., 2000; Zakian, 1995). Beide Proteine sind an den Chromosomenenden lokalisiert.

Die DNA-Komponente der Telomere des Menschen und allen anderen Wirbeltieren besteht aus 6 Basen mit der sich wiederholenden Sequenz (TTAGGG)_n (Moyzis et al., 1988). Im Gegensatz zur konservierten Nukleotid-Sequenz bestehen in der Anzahl der Wiederholungen speziesspezifische Unterschiede. Während der Mensch im Durchschnitt über wenige Tausend Wiederholungen pro Telomer verfügt, findet man z.B. bei der Maus oder der

Katze Telomerenden bis zu einem Vielfachen dieser Länge (5 – 10 fach) (Brummendorf et al., 2002; Kipling and Cooke, 1990).

Genauere Untersuchungen zeigten, dass die Telomerlänge auch innerhalb einer Art, selbst innerhalb verschiedener Gewebe und sogar von Chromosomenarm zu Chromosomenarm Unterschiede aufweist (Martens et al., 1998).

Der Telomer-Nukleoproteinkomplex leistet einen wesentlichen Beitrag zum Schutz der kodierenden Bereiche des Chromosoms. Telomere sitzen wie „Kappen“ an Chromosomenenden und schützen diese vor enzymatischer Degradation, Rekombination und Fusion (Zakian, 1995). Der Verlust der Kappenfunktion hat daher schwerwiegende Auswirkungen auf das Genom in Folge von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen (Bouffler et al., 1996).

Eine weitere wichtige Rolle der Telomere ist die strukturelle Organisation der Zellteilungsphase. Hier dienen sie als Anheftungspunkt der Chromosomen in der Kernmatrix (Tommerup et al., 1994), sind für die räumliche Anordnung von Chromosomen im Zellkern und für deren korrekten Trennung während des Zellzyklus verantwortlich.

Wie mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, bilden die Enden der Chromosomen kein stumpfes Ende, sondern spezielle Formationen aus. Das telomerbindende Protein TRF1, ein wichtiger Regulator der Telomerlänge, ist basierend auf biochemischen Untersuchungen neben TRF2 an der Ausbildung dieses sogenannten t-(telomeric)-Loops beteiligt (Abbildung 2). Dabei bildet die doppelsträngige Telomer-DNA den t-Loop, während das freie 3'-Ende der Telomere in den doppelsträngigen Telomerbereich eindringt und den D-(displacement) - Loop formiert.

Eine wichtige Funktion kommt hierbei dem Protein TRF2 zu, welches die Rückfaltung des 3' Einzelstrangs TTAGGG in die Doppelstrang-DNA und so die t-Loop-Struktur induziert (van Steensel et al., 1998).

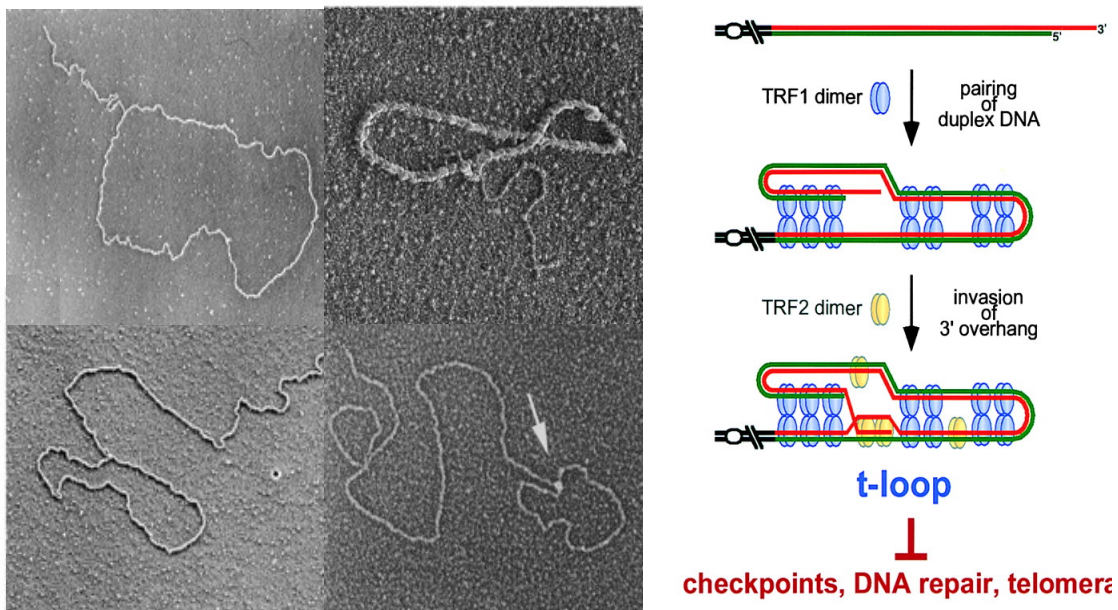


Abbildung 2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Schemazeichnung der Telomerenden und des Telomerloops (aus Griffith et al., 1999)

Auch für die Länge der Telomere spielen diese und andere telomerbindende Proteine eine Rolle.

Smogorzewska et al. (2000) erklärten die durch TRF1 und TRF2 vermittelte negative Regulation der Telomerlänge mit Hilfe der Begünstigung der geschlossenen Form des Telomers, des t-loops.

Darüber hinaus wurden zwei TRF1 beeinflussende Proteine beschrieben: *In vitro*-Untersuchungen zeigen eine modifizierende Wirkung des Enzyms Tankyrase (TRF1-interacting, ANKYrin-related ADP-ribose polymerase) auf TRF1. Tankyrase hebt die Bindung von TRF1 an die Telomer-DNA auf, so dass die Telomer-DNA für das Enzym Telomerase zugänglich wird (Zhu et al., 1999; Smith et al., 1998). Im Gegensatz dazu wird die Bindung von TRF1 an die Telomere durch TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2) vermittelt (Kim et al., 1999). Neben den TRF1 bindenden Proteinen wurde hRap1 (TRF2-interacting telomeric protein Rap1), als TRF2 bindendes Protein beschrieben (Li et al., 2000a).

Verschiedene Arbeitsgruppen identifizierten außerdem einen Zusammenhang zwischen dem Protein Ku86, eine Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase und den Telomeren. So führt fehlendes Ku86 zu einem verstärkten Auftreten von Chromosomenfusionen (Espejel et al., 2002; Samper et al., 2000).

1.1.1.2 Telomere und das Endreplikationsproblem

Die Erklärung für die Heterogenität der Telomerlänge ergibt sich aus der Natur der DNA-Replikation. Durch die 5' → 3' Leserichtung der DNA-Polymerase, kann eine kontinuierliche Replikation, ausgehend von einem RNA-Primer, nur für einen DNA-Strang erfolgen. Der zweite Strang wird diskontinuierlich repliziert. Nach Aufwinden der Doppelhelix durch das Enzym Helicase binden, im Unterschied zum kontinuierlich replizierten Leitstrang („leading strand“), mehrere kurze RNA-Stücke als Primer an diesen Strang („lagging strand“). An deren freien 3'OH-Enden beginnt die DNA-Polymerase α mit der Synthese der sogenannten Okazaki-Fragmente. Nach enzymatischem Entfernen der RNA-Primer können die entstehenden Lücken von der DNA-Polymerase δ geschlossen werden – mit Ausnahme des äußersten 5'-Endes des „lagging strands“ (Harley et al., 1990), welcher unrepliziert bleibt.

Diese inkomplette Replikation, das sogenannte „Endreplikations-Problem“, wurde bereits von Olovnikov (1973) und Watson (1972) erkannt und führt bei jeder Zellteilung zu einer Verkürzung der Telomer-DNA der Tochterzelle gegenüber der Mutterzelle.

Hier zeigt sich die Funktion der nicht kodierenden Telomer-DNA als Pufferzone zwischen Telomerende und kodierenden Nukleotidsequenzen. Der Verlust an Telomersequenz in somatischen Zellen beläuft sich dabei auf 50 bis 200 Basenpaare (bp) pro Zellteilung (Levy et al., 1992).

Bereits 1961 konnten Hayflick und Moorhead zeigen, dass somatische Zellen sich in Kultur nur für eine begrenzte Zeit teilen können, bevor sie in eine Art Ruhezustand, die sogenannte „Seneszenz“, übergehen (Hayflick, 1965).

Dabei wird beim replikativen Altern die Lebensspanne der Zellen durch die Anzahl der, während der Expansionszeit in Kultur, durchlaufenen Zellteilungen bis zum Erreichen des sogenannten „Hayflick-Limit“ bestimmt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass sich primäre, humane Zellen, in Abhängigkeit vom Zelltyp, ca. 50- bis 80-fach teilen können, bevor sie in die Seneszenz übergehen. Diese

Zellen leben zwar weiter und sind auch stoffwechselaktiv, doch haben sie die Fähigkeit verloren sich weiter zu teilen. Seneszenz ist also nicht gleichbedeutend mit Zelltod, sondern bedeutet vielmehr eine Art postmitotisches Ruhestadium. Das Hayflick-Limit stellt somit einen wichtigen Kontrollpunkt im Zellzyklus dar, welcher die Zelle vor Hyperproliferation im Rahmen einer malignen Entartung schützt (Schmitt, 2003). Verbunden ist das Erreichen des Hayflick-Limits mit einer kritischen Telomerlänge von ca. 5-7 kb.

Basierend auf diesen Arbeiten formulierte Calvin Harley das „Modell der mitotischen Uhr“ somatischer Zellen, demzufolge die Telomerlänge Rückschlüsse auf die replikative Vergangenheit der Zelle *in vitro* und *in vivo* zulässt (Harley et al., 1990) (Abbildung 3).

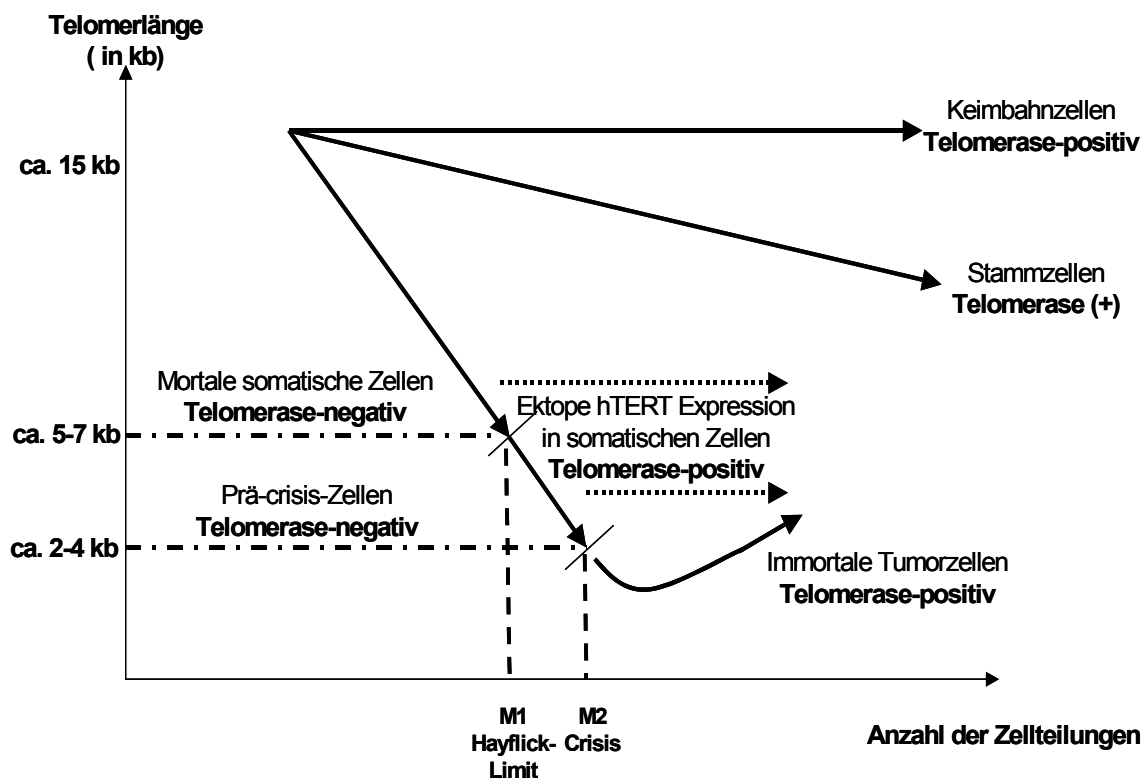


Abbildung 3 Telomerhypothese der zellulären Alterung und Immortalisierung (aus: Hartmann U. und Brümmendorf T.H.; *Arzneimitteltherapie* (2003) 6:176-185; modifiziert nach Harley, *Exp. Geront.* 1992)

Die scheinbar unbegrenzte Proliferationsfähigkeit von Tumorzellen ist mit der, aus dem Hayflick-Limit resultierenden, eingeschränkten Proliferationsfähigkeit somatischer Zellen nicht zu vereinbaren. Demzufolge verfügen Tumorzellen offensichtlich über Mechanismen, die es ihnen ermöglichen, das Hayflick-Limit zu überwinden.

Gegenwärtige Modelle beschreiben den Weg zur Unsterblichkeit der Zellen, der Immortalisierung, als einen zweistufigen Prozess (Abbildung 3). *In vitro* können Zellen das als „Mortalitätsstadium 1“ (M1) bezeichnete Hayflick-Limit durch Transformation mit viralen Onkogenen (z.B. „simian virus“ SV 40 T, „human papilloma virus“ HPV E6) überwinden, indem diese vermutlich Zellwachstum kontrollierende Gene [wie die Tumorsuppressorgene p53 und das Retinoblastom (RB)-Gen] ausschalten. Daraus resultiert eine, gegenüber dem Hayflick-Limit, verlängerte Zeit der Proliferationsfähigkeit und damit eine weitere Verkürzung der Telomere, was infolge zunehmender genetischer Instabilität zur Akkumulation von chromosomalen Schäden führt.

Der multifunktionale Transkriptionsfaktor p53 scheint eine wichtige Rolle in der Überwindung dieses, beim Erreichen des Hayflick-Limit ausgelösten Signals der Zellzyklusblockade zu spielen. Eine Aktivierung von p53 wird u.a. durch die oben genannten DNA-Schäden (vor allem Doppelstrangbrüche) ausgelöst und stimuliert die Transkription zellzyklusregulierender Gene (von Zglinicki et al., 1995). In den meisten Fällen sterben viele dieser post-seneszenten Zellen aufgrund der erfolgten Schädigungen ab (Olovnikov, 1973). Im Gegensatz zur Seneszenz handelt es sich hierbei um einen Zustand, der mit beträchtlicher Instabilität der Chromosomenstruktur und nachfolgendem Zelltod – vermutlich durch Apoptose – einhergeht. Nur einigen wenigen Zellklonen gelingt es, dieses im Englischen recht treffend als „crisis“ bezeichnete, „Mortalitätsstadium 2“ (M2) zu überwinden.

Diese Zellen haben offensichtlich durch bestimmte genetische Veränderungen die Fähigkeit zu unbegrenztem Zellwachstum erworben (Chiu and Harley, 1997). Die Suche nach dem Schlüssel zur Immortalität führte dabei zu dem Enzym Telomerase (de Lange, 1995; Greider, 1996; Morin, 1989)

1.1.2 Telomerase

1.1.2.1 Telomerase – Struktur

Anfang der 80er Jahre gab es erste experimentelle Hinweise auf ein Enzym, welches dem replikationsabhängigen Verlust der Telomer-„repeats“ entgegenwirken kann. Wie auch schon bei der Entschlüsselung der Telomer-DNA konnte dieses als Telomerterminal-Transferase bzw. Telomerase bezeichnete Enzym zuerst in Wimperntierchen (*Tetrahymena thermophila*) nachgewiesen werden (Greider, 1996). 1989 entdeckte Morin erstmals Telomeraseaktivität in einer humanen Tumorzell-Linie (Morin, 1989). Telomerase stellt einen Ribonukleoproteinkomplex dar, der aus einer RNA-Komponente, einer katalytischen Untereinheit und mehreren assoziierten Proteinen besteht. Trotz intensiver Forschung ist es bis heute noch nicht gelungen, die Struktur der humanen Telomerase, einem ca. 1000 kDa großen Moleküls, vollständig aufzuklären.

Bekannt ist bisher die Zusammensetzung aus einer 560 bp langen RNA-Matrize (hTR, human telomerase RNA) (Feng et al., 1995) und einer reversen Transkriptase, welche als katalytische Untereinheit des Enzyms fungiert (hTERT, human telomerase reverse transcriptase) (Counter et al., 1998) (Abbildung 4).

Die RNA-Komponente (5'-CUAACCCUAAC)_n der humanen Telomerase besitzt dabei einen Abschnitt, komplementär zur humanen Telomerasequenz (TTAGGG)_n.

Das über 35 kb große hTERT-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5 (5p15.33), ca. 2 Mb vom Telomer entfernt lokalisiert und besteht aus 16 Exons und 15 Introns (Cong et al., 1999; Wick et al., 1999). Das daraus resultierende, aus 1132 Aminosäuren bestehende, 127 kDa große hTERT-Protein enthält die konservierten Motive 1, 2 und A bis E bekannter reverser Transkriptasen (RT). Zusätzlich zu diesen RT-Domänen ist das hTERT-Protein durch spezifische Telomerase-Domänen, die T-Domänen gekennzeichnet (Meyerson et al., 1997). Diese T-Domänen scheinen bei der Bindung der RNA-Komponente hTR an die katalytische Untereinheit hTERT eine wichtige Rolle zu spielen (Lai et al., 2001) und befinden sich auf einem anderen Exon als die RT-Motive.

Im Gegensatz zu hTERT (Ducrest et al., 2002), dessen Expression vor allem in Keimbahnzellen und malignen Tumoren gefunden wird, scheint hTR in allen

bisher untersuchten Geweben ubiquitär exprimiert zu werden (Feng et al., 1995).

Des Weiteren wurden telomerasebindende Proteine (Abbildung 4), wie das TP1 (telomerase associated protein) des Telomerase-Komplexes identifiziert, dessen Anwesenheit für die Telomeraseaktivität *in vitro* jedoch nicht zwingend erforderlich zu sein scheint (Beattie et al., 1998; Harrington et al., 1997). Im Gegensatz dazu wurden den Proteinen p23 und hsp90 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine essentielle Funktion für die Telomeraseaktivität zugeschrieben (Holt et al., 1999). Ein weiteres Protein, das Dyskerin, ist ebenfalls in der Lage sowohl Aufbau als auch Aktivität des Enzyms zu modulieren (Mitchell et al., 1999).

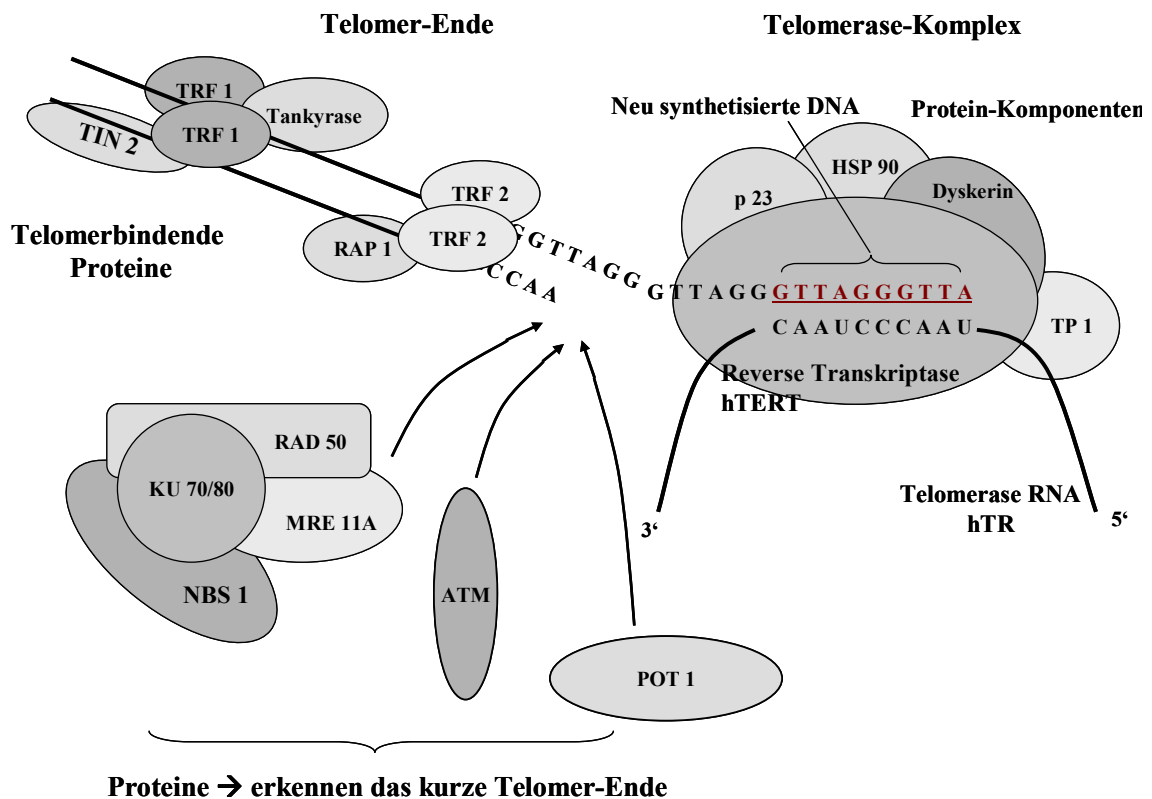


Abbildung 4 Telomere, Telomerase und Proteine, die deren Funktion modulieren (aus: Hartmann U. und Brümmendorf T.H.; Arzneimitteltherapie (2003) 6:176-185; modifiziert nach Keith et al. Expert Reviews, 2002)

1.1.2.2 Telomerase – Molekulare Regulationsmechanismen

Ein detailliertes Verständnis der komplexen und dynamischen Mechanismen zur Regulation der Telomeraseaktivität ist Voraussetzung für die Entwicklung klinisch-therapeutischer Anwendungen. Viele Forschungsarbeiten fokussieren sich dabei auf die transkriptionelle Regulation der katalytischen Komponente der Telomerase, der hTERT. Trotz vielfacher Bemühungen wurde der genaue molekulare Mechanismus der Telomeraseaktivierung bisher nur zum Teil aufgedeckt. Untersucht wurden hierbei neben der Regulation der hTERT-Transkription die posttranslationale Modifikation der hTERT, der Transport zum Kern, die Struktur des Telomerase Holoenzym, sowie die Bindungsstellen der Telomerase am Telomer.

Regulation der hTERT Gen-Expression

Die Transkription der enzymatischen Untereinheit hTERT scheint der entscheidende Schritt für die Aktivierung der Telomerase zu sein. Während die RNA-Komponente hTR (Feng et al., 1995) ubiquitär exprimiert wird, ist die hTERT-Expression in telomerasenegativen Geweben nicht vorhanden (Ducrest et al., 2002). Des Weiteren korreliert die Expression der hTERT mRNA, im Gegensatz zu hTR, mit der Telomeraseaktivität (Ducrest et al., 2001), was ebenfalls auf eine transkriptionelle Regulation der hTERT-Aktivität hinweist.

Mittels Sequenz-Analysen des hTERT-Promotors wurden mehrere GC-reiche Regionen identifiziert, welche um den Translations-Start (ATG) ausgedehnte CpG-Inseln bilden. Es ist bekannt, dass die Methylierung der CpG-Inseln eines Gens eine wichtige Rolle bei der Regulation von Differenzierung, Seneszenz und Tumorentwicklung spielt (Merlo et al., 1995; Deng et al., 1999). Die Lage des hTERT-Promotors zwischen diesen CpG-Inseln lässt demnach auf eine transkriptionelle Regulation des hTERT-Gens durch Methylierung schließen.

Unterstützt wird diese Annahme durch die Fähigkeit verschiedener Onkogene, hTERT direkt zu induzieren. Der hTERT-Promotor enthält Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren (Cong et al., 1999). Die Anzahl dieser potentiellen Bindungsstellen deuten auf eine Regulation der hTERT-Expression auf mehreren Kontrollebenen hin. Von c-Myc (Wang et al., 1998) oder auch dem humanen Papillomavirus 16 E6 Protein (Veldman et al., 2001), ist eine Beteiligung an der Aktivierung der hTERT-Transkription bekannt. Darüber hinaus ist auch Estrogen in der Lage über direkte (estrogenresponsible

Elemente des hTERT-Promotors) aber auch indirekte (c-Myc-Aktivierung) Effekte Telomerase zu aktivieren (Kyo et al., 1999).

Daneben sind auch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel Mad1 (Gunes et al., 2000) oder p53 (Xu et al., 2000) als negative Regulatoren der hTERT bekannt.

Ferner wird angenommen, dass die fehlende Telomeraseaktivität der meisten somatischen Zellen auf die transkriptionelle Hemmung des hTERT-Gens zurückzuführen ist. Im Einklang mit dieser Hypothese, führt die Fusion normaler somatischer Zellen mit einigen telomerase-positiven Zellen zur Telomerasehemmung (Ishii et al., 1999). Des Weiteren kann die hTERT-Expression und auch die Telomeraseaktivität von Tumorzellen durch den Transfer spezifischer humaner Chromosomen gehemmt werden (Oshimura and Barrett, 1997). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen findet man auf verschiedenen Chromosomen potentielle transkriptionelle Hemmer der hTERT. Untersuchungen zeigen, dass der Transfer von Chromosom 3 (Tanaka et al., 1998) und auch Chromosom 10 (Nishimoto et al., 2001) in der Lage ist die Expression von hTERT zu hemmen.

Regulation durch Splicing-Varianten

Eine weitere Möglichkeit die Aktivität der Telomerase zu regulieren bietet auf transkriptioneller Ebene alternatives Spleißen der hTERT mRNA, welches zu Proteinen unterschiedlicher Größe führt. Einige Gruppen beschrieben unterschiedliche Splicing-Varianten der hTERT mRNA, nicht nur während der embryonalen Entwicklung (Kilian et al., 1997; Ulaner et al., 1998) sondern auch im normalem Gewebe (Ulaner et al., 1998) und in Tumoren (Krams et al., 2001). Diese Splicing-Varianten unterscheiden sich dabei in ihrer Fähigkeit, aktive Telomerase zu generieren. Ergebnisse aus *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zeigten, dass nur Transkripte der vollen Länge in der Lage sind funktionsfähige Telomerase zu bilden. Neben diesen „full-length“-Transkripten ($+\alpha+\beta$) wurden bisher sieben weitere Splicing-Varianten beschrieben (Yi et al., 2001). Das hTERT Gen besitzt vier Insertions-Stellen und zwei Deletions-Stellen (Abbildung 5 und 6), was eine Fülle an Kombinations-Möglichkeiten bietet. Alle Insertionen führen durch die Unterbrechung der RT Domäne zu nicht funktionsfähigen Proteinen. Die α -Deletion (36 bp) beinhaltet eine Deletion im Reversen Transkriptase (RT) Motif A (Kilian et al., 1997; Wick et al., 1999) und führt ebenfalls zu nicht funktionsfähigen Proteinen. Interessanterweise wurde diese $-\alpha$ -Variante durch

in vitro Untersuchungen außerdem als dominant-negativer Repressor der Telomeraseaktivität identifiziert (Colgin et al., 2000; Yi et al., 2000). Die β -Deletion (182 bp) führt auf Grund ihrer Lage vor dem essentiellen RT Motif B zum vorzeitigen Abbruch der Translation. Die Proteine der daraus resultierenden Splicing-Varianten ($-\beta$ and $-\alpha-\beta$) besitzen deshalb keine katalytische Aktivität. Die Entdeckung verschiedener Splicing-Varianten in Proben mit wenig oder keiner Telomeraseaktivität zeigen darüber hinaus, dass die Transkription der hTERT mRNA nicht notwendigerweise zu funktionsfähigen „full-length“ Transkripten führt.

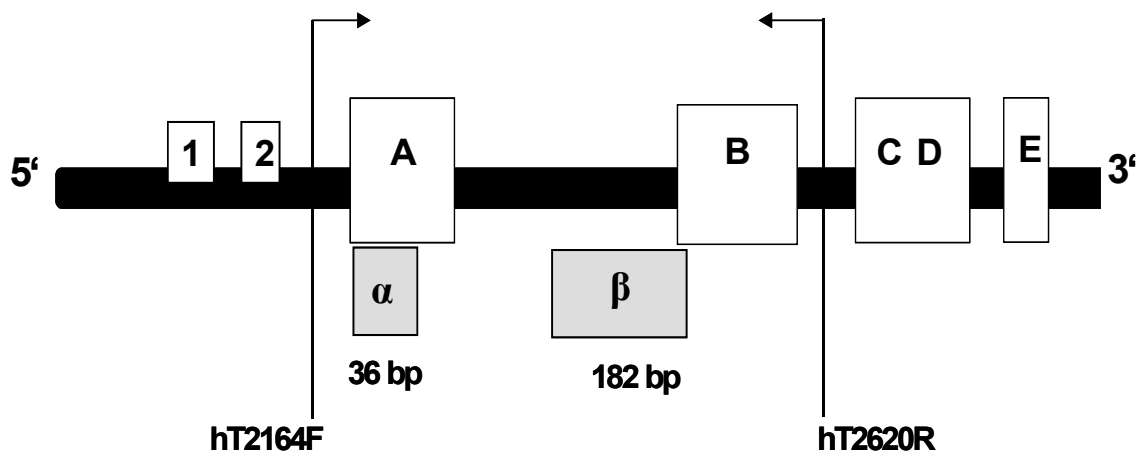


Abbildung 5 Aufbau des hTERT Gens mit den RT Motifs (1, 2 und A – E) und den alternativen Splicing-Stellen. (Deletion α und β), flankiert von den verwendeten Primern hT2164F und hT2620R. Die Insertions-Stellen 1 – 4 sind nicht dargestellt.

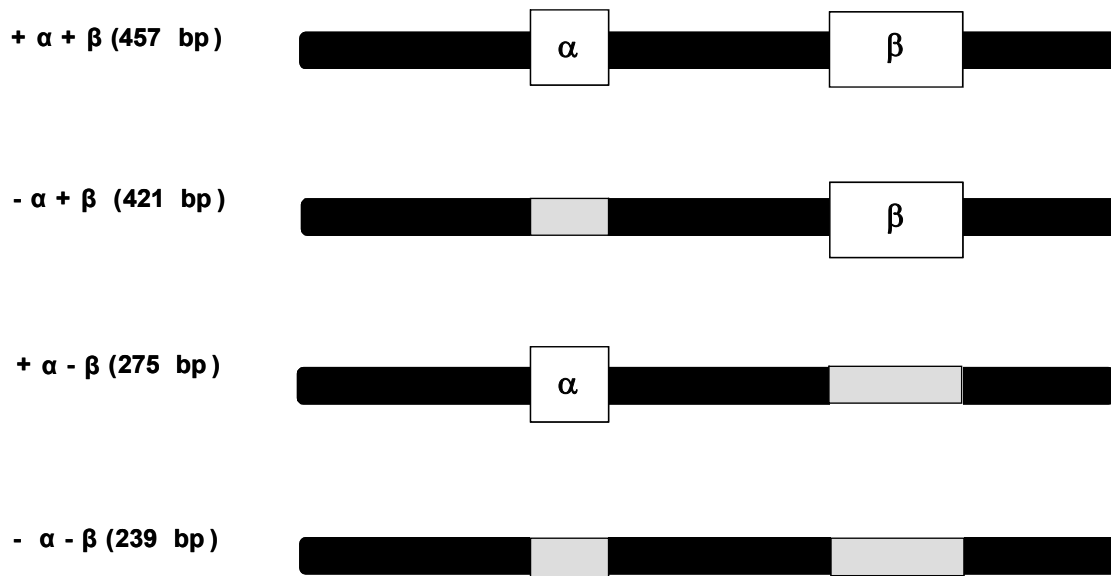


Abbildung 6 Darstellung der unterschiedlichen Splicing-Varianten der hTERT mRNA. Nur das „full-length“ Transkript (+ α + β) führt zu einem funktionsfähigen Protein und damit zur aktiven Telomerase.

Regulation durch posttranslationale Modifikation

Die transkriptionelle Regulation von hTERT ist zweifellos der grundlegende Mechanismus zur Kontrolle der Telomeraseaktivität. Dennoch weisen Untersuchungen auf posttranslationale Modifikationen als zusätzliche Regulations-mechanismen der Telomeraseaktivität hin. Untersuchungen an ovarialem Gewebe sowie an Uterus-Leiomyom-Zellen fanden trotz hTR- und hTERT-Expression keine nachweisbare Telomeraseaktivität (Ulaner et al., 2000). Darüber hinaus kann die Telomeraseaktivität in Lymphozyten, peripheren B- und T-Zellen, sowie in Tonsillen ungeachtet der einheitlichen hTERT-Expression stark variieren (Liu et al., 1999), während in einigen Zellarten die hTERT mRNA Expression nicht ausreicht um Telomerase überhaupt aktivieren zu können. Die posttranslationale Modifikation von hTERT spielt demzufolge eine wichtige Rolle in der Modifikation des aktiven sowie inaktiven Zustands der Telomerase.

Reversible Phosphorylierung stellt einen der wichtigsten Mechanismen zur Regulation von Struktur, Lokalisation und Aktivität von Proteinen dar. Einige Studien weisen auf die Beteiligung unterschiedlicher Proteinkinase C (PKC)

Isoformen an der Regulierung der Telomeraseaktivität verschiedener Zellarten hin (Ku et al., 1997; Li et al., 1997). Bekannt ist darüber hinaus sowohl die Steigerung der Telomeraseaktivität durch Aktivatoren der PKC als auch deren Hemmung durch PKC-Inhibitoren (Bodnar et al., 1996). Untersuchungen dieser Art zeigen, dass die Telomerase auf Proteinebene mittels Phosphorylierung reguliert werden kann.

Neben der PKC ist auch die Proteinkinase B (PKB oder auch Akt Kinase genannt) in der Lage die enzymatische Untereinheit hTERT zu phosphorylieren und damit die Telomeraseaktivität zu stimulieren (Kang et al., 1999). Durch die Schlüsselposition der Akt Kinase im Phosphatidylinositol 3 (PI3) - Signalweg bietet diese Beobachtung zudem neue Erkenntnisse über welche molekularen Mechanismen der PI3-Signalweges Zellwachstum und -überleben fördern und damit Einfluss auf das Wachstum maligner Zellen nehmen kann (Lawlor and Alessi, 2001).

Neuere Studien beschreiben die Fähigkeit der Tyrosinkinase c-abl hTERT *in vitro* und *in vivo* zu binden und zu phosphorylieren. Im Vergleich zu PKC und der Akt Kinase hemmt die Phosphorylierung von hTERT durch c-Abl die Telomeraseaktivität. Interessanterweise führte die Expression von c-Abl in hTERT positiven Zellen nicht nur zu einer Herunter-Regulation der Telomeraseaktivität sondern auch zu signifikant kürzeren Telomeren gegenüber c-Abl^{-/-} Zellen (Kharbanda et al., 2000). Darüber hinaus führt die Behandlung der Zellen mit ionisierender Bestrahlung über einen c-Abl-abhängigen Mechanismus zur hTERT-Phosphorylierung. Unter Berücksichtigung der Assoziation zwischen c-Abl und einem DNA-abhängigen Protein-Kinase-Komplex (Kharbanda et al., 1997), beteiligt an DNA-Reparatur, Zellzyklus-Arrest und pro-apoptotischen Aktivitäten, stellt die funktionelle Interaktion zwischen c-Abl und hTERT einen engen Zusammenhang zwischen DNA-Schäden, ihrer Reparatursysteme und der Erhaltung von Telomeren dar.

Ein weiterer interessanter Mechanismus, bei welchem hTERT-Phosphorylierung die Telomeraseaktivität reguliert, zeigt sich bei der Aktivierung von T-Lymphozyten (Liu et al., 1999). Während unstimulierte Lymphozyten bei nachweisbaren hTERT-Leveln keine Telomeraseaktivität zeigen, findet man in stimulierten Lymphozyten mit unwesentlich höheren hTERT-Spiegeln eine dramatische Steigerung der hTERT-Phosphorylierung sowie der Telomeraseaktivität. Diese Änderungen korrelieren außerdem mit unterschiedlicher subzellulärer Verteilung von hTERT. Unphosphorylierte, inaktive hTERT scheint sich zytoplasmatisch anzureichern, während

phosphorylierte, aktive hTERT in den Kern wandert und zur die Aktivierung der Telomerase führt (Liu et al., 2001).

1.1.2.3 Telomerase – Lösung des Endreplikationsproblems

Die Synthese neuer Telomer-Repeats erfolgt vermutlich bereits vor Beginn der Replikation (Feist et al., 1998). Dabei nutzt die Telomerase einen Teil ihrer RNA-Komponente hTR für die Bindung an das überhängende G-reiche Telomerende, während der andere Teil als Matrize für die Reverse Transkriptase hTERT dient, welche die DNA-Neusynthese übernimmt (Morin, 1989).

Die Verlängerung der Telomere erfolgt dabei in insgesamt 3 Schritten: Nach der Bindung des Telomerase-Enzymkomplexes an das freie 3'-Ende der chromosomale DNA (Alignment) werden die Telomer-Repeats (TTAGGG) synthetisiert (Elongation). Danach rückt der Enzymkomplex weiter (Translokation), wodurch eine neue Runde der Telomersynthese eingeleitet wird.

Eine wichtige Kontrollinstanz der Elongation scheint dabei das telomerbindende Protein TRF1 zu sein. Wird TRF1 in einer Tumorzell-Linie überexprimiert, erfolgt eine kontinuierliche Verkürzung der Telomere. Mutiertes TRF1, welches nicht mehr zur Telomerbindung fähig ist, führte dagegen zur unkontrollierten Telomerverlängerung (Smogorzewska et al., 2000; van Steensel and de Lange, 1997). Obwohl keine nachweisbare Beeinflussung der Expression und der generellen Aktivität der Telomerase durch TRF1 nachgewiesen werden konnte, wirkt TRF1 als negativer Regulator der Telomerlänge an individuellen Telomeren. Während TRF1 entlang des gesamten Telomers bindet, greift die Telomerase an den Telomerenden an. Dabei kann die Zugänglichkeit des DNA-Endes für die Telomerase durch die Nähe des TRF1 zum Telomer-Terminus (dem freie 3'-Ende des Telomers) vermindern sein. Eine alternative Erklärung ist die Ausbildung der t-Loopstruktur, welche die Bindung der Telomerase, verhindern kann. Ein weiteres Sequenz-spezifisches telomerbindendes Protein, TRF2 (van Steensel et al., 1998) ist für die Ausbildung der sogenannten t-loops, und damit für den Schutz der freien Telomerenden mitverantwortlich (Griffith et al., 1999). Der Verlust an TRF2 führt zur chromosomalen Veränderungen und zum Zellzyklus-Arrest (van Steensel et al., 1998). Bei der Überexpression von TRF2 dagegen, wird der Zeitpunkt bis zum Eintreten der zellulären Seneszenz *in vitro* über eine Reduktion der kritischen Telomerlängenschwelle verzögert (Karlseder et al., 2002).

1.1.2.4 Telomeraseunabhängige Verlängerung der Telomere

Einige Untersuchungen zeigten, dass der Mechanismus der Telomere-Regulation vermutlich komplexer ist, als ursprünglich vermutet. Während 90% der Tumoren telomerasepositiv sind, stabilisieren / verlängern die restlichen 10% ihre Telomere auf andere Art und Weise. Es muss also von einem weiteren Mechanismus der Telomerverlängerung ausgegangen werden. Dieser weitere, telomerase-unabhängige Mechanismus wurde erstmalig 1995 von Reddel et al. beschrieben (Reddel, 2003; Bryan et al., 1995) und als „ALT (alternative lengthening of telomeres) pathway“ oder „ASP-pathway“ (alternative senescence pathway) bezeichnet. Untersuchungen an immortalen Zellen ohne Telomeraseaktivität, hatten untereinander ein sehr ähnliches und typisches Muster an TRFs (terminal restriction fragments) gezeigt. Mit einer TRF-Länge von ca. 20-25 kb unterscheiden sie sich deutlich von den telomerasepositiven Zellen, welche zwar stabile, aber kürzere TRFs aufweisen. ALT ist also ebenfalls in der Lage die Telomerlänge zu erhalten und unter bestimmten Umständen zu verlängern. Ferner konnte in Hefen nachgewiesen werden, dass blanke, d.h. telomer-freie Chromosomenenden durch Rekombination über einen RAD52-induzierten Prozess zu zusätzlichen Telomer-repeats gelangen können (Wu et al., 2003).

Neueste Untersuchungen zur Hypermethylierung der hTR und hTERT-Promotoren zeigten eine hohe Methylierungsfrequenz in den untersuchten ALT Zelllinien (Hoare et al., 2001). Diese Hypermethylierung kann den Verlust der Telomeraseaktivität nach sich ziehen oder Verlust der Telomeraseaktivität führt sekundär zur Hypermethylierung der Promotoren. Weitere Arbeiten beschrieben in Interphasekernen von ALT Zelllinien, jedoch nicht in telomerasepositiven immortalen oder telomerasenegativen mortalen Zellen, sogenannte „promyelocytic leukemia bodies“ – PML-Körper, deren Funktion noch unbekannt ist. Die ALT-assoziierten PML-Körper enthielten ein PML-Protein, Telomer-DNA und telomerbindende Proteine, wie TRF1 und TRF2, sowie Proteine, die bei der DNA-Synthese und Rekombination beteiligt sind (Yeager et al., 1999). Kass-Eisler und Greider vermuteten, dass ähnlich wie in der Hefe alle TMM – „telomere maintenance mechanism“ – zusammen auftreten, jedoch die Telomerase der dominierende Weg zur Erhaltung der Telomere ist. Unter bestimmten Umständen kommt es dann zur Selektion des einen oder anderen Mechanismus (Kass-Eisler and Greider, 2000). Dem ALT Mechanismus scheint nach gegenwärtigem Stand der Forschung bei Säugetieren allerdings gegenüber der Telomerase eine weitaus geringere Bedeutung zuzukommen.

1.1.2.5 Telomerase und ihre Bedeutung

Im Gegensatz zu Tumorzellen kann in somatischen Zellen, vermutlich durch mangelnde Telomeraseaktivität dieser Zellen, eine kontinuierliche Telomerverkürzung *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden. In periphere Blutleukozyten und hämatopoetischen Stammzellen dagegen konnten einige Arbeitsgruppen in einem geringen Ausmaß Telomeraseaktivität nachweisen (ca. 10% des Expressionsniveaus von Tumorzellen) (Broccoli et al., 1995; Hiyama et al., 1995b; Yui et al., 1998). Vermutlich ist die geringe Expression nicht ausreichend, um dem stetigen Telomerverlust entgegenzuwirken. Bei Zellen, für welche eine Stabilisierung der Telomerlänge über Generationen hinweg essentiell ist, wie zum Beispiel Keimbahnzellen, findet sich dagegen eine hohe Expression des Enzyms (Wright et al., 1996).

Untersuchungen an Mäusen, deren RNA-Komponente der Telomerase homozygot deletiert wurde ($mTR^{-/-}$ = mice deficient for the mouse telomerase RNA bzw. „telomerase knock out Mäuse“) verdeutlichen die Bedeutung der Telomerase für den Erhalt der Telomere (Blasco et al., 1997). Homozygote „knock-out Mäuse“ zeigen eine kontinuierliche Telomerverkürzung, bis es schließlich zum völligen Verschwinden der TTAGGG-Wiederholungen kommt. Darüber hinaus wurde mit steigender Generationenzahl eine Zunahme an End-zu-End Fusionen, den sogenannten „telomeric associations“ (TA`s) beobachtet. Da in Mäusen alle Chromosomen akrozentrisch vorliegen, entstehen durch die Fusion der Telomere kurzer Chromosomenarme vorwiegend die sogenannten Robertson-ähnliche Fusionen („Robertsonian-fusion-like configurations“) sowie durch Fusion der langen Chromosomenarme sogenannte „dicentric chromosomes“ (Hande et al., 1999).

Trotz der stetigen Abnahme an Telomerlänge bleiben die $mTR^{-/-}$ Mäuse bis in die sechste Nachfolge-Generation zeugungsfähig. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Mäuse jedoch zunehmend Defekte der Spermatogenese bis hin zur Infertilität, sowie neben Milzatrophen auch Störungen der Wundheilung, Immundefizienzen (insbesondere Defekte der B-lymphozytären Reihe) und eine Reduktion der Knochenmarkreserve. Gegenüber den Kontrolltieren war außerdem eine deutlich erhöhte Tumorzinzidenz und gesteigerte Apoptoseraten innerhalb des hämatopoetischen Systems nachweisbar (Blasco et al., 1997; Lee et al., 1998; Rudolph et al., 1999).

Auf der anderen Seite konnten Bodnar et al. sowie andere Arbeitsgruppen zeigen, dass die Expression der Telomerase in ansonsten telomerasenegativen humanen retinalen Epithelzellen und Fibroblasten zu einer Teilung der Zellen

weit über das Hayflick-Limit hinaus führt. Diese Zellen können somit als immortalisiert betrachtet werden (Bodnar et al., 1998; Vaziri and Benchimol, 1998), womit die „Telomerhypothese der zellulären Alterung“ (Harley et al., 1992) nach Harley für somatische, telomerasenegative Zellen als bewiesen gelten kann.

Während Epithelzellen, welche durch Transfektion mit hTERT immortalisiert werden, gegenüber den Kontrollzellen keine Anzeichen einer malignen Transformation aufweisen (Morales et al., 1999; Vaziri et al., 1999), schreiben andere Untersuchungen der Telomerase allein ein telomerlängen-unabhängiges onkogenes Potential zu (Stewart et al., 2002).

Des Weiteren führt die gemeinsame Expression von hTERT mit den H-ras und SV40-large T Onkoproteinen in primären Epithelzellen nicht nur zur Immortalisierung, sondern auch zur malignen Transformation der Zellen (Hahn et al., 1999a).

Wird andererseits die Telomerase ursprünglich telomerasepositiver immortaler Zellen inhibiert, so erreichen diese nach einer definierten Anzahl von Zellteilungen das Stadium der Seneszenz. Die Zeitspanne bis zum Erreichen der Seneszenz korreliert dabei mit der Telomerlänge der Zellen vor der Mutation, was bedeutet, dass die Telomerreserve der Zellen vor dem Abschalten der Telomerase die Anzahl der noch möglichen Zellteilungen limitiert (Herbert et al., 1999).

1.1.2.6 Telomerase als diagnostischer und prognostischer Marker

In den letzten Jahren wurden die meisten malignen Tumorarten des Menschen auf ihre Telomeraseaktivität untersucht. Dabei zeigt sich in der überwiegenden Mehrzahl der Tumoren eine hohe Enzymaktivität, während im Vergleich dazu im umliegenden Normalgewebe keine nachweisbare Aktivität gefunden werden konnte (Shay, 1997). 90% aller untersuchten malignen Tumoren zeigen, wie oben schon angesprochen, deutliche Telomeraseaktivität (Schwartz et al., 1995; Langford et al., 1995).

Für die klinische Onkologie könnte hier eine Verwendung der Telomerase als molekularer, mit der Proliferationsaktivität assoziierter prognostischer und diagnostischer Marker maligner Erkrankungen liegen. Um die Telomeraseaktivität in unterschiedlichem Probenmaterial bestimmen zu können wurden sensitive, sog. PCR-basierte TRAP-Assays entwickelt.

Dabei ist unklar, in wie weit diese Methode geeignet ist, um in Routinemessungen angewendet werden zu können.

Hiyama et al. (2000) berichteten in einer prospektiven Studie von einer Verbesserung der Brustkrebsdiagnostik durch die Bestimmung der Telomeraseaktivität in Feinnadelpunktionen mit einer Steigerung der Genauigkeit gegenüber der konventionellen zytologischen Diagnose von 70% auf 86%. Auch Untersuchungen an Zellen aus Blasenspülungen versprechen eine Verbesserung der Diagnostik und des Monitorings des Blasenkarzinoms (Dalbagni et al., 1997).

Trotzdem bleiben bei der Verwendung der Telomerase in der Diagnostik noch die Fragen nach Grenzwerten für Spezifität, Sensivität und Genauigkeit des Assays zu beantworten, bevor ein solcher Assay in die Routinediagnostik übernommen werden kann.

In vielen Studien wird versucht die Telomeraseaktivität mit dem klinischen Verlauf verschiedener Tumorentitäten zu korrelieren. Hiyama et al. (Hiyama et al., 1995a) konnte beim Neuroblastom eine Korrelation zwischen der Aggressivität des Tumors und der Telomeraseaktivität zeigen. Auch für andere Tumorarten, wie beim Magenkarzinom (Kakeji et al., 2001) oder der chronischen und akuten Leukämien (Ohyashiki et al., 1997a; Ohyashiki et al., 1997b) konnten Korrelationen zwischen der Telomeraseaktivität und dem Verlauf der Erkrankung festgestellt werden.

1.2 Messung der Telomerlänge

1.2.1 Southern Blot

Die Telomerlängen-Messung humaner Zellen basierte bis vor einigen Jahren auf dem Southern Blot (Oexle, 1998). Hierbei erhält man nach dem Restriktionsverdau der DNA Telomerfragmente (TRF = telomere/terminal restriction fragment), welche mittels Elektrophorese nach Größe getrennt, geblottet und anschließend mit einer telomerspezifischen Sonde hybridisiert werden. In Folge der inter- und intrazellulären Heterogenität der Telomere verteilen sich die TRFs als „Schmier“ auf der Membran.

Obwohl der Southern Blot eine häufig verwendete Methode zur Telomerlängen-Messung ist, besitzt sie verschiedene Nachteile. Zum einen ist es nicht möglich die Telomerlänge einzelner Zellen oder auch Subpopulationen von Zellen innerhalb einer Probe zu bestimmen. Zum anderen enthalten die Telomerfragmente aufgrund der subtelomerisch gelegenen Schnittstelle der

Restriktionsenzyme subtelomerische DNA (ca. 2.5 bis 4 kb) und geben die Telomerlänge nur annäherungsweise wieder (Murnane et al., 1994).

Zudem ist der Southern Blot eine zeitraubende, arbeitsintensive Methode, welche große Mengen an unfixierten Zellen (mind. $\sim 5 \times 10^5$ Zellen; $\geq 2 \mu\text{g}$ DNA) zur Isolation von hochmolekularer genomischer DNA benötigt.

1.2.2 Q-FISH

Aufgrund der verschiedenen Nachteile und Schwierigkeiten des Southern Blot, wurde in der Arbeitsgruppe von Peter Landsdorp die sogenannte „quantitative Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung“ (Q-FISH) entwickelt. Dieser Methode liegt die quantitative Hybridisierung der Telomer-Repeats mit einer komplementären fluoreszenz-markierten Peptid-Nukleinsäure (PNA-Sonde; „peptide nucleic acid“) zugrunde (Landsdorp et al., 1996).

Dabei ist das negativ geladene Phospho-Deoxyribose-Rückgrat der DNA durch eine ungeladene, auf N-Aminoethylglycin-Einheiten basierende Polyamidstruktur ersetzt (Nielsen et al., 1994).

PNAs hybridisieren mit der komplementären DNA oder RNA über Wasserstoffbrücken-vermittelte Basenpaarung nach Watson-Crick (Egholm et al., 1993) und zeichnen sich durch wesentlich thermostabilere Bindungen zur Ziel-DNA aus. So können bei niedriger Ionenkonzentration Hybridisierungsbedingungen gewählt werden, die eine spezifische und quantitative Bindung der Probe unter weitgehender Vermeidung von unspezifischer Autohybridisierung erlauben.

Die Fluoreszenzintensität der zur Darstellung kommenden Telomersignale kann mittels digitaler Bildverarbeitung und einer eigens entwickelten Computer-Software quantifiziert werden (Poon et al., 1999).

Da die Fluoreszenz proportional zur Anzahl der Telomer-Wiederholungen ist, kann sie zur Messung der Telomerlänge herangezogen werden (Landsdorp, 1996). Dieses Verfahren wird an Metaphasen, welche auf Objektträger aufgebracht werden, durchgeführt und erfordert eine wesentlich geringere Zellzahl (10^2 bis 10^3 Zellen) als ein Southern Blot.

Darüber hinaus kann Q-FISH mit einer Karyotypisierung kombiniert werden und erlaubt dann die spezifische Untersuchung der replikationsabhängigen Telomerverkürzung der jeweiligen individuellen Chromosomenarme einer Zelle (Landsdorp et al., 1996; Martens et al., 1998; Poon and Landsdorp, 2001).

Von Nachteil ist allerdings die Einschränkung dieser sehr laborintensiven Methode auf sich teilende Zellen.

1.2.3 Flow-FISH

Um die durchschnittlichen Telomerlängen größerer Probenmengen analysieren zu können, wurde im Labor von Peter Lansdorp die Q-FISH Methode durch Rufer und Brümmendorf et al. für die durchflusszytometrische Analyse von Interphase-Zellen in Suspension weiterentwickelt (Rufer et al., 1998; Rufer et al., 1999). Zur quantitativen Hybridisierung der Telomer-Repeats wird, wie schon bei Q-FISH, eine fluoreszenz-markierte PNA-Sonde, komplementär zur Telomer-DNA, verwendet. Man erhält eine telomerspezifische Fluoreszenz, welche anschließend mittels Durchfluss-Zytometrie schnell und reproduzierbar gemessen und ausgewertet werden kann.

Im Gegensatz zu Q-FISH misst Flow-FISH dabei die Summe der Telomersignale aller Chromosomenarme einer individuellen, diploiden Zelle, unabhängig vom Zellteilungs-Status. Basierend auf der unterschiedlichen Größe und Granularität der Zellen ist es möglich Subpopulationen (z.B. Lymphozyten und Granulozyten innerhalb der peripheren Blutleukozyten) gesondert zu analysieren. Neben der Schnelligkeit der Methode ist die geringe benötigte Zellzahl (Minimum 10^5 Zellen pro Test) ein wichtiger Vorteil dieser Methode. Durch Einsatz interner Kontrollen (Baerlocher et al., 2002) ist es möglich, Unterschiede innerhalb eines Experiments und zwischen unterschiedlichen Versuchen auszugleichen.

1.3 Chronisch Myeloische Leukämie

1.3.1 Krankheitsbild

Die Chronisch Myeloische Leukämie (CML) ist eine klonale, myeloproliferative Erkrankung der pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle und gehört damit zu den Myeloproliferativen Syndromen. Kennzeichnend für dieses Krankheitsbild sind die z.T. sehr hohen Leukozytenzahlen, welche 1845 zu der von Virchow geprägten Bezeichnung „weisses Blut“ oder „Leukämie“ geführt hatten.

Ohne geographische Variationen beträgt die Inzidenz der CML weltweit etwa 1-1,5 / 10^5 Neuerkrankungen pro Jahr, wobei Männer ca. 1,4-mal häufiger betroffen sind als Frauen. Obwohl CML im Allgemeinen eine Erkrankung der Erwachsenen mit einem medianen Erkrankungsalter von ca. 50 Jahren ist, kann

sie in allen Altersgruppen beobachtet werden und macht etwa 20% aller Leukämien aus (Lee, 2000).

Charakteristisch für die CML sind drei Phasen: die chronische Phase (CP), welche einige Jahre andauern kann, die akzelerierte Phase (AP) und die Blastenkrise (BC), mit einer massiven Proliferation von unreifen, funktionslosen Leukozyten.

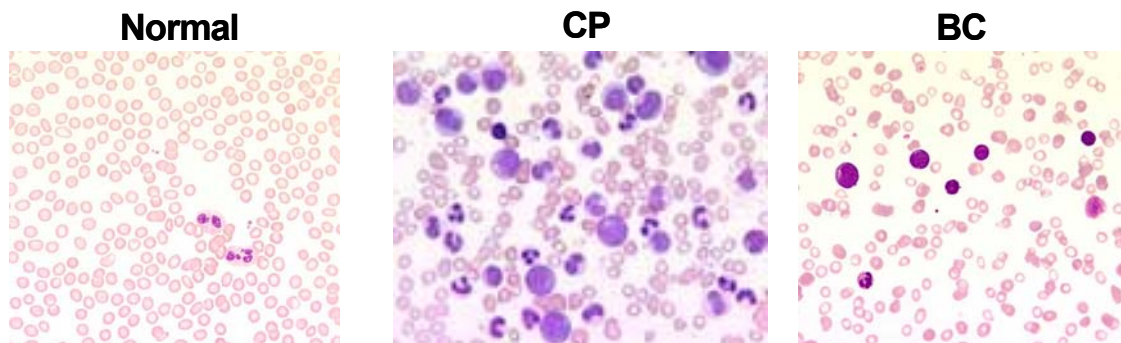


Abbildung 7 Blutausstrich eines gesunden Probanden (Normal) und eines Patienten mit CML in der Chronischen Phase (CP) und in der Blastenkrise (BC) (Med.Uniklinik Tübingen)

Typisches Charakteristikum der CP stellt eine Vermehrung der Zellen der myeloischen Reihe aller Differentiationsstufen, sowie mitunter eine deutliche Steigerung der Thrombopoese dar. Während die Beteiligung der B-lymphozytären Reihe keine Seltenheit ist, wird die Häufigkeit einer Beteiligung der T-lymphozytären Reihe kontrovers diskutiert (Brummendorf et al., 2000). Nach 4 bis 6 Jahren (bei prognostisch günstigen Verläufen auch 8 – 10 Jahre) kommt es zur Progression der Erkrankung, gekennzeichnet durch zunehmende Blastenzahl, schlechtere medikamentöse Führbarkeit oder Auftreten zusätzlicher genetischer Abberationen. Die Akzeleration geht schließlich in die terminale Blastenkrise über, welche einer akuten Leukämie gleicht und therapeutisch nur wenig beeinflusst werden kann.

1.3.2 Das Philadelphia-Chromosom

Die CML ist durch eine spezifische, zytogenetische Anomalität, dem Philadelphia-Chromosom gekennzeichnet. Ursächlich für die Entstehung des Philadelphia-Chromosoms ist eine reziproke Translokation zwischen den langen Armen der Chromosome 9 und 22 (Ph+ t(9,22)) (Sawyers, 1992). Diese Translokation führt zur Kopplung des BCR-Gens (breakpoint cluster region, auf

von BCR-ABL für die Entstehung der chronischen Phase der CML durch Transfektionsexperimente *in vitro* (Daley and Baltimore, 1988) aber auch durch die Transplantationsexperimente mit murinem BCR-ABL transfizierte Knochenmarkzellen im Tierexperiment (Daley et al., 1990) belegt (Übersicht in (Wong and Witte, 2001)).

Zum einen führt BCR-ABL zu einer Steigerung der Zellwachstumsrate, zum anderen zu einem anti-apoptotischen Effekt und zudem zu einer Veränderung der adhäsiven Eigenschaften gegenüber Knochenmarkstroma. Das erklärt die, bei Diagnosestellung bzw. im unbehandelten Zustand, deutlich erhöhte Zahl insbesondere durch unreife myeloischen Zellen in Knochenmark und Blut der Patienten.

1.3.3 BCR-ABL Signaltransduktion

So gut die Relevanz des BCR-ABL-Genprodukts für den malignen Phänotyp der CML untersucht wurde, so wenig ist bekannt über die Bedeutung der einzelnen bislang charakterisierten Schritte der Signaltransduktionskaskaden an deren Anfang die Phosphorylierung durch BCR-ABL steht.

Einzelne Interaktionspartner sind bekannt, darunter der sog. „Growth-factor-receptor binding protein 2“ – Komplex (GRB-2) (Pendergast et al., 1993) der ebenso wie das sog. „CRK-like-Protein“ (CRKL) (Feller et al., 1998; Rhodes et al., 2000) zur Aktivierung des RAS-Signalweges über BCR-ABL führt (Sawyers et al., 1995). CRKL kann darüber hinaus zu einer Aktivierung der Nicht-Rezeptortyrosinkinase PI-3 (Phosphatidylinositol-3) führen, welche ebenfalls als „downstream target“ von BCR-ABL identifiziert wurde (Skorski et al., 1995). Weitere Signalwege laufen über die Aktivierung von sog. Janus-Kinasen (JAK) und STAT-Proteinen (= signal-transducer and activator of transcription) und die damit verbundene Auslösung von anti-apoptotischen Signalen.

Weiterhin beeinflusst BCR-ABL Adhäsionsproteine wie Paxillin mit den damit verbundenen Veränderungen des Adhäsionsverhaltens der Zelle und ist so für eine vermehrte Zellfreisetzung in die Peripherie verantwortlich. Ein RAS-unabhängiger Signalweg ist die BCR-ABL-induzierte Überexpression von c-myc und die dadurch bedingte Transformation von Fibroblasten (Sawyers et al., 1992; Sawyers, 1993).

1.3.4 Therapie

Hauptziel der CML-Therapie ist die Stabilisierung des Blutbildes, sowie das Erreichen eines hämatologischen (hematological response = HR) und zytogenetischen Ansprechens (cytogenetic response = CR). Kennzeichen des hämatologischen Ansprechens ist neben Normalisierung der Leukozytenzahlen eine Eliminierung unreifer myeloischer Blasten und eine Beseitigung der Krankheitssymptome mit Stabilisierung des Therapieeffektes über mindestens 4 Wochen. Im Gegensatz dazu spricht man bei einer Verminderung oder vollständigen Eliminierung Philadelphia-positiver Zellen von einem zytogenetischen Ansprechen (CCR = complete cytogenetic response = vollständige Entfernung Ph⁺ Zellen; PCR = partial cytogenetic response = Anteil Ph⁺ Zellen zwischen 1% und 35%).

Zur Behandlung der CML kommen heute verschiedene Therapieoptionen zur Anwendung. Die einzig mögliche kurative Therapie ist auch heute noch die allogene (Geschwister- oder nichtverwandter Spender) Stammzelltransplantation. Rein zytoreduktive, aber nicht kurative Behandlungen werden mit Hydroxyurea (Hydroxycarbamid) oder Arabinosylcytosin (Ara-C; Cytarabin) durchgeführt.

Seit 1986 hat Interferon- α (INF- α) erhebliche Bedeutung in der CML-Therapie gewonnen. Grund hierfür ist das Erreichen stabiler hämatologischer Remissionen bei 70-80% der CML-Patienten, sowie teils lang andauernde komplette zytogenetische Remissionen in einem kleinen Prozentsatz der Fälle (Hehlmann et al., 1994).

Durch die Einführung von Imatinib (Glivec[®]) (Buchdunger et al., 1996) ist für die Behandlung der CML eine vollkommen neue Situation entstanden (Goldman and Druker, 2001). Glivec[®] (Imatinibmesylat, auch unter der Bezeichnung STI 571 / GCP 57148 bekannt) ist der erste klinisch erprobte selektive Tyrosinkinasaseinhibitor.

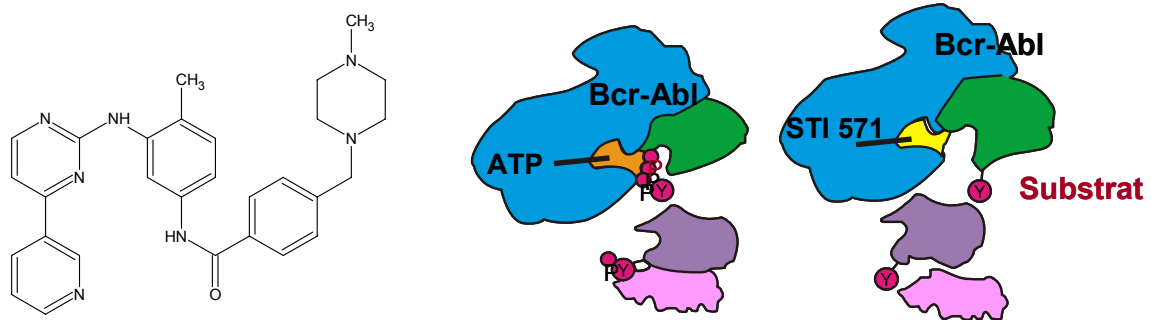


Abbildung 9 Chemische Struktur von Imatinib (Glivec®) und Wirkmechanismus (aus Produktinformation Novartis Oncology)

Imatinib unterdrückt über kompetitive Hemmung der ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase relativ spezifisch die Wirkung von BCR-ABL, aber auch von anderen Tyrosinkinasen wie ABL, dem Stammzellrezeptor c-kit und PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor) (Druker et al., 1996). Die Substanz zeigt hohe zytogenetische Ansprechraten in sowohl der chronischen Phase (CP) (Kantarjian et al., 2002) der Erkrankung als auch in der akzelerierten Phase (AP) (Talpoz et al., 2002) und der Blastenkrise (BC) (Sawyers et al., 2002).

Inzwischen wurde Imatinib als Therapie erster Wahl für Patienten mit neu diagnostizierter CML, sowie zur Behandlung von c-kit-positiver nicht resezierbarer und/oder metastasierter Gastrointestinaler Stromatumoren (GIST-Tumoren) zugelassen. Bei letzteren wird eine Mutation in c-kit für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich gemacht.

Imatinib wird im Allgemeinen von den Patienten gut toleriert, typische Nebenwirkungen der Behandlung mit Imatinib, neben Übelkeit, Erbrechen, Muskelkrämpfen und Ödemneigung, betreffen das blutbildende System mit Abfall der Erythrozyten, Leukozyten und der Thrombozyten im Blut (Druker et al., 2001). Ein weiteres Problem der Therapie kann die Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib sein. Mögliche Mechanismen sind Überexpression des BCR-ABL-Proteins, genomische Amplifikation von BCR-ABL, gesteigerte Expression des P-Glykoproteins mit Induktion einer Multi-Drug-Resistenz (MDR), eine Mutation der Tyrosinkinase-Domäne von BCR-ABL und gesteigerte Wirkspiegel des sauren α 1-Glykoproteins mit der Folge einer gesteigerten Bindung von Imatinib. Die klonale Selektion von Blasten mit Vervielfachung des BCR-ABL-Gens oder mit Punktmutationen, die eine

Konformationsänderung der ATP-Bindungsstelle auslösen, wurde bei Patienten mit sekundärer Imatinib-Resistenz beschrieben (Shah and Sawyers, 2003).

1.4 Akute Myeloische Leukämie

1.4.1 Krankheitsbild

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine sehr heterogene Erkrankung. Die Entwicklung einer AML resultiert aus einer Vielzahl von genetischen Veränderungen hämatopoetischer Stamm- oder Vorläuferzellen (Jamieson et al., 2004; Cozzio et al., 2003). Obwohl mit Hilfe genetischer Studien der klonale Ursprung der AML nachgewiesen werden konnte, ist die genaue Ursprungszelle der leukämischen Transformation noch unbekannt.

Im Gegensatz zur Chronischen Phase der CML ist die Folge dieser Transformation der Verlust oder die Einschränkung des Differenzierungspotentials der Zellen mit Stop der Ausreifung auf einem sehr frühen Stadium der Myelopoese. Bei erhaltener Proliferationskapazität kommt es zur Akkumulation der Blasten im Knochenmark, im peripheren Blut und in extramedullären Organen. Folge davon ist die sukzessive Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark mit den häufig akut auftretenden Symptomen Blutung, Anämie und Infekt.

Die Inzidenz der AML liegt bei 2,3 / 100 000 Einwohner pro Jahr, wobei die Häufigkeit mit dem Alter zunimmt, so dass das mediane Erkrankungsalter bei ca. 60 Jahren liegt. Die AML macht somit 80% der akuten Leukämien der Erwachsenen und 20% der Kinder aus.

1.4.2 Einteilung und Klassifikation

Die AML ist keine homogene Erkrankung, deshalb existieren neben der Einteilung nach Verlauf der Erkrankung in de-novo AML oder sekundäre AML noch verschiedene andere Möglichkeiten der Klassifikation.

Die gebräuchlichste Einteilung der AML erfolgt nach der FAB-Klassifikation (French-American-British). Diese beruht auf der Morphologie der vorherrschenden Blasten-population, welche mit Hilfe der panoptischen Färbung (Pappenheim) sowie einer zytochemischen Färbungen (Peroxidase,

Periodschiffsäure, unspezifische Esterase) (Bennett et al., 1985) beurteilt wird. Ergänzt und unterstützt wird diese morphologische Klassifizierung durch Durchfluss-Zytometrie (immunologische Klassifikation) und die Chromosomenanalyse (Zytogenetik verschiedener Chromosomenabberationen).

Nach 25 Jahren FAB-Klassifikation wurde von der WHO ein neuer Vorschlag zur Einteilung der AML gemacht. Diese Klassifikation enthält neben morphologischen, zytochemischen und immunologischen Kriterien auch zytogenetische und klinische Merkmale, die prognostisch relevant sein können (Harris et al., 2000).

1.4.3 Therapie

Standard einer rein medikamentösen AML-Therapie ist heute die intensive Polychemotherapie mit mehreren Zytostatika. In der ersten Behandlungsphase, der Induktionsphase, wird eine rasche Reduktion der Leukämiezellmasse unter die mit Routineverfahren noch nachweisbare Grenze, sowie die Rekonstitution der gesunden Hämatopoese angestrebt (Cheson et al., 1990). Erreicht wird dies durch intensive Behandlung mit mehreren verschiedenen Zytostatika, welche zu einer lang anhaltenden Knochenmarksaplasie führen. Die Fortsetzung der Therapie nach Erreichen einer kompletten Remission (CR) beruht auf der Vorstellung, dass ein mögliches Rezidiv der Leukämie von den zum Remissionszeitpunkt noch vorhandenen Leukämiezellen ausgeht und die Dauer der Remission von deren Zahl und Proliferationskapazität bestimmt wird. Die Postremissionstherapie ist von ähnlicher antileukämischen Wirkung, wie die Induktionsphase, häufig werden hier die gleichen Zytostatika eingesetzt oder auch mehrere nicht kreuzresistente Medikamente. Im Anschluss wird oft noch eine Erhaltungstherapie mit einer Gesamtdauer von bis zu 1,5 Jahren angeschlossen.

1.5. Hemmung der Telomerase – ein neuer Therapieansatz

1.5.1 Prinzip

In den letzten Jahren wurden die meisten malignen Tumoren des Menschen auf Telomerase-Aktivität hin untersucht. Dabei zeigte sich in der überwiegenden Mehrzahl der Tumoren eine hohe Enzymaktivität und im Vergleich dazu keine

nachweisbare Aktivität im umliegenden Normalgewebe (Shay and Bacchetti, 1997; Sommerfeld et al., 1996; Schwartz et al., 1995; Langford et al., 1995). Das Enzym Telomerase bzw. dessen Hemmung durch neue therapeutische Strategien bietet (neben der Nutzung des Enzyms als diagnostisch-prognostischer Faktor (Hiyama et al., 1995a)) die Möglichkeit eines völlig neuartigen, kausalen und zudem auch tumorentitäts-übergreifenden therapeutischen Ansatzes zur Behandlung maligner Tumoren, welcher gegenwärtig weltweit intensiv bearbeitet wird.

1.5.2 Tumorbilologische Überlegungen und Perspektiven

Theoretische Überlegungen, die den klinischen Einsatz von Telomerase-Inhibitoren limitieren könnten, ergeben sich zum einen aus der Tatsache, dass sich nicht in allen malignen Tumoren Telomerase-Expression findet. Zum anderen könnte diese Therapie bei Tumoren mit relativ langen Telomeren zum Zeitpunkt des Therapiebeginns möglicherweise erst nach einer, viele Monate oder gar Jahre andauernden, Latenzzeit zur proliferationsrelevanten Verkürzung der Telomere führen, da die Zelle zunächst ihr vorhandenes Replikationspotential aufbrauchen würde.

Dies legt zumindest im metastasierten Stadium die Kombination von Telomerase-Inhibitoren mit konventionellen Therapiemodalitäten (Chirurgie, Bestrahlung, Chemotherapie) nahe, um die erforderliche Reduktion der Tumorlast zu erzielen, die den Substanzen die nötige Zeit gibt, ihre antiproliferative Wirkung zu entfalten. Analog bietet sich die Therapie bei minimaler Tumorlast z.B. im Sinne einer minimalen Resterkrankung (MRD) oder in einer adjuvanten (beispielsweise Hochrisiko-) Situation an. Es ist darüber hinaus möglich, Tumorzellen mit Telomerase-Inhibitoren für konventionelle Chemotherapien zu sensibilisieren. So berichtete Kondo et al. (Kondo et al., 2001) von einer Steigerung der Sensitivität humaner Gliomzellen für die Cisplatin-induzierte Apoptose *in vitro* in Folge von Telomerase-Inhibition durch stabile Expression einer anti-hTR-RNA und Ludwig et al. (2001) zeigte einen gesteigerten apoptotischen Effekt von Topoisomerase-Hemmstoffen durch ein anti-hTERT-Ribozym. Alternativ wäre es unter den oben genannten tumorbilologischen Gesichtspunkten auch vorstellbar, zukünftig replikationsabhängige und replikationsunabhängige telomerase-spezifische Therapiestrategien zu kombinieren.

Potentielle Nebenwirkungen einer Therapiestrategie mit Telomerase-Inhibitoren betreffen eine Verkürzung der Telomere in Keimbahnzellen des Patienten. Dies könnte zur Folge haben, dass es im Falle von weiterbestehender Fertilität zu einer Verkürzung der Telomere bei den Nachkommen dieser Patienten käme. Außerdem könnten telomerasepositive somatische Zellen, wie zum Beispiel aktivierte Lymphozyten oder hämatopoetische Stammzellen in ihrer Proliferationsfähigkeit durch die Therapie mit Telomerase-Inhibitoren beeinträchtigt werden.

Ein engmaschiges telomerbiologisches Monitoring der zu behandelnden Patienten ist erforderlich, um sowohl die Effekte der Substanzen auf die erkrankte (im Falle von hämatologischen Neoplasien) als auch auf die normale Hämatopoese rechtzeitig erkennen zu können.

Mit dem Ziel der Entwicklung neuer telomerase-inhibitorischer Strategien werden verschiedenste Angriffspunkte des Telomerase-Komplexes evaluiert. In den letzten Jahren wurden Telomerase-Inhibitoren in einer Vielzahl von Publikationen erwähnt. White et al. (White et al., 2001) erarbeitete verschiedene theoretische Voraussetzungen für den telomerabhängigen, antiproliferativen Effekt einer Telomerase-hemmenden Substanz:

- [1] Der Inhibitor sollte die Telomerase-Aktivität reduzieren, aber initial keinen Effekt auf die Zellwachstumsrate zeigen.
- [2] Die Zugabe des Inhibitors sollte mit jeder Zellteilung zu einer progressiven Verkürzung der Telomere führen.
- [3] Die Zugabe des Inhibitors sollte nach (längerer) Therapie zu Apoptose oder Wachstumsarrest der Zellen führen.
- [4] Die Behandlungsdauer bis zum Einsetzen eines proliferationshemmenden Effekts sollte direkt mit der initialen Telomerlänge korreliert sein.
- [5] Substanzen, welche die Telomerase-Aktivität nicht reduzieren, sollten die Zell-Proliferation oder Telomer-Verkürzung ebenfalls nicht verringern.

1.5.3 Selektive Hemmung der Telomerase - BIBR1532

Ein großer Fortschritt in der Entwicklung neuer, selektiver Telomerase-Inhibitoren wurde durch das Screening verschiedener „small molecule“ Substanzen gegen telomerasehaltige Kernextrakte erreicht. Diese Stoffe erfüllen die oben genannten theoretischen Anforderungen an einen Telomerase-Inhibitor. Das heißt, sie zeigen keinen Effekt auf das kurzzeitige Überleben oder das Wachstum der Zellen und bewirken eine replikationsabhängige Verkürzung der

Telomere in Krebszellen. Experimentelle Erfolge wurden mit der von Böhlinger Ingelheim entwickelten Substanz BIBR1532 (2-[(E)-3-naphtalen-2-yl-but-2-enoylamino]-benzoesäure erzielt (Damm et al., 2001). Bei dieser Substanz handelt es sich um einen nicht nukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitor, der *in vitro* bei verschiedenen Tumorzelllinien zu einer Verkürzung der Telomere und zu einem seneszenten Phänotyp führt. Darüber hinaus kann unter Einsatz dieses Inhibitors in einem Maus-Xenograft-Modell eine Reduktion der Tumorgrößen gegenüber Kontrolltieren festgestellt werden. Ein weiterer Vorteil besteht in der oralen Bioverfügbarkeit der Substanz, was in Anbetracht der zu erwartenden Einnahme der Substanz im Sinne einer „Dauertherapie“ von besonderer Bedeutung ist.

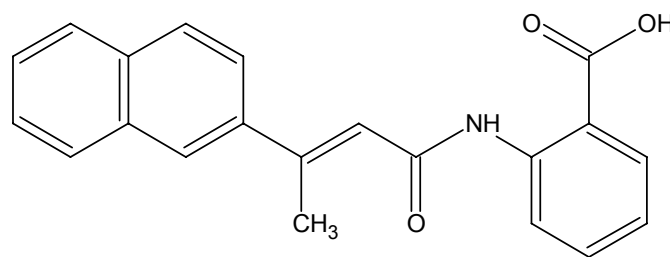


Abbildung 10 Chemische Struktur von BIBR1532

1.5.4 Weitere Strategien

Verschiedene weitere therapeutische Prinzipien wurden bislang *in vitro* und in präklinischen *in vivo* Modellen geprüft. Beispielhaft sei die Hemmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) mit aus der HIV Therapie bekannten Inhibitoren der Reversen Transkriptase wie zum Beispiel Azidothymidin (AZT) erwähnt (Strahl and Blackburn, 1996).

Weitere Ansätze zielen auf eine Hemmung der RNA Untereinheit, hTR mittels sog. „Antisense“-Strategien (Kushner et al., 2000) ab. Hier ruhen die Hoffnungen insbesondere auf RNA Analoga (wie z.B. 2',5'-Oligoadenylat (2,5-A)-Oligonukleotiden (Kondo et al., 2000; Kushner et al., 2000) und den sog. peptide nucleic acids (PNA) (Norton et al., 1996; Shammass et al., 1999).

Einen weiteren Angriffspunkt für therapeutische Intervention könnte die Stabilisierung der räumlichen Konfiguration der Telomere bieten (Hurley et al., 2000). Damit kann die Anlagerung der Telomerase an das Telomerende gehemmt werden. „Hammerhead“ Ribozyme, so genannt wegen ihrer

spezifischen Y-förmigen Struktur, erkennen spezifische Sequenzen und spalten die Ziel-RNA an diesen Stellen durch ihre Endoribonuklease-Aktivität (Yokoyama et al., 2000).

Von den genannten Ansätzen abzugrenzen sind immuntherapeutische Strategien, die sich die Expression des Enzyms in der Mehrzahl der untersuchten Tumorentitäten als sog. „Pan-Tumor-spezifisches Antigen“ zunutze machen (Nair et al., 2000).

Eine alternative Strategie nutzt die Telomerase-Expression in malignen Geweben, um zytotoxische Moleküle tumorspezifisch zu aktivieren, wo sie ihre Wirkung telomerunabhängig entfalten können. hTR und/oder hTERT-Promotoren ergeben eine Vielzahl an exzellenten Angriffspunkten für derartige Therapiestrategien (Nettelbeck et al., 2000).

2. Fragestellung

2.1 *Telomerlängen-Dynamik der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) unter Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib*

Über eine deutlich erhöhte Teilungsrate in den malignen, hämatopoetischen Stammzellen kommt es bei dem Krankheitsbild der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) zu einer akzelerierten Telomerverkürzung der malignen Zellpopulation im Laufe der chronischen, klinisch stabilen Phase der Erkrankung. (Brummendorf et al., 2000). Trotz erhöhter Telomerase-Aktivität der fortschreitenden Erkrankung überwiegt offensichtlich der Effekt des gesteigerten Stammzellturnovers und damit des erhöhten zellulären Umsatzes.

Seit Einführung des selektiven Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib (Glivec[®]) hat sich die Therapie der CML-Patienten grundlegend geändert (Buchdunger et al., 1996; Goldman and Druker, 2001).

In Folge dessen ergab sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellung:

- 1) Inwieweit schlägt sich ein Ansprechen auf diesen veränderten Therapieansatz mit Imatinib (Sawyers et al., 2002; Talpaz et al., 2002) in einer Zunahme der durchschnittlichen Telomerlänge nieder?

Dieser Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Fr. Dr. med Inci Ersöz erstellt.

2.2 *Untersuchungen zum funktionellen Zusammenhang zwischen der BCR-ABL-Tyrosinkinaseaktivität und der Telomerase-Aktivität bzw. Telomerlänge in vitro*

Die c-Abl Tyrosinkinaseaktivität wird in gesunden Zellen streng reguliert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass c-Abl an die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) bindet, diese phosphoryliert und damit eine signifikante Hemmung der Telomeraseaktivität bewirkt. Interessanterweise führt die Expression von c-Abl in hTERT positiven Zellen nicht nur zu einer Herunterregulation der Telomerase-Aktivität sondern auch zu signifikant kürzeren Telomeren gegenüber c-Abl^{-/-} Zellen (Kharbanda et al., 2000).

Aufgrund dieser Daten stellte sich die Frage:

- 1) Gibt es analog zu c-Abl, eine funktionelle Interaktion zwischen BCR-ABL und der Telomerase-Regulation?

Die Hemmung von BCR-ABL durch Imatinib könnte demzufolge die Phosphorylierung von hTERT analog zur c-ABL-Wirkung aufheben und damit über steigende hTERT-Aktivität eine Verlängerung der Telomere bewirken.

Untersuchungen dieser funktionellen Interaktionen wurden mit Hilfe pharmakologischer Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität mittels Imatinib am Beispiel Ph⁺ und Ph⁻ Zell-Linien durchgeführt. Hierbei wurde die relative Telomerase-Aktivität mit TRAP-Assay bestimmt und sequentielle Telomerlängen-Messungen mittels Flow-FISH durchgeführt.

Eine funktionelle Interaktion zwischen der Tyrosinkinase BCR-ABL und der Telomerase-Aktivität, sowie der Telomerlänge in Ph⁺ Zell-Linien könnte dabei auf einen direkten Effekt von Imatinib auf die Ph⁺ Zellen des CML-Patienten hinweisen. Das Fehlen dieser Interaktion würde die Theorie der Zunahme gesunder Ph⁻ Zellen im peripheren Blut der Patienten erhärten.

2.3 *Telomerlänge und hTERT-Expression als prognostischer und diagnostischer Marker myeloischer Leukämie*

Eine weitere Erkrankung des hämatopoetischen Systems, welcher eine maligne Transformation hämatopoetischer Stamm-, bzw. Vorläuferzellen zugrunde liegt, ist die akute myeloischen Leukämie (AML).

Die AML repräsentiert eine genetisch sehr heterogene Erkrankung, verbunden mit dem unkontrollierten Wachstum unreifer myeloischer Zellen (Dash and Gilliland, 2001; Lowenberg et al., 1999). Die Prognose des Ansprechens auf die Therapie stützt sich heute vor allem auf die Zytogenetik. Trotz allem zeigen 2/3 der Patienten einen normalen Karyotyp (Grimwade et al., 1998; Slovak et al., 2000). Die Bestimmung der FLT3-aktivierenden Mutation (Thiede et al., 2002) ist eine Möglichkeit diese Gruppe zu unterteilen. Trotzdem werden für eine weitere Einteilung dieser, was das Ansprechen auf die Therapie betrifft, sehr heterogenen Gruppe weitere prognostische Faktoren benötigt.

Auf den prognostische Nutzen der Telomerlängen-Analyse und auch der Bestimmung der Telomerase-Aktivität wurde schon im Rahmen anderer

hämatologischen Erkrankungen hingewiesen (Brummendorf et al., 2001; Ohyashiki et al., 2002).

Bislang wurden einige Studien zur Telomerase-Aktivität und Telomerlänge von AML-Patienten (Seol et al., 1998; Xu et al., 1998), allerdings mit sehr heterogenen Daten unterschiedlicher Leukozyten-Subpopulationen veröffentlicht. Systematische Untersuchungen zur Telomerlänge, Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT, sowie der verschiedenen hTERT Splicing-Varianten einer definierten Subpopulation, die eine Aussage zu deren diagnostischen bzw. prognostischen Wert zulassen fehlten bei der AML bisher. Aufgrund dieser offenen Fragen ergaben sich für diesen Teilaspekt der Arbeit folgende Ziele:

- 1) Können die Telomerlängen, hTERT-Expressionen oder des hTERT-Splicing mit der karyotypischen Instabilität der AML-Proben korreliert werden?
- 2) Haben Telomerlänge, hTERT-Expression oder die Splicing-Varianten der hTERT eine Bedeutung als diagnostische oder prognostische Marker für die AML?

2.4 Telomere und Telomerase als Angriffspunkt für pharmakologische Modulation

Durch den Nachweis der Telomerase in ca. 90% aller Tumorzellen, stellt die Hemmung dieses Enzyms einen möglichen Ansatzpunkt für ein neues Prinzip in der Tumorthherapie dar.

Deshalb beschäftigte sich ein weiterer Teil der Arbeit mit der pharmakologischen Beeinflussung der Telomerase. Am Zellmodell der CML und der AML wurde die Effektivität des neuen Telomerase-Inhibitors BIBR1532 getestet (Damm et al., 2001). Ziel dieser Untersuchungen war:

- 1) Unterscheidet sich der Effekt einer pharmakologischen Hemmung der Telomerase-Aktivität in Ph+ und Ph- Zellen?
- 2) Ist die pharmakologische Hemmung der Telomerase-Aktivität eine neue Therapieoption myeloischer Leukämien?

- 3) Kann der therapeutische Effekt von Imatinib auf BCR-ABL-positive Zellen durch parallele Behandlung mit dem Telomerase-Inhibitor BIBR1532 verbessert werden?

Dazu sollten vor allem sequentielle Telomerlängen-Messungen mittels Flow-FISH durchgeführt und sowohl Proliferaton als auch die Morphologie der Zellen verfolgt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 3.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

| Substanz | Hersteller / Lieferant |
|----------------------------------|--|
| Agarose GTQ | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumchlorid-Lösung | Stem Cell Technologies, Vancouver, B.C., Kanada |
| BEADS, Quantum TM 24 FITC Premix | Flow Cytometry Standards, Indiana, USA |
| Borsäure | Merck, Darmstadt |
| BSA (Bovines Serumalbumin), | Calbiochem, San Diego, CA, USA |
| DAPI | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| DEPC | Roth, Mannheim |
| Dimethylformamid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| DNA-Leiter Plus 100 bp | Peqlab, Erlangen |
| dNTP Mix 10 mM | Invitrogen, Karlsruhe |
| EDTA | Roth, Karlsruhe |
| Essigsäure | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| FCS (fötale Kälberserum) | Biochrom, Berlin |
| Fluor-Save TM Reagenz | Calbiochem, San Diego, CA, USA |
| Formaldehyd | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Formamid 100% | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Formamid, deionisiert | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Glucose | Merck, Darmstadt |
| Hepes-Puffer 1M | Gibco BRL, Karlsruhe |

| | |
|--|---|
| Human GAPDH Endogenous Control (markiert mit VIC TM and TAMRA TM) LDS 751 | Applied Biosystems, Foster City, USA Exciton Chemical, Dayton, OH, USA |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Milchpulver | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| MTT | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriumacetat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Natriumcitrat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriumpyruvat (MEM 100 mM) | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Nichtessentielle Aminosäuren (MEM 100x) | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Oligo(dt)12-18 (500 µg/ml) | Invitrogen, Karlsruhe |
| PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ | Bio Whittaker, Verviers, Belgien |
| Penicillin-Streptomycin (10 000 U) | Gibco BRL, Karlsruhe |
| PNA Oligomer (C ₃ TA ₂) FITC-markiert | PE-Biosystem, Weiterstadt |
| Propidium Iodid 25 mg/ml | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Red Taq TM Ready Mix TM PCR Reaction Mix | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| RNase A | Roth, Karlsruhe |
| RNase H (kloniert) (250 U) | Amersham, Freiburg |
| RNase Out Recombinante Ribonuclease Inhibitor (5 000 U) | Invitrogen, Karlsruhe |
| RNase T1 (500 000 U/ml) | Boehringer, Mannheim |
| RPMI 1640 mit Glutamax und HEPES | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| SuperScript II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase (10 000 U) | Invitrogen, Karlsruhe |
| TaqMan [®] Universal PCR Master Mix | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| TE-Puffer 100x | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| TRIS Base | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Trypanblau 0,5% | Biochrom, Berlin |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich, Steinheim |

| | |
|---|-----------------|
| Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA ^{PLUS} Kit | Roche, Mannheim |
| Rneasy Mini Kit | Quiagen, Hilden |

3.2 Antikörper und Wachstumsfaktoren

Tabelle 3.2 Antikörper und Wachstumsfaktoren

| Substanz | Hersteller / Lieferant |
|----------------------|-----------------------------|
| Interleukin 3, murin | Strathmann, Hannover |
| Anti-c-Abl Ab-2 | Oncogene, Cambridge, USA |
| Anti-Maus-FITC | Sigma-Aldrich, Steinheim |

3.3 Oligonukleotide

Die Sequenz der Oligonukleotide wurde mit Hilfe der im Internet Primer Express 2.0 Software (Applied Biosystems, England) ermittelt. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der MWG-Biotech AG synthetisiert.

Tabelle 3.3 Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz |
|--|---|
| <i>Bestimmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT)</i> | |
| hTERT-for | 5'-TGA CAC CTC ACC TCA CCC AC-3' |
| hTERT-rev | 5'-CAC TGT CTT CCG CAA GTT CAC-3' |
| hTERT-sonde | 5'-FAM-ACC CTG GTC CGA GGT GTC CCT GAG-TAMRA-3' |
| <i>Bestimmung der hTERT Splice-Varianten</i> | |
| ht2164F | 5'-GCC TGA GCT GTA CTT TGT CAA-3' |
| ht2620R | 5'-CGC AAA CAG CTT GTT CTC CAT GTC-3' |
| GAPDH-for | 5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3' |
| GAPDH-rev | 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3' |

3.4 Medien, Puffer und Lösungen

3.4.1 Medien

Tabelle 3.4 Medien

| Medien | Zusammensetzung | |
|----------------|-----------------|-----|
| Einfriermedium | RPMI 1640 | 40% |
| | FCS | 40% |
| | DMSO | 20% |

| | | |
|--------------|------------------------------|----------|
| Auftaumedium | RPMI 1640 | 60% |
| | FCS | 40% |
| RPMI 10%FCS | RPMI 1640 mit Glutamax | |
| | FCS konz. | 10% |
| | Natriumpyruvat | 1mM |
| | Nichtessentielle Aminosäuren | 1mM |
| | Penicillin | 50 U |
| | Streptomycin | 50 µg/ml |

3.4.2 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Puffer mit destilliertem (dest.) Wasser hergestellt.

Tabelle 3.5 Puffer und Lösungen

| Puffer, Lösungen | Zusammensetzung | |
|---|---------------------------|------------|
| <i>MTT-Assay</i> | | |
| Lyse-Puffer | Dimethylformamid / Wasser | 1:1 |
| | Sodiumdodecylsulfat (SDS) | 15% |
| | Essigsäure 80% | pH 4.5 |
| <i>Apoptose-Assay</i> | | |
| Lyse-Puffer (hypoton) | Natriumcitrat | 1% |
| | Triton X-100 | 0.1% |
| | Propidium Iodid | 50 µg / ml |
| <i>Flow FISH (altes Protokoll)</i> | | |
| Aufnahmepuffer | BSA | 0.1% |
| | PBS | ad x ml |

Hybridisierungs-Ansatz

Tabelle 3.6 Hybridisierungs-Ansatz für Flow-FISH (altes Protokoll)

unst = „unstained“ ohne PNA-Probe, tel = „telomer“ mit PNA-Probe

X* = auf das gewünschte Volumen auffüllen

| Hybridisierungs-Ansatz | unst | tel |
|------------------------|-------|-------------|
| Tris pH 7,1 | 20 mM | 20 mM |
| BSA | 1% | 1% |
| Formamid | 70% | 70% |
| PNA-FITC | | 0,3 µg / ml |
| Aqua dest. | X* | X* |

| | | |
|---------------|------------|---------|
| Waschpuffer 1 | Formamid | 70% |
| | Tris | 20 mM |
| | BSA 10% | 0.1% |
| | Tween 20 | 1% |
| | Aqua dest. | ad x ml |

| | | |
|---------------|----------|---------|
| Waschpuffer 2 | BSA | 0.1% |
| | Tween 20 | 0.1% |
| | PBS | ad x ml |

| | | |
|------------------------|-----------------|--------------|
| Propidium Iodid-Lösung | Propidium Iodid | 0.06 µg / ml |
| | RNase T1 | 1000 U |
| | BSA | 0.1% |
| | PBS | ad x ml |

Flow FISH (neues Protokoll)

| | | |
|----------------|--------------|---------|
| Aufnahmepuffer | BSA | 0.1% |
| | Hepes-Puffer | 10 mM |
| | Glucose 5% | ad x ml |

Hybridisierungs-Ansatz

Tabelle 3.7 Hybridisierungs-Ansatz für Flow-FISH (neues Protokoll)

unst = „unstained“ ohne PNA-Probe, tel = „telomer“ mit PNA-Probe

X* = auf das gewünschte Volumen auffüllen

| Hybridisierungs-Ansatz | unst | tel |
|------------------------|-------|-------------|
| Tris pH 7,1 | 20 mM | 20 mM |
| NaCl | 20 mM | 20 mM |
| BSA | 1% | 1% |
| Formamid | 75% | 75% |
| PNA-FITC | | 0.3 µg / ml |
| Aqua dest. | X* | X* |

| | | |
|---------------|--------------|-------------|
| Waschpuffer 1 | Formamid | 75% |
| | Tris | 20 mM |
| | BSA 10% | 1% |
| | Tween 20 | 1% |
| | Aqua dest. | ad x ml |
| Waschpuffer 2 | BSA | 1% |
| | Tween 20 | 1% |
| | Hepes-Puffer | 10 mM |
| | Glucose 5% | ad x ml |
| LDS-Lösung | LDS | 0.1 µg / ml |
| | RNase A | 10 µg / ml |
| | BSA | 0.1% |
| | PBS | ad x ml |

Immunfluoreszenz

| | | |
|--------------|--------------------------|-----------|
| Fixierlösung | 3% Formaldehyd in PBS | |
| Block-Lösung | Triton X-100 | 0.1% |
| | Milchpulver | 3% |
| | PBS | ad x ml |
| Waschlösung | 0.1% Triton X-100 in PBS | |
| Kernfärbung | Triton X-100 | 0.1% |
| | DAPI | 5 ng / ml |
| | PBS | ad x ml |

Bestimmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT)

| | | |
|-------------|---|--|
| DEPC-Wasser | Aqua bidest + 0.1% DEPC Nach 24 h Inkubation bei Raumtemperatur autoklavieren | |
|-------------|---|--|

Bestimmung der hTERT Splice-Varianten

| | | |
|--------------------|--|--------|
| TBE-Puffer | Tris Base | 90 mM |
| | Borsäure | 90 mM |
| | EDTA | 2 mM |
| Agarose-Gel GAPDH | 1.5 % Agarose GTQ in TBE 0.8 µg Ethidiumbromid pro ml Gel | |
| Agarose-Gel hTERT | 2 % Agarose GTQ in TBE 0.8 µg Ethidiumbromid pro ml Gel | |
| DNA-Leiter, 100 bp | DNA-Leiter Plus | 2 µl |
| | Aqua dest. | 6.3 µl |
| | Farbstoff 6x | 1.7 µl |

3.5 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 3.8 Geräte und Hilfsmittel

| Bezeichnung | Hersteller / Lieferant |
|--|-------------------------------------|
| Einwegmaterialien: | |
| Eppendorf-Hütchen | Eppendorf, Hamburg |
| Facs-Röhrchen | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Filtercards | Thermo-Shandon, Frankfurt |
| Gewebekulturplatten | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Kryo-Röhrchen | Nunc, Wiesbaden |
| Objektträger | Langenbrinck, Emendingen |
| Pipetten | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Pipettenspitzen | Roth, Mannheim |
| Safe-Lock (Eppendorf) | Multimed, Kirchheim / Teck |
| SafeSeal-Tips (DNAse-, RNAse-, pyrogenfrei) | Biozym Diagnostik, Oldendorf |
| Thermo-Fast 96 Non-Skirted | Abgene, Epsom, Surrey, GB |
| Zellkulturflaschen | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Zentrifugen-Röhrchen | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Brutschrank | Kendro / Heraeus, Hanau |
| Cytospin 3 | Thermo Shandon, Frankfurt |
| Dampfsterilisator 500 E | H+PLabortechnik, Oberschleißheim |
| Eismaschine AT 20 | Scotsman [®] , Hamburg |
| ELISA-Reader Dynatech MR7000 | Dynatech, Denkendorf |
| FACS-Calibur [™] | Beckton Dickinson, Heidelberg |
| Feinwaage BP 2100S | Sartorius, Göttingen |
| Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert | Zeiss, Stuttgart |
| Gefrierschrank -20°C | Liebherr, Biberach |
| Gefrierschrank NU 6512 E | Zapf Instrumente, Delmenhorst |
| GeneAmp PCR-System 9700 | Applied Biosystems, Darmstadt |
| GeneQuant DNA/RNA Calculator | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Heraeus Biofuge 15 | Heraeus, Hanau |
| Heraeus Megafuge 3.0 R | Heraeus, Hanau |
| Hydra Microdispenser | Robbins, Sunnyvale, CA, USA |

| | |
|---|---|
| 0.60X HRD060-NIK CCD-Kamera | Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan, USA |
| Kühlschrank | Liebherr, Biberach |
| Mikroskop Wilovert S | Hund, Wetzlar |
| MicroAmp [®] Optical 96-Well Platten | Applied Biosystems, Darmstadt |
| Multipipette Plus | Eppendorf, Hamburg |
| Multipipette, 8-Kanal | Dunn, Ansbach |
| Neubauer Zählkammer | Roth, Karlsruhe |
| pH-Messgerät | WTW, Weilheim |
| Pipetman | Gilson, Villers-le-Bel, Frankreich |
| Pipettus akku | Hirschmann, Rottenburg |
| Präzisionswaage Mettler AT261 | Sartorius, Göttingen |
| Schüttler | Neolab, Heidelberg |
| Schutron Thermoshaker | Neolab, Heidelberg |
| Sterilbank Herasafe | Heraeus, Hanau |
| Taqman, ABI Prism 7000 | Applied Biosystems, Darmstadt |
| Ultrazentrifuge Sigma 3K30 | Braun Biotech, Melsungen |
| Vortexer Certomat [®] MV | Braun Biotech, Melsungen |
| Wasserbad Thermomix | Braun Biotech, Melsungen |

3.6 Software zur Auswertung

Tabelle 3.9 Software zur Auswertung

| Bezeichnung | Hersteller / Lieferant |
|---------------------------------|--|
| ABI Prism 7000 SDS Software 1.0 | Applied Biosystems, England |
| Calculusyn Software | Biosoft, Cambridge, England |
| CELLQuest™ | Becton Dickinson, Heidelberg |
| GraphPad Prism® | GraphPad Software, San Diego, USA |
| Microcal™ Origin (Version 6.0) | Microcal Software, Northampton, MA, USA |
| Microsoft® Excel 2000 | Microsoft Corporation, München |
| Primer Express™ 2.0 | Applied Biosystems, England |
| Sigma STAT (Version 2.03) | SPSS Inc., Erkrath |

3.7 Verwendete Arzneistoffe

Tabelle 3.10 Verwendete Arzneistoffe

| Bezeichnung | Hersteller / Lieferant |
|--------------------------|-------------------------------|
| Imatinibmesylat; Glivec® | Novartis Pharma, Basel |
| BIBR 1532 | Böhringer Ingelheim, Biberach |

3.8 Biologisches Untersuchungsmaterial

3.8.1 Zelllinien

3.8.1.1 BaF3 und BaF3p185

Die murine pro-B-Zelllinie BaF3 benötigt für ihr Wachstum und ihre Lebensfähigkeit Interleukin-3 (IL-3), während die retroviral mit BCR-ABL transduzierte BaF3p185 wachstumsfaktorunabhängig wächst. Beide Zelllinien wurden von Dr. Justus Duyster (TU München) zur Verfügung gestellt.

3.8.1.2 K562

Die humane BCR-ABL-positive K562 Zelllinie stammt aus dem pleuralen Erguss einer 53-jährigen Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie in myeloischer Blastenkrise (Lozzio and Lozzio, 1975). Die Zelllinie wurde von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSMZ) bezogen. Die K562 Zelllinie wird als undifferenzierte, multipotente, hämatopoetische maligne Zelllinie mit dem Potential zur spontanen Differenzierung in Vorläufer der erythrozytären, granulozytären oder monozytären Reihe dargestellt. Studien der Oberflächeneigenschaften beschreiben die K562 Zellen als humane Erythroleukämie (Andersson et al., 1979).

3.8.1.3 BV-173

Die humane BCR-ABL-positive Zelllinie BV-173 wurde aus dem peripheren Blut eines 45-jährigen Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie in lymphatischer Blastenkrise gewonnen. Die Zelllinie wurde von der DSMZ bezogen. Die Literatur beschreibt diese Zellen als B-Zell-Vorläuferleukämien (Pegoraro et al., 1983).

3.8.1.4 HL-60

Die humane BCR/ABL-negative Zelllinie HL-60 wurde aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen Patientin mit akuter myeloischer Leukämie (AML FAB M2) gewonnen (Collins et al., 1977; Dalton, Jr. et al., 1988). Bezugsquelle der HL-60 Zellen war die DSMZ. In Kultur differenzieren bis zu 10% der Zellen spontan in Myelozyten, Metamyelozyten oder Neutrophile (Collins et al., 1978).

3.8.2 Patientenkollektive

3.8.2.1 CML-Patienten

Untersuchung der Telomerlänge STI-behandelter und -unbehandelter CML-Patienten in Zusammenarbeit mit Fr. Dr. med. Inci Ersöz. Im Rahmen der prospektiven Multicenter-Studien CML III bzw. IIIA der Süddeutschen Hämoblastosegruppe unter der Studienleitung von Prof. Dr. R. Hehlmann sowie der multizentrischen STI 571-Phase-II-Studien (Leitung: Prof. Dr. A. Hochhaus, Mannheim) konnten im Zeitraum zwischen Oktober 1999 bis Januar 2002 von 206 CML-Patienten 517 Blutproben, die entweder bereits mit STI behandelt wurden oder bei denen im weiteren Verlauf ihrer Erkrankung eine STI-Monotherapie geplant war, für die hier vorgestellte Studie gewonnen werden.

Zur Telomerlängen-Bestimmung wurden 3-5 ml peripheres EDTA- oder Heparin-Blut benötigt, welches im Rahmen von Routineblutabnahmen im Einverständnis mit dem Patienten zusätzlich entnommen wurde und für den Patienten keine weitere körperliche Belastung darstellte. Da periphere Blutzellen bei Raumtemperatur 24-48 Stunden viabel sind, war es möglich die Analyse der Telomerlänge auch nach dem Erhalt der Proben über den Postweg durchzuführen. Die in die Studie eingeschlossenen Patienten waren zwischen 16 und 81 Jahre alt (Median 60 Jahre). Die folgende Tabelle enthält detaillierte Charakteristika der CML-Patienten.

Tabelle 3.11 Patienten-Charakteristika CML

| | | Patienten (n = 206) | Proben (n = 517) |
|------------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| Alter (Jahre) | Median (Range) | 59 (16 - 81) | |
| | > 60 Jahre (%) | 97 (47) | 242 (46.8) |
| Geschlecht | Männlich (%) | 114 (55.3) | 290 (56.1) |
| | Weiblich (%) | 92 (44.7) | 227 (43.9) |
| Zeit seit Diagnose (Monate) | Median (Range) | | 37 (0 - 311) |
| | | | |
| Krankheitsstadium | Chronische Phase (%) | 120 (58.3) | 321 (62.1) |
| | Akzelerierte Phase (%) | 50 (24.3) | 101 (19.5) |
| | Blastenkrise (%) | 40 (19.4) | 95 (18.4) |

| | Patienten (n = 206) | Proben (n = 517) |
|--|------------------------|---------------------|
| Verteilung, relativ zum Imatinib-Start: | | |
| <i>Vor Imatinib-Start (Median -2 Tage)</i> | | |
| Tag -355 bis -100 (%) | 10 | 17 (3.3) |
| Tag -100 bis 0 (%) | 86 | 107 (20.7) |
| <i>Nach Imatinib-Start (Median 144 Tage)</i> | | |
| Tag 1 bis 144 (%) | 133 | 197 (38.1) |
| Tag 145 bis 706 (%) | 117 | 196 (37.9) |
| Zytogenetisches Ansprechen (CR): | | |
| <i>alle (n = 246)</i> | | |
| Major CR (%) | 41 | 58 (23.6) |
| Minor CR (%) | 36 | 44 (17.9) |
| No CR (%) | 107 | 144 (58.5) |
| <i>Chronische Phase (CP), (n = 147)</i> | | |
| Major CR (%) | 32 | 47 (32.0) |
| Minor CR (%) | 22 | 28 (19.0) |
| No CR (%) | 52 | 72 (49.0) |
| <i>Akzelerierte Phase (AP), (n = 47)</i> | | |
| Major CR (%) | 6 | 8 (17.0) |
| Minor CR (%) | 8 | 8 (17.0) |
| No CR (%) | 25 | 31 (66.0) |
| <i>Blastenkrise (BC), (n = 52)</i> | | |
| Major CR (%) | 3 | 3 (5.8) |
| Minor CR (%) | 6 | 8 (15.4) |
| No CR (%) | 30 | 41 (78.8) |
| Interphase FISH (n = 204) | | |
| < 35% Ph+ (%) | 55 | 73 (35.8) |
| ≥ 35% Ph+ (%) | 103 | 131 (64.2) |
| Molekulares Ansprechen (n = 371) | | |
| <i>(ratio BCR-ABL/ABL)</i> | | |
| < 2% | 33 | 44 (11.9) |
| ≥ 2% bis < 14% | 43 | 49 (13.2) |
| ≥ 14% | 147 | 278 (74.9) |

3.8.2.2 AML-Patienten

Die Untersuchungen wurden an peripherem Blut oder Knochenmark von 137 untherapierten Patienten mit de novo oder therapiebedingter sekundärer akuter myeloischer Leukämie (AML) durchgeführt.

Das Material wurde nach Ficoll in flüssigem Stickstoff eingelagert und auf Trockeneis verschickt. Die Patienten waren zwischen 18 und 87 Jahren alt und hatten bei Diagnosestellung $\geq 80\%$ Blasten im Knochenmark.

Alle Patienten waren Teilnehmer der deutschen Multicenter-Studie AML-96 der Süddeutschen Hämoblastose Gruppe (Leitung: Prof. Dr. G. Ehninger, Dresden) und wurden nach dem Protokoll der SHG-AML-96 Studie (Schaich et al., 2001) behandelt. AML-Patienten mit Diagnose des Subtyps FAB M3 wurden nicht eingeschlossen, sondern mit anderen europäischen Studienprotokollen therapiert.

Genehmigt wurde die vorliegende Studie von der Ethikkommission der Universität Dresden (EK210396). Nach Aufklärung erteilten alle Patienten ihr Einverständnis zur Studie. Die folgende Tabelle dient der genauen Beschreibung detaillierter Charakteristika der Patienten.

Tabelle 3.12 Patienten-Charakteristika AML

WBC = Zahl der weißen Blutzellen in Gpt/l

CD34 Expression, positive Expression reflektiert mehr als 20% CD34-positive Blasten

| | | Patienten (n = 137) |
|---|--|---------------------|
| Alter (Jahre) | | |
| | Median (Range) | 58 (18 - 78) |
| | ≥ 60 Jahre (n =) | 79 |
| | > 60 Jahre (n =) | 58 |
| Krankheits-Stadium (n = 137) | | |
| | De novo AML | 125 |
| | Sekundäre AML | 12 |
| WBC | | |
| | Median Gpt / l (Range) | 48.0 (1.2 - 372.0) |
| Blasten im Knochenmark | | |
| | Median % (Range) | 87% (80 - 99) |
| CD34 Expression (n = 128) | | |
| | Median % (Range) | 22% (0 - 98) |
| | ≥ 20% (n =) | 65 |
| | < 20% (n =) | 63 |
| Ration FLT3-ITD Mutant/Wildtyp (n = 131) | | |
| | > 0.8 | 21 |
| | ≤ 0.8 | 110 |
| FAB Subtypen (n = 137) | | |
| | M0 | 11 |
| | M1 | 68 |
| | M2 | 7 |
| | M4 | 8 |
| | M4eo | 4 |
| | M5 | 38 |
| | M7 | 1 |
| Anzahl der Aberrationen (n = 137) | | |
| | Normaler Karyotyp | 87 |
| | Eine oder zwei unabhängige Abberationen | 36 |
| | Mehrere (z.B. ≥ drei) unabhängige Abberationen | 13 |
| Zytogenetik (n = 137) | | |
| | Günstig | 7 |
| | Mittel | 116 |
| | Ungünstig | 14 |

3.9 Zellbiologische Methoden

3.9.1 Kultivierung der Zellen

Die verwendeten Suspensionskulturen wurden in RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM nichtessentielle Aminosäuren, 50 U Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Das Passagieren der Zellen erfolgte in regelmäßigen Abständen (Montag, Mittwoch, Freitag). Dazu wurden die Zellen bei 1400 U/min (Heraeus Megafuge 3.0 R) und 20°C für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet in 2 ml Kulturmedium resuspendiert.

Nach dem Bestimmen der Zellzahl wurden die Zellen in Medium resuspendiert und in der gewünschten Dichte ausgesät. Den Ansätzen der wachstumsfaktorabhängigen Zelllinie BaF3 wurde 3 µl murines Interleukin 3 (m-IL-3) zugesetzt.

3.9.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der „Neubauer“-Zählkammer. Dazu wurden 10 µl der jeweiligen Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:5 resuspendiert. Das verwendete Trypanblau färbte dabei lediglich die toten Zellen, da lebende Zellen im Stande sind den Farbstoff aktiv zu eliminieren. Nach der Vitalfärbung wurden die Zellen in die Neubauer-Zählkammer überführt und gezählt, sowie der Anteil lebender und toter Zellen der Zellkultur bestimmt. Die Zellkonzentration ergibt sich aus der Multiplikation von Zellzahl, Verdünnungsfaktor und Kammerfaktor (10^4). Die Formel zur Bestimmung der Zellzahl nach Neubauer lautet dementsprechend:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Anzahl der Zellen/Anzahl der ausgezählten Quadrate}) \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

3.9.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellsuspensionen, welche nicht am selben Tag verarbeitet werden sollten, wurden bei -80°C tiefgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C bis zur Analyse gelagert. Zur Verwendung kam als Einfriermedium, die vorher beschriebene DMSO-Lösung, bestehend aus je 40% RPMI 1640 und

FCS sowie 20% DMSO, verwendet. Dazu wurde die Zellsuspension mit dem Einfriermedium im Verhältnis 1:1 gemischt, sofort bei -80°C eingefroren und in den flüssigen Stickstoff überführt. Werden die Zellen nur für kurze Zeit gelagert, kann dies auch bei -80°C geschehen.

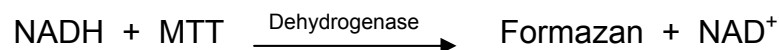
Da das Auftauen der Zellen so schnell wie möglich vonstatten gehen sollte, wurden die Kryo-Röhrchen mit der Zellsuspension direkt aus dem flüssigen Stickstoff oder dem Tiefkühlschrank (-80°C) in das Wasserbad mit 37°C gestellt. Nach dem Resuspendieren der Zellen im Auftaumedium wurden sie mit 1400 U/min für 5 min bei 4°C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 3.0 R). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zell-Pellet in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Bestimmung der Zellvitalität und der Zellzahl erfolgte über Trypanblau-Färbung und die Neubauer-Zählkammer.

3.10 MTT-Assay

3.10.1 Prinzip

Mittels eines Zytotoxizitäts-Assays, dem MTT-Assay wurde die Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen unter Einfluss von Imatinib in unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt. Der MTT-Assay misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen unabhängig davon, ob sie zum Analysezeitpunkt DNA synthetisieren oder nicht.

Das schwach gelbe Tetrazoliumsalz MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid] wird von den Zellen aufgenommen. Dabei wird es durch NADH in einer succinat-abhängigen Dehydrogenasen-katalysierten Reaktion der aktiven Mitochondrien zum blau-violette Formazan [1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan] reduziert.



Diese Reaktion ist irreversibel. Das Formazan bildet sich in Form kleiner Nadeln in der Zelle. Das Detergens Sodiumdodecylsulfat (SDS) lysiert die Zellen und setzt dadurch das gebildete Formazan frei. Die Intensität der alkoholischen Formazanlösung wird anschließend photometrisch bei 570 nm am ELISA-Reader gemessen. Die Höhe der Absorption ist dabei proportional zur mitochondrialen Aktivität der Zellen.

3.10.2 Durchführung

Zur Durchführung des Testes wurden die zu untersuchenden Zelllinien in einer Konzentration von 1.5×10^4 Zellen / Vertiefung (Well) in 150 μ l des entsprechenden Zellmediums in „96-Well-Platten“ mit flachem Boden ausgesät. Nach einer Vorinkubation von 24 Stunden bei 37°C, wurde die Zellsuspension mit 50 μ l der Arzneistoff-Lösung in steigenden Konzentrationen versetzt. Jede Konzentrationsstufe wurde dabei dreifach angesetzt.

Jeweils 3 Wells mit Kulturmedium ohne Zellsuspension und Arzneistoff dienten dabei als Hintergrund, sowie 3 Wells mit Zellsuspension ohne Arzneistoff als Nullwert. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C, wurde jedem Well 10 μ l einer 10 mg/ml MTT-Lösung zugesetzt.

Anschließend folgte eine zweistündige Inkubation der Platten im Brutschrank und danach die Freisetzung des gebildeten Formazans durch Auflösen der Zellen mit 90 μ l Lyse-Puffer (15% SDS in Dimethylformamid / Wasser 1:1; pH 4.5) unter Schütteln über Nacht. Die Absorption der Proben wurde mittels eines ELISA-Readers (ELISA-Reader Dynatech MR7000) bei 570 nm gegen eine Referenz-Wellenlänge von 690 nm gemessen, wobei die Intensität der Farbentwicklung im direkten Verhältnis zur Anzahl proliferierender Zellen steht.

3.10.3 Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung

Nach Abzug des Mittelwertes der Hintergrund-Absorption von dem Mittelwert der jeweiligen Absorptionen einzelner Arzneistoff-Konzentrationen wurde der erhaltene Wert für die Kalkulation der Wachstumshemmung benutzt.

$$(A) \quad F_a = 1 - [MW A_{\text{behandelte Probe}} / MW A_{\text{unbehandelte Probe}}]$$

Der F_a -Wert (fraction affected) von 0.5 ist dabei der Arzneistoff-Konzentration, welche eine Wachstumshemmung von 50% verursacht und damit auch dem IC_{50} gleichzusetzen.

Die Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehungen und die Bestimmung des IC_{50} wurden mit Hilfe der Calcsyn-Software, nach der „median-effect method“ von Chou und Talalay (1981; 1984) durchgeführt. Die sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve wurde mittels folgender Gleichung linearisiert:

$$(B) \quad F_a / F_u = (D / D_m)^m \quad \text{oder} \quad \log(F_a / F_u) = m \log(D) - m \log(D_m)$$

In dieser Gleichung entspricht:

D = Dosis des AM

D_m = mittlere effektive Dosis (IC_{50} oder $F_a = 0.5$),
entspricht der Potenz der Substanz und wird durch den Schnittpunkt
mit der x-Achse dargestellt

F_a = Fraktion, welche von dem Arzneistoff beeinträchtigt wird

F_u = Fraktion, welche durch den Arzneistoff nicht beeinträchtigt wird
 $F_u = 1 - F_a$

m = Koeffizient (Form der Kurve)

Erzeugt man, basierend auf die logarithmische Form der Gleichung (B) eine grafische Darstellung mit dem x- und y-Achsen-Abschnitt:

$$x = \log(D) \quad \text{und} \quad y = \log(F_a / F_u)$$

erhält man eine Gerade, sofern die Dosis-Wirkungsbeziehung den Prinzipien des Massen-Wirkungs-Gesetzes gehorcht. Der lineare Korrelationskoeffizient r wird für jede Kurve bestimmt, um die Anwendbarkeit dieser Analysen-Methode für die entsprechenden Daten zu prüfen.

Durch das Umstellen der Gleichung (B) erhält man alternative Formen der Gleichung (C) und (D), mit deren Hilfe die Dosis des Arzneistoffes (C) oder der erreichte Effekt (F_a) ermittelt werden kann.

$$(C) \quad D = D_m [F_a / (1 - F_a)]^{1/m}$$

$$(D) \quad F_a = 1 / [1 + (D_m / D)^m]$$

Zur Anwendung kommt diese Methode der Berechnung bei der Bestimmung verschiedener Dosis-Wirkungs-Beziehungen für unterschiedliche Arzneistoffe und Zellarten.

3.11 Apoptose-Assay nach Nicoletti

3.11.1 Prinzip

Die durchflusszytometrische Bestimmung des programmierten Zelltodes (Apoptose) beruht auf der Messung des zellulären DNA-Gehaltes.

Während der Apoptose kommt es durch die Aktivierung endogener Nukleasen und anschließender enzymatischer Verdauung zur charakteristischen Fragmentierung der DNA in Bruchstücke von oligonukleosomaler (≥ 180 bp) Größe. Kleinere DNA-Fragmente sind nun in der Lage aus dem Kern in das Zytoplasma zu diffundieren, während größere Fragmente im Nukleus zurückbleiben. Da die Zellmembran apoptotischer Zellen vorerst erhalten bleibt, werden diese kleineren DNA-Bruchstücke in der Zelle zurückgehalten.

Die Behandlung der Zellen mit dem Detergenz ermöglicht eine Permeabilisierung der Kernmembran, eine Auflockerung des Chromatins und eine bessere Anlagerung des Fluoreszenz-Farbstoffes Propidium Iodid. Durch die permeabilisierte Zellmembran wird die Herstellung der Kernsuspension mit Hilfe des hypotonen Puffers erleichtert.

Die anschließende Freisetzung der DNA-Fragmente führt zum reduzierten DNA-Gehalt apoptotischer Zellpopulationen und zur Identifikation der zellulären DNA im Histogramm als Sub-G1-Peak (Nicoletti et al., 1991). Da die durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes auch Informationen über die Zellzyklusverteilung nichtapoptotischer Zellen liefert, sind anhand dieser Untersuchungsmethode auch Aussagen über die Zellzykluspezifität der apoptoseinduzierenden Substanz möglich.

3.11.2 Durchführung

Vor Durchführung des Apoptose-Assays wurden die verwendeten Zellen in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen / Well in 24-Well-Platten für 24 Stunden bei 37°C vorinkubiert. Nach Zugabe von 1 μ M Imatinib inkubierten die Zellen zeitabhängig von 2 bis 21 Stunden. Als Ausgangswert wurden die entsprechenden Zellen ohne Arzneistoff verwendet. Nach Ernte der Zellen wurden diese mit 1 ml PBS gewaschen und danach mit 200 μ l des hypotonen Lyse-Puffers versetzt (0.1% Natriumcitrat, 0.1% Triton X-100, 50 μ g Propidium Iodid pro ml) und resuspendiert.

Die erhaltene Kernsuspension wurde danach durchflusszytometrisch am FACS-Calibur™ gemessen und mit Hilfe der CELLquest™ Software ausgewertet.

3.12 Immunfluoreszenz

3.12.1 Prinzip

Durch stabile Konjugation von Antikörpern mit einem Fluorochrom, gelang es die hohe Nachweisempfindlichkeit fluoreszenzmikroskopischer Methoden mit der strengen Spezifität serologischer Verfahren zu verbinden (Coons, 1960).

In diesem Versuch wurde die indirekte Methode verwendet (Weller and Coons, 1954). Dabei beinhaltet die erste Reaktion die Verbindung des Antikörpers (Ak) mit dem Antigen. Bei der zweiten Reaktion wird ein Fluorochrom-markierter Antikörper, welcher sich spezies-spezifisch gegen den FC-Teil des ersten unmarkierten Antikörpers richtet, zugegeben.

3.12.2 Durchführung

Für die Immunfluoreszenz wurde die BCR-ABL-positive Transfektante BaF3p185 verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unbehandelt, mit 10 µM Imatinib oder mit 10 µM Imatinib und 0,1 µg/ml m-Interleukin-3. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und 1×10^5 Zellen / 100µl bei 800 U/min, 3 Minuten lang in der Zytocentrifuge (Cytospin 2, Shandon) zentrifugiert.

Die Zellen wurden auf den Objektträgern mit 3.7% Formaldehyd-Lösung 15 Minuten fixiert und anschließend mit Hilfe von 0.1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen der Zellmembran wurden durch 30-minütige Inkubation mit 3% Milchpulver in PBS / 0.1% Triton-X-100 bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach weiterem 3-maligen Waschen mit PBS / 0.1% Triton-X-100 inkubierten die Zellen bei Raumtemperatur weitere 60 Minuten mit dem ersten Antikörper: anti-c-ABL Ab-2 (2 µg/ml) und wurden anschließend nach erneutem 3-maligem Waschen mit PBS / 0.1% Triton-X-100 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markierten Ziegen-Anti-Maus-Antikörper inkubiert.

Nach einminütiger DNA-Färbung der Zellen mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) (2 ng/ml) bei Raumtemperatur, wurden die Deckgläser mit Flour-Save Mounting Lösung auf den Objektträgern fixiert. Zur Versiegelung wurden

die Deckgläser mit Nagellack umrandet und die Objektträger anschließend bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Je Präparat wurden in 3 unabhängigen Versuchen 10 zwei-dimensionalen Fluoreszenz-Bilder digital mit einer 0.60X HRD060-NIK CCD-Kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights) an einem Axiovert Mikroskop aufgenommen.

3.13 Telomerlängen-Analyse mittels quantitativer Fluoreszenz - in-situ-Hybridisierung (Flow FISH)

3.13.1 Prinzip

Die durchschnittliche Länge der Telomersequenzen an den Enden der Chromosomen wurde mittels Flow FISH ermittelt.

Diese im Labor von Peter Lansdorp durch Rufer und Brümmendorf et al. weiterentwickelte Methode stellt eine Kombination aus Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) dar (Rufer et al., 1998; Rufer et al., 1999). Zur quantitativen Hybridisierung der Telomer-Repeats wird eine FITC-markierte Peptid-Nukleinsäure (PNA-Sonde), komplementär zur Basensequenz der Telomer-DNA, verwendet. PNA Oligonukleotide zeichnen sich gegenüber herkömmlichen DNA Oligonukleotiden durch eine thermostabile Bindung an die Ziel-DNA aus, welche zu einer quantitativen Hybridisierung auch bei niedriger Ionenspannung führt. Somit können Hybridisierungsbedingungen gewählt werden, die eine spezifische und quantitative Bindung der Probe unter Vermeidung von unspezifischer Autohybridisierung erlauben (Martens et al., 1998).

Mit der Durchflusszytometrie werden die in Suspension vorliegenden Interphasezellen anschließend nach Größe und Granularität beurteilt. Die telomerspezifische Fluoreszenz kann mit dieser Methode bei überwiegend erhaltener Morphologie der Zellpopulation am FACS-Calibur™ schnell und reproduzierbar ausgewertet werden.

Mit dieser Methode (Flow FISH) ist die Analyse deutlich größerer Probenmengen zu bewältigen, was die Beantwortung einer Vielzahl von Fragen in der gesunden und malignen Hämatopoese ermöglicht hat.

3.13.2 Aufarbeitung des Probenmaterials

3.13.2.1 Aufarbeitung von frischem Probenmaterial (Blutproben)

Blutproben der Blutspender und der CML-Patienten wurden nach dem „alten Flow FISH Protokoll“ frisch verarbeitet.

Dabei versetzte man das EDTA-Blut im Verhältnis 1:4 mit Ammoniumchlorid-Lösung, wodurch die Erythrozyten osmotisch lysiert wurden. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 1200 U/min (Heraeus Megafuge 3.0 R) bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die kernhaltigen Leukozyten noch zwei Mal in je 1 ml Ammoniumchlorid resuspendiert, 5 min inkubiert und bei 12000 U/min in der Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge 15) bei Raumtemperatur für 5 sek abzentrifugiert. Diese Lyse- und Waschschrte sind zur vollständigen Entfernung der Erythrozyten, von Erythrozytenresten oder Hämoglobin notwendig, da diese bei der späteren durchflusszytometrischen Messung mit der Telomerfluoreszenz interferieren könnten.

Der im Anschluss an den dritten Lyse-Schritt gewonnene Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml PBS und 0.1% BSA resuspendiert. Die Zellzahl und Zellvitalität der Proben wurde mittels Trypanblaufärbung und Neubauerzählkammer bestimmt.

3.13.2.2 Aufarbeitung von tiefgefrorenem Probenmaterial

Zellkulturen und AML-Proben wurden nicht frisch, sondern nach dem Auftauen der Proben in Auftaulösung mit dem neuen Flow FISH Protokoll verarbeitet. Dazu resuspendierte man das nach dem Auftauen erhaltene Zellpellet in 1 ml Aufnahmepuffer und ermittelte mittels Trypanblaufärbung und Neubauer Zählkammer die Zellzahl und Viabilität der Zellen.

3.13.3 Weiterverarbeitung der Proben nach „altem Flow FISH Protokoll“

3.13.3.1 Präzisionskontrolle und externer Standard

Zur Qualitätssicherung der erhobenen Ergebnisse wurde eine Präzisionskontrolle in Anlehnung an die CUL (Clinically useful limits) -Kriterien

von Schoen et al. (1989) durchgeführt. Die Präzision beschreibt die gegenseitige Annäherung voneinander unabhängiger Messergebnisse bei mehrfacher Anwendung einer Methode und macht Aussagen über die Zuverlässigkeit einer Methode, die durch verschiedene Personen, mit verschiedenen Geräten und an verschiedenen Tagen durchgeführt wird.

Sie ist Kenngröße für den zufälligen Fehler, der prinzipiell bei jeder Analyse unvermeidbar ist und auf verschiedenen Faktoren, wie z.B. Temperaturschwankungen während der Inkubation, Anzahl der Pipettierschritte, Stabilität des Messgerätes und menschliche Fehler, beruhen kann. Ausgedrückt wird die Präzision durch Standardabweichung und Variationskoeffizient.

Als externer Standard kamen mononukleäre Zellen aus unterschiedlichen Buffy Coats gesunder Spender zur Anwendung, welche jede für sich eine Kontrollpopulation darstellte, die bei bis zu 100 Testreihen mitgeführt werden konnte. Die ficollisierten, mononukleären Zellen jedes einzelnen Buffy Coats wurden zu diesem Zweck in Aliquots von etwa 3×10^7 Zellen eingefroren. Für jede Messreihe wurde je ein Aliquot von mindestens zwei unterschiedlichen Buffy Coats aufgetaut, welche wie die zu untersuchenden Proben nach Protokoll (siehe folgend) weiterverarbeitet und mitgemessen wurden.

3.13.3.2 Denaturierung der DNA und *in-situ*-Hybridisierung

Für jede Probe wurden Doppelwerte angesetzt, um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Telomerlängenbestimmung überprüfen zu können. Da die Zellen eine Eigenfluoreszenz besitzen, die sich bei der Messung zu der telomerspezifischen Fluoreszenz addieren und damit falsch hohe Ergebnisse ergeben würden, musste bei jeder Probe ein sogenannter „Leerwert“ (unstained, unst.) mitgemessen werden. Dieser gibt die Eigenfluoreszenz der Zellen wieder und wurde von der gemessenen mittleren Fluoreszenz der mit PNA-Probe hybridisierten Zellen subtrahiert, um die zellspezifische Telomerfluoreszenz zu erhalten.

Somit wurden zur Telomerlängenbestimmung pro Probe in vier 1.5 ml Eppendorf Röhrchen je 2×10^5 Zellen eingesetzt: Je zwei Röhrchen für den Ansatz mit („telomere“) bzw. ohne („unstained“) PNA-Probe. Nach dem Abzentrifugieren mit 12000 U/min (Biofuge 15) bei Raumtemperatur für wenige Sekunden, wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit Hybridisierungsansatz resuspendiert. Zur Bestimmung der Telomerfluoreszenz enthielt der Hybridisierungsmix telomerspezifische FITC-markierte PNA-Probe. Zur Verwendung kamen 100 μ l Hybridisierungsmix pro 10^5 Zellen. Der Ansatz

wurde mit einer Pipettenspitze gut resuspendiert und im Thermoshaker für 10 Minuten bei 80°C denaturiert und anschließend für 60 bis 90 Minuten zur Hybridisierung bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen, um ein spezifisches Binden der im Überschuss vorhandenen FITC-markierten PNA-Probe an die Telomersequenzen zu ermöglichen.

Um überschüssige und unspezifisch gebundene PNA-Probe zu entfernen, folgten zwei Waschschrte, in denen die Proben mit je 1 ml Waschpuffer 1 versetzt und resuspendiert wurden. Bei 2800 U/min für 10 Minuten wurden die Ansätze in der Megafuge (Heraeus) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 100 µl abgesaugt und nochmals mit 1 ml Waschpuffer 1 gewaschen, resuspendiert und zentrifugiert (s.o.). Anschließend wurden die Proben mit dem Waschpuffer 2 gemischt und bei 2000 U/min für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Megafuge Heraeus) und der Überstand auf 50 µl abgenommen.

3.13.3.3 DNA-Färbung mit Propidium Iodid (PI)

Nach dem letzten Waschschrte erfolgte die Färbung der DNA mit Propidium Iodid (PI), um diploide Zellen (2N) von polyploiden Zellen oder Zellen in S- oder G₂M-Phase (4N) zu trennen. Dazu wurden die Zellen in einer Lösung aus 0.1% BSA; 1000 U/ml RNase T1; 0.06 µg/ml Propidium Iodid sowie PBS resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Da sich die Emissionspektren der Fluoreszenzfarbstoffe FITC und PI bei einer bestimmten Konzentration überschneiden, wurde die PI-Konzentration suboptimal gewählt, so dass eine Interaktion zwischen emittierter DNA-Fluoreszenz (Propidium Iodid) und spezifischer Telomerfluoreszenz (FITC) vermieden werden konnte. Falls die durchflußzytometrische Analyse nicht am gleichen Tag erfolgen konnte, wurden die Zellen bei 4°C im Kühlschrank bis zum nächsten Tag aufbewahrt.

3.13.4 Änderungen des „Neuen Flow FISH Protokolls“ (Baerlocher et al., 2002)

3.13.4.1 Rinder-Thymozyten als Interne Kontrolle

Eine wesentliche Verbesserung des „Neuen Flow-FISH Protokolls“ wurde durch die Verwendung von Rinder-Thymozyten als interner Standard erreicht. Dazu wurde frischer Rinder-Thymus zerkleinert und zu einer Einzelzell-Suspension

verarbeitet. Nach 10-minütiger Fixierung der Thymozyten in 3.7% Formaldehyd wurden die Zellen zwei mal mit RPMI 1640 gewaschen und anschließend als Aliquotes bei -80°C in Einfriermedium eingefroren (Baerlocher et al., 2002; Baerlocher and Lansdorp, 2003).

3.13.4.2 Denaturierung der DNA und in-situ-Hybridisierung

Als interne Kontrolle wurden im neuen Protokoll 1×10^5 Thymozyten zu jedem Ansatz pipettiert und mit der Probe resuspendiert. Die Endzellzahl betrug damit 3×10^5 Zellen, welche nach Zentrifugation bei 15 000 U/min für 30 sek bei Raumtemperatur (Biofuge 15, Heraeus) und Absaugen des Überstandes mit 300 μl des Hybridisierungs-Ansatzes resuspendiert wurden.

Der Hybridisierungsmix enthielt im Gegensatz zum alten Protokoll zusätzlich 20mM NaCl und statt 70% nun 75% deionisiertes Formamid, während die restlichen Bestandteile unverändert blieben. Mit Erhöhung der Denaturierungstemperatur auf 85°C , Verlängerung der Denaturierungszeit auf 15 min und einer Hybridisierungszeit von mindestens 90 min bei Raumtemperatur wurde eine Optimierung der DNA-Denaturierung und Hybridisierung mit der PNA-Probe erreicht (Baerlocher et al., 2002).

Die Denaturierung im zirkulierenden Wasserbad erlaubte eine gleichmäßige Verteilung der Temperaturen in allen Proben, was bei Verwendung des Thermoshakers nicht in gleichem Maß möglich war.

Um überschüssige PNA-Probe sicher zu entfernen, wurde die Zusammensetzung der Waschpuffer und die Anzahl der Waschschriffe im neuen Protokoll verändert. Im Gegensatz zum alten Protokoll enthielt der neue Waschpuffer 1 nun 75% Formamid; 10 mM Tris; 1% BSA und 1% Tween 20 sowie deionisiertes Wasser. Die Proben wurden insgesamt 4 mal mit 1 ml Waschpuffer 1 gewaschen und anschließend bei 2000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert (Megafuge Heraeus). Der letzte Waschschriff erfolgte mit Waschpuffer 2, welcher 1% BSA; 1% Tween 20; 10 mM Hepes-Puffer sowie deionisiertes Wasser enthielt, und anschließender Zentrifugation bei 4°C für 10 min. Mit Waschlösung 2 konnten die Zellen über Nacht im Kühlschrank bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt werden.

3.13.4.3 DNA-Färbung mit LDS 751

Ein optimaler DNA-Farbstoff für Flow FISH sollte spezifisch und fest an die denaturierte DNA binden, die Diskriminierung zwischen 2N und 4N Zellen erlauben und nicht mit dem Emissionsspektrum von FITC interferieren.

Während Propidium Iodid nicht alle genannten Eigenschaften erfüllte, waren LDS 751 in niedrigen Konzentrationen von 0.01 µg/ml und DAPI (0.01 - 1 µg/ml) die einzigen DNA-Farbstoffe, welche nicht nennenswert mit FITC der PNA-Probe interferieren.

Die neue DNA-Färbelösung enthielt neben 0.1% BSA; 10 µg/ml RNase A und PBS nun LDS 751 in einer Konzentration von 0.1 µg/ml. Die Proben wurden mit der Färbelösung resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur 20 min bis zur Messung inkubiert.

3.13.5 Automatisierung

Im Gegensatz zu anderen Protokollen, bietet die Flow FISH Methode die Möglichkeit einige Schritte zu standardisieren und zu beschleunigen. Vor allem sich wiederholende Schritte, wie das Dispensieren der Zellsuspension, von Waschlösungen und anderen Lösungen lassen sich einfach automatisieren. Baerlocher et al. beschrieben den Hydra Microdispenser von Robbin Scientific als Automat mit 96 Spritzen in Standard-Array-Format.

Dieses Gerät konnte programmiert werden, genau und fehlerfrei Lösungen, Reagenzien und Zellsuspensionen im µl-Bereich zu dispensieren, aspirieren und zu mischen. Sie adaptierten einige Flow FISH Schritte für den Gebrauch der Hydra und reduzierten somit die Schwankungen der Telomerlängen-Messung des Flow FISH Protokolls. Diese Automatisierung des Flow FISH Protokolls wurde in das neue Protokoll übernommen, was die Möglichkeit große Probenanzahlen zu bearbeiten verbesserte.

3.13.6 Messung

An dem FACSCalibur (Becton Dickinson) konnte mittels Durchflußzytometrie die Telomer-Fluoreszenz der Proben bestimmt werden. Das Messprinzip der Durchflußzytometrie beruht auf der Methode der hydrodynamischen Fokussierung, d.h. die mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Partikel werden kontinuierlich hintereinander an einer Lichtquelle vorbeigeführt. Als Lichtquelle dient ein Laser, welcher sich wegen der guten Bündelung des Strahls und der Enge und Gleichförmigkeit des Farbspektrums dafür eignet. Das im Kreuzungspunkt zwischen dem Lichtstrahl und der Zelle entstehende Streulicht wird in verschiedenen Raumwinkeln ausgewertet und somit die unterschiedlichen Eigenschaften der Zellen wiedergegeben.

Die Streulichteigenschaften sind stark abhängig von der Wellenlänge des Lichts und der Partikelgröße. So wird im Engwinkel zum Laserstrahl, in Vorwärtsrichtung, entlang des einfallenden Lichtstrahls, (forward light scatter; FSC) die Zellgröße und im rechten Winkel (side scatter; SSC) die Zelldichte und Granularität bestimmt. Die FITC-markierte PNA-Probe wird nun mit dem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die daraus resultierende Telomerfluoreszenz im FL1-Kanal gemessen.

Um Daten verschiedener Experimente an unterschiedlichen Tagen zu vergleichen und um tägliche Schwankungen der einzelnen Komponenten des Durchflußzytometers, sowie Abweichungen der Laserintensität und -ausrichtung korrigieren zu können, wurden zu Beginn eines jeden Experimentes FITC-markierte „beads“ (Flow Cytometry Standards Corporation) in PBS gemessen.

Die „Bead“-Lösung enthält vier Teilchen-Populationen, dessen Fluoreszenz mit unterschiedlichen, bekannten Mengen an MESF-Einheiten (molecules of equivalent soluble fluorochrome), in der Größenordnung von 3 000 bis 50 000 korrespondieren. Die mittlere Fluoreszenz jedes der vier verschiedenen Fluoreszenz-Peaks wurde zur Ermittlung einer Eichkurve und damit zur Konvertierung der ermittelten Telomerfluoreszenz in MESF-Einheiten genutzt. Diese Korrektur der Werte erlaubte den Vergleich unter den einzelnen Experimenten.

3.13.7 Auswertung

3.13.7.1 Altes Flow FISH Protokoll

Bei der Auswertung mit dem Programm CELLQuest (Becton Dickinson) wurde die 2N-Population der Zellen (Abbildung 11: Region 1; R1 in Dot-Plot A) auf Basis der DNA-Fluoreszenz und Größe (FSC) eingegatet. Trennt man die Probe nach Größe (forward light scatter, FSC) und Granularität (side scatter, SSC) auf, so zeigen sich zwei Subpopulationen der Leukozyten, Lymphozyten (R2 in Dot-Plot B) und Granulozyten (R3 in Dot-Plot B). Die dazugehörigen Histogramme geben zum einen die Eigenfluoreszenz (hellgrau in Histogramm C und D) und zum anderen die Telomerfluoreszenz der Zellen (dunkelgrau in Histogramm C und D) in Kanälen wieder. Die mittlere spezifische Telomerfluoreszenz der Zellen wurde durch Subtrahieren der durchschnittlichen Fluoreszenz der Leerwerte (Probenansatz ohne PNA-Probe) von den durchschnittlichen Fluoreszenzwerten des gleichen, aber mit der FITC-

markierten PNA-Probe hybridisierten Probenansatzes ermittelt (horizontale Linien in Histogramm C und D).

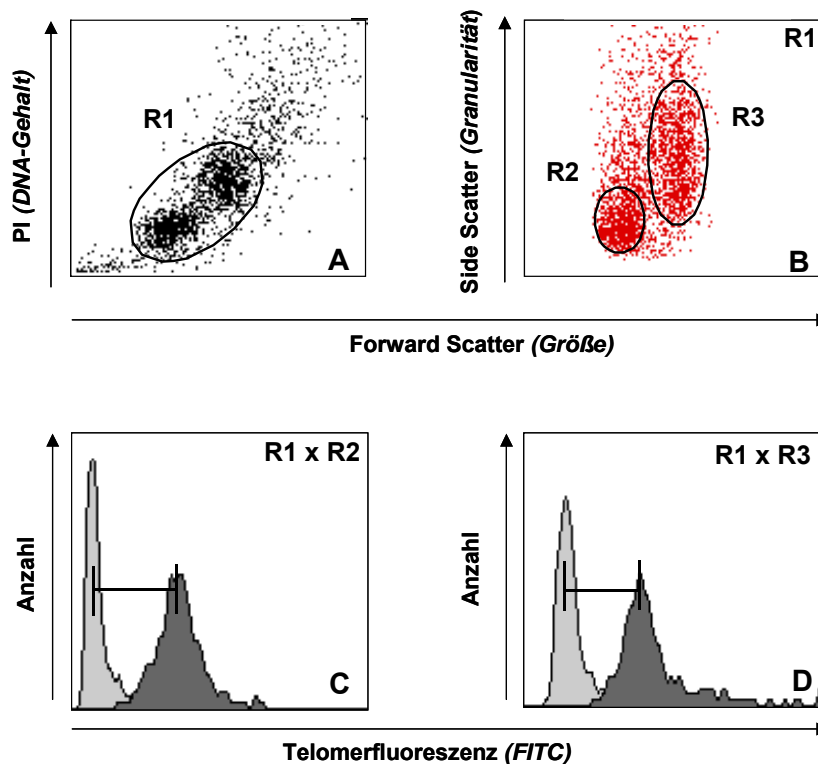


Abbildung 11 Auswertung der Telomerfluoreszenzen am Beispiel von Leukozyten- Subpopulationen (nach altem Flow FISH Protokoll)

Zur Umrechnung der mittleren Telomerfluoreszenz von Lymphozyten oder Granulozyten in kMESF wurden diese Differenzen durch 10^3 und durch die Steigung (slope) der Geraden, welche aus den gemessenen Fluoreszenzen der FITC-markierten Kalibrationsbeads erhoben wurden, dividiert:

(A)
$$\text{Telomerlänge in kMESF} = \frac{\text{gemessene Kanäle}}{1000 / \text{Steigung}}$$
 (bei einer Messung in FL1 von 775×4)

Da die Telomerlänge einen altersabhängigen Parameter darstellt, ist es erforderlich eine Altersadaptation der individuellen Messungen durch Vergleich mit Messungen in gesunden Kontrollindividuen durchzuführen. Daher wurden die erhaltenen Ergebnisse der Proben mit den Telomerlängen der altersadaptierten gesunden Kontrollpopulation, die von Rufer und Brümmendorf *et al.* (1999) beschrieben wurde, verglichen.

Errechnet wurden diese Werte der altersadaptierten Kontrolle mit den Formeln:

- (B) Granulozyten = $15.96 - 0.079 \times \text{Alter}$
 (C) Lymphozyten = $18.48 - 0.119 \times \text{Alter}$

Die Differenz (age-adjusted telomere length, deltaTel) aus diesem Vergleich verdeutlichte dann das Ausmaß der Telomerverkürzung der Probanden gegenüber der gesunden Kontrollperson des gleichen Alters (Rufer et al., 1999)

3.13.7.2 Änderungen im neuen Flow FISH Protokoll

Im Unterschied zu den Auswertungen des alten Flow FISH Protokolls, wurde beim neuen Protokoll zusätzlich die interne Kontrolle ausgewertet (Abbildung 12: R2 in Dot-Plot A) und nach Größe und Granularität aufgetrennt (R5 in Dot-Plot C). Das dazugehörige Histogramm (F) zeigt ebenfalls die Differenz zwischen Eigenfluoreszenz (hellgrauer Peak) und Telomerfluoreszenz (dunkelgrauer Peak)

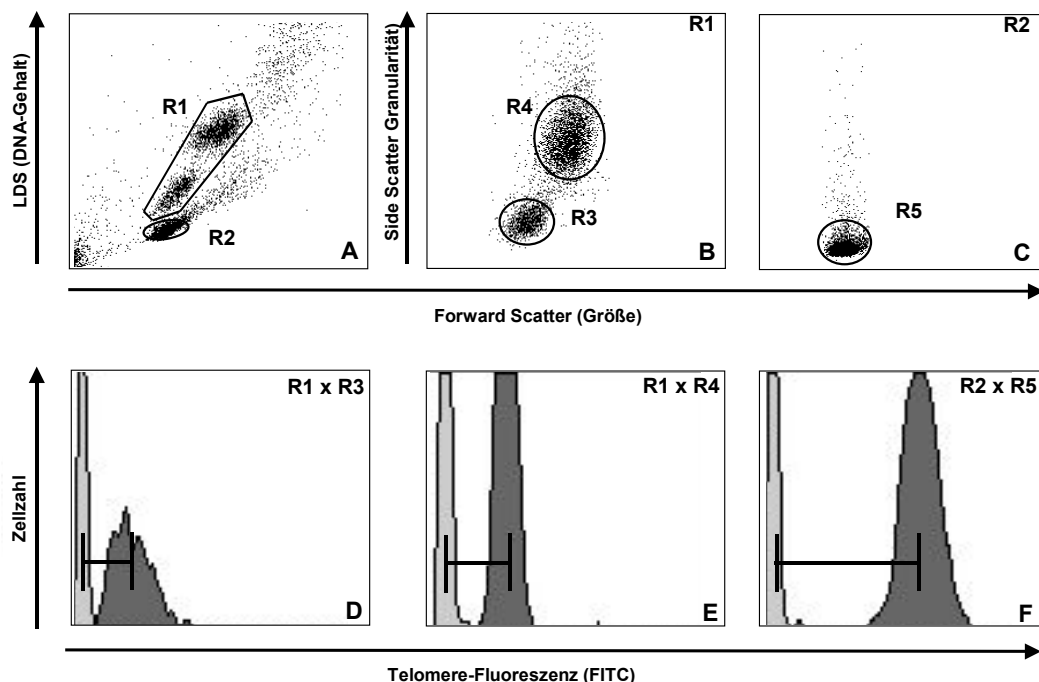


Abbildung 12 Beispiel einer Telomerfluoreszenz-Messung am Beispiel eines gesunden Spenders

Um für die täglichen Schwankungen in der Hybridisierungseffizienz zu korrigieren wurden im neuen Protokoll Rinder-Thymozyten als interne Kontrolle eingesetzt. Dabei wird der ermittelte mittlere kMESF-Wert der Probe mit dem mittleren kMESF-Wert der zugehörigen internen Kontrolle dividiert. Man erhält die relative Telomerlänge. Die Kalkulation der TFU (Telomere Fluoreszenz Units = 1 kb) erfolgte basierend auf Southern Blot Analysen der Rinder Thymozyten. Die relative Telomerlängen wurden mit dem Faktor 19.515 kb (Mittelwert der Southern Blot Analysen des Rinder-Thymus) multipliziert.

3.13.8 Plausibilitätskontrolle

Die Plausibilitätskontrolle betrifft die Kontrolle des Musters der Analysenwerte eines Patienten. Sie soll Diskrepanzen und unplausible Ergebniskonstellationen durch Extremwertkontrolle, Konstellationskontrolle oder Vorwertvergleich aufdecken und eliminieren dürfen. In einigen seltenen Fällen wurden Werte innerhalb einer Testreihe aufgrund ihrer Unplausibilität ausgeschlossen, z.B. wurden Proben, bei denen nach durchflußzytometrischen Kriterien keine eindeutige Population oder kein eindeutiger Peak zuzuordnen waren, nicht berücksichtigt.

3.14 Bestimmung der Telomerase-Aktivität (TRAP-Assay)

3.14.1 Prinzip

Die Methode des „Telomeric Repeat Amplification Protocol“ (TRAP) zur Bestimmung der Telomerase-Aktivität *in vitro* wurde von Kim et al. (Kim et al., 1994) entwickelt. Der verwendete Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA^{Plus} Assay der Firma Roche ist eine Weiterentwicklung des von Kim et al. entwickelten Assays und bietet die Möglichkeit die Telomerase-Aktivität mit einem sensitiven, nichtradioaktiven photometrischen Immunoassays zu bestimmen. Informationen des Herstellers zufolge sind bereits Extrakte mit 10 telomerase-positiven Zellen semiquantitativ detektierbar.

Der TRAP-Assay besteht im Wesentlichen aus den im Folgenden schematisch dargestellten Schritten:

Schritt 1 = Elongation / Amplifikation

Während des ersten Schrittes addiert die Telomerase der zu untersuchenden Probe Telomer-Repeats (TTAGGG) an das 3'Ende des Biotin-gelabelten synthetischen P1-TS-Primers. Diese Elongationsprodukte, sowie der, im gleichen Eppendorf-Tube enthaltene Interne Standard (IS), werden nun mittels PCR amplifiziert. Zur Verwendung kommen dabei zum einen der biotinygelabelte Primer P1-TS und der Anker-Primer P2. Die PCR-Produkte, welche aus den Elongationsprodukten der Telomerase resultieren, enthalten die telomerase-spezifischen (TTAGGG)_n Sequenzen, während der Interne Standard (IS) ein 216 bp schweres PCR-Produkt bildet.

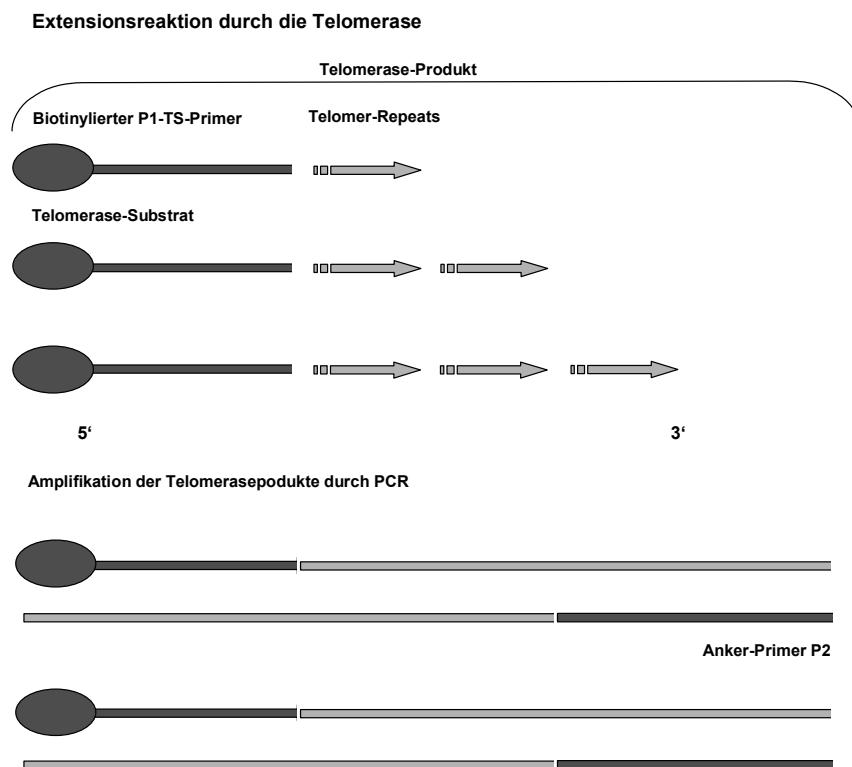


Abbildung 13 Darstellung des Prinzips des *Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP)*-Assays (modifiziert nach Roche „Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA^{Plus} Assay“)

Schritt 2 = Detektion durch ELISA

Das in zwei Aliquotes geteilte PCR-Produkt wird denaturiert und anschließend hybridisiert. Die zur Hybridisierung benutzte Digoxigenin-(DIG)-markierte Detektionsprobe ist entweder zum Amplifikationsprodukt der Telomerase (P3-T) oder des Internen Standards (IS) (P3-Std) komplementär. Über den biotinmarkierten P1-TS Primer binden die gebildeten Produkte an die Streptavidin-markierte Microtiter-Platte. Der Antikörper gegen Digoxigenin ist an Meerrettich-Peroxidase (Anti-DIG-HRP) gebunden und kann das Peroxidase-Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) [Grundfarbe = gelb] sensitivieren [Farbumschlag nach blau]. Die Intensität des entstandenen Farbumschlags kann anschließend am ELISA-Reader gemessen werden.

Die Bestimmungen der Telomerase-Aktivität wurden analog den Angaben des Herstellers durchgeführt.

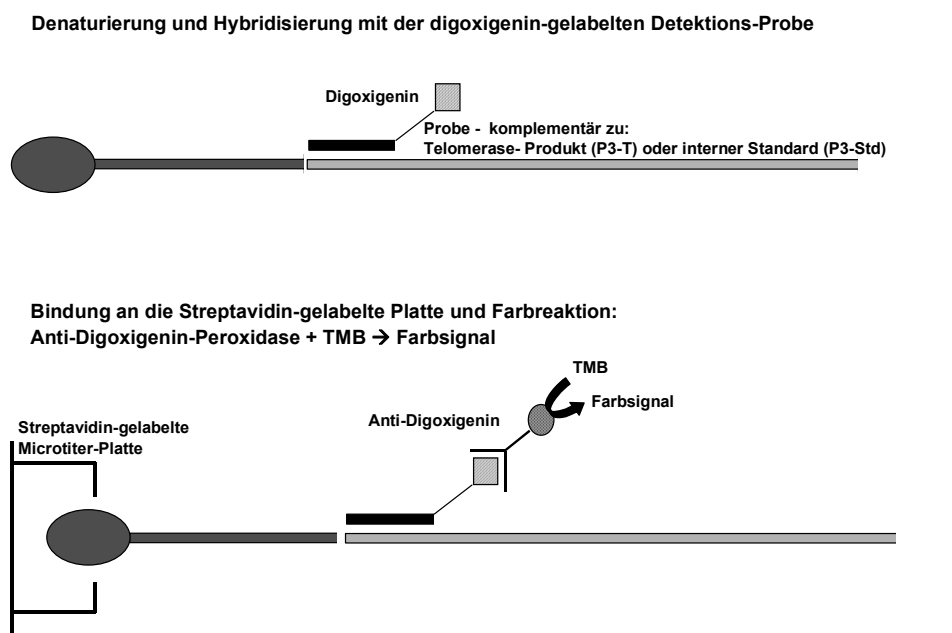


Abbildung 14 Darstellung der Detektion durch ELISA modifiziert nach Roche „Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA^{Plus} Assay“)

3.14.2 Aufarbeitung des Probenmaterials

Bei -80°C trocken eingefrorene Pellets (2×10^5 Zellen) wurde auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 200 μl Lysis-Reagenz resuspendiert. Nach 30 Min Inkubation des Ansatzes auf Eis wurde die Probe bei 16 000 U/min und 4°C für 20 Min abzentrifugiert. Von dem Überstand nahm man 175 μl vorsichtig, ohne die Zellfragmente mitzupipettieren, in ein steriles Eppendorf -Tube ab.

Für jede Probe wurde als Negativkontrolle 10 μl des Zellextraktes mit 2.5 μl RNAse T1 (100 000 IE) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.14.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels PCR wurden die Telomerase-Produkte amplifiziert. Dazu kam folgender PCR-Ansatz zur Verwendung:

Tabelle 3.13 Mastermix TRAP-Assay

| Mastermix | 1 Ansatz | Zusammensetzung |
|----------------------|------------------|---|
| Reaktions-Mix | 25 μl | Biotingelabeltes Telomerasesubstrat P1-TS; optimierter Anker-Primer; Nukleotide, Taq-DNA-Polymerase |
| IS-Standard | 5 μl | 216 bp IS DNA 0,001 amol/ μl |
| Wasser, nukleasefrei | 17 μl | |

Pro Tube wurden 47 μl Mastermix vorgelegt und mit 3 μl Proben-Lysat oder 3 μl der Negativkontrolle resuspendiert. Je ein Tube wurde mit 1 μl Kontrolltemplate low (enthält 0.001 amol/ μl der Positive-Kontroll-DNA mit 8 Repeats des Telomerase-Produktes TS8) oder 1 μl Kontrollreagenz high (enthält 0.1 amol/ μl der Positive-Kontroll-DNA TS8) als Positiv-Kontrolle oder mit 1 μl Lysis-Puffer als Negativ-Kontrolle versetzt. Um das Endvolumen von 50 μl zu erreichen wurde zu diesen Ansätzen je 2 μl nukleasefreies Wasser pipettiert.

Nach Zentrifugation der Tubes mit 3000 U/min bei Raumtemperatur für 5 Sekunden wurden die Tubes in die PCR-Maschine überführt.

Tabelle 3.14 PCR-Bedingungen TRAP-Assay

| Schritt | Zeit | Temperatur | Zyklen |
|---------------------------------|-----------|------------|--------|
| Primer Elongation | 10-30 min | 25°C | 1 |
| Telomerase Inaktivierung | 5 min | 94°C | 1 |
| Amplifikation | | | 1 - 30 |
| Denaturierung | 30 sek | 94°C | |
| Annealing | 30 sek | 50°C | |
| Extension | 90 sek | 72°C | |
| | 10 min | 72°C | |
| Hold | | 4°C | |

3.14.4 Detektion

Für jede Probe wurden 2 Tubes mit 10 µl Denaturierungsreagenz (bestehend aus 0.5 % NaOH) vorbereitet und mit je 2.5 µl des Amplifikationsproduktes resuspendiert. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde ein Tube mit 100 µl Hybridisierungspuffer T (Detektions-Probe komplementär zum Telomerase-Amplifikationsprodukt) und das andere Tube mit 100 µl Hybridisierungspuffer IS (Detektions-Probe komplementär zum Internen Standard) versetzt und die Ansätze sorgfältig mit Vortex gemischt. Die Zubereitung der einzelnen Negativ-Kontrollen erfolgte auf die gleiche Weise mit Hybridisierungspuffer T. Nach Überführung von je 100 µl der einzelnen Ansätze auf die Streptavidin-markierte Microtiterplatte inkubierte der Ansatz 2 Stunden bei 37°C unter ständigem Schütteln bei 300 U/min. Danach wurde der Hybridisierungsmix vollständig entfernt und jedes Well dreimal mit 250 µl des Waschpuffers gewaschen. Der nächste Schritt beinhaltete die Zugabe von 100 µl eines polyklonalen, mit Meerrettichperoxidase-konjugierten Anti-Digoxigenin (Anti-DIG-HRP-Lösung) und der 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Rüttler (300 U/min).

Nach kompletter Entfernung der Lösung wurde wieder fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 100 µl TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) 15 min bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert (300 U/min). Ohne das Substrat zu entfernen wurden 100 µl Stoppreagenz (< 5% Schwefelsäure)

(Reaktionsfarbe gelb → blau) aufpipettiert und am Elisa-Reader bei 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) innerhalb einer Zeitspanne von 30 Minuten gemessen.

3.14.5 Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Die Absorption der Proben wird mit $A_{450\text{ nm}}$ gegenüber der Referenzwellenlänge $A_{690\text{ nm}}$ angegeben.

3.14.5.1 Negativ-Kontrollen

Um die Spezifität der Telomerase-Reaktion zu überprüfen wurde für jede Probe eine RNase inaktivierte Negativkontrolle zubereitet. Die Absorption der Negativ-Kontrollen ist abhängig von der Effektivität der Telomerase-Inaktivierung. Sie liegt dabei in der Regel unter $0,1 A_{450\text{ nm}} - A_{690\text{ nm}}$ Units. Bei Ergebnissen über 0.1 Units musste das Experiment, inklusive der TRAP-Reaktion mit intensiverer Inaktivierung wiederholt werden.

3.14.5.2 Positiv-Kontrollen

Die Ergebnisse der Positiv-Kontrollen müssen für das Kontrolltemplate low zwischen 0.2 und 0.5 und für das Kontrolltemplate high zwischen 2.0 und 4.0 liegen. Formel zu Berechnung:

$$\text{Positiv-Kontrolle} = \frac{(\text{Absorption Kontrolltemplate} - \text{Absorption Lysepuffer})}{\text{Absorption Interner Standard (IS) des Kontrolltemplates}}$$

3.14.5.3 Proben

Von der Absorption der Proben wurde die der Negativ-Kontrolle abgezogen. Bei telomerasepositiven Proben musste die daraus resultierende Absorptions-Differenz höher als die zweifache Hintergrund-Aktivität liegen.

3.14.5.4 Quantifizierung der Telomerase-Aktivität

Um das Level der Telomerase-Aktivität in den untersuchten Proben zu bestimmen, wurde das Signal der Proben mit dem Signal der bekannten Konzentration des Kontrolltemplates verglichen. Das benutzte Kontrolltemplate

war identisch mit den Produkten aus der Telomerase-Elongation. Für die meisten Untersuchungen konnte das niedrige Kontrolltemplate verwendet. Bei Proben mit sehr hoher Telomeraseaktivität lag das Signal des Internen Standards in der Nähe des Hintergrund-Levels. Grund dafür war die kompetitive Amplifikation der TRAP Produkte und des Internen Standards. In solchen Fällen musste das Kontrolltemplate mit der höheren Konzentration verwendet werden. Die relative Telomerase-Aktivität (RTA) der verschiedenen Proben wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{RTA} = \frac{(A_{\text{Probe}} - A_{\text{Negativ-Kontrolle}}) / A_{\text{Interner Standard der Proben}}}{(A_{\text{Kontrolltemplate}} - A_{\text{Lysepuffer}}) / A_{\text{Interner Standard der Kontrolle}}} \times 100$$

3.15 Bestimmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT)

3.15.1 RNA-Isolierung

Das Grundprinzip der RNA-Isolierung besteht darin, die Zellen zu lysieren, RNasen zu inaktivieren und anschließend die RNA aus dem gewonnenen Lysat zu isolieren. Auf diese Weise wird ein Gemisch aus rRNA, mRNA, tRNA und snRNA, also die Gesamt-RNA erhalten.

Die RNA-Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Quiagen) unter RNase freien Bedingungen. Mit dieser Methode erhält man eine selektive Anreicherung aller RNA-Moleküle über 200 Nukleotide, vor allem also mRNA, da die meisten RNAs < 200 Nukleotide besitzen.

Das Zellpellet wurde dabei zunächst in einem denaturierenden guanidin-isothiocyanathaltigen (GITC)-Puffer aufgenommen und resuspendiert, um durch die Inaktivierung der Rnasen intakte RNA isolieren zu können. Um geeignete Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silica-Gel-Membran zu gewährleisten, wurden die Proben mit Ethanol versetzt. Enthaltene Verunreinigungen wurden mit verschiedenen Waschschrinen abgewaschen und die RNA im letzten Schritt mit RNase-freiem Wasser eluiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

3.15.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des UV-Photometers GeneQuant bei 260 nm. Dafür wurden die Proben mit RNase-freiem Wasser so verdünnt, dass sie im Absorptionsbereich zwischen 0.1 und 1.0 gemessen werden konnten. Eine Absorption von 1.0 entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg RNA pro ml. Aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} ergibt sich die Reinheit der gemessenen Probe. Eine proteinfreie Lösung weist demnach ein Verhältnis von 1.7 bis 1.9 auf. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA - Konzentration} = 40 \times OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.15.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels dem Superscript™ First-Strand Synthesis System für RTQ-PCR, indem mRNA als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese diente. Hierfür wurde 1 µg RNA je Probe mit folgendem Primer-Mix resuspendiert und bei 65°C für 5 min denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt.

Tabelle 3.15 Primer-Mix für die cDNA-Synthese

| Primer-Mix | pro Ansatz |
|------------------------------|---------------|
| RNA | x µl (= 1 µg) |
| 10 mM dNTP Mix | 1 µl |
| Oligo(dt)12-18 (500 µg / ml) | 1 µl |
| Wasser, nukleasefrei | ad 12 µl |

Nach dem Mischen mit 7 µl Reaktions-Mix wurden die Ansätze bei 42°C für 2 min inkubiert.

Tabelle 3.16 Reaktions-Mix für die cDNA-Synthese

| Reaktions-Mix | pro Ansatz |
|-------------------------------|------------|
| 5x First Strand Buffer | 4 μ l |
| 0.1 M DTT | 2 μ l |
| RNase Inhibitor (40 Units/ml) | 1 μ l |

Danach wurde zu jedem Ansatz 1 μ l Superscript II RT (= 200 Units), die Reverse Transkriptase (RTase) pipettiert und nach dem Resuspendieren für 50 min bei 42°C im PCR-Gerät inkubiert. An die Inkubation schloss sich mit 70°C für 15 min die Inaktivierung der RTase an.

Die RTase ist ein Enzym, welches in der Lage ist komplementäre DNA (cDNA - copy-DNA) aus einer RNA-Matrize zu erstellen. Um dem Enzym die nötigen 3'-OH-Gruppen zu liefern, wurden Oligo(dT)-Primer an den poly(A)-Schwanz des 3'-Ende der mRNA hybridisiert. Unter entsprechenden Bedingungen synthetisiert die RTase mit den zugegebenen vier dNTP's (Desoxynucleotidtriphosphat) nun eine Kopie der eingesetzten mRNA, ein cDNA-mRNA-Hybrid. Um die mRNA aus dem Hybrid zu entfernen kam am Schluss 1 μ l RNase H für 20 min bei 37°C zur Anwendung. Die so erhaltene einzelsträngige cDNA konnte nun bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt werden.

3.15.4 Real-Time TaqMan® PCR

3.15.4.1 Prinzip

Die Real-Time TaqMan® PCR bietet die Möglichkeit zur schnellen und quantitativen Analyse von PCR-Produkten. Aufbauend auf den Arbeiten von Holland et al. und Lee et al. (Holland et al., 1991; Lee et al., 1993) wurde die TaqMan®-Technologie entwickelt, bei dem Amplifikation und Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden.

Für diese Methode wird die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase zur Detektion der sequenz-spezifischen Amplifikation genutzt. Zum Einsatz kommt eine spezielle Sonde (TaqMan® Sonde, Probe) welche aus einem Oligonukleotid komplementär zum amplifizierten Fragment besteht. Die Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (6-

Carboxyfluoreszein, FAM) markiert, während am 3'-Ende ein Quencher-Farbstoff (6-Carboxytetramethylrhodamin, TAMRA) über ein Linker-Arm-modifiziertes-Nukleotid (LAN) an die Sonde gebunden ist.

Ist die Sonde intakt, wird bei einer Anregung des Reporters durch eine spezifische Wellenlänge (488 nm) des Lasers die emittierte Fluoreszenzenergie durch die räumliche Nähe über FRET (Fluorescence Resonance Energie Transfer) auf den Quencher übertragen, welcher dadurch angeregt wird und ebenfalls ein Lichtsignal emittiert. Während der PCR hybridisieren Sonde und Primer zunächst an den komplementären Matrizen-Strang.

Wird nun die Sonde in der Extensionsphase durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase gespalten, werden Reporter und Quencher räumlich getrennt und der Energietransfer (FRET) dadurch unterbrochen. Entsprechend der Anreicherung an spezifischem PCR-Produkt nimmt nun die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus zu, d.h. der Fluoreszenz-Anstieg ist direkt proportional zur Anreicherung des Amplifikats.

3.15.4.2 Durchführung

In dieser Arbeit wurde die katalytische Untereinheit der Telomerase (hTERT) mit Hilfe der TaqMan[®] PCR quantifiziert.

Die spezielle TaqMan[®] Primer wurden unter Nutzung publizierter Sequenz-Daten der NCBI Datenbank mit Hilfe der Primer Express[™] 2.0 Software von Applied Biosystems (England) entworfen und von der MWG Biotech AG synthetisiert. Die Sequenz der Primer wurde so gewählt, dass sie Intron-überspannend waren. Dabei betrug die optimale Länge der Primer 20 Basenpaare, die Annealingtemperatur 58 bis 60°C, der GC-Gehalt lag zwischen 20 und 80% und die Größe des PCR-Produktes zwischen 50 und 150 Basenpaaren. Außerdem war zu berücksichtigen, dass Sonde und Primer nicht komplementär zueinander sind und auffällige Sekundärstrukturen (z.B. hairpin-loops) vermieden wurden. Die Sequenz der eingesetzten Primer und der verwendeten Sonde sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 3.17 Charakterisierung der Primer und Sonde für die TaqMan[®] PCR
(FAM = 6-Carboxyfluoreszein; TAMRA = 6-Carboxytetramethylrhodamin)

| Bezeichnung | Lage | Sequenz (5' – 3') |
|-------------|----------------|---|
| hTERT-for | 2673U, Exon 10 | TGA CAC CTC ACC TCA CCC AC |
| hTERT-rev | 2767L, Exon 11 | CAC TGT CTT CCG CAA GTT CAC |
| hTERT-sonde | 2711U, Exon 11 | FAM-ACC CTG GTC CGA GGT GTC CCT GAG-TAMRA |

Für die PCR wurden 100 ng cDNA der zu bestimmenden Proben, sowie die Primer in einer Endkonzentration von 200 nM und die Sonde (Probe) in einer Endkonzentration von 100 nM in folgendem Ansatz eingesetzt:

Tabelle 3.18 TaqMan[®] PCR – Ansatz für hTERT

| TaqMan [®] PCR | hTERT | pro Ansatz |
|---------------------------|-------|---------------|
| Universal Master Mix (2x) | | 10 µl |
| Forward Primer (200 nM) | | 1 µl |
| Reverse Primer (200 nM) | | 1 µl |
| Sonde | | 1 µl |
| cDNA | | 100 ng = x µl |
| DEPC-Wasser | | ad 20 µl |

Als endogene Kontrolle diente GAPDH. Primer und Sonde für diese Kontrolle waren im „Pre-Developed TaqMan Assay Reagent Control Kit - Human GAPDH Endogenous Control“ enthalten. Die Sonde für GAPDH war mit VIC and TAMRA markiert. Nach Anweisungen des Herstellers wurde für die PCR folgender Ansatz gewählt:

Tabelle 3.19 TaqMan[®] PCR – Ansatz für GAPDH

| TaqMan [®] PCR | GAPDH | pro Ansatz |
|---------------------------|-------|---------------|
| Universal Master Mix (2x) | | 10 µl |
| GAPDH-Mix (KIT) (20x) | | 1 µl |
| cDNA | | 100 ng = x µl |
| DEPC-Wasser | | ad 20 µl |

Die Ansätze wurden in MicroAmp[®] Optical 96-Well Platten pipettiert, mit Deckel versehen, abzentrifugiert und die PCR in dem ABI PRISM 7000 Sequence Detector unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 3.20 Temperatur-Zeit-Verlauf während der TaqMan[®] PCR
(UNG = Uracil-N-Glykosylase)

| Schritt | Zeit | Temperatur | Zyklen |
|--|--------|------------|--------|
| Verdau (durch UNG) | 2 min | 50°C | 1 |
| Aktivierung der AmpliTaq Polymerase | 10 min | 95°C | 1 |
| Amplifikation | | | 1 - 40 |
| Denaturierung | 15 sek | 95°C | |
| Synthese | 1 min | 60°C | |

Über den Reaktionsgefäßen der Microtiterplatte befindet sich eine Linse, die den Strahl eines Argon-Lasers (488 nm) in die Gefäße weiterleitet, wodurch eine Fluoreszenzanzregung erfolgen kann. Die Fluoreszenzemission wird über denselben optischen Leiter gemessen.

Bei jedem TaqMan[®] - Lauf wurden hTERT und GAPDH der Proben in einer Doppelbestimmung gemessen, sowie Negativkontrollen mitgeführt, welche anstelle der cDNA-Probe Wasser enthielten.

3.15.4.3 Auswertung der TaqMan[®] -Daten

Die Auswertung der Resultate erfolgte mit Hilfe der ABI Prism 7000 SDS 1.0 Software. Mit Hilfe dieses Computerprogrammes konnte der Verlauf der PCR graphisch als Kurve mit x = Zyklenzahl und y = relative Fluoreszenzintensität dargestellt werden.

Das Signal der TaqMan[®] PCR repräsentierte die Veränderung der Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffs aufgrund der Hydrolyse der sequenzspezifischen Sonde. Es ergab sich in der Regel ein exponentieller Verlauf der Kurve, wobei zum Ende hin ein Plateau erreicht wurde. Störende Fluktuationen der Fluoreszenz wurden mit Hilfe eines passiven Referenzfarbstoffs, der dem Reaktionspuffer zugesetzt war, ausgeglichen. Dieser normalisierende Effekt ging in die Berechnung als normalisiertes

Reportersignal (Rn) ein: der Rn-Wert entspricht dem Quotienten der Emissions-Intensität des Reporter-Farbstoffs dividiert durch die Emissions-Intensität des passiven Referenzfarbstoffs. Auf diese Weise konnten unspezifische Einflüsse wie Konzentrationsänderungen aufgrund von Schwankungen der Volumina (Pipettierfehler) ausgeglichen werden.

Weitere Schwankungen, die nicht auf dem PCR-abhängigen Nuklease-Verdau basierten, wurden berücksichtigt, indem das Hintergrundsignal (Signal der Negativkontrolle) von dem jeweiligen Rn-Wert abgezogen wurde.

Zur Quantifizierung ermittelte das Computerprogramm einen Schwellenwert. Der C_t-Wert (Threshold Cycle) ergab sich aus dem Schnittpunkt der Kurve mit diesem Schwellenwert. C_t war ein Maß für die Menge an cDNA in der Startreaktion und spiegelt die Zyklenzahl wieder, bei der statistisch gesehen ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz auftrat. Um einen Effekt unterschiedlicher cDNA-Mengen auszuschließen, wurde der C_t-Wert der endogenen Kontrolle GAPDH von den C_t-Werten der jeweiligen Proben abgezogen, wodurch man ΔC_t erhielt. Die relative Menge an vorhandener cDNA wurde als $2^{-\Delta C_t}$ ausgedrückt. Die Formel zur Berechnung kann wie folgt zusammengefasst werden:

$$\text{Relative hTERT Expression} = 2^{-[C_t(\text{hTERT}) - C_t(\text{GAPDH})]} \times 100$$

3.16 Bestimmung der hTERT Splice-Varianten

3.16.1 PCR

Mittels PCR wurden ausgehend von cDNA die unterschiedlichen hTERT Splice-Varianten amplifiziert. Die dazu verwendeten Primer, synthetisiert von MWG Biotech AG, umschlossen dabei die Leitstruktur A und B der Reversen Transkriptase. Damit war es möglich vorhandene α - und β - Deletionen nachzuweisen. Als Positiv-Kontrolle der verwendeten PCR-Bedingungen dienten K562-Zellen. Folgende Primer wurden für die RT-PCR eingesetzt:

Tabelle 3.21 Primer zur Bestimmung der hTERT Splice-Varianten

| Bezeichnung | Sequenz |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| Splice Varianten hTERT | |
| hT2164F | 5'-GCC TGA GCT GTA CTT TGT CAA-3' |
| hT2620R | 5'-CGC AAA CAG CTT GTT CTC CAT GTC-3' |

Kontrolle: GAPDH

GAPDH-for 5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3'
 GAPDH-rev 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'

Das hTERT Transkript der vollen Länge (+ α + β) reicht von Base 2164 bis 2620 und bildet ein 457 bp großes PCR-Produkt. Die α -Deletion entfernt eine 36 bp große Sequenz des RT Motif A und die β -Deletion führt zum Verlust einer 182 bp großen Sequenz vor dem RT Motif B.

Für die PCR-Reaktionen der hTERT Splice-Varianten und der Kontrolle GAPDH wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 3.22 PCR-Ansatz - hTERT Splice-Varianten

| PCR | pro Ansatz |
|------------------------------------|-------------------|
| Red Taq TM Reaction Mix | 25 μ l |
| Forward Primer (10 μ M) | 1 μ l |
| Reverse Primer (10 μ M) | 1 μ l |
| cDNA | 50 ng = x μ l |
| DEPC-Wasser | ad 50 μ l |

Die Reaktion wurde in dem GeneAmp PCR-System 9700 durchgeführt, wobei die Temperatur- und Zeitabläufe an die verwendeten Primer angepasst wurden:

Tabelle 3.23 PCR-Bedingungen hTERT Splice-Varianten

| Schritt | Zeit | Temperatur | Zyklen |
|----------------------|--------|------------|--------|
| Denaturierung | 15 min | 94°C | 1 |
| Amplifikation | | | 1 - 40 |
| Denaturierung | 30 sek | 95°C | |
| Annealing | 45 sek | 64°C | |
| Extension | 45 sek | 72°C | |
| Extension | 5 min | 72°C | 1 |
| Hold | | 4°C | |

Tabelle 3.24 PCR-Bedingungen GAPDH - Kontrolle

| Schritt | Zeit | Temperatur | Zyklen |
|----------------------|--------|------------|--------|
| Amplifikation | | | 1 - 30 |
| Denaturierung | 45 sek | 94°C | |
| Annealing | 45 sek | 61°C | |
| Extension | 2 min | 72°C | |
| Extension | 10 min | 72°C | 1 |
| Hold | | 4°C | |

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte bis zu ihrer Darstellung in Agarosegelen bei -20°C gelagert.

3.16.3 Agarosegel - Elektrophorese

Zur Auftrennung der PCR-Produkte nach ihrer Größe wurden horizontale Agarosegele in der Konzentration von 1.5 % (für GAPDH) und 2 % (für hTERT Splice-Varianten) verwendet. Die Agarose wurde in dem entsprechenden Volumen Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Puffer aufgenommen und in der Mikrowelle vollständig geschmolzen. Nach kurzem Abkühlen wurde Ethidiumbromid (0.8 µg/ml Gel) zugegeben. Die Gellösung wurde nach weiterem Abkühlen auf ca. 50°C luftblasenfrei in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Sobald das Gel erstarrt war, konnte der Kamm für die Probenaschen entfernt und die Elektrophorese-Kammer mit 1% TBE-Puffer gefüllt werden.

Die Probenaschen wurden nun mit je 35 µl der PCR-Produkte der Proben, als Positiv-Kontrolle mit 10 µl K562 PCR-Ansatz und zur Abschätzung der Fragmentgröße mit der DNA-Leiter befüllt. Nach der Auftrennung bei konstanter Spannung von 140 V konnten die aufgetrennten Fragmente unter kurzweiligem UV-Licht (302 nm) visualisiert und mit Hilfe eines Videodokumentationssystems aufgenommen werden.

4. Ergebnisse

4.1 *Telomerbiologie der pathologisch gesteigerten Hämatopoese myeloischer Leukämien*

4.1.1 Chronisch Myeloische Leukämie (CML)

4.1.1.1 *In vivo Untersuchung der Telomerlängen-Dynamik in CML-Patienten unter Behandlung mit Imatinib*

Über eine deutlich erhöhte Teilungsrate in den malignen, hämatopoetischen Stammzellen kommt es bei dem Krankheitsbild der CML zu einer akzelerierten Telomerverkürzung der malignen Zellpopulation im Laufe der chronischen, klinisch stabilen Phase der Erkrankung (Brummendorf et al., 2000).

Die hier vorliegende Studie untersuchte die Telomerlängendynamik unter Behandlung der Patienten mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib, dem neuen Standard der CML-Therapie. Dazu wurden insgesamt 517 Proben von 206 CML-Patienten in CP, AP und BC vor und während der Therapie mit Imatinib mit Hilfe von Flow FISH, wie in Kapitel 3.13 beschrieben, analysiert. Die Telomerfluoreszenz wurde in MESF (molecular equivalents of soluble fluorochrome units) ausgedrückt (Tabelle 4.1).

Mit Hilfe eines Shapiro-Wilk-Tests wurde dabei die Häufigkeitsverteilung der altersadaptierten Telomerlängen der Granulozyten ($\text{deltaTel}_{\text{gran}}$) abhängig vom Stadium der Erkrankung untersucht. Wie in Abbildung 15 gezeigt, waren die $\text{deltaTel}_{\text{gran}}$ nicht normalverteilt ($p < 0.0001$ (CP) und $p = 0.02$ (AP, BC)), sondern sowohl im chronischen Krankheitsstadium, als auch in der akzelerierten Phase bzw. Blastenkrise zu kürzeren altersadaptierten Telomeren hin verschoben.

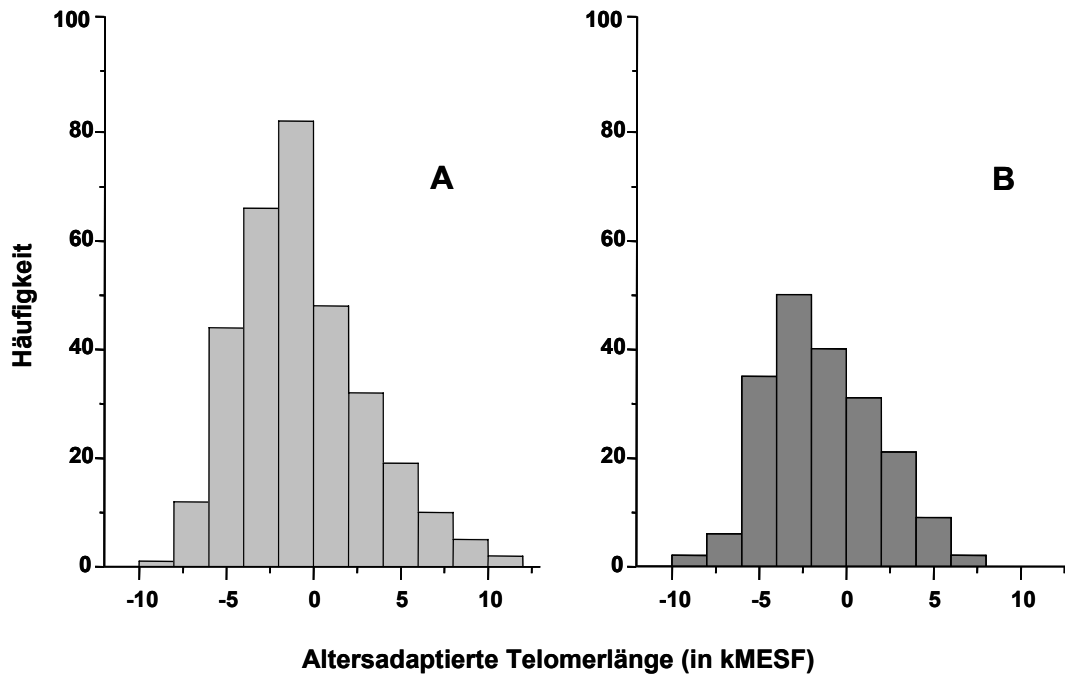


Abbildung 15 Verteilung der deltaTel der Granulozyten in der **(A)** chronischen Phase (CP), sowie der **(B)** akzelerierten Phase und Blastenkrise (AP / BC)

Tabelle 4.1 Telomerlängen-Verteilung abhängig vom Krankheitsstadium und Remissionsstadium

| | Telomerlänge [kMESF] Median | 25 - 75% Percentile |
|--|-----------------------------------|------------------------|
| Krankheitsstadium | | |
| Chronische Phase (%) | -1.1 | -3.3 bis 1.2 |
| Akzelerierte Phase (%) | -1.6 | -3.9 bis 1.3 |
| Blastenkrise (%) | -1.8 | -3.7 bis 0.5 |
| Zytogenetisches Ansprechen (CR) | | |
| Major CR (%) | -0.3 | -2.8 bis 2.6 |
| Minor CR (%) | -1.4 | -3.4 bis 1.2 |
| Keine CR (%) | -1.7 | -3.9 bis 0.6 |
| Interphase-FISH | | |
| < 35% Ph+ (%) | -1.3 | -3.0 bis 2.0 |
| ≥ 35% Ph+ (%) | -1.8 | -3.8 bis 0.1 |
| Molekulares Ansprechen (BCR/ABL / ABL Quotient) | | |
| < 2% (%) | 0.6 | -2.3 bis 3.0 |
| ≥ 2% bis < 14% (%) | -0.9 | -3.2 bis 2.1 |
| ≥ 14 (%) | -1.8 | -4.1 bis 0.3 |

4.1.1.2 Zusammenhang zwischen Telomerlänge und Krankheitsstadium der CML-Patienten

In früheren Untersuchungen wurde bereits eine Verkürzung der Telomere während fortschreitender Erkrankung, in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium beschrieben (Brummendorf et al., 2000).

Wie schon in diesen Voruntersuchungen zeigten CML-Patienten in CP längere Telomere (Median: -1.1 kMESF; 25-75% Percentile: -3.3 bis 1.2 kMESF), als Patienten der AP (Median: -1.6 kMESF; 25-75% Percentile: -3.9 bis 1.3 kMESF) und diese wiederum längere als Patienten in der BC (Median: -1.8 kMESF; 25-75% Percentile: -3.7 bis 0.5 kMESF) (Tabelle 4.1 und Abbildung 16). Das Ausmaß dieser Telomerverkürzung war jedoch wesentlich geringer als die Ergebnisse der vorhergehenden Studie aus der Zeit vor der neuen Therapieoption „Imatinib“.

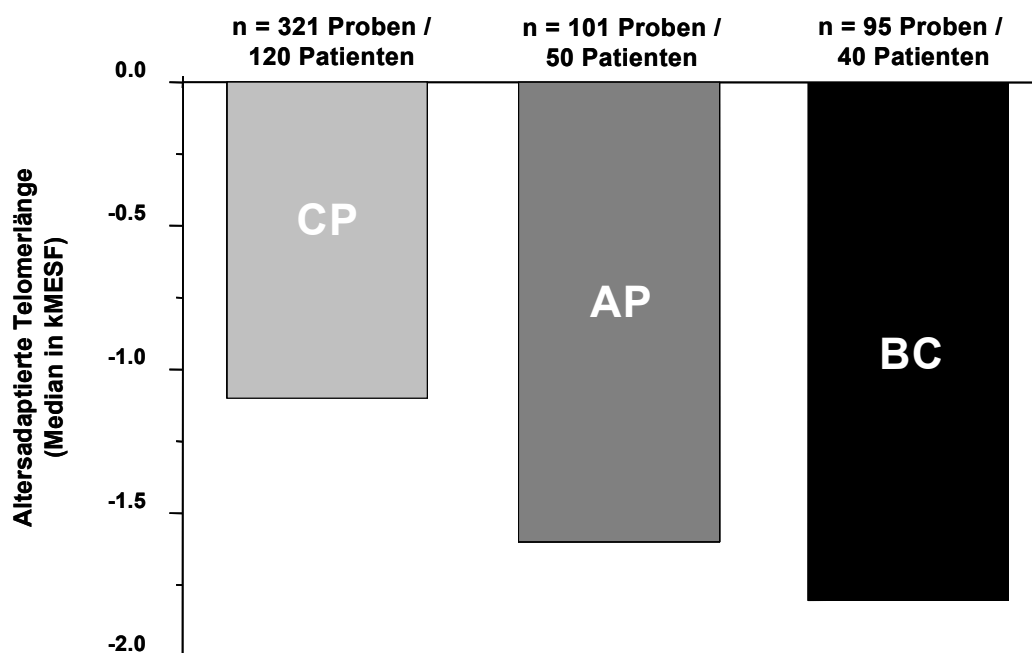


Abbildung 16 Zusammenhang zwischen der Median der altersadaptierten Telomerlänge (in kMESF) und dem Krankheitsstadium der Patienten (CP = chronische Phase; AP = akzelerierte Phase; BC = Blastenkrise)

Da alle untersuchten Proben von Patienten stammten, die entweder aktuell oder im weiteren Verlauf der Studie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib

therapiert wurden, lag der Verdacht nahe, dass die Behandlung mit Imatinib einen Einfluss auf die altersadaptierte Telomerlänge haben könnte.

4.1.1.3 Untersuchung der Telomerlänge in Abhängigkeit vom zygotenischen und molekularen Ansprechen auf die Imatinib-Therapie

Basierend auf der Hypothese, dass bei Ansprechen der CML-Patienten auf die Therapie mit Imatinib die mittlere Telomerlänge zunimmt, wurde die Telomerlänge vor und im Verlauf der Imatinib-Behandlung untersucht. Das gesamte Kollektiv der Patienten wurde dafür nach der medianen Therapiedauer mit Imatinib (in dieser Studie = 144 Tage) in zwei Gruppen eingeteilt.

Die Telomerlängen von 197 Proben vor Therapie mit Imatinib bis zur medianen Therapiedauer mit Imatinib (144 Tagen) wurden mit 196 Proben eines späteren Zeitpunktes (bis Tag 706) verglichen (Abbildung 17).

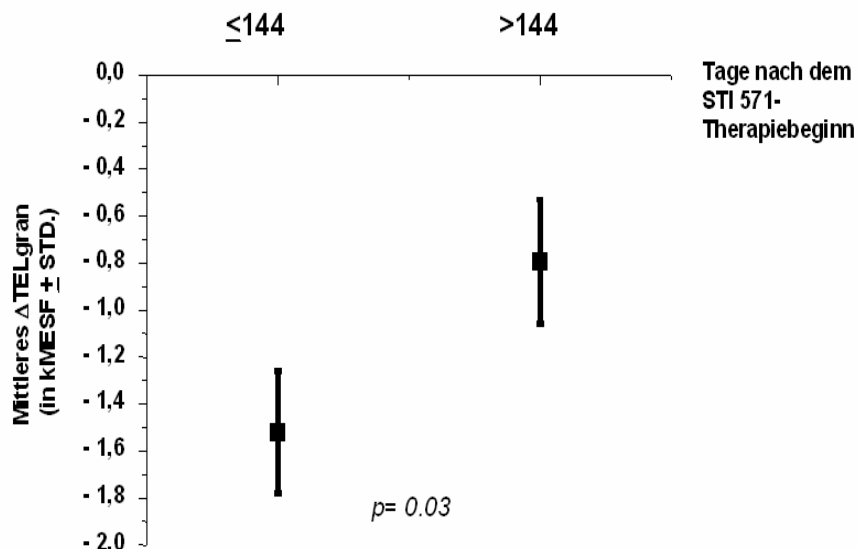


Abbildung 17 Korrelation der mittleren Telomerlänge ≤ 144 Tage Therapie mit Imatinib mit der Telomerlänge > 144 Tagen Therapiedauer

Dabei zeigten die Proben der Patienten kurz nach Therapiebeginn signifikant kürzere Telomere (Mittelwert \pm S.D.: $-1,5 \pm 0,3$ kMESF; $n = 197$) im Vergleich zu den länger therapierten Patienten ($-0,8 \pm 0,3$ kMESF; $n = 196$; $p = 0,03$).

An diese Ergebnisse schloss sich die Analyse der Telomerlänge im Zeitraum von 100 Tagen vor Therapiebeginn mit Imatinib bis zum letzten Zeitpunkt einer Wiederholungsmessung der Telomerlänge des jeweiligen Patienten unter Behandlung mit Imatinib unabhängig vom Krankheitsstadium der Patienten an (Abbildung 18). In den 119 Patienten, von denen sequentielle Messungen (Median: 2; Range 2 - 12) vorhanden waren, fand sich dabei eine signifikante Wiederzunahme der Telomerlänge von 760 MESF pro Jahr ($p < 0.0001$).

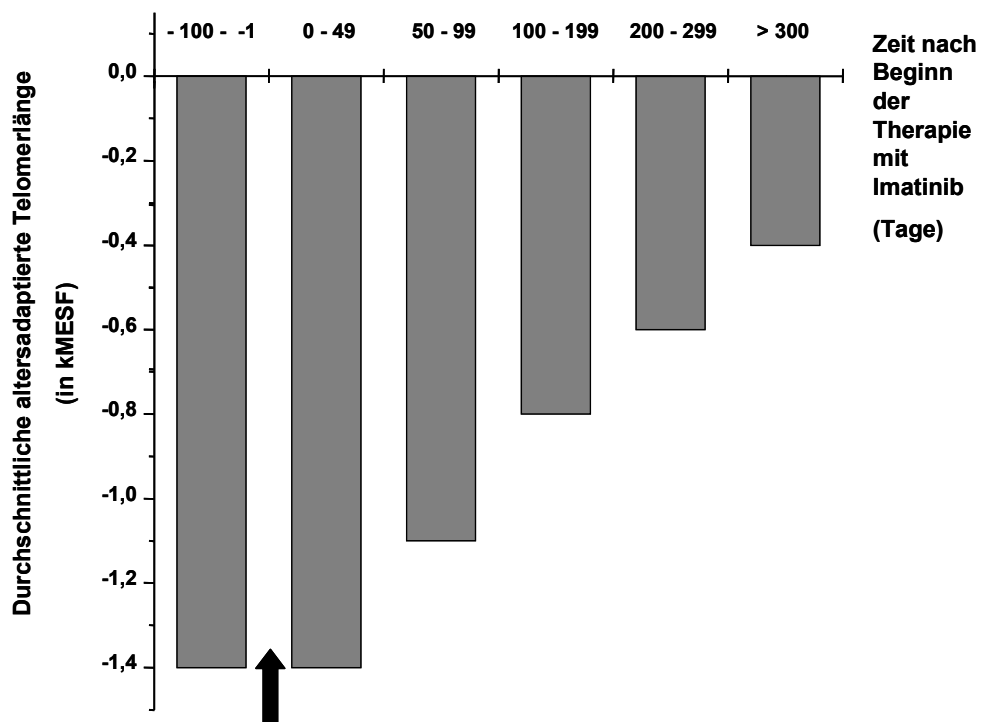


Abbildung 18 Verlauf der mittleren altersadaptierten Telomerlänge im Verlauf der Behandlung mit Imatinib. Der Pfeil kennzeichnet den Beginn der Imatinib-Therapie.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, inwiefern die Ursache für den Anstieg der altersadaptierten Telomerlänge unter Therapie mit Imatinib auf eine relative Zunahme der Ph⁻ Zellen infolge einer Abnahme der Ph⁺ Zellen im peripheren Blut zurückzuführen war. Die Telomerlängen der Proben wurden dazu mit dem erreichten Remissionsstadium unter Imatinib-Therapie, ermittelt durch konventionelle Zytogenetik (Abbildung 19) im Knochenmark, durch Interphase-FISH (Abbildung 20) an peripheren Blutzellen oder durch Bestimmung des BCR-ABL/ABL-Quotienten mit RT-PCR (Abbildung 21) korreliert.

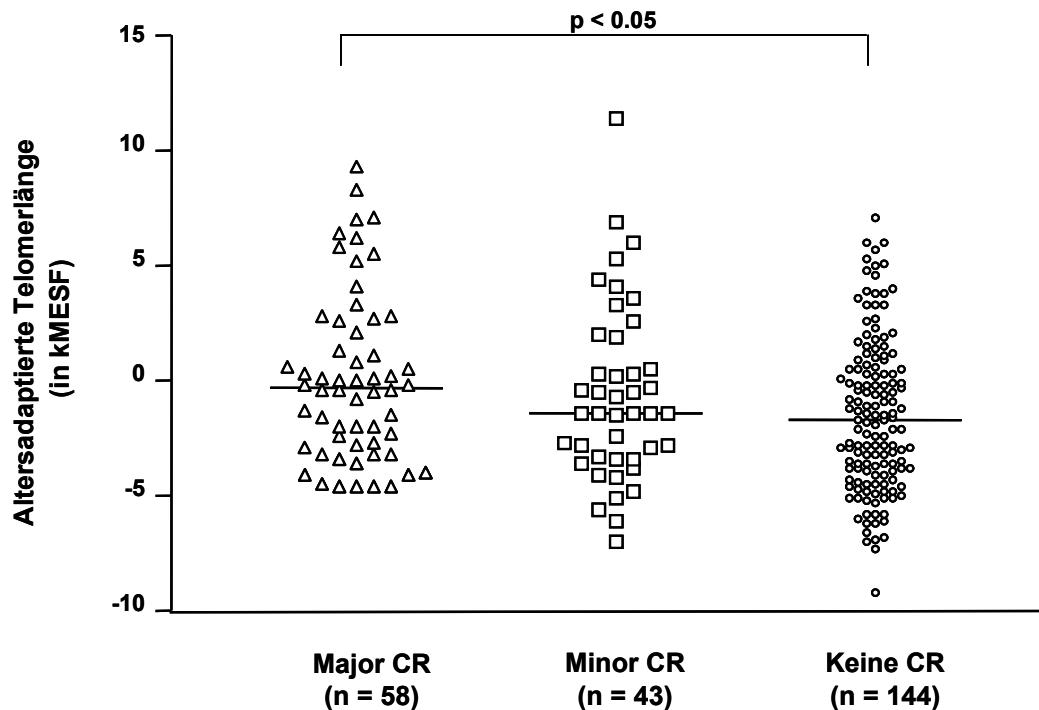


Abbildung 19 Die Telomerlänge der CML-Patienten nimmt mit dem Ansprechen auf die Therapie mit Imatinib zu (Major CR = 0-34% Ph+ Metaphasen; Minor CR = 35-65% Ph+ Metaphasen; Keine CR = 100% Ph+ Metaphasen).

Die mediane Telomerverkürzung der Patienten in kompletter bzw. major zytogenetischer Remission [0% bzw. 0-34% Ph+ Metaphasen] (Median: -0.3 kMESF; 25-75% Percentile: -2.8 bis 2.6 kMESF; n = 58) gegenüber altersadaptierten Gesunden, war geringer als die Telomerverkürzung der Patienten mit minor [35-65% Ph+ Metaphasen] (Median: -1.4 kMESF; 25-75% Percentile: -3.4 bis 1.2 kMESF; n = 43) oder ohne [100% Ph+ Metaphasen] zytogenetisches Ansprechen (Median: -1.7 kMESF; 25-75% Percentile: -3.9 bis 0.6 kMESF; n = 144) (Abbildung 19). Die Unterschiede zwischen den Telomerlängen der Patienten mit major bzw. kompletter zytogenetischer Remission und den Telomeren der Patienten ohne zytogenetische Remission waren signifikant ($p < 0.05$).

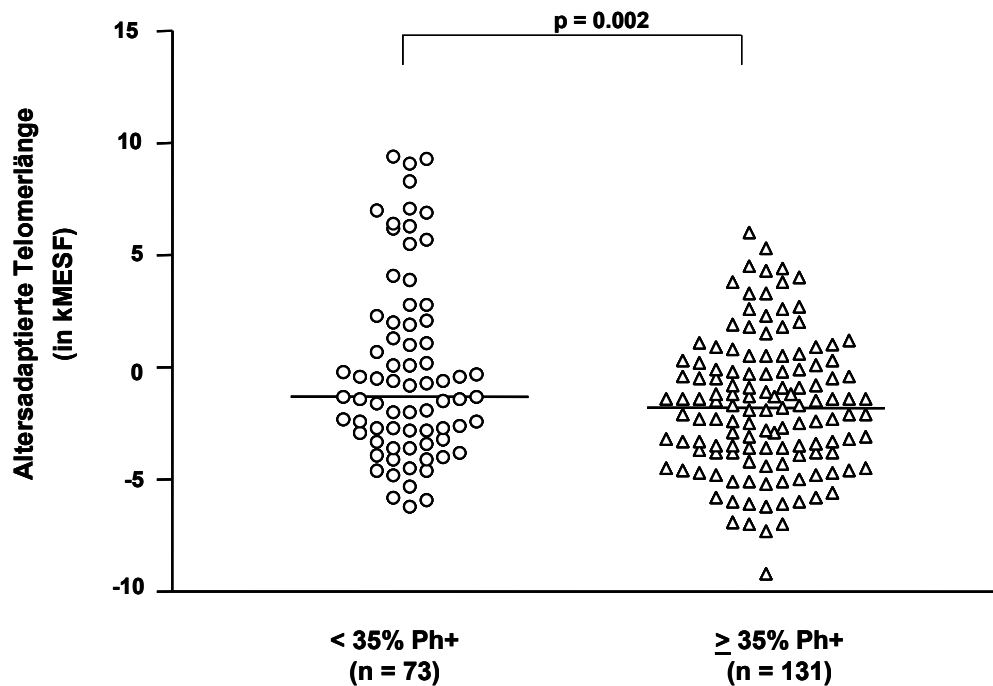


Abbildung 20 Telomerlängen (in kMESF) in Abhängigkeit vom Remissionsstatus, ermittelt mit Interphase-FISH.

Der signifikante Unterschied, ermittelt durch konventionelle Zytogenetik, konnte durch Interphase-FISH bestätigt werden ($p=0.002$) (Abbildung 20 und Tabelle 4.1). Dabei zeigten wieder die Patienten mit < 35% Ph+ Metaphasen längere Telomere (Median: -1.3 kMESF; 25-75% Percentile: -3.0 bis 2.0 kMESF; $n = 73$) als die Patienten mit $\geq 35\%$ Ph+ Metaphasen (Median: -1.8 kMESF; 25-75% Percentile: -3.8 bis 0.1 kMESF; $n = 131$).

Wie bereits erwähnt, wurden die Proben außerdem über ihren BCR-ABL/ABL-Quotienten in drei Gruppen eingeteilt. Ein BCR-ABL/ABL-Quotient von < 2% kann mit einer kompletten zytogenetischen Remission (0% Ph+-Metaphasen im Knochenmark), ein BCR-ABL/ABL-Quotient von $\geq 2\%$ bis < 14% mit einer partiellen zytogenetischen Remission (1-34% Ph+-Metaphasen) und ein BCR-ABL/ABL-Quotient von $\geq 14\%$ mit einem geringen bzw. keinem zytogenetischen Ansprechen (35-100% Ph+-Metaphasen) verglichen werden.

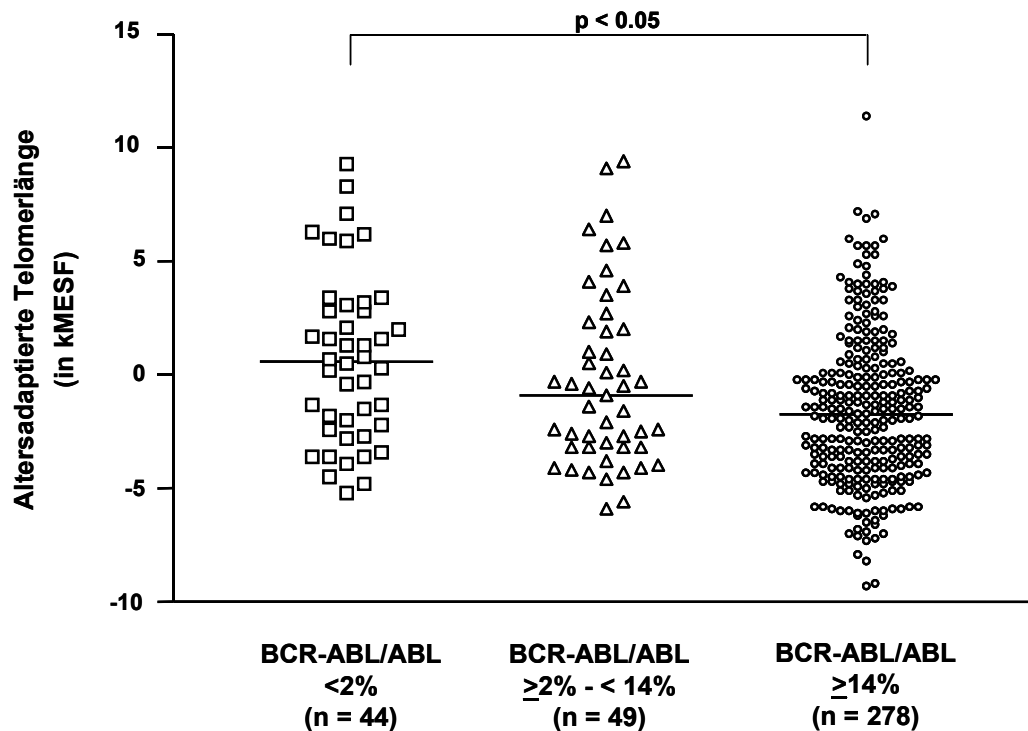


Abbildung 21 Die Telomerlänge der CML-Patienten nimmt mit zunehmendem molekularem Ansprechen auf die Therapie mit Imatinib signifikant zu.

Dabei zeigen die medianen Telomerlängen der Patienten mit gutem molekularem Ansprechen (Median: 0.6 kMESF; 25-75% Percentile: -2.3 bis 3.0 kMESF; n = 44) keinen signifikanten Unterschied mehr zu den altersadaptierten gesunden Kontrollen.

Sie unterschied sich allerdings signifikant ($p < 0.05$) von der Telomerlänge der Patienten ohne molekulares Ansprechen auf die Therapie (Median: -1.8 kMESF; 25-75% Percentile: -4.1 bis 0.3 kMESF; n = 278). Die Telomerlänge der Patienten mit partiellem Ansprechen auf die Therapie lag dazwischen (Median: -0.9 kMESF; 25-75% Percentile: -3.2 bis 2.1 kMESF; n = 49).

4.1.2 Optimierung des verwendeten Flow FISH-Protokolls

Zur Optimierung des Flow FISH Protokolls wurde die Methode nach den Angaben von Baerlocher et al. (Baerlocher et al., 2002), wie in Kapitel 3.13 (Material und Methode) beschrieben, verändert. Dadurch wurde nicht nur eine Optimierung der DNA-Denaturierung, der Hybridisierung mit der PNA-Probe und der DNA-Färbung erreicht, sondern zudem mit Hilfe des internen Standards die Qualität der Ergebnisse verbessert.

Zum Vergleich der beiden Flow FISH Protokolle diente die Bestimmung der Telomerlänge von 28 Patienten mit beiden Protokollen. In Abbildung 22 sind die Telomerlängen der Leukozyten und Granulozyten dargestellt.

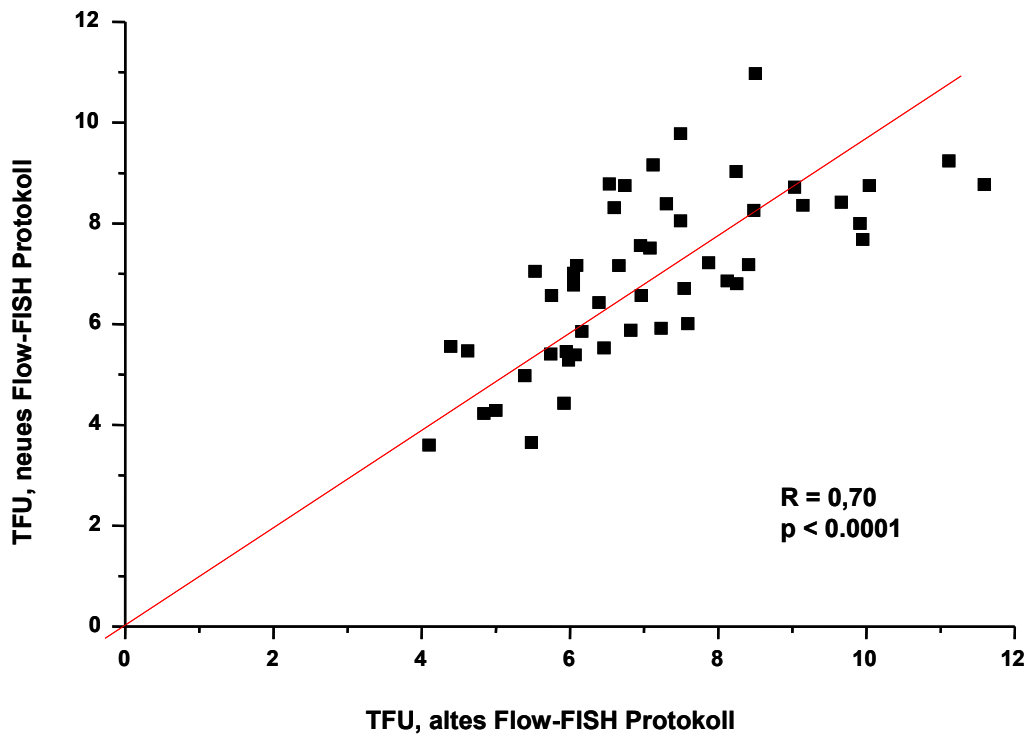


Abbildung 22 *Telomerlänge Leukozyten und Granulozyten in TFU, Vergleich neues und altes Flow-FISH Protokoll.*

Dabei korrelieren die Telomerlängen, gemessen mit dem neuen Flow-FISH Protokoll gut mit den Ergebnissen des alten Flow-FISH Protokolls (Abbildung 22).

4.1.3 *in vitro* Untersuchungen zur Interaktion zwischen BCR-ABL und Telomerase

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die im Lauf der Therapie mit Imatinib gefundene Zunahme der Telomerlänge in CML-Patienten auf die Zunahme von Ph- Zellen im Blut des Patienten oder auf die Interaktion zwischen BCR-ABL und der Telomerase zurückführen lässt. Zur Untersuchungen einer funktionellen Interaktionen dieser Art wurden *in vitro* Tests mit Hilfe der imatinib-vermittelten Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität am Beispiel der BCR-ABL-positiven Zell-Linie BaF3p185 und dem BCR-ABL-negativen Wildtyp BaF3 durchgeführt.

Das BaF3-Modell ist zur Untersuchung BCR-ABL-abhängiger zellulärer Interaktionen gut etabliert (Carlesso et al., 1996; Gesbert and Griffin, 2000; van der Kuip et al., 2001). Mit Hilfe dieses Modells war es möglich, den Effekt von BCR-ABL auf die Telomerase-Aktivität und damit auf die replikationsabhängige Telomer-Verkürzung untersuchen zu können.

4.1.3.1 *Untersuchung der Zytotoxizität von Imatinib auf BaF3 / BaF3p185*

Zur Durchführung der geplanten Langzeit-Untersuchungen des BCR-ABL-abhängigen Effekts auf Telomerlänge und Telomeraseaktivität der BCR-ABL-positiven BaF3p185 sollte Imatinib in Konzentrationen verwendet werden, welche in der Lage waren BCR-ABL auszuschalten und zugleich keine zytotoxische Wirkung auf den Wildtyp BaF3 zu zeigen. Die Lebensfähigkeit der Zellen unter steigenden Imatinib-Konzentrationen wurde dazu mit Hilfe des MTT-Zytotoxizitätstests (wie in 2.10 beschrieben) zu Beginn des Langzeitversuchs bestimmt.

Die so ermittelte mittlere IC_{50} (\pm S.D.) betrug für die BCR-ABL-positve BaF3p185 $0.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$ Imatinib, während der Wildtyp BaF3 mit $6.8 \pm 3.0 \mu\text{M}$ wesentlich resistenter auf die 48-stündige Inkubation mit Imatinib reagierte (Abbildung 23 A, B).

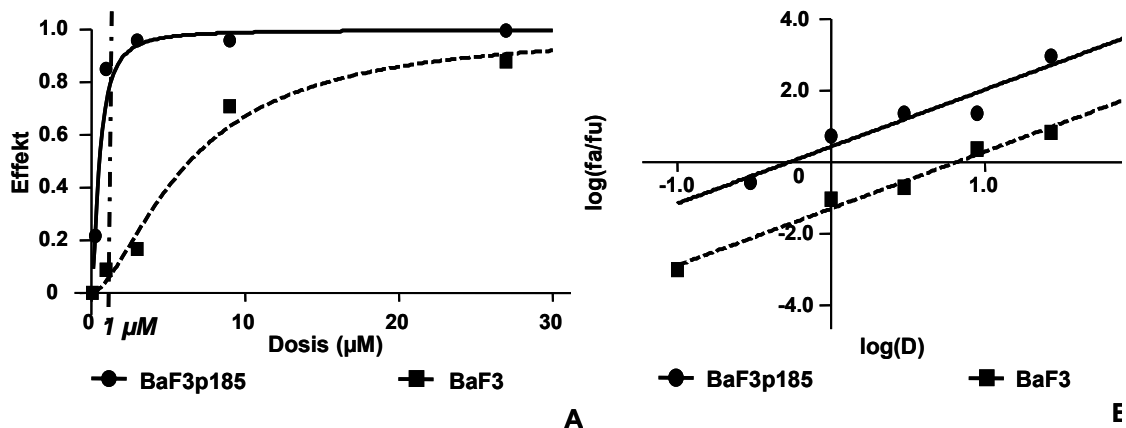


Abbildung 23 (A) Repräsentatives Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve von Imatinib auf BaF3 und BaF3p185. Eingezeichnet ist die weiterverwendete Dosis von 1 μM Imatinib (gestrichelte Linie). (B) Die „Median-Effekt-Gleichung“ ermöglicht die Kalkulation der IC_{50} über den Schnittpunkt der Regressionsgerade mit der x-Achse. (D = Dosis; F_a = fraction affected; F_u = fraction uneffected)

Aufgrund dieser Ergebnisse kam für weitere Experimente, sowie die folgenden Langzeit-Untersuchungen 1 μM Imatinib zur Anwendung. Mit dieser Konzentration konnte die BCR-ABL-vermittelte Proliferation gehemmt werden, während Lebensfähigkeit und Wachstum der BCR-ABL-negativen Zellen BaF3 nicht beeinträchtigt wurden. Ohne den Wachstumsstimulus des BCR-ABL entsprach die Wachstumseigenschaft von BaF3p185 wieder denen des Wildtyps BaF3, weswegen zur Kultivierung mit Imatinib wieder murines IL-3 als Wachstumsfaktor zugesetzt werden musste.

4.1.3.2 Imatinib stellt die Wachstumsfaktor-Abhängigkeit der BCR-ABL-transfizierten Zellen wieder her

Das Wachstum und Überleben der Wildtyp BaF3-Zellen ist von der exogenen Zufuhr des Wachstumsfaktors IL-3 abhängig, während die BCR-ABL transfizierten BaF3p185-Zellen in der Lage sind wachstumsfaktor-unabhängig zu wachsen (Daley and Baltimore, 1988). Dieses, durch BCR-ABL vermittelte Wachstumssignal kann durch Hemmung der Tyrosinkinase-Aktivität mittels Imatinib aufgehoben werden (Buchdunger et al., 1996; Druker et al., 1996).

Nach 21-stündiger Inkubation des Wildtyps BaF3 mit 1 μ M Imatinib bei aufrechterhaltener Zufuhr des Wachstumsfaktors wurde die Proliferationsfähigkeit der Zellen nicht beeinflusst (Abbildung 24 A, 25).

Im Gegensatz dazu zeigte die Hemmung von BCR-ABL durch Imatinib eine schnelle und spezifische zytotoxische Wirkung auf die BCR-ABL-positiven Zellen. Während die apoptotische Zellfraktion von BaF3p185 nach 21-stündiger Inkubation mit 1 μ M Imatinib ohne IL-3 auf 43% anstieg (Abbildung 24 B, 25), blieb die Apoptoserate durch Zugabe von IL-3 auf 1.3 % Grund-Apoptose (Abbildung 24 C, 25).

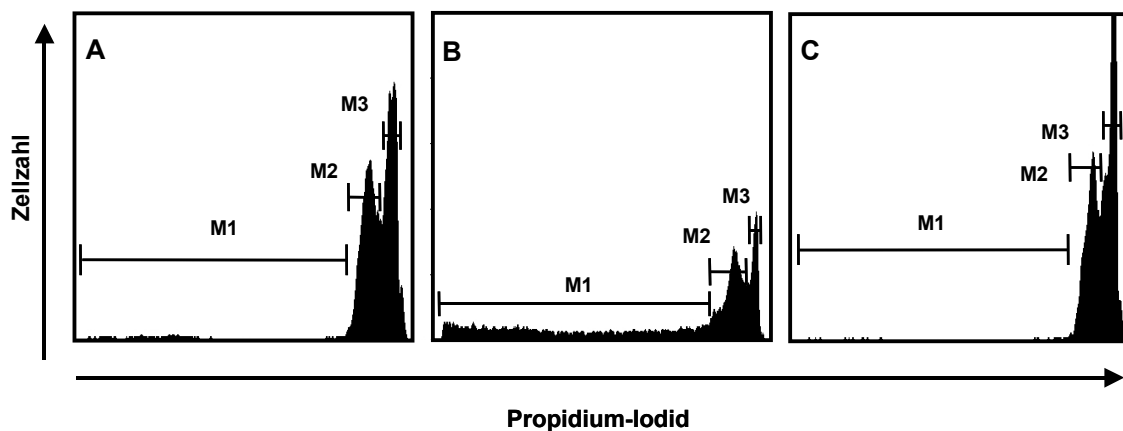


Abbildung 24 FACS-Analyse der Apoptose nach Nicoletti et al. 1 μ M Imatinib zeigt nach 21 h keinen Effekt auf den Wildtyp BaF3 (A). Nach Behandlung der BCR-ABL-positiven BaF3p185 steigert Imatinib die Apoptose (B). Dieser Effekt kann durch simultane Zugabe von IL-3 verhindert werden (C). (M1 = Apoptose; M2 = G1-Phase; M3 = G2-/S-Phase der jeweiligen Zellen)

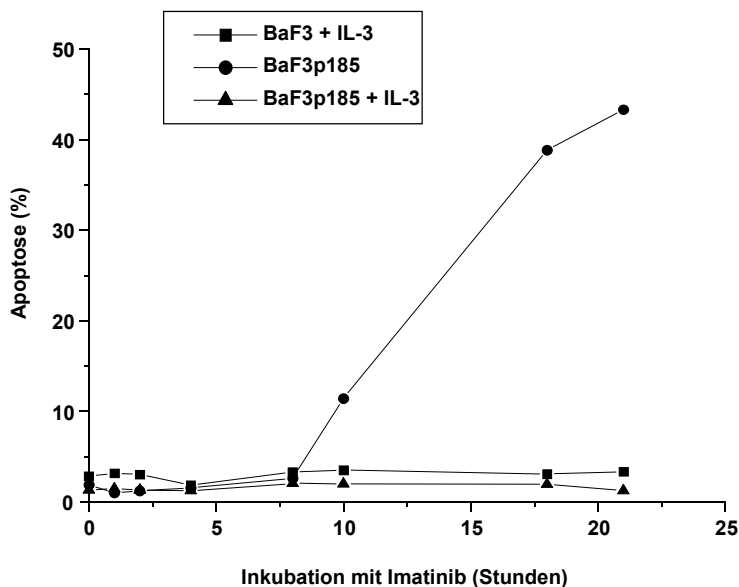


Abbildung 25 Graphische Darstellung induzierter Apoptose (in %) nach 21 h Behandlung von BaF3, BaF3p185 und BaF3p185 + IL-3 mit 1 μ M Imatinib.

Mit dem gewählten System war es also möglich, BCR-ABL mit Hilfe von Imatinib zu inaktivieren und diese Zellen mit den BCR-ABL-positiven, tyrosinkinaseaktiven Zellen zu vergleichen.

4.1.3.3 Vergleich der Wachstumskinetik behandelter und unbehandelter Zellen

Um das Wachstumsverhalten von BaF3 und BaF3p185 in Anwesenheit von Imatinib zu untersuchen, wurden die im Langzeitversuch kultivierten Zellen bei jedem Wechsel des Kulturmediums mit Trypanblau gefärbt und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt.

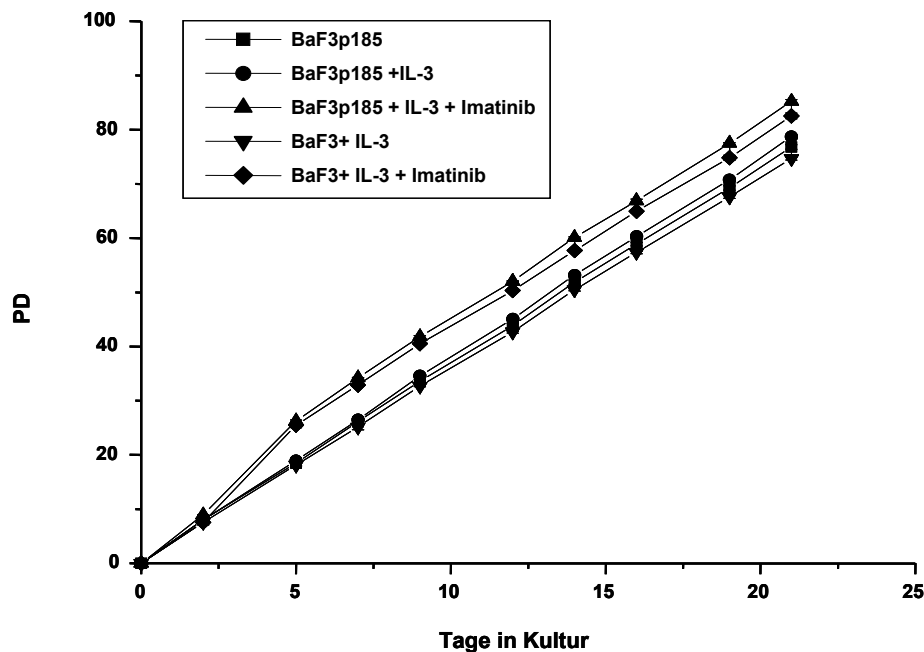


Abbildung 26 Wachstumskinetik von BaF3 \pm Imatinib, BaF3p185 \pm IL-3 \pm Imatinib aus drei unabhängigen Versuchen. Augetragen wurden die Tage der Zellen in Kultur gegen die Verdopplung der Zellen (PD) in dieser Zeit (+ S.D.)

Bis zum Erreichen von ca. 90 Verdopplungen unterschied sich die Wachstumskinetik der imatinib-behandelten Zellen nur marginal von den unbehandelten Zellen. Auch die Zugabe von IL-3 zur BaF3p185 hatte innerhalb des untersuchten Zeitrahmens keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen (Abbildung 26).

4.1.3.4 Einfluss von Imatinib auf die Telomerlänge der Zell-Linien

Um *in vitro* den Effekt des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib auf die Telomerlänge des Wildtyps BaF3 und der BCR-ABL-positiven Transfektanten BaF3p185 zu untersuchen, wurden die Zellen in drei unabhängigen Versuchen bis zu 90 PD (Verdopplungen) mit und ohne Zusatz von Imatinib kultiviert.

Die Berechnung der TFU (Telomerfluoreszenz-Einheiten) der Zellen basierten dabei auf Southern Blot Analysen der Rinderthymozyten (Interne Kontrolle unseres Flow-FISH Protokolls). Durchgeführt wurden die Southern Blot Analysen von Dr. Jörg Fellenberg, (Uniklinik Heidelberg, Abteilung Orthopädie).

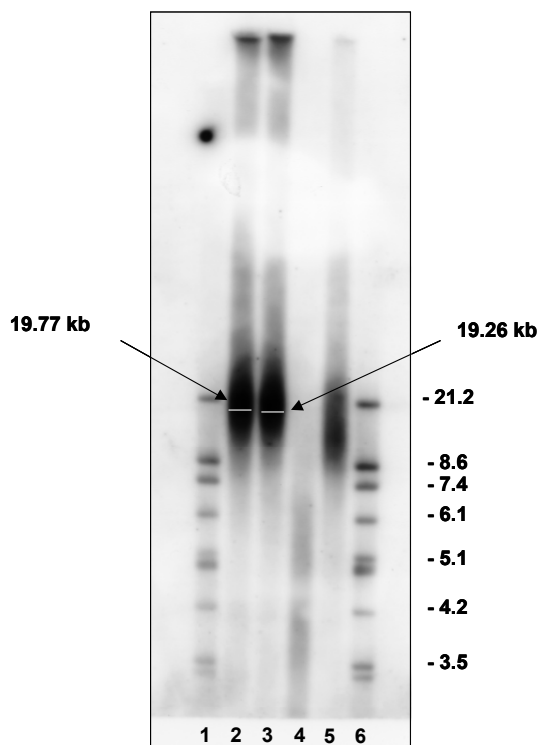


Abbildung 27 Southern Blot Analyse der internen Kontrolle - Rinderthymozyten. Die weißen Markierungen entsprechen den densitometrisch bestimmten mittleren Werten (19.77 und 19.26 kb).

Bande 1 und 6: Marker;

Bande 2 und 3: Rinderthymozyten;

Bande 4: Kontrolle 3.9 kb

Bande 5: Kontrolle 10.2 kb

Die mittlere Telomerlänge der Rinderthymozyten betrug 19.515 kb (19.77 + 19.26 kb, n = 2). Die Telomerlänge der einzelnen Ansätze wurde mit dem überarbeiteten Flow-FISH Protokoll, wie in Kapitel 3.13 erläutert, gemessen und als Telomerfluoreszenz-Einheiten (TFU ± S.D.) dargestellt (Abbildung 27).

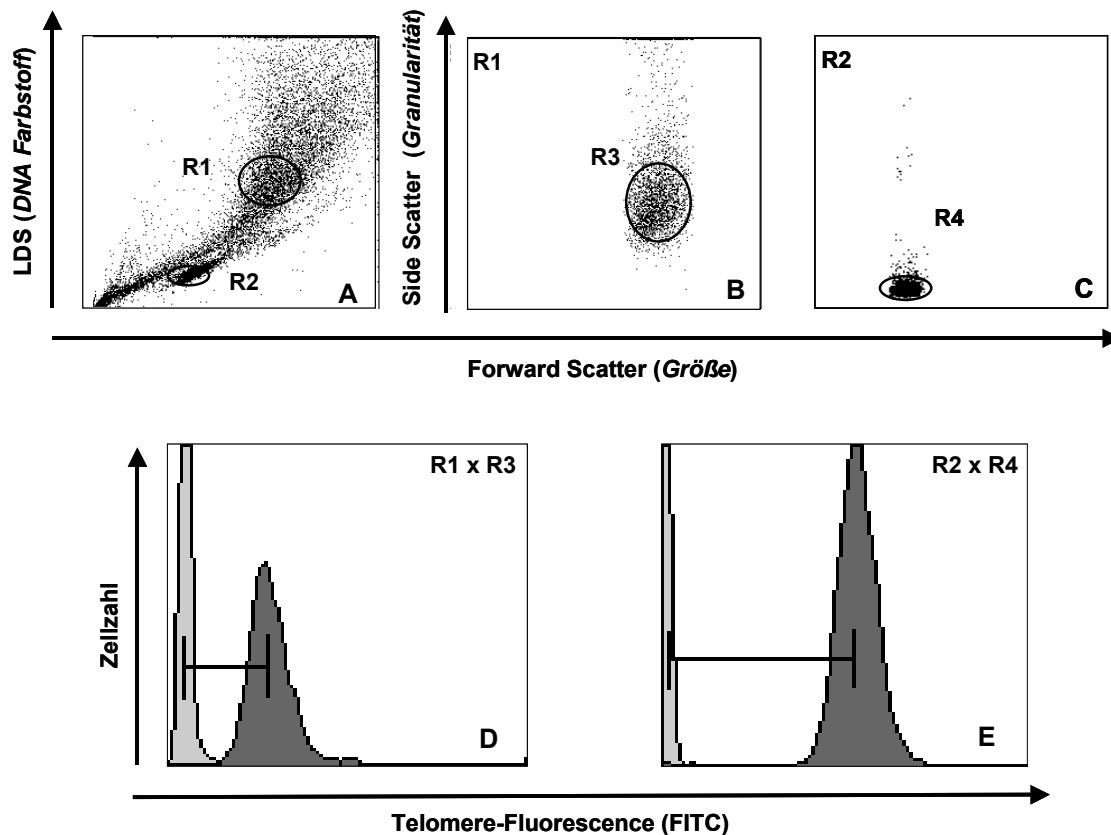


Abbildung 28 Flow-FISH-Analyse am Beispiel von BaF3p185. Auftrennung der Zellen auf Basis ihrer LDS Fluoreszenz und Größe (FSC; Forward Scatter) (R1 = diploide Zellen; R2 = interne Kontrolle) (A) und der Granularität (SSC; Side Scatter) und Größe (B, C). Die Autofluoreszenz (hellgrauer Peak; D, E) wurde von der Telomerfluoreszenz (dunkelgrauer Peak; D, E) abgezogen.

Beim Vergleich der Telomerlänge von BaF3 (6.04 ± 1.46 TFU) fand sich kein signifikanten Unterschied zur Transfektanten BaF3p185 (5.90 ± 1.44 TFU). Weiteres Ziel der Telomerlängen-Messung war der Vergleich von BaF3p185 + IL-3 mit und ohne Zusatz von $1 \mu\text{M}$ Imatinib zur Langzeit-Kultur. Die mittlere Telomerlänge von BaF3p185 + IL-3 (5.08 ± 0.53 TFU) wurde durch die Behandlung mit Imatinib (5.67 ± 1.63 TFU) nicht beeinflusst. Wie in Abbildung 29 dargestellt, gab es unter den Verdopplungen der Zellen (PD) keine Änderung der Telomerlänge.

Als Kontrolle diente die Untersuchung der Telomere von BaF3 +/- Imatinib und BaF3p185 +/- IL-3. Diese Telomerlängen-Messung zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

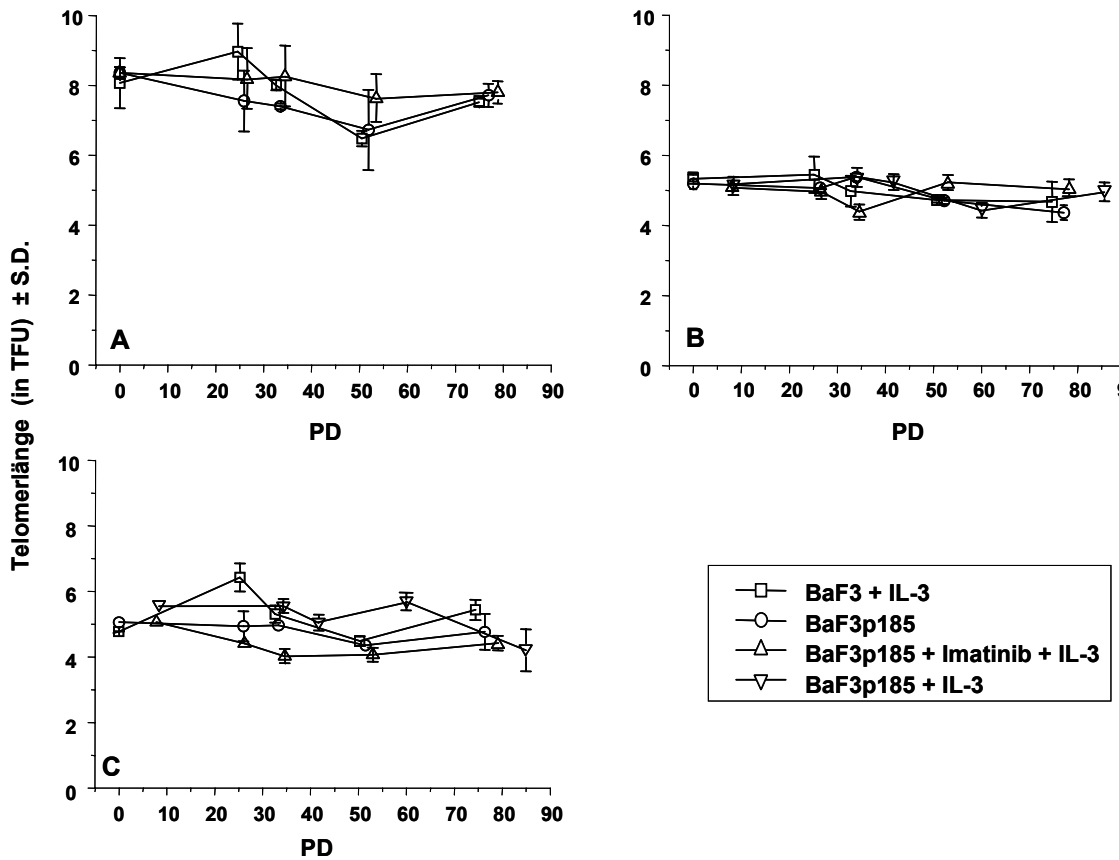


Abbildung 29 Analyse der Telomerlängen von BaF3 + IL-3, sowie BaF3p185 entweder mit Imatinib + IL-3, nur mit IL-3 oder ohne Zusätze. A – C zeigen drei unabhängige Experimente. Die Telomerlänge der Zellen wurde als TFU ± S.D. angegeben und gegen die Anzahl an Zellverdopplungen (PD) aufgetragen.

4.1.3.5 Untersuchung der Telomerase-Aktivität nach Behandlung mit Imatinib

Die Telomerase-Aktivität der Zellen wurde, wie in Kapitel 3.14 erläutert, als relative Telomeraseaktivität (RTA) mit dem Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} - Assay (TRAP-Assay) bestimmt. Um die Reproduzierbarkeit des Assays zu validieren, wurde die RTA aliquotierter und eingefrorener Proben von drei unterschiedlichen Zell-Linien an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in Doppelwerten bestimmt (Abbildung 30). Weder die Schwankungen zwischen den einzelnen Werten, noch zwischen den Messtagen waren signifikant.

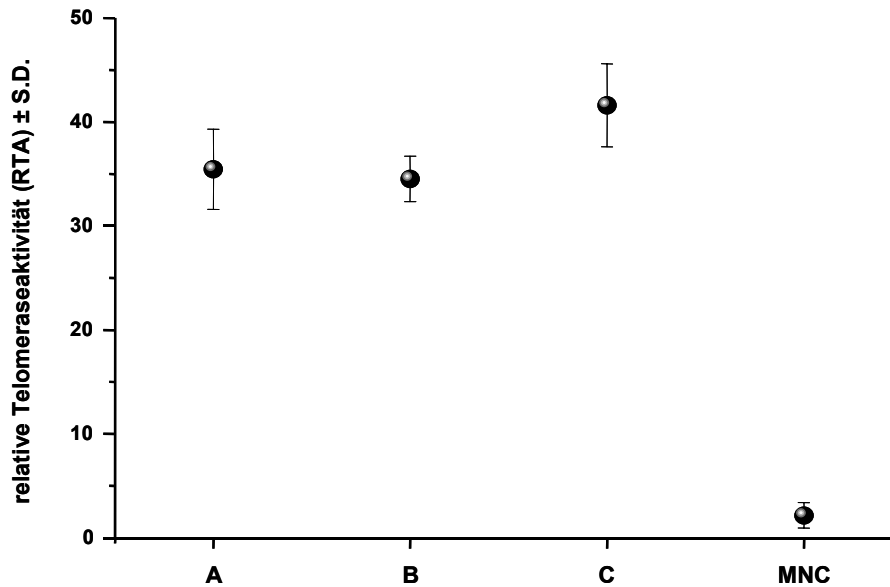


Abbildung 30 Mittelwert der relativen Telomeraseaktivität ($RTA \pm S.D.$) drei unterschiedlicher Zell-Linien (A – C) und der Negativkontrolle (MNC), gemessen als Doppelwerte an zwei unterschiedlichen Tagen.

Als Negativkontrolle diente die RTA mononukleärer Zellen (MNC) aus ficollisierten humanen peripheren Blutzellen.

Um den Einfluss der Tyrosinkinase BCR-ABL auf die Telomerase-Aktivität der Zellen zu untersuchen, wurde die RTA dreier voneinander unabhängigen Versuchen bei 0, ~60 und ~80 PD (Verdopplungen) jedes einzelnen Ansatzes (BaF3 + IL-3; BaF3p185 + IL-3 und BaF3p185 + IL-3 + Imatinib) bestimmt.

Im Vergleich zur Negativkontrolle ($RTA \pm S.D.$; 2.16 ± 1.22) war die RTA aller Ansätze sehr hoch. Der Vergleich der Telomerase-Aktivität ($RTA \pm S.D.$) zwischen dem Wildtyp BaF3 (98.25 ± 4.52) und BaF3p185 (78.63 ± 9.99) ergab keinen signifikanten Unterschied.

Darüber hinaus fand sich ebenfalls kein Unterschied zwischen der imatinib-behandelten BaF3p185 + IL-3 (76.92 ± 10.34) und der unbehandelten BaF3p185 + IL-3 (79.70 ± 7.83) (Abbildung 31).

Die Zugabe von IL-3 zu der BCR-ABL-positiven BaF3p185 allein, wie auch die Behandlung des Wildtyps BaF3 + IL-3 mit Imatinib hatte ebenso keinen Effekt auf die RTA.

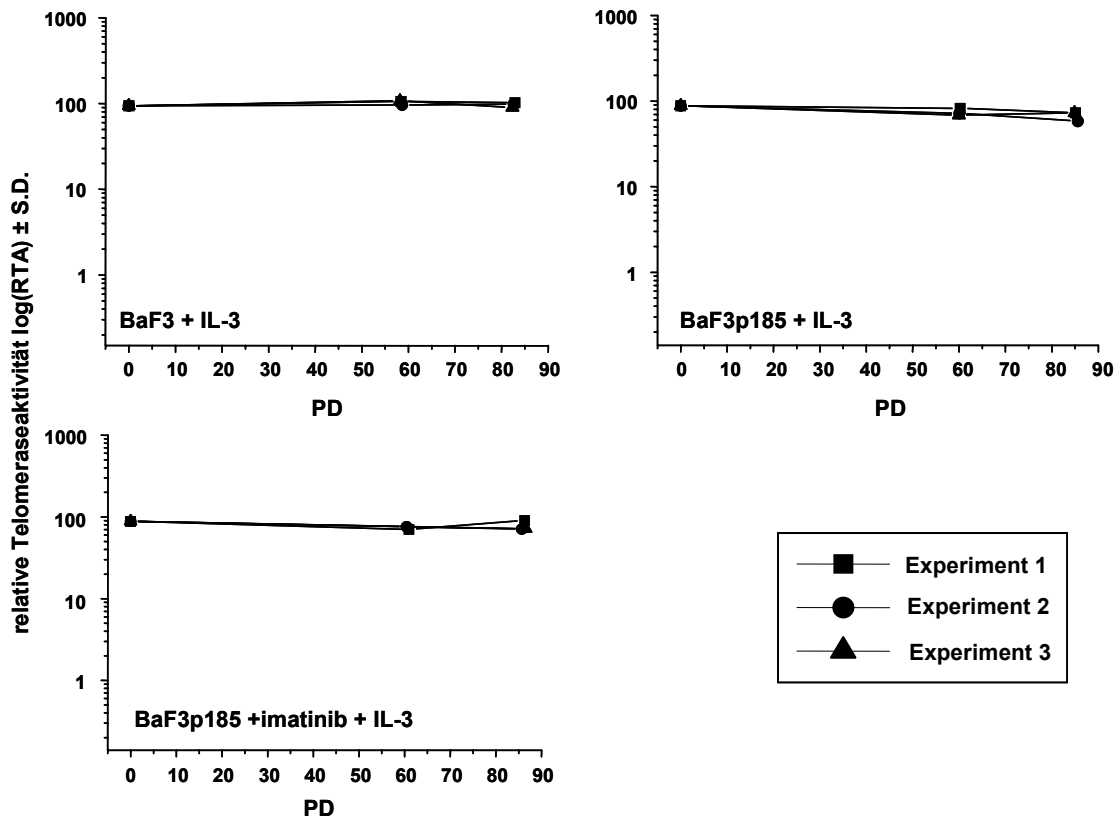


Abbildung 31 Bestimmung der relativen Telomeraseaktivität ($RTA \pm S.D.$) von BaF3 + IL-3 und BaF3p185 + IL-3 \pm Imatinib. Jede Abbildung repräsentiert 3 unabhängige Langzeitkulturen. Als Negativkontrolle dienten mononukleäre Zellen (MNC) ($n = 2$; $RTA \pm S.D.$; 2.16 ± 1.22). Die gemessene Absorption der Zellen (relative Telomeraseaktivität ($\log RTA$)) wurde gegen die Zahl der Zell-Verdopplungen (PD) aufgetragen.

4.1.3.6 Intrazelluläre Lokalisation von BCR-ABL

Der nächste Schritt war die Untersuchung der intrazellulären, vorwiegend zytoplasmatischen Lokalisation der Tyrosinkinase BCR-ABL, als ein möglicher Grund des mangelnden Effektes auf die Telomerase-Aktivität und Telomerlänge der Zellen (im Gegensatz zum nukleär lokalisierten c-ABL). Dazu wurde die Lokalisation von BCR-ABL in BaF3p185 in Abhängigkeit von Imatinib untersucht. In Abbildung 32 ist die Immunfluoreszenz von BCR-ABL nach einer 12-stündigen Behandlung mit 10 μ M Imatinib allein (E-H) oder in Kombination mit IL-3 (I-L) und die unbehandelte BaF3p185 (A-D) dargestellt.

Die Abbildungen zeigen grün gefärbt BCR-ABL, sowie (blau gefärbt) den Kern der Zellen, während die rechte Abbildung die Überlagerung des FITC-markiertem BCR-ABL und des DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol) -gefärbten Kerns darstellt.

Um die Abbildungen mit der Größe der Zelle vergleichen zu können zeigt die linke Reihe der Abbildung (A; E; I) die Durchlichtaufnahmen.

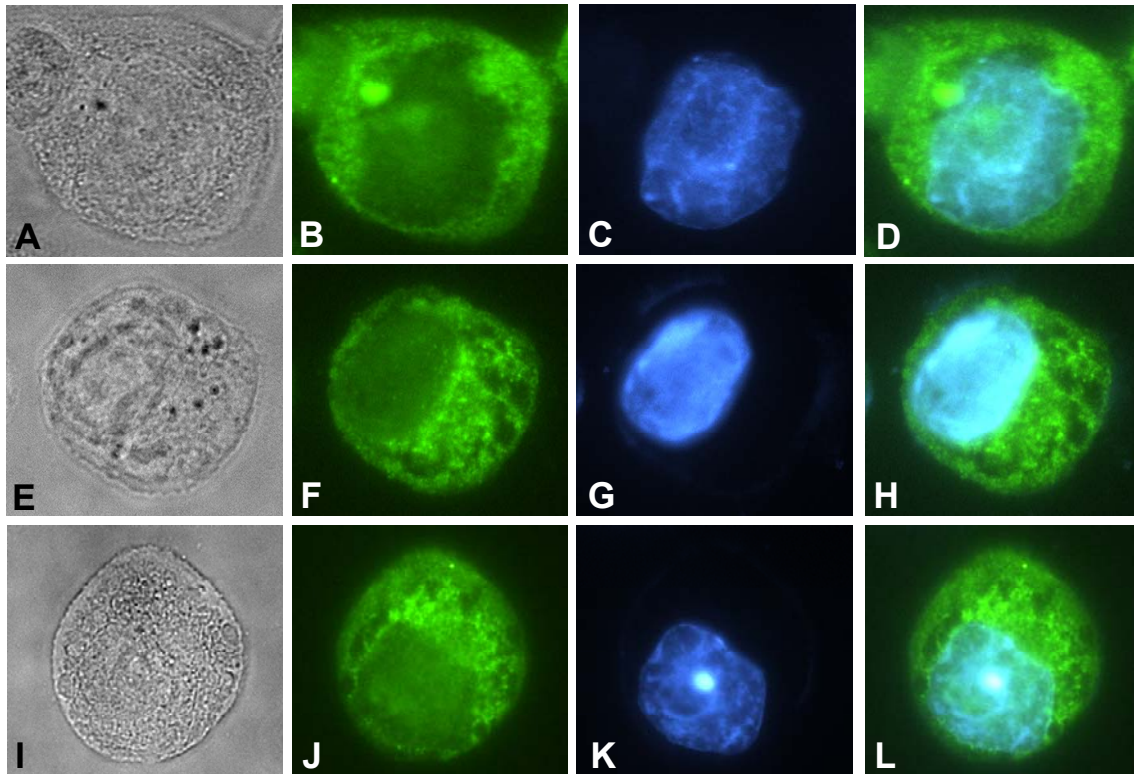


Abbildung 32 Immunfluoreszenz des FITC-markierten BCR-ABL (grün) und dem DAPI-gefärbten Kerns (blau). (A-D) unbehandelte BaF3p185 (E-H) BaF3p185 + Imatinib und (I-L) BaF3p185 + IL-3 + Imatinib.

Wie dargestellt, befand sich BCR-ABL ausschließlich im Zytoplasma (Abbildung 32 A-D). Weder die Behandlung mit Imatinib allein (Abbildung 32 E-H), noch die Kombination von Imatinib mit IL-3 (Abbildung 32 I-L) hatte einen signifikanten Effekt auf die zytoplasmatische Lokalisation von BCR-ABL.

4.1.4 Akute Myeloische Leukämie (AML)

4.1.4.1 Altersadaptierte Telomerlängen in AML-Patienten

In einer verblindeten Studie wurde mittels Flow-FISH die Telomerlängen mononukleärer Zellen (MNC) von 137 unbehandelter AML-Patienten mit über 80% Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark untersucht.

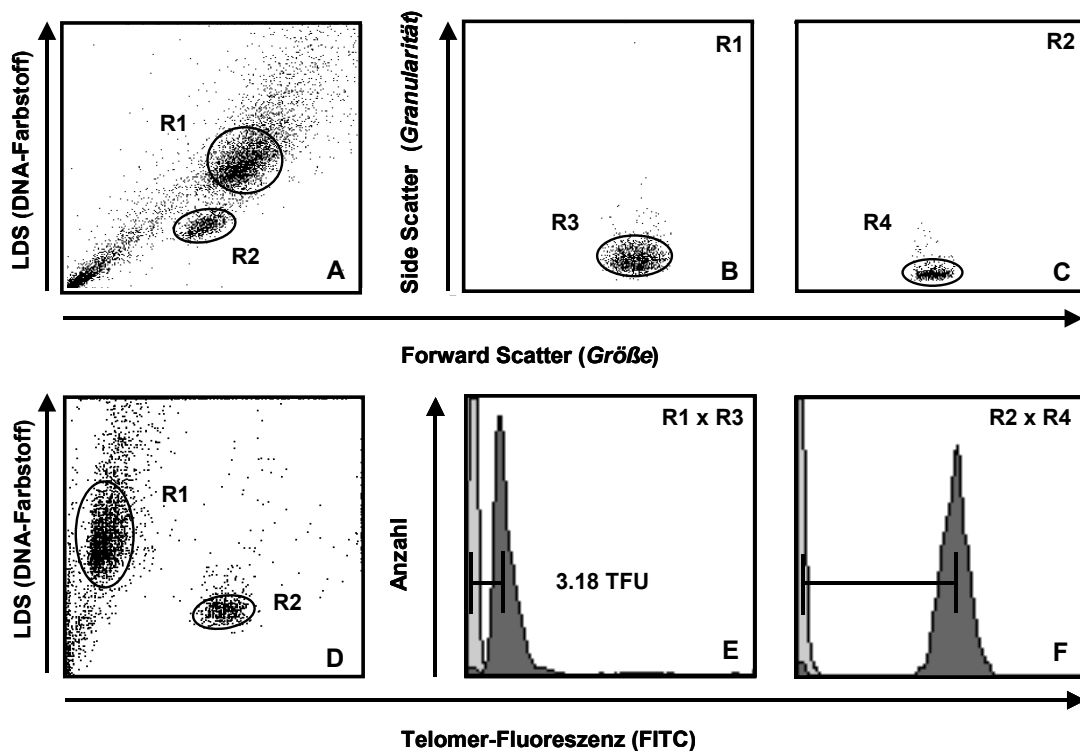


Abbildung 33 Flow-FISH Analyse der mononukleären AML-Zellen (MNC). Auftrennung der Zellen auf Basis ihrer LDS Fluoreszenz und Größe (FSC; Forward Scatter) (R1 = diploide AML-Zellen; R2 = interne Kontrolle) (A) und der Granularität (SSC; Side Scatter) und Größe (B, C), sowie eine weitere Möglichkeit zur Auftrennung mittels LDS-Fluoreszenz und Telomerfluoreszenz (D). Die Autofluoreszenz (hellgrauer Peak; E, F) wurde von der Telomerfluoreszenz (dunkelgrauer Peak; E, F) abgezogen.

Nach Korrektur mit Hilfe interner Kontrollzellen wurden die Ergebnisse als Telomer-Fluoreszenz-Einheiten (TFU = 1 kb) ausgedrückt (Abbildung 33).

Die Telomer-Fluoreszenz der AML-Patienten wurde mit den Ergebnissen vorhergehenden Messungen an peripheren Blut-Granulozyten einer Population

gesunder Kontrollpersonen (im Alter von 0 bis 90 Jahren) (Rufer et al., 1999) verglichen.

Wie in Abbildung 34 dargestellt, war die altersadaptierte Telomerlänge der AML-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollpersonen signifikant verkürzt (Median: -2.5; Range: -5.0 bis 4.0 TFU; $p < 0.001$).

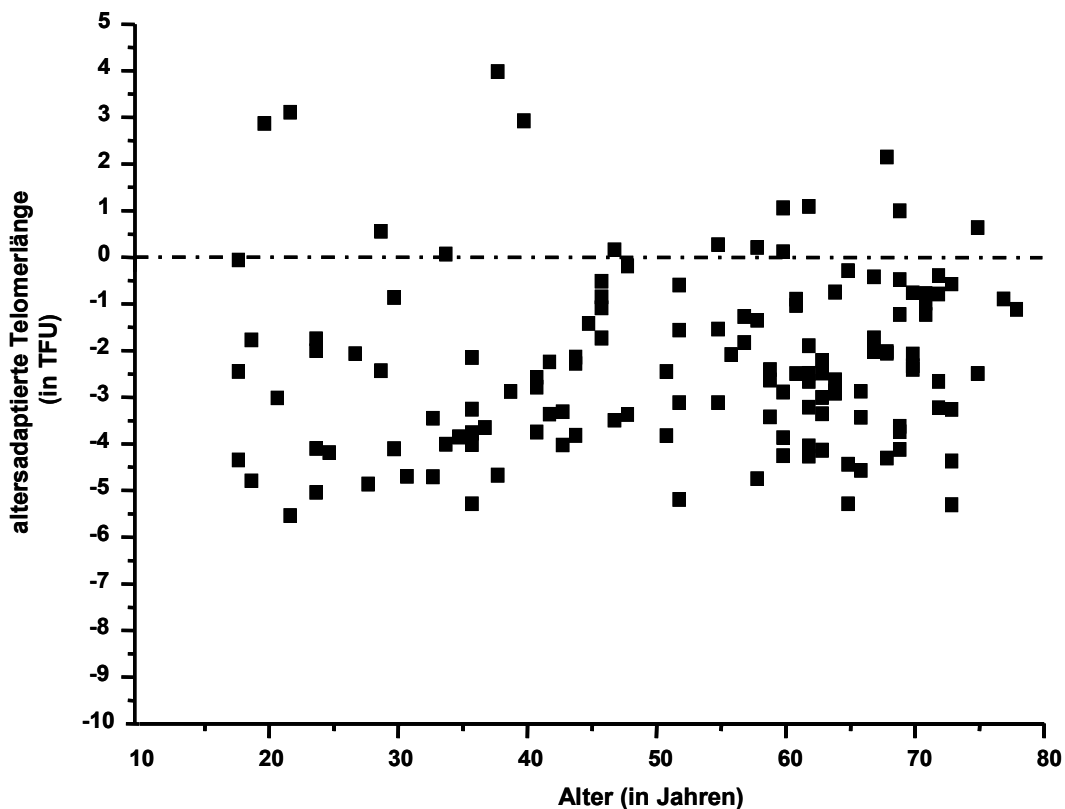


Abbildung 34 Verteilung der altersadaptierten Telomerlängen der AML-Patienten. Die Telomere der AML-Patienten sind im Vergleich zu den altersadaptierten Kontrollen (gestrichelte Linie) signifikant kürzer.

4.1.4.2 Korrelation der Telomerlänge mit klinischen Charakteristika der AML-Patienten

Die altersadaptierte Telomerlänge verschiedener klinischer Charakteristika der Patienten ist in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2 Korrelation altersadaptierter Telomerlängen mit verschiedenen klinischen Parametern der Patienten.

^a Statistische Analyse für FAB mittels logistische Regression, für die anderen Parameter mit zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test

* Signifikante Korrelation bei einem p-Wert < 0.05

Die Telomerlänge der verschiedenen FAB-Subtypen wurde mit FAB M1 verglichen

| | n = | Telomerlänge [TFU] Median | Range | p-Wert ^a |
|------------------------------|-----|------------------------------|---------------|---------------------|
| Karyotyp | | | | |
| Normal | 78 | -2.3 | (-5.3 – 2.9) | |
| Abberant | 59 | -3.0 | (-5.5 – 4.0) | 0.03* |
| Ein / zwei Abberationen | 46 | -2.9 | (-5.5 – 4.0) | 0.10 |
| ≥ drei Abberationen | 13 | -3.7 | (-4.9 – 3.1) | 0.03* |
| Ratio FLT3-ITD mut/wt | | | | |
| > 0.8 | 21 | -3.2 | (-5.3 – 4.0) | 0.04* |
| ≥ 0.8 | 110 | -2.4 | (-5.5 – 3.1) | |
| FAB | | | | |
| M0 | 11 | -2.1 | (-5.2 – 2.9) | 0.71# |
| M1 | 68 | -1.9 | (-5.3 – 4.0) | |
| M2 | 7 | -1.0 | (-2.9 – 2.9) | 0.21# |
| M4 | 8 | -3.3 | (-4.7 – -0.6) | 0.03#* |
| M4eo | 4 | -3.2 | (-4.6 – -1.3) | 0.13# |
| M5 | 38 | -3.8 | (-5.5 – 0.3) | < 0.001#* |
| M7 | 1 | -2.4 | | 0.69# |
| Krankheitsstadium | | | | |
| De novo | 125 | -2.5 | (-5.5 – 4.0) | |
| Sekundär | 12 | -1.3 | (-5.0 – 0.2) | 0.35 |
| CD34 Expression | | | | |
| Negativ | 63 | -2.5 | (-5.5 – 2.9) | |
| Positiv | 65 | -2.5 | (-5.3 – 4.0) | 0.94 |
| Alter | | | | |
| ≤ 60 Jahre | 80 | -3.4 | (-5.5 – 2.2) | |
| > 60 Jahre | 57 | -1.7 | (-4.0 – 4.0) | < 0.001* |

Vergleicht man die Telomerlänge der AML-Patienten unter Berücksichtigung der Einteilung der Patienten in de-novo AML (Median: -2.5 TFU) oder therapieassoziierte sekundäre AML (Median: -1.3 TFU) finden sich keine signifikanten Unterschiede. Allerdings darf hier die ungleiche Verteilung der Patientenzahl (125 Patienten mit de-novo AML und nur 12 Patienten mit sekundärer AML) nicht außer Acht gelassen werden.

Ein weiterer ungünstiger prognostischer Faktor ist der Gehalt an CD34⁺ Zellen in der Blastenpopulation der AML Patienten als Marker unreifer Zellen. Ab einem Anteil von $\geq 30\%$ CD34⁺ Zellen spricht man von CD34 Positivität der AML Patienten. Die altersadaptierte Telomerlänge zeigte keine Korrelation mit dem Anteil an CD34-positiven Blasten der Patienten.

Sowohl Patienten mit CD34-positiven Blasten, als auch Patienten mit einer CD34-negativen Blasten weisen altersadaptierte Telomerlängen von -2.5 TFU (Range siehe Tabelle 4.2) auf.

Klinisch wird die AML nach der FAB-Klassifikation in die Subtypen M0 bis M7 eingeteilt. Innerhalb dieses FAB Klassifikationssystems wiesen AML Patienten des monozytischen FAB Subtyps M5 (Median -3.8 TFU), im Vergleich zu FAB M1 (Median -1.9 TFU; $p < 0.001$), die kürzesten Telomere auf. Auch FAB M4 (Median -3.3 TFU; $p = 0.03$) zeigte trotz der niedrigen Fallzahl von nur 8 Patienten signifikant kürzere Telomere.

Vergleicht man die prozentuale Verteilung eines normalen, einfach oder multipel aberranten Karyotyps innerhalb FAB M4 / M5 mit der Verteilung in FAB M1, so findet sich hier kein Unterschied (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3 Verteilung der Karyotypen auf FAB-Subtyp M1 im Vergleich zu M4/M5

| | Karyotyp | | | Gesamt |
|---------------------------|----------|------------------|-------------------|--------|
| | normal | einfach aberrant | multipel aberrant | |
| FAB-Subtyp M1 | | | | |
| n = | 42 | 23 | 3 | 68 |
| (%) | 61.8 % | 33.8 % | 4.4 % | 100% |
| FAB-Subtyp M4 / M5 | | | | |
| n = | 25 | 15 | 6 | 46 |
| (%) | 54.3 % | 32.6 % | 13.0 % | 100% |

Ein wichtiger prognostischer Faktor und damit ein essentielles Charakteristikum der AML Patienten ist der Anteil an mutiertem FLT3 im Vergleich zum unmutierten Wildtyp FLT3 (Bestimmung wurde von der Studiengruppe SHG-AML 96, Dresden durchgeführt). Dieser Anteil wird als FLT3 Ratio ausgedrückt. Patienten mit einer hohen FLT3 Ratio (FLT3-ITD mutant/wildtyp > 0.8) und damit einer ungünstigeren Prognose hatten signifikant kürzere Telomere als Patienten mit einer FLT3 Ratio ≤ 0.8 (Median -3.2 TFU vs. -2.4 TFU; $p = 0.04$). Der Einfluss der FLT3 Ratio auf die Telomerlänge der AML-Patienten wird in der Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp noch deutlicher (Median -2.9 TFU vs. -2.0 TFU; $p = 0.01$).

Eine weitere Einteilungsmöglichkeit bietet das Alter der Patienten (≤ 60 Jahre und über 60 Jahre). Interessanterweise zeigte hier das jüngere Patienten-Kollektiv signifikant kürzere Telomere (Median -3.4 TFU versus -1.7 TFU; $p < 0.001$; Abbildung 35).

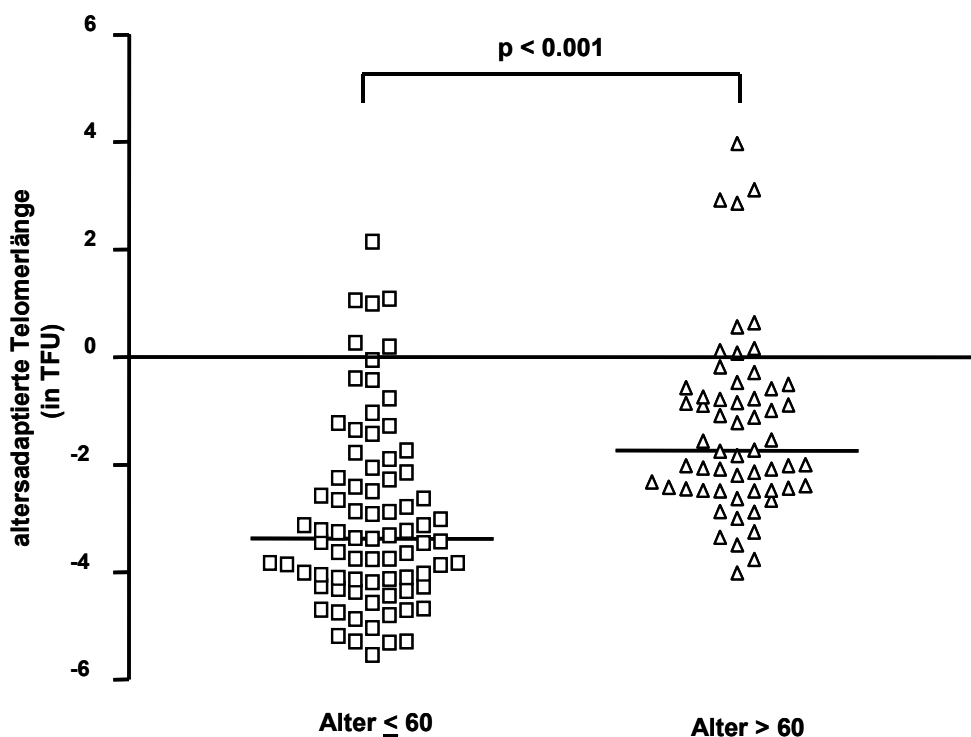


Abbildung 35 Vergleich der altersadaptierten Telomerlänge der AML Patienten unter 60 Jahren mit den Patienten über 60 Jahren.

Um diese beiden Patienten-Kollektive genauer zu charakterisieren, wurde die Verteilung chromosomaler Aberrationen untersucht. Während Patienten unter 60 Jahren einen höheren Prozentsatz an multipel aberranten Karyotypen

aufwiesen (50% normale, 37% einfach aberrante und 13% multipel aberrante Karyotypen) war der Anteil in Patienten unter 60 Jahren niedriger (66% normale, 29% einfach aberrante und 5% multipel aberrante Karyotypen).

4.1.4.3 Zusammenhang zwischen Telomerlänge und karyotypischer Klassifizierung

Chromosomale Aberrationen gehören zu den wichtigsten bekannten Prognosefaktoren der AML. Um eine potentielle Abhängigkeit der Telomerlänge von der karyotypischen Instabilität der AML Blasten untersuchen zu können, wurden die Patienten, basierend auf konventioneller Zytogenetik (durchgeführt von der Studiengruppe SHG-AML 96, Dresden), in drei Gruppen eingeteilt.

Dabei hatten 78 der untersuchten Patienten einen normalen Karyotyp, während 46 Patienten ein oder zwei unabhängige Aberrationen (nicht-komplexer Karyotyp) und 13 Patienten mehr als drei unabhängige Aberrationen (multiple Aberrationen, komplexer Karyotyp) aufwiesen (Tabelle 3.13; Patienten-Charakteristika AML). Mit eingeschlossen waren sieben Patienten mit einem günstigen zytogenetischen Profil [t(8;21), inv(16)].

Vergleicht man die altersadaptierte Telomerlänge dieser zytogenetisch eingeteilten Gruppen, so fanden sich bei Patienten mit aberrantem Karyotyp (komplex und nicht-komplex) (Median -3.0 TFU) signifikant kürzere Telomere als bei Patienten mit normaler Zytogenetik (Median -2.3 TFU; $p = 0.03$). Während die Telomere der Patienten mit einem nicht-komplexen Karyotyp (Median -2.9 TFU) im Vergleich zum normalen Karyotyp verkürzt waren, hatten Patienten mit multiplen Aberrationen (Median -3.7 TFU; $p = 0.03$) die kürzesten Telomere (Tabelle 4.2 und Abbildung 36).

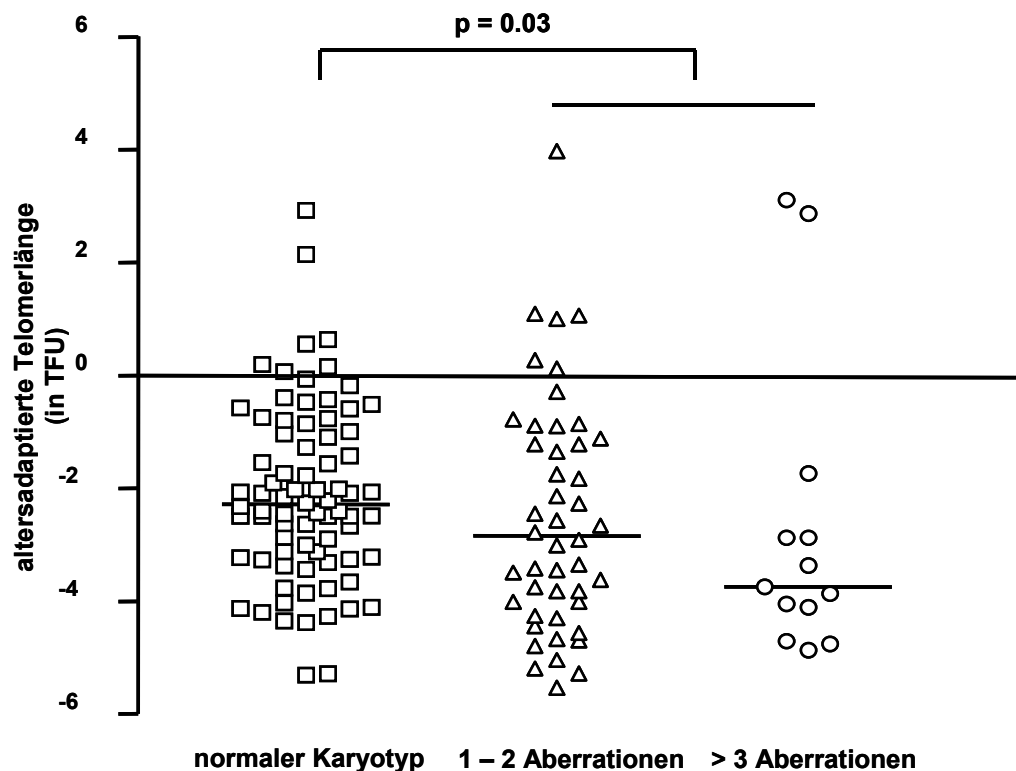


Abbildung 36 Altersadaptierte Telomerlänge (in TFU) in Korrelation mit der karyotypischen Instabilität der AML-Patienten.

Die Einteilung in verschiedene Risikogruppen bietet eine weitere Möglichkeit Patienten mit AML einzuteilen. Die Niedrigrisikogruppe umschließt dabei Patienten mit t(8;21) mit bzw. ohne zusätzliche Aberrationen. Die Gruppe mit Standardrisiko enthält Patienten mit normalem Karyotyp, mit inv(16) mit/ohne weitere Aberrationen und Aberrationen welche nicht im Hoch- bzw. Niedrigrisiko eingeschlossen sind. Im Gegensatz dazu umschreibt die Gruppe der Hochrisikopatienten die restlichen Aberrationen, sowie multiple Aberrationen und sekundäre Leukämien.

Wie in Abbildung 37 dargestellt, zeigten die Hochrisikopatienten (n = 29) eine deutliche Tendenz zu kürzeren Telomeren (Median -3.7; Range -5.5 bis 4.0) als die Telomere der Patienten mit Standardrisiko (n = 103) (Median -2.4; Range -5.3 bis 2.9). Die Telomere der Patienten mit Niedrigrisiko lagen zwischen der Hochrisiko- und der Standardrisikogruppe (Median -2.9; Range -4.9 bis -0.3).

Diese Gruppe wies mit 5 Patienten allerdings eine zu geringe Fallzahl auf, weswegen sie hier nicht mit berücksichtigt wurde.

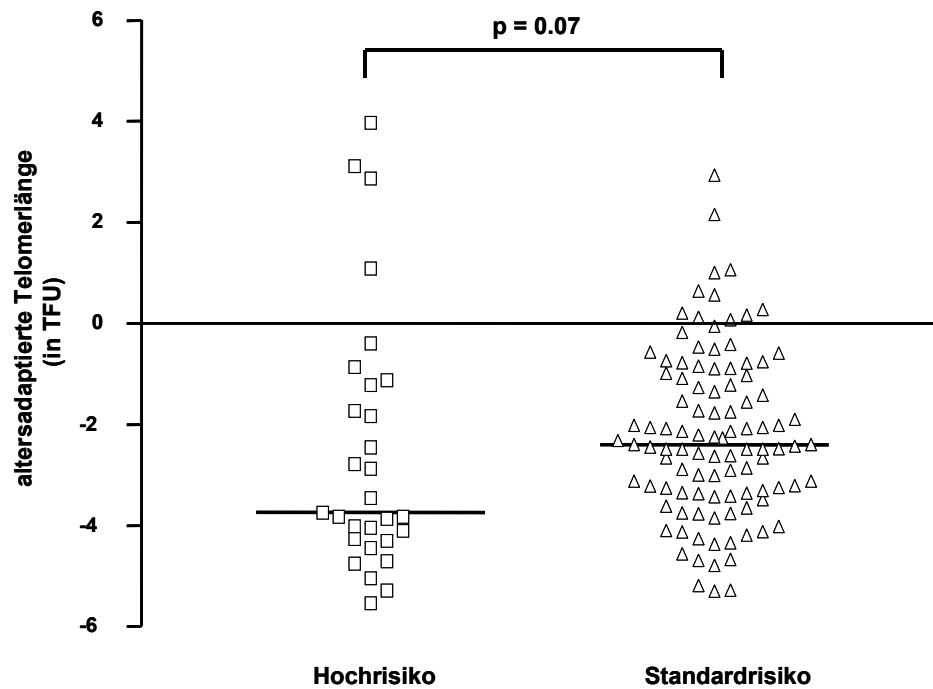


Abbildung 37 Altersadaptierte Telomerlänge (in TFU) in Korrelation mit dem Risikoscore der AML-Patienten.

4.1.4.4 Einfluss der Telomerlänge auf das Therapieansprechen und das Überleben der Patienten

Für die Gesamtgruppe der untersuchten AML Patienten fand sich im untersuchten Zeitraum weder auf das Therapieansprechen, noch auf das Gesamtüberleben oder krankheitsfreie Überleben einen signifikanten Einfluss der Telomerlänge.

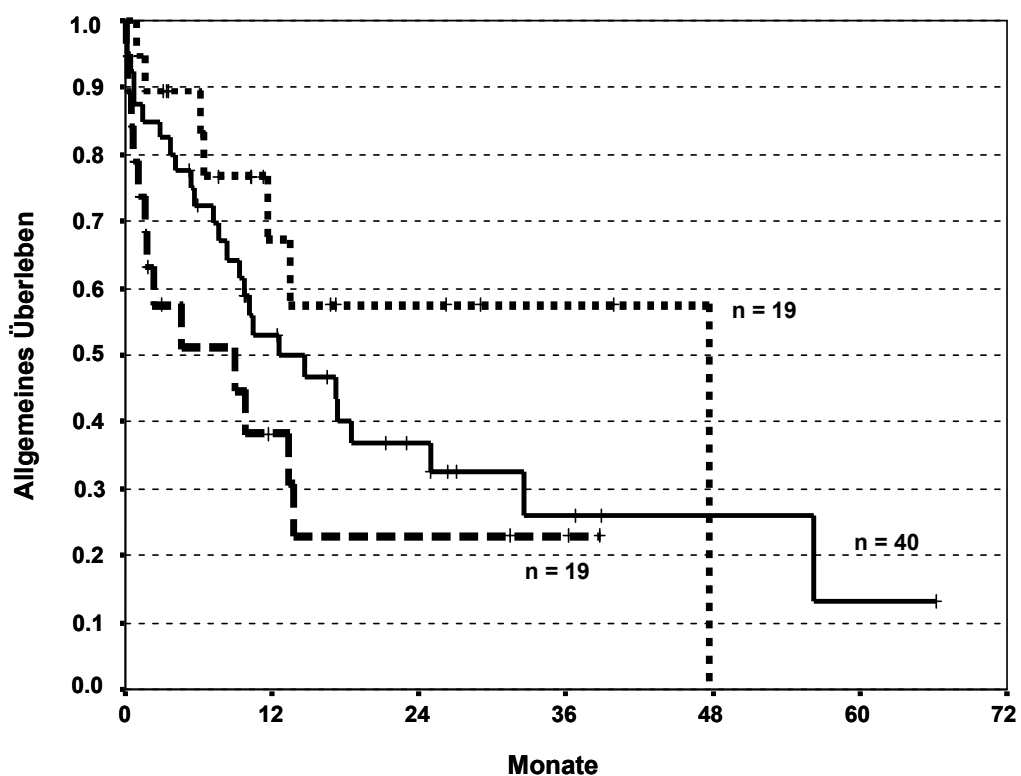


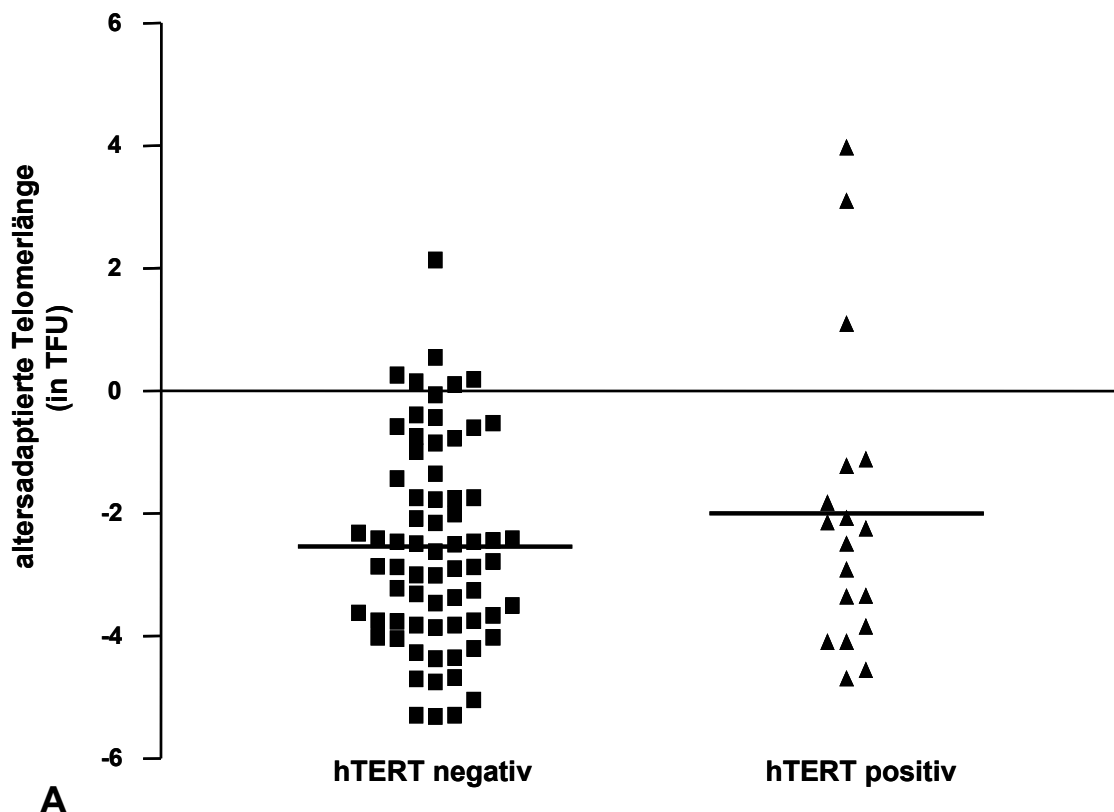
Abbildung 38 Gesamtüberleben der AML Patienten mit normalem Karyotyp in Abhängigkeit von der Telomerlänge. Gestrichelte Linie = Patienten mit Telomeren länger als die 75th Perzentile; durchgezogene Linie = Patienten mit Telomeren zwischen der 25th und 75th Perzentile; gepunktete Linie = Patienten mit Telomeren kürzer als die 25th Perzentile

In der Gruppe der Patienten mit normalem Karyotyp (n=78) zeigte sich jedoch ein Einfluss der Telomerlänge auf das Überleben. Zum besseren Vergleich wurden die Patienten in 3 Gruppen eingeteilt: Telomere länger als die 75th

Perzentile (Telomere länger als -1.0 TFU; $n = 19$); Telomere zwischen der 25th und 75th Perzentile ($n = 40$) und Telomere kürzer als die 25th Perzentile (Telomere kürzer als -3.2 TFU; $n = 19$). Ein Vergleich der Überlebenskurven der Patienten nach 48 Monaten zeigt Abbildung 38. Nach 48 Monaten befindet sich kein Patient der Gruppe mit den kürzesten Telomere am Leben (Abbildung 38, gepunktete Linie), während aus den beiden anderen Gruppen jeweils ca. 20% der Patienten am Leben sind (Abbildung 38). Die kleine Fallzahl lässt hier allerdings kein entgültiges Urteil zu.

4.1.4.5 Zusammenhang zwischen Telomerlänge und Expression von hTERT mRNA

Aus der Gruppe der 137 Patienten, von welchen die Telomerlänge mit Flow FISH gemessen werden konnte, wurden 87 Patienten auf den Anteil an hTERT mRNA Expression mittels quantitativer RT-PCR (Taqman[®]) untersucht. Die Expression von hTERT mRNA konnte in 21% der Patienten (18 von 87 Patienten) nachgewiesen werden. Überraschenderweise war die altersadaptierte Telomerlänge zwischen den Patienten ohne hTERT Expression ($n = 69$; mittlere TFU \pm S.D.: -2.5 ± 0.2 TFU) und mit hTERT Expression ($n = 18$; -2.0 ± 0.6 TFU) nicht unterschiedlich (Abbildung 39 A).



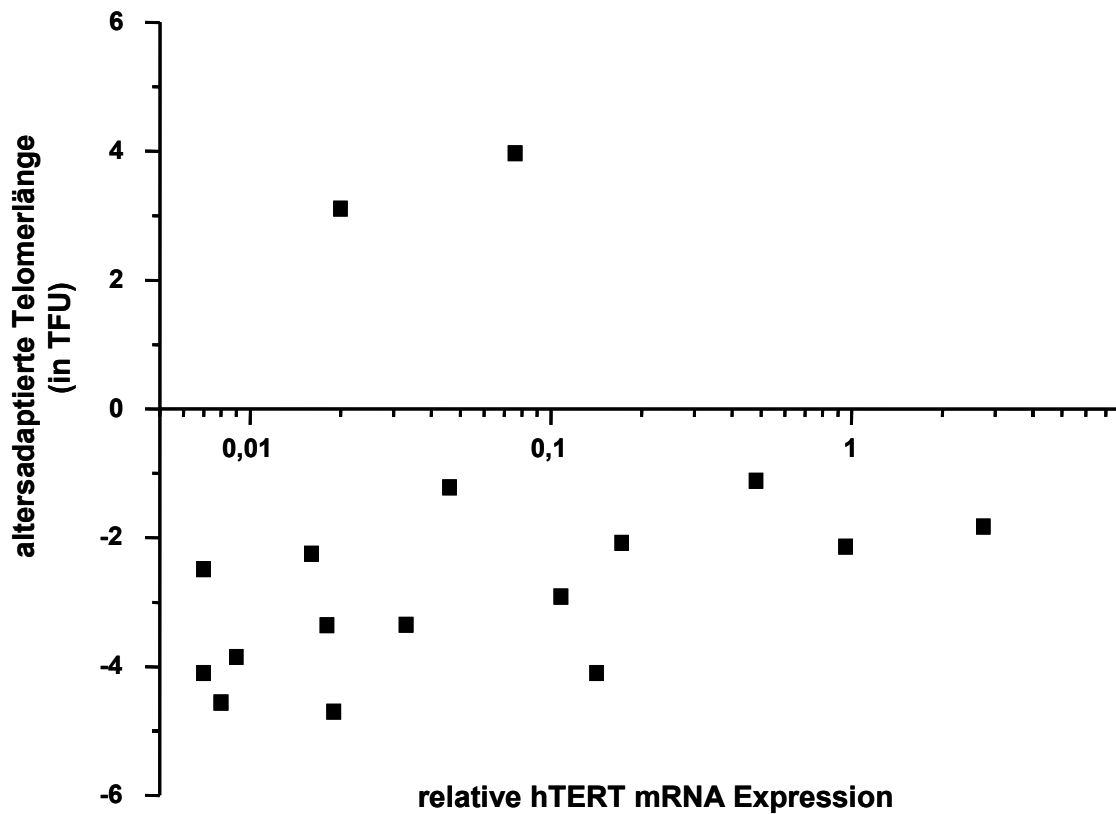
**B**

Abbildung 39 (A) Vergleich der altersadaptierten Telomerlänge zwischen hTERT positiven und hTERT negativen Proben (B) Korrelation zwischen altersadaptierter Telomerlänge und der relativen hTERT mRNA Expression.

Nach Korrelation der relativen hTERT mRNA Expression mit der altersadaptierten Telomerlänge zeigte sich mit zunehmender Expression eine leichte, aber nicht signifikante Tendenz zu längeren Telomeren (Abbildung 39 B).

4.1.4.6 *Beziehung zwischen der hTERT Expression und den chromosomalen Abberationen der Patienten*

Da die Telomerlänge signifikant mit dem Karyotyp der Patienten korrelierte, stellte sich die Frage, inwieweit die Expression der hTERT mRNA mit chromosomalen Aberrationen der Patienten korreliert. Dabei zeigte sich, dass die meisten AML Patienten mit normalem Karyotyp kein hTERT exprimierten, während die Expression des hTERT bei den Patienten mit aberrantem Karyotyp zunahm (Abbildung 40).

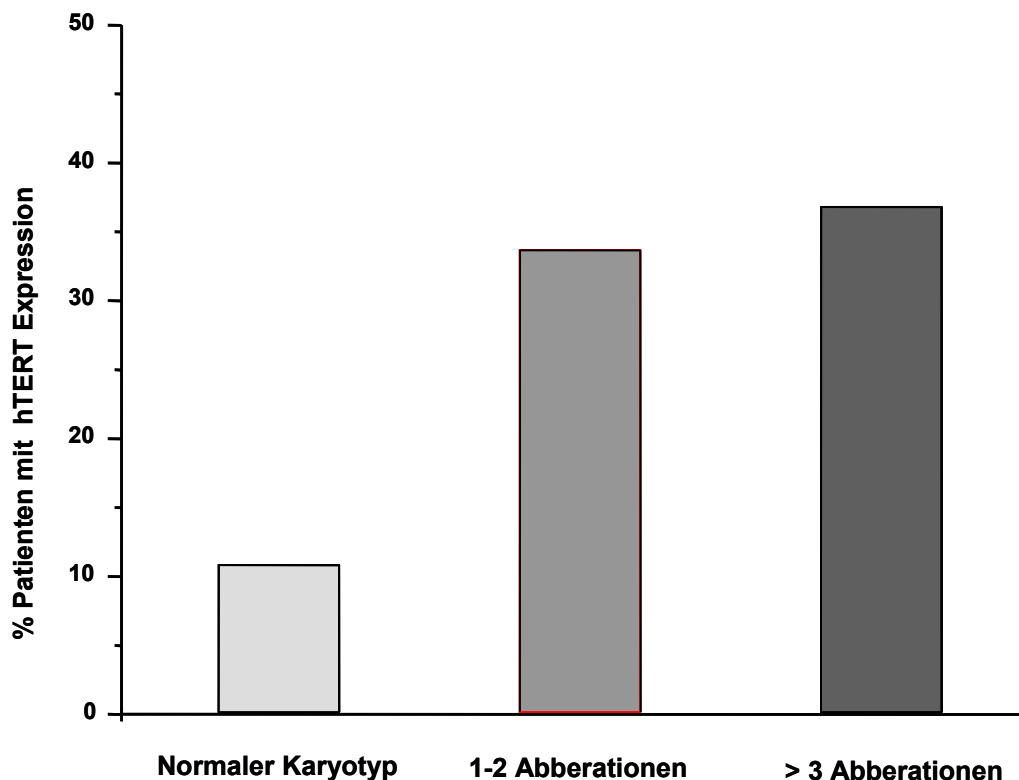


Abbildung 40 *Verteilung hTERT positiver Proben auf einzelnen Karyotypen (in %).*

Nachweisbar war die hTERT Expression in 4 von 11 (= 36.4 %) der Patienten mit komplexem Karyotyp, in 9 von 27 (= 33.3 %) mit nicht-komplexem Karyotyp und in 5 von 49 (= 10.2 %) Patienten mit normalem Karyotyp. Während also Patienten mit hTERT Expression zu 72% einen aberranten Karyotyp aufwiesen, zeigte sich bei hTERT negativen Patienten nur zu 36% ein aberranter Karyotyp.

4.1.4.7 Bestimmung alternativer hTERT Splice-Varianten in der AML

Alternatives Spleißen der hTERT mRNA führt zur Generierung funktionsloser Proteine unterschiedlicher Größe und spielt so eine wichtige Rolle in der Regulation der Telomeraseaktivität.

Um zu untersuchen, ob diese unterschiedlichen Splicing-Varianten bei der AML für die steigende hTERT mRNA Level der aberranten Karyotypen verantwortlich sein könnten, wurde in diesem Teil der Arbeit ihre Verteilung mit Hilfe von RT-PCR (wie in Kapitel 3.16 Material und Methode erläutert) bestimmt. Von 87 der 137 AML Patienten konnte neben der relativen hTERT mRNA Expression auch die Verteilung der Splicing-Varianten bestimmt werden. Ein Beispiel unterschiedlicher hTERT Splicing-Varianten zeigt Abbildung 41.

Das hTERT Transkript der vollen Länge (+ α + β) reicht von Base 2164 bis 2620 und bildet ein 457 bp großes PCR-Produkt. Nur dieses „full-length“ Transkript ist in der Lage funktionsfähige Telomerase zu bilden. Die α -Deletion entfernt eine 36 bp große Sequenz des RT Motif A und führt nicht nur zu funktionslosen Proteinen, sondern ist ein dominant negativer Repressor der Telomeraseaktivität. Auch die β -Deletion führt durch den Verlust einer 182 bp großen Sequenz vor dem RT Motif B zu einem nicht funktionsfähigen Protein.

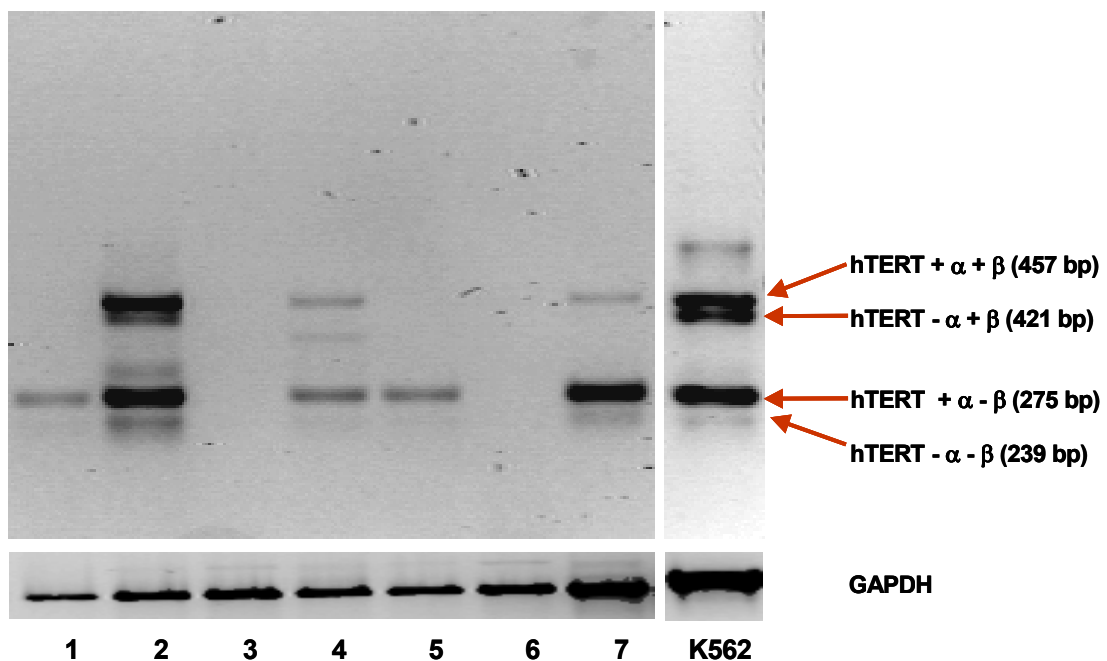


Abbildung 41 Beispiel der Darstellung verschiedener hTERT Splicing-Varianten in AML Patienten (Bahn 1 – 7) und K562 als Positiv-Kontrolle.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der hTERT Expression zeigten 18 der 87 Patienten (21%) die aktive „full-length“ hTERT ($+\alpha+\beta$). In zwei der hTERT positiven Proben konnte allerdings keine ($+\alpha+\beta$) hTERT Splicing-Variante nachgewiesen werden, während zwei hTERT negative Proben die aktive hTERT ($+\alpha+\beta$) aufwiesen.

Sieben AML Patienten mit ($+\alpha+\beta$) hTERT exprimierten zusätzlich die inaktive, dominant negative $-\alpha$ Splicing-Variante. 22% der Patienten ($n = 19$) wiesen nur die inaktiven Splicing-Varianten ($-\alpha$, $-\beta$ und $-\alpha-\beta$) auf, während in 57% der Patienten ($n = 50$) keine hTERT Splicing-Variante nachweisbar war (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4 Verteilung der verschiedenen Splicing-Varianten (absolute Anzahl sowie prozentualer Anteil der 87 untersuchten AML Patienten)

| | n = 87 | % Anteil |
|--|---------------|-----------------|
| Proben ohne hTERT Splicing-Varianten | 50 | 57% |
| Anzahl Splicing-Varianten insgesamt | 37 | 43% |
| Verteilung der einzelnen Splicing-Varianten | | |
| $+\alpha+\beta$ | 18 | 21% |
| $-\alpha$ | 14 | 16% |
| $+\alpha+\beta$ ohne $-\alpha$ | 11 | 13% |
| $+\alpha+\beta$ inklusive $-\alpha$ | 7 | 8% |
| Splicing-Varianten ohne $+\alpha+\beta$ | 19 | 22% |
| $-\beta$ | 24 | 28% |
| $-\alpha-\beta$ | 25 | 29% |

4.1.4.8 Untersuchung des Zusammenhangs funktionell aktiver Splice-Varianten und hTERT Expression

Die zuvor beschriebene relative hTERT Expression zeigte eine gute Korrelation ($p < 0.001$) mit der funktionsfähigen Splicing-Variante ($+\alpha+\beta$).

Um die Gruppe der 18 aktiven Splicing-Varianten ($+\alpha+\beta$) noch einmal zu unterteilen, wurde die relative hTERT Expression der aktiven Variante ($+\alpha+\beta$) mit und ohne dominant negative $-\alpha$ Splicing-Variante untersucht. Dabei fand sich eine signifikant höhere relative hTERT Expression in den Proben ohne Kombination mit $-\alpha$ ($p > 0.001$).

4.1.4.9 Zusammenhang zwischen der aktiven hTERT Splice-Variante und der Telomerlänge

Um die Ergebnisse der fehlenden signifikanten Korrelation der hTERT Expression mit altersadaptierten Telomerlängen der AML Patienten zu bestätigen, wurde die aktive hTERT Splice-Variante ($+\alpha+\beta$) in demselben Zusammenhang untersucht.

Dabei fand sich auch hier kein signifikanter Unterschied der Telomerlänge zwischen Patienten ohne ($n = 69$; mittlere TFU \pm S.D.; -2.4 ± 0.2) und mit ($n = 18$; -2.3 ± 0.5) funktioneller hTERT ($+\alpha+\beta$) (Abbildung 42).

Auch hier wurde die Gruppe der aktiven Splicing-Varianten ($+\alpha+\beta$) unterteilt und in der Gruppe mit dominant negativer $-\alpha$ Splicing-Variante (mittlere TFU \pm S.D.; -2.8 ± 0.5 TFU) eine Tendenz zu kürzeren altersadaptierte Telomeren als in der Gruppe ohne $-\alpha$ (-2.0 ± 2.6 TFU) gefunden.

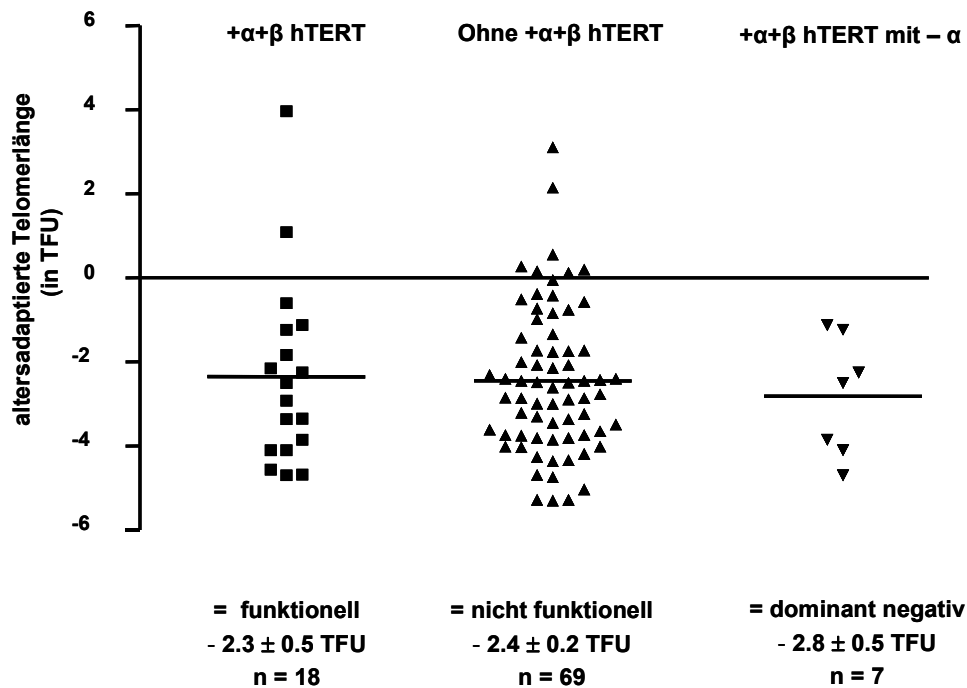


Abbildung 42 Vergleich der altersadaptierten Telomerlänge zwischen Proben mit / ohne aktiver hTERT Splicing-Variante (+α+β), sowie in Kombination mit der dominant negativen Splicing-Variante -α.

4.1.4.10 Korrelation funktionell aktiver Splice-Varianten mit dem Karyotyp der Patienten

AML Patienten mit aberrantem Karyotyp zeigten zunehmende Expression der hTERT mRNA. Um zu untersuchen, ob das alternative Spleißen der hTERT mRNA dabei eine Rolle spielt, wurde die Verteilung der unterschiedlichen hTERT Varianten auf die verschiedenen Karyotypen (Tabelle 4.5) geprüft.

Tabelle 4.5 Verteilung der unterschiedlichen Splicing-Varianten in Abhängigkeit vom Karyotyp des Patienten

| | Normal | Nicht-Komplex | Komplex |
|---|--------|---------------|---------|
| Gesamtanzahl der Proben (n = 87) | 49 | 27 | 11 |
| Gesamtanzahl der Splicing-Varianten (n = 37) | 16 | 14 | 7 |
| Verteilung der Splicing Varianten | | | |
| + α + β | 5 | 10 | 3 |
| - α | 8 | 4 | 2 |
| + α + β inklusive - α | 3 | 2 | 2 |
| + α + β ohne - α | 2 | 8 | 1 |
| - β | 9 | 11 | 4 |
| - α - β | 9 | 11 | 5 |

Wie schon bei der hTERT Expression fand sich der aberrante Karyotyp vorwiegend bei Patienten mit funktioneller hTERT Splicing-Variante (+ α + β) (72% der Patienten) im Vergleich zu 36% aberranten Karyotypen bei Patienten ohne + α + β hTERT ($p = 0.008$). Trennte man die Gruppe der Patienten mit + α + β Splicing-Variante anhand der Kombination mit / ohne - α Form, so fand sich ein signifikanter Unterschied zum normalen Karyotyp nur ohne die - α Form (82% mit aberrantem Karyotyp; $p = 0.007$). War die + α + β Form mit - α kombiniert, so zeigten nur noch 57% der Patienten einen aberranten Karyotyp.

4.2 Einfluss des Telomerase-Inhibitors BIBR1532 auf die Telomerlängendynamik in vitro

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Telomerase-Inhibitors BIBR1532 (Böhringer Ingelheim) auf die Telomerdynamik verschiedener CML Zell-Linien (K562, BV-173), einer AML Zell-Linie (HL-60) und der murinen BCR-ABL-positiven BaF3p185 als Negativ-Kontrolle getestet.

Von Interesse war in diesem Teil der Arbeit vor allem die Telomerlänge als auch Änderungen der Morphologie, des Proliferationsverhaltens der Zellen, sowie das Ansprechen auf Imatinib unter Behandlung mit BIBR1532.

4.2.1 Untersuchung der Zytotoxizität von BIBR1532 auf die verwendeten Zellen

Der Telomerase-Inhibitor BIBR1532 sollte nach Angaben von Böhringer Ingelheim mit einer Konzentration von 10 μM getestet werden. Um einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen zu vermeiden, wurde die IC_{50} von BIBR1532 mit Hilfe des MTT-Assays getestet. Als Kontrolle verwendeten wir Imatinib, von welchem die IC_{50} Werte für die verwendeten Zell-Linien schon bekannt waren. Die Messung wurde mit Dreifachwerten durchgeführt (Abbildung 43).

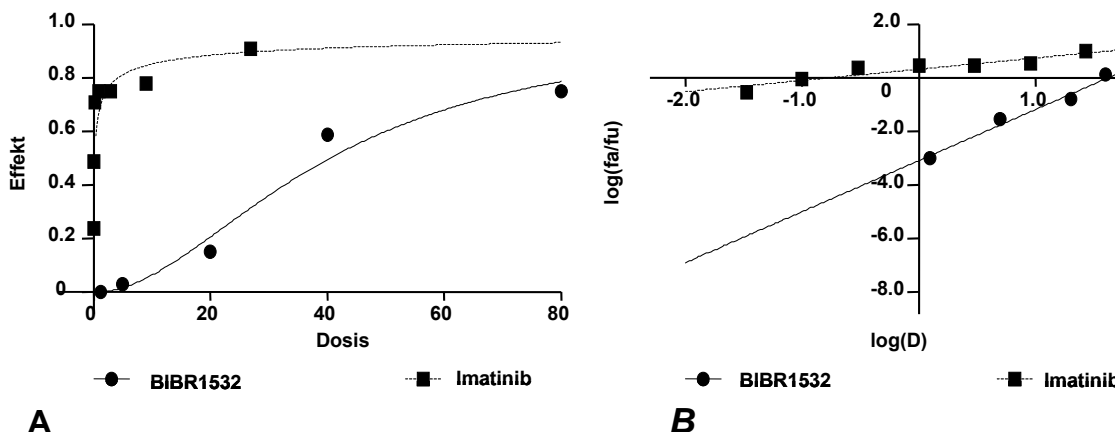


Abbildung 43 (A) Repräsentatives Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve von BIBR1532 und Imatinib auf K562. (B) Kalkulation der IC_{50} mit der „Median-Effekt-Gleichung“ über den Schnittpunkt der Regressionsgerade mit der x-Achse. (D = Dosis; F_a = fraction affected; F_u = fraction uneffected)

Tabelle 4.6 IC₅₀ des Telomerase-Inhibitors BIBR1532 und von Imatinib

| | IC ₅₀ BIBR1532 | IC ₅₀ Imatinib |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| K562 | 40.22 µM | 0.15 µM |
| BV-173 | 54.06 µM | 0.41 µM |
| HL-60 | 106.90 µM | 16.33 µM |
| BaF3p185 | 20.39 µM | 0.50 µM |

Wie in Tabelle 4.6 dargestellt, lagen die IC₅₀ des Telomerase-Inhibitors BIBR1532 über der in Zellkultur verwendeten Konzentration 10 µM. Die verwendete Konzentration hatte demnach weder direkte, signifikante zytotoxische Effekte auf die verwendeten Zellen, noch wurde die Proliferation der Zellen durch die Behandlung direkt beeinflusst.

Die im Vergleich zur Kontrolle gemessenen IC₅₀ von Imatinib entsprachen den Werten aus Vorversuchen.

4.2.2 Untersuchungen des Proliferationsverhaltens der Zell-Linien unter Behandlung mit BIBR1532 *in vitro*

Wie schon von Hayflick gezeigt, können sich Zellen in Kultur ohne Telomerase nur eine begrenzte Zeit teilen, bis sie in die Seneszenz übergehen. Die Lebensspanne der Zellen ohne Telomerase ist durch die Anzahl der durchlaufenen Teilungen und nicht durch die Expansionszeit bestimmt.

Die Proliferationsfähigkeit der Zellen mit und ohne Behandlung wurde bei jedem Umsetzen der Zellen in neues Medium nach Trypanblau-Färbung und Auszählen der Zellen mit Neubauer Zählkammer bestimmt. Dabei unterschied sich die Wachstumskinetik der inhibitor-behandelten Zellen im untersuchten Zeitraum noch nicht von den unbehandelten Zellen (Abbildung 44 A - C).

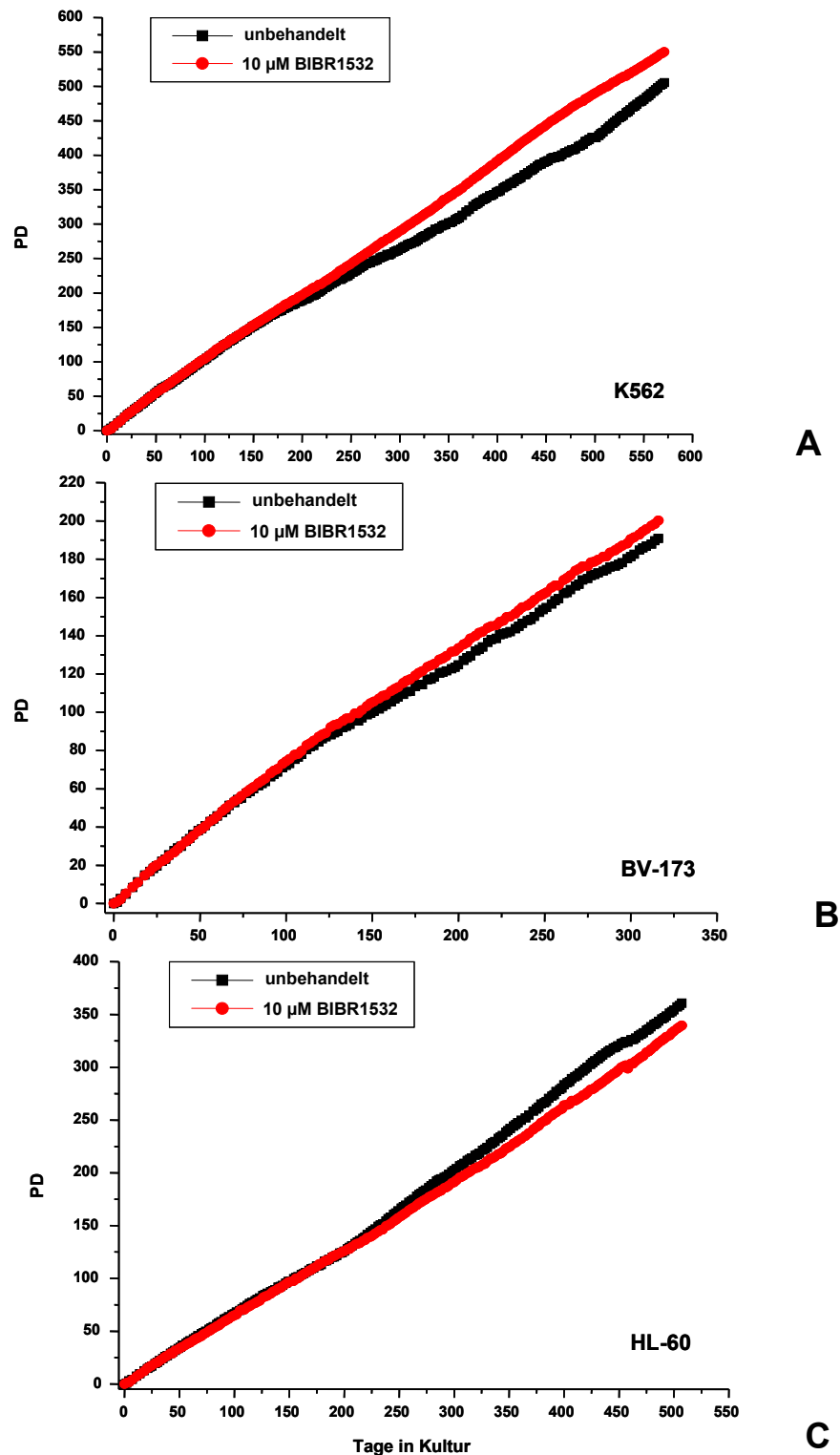
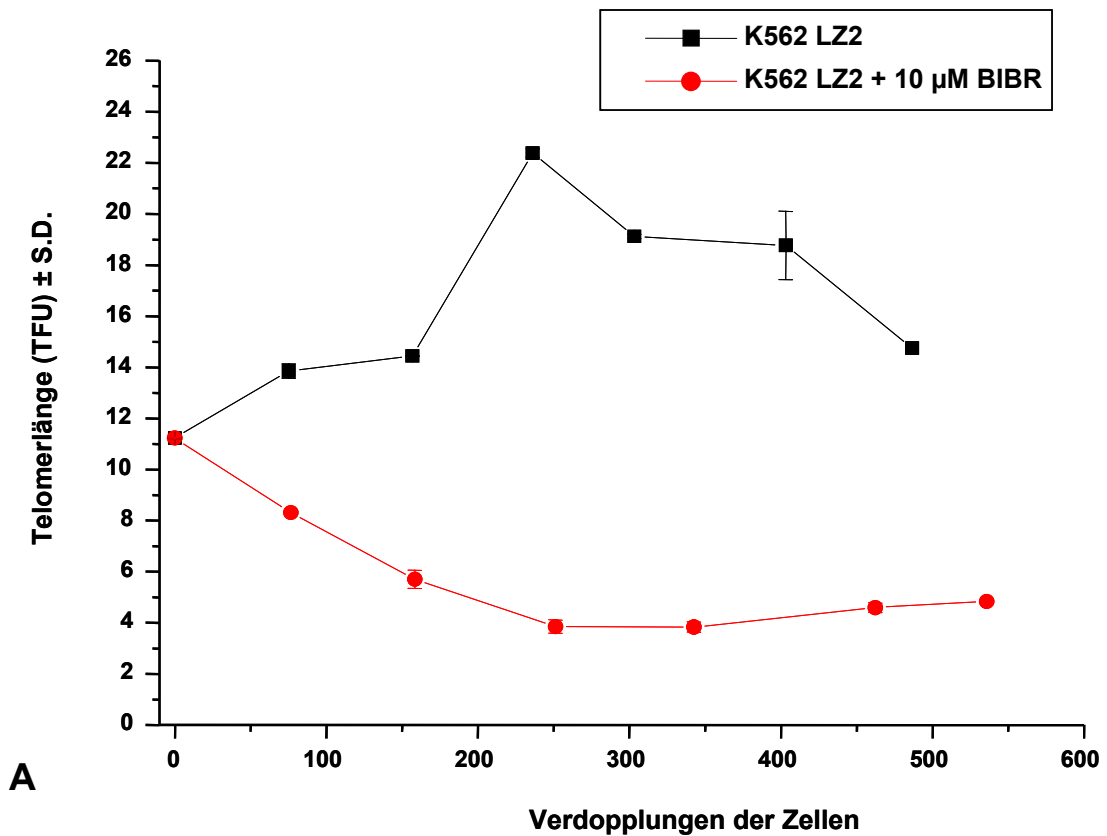


Abbildung 44 Wachstumskinetik der Zellen unbehandelt im Vergleich zur Behandlung mit BIBR1532. **A** stellt ein repräsentativ die Wachstumskinetik von K562, **B** von BV-173 und **C** von HL-60 dar. Aufgetragen sind jeweils die Verdopplungen der Zellen gegen die Zeit in Kultur (Tage).

4.2.3 Telomerlänge nach Behandlung mit BIBR1532 *in vitro*

Um den Einfluss des Telomeraseinhibitors BIBR1532 auf die Telomerlänge der verwendeten Zellen nachweisen zu können, wurden sequentielle Telomerlängen-Messungen der behandelten und unbehandelten Zellen mittels Flow-FISH durchgeführt. 2 Langzeitversuche mit der BCR-ABL-positiven Zellen K562 und BV-173 (LZ2 und 3) und einer mit HL-60 (LZ2) wurden mit und ohne Zusatz von 10 μ M BIBR1532 durchgeführt und ausgewertet.

Wie in Abbildung 45 A und B dargestellt, nahm die Telomerlänge (TFU \pm S.D.) der BIBR1532 behandelten K562 in beiden Versuchen kontinuierlich ab.



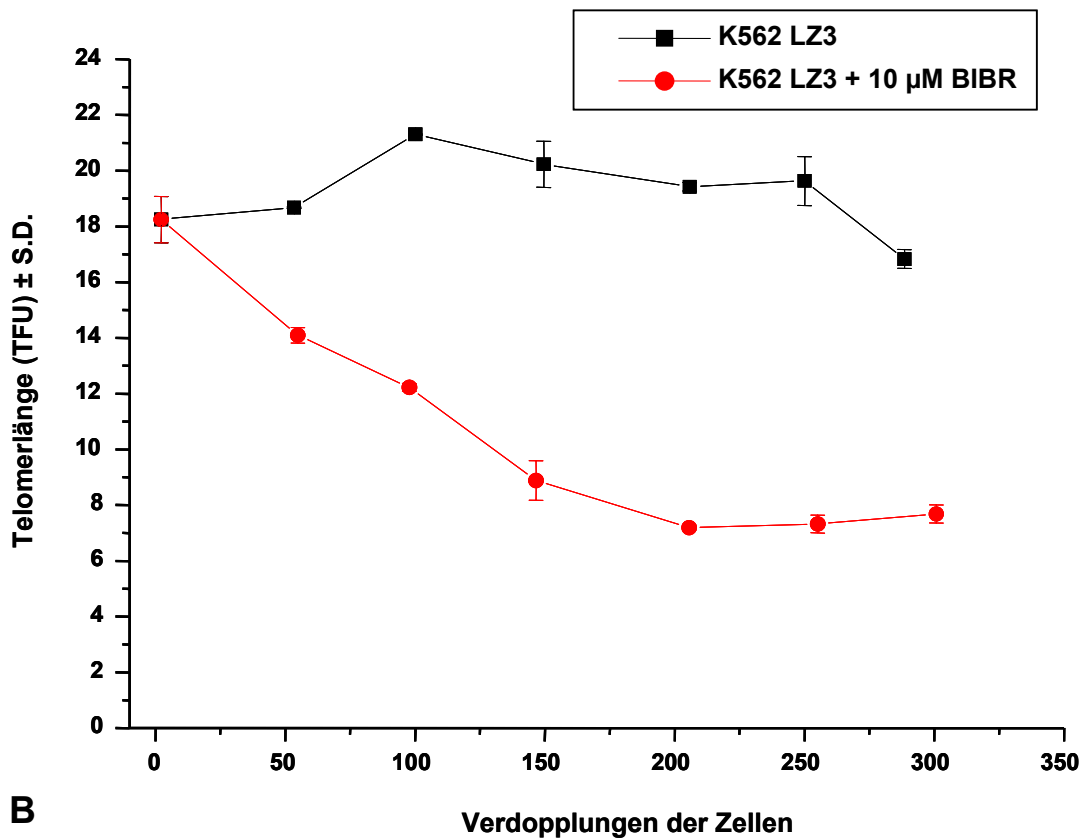


Abbildung 45 Verlauf der Telomerlänge (TFU \pm S.D.) der BIBR1532 behandelten und unbehandelten BCR-ABL-positiven K562 in 2 unabhängigen Langzeitversuchen (A LZ2 und B LZ3).

Die Telomerlänge der unbehandelten Zellen fluktuierte stark und nahm im LZ2 durchschnittlich um 11 Basenpaare pro Verdopplung der Zellen (bp / PD) zu, während sie im LZ3 um 3 bp / PD abnahm. Im Gegensatz dazu zeigte die Telomerlänge der BIBR1532-behandelten Zellen des LZ2 im Beobachtungszeitraum von insgesamt 536 PD eine Abnahme von 11 bp / PD ($p = 0.04$; $R = -0.77$) und im LZ3 über 301 PD eine Reduktion von 36 bp / PD ($p = 0.004$; $R = -0.92$) (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7 Verlust an Basenpaaren / Verdopplung unter Behandlung mit BIBR1532

LZ = Langzeitversuch

R = Regressionskoeffizient

bp / PD = Abnahme oder Zunahme an Basenpaaren pro Verdopplung (PD) der Zellen

* Signifikante Korrelation bei einem p-Wert < 0.05

| | BIBR 1532 | LZ | PD | bp / PD | R | p-Wert |
|---------------|--------------|----|-----|---------|--------|---------|
| K562 | - | 2 | 489 | + 11 | 0.48 | 0.27 |
| | 10 µM | | 536 | - 11 | - 0.77 | 0.04* |
| K562 | - | 3 | 289 | - 3 | - 0.21 | 0.66 |
| | 10 µM | | 301 | - 36 | - 0.92 | 0.004* |
| BV-173 | - | 2 | 191 | - 11 | - 0.79 | 0.03* |
| | 10 µM | | 200 | - 53 | - 0.96 | 0.0006* |
| BV-173 | - | 3 | 137 | - 31 | - 0.91 | 0.005* |
| | 10 µM | | 161 | - 55 | - 0.92 | 0.003* |
| HL-60 | - | 2 | 361 | + 6 | 0.90 | 0.006* |
| | 10 µM | | 340 | - 3 | - 0.71 | 0.07 |

Betrachtet man den Telomerlängen-Verlauf behandelter K562-Zellen, so zeigte sich nach ca. 200 Verdopplungen eine weitgehende Stabilisierung der Telomerlänge bei 4.61 ± 0.86 TFU (LZ2) und bei 7.29 ± 0.30 TFU im LZ3.

Zur detaillierteren Analyse wurden die Verläufe der Telomerlängen bei ca. 200 PD geteilt und die Veränderung der Telomere vor und nach Erreichen der 200 Verdopplungen verglichen. Dabei zeigte sich im LZ2 bis PD 200 eine Abnahme der Telomerlänge von 29 bp / PD ($p = 0.01$, $R = -0.99$), während die Telomerlänge nach PD 200 mit + 4 bp / PD relativ konstant blieb. In LZ3 fand sich eine Abnahme der Telomerlänge vor PD 200 um 63 bp / PD ($p = 0.005$; $R = -0.99$) und danach eine weniger ausgeprägte Abnahme um 7 bp / PD.

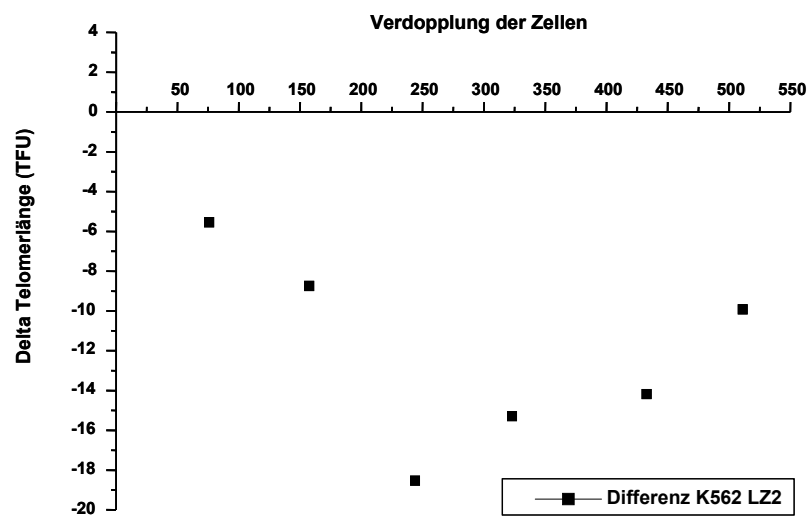
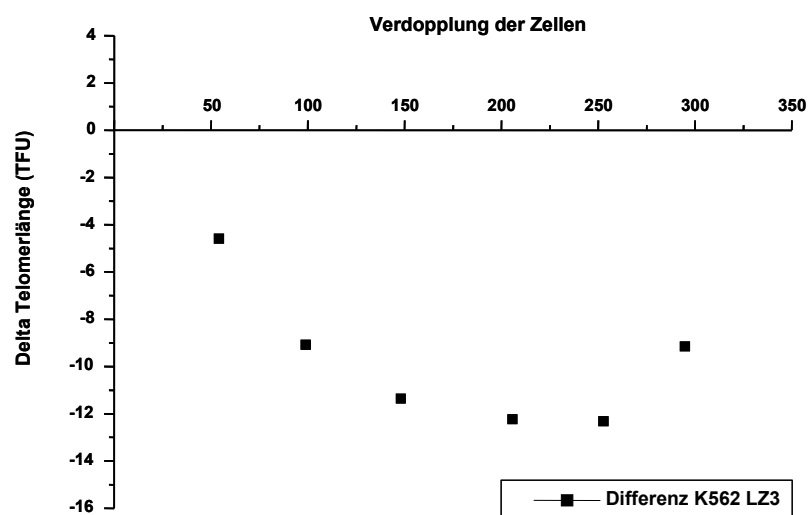
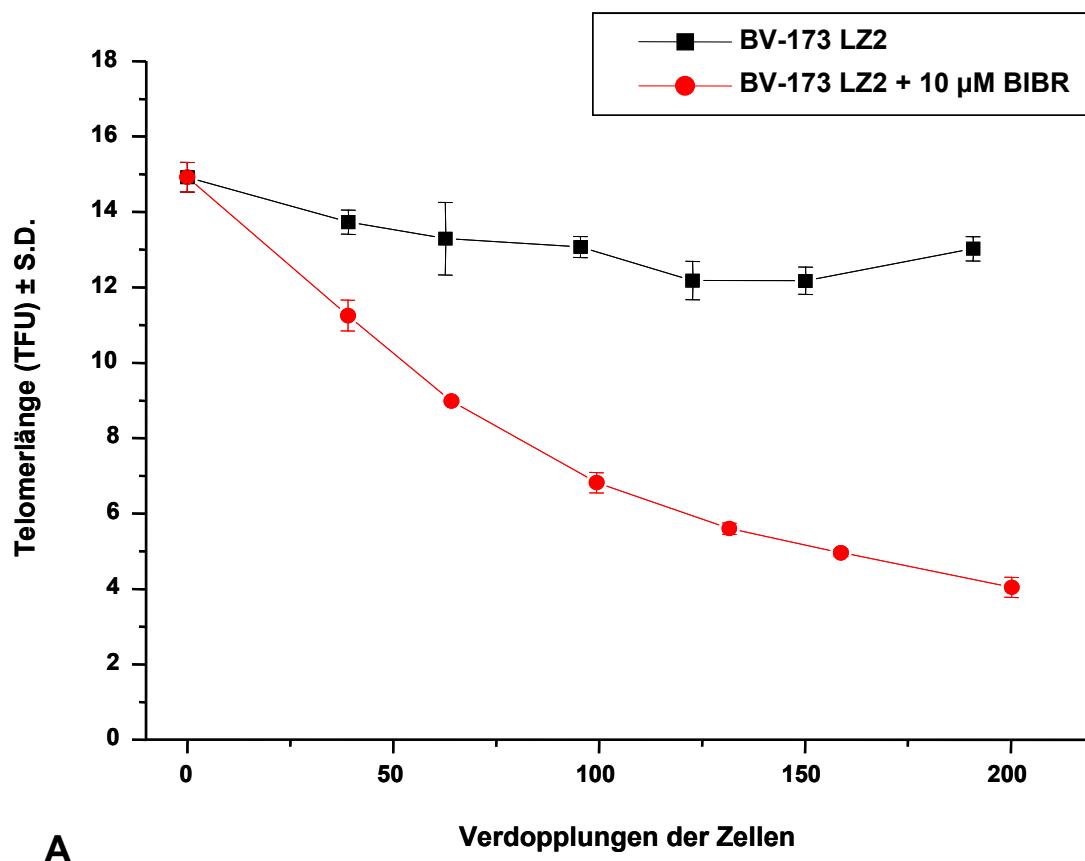
**A****B**

Abbildung 46 Differenz der Telomerlänge (TFU) unbehandelter und BIBR1532 behandelter K562 in 2 unabhängigen Langzeitversuchen (**A** LZ2 und **B** LZ3), aufgetragen gegenüber der Verdopplung der Zellen.

Abbildung 46 A und B zeigen die Differenz der Telomerlänge zwischen unbehandelten und BIBR1532-behandelten K562 Zellen. Diese Differenz der beiden Langzeitversuche wurde bis zur PD 200 kontinuierlich größer und nahm ab der 200. Verdopplung wieder ab, was die vorhin dargestellten Ergebnisse noch einmal verdeutlicht.

Neben K562 wurde als weitere BCR-ABL-positive Zell-Linie BV-173 untersucht. Auch hier zeigte sich in beiden Versuchen eine kontinuierliche Abnahme der Telomerlänge unter Behandlung mit BIBR1532 (dargestellt in Abbildung 47 A und B).



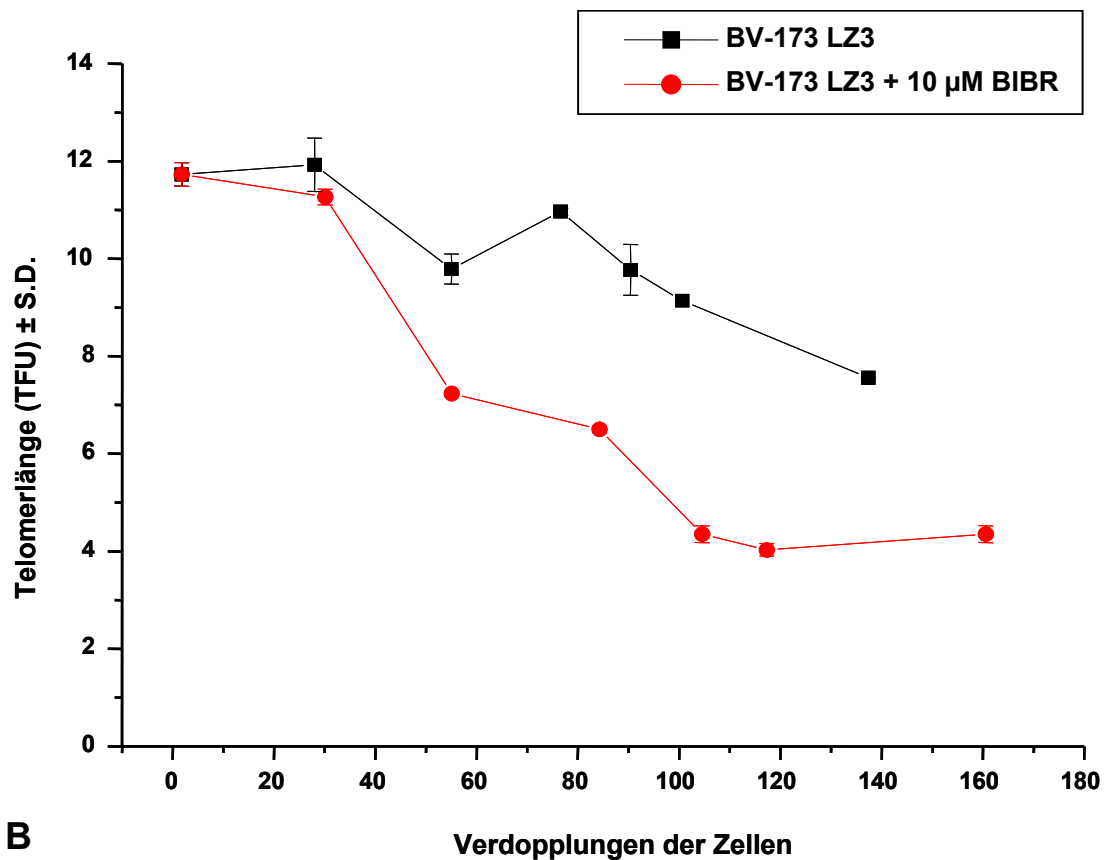


Abbildung 47 Verlauf der Telomerlänge (TFU \pm S.D.) der BIBR1532 behandelten, sowie unbehandelten BCR-ABL-positiven BV-173 in 2 unabhängigen Langzeitversuchen (A LZ2 und B LZ3).

Im Gegensatz zu K562 zeigten hier schon unbehandelte BV-173 Zellen eine Abnahme der Telomerlänge. In LZ2 betrug diese Reduktion der Telomere 11 bp / PD ($p = 0.03$; $R = -0.79$) und in LZ3 31 bp / PD ($p = 0.005$; $R = -0.91$).

Die Reduktion der Telomerlänge unter Behandlung mit BIBR1532 war dagegen mit einer Abnahme um 53 bp / PD in LZ2 ($p = 0.0006$; $R = -0.96$) und um 55 bp / PD ($p = 0.003$; $R = -0.92$) in LZ3 (Tabelle 4.7) ausgeprägter.

Abbildung 48 und 49 zeigen wieder die Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Während in LZ2 die Differenz stetig zunahm (Abbildung 48), reduzierte sich die Differenz in LZ3 nach ca. 100 Verdopplungen wieder (Abbildung 49 A). Die deutliche Zunahme der Telomer-Differenz über diese ersten 100 Verdopplungen verdeutlicht noch einmal Abbildung 48 B.

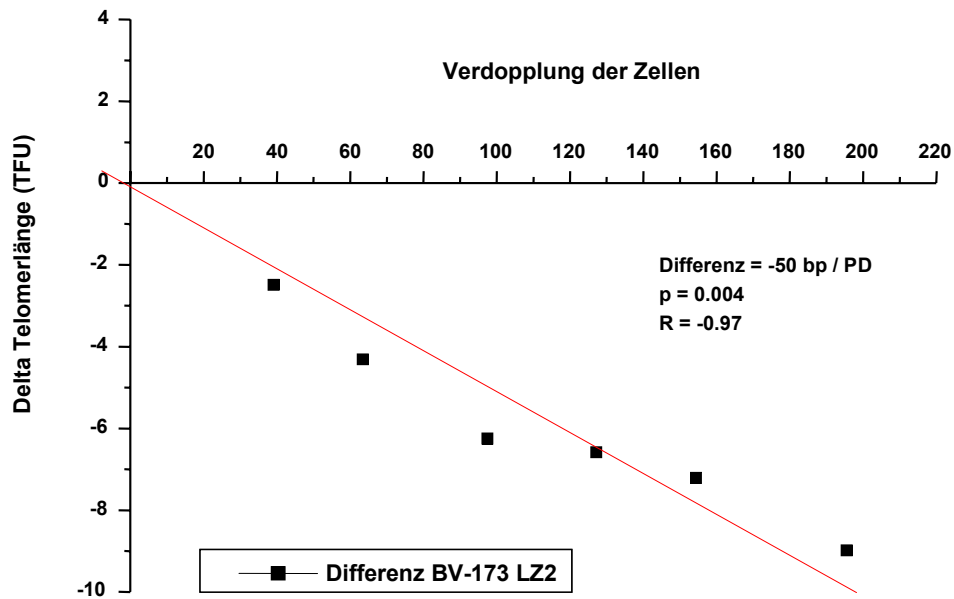


Abbildung 48 Differenz der Telomerlänge (TFU) unbehandelter und BIBR1532 behandelter BV-173 des Langzeitversuchs LZ2, aufgetragen gegenüber der Verdopplung der Zellen.

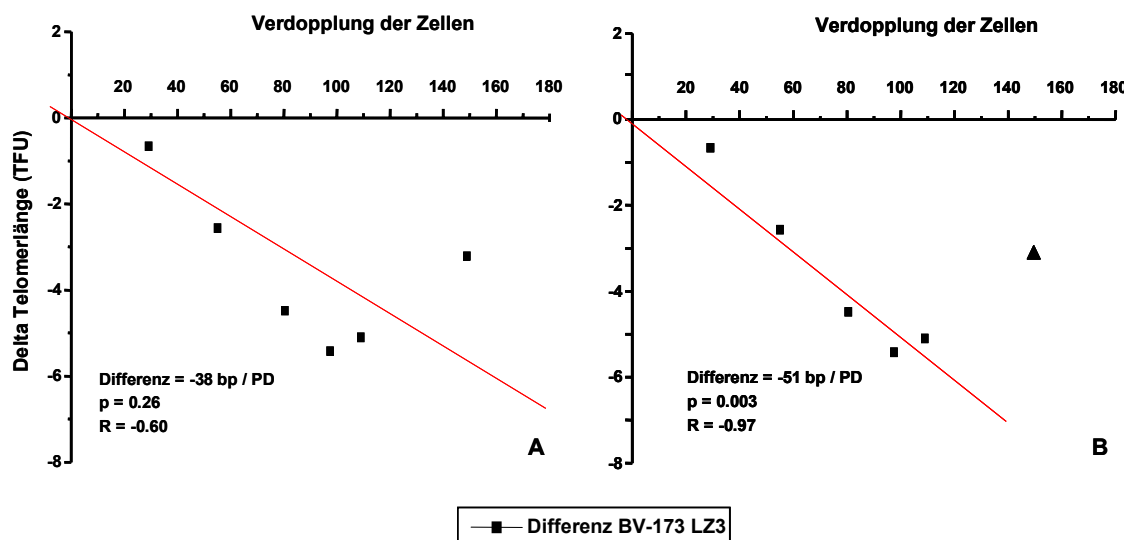


Abbildung 49 Differenz der Telomerlänge in (TFU) unbehandelter und BIBR1532 –behandelter BV-173 des LZ3. **A** Regression durch alle Messpunkte. **B** Regression ohne den letzten Messpunkt (Dreieck); Telomer-Stabilisierung durch weitere Mechanismen (ALT?) möglich?

Vergleicht man die Telomerlänge der BCR-ABL-negativen HL-60, mit ihren sehr kurzen Ausgangstelomeren, mit den BCR-ABL-positiven Zell-Linien, so zeigte sich auch hier eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion der Telomere BIBR1532-behandelter Zellen um 3 bp / PD ($p = 0.07$; $R = -0.71$). Im Gegensatz dazu nahm die Telomerlänge unbehandelter Zellen kontinuierlich um 6 bp / PD ($p = 0.006$; $R = 0.90$) zu (Abbildung 50, Tabelle 4.7).

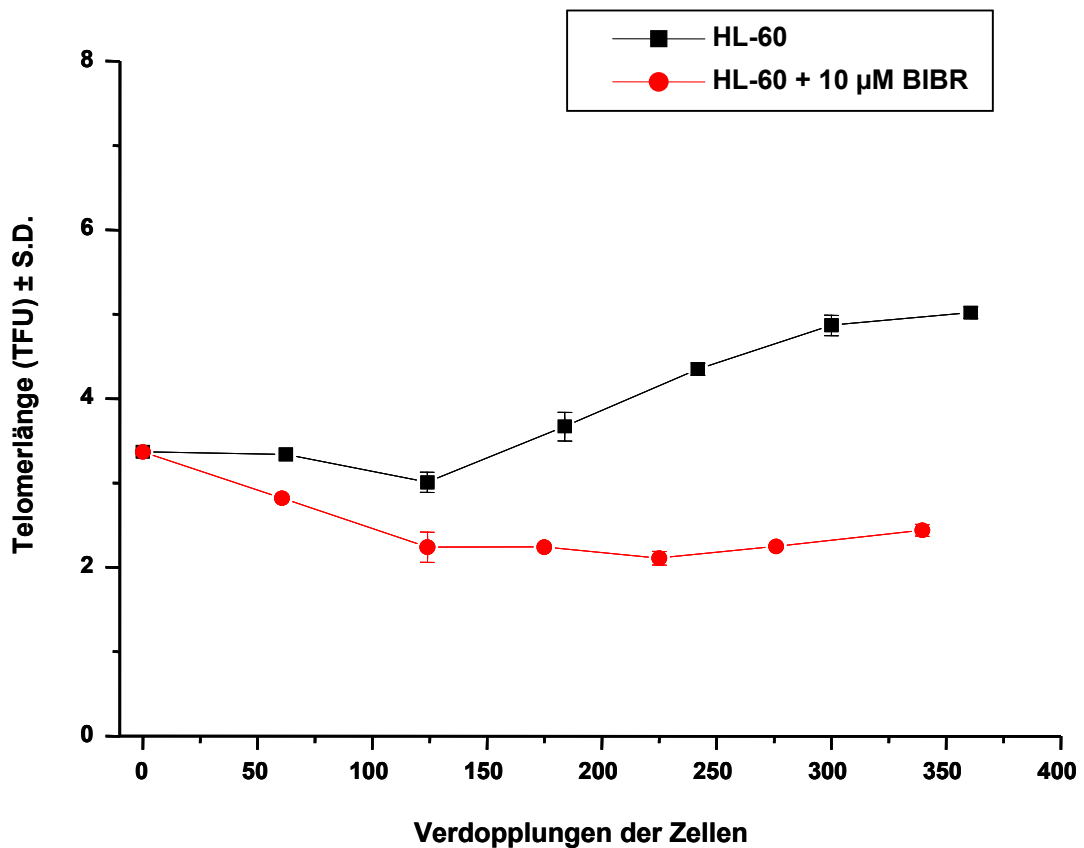


Abbildung 50 Verlauf der Telomerlänge (TFU ± S.D.) der BIBR1532 behandelten und unbehandelten BCR-ABL-negativen HL-60 (LZ2).

Aufgrund der Telomerlängen-Zunahme der unbehandelten HL-60 Zellen wird auch die Telomer-Differenz in Abbildung 51 kontinuierlich größer.

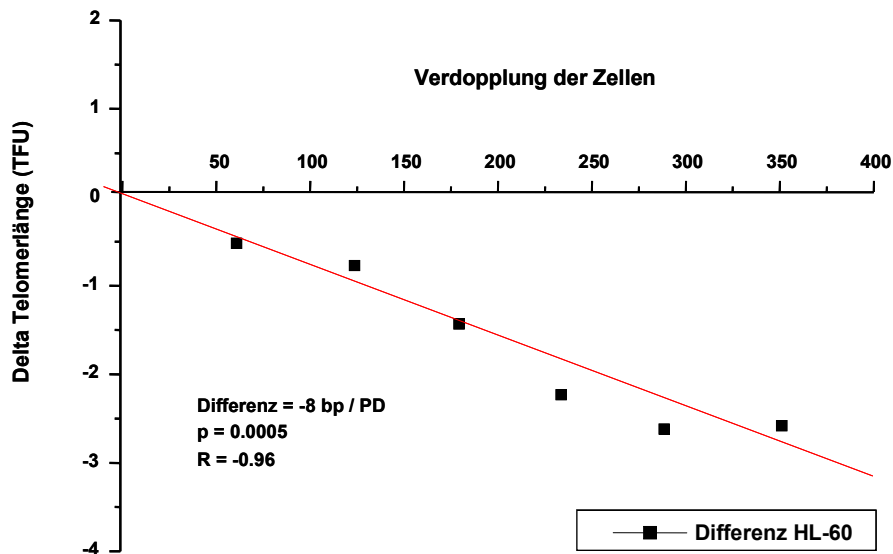


Abbildung 51 Differenz der Telomerlänge (TFU) unbehandelter und BIBR1532 behandelter HL-60 (LZ2), aufgetragen gegenüber der Verdopplung der Zellen.

Als weitere Negativ-Kontrolle diente die BCR-ABL-positive murine Zell-Linie BaF3p185. Da BIBR1532 sehr selektiv humane Telomerase hemmt, würde eine signifikante Telomerverkürzung muriner Zellen auf unspezifische Telomere-Erosionen unabhängig der Telomerase-Hemmung hinweisen.

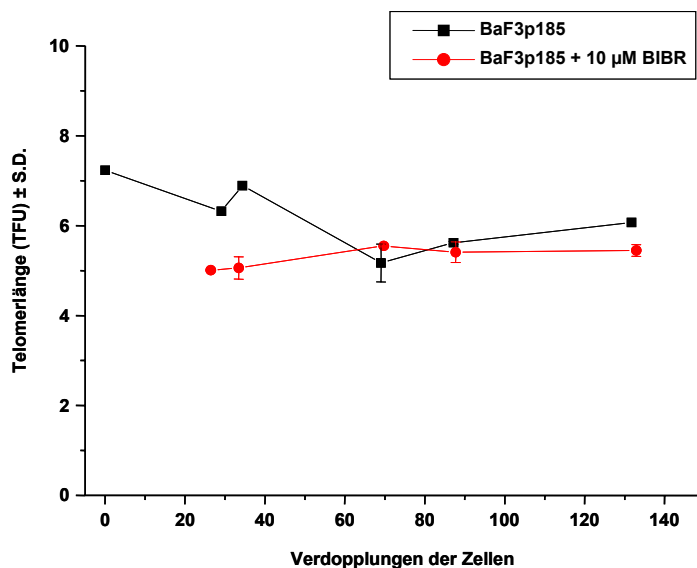


Abbildung 52 Telomerlänge (TFU) unbehandelter und BIBR1532 behandelter muriner BaF3p185, aufgetragen gegenüber der Verdopplung der Zellen.

Wie in Abbildung 52 gezeigt, ändern sich weder die Telomere der behandelten (+4 bp / PD, $p = 0.13$; $R = 0.77$), noch der unbehandelten Zellen (-12 bp / PD, $p = 0.17$; $R = -0.65$) signifikant.

4.2.4 Telomeraseaktivität unter Langzeit-Behandlung mit BIBR1532

Um den Einfluss einer eventuell veränderten Telomeraseaktivität (z.B. eine Hochregulierung der Telomeraseaktivität), verursacht durch die lange Behandlung mit BIBR1532, auf die Telomerlänge der Zellen ausschließen zu können, wurde die relative Telomeraseaktivität (RTA) der einzelnen Ansätze mittels eines PCR-basierten TRAP-Assays untersucht. Während der Durchführung des Tests wurde den Zellen kein BIBR1532 zugesetzt. Da die Wirkung des Telomeraseinhibitors nach Absetzen reversibel ist, konnte so unbehandelte und behandelte Zellen direkt verglichen werden. Als Negativkontrolle diente die RTA mononukleärer Zellen (MNC) aus ficollisierten humanen peripheren Blutzellen. Wie in Abbildung 53 dargestellt, war die relative Telomeraseaktivität (RTA) der einzelnen Ansätze im Vergleich zur Negativkontrolle sehr hoch. Die Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zeigte keine Signifikanz.

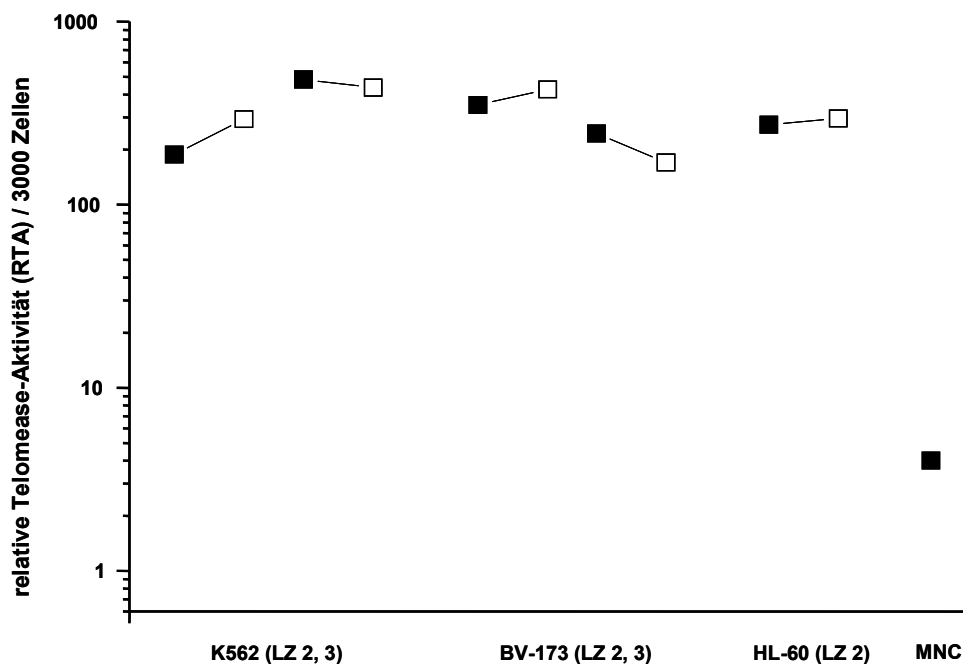


Abbildung 53 Darstellung der relativen Telomeraseaktivität (RTA) ohne (ausgefüllte Kästchen) und mit BIBR1532 Behandlung (leere Kästchen). Dargestellt sind als Negativkontrolle MNC (mononukleäre Zellen). Untersucht wurden bei K562 und BV-173 Zellen zweier unabhängiger Versuche (Langzeitversuch 2 und 3), bei HL-60 der Langzeitversuch 2.

4.2.5 Vergleich der Kerne behandelter und unbehandelter Zellen

Eine Verkürzung der Telomere unter einen gewissen Schwellenwert (vermutlich ca. 3-5 kb) ist verbunden mit zunehmender genetischer Instabilität bzw. zellulärer Seneszenz (de Lange, 1995). Narita et al. (2003) beschrieben die zunehmende Bildung sogenannter DNA-Foci, welche vor allem bei seneszenten Zellen auftraten. In Anlehnung an diese Arbeiten wurde die Morphologie der Kerne nach Färbung mit DAPI am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Diese Analysen wurde parallel zur Telomerlängen-Messung sowohl mit den unbehandelten, als auch mit den BIBR-behandelten Zellen des Langzeitversuchs 2 und 3 durchgeführt. Verwendet wurden hierfür die Ausgangszellen, sowie behandelte und unbehandelte Zellen an drei fortlaufenden Zeitpunkten. Bei der mikroskopischen Untersuchung der DAPI-gefärbten Präparate fand sich kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Dargestellt sind in Abbildung 54 – 56 die Zellkerne des Endpunkts der Telomer-Messung.

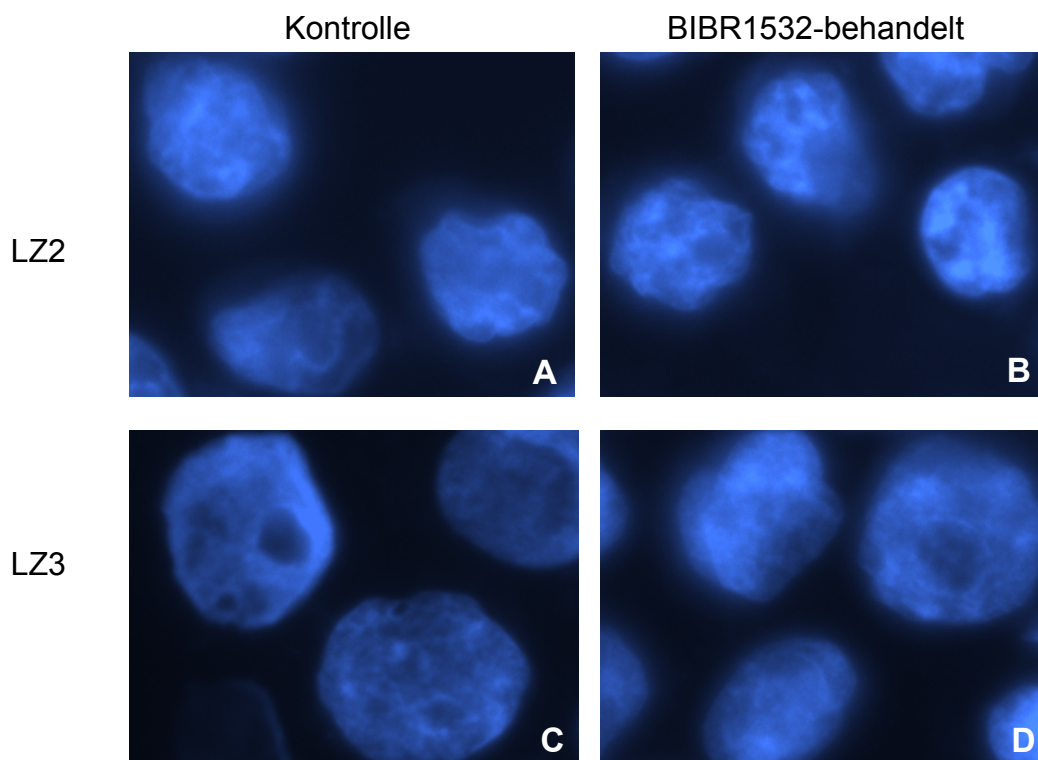


Abbildung 54 Dargestellt sind die Kerne der K562 LZ2 (**A** unbehandelt, PD 489; **B** behandelt mit BIBR1532, PD 536) und K562 LZ3 (**C** unbehandelt, PD 289; **D** behandelt, PD 301).

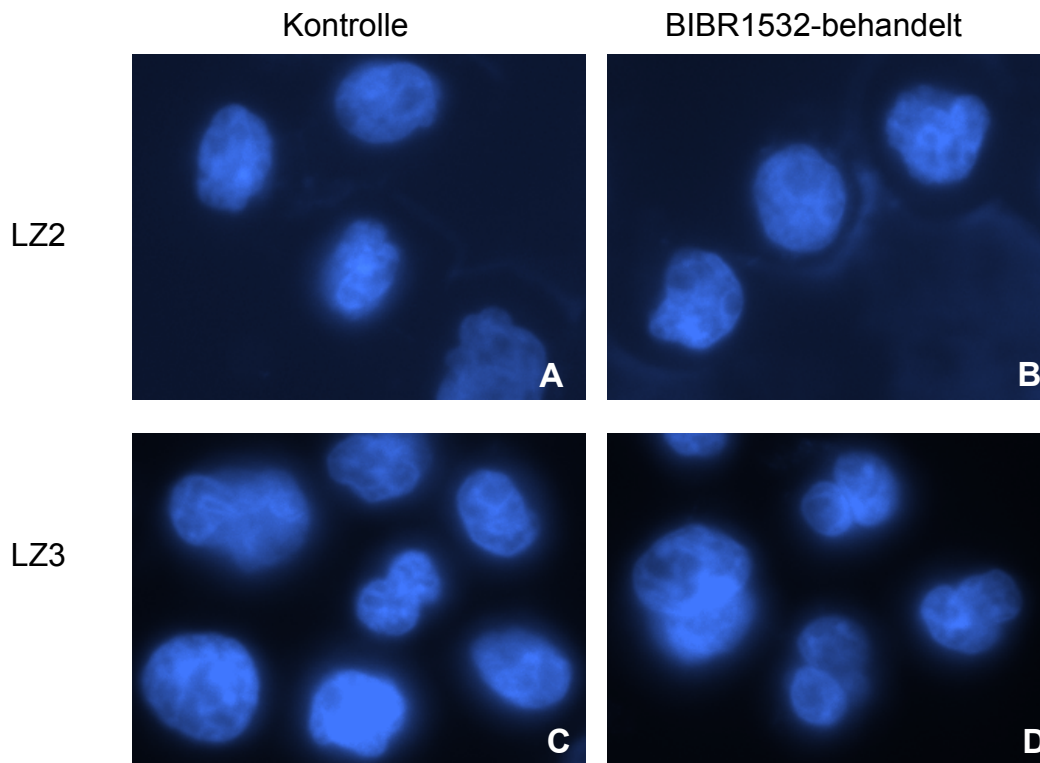


Abbildung 55 BV-173 Kerne des LZ2 (**A** unbehandelt, PD 191; **B** behandelt mit BIBR1532, PD 200) und LZ3 (**C** unbehandelt, PD 137; **D** behandelt, PD 161).

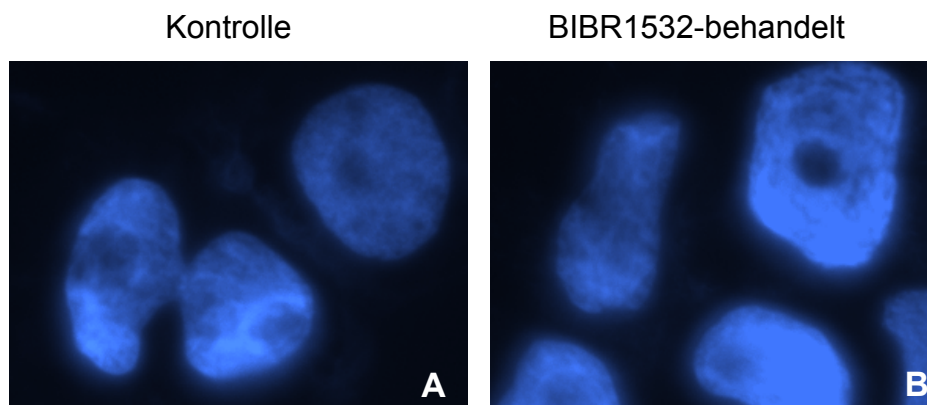


Abbildung 56 Kerne der AML-Zell-Linie HL-60 LZ2 (**A** unbehandelt, PD 361; **B** behandelt mit BIBR1532, PD 340).

4.2.6 Effekt von Imatinib auf BIBR1532 behandelte Zellen

Als weiterer Aspekt wurde der therapeutische Effekt von Imatinib auf die Zellen unter Behandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR1532 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen untersucht.

Die Sensitivität der Zellen auf Imatinib wurde mit Hilfe des MTT-Assays während des Langzeitversuchs in regelmäßigen Abständen bestimmt. Tabelle 4.7 zeigt den Mittelwert der IC₅₀ für Imatinib im Vergleich unbehandelter und BIBR1532 behandelter Zellen.

Tabelle 4.7 Mittlere IC₅₀ für Imatinib in BIBR1532 behandelten und unbehandelten Zellen

LZ = Langzeitversuch

S.E. = Standardfehler

* Signifikante Korrelation bei einem p-Wert < 0.05

| | BIBR 1532 | LZ | n | Mittelwert IC₅₀ Imatinib ± S.E. | p-Wert |
|---------------|----------------------|-----------|----------|---|---------------|
| K562 | - | 2 | 14 | 6.41 ± 1.05 | < 0.001* |
| | 10 µM | | | 0.35 ± 0.17 | |
| K562 | - | 3 | 11 | 0.78 ± 0.24 | 0.013* |
| | 10 µM | | | 0.25 ± 0.11 | |
| BV-173 | - | 2 | 14 | 0.34 ± 0.07 | 0.20 |
| | 10 µM | | | 0.42 ± 0.07 | |
| BV-173 | - | 3 | 10 | 0.36 ± 0.09 | 0.39 |
| | 10 µM | | | 0.43 ± 0.10 | |
| HL-60 | - | 2 | 14 | 18.43 ± 2.62 | 0.12 |
| | 10 µM | | | 15.90 ± 2.40 | |

K562 LZ2 zeigte deutlich die Zunahme der IC_{50} unbehandelter Zellen, während die IC_{50} und damit die Sensivität der BIBR1532 behandelten Zellen auf Imatinib sich nicht änderte ($p < 0.001$). Im Vergleich dazu war der Unterschied im LZ3 weniger deutlich aber ebenfalls signifikant ($p = 0.013$).

BV-173 dagegen zeigte in beiden Versuchen keinen Unterschied, ebenso die BCR-ABL-negative Kontrolle HL-60.

5. Diskussion

Die Ursprungszelle leukämischer Transformationen myeloischer Leukämien ist die pluripotente, hämatopoetische Stammzelle. Aufgrund der deutlich erhöhten Teilungsrate im malignen, hämatopoetischen Stammzell-Kompartiment können Auswirkungen auf die Telomerbiologie der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Die exzessive Verkürzung der Telomere kann dabei zu einer Zunahme genetischer Instabilität hämatopoetischer Zellen führen und in Folge dessen mit dem klinischen Verlauf oder auch dem Erkrankungsstadium myeloischer Leukämien in Verbindung gebracht werden.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen deshalb Untersuchungen der Telomerlänge, sowie der Telomeraseaktivität der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) und der Akuten Myeloischen Leukämie (AML). Darüber hinaus wurde der Einfluss pharmakologischer Telomerase-Inhibition auf die Telomerbiologie Myeloischer Leukämien untersucht.

5.1 *Telomerlängendynamik der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) unter Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib*

Von besonderem Interesse für die klinische Hämatologie ist die Frage nach dem Proliferationspotential, sowie dem natürlichen Turnover normaler hämatopoetischer Stammzellen (HSC) und ihren malignen Varianten. Die Anzahl der Zellteilungen, welche im Rahmen der Differenzierung von der primitiven Stammzelle zu einer differenzierten Blutzelle durchlaufen werden, sollte über das gesamte Leben konstant sein. Davon ausgehend spiegelt die Telomerlängenkinetik peripherer Blutzellen den zellulären Umsatz im Stammzellkompartiment des Knochenmarks wider.

In Untersuchungen an gesunden Spendern zeigten Rufer und Brümmendorf et al. (Rufer et al., 1999), dass die mit Flow-FISH (quantitative Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) gemessene Telomerlänge peripherer Granulozyten den zellulären Umsatz hämatopoetischer Stammzellen *in vivo* charakterisieren kann.

Daher stellte sich die Frage, inwieweit die Telomerlänge in hämatologischen Malignomen mit Stammzellbeteiligung infolge des deutlich gesteigerten

Stammzellturnover verändert und möglicherweise mit dem Krankheitsverlauf bzw. der Prognose des Patienten korreliert ist.

Die Chronisch Myeloische Leukämie (CML) stellt eine hämatologische Modellerkrankung zur Überprüfung dieser Theorie dar. Auf der Basis des sogenannten Philadelphia-Chromosoms (Ph⁺) kommt es zur Entstehung des BCR-ABL-Fusionsproteins, welches wiederum die erhöhte Zellteilungsaktivität der Ph⁺ HSC bedingt. Damit unterscheiden sich Ph⁺ hämatopoetischen Stammzellen hinsichtlich zellulärem Turnover und Differenzierungsneigung deutlich von den koexistierenden Ph⁻ Stammzellen (Udomsakdi-Auewarakul et al., 2000). Diese deutlich erhöhte Proliferationsneigung der Ph⁺ Stammzellen sollte zwangsläufig mit einer zunehmenden Verkürzung der Telomerlänge verbunden sein.

Das Enzym Telomerase, welches theoretisch in der Lage ist der replikationsabhängigen Verkürzung der Telomere entgegenzuwirken, wird in hämatopoetischen Stammzellen zwar exprimiert, ist aber aufgrund des niedrigen Expressionsniveaus funktionell nicht relevant (Vaziri et al., 1994). Die dadurch bedingte replikationsabhängige Telomerlängen-verkürzung in den Ph⁺ Zellen der CML-Patienten sollte daher mit der Dauer der Erkrankung (zumindest solange sich der Patient in der Chronischen Phase befindet) korreliert sein. Eine Verkürzung der Telomere unter einen gewissen Schwellenwert (vermutlich ca. 3-5 kb) ist verbunden mit zunehmender genetischer Instabilität bzw. zellulärer Seneszenz (de Lange, 1995).

Brümmendorf et al. (Brümmendorf et al., 2000) konnten zeigen, dass die Telomerlänge peripherer Blutzellen von CML-Patienten sowohl gegenüber den nicht betroffenen Zellen (z.B. Ph⁻ T-Zellen) desselben Individuums als auch gegenüber altersgleichen Gesunden signifikant verkürzt ist. Als Konsequenz der massiven Proliferation der malignen Stammzelle fand sich, trotz gesteigerter Telomerase-Aktivität (um das 2- bis 5-fache in der Chronischen Phase und um das 10- bis 50-fache in Akzeleration und Blastenkrise (Engelhardt et al., 2000)), eine massive Telomer-Verkürzung im Laufe der Progression der Erkrankung von der Chronischen Phase (CP) bis zu den fortgeschrittenen Stadien, wie die Akzelerierte Phase (AP) und die Blastenkrise (BC) (Boulwood et al., 1999; Brümmendorf et al., 2000; Engelhardt et al., 2000) (Modell der Telomerbiologie der CML siehe Abbildung 55). Das Ausmaß dieser Telomer-Verkürzung korrelierte dabei mit der Dauer der CP, sowie mit klinischen Prognosescores, wie z.B. dem Hasford Score (Drummond et al., 2004).

Es liegt also nahe, einen Zusammenhang zwischen dem erhöhten Turnover Ph⁺ Stammzellen, der signifikanten Telomer-Verkürzung in Ph⁺ peripheren Blutzellen sowie dem klinischen Verlauf der Erkrankung herzustellen. Während der Chronischen Phase der Erkrankung kommt es gemäß dieser Hypothese über die fortschreitende Telomer-Verkürzung zur zunehmenden genetischen Instabilität welche möglicherweise das Auftreten sekundärer chromosomaler Aberrationen begünstigen (Abbildung 57).

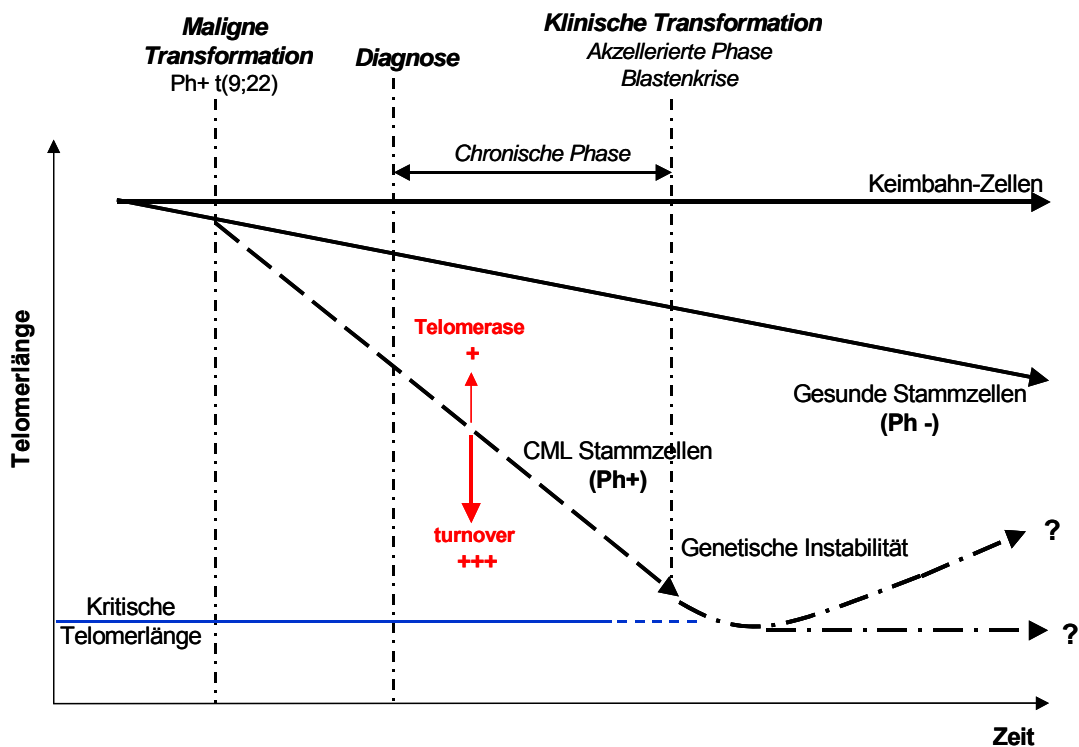


Abbildung 57 Rolle der Telomerbiologie im Krankheitsverlauf von CML-Patienten, aus Hartmann U. und Brümmendorf T.H.; *Arzneimitteltherapie* (2003) 6:176-185; modifiziert nach Brümmendorf et al. *Blood* 95:1883-1890 (2000))

Studien, welche den Einfluss der konventionellen CML-Therapie auf die Telomerlänge untersuchen sind selten und meist auf die Behandlung mit Interferon (IFN) und Hydroxyurea beschränkt (Brummendorf et al., 2000; Iwama et al., 1997).

Die Behandlung neu diagnostizierter CML-Patienten hat sich aber während der letzten Jahre durch die Entwicklung des neuen selektiven Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib (STI571, Glivec®) grundsätzlich geändert. Sowohl hämatologische, als auch zytogenetische Remissionsraten (von 14% auf > 80%) konnten durch Therapie mit Imatinib deutlich gesteigert werden.

Diese Remissionsdaten können durchaus in ein besseres Überleben übersetzt werden, obwohl eine Heilung der Erkrankung mit Hilfe einer Imatinib-Monotherapie aus mehreren Gründen nicht möglich zu sein scheint.

Ein möglicher Grund ist die nur selten erreichte komplette molekulare Remission, während Resistenzen unter Imatinib vor allem in den fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung zu einem immer größeren Problem werden. Außerdem scheinen ruhende Ph⁺ Stammzellen von der Therapie mit Imatinib verschont zu werden, worauf *in vitro* (Graham et al., 2002) und *in vivo* (Bhatia et al., 2003) Daten hinweisen.

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Fragestellung, inwieweit sich das Ansprechen auf die Imatinib-Therapie in einer Normalisierung (oder zumindest Zunahme) der durchschnittlichen Telomerlänge niederschlagen würde. Aufgrund dessen wurde die Telomerlänge von über 500 peripheren Blutproben, die von mehr als 200 Patienten aller Erkrankungsstadien gewonnen wurden vor und auch während der Therapie mit Imatinib untersucht.

Trotz ausgeprägter Heterogenität zeigten die Telomerlängen dieses Kollektivs eine Verschiebung in Richtung kürzerer Telomere. Sowohl in der chronischen Phase, als auch in den akuten Phase (AP/BC) waren die Telomere nicht normal, sondern log-normal verteilt. Diese Art der Verteilung könnte die oben erläuterte kontinuierliche Verkürzung der Telomere (aufgrund des gesteigerten zellulären Turnovers der Zellen) bis hin zur replikativen Seneszenz nach Erreichen der „kritische Telomerlänge“ widerspiegeln.

Es könnte außerdem spekuliert werden, dass die zunehmende genetische Instabilität individueller CML-Zellen durch fortschreitende Telomer-Verkürzungen, gemäß der oben genannten Hypothese, vereinzelt Zellen erlaubt das Hayflick-Limit und damit die replikative Seneszenz zu übergehen. Der daraus resultierende Wachstumsvorteil würde dabei noch vor Erreichen der Seneszenz zur klonalen Selektion führen, wobei die Zeitspanne bis zur klonalen Selektion von der Telomerlänge der Zellen zum Diagnosezeitpunkt abhängen würde.

Dieser zusätzliche Wachstumsvorteil der Zellen in Folge sekundär erworbener genetischer Abnormalitäten könnte dabei zum einen durch die Aktivierung von Onkogenen oder zum anderen durch Hemmung verschiedener Tumor-Suppressorgenen (oder durch beides) zustande kommen. Die so entstandene Unabhängigkeit der Ph⁺ Zellen vom Wachstumsstimulus des BCR-ABL könnte ein Grund für das Problem erworbener Resistenz und/oder der Progression der Krankheit sein.

Genetische Instabilität ist eine Voraussetzung für die Entwicklung karyotypischer Abnormalitäten, welche in späteren Stadien (Akzeleration und Blastenkrise) der CML vermehrt auftreten. In der Tat konnte die progressive Verkürzung der Telomere durch den gesteigerten zellulären Turnover der Ph⁺ (im Vergleich zu koexistierenden Ph⁻) Stammzellen von Brummendorf et al. (2000) mit dem Krankheitsverlauf der CML korreliert werden. Die Verkürzung der Telomere reflektiert damit einen potentiellen Mechanismus, durch welchen die genetische Instabilität gefördert werden könnte.

Auch in dieser aktuellen Studie war die Verkürzung der Telomere vom Stadium der Erkrankung abhängig. Mit fortschreitender Erkrankung hin zur Blastenkrise zeigte sich eine deutlich zunehmende Verkürzung der Telomere.

Im Gegensatz zu der vorhergehenden Studie fand sich allerdings nicht nur eine wesentlich weniger ausgeprägte Verkürzung der Telomere, sondern darüber hinaus eine signifikante Wiederzunahme der durchschnittlichen Telomerlänge unter Therapie mit Imatinib. Die Rate der Wiederzunahme betrug dabei +760 MESF (= molecular equivalents of soluble fluorochrome) pro Jahr. Zum Vergleich: die Abnahme der Telomerlänge gesunder Erwachsener beträgt in Granulozyten durchschnittlich -80 MESF/Jahr.

Für dieses Ergebnis gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnte eine stetige relative Zunahme Ph⁻ Zellen (mit normalen oder kaum verkürzten Telomeren) infolge der Unterdrückung der Ph⁺ Hämatopoese im peripheren Blut der CML-Patienten (in Reflektion des Therapieansprechens) Grund für die Zunahme der Telomerlänge sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese, diente die Analyse der Telomerlängen in Abhängigkeit vom Remissions-Status der Patienten, gemessen im Rahmen der Studie durch konventionelle Zytogenetik, Interphase-FISH oder quantitative RT-PCR. Unabhängig von der verwendeten Methodik fand sich eine gute Korrelation zwischen dem besten Ansprechen auf die Therapie und der ermittelten Reduktion der bestehenden Telomer-Verkürzung. Beim Erreichen einer kompletten (major) Remission, war keine signifikante Verkürzung der Telomere gegenüber altersgleichen gesunden Kontrollpersonen mehr messbar.

Diese Ergebnisse sprechen zum einen gegen eine bestehende Telomer-Verkürzung normaler hämatopoetischer Stammzellen von CML-Patienten zum Zeitpunkt der malignen Transformation. Unterstützt wird diese These außerdem durch die Resultate der vorhergehenden Studie (Brummendorf et al., 2000), welche zeigte, dass die Ph⁻ CD3⁺ Zellen im Gegensatz zu den Ph⁺ Zellen desselben CML-Patienten, signifikant längere Telomere aufwiesen. Diese gute Korrelation zwischen abnehmender Telomer-Verkürzung und erreichtem Grad

an zytogenetischer und molekularer Remission unter Imatinib bestärkt zudem die oben genannte Hypothese, welche die Telomer-Verlängerung als Reflektion einer Verschiebung von Ph⁺ Zellen hin zu Ph⁻ Zellen erklärt.

Eine alternative Erklärung könnte in einer zunehmenden katalytischen Aktivität des hTERT infolge imatinib-vermittelter Hemmung des BCR-ABL liegen. Analog zu c-ABL würde dabei die Hemmung des BCR-ABL die hTERT-Phosphorylierung aufheben und so über die steigende hTERT-Aktivität eine Verlängerung der Telomere bewirken. Die Folge wäre, dass die Zunahme der Telomerlänge in Ph⁺ Zellen auf einem Imatinib-vermittelten und damit indirekt Telomer-verlängernden Effekt beruhen würde.

Der folgende Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dieser alternativen Erklärungsmöglichkeit für die, in der *in vivo* Studie, gefundene Zunahme der Telomerlänge unter Therapie mit Imatinib.

5.2 Untersuchungen zum funktionellen Zusammenhang zwischen der BCR-ABL-Tyrosinkinaseaktivität und der Telomerase-Aktivität bzw. Telomerlänge *in vitro*

Neben der Telomerlänge scheint auch die Enzymaktivität der Telomerase im Krankheitsverlauf der CML eine wichtige Rolle zu spielen.

Vor einigen Jahren konnten Kharbanda et al. (2000) eine direkte Abhängigkeit der Telomerase von der Tyrosinkinase c-ABL nachweisen.

In gesunden Zellen wird die c-ABL Tyrosinkinase-Aktivität streng reguliert. Das c-ABL Protein bindet an den DNA-abhängigen Proteinkinasekomplex (DNA-PK) und an das ataxia teleangiectatika (ATM) Genprodukt. Die katalytische Untereinheit der DNA-PK und ATM sind Mitglieder der PI3-Kinase-ähnlichen Enzym-Familie, welche nicht nur an der Zellzyklusregulation, Rekombination und „DNA damage response“ sondern auch an der Telomerlängen-Homöostase beteiligt sind.

Kharbanda et al. zeigten sowohl die direkte Bindung der Tyrosinkinase c-ABL an die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase, hTERT, als auch die daraus resultierende Phosphorylierung von hTERT. Das bedeutet, dass c-ABL in der Lage ist die Telomerase-Aktivität signifikant zu hemmen. Interessanterweise führt die Expression von c-ABL in hTERT-positiven Zellen nicht nur zu einer Reduktion der Telomerase-Aktivität, sondern auch zu signifikant kürzeren Telomeren gegenüber c-ABL^{-/-} Zellen.

Vergleichbar mit diesen Ergebnissen kann auch ein BCR-ABL-abhängiger hemmender Effekt auf die Telomerase nicht ausgeschlossen werden.

Neben dem massiv gesteigerten zellulären Turnover maligner Ph+ hämatopoetischer Stammzellen könnte demnach durch BCR-ABL, analog zu c-ABL, die Telomerase-Aktivität vermindert und damit die Telomer-Verkürzung in den Proben der CML-Patienten erklärt werden. Das Aufheben dieses BCR-ABL-abhängigen hemmenden Effekts auf hTERT mittels Imatinib würde in Folge dessen zu einer Hochregulierung der Telomerase und so zur Verlängerung der Telomere führen. Analog könnte eine hypothetisch gesteigerte Telomerase-Aktivität unter Imatinib besonders genetisch instabilen CML-Subklonen mit sehr kurzen Telomeren einen selektiven Wachstumsvorteil verschaffen und damit ein potentiell Risiko für den weiteren Krankheitsverlauf darstellen.

In der Tat beschrieben Tauchi et al. (2002) in BCR-ABL-positiven Zellen *in vitro* nach Imatinib-abhängiger Hemmung von BCR-ABL eine Verlängerung der Telomere. Die Expression einer dominant-negativen hTERT-Mutante in BCR-ABL-positiven K562 Zellen führte hier neben der Hemmung der Telomerase-Aktivität und der daraus resultierenden Telomer-Verkürzung auch zu einer gesteigerten Sensivität gegenüber der Behandlung mit Imatinib.

Um diese hypothetische funktionelle Interaktion zwischen BCR-ABL und hTERT zu untersuchen, wurden Zellen des murinen Wildtyps BaF3 und die BCR-ABL-positive BaF3p185 (Daley and Baltimore, 1988) *in vitro* mit Imatinib behandelt. Während BaF3 die exogene Zufuhr des Wachstumsfaktors IL-3 für Überleben und Proliferation benötigt, wächst die BCR-ABL-positive BaF3p185 wachstumsfaktor-unabhängig. Durch Hemmung der Tyrosinkinase BCR-ABL mittels Imatinib (Buchdunger et al., 1996; Druker et al., 1996) wird allerdings auch das BCR-ABL-vermittelte Wachstumssignal aufgehoben, so dass BaF3p185 wieder IL-3 als Wachstumsfaktor benötigt.

Das BaF3-Modell ist zur Untersuchung BCR-ABL-abhängiger zellulärer Interaktionen gut etabliert (Carlesso et al., 1996; Gesbert and Griffin, 2000; van der Kuip et al., 2001) und bietet die Möglichkeit sehr selektiv den Effekt von BCR-ABL auf die Telomerase-Aktivität und als Konsequenz auf die replikationsabhängige Telomer-Verkürzung untersuchen zu können. Um die Phosphorylierung von „downstream“ Targets ermöglichen zu können, kam in diesem Modell ein BCR-ABL-Hybrid aus humanem BCR und murinem ABL zur Anwendung.

Sowohl der Wildtyp BaF3 als auch BaF3p185 wurden *in vitro* mit und ohne Imatinib über annähernd 90 Zellteilungen in drei unabhängigen Langzeitexpansionskulturen kultiviert. Untersuchungen der Morphologie oder auch des Wachstumsverhaltens der Zellen zeigten unter Behandlung mit Imatinib keine Unterschiede.

Ebenso fand sich weder ein Effekt auf die Telomerase-Aktivität, noch auf die Telomerlänge, was gegen die aufgestellte Hypothese einer direkten Interaktion zwischen BCR-ABL und hTERT spricht.

Eine Erklärungsmöglichkeit für den fehlenden Effekt der BCR-ABL Tyrosinkinase (im Vergleich zu c-ABL (Kharbanda et al., 2000)) auf Telomerase-Aktivität und damit natürlich auch auf die Telomerlänge in dem verwendeten Modell, könnte die zelluläre Lokalisation von BCR-ABL bieten. Während c-ABL und Telomerase nukleär lokalisiert sind (Sawyers et al., 1994; Yang et al., 2002), findet man BCR-ABL überwiegend außerhalb des Zellkerns (Dhut et al., 1990). Diese vorwiegend extranukleäre Lokalisation der BCR-ABL Tyrosinkinase kann durch eine Hemmung des nukleären Imports und/oder durch einen beschleunigten Export aus dem Zellkern (Vigneri and Wang, 2001) erklärt werden.

Auf Basis dieser Hypothese wurde die Lokalisation von BCR-ABL in BaF3p185 mit Hilfe der Immunofluoreszenz untersucht. Dabei fand sich BCR-ABL, sowohl in unbehandelten Zellen, als auch in Zellen nach Behandlung mit IL-3 oder Imatinib + IL-3, wie schon von Vigneri et al. für K562 Zellen beschrieben (Vigneri and Wang, 2001), im Zytoplasma der Zellen.

Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich die relative Verlängerung der Telomere im peripheren Blut der untersuchten Patienten mit CML unter Imatinib mit einer stetigen Zunahme Ph- Zellen (mit normalen oder nur weniger verkürzten Telomeren) als Reflektion des Therapieansprechens erklären.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen für c-ABL (nukleär lokalisiert) konnte in dem verwendeten Zell-Modell keine funktionelle Interaktion zwischen BCR-ABL (zytoplasmatisch lokalisiert) und hTERT (nukleär lokalisiert) gefunden werden. Diese Ergebnisse sprechen darüber hinaus gegen die imatinib-vermittelte Hochregulierung der Telomerase-Aktivität, welche potentiell zu einer klonalen Evolution der Erkrankung beitragen könnte.

5.3 *Telomerlänge und Telomerase-Aktivität als prognostischer und diagnostischer Marker myeloischer Leukämien*

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) repräsentiert eine maligne und im Gegensatz zur CML genetisch sehr heterogene Erkrankung. Die betroffenen malignen Stammzellen bzw. Vorläuferzellen zeichnen sich sowohl durch ihre Dysfunktionalität, als auch durch Verlust oder Einschränkung ihres Differenzierungspotentials noch vor der entgültigen Ausdifferenzierung der Zellen aus (Dash and Gilliland, 2001; Lowenberg et al., 1999). Neben der Chronisch Myeloischen Leukämie ist die AML also eine weitere Erkrankung mit zugrundeliegender maligner Transformation der hämatopoetischen Stammzelle. Zu den wichtigsten prognostischen Faktoren der AML zählt sowohl der Anteil als auch die Verteilung der zytogenetischen Aberrationen (Byrd et al., 2002; Grimwade et al., 1998; Slovak et al., 2000). Dem gegenüber weisen allerdings ca. 45-50% der AML-Patienten gemäß der Standard-Zytogenetik einen normalen Karyotyp auf.

Trotzdem ist das klinische Ansprechen einzelner Patienten innerhalb der Gruppe immer noch sehr unterschiedlich. Eine Option zur weiteren Unterteilung dieser Patientengruppe bietet neben der Analyse FLT3-aktivierender Mutationen (Thiede et al., 2002) die Untersuchung des Genexpressions-Profiles der Patienten (Bullinger et al., 2004; Valk et al., 2004) oder der Mutationsstatus im Nukleophosmin-Gen (Suzuki et al., 2005; Falini et al., 2005).

Es werden jedoch noch weitere prognostische Parameter benötigt, um innerhalb dieser zytogenetisch definierten Gruppe die Patienten mit guter Prognose von den Patienten mit schlechter Prognose unterscheiden und damit die risikoadaptierte Therapie verbessern zu können.

Wie schon bei der CML, wird die progressive Telomer-Verkürzung sehr eng mit der Entwicklung genetischer Instabilitäten und karyotypischer Abnormalitäten in Verbindung gebracht. In verschiedenen hämatopoetischen Erkrankungen wurde auf den prognostischen Wert der Telomer-Verkürzung (oder Telomerase-Aktivität) hingewiesen (Brummendorf et al., 2000; Brummendorf et al., 2001; Ohyashiki et al., 2002). Auch an AML-Patienten wurden Untersuchung der Telomerlänge und der Telomerase-Aktivität mononukleärer Zellen durchgeführt (Engelhardt et al., 2000; Li et al., 2000b; Li et al., 2004; Ohyashiki et al., 1997a; Seol et al., 1998; Sieglova et al., 2004; Verstovsek et al., 2003; Xu et al., 1998). Die Telomerlängendynamik über das Lebensalter stellt sich in unterschiedlichen Subpopulationen peripherer Leukozyten (wie z.B. die Lymphozyten inklusive

ihrer naiven und Gedächtniszellen, Granulozyten oder Monozyten) sehr heterogen dar (Rufer et al., 1999). Bei der AML wurden die bisherigen Untersuchungen zur Telomerbiologie ausschließlich an der Gesamtpopulation der Mononukleären Zellen und nicht an definierten Subpopulationen peripherer Leukozyten durchgeführt. Mit dem Ziel ein möglichst homogenes Probenkollektiv zu erhalten, wurden in die vorliegende Studie nur Patienten mit über 80% Blasten zum Diagnosezeitpunkt (im Knochenmark oder Blut) eingeschlossen. Hierfür wurden in Kooperation mit der SHG AML 96 Studiengruppe Proben von 137 unbehandelten Patienten untersucht.

Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen fand sich in den untersuchten AML-Patienten, vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Gruppen (Counter et al., 1995; Takauchi et al., 1994; Yamada et al., 1995), eine ausgeprägte, sowie hoch signifikante Verkürzung der Telomerlänge. Die mediane Telomer-Verkürzung betrug dabei -2.5 TFU. Wenn man bedenkt, dass Telomere mit jeder Zellteilung ca. 100 bp verlieren, entspricht das einem Unterschied von ungefähr 25 PD. Das würde bedeuten, dass sich die AML-Zellen 25 mal häufiger geteilt haben als gesunde Zellen.

Für detailliertere Analysen wurden die Telomerlängen der AML-Patienten mit verschiedenen prognostisch relevanten klinischen Parametern korreliert.

Als prognostisch ungünstig gilt unter anderem die Diagnose einer sekundären AML. Durch die längere Krankheitsgeschichte oder auch die Entstehung der sekundären AML aus anderen hämatologischen Erkrankungen, welche ebenfalls Telomer-Verkürzungen aufweisen können, wie z.B. das myelodysplastische Syndrom (MDS) (Ohyashiki et al., 1994), könnte auf eine ausgeprägtere Verkürzung der Telomere geschlossen werden. Die Telomerlängen-Untersuchung der vorliegenden Arbeit zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen einer de-novo AML und der sekundären AML. Allerdings darf die ungleiche Verteilung der Patienten und die damit nur sehr kleine Gruppe an Patienten mit sekundärer AML (12 Patienten versus 125 Patienten mit de-novo AML) nicht außer Acht gelassen werden.

Ein weiterer ungünstiger Prognosefaktor ist der Anteil an CD34⁺ AML-Blasten, als Marker für den Anteil an unreifen Zellen. Auch dieser Marker zeigte keine Korrelation mit der Telomerlänge der Zellen.

Die klinische Einteilung der AML erfolgt gemäß FAB-Klassifikation in die Subtypen M0 bis M7. Die ausgeprägteste Telomer-Verkürzung im Vergleich zum häufigsten FAB-Subtyp M1 wurde in Patienten mit FAB-Subtyp M5 gefunden. Diese Resultate könnten durch den höheren Anteil FLT3-

aktivierender Mutationen, gefunden in Patienten mit FAB M5 (Thiede et al., 2002) welche mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet, erklärt werden. Auch FAB M4 zeigte trotz der niedrigen Fallzahl im Vergleich zu FAB M1 eine signifikante Tendenz zu kürzeren Telomeren, während FAB M2, welcher kaum mit den genannten FLT3-aktivierenden Mutationen assoziiert ist, die längsten Telomere aufwies. Die Zunahme FLT3-aktivierender Mutationen ist mit steigenden Proliferationsraten verbunden (Lowenberg et al., 1993), was wiederum die kürzeren Telomere erklären könnte. Da sich zwischen den FAB-Subtypen M4/M5 und dem FAB M1 kein signifikanter Unterschied des karyotypischen Verteilungsmusters fand, ist eine Erklärung der gefundenen Telomer-Unterschiede darüber nicht möglich.

Aufgrund der stringent gewählten Einschlusskriterien waren allerdings die Patientenzahlen für die Analysen der FAB-Subtypen, mit Ausnahme von FAB M1 und M5, zu gering um einen endgültigen Schluss ziehen zu können.

Eine wichtige Rolle bei der leukämischen Transformation spielen somatische Mutationen des FLT3 Gens, eine ausschliesslich von hämatopoetischen Zellen exprimierte Tyrosinkinase, welche zu einer konstitutiven Aktivierung des FLT3-Rezeptors führen. Um den Rückschluss von den FLT3-aktivierenden Mutationen über die gesteigerte Proliferationsrate der myeloischen Zellen zu kürzeren Telomeren ziehen zu können, wurde die Telomerlänge in Abhängigkeit von der FLT3-Ratio untersucht. Die FLT3-Ratio spiegelt dabei den Anteil FLT3-aktivierender Mutationen im Vergleich zu dem unmutierten FLT3-Wildtyp wieder. Und in der Tat zeigten Patienten mit höherem Anteil an FLT3-aktivierenden Mutationen im Vergleich zum unmutierten FLT3-Wildtyp (also mit höherer FLT3-Ratio) signifikant kürzere Telomere.

Für weitere Vergleiche wurde das Patientenkollektiv in 2 Gruppen (Patienten über 60 Jahre und Patienten unter 60 Jahre) geteilt. Vergleicht man nun die altersadaptierte Telomerlänge zwischen diesen beiden Gruppen so finden sich überraschenderweise in den jüngeren Patienten die signifikant kürzeren Telomere. Da das Alter ein ungünstiger Prognosefaktor ist, könnte trotz Altersadaptation in der Gruppe der älteren Patienten eine deutliche Telomer-Verkürzung erwartet werden.

Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Arbeit von Ohyashiki et al. (2001). Während die Telomerlänge in gesunden Personen in Abhängigkeit vom Alter abnimmt (Rufer et al., 1999), fanden Ohyashiki et al. in Patienten mit MDS oder sekundärer AML keine altersabhängige Verkürzung der Telomere. Diese Untersuchung wurde von Rigolin et al. für MDS-Patienten noch einmal bestätigt (Rigolin et al., 2004).

Nach genaueren Untersuchungen beider Altersgruppen zeigte sich allerdings, dass die jüngeren Patienten im Vergleich zu den älteren Patienten einen höheren Anteil an karyotypischen Instabilitäten aufwiesen. Während 50% der jüngeren AML-Patienten einen aberranten Karyotyp aufwiesen, zeigten nur 34% der älteren Patienten einen aberranten Karyotyp.

Da dieses Ergebnis den Einfluss dieses Parameters auf die Telomerlänge nahe legt, wurde deshalb das Ausmaß karyotypischer Instabilität im Vergleich mit der Telomer-Verkürzung untersucht.

Dabei fand sich bei annähernd 43% der Patienten karyotypische Abnormalitäten, wobei 9.5% einen komplexen Karyotyp aufwiesen (definiert als drei oder mehr unabhängige Aberrationen in Knochenmark-Metaphasen).

Interessanterweise war die Verkürzung der Telomere in Patienten mit zytogenetischen Veränderungen ausgeprägter als in Patienten mit normalem Karyotyp. Während Patienten mit mehr als 3 Aberrationen mit -3.7 TFU die kürzesten Telomere aufwiesen, zeigten Patienten mit normalem Karyotyp eine Verkürzung von -2.3 TFU. Diese Ergebnisse spiegelten sich auch im Trend zu kürzeren Telomeren in der Hochrisikogruppe (im Vergleich zum Standardrisiko) wieder.

Da die Gruppe der Patienten mit komplexem Karyotyp aufgrund der stringenten Einschlusskriterien relativ klein war, besteht der Bedarf an einer großen, möglicherweise auch prospektiven Studie zur Bestätigung dieser Ergebnisse.

Durch die Untersuchung der FLT3-Ratio (Mutant vs. Wildtyp) in Korrelation mit der Telomerlänge der Patienten war es möglich Patienten mit kurzen Telomeren von solchen mit langen Telomeren zu unterscheiden. Dieses Ergebnis spricht wiederum dafür, dass nicht nur zytogenetische Aberrationen, sondern auch Mutationen in Zellzyklus-relevanten Genen zu Telomer-Verkürzungen führen können.

Ein wichtiger richtungweisender Faktor in der Behandlung der Patienten ist das Ansprechen auf die gewählte Therapie, sowie das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben der Patienten. Für das gesamte Kollektiv der Patienten war kein Einfluss der Telomerlänge auf diese Parameter zu finden.

Die Proliferations-Aktivität leukämischer Blasten ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Einige Gruppen (Braess et al., 2001; Jahns-Streubel et al., 2001) zeigten dabei einen Zusammenhang zwischen dem hohen Proliferations-Potential der Zellen mit einer gesteigerten Inkorporation des Chemotherapeutikums Cytosinarabinosid (Cytarabin) in die DNA der Blasten und daraus folgernd eine bessere CR Rate dieser Patienten. Die AML-Patienten des normalen Karyotyps mit kurzen Telomeren, als Marker für

gesteigerte zelluläre Proliferation, könnten diesen Mechanismus widerspiegeln. Auf der anderen Hand zeigen auch Patienten mit komplexem Karyotyp sehr kurze Telomere in Assoziation mit der bekanntlich schlechten Prognose. Das zeigt, dass die Proliferations-Aktivität der leukämischen Zellen die komplexen Auswirkungen einiger genetischen Veränderungen nur teilweise reflektieren kann.

Vergleicht man die Überlebenskurven der Patienten nach 48 Monaten Beobachtungszeitraum, findet sich ein anderes Ergebnis. Die kürzesten Telomere führen hier zu kürzeren Überlebenszeiten und auch zu einem kürzeren krankheitsfreien Überleben der AML-Patienten. Die kleine Fallzahl der Patienten in den einzelnen Untergruppen, sowie die noch zu kurze Nachbeobachtungszeit verhindert allerdings die entgeltige Beurteilung dieser Ergebnisse.

Die oben gezeigte Abhängigkeit der Telomerlänge von den chromosomalen Instabilitäten des Patienten könnte unter anderem an einer differentiellen hTERT Expression in Abhängigkeit vom Karyotyp liegen. Interessanterweise zeigte sich hier keine Abnahme der hTERT Expression, sondern eine Zunahme der Expression in Abhängigkeit von der Zunahme chromosomaler Aberrationen in AML Blasten. Die hTERT mRNA Expression war in Patienten mit komplexem Karyotyp (welche die kürzesten Telomere aufwiesen) am ausgeprägtesten, gefolgt von den Patienten mit nichtkomplexem Karyotyp und den Patienten ohne karyotypische Veränderungen. Dies könnte andeuten, dass die deutlichere Telomer-Verkürzung mit zunehmender karyotypischen Abnormalität sowohl durch replikations-abhängige, als auch durch replikations-unabhängige Mechanismen verursacht worden sein könnte. Die Konsequenz daraus wäre für den malignen Klon die Notwendigkeit zur Steigerung der Telomerase-Aktivität, um den Eintritt in die replikativer Seneszenz vermeiden zu können.

In der Tat fanden einige Gruppen in einem Großteil humaner AML Blasten nachweisbare Telomerase-Aktivität, wenn auch mit sehr heterogenen Aktivitäts-Leveln (Ohyashiki et al., 1997a; Seol et al., 1998; Zhang et al., 1996). Die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase, hTERT spielt dabei für die Aktivierung des Enzyms nicht nur eine große Rolle, sondern ist wahrscheinlich sogar der limitierende Faktor für das Ausmaß an Telomerase-Aktivität (Poole et al., 2001).

Im Gegensatz zur beschriebenen, ausgeprägten Telomerase-Aktivität vieler AML-Patienten (Ohyashiki et al., 1997a; Seol et al., 1998; Xu et al., 1998), zeigten hier nur 21% der neu diagnostizierten AML-Patienten hTERT Expression. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Beobachtungen von

Greiner et al. (Greiner et al., 2004) und wird zudem unterstützt durch die Studie von Xu et al. (Xu et al., 1998), welche nur in Patienten mit mittlerer bis hoher Telomerase-Aktivität eine nachweisbare Expression von hTERT fand.

Überraschenderweise unterschieden sich Patienten mit bzw. ohne hTERT Expression nicht signifikant in ihrer altersadaptierten Telomerlänge, was auf der wesentlich kleineren Gruppe hTERT positiver Patienten, im Gegensatz zu der hTERT negativen Gruppe zurückgeführt werden könnte.

Neben der hTERT Expression ist das alternative Splicing der hTERT eine weitere Möglichkeit die Telomerase-Aktivität zu regulieren (Yi et al., 2000). Um diese Möglichkeit, in die Telomerase-Regulation einzugreifen nicht außer Acht zu lassen, wurde neben der hTERT Expression außerdem das Muster differentieller Splicing Varianten der AML-Proben untersucht.

Die gefundene hTERT Expression korrelierte dabei sehr gut mit der Expression der aktiven hTERT Splicing-Variante $+\alpha+\beta$ (Yi et al., 2001). Im Gegensatz zu anderen Krankheits-Entitäten (Fujiwara et al., 2004; Zaffaroni et al., 2002) deuten die gewonnenen Daten allerdings an, dass differentielles Splicing der hTERT kein hauptsächlicher Mechanismus der Telomerase-Regulation in AML-Patienten zu sein scheint.

Der bisher wichtigste, unabhängige Prognosefaktor der AML (Byrd et al., 2002) ist die Zytogenetik. Eine gute Möglichkeit AML-Patienten einzuteilen bietet die Trennung der Patienten mit normalem Karyotyp oder primären chromosomalen Abnormalitäten von Patienten mit sekundären chromosomalen Aberrationen (Mrozek et al., 2001; Schoch and Haferlach, 2002). Für einige Translokationen war es möglich die zugrundeliegende onkogene Aktivierung oder auch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen nachzuweisen. Obwohl die Verteilung der sekundären Aberrationen weniger spezifisch ist, als die der primären Abnormalitäten, kommt sie jedoch nicht zufällig zustande. Es ist sogar möglich sowohl Art als auch Häufigkeit des Auftretens sekundärer Aberrationen auf die jeweils zugrundeliegende primäre Veränderung zu beziehen (Johansson et al., 1994).

Theoretisch könnten die komplexen Karyotypen der AML-Patienten das Resultat genetisch/karyotypischer Instabilitäten sein, aus welchen willkürlich verschiedenste chromosomale Aberrationen entstanden, welche wiederum zum selektiven Wachstumsvorteil der betroffenen Blasten oder Vorläuferzellen geführt hatten.

Insgesamt deuten die hier vorgestellten Ergebnisse auf einen signifikanten Verlust der Telomerlänge hin, welcher zur Telomer-Dysfunktion und daraus

folgend zur genetischen Instabilität führen könnte, um so in die Pathogenese der AML einzugreifen.

Analog zu Daten, gewonnen von CML-Patienten in später chronischer Phase (Boultwood et al., 2000; Brummendorf et al., 2000), kann die durch progressive Telomer-Verkürzung entstandene genetische Instabilität in direktem Zusammenhang mit der Hochregulierung der Telomerase-Aktivität und auch der Progression der AML stehen.

Da Telomere auf den individuellen Chromosomenarmen unterschiedlich lang sind (Martens et al., 1998), könnte schon die Verkürzung der Telomere eines Armes bis zur kritischen Länge die Bildung chromosomaler Aberrationen fördern, obwohl die durchschnittliche Länge der Telomere der einzelnen Zelle von dieser kritischen Telomerlänge noch weit entfernt ist.

Noch ist jedoch nicht klar, inwiefern die Telomerlänge als einzelner Parameter für die AML von prognostischer Relevanz sein könnte. Wie in den hier durchgeführten Untersuchungen gezeigt wurde, kann die Telomerlänge durch andere Parameter, wie z.B. die FLT3-Mutationen beeinflusst werden. Zukünftig durchgeführte Multi-Parameter-Assays, wie z.B. die Analyse des Genexpressions-Profiles (Bullinger et al., 2004; Valk et al., 2004) könnten breiter eingesetzt werden und ein Licht auf die zahlreichen Möglichkeiten werfen, welche Pathogenese und Prognose der AML beeinflussen können.

5.4. Telomere und Telomerase als Angriffspunkt für pharmakologische Modulation

Zur Klärung der prognostischen Relevanz von Telomerlänge und Telomeraseaktivität wird gegenwärtig eine Vielzahl an Untersuchungen in verschiedenen hämatologischen und nicht-hämatologischen Malignomen durchgeführt. Ein neues und sehr vielversprechendes therapeutisches Prinzip zur Behandlung maligner Tumoren, mit Angriffspunkt an einer zentralen Schaltstelle des malignen Zellwachstums, stellt dagegen die Entwicklung neuer Telomerase-Inhibitoren dar.

Verschiedene dieser therapeutischen Prinzipien wurden bislang *in vitro* (Hahn et al., 1999b; Strahl and Blackburn, 1996; Wan et al., 1998) und in präklinischen *in vivo* (Koga et al., 2001; Kondo et al., 2000; Mata et al., 1997) Modellen geprüft. Obwohl telomerase-abhängige Therapien eine theoretisch erfolgversprechende neue tumorbiologische Therapie-Strategie darstellen, kann der klinische Stellenwert dieser Therapiemodalität aufgrund fehlender klinischer

Studien in gut ausgewählten klinischen Modellsituationen zum heutigen Zeitpunkt noch keinesfalls abgeschätzt werden.

Eine neue Substanz stellt hier der Telomerase-Inhibitor BIBR1532 dar. BIBR1532 hemmt als kompetitive, nicht nukleosidische Reverse Transkriptase sehr spezifisch die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT (Damm et al., 2001; Pascolo et al., 2002).

Als Modellsituation für den klinischen Einsatz von Telomerase-Inhibitoren bietet sich unter anderem die chronische Phase der CML an, da dieses Stadium durch eine erhöhte zelluläre Teilungsrate bei (relativer) klinischer Stabilität, sowie durch eine verkürzte Telomere bei erhöhter Telomeraseaktivität charakterisiert ist. Damit sind die theoretischen Voraussetzungen für die klinische Testung einer solchen Substanzklasse erfüllt.

Aufgrund dessen wurde in diesem Teil der Arbeit die Effektivität des Telomerase-Inhibitors BIBR1532 am Zellmodell der CML, in zwei voneinander unabhängigen Langzeit-Versuchen getestet. Da die hierfür verwendeten Zell-Linien relativ lange Ausgangstelomere (K562: 11 TFU und 18 TFU; BV-173: 15 TFU und 12 TFU) aufwiesen, wurde als BCR-ABL-negative Kontroll-Zelllinie HL-60 mit einer Ausgangs-Telomerlänge von ca. 3 TFU verwendet.

Analog zur Originalarbeit (Damm et al., 2001), sollte BIBR1532 in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt werden.

Um in der Lage zu sein, die Telomer-Dynamik der Zellen unter Therapie mit BIBR1532 zu untersuchen, durfte die Substanz keine direkten zytotoxischen Effekte auf die verwendeten Zellen haben. Als Vorbereitung der Langzeit-Versuche wurde deshalb die Zytotoxizität der Substanz mittels MTT-Assay untersucht. Die so ermittelten IC_{50} Werte lagen für alle Zell-Linien deutlich über 10 μM , so dass diese Konzentration für alle nachfolgenden Untersuchungen verwendet werden konnte.

Höhere BIBR1532-Konzentrationen zeigten einen deutlich zytotoxischen Effekt, welcher auf einen Mechanismus, analog zu den Untersuchungen von El-Daly et al. (2005) zurückgeführt werden könnte. In El-Dalys Versuchen zeigte BIBR1532 in Konzentrationsbereichen zwischen 30 und 80 μM eine direkte, nicht mehr über die Hemmung der Telomerase erklärbare Zytotoxizität. Diese zeitabhängige individuelle Telomer-Erosion wurde von der Arbeitsgruppe auf den Verlust von TRF2 und einer gesteigerten Phosphorylierung des p53 zurückgeführt.

Durch die Verwendung von 10 μM konnte die von El-Daly et al. beschriebene dosisabhängige Zytotoxizität auf die Zellen ausgeschlossen werden.

Untersuchungen von Damm et al. (2001) beschrieben am Zellmodell solider Tumoren wie dem Prostata-, Lungen- und Mamma-Karzinom, sowie an Fibrosarkom-Zellen eine kontinuierliche Telomer-Verkürzung unter Behandlung mit dem Telomerase-Hemmer BIBR1532.

Um diese Ergebnisse an den verwendeten CML- und AML-Zellen reproduzieren zu können, wurden diese mit oder ohne Zusatz von BIBR1532 kultiviert.

Als weitere Kontrolle diente die murine BCR-ABL-positive Zell-Linie BaF3p185. BIBR1532 zeigt eine sehr selektive Hemmung humaner Telomerase (500fach stärkere Hemmung im Vergleich zur murinen Telomerase) (Damm et al., 2001). Signifikante Telomer-Verkürzungen muriner Zell-Linien würden demzufolge auf unspezifische Telomer-Erosionen, unabhängig der telomerase-hemmenden Wirkung der Substanz hindeuten.

Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zeigte die BIBR1532-behandelte BaF3p185 keine signifikanten Veränderungen der Telomerlänge. Eine unspezifische Wirkung der Substanz auf die Telomere konnte also weitgehend ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz dazu wiesen beide CML-Linien eine deutliche und signifikante Verkürzung der Telomere unter Behandlung mit BIBR1532 auf, obwohl sich die Telomere nicht kontinuierlich über den gesamten Behandlungs-Zeitraum verkürzten. Nach ca. 200 Verdopplungen stabilisierten sich die Telomere der Zell-Linie K562 auf relativ konstante Werte. Im Vergleich dazu zeigte die BIBR1532-behandelte BV-173 eine wesentlich ausgeprägtere Verkürzung der Telomere. Bei genauerer Betrachtung der Telomerlängen des BV-173 Langzeitversuch 3 wird aber auch hier, vergleichbar mit den K562-Zellen, eine Stabilisierung der Telomerlänge bei ca. 4 TFU deutlich.

Grund für diese Beobachtungen könnte die Aktivierung alternativer telomere-stabilisierender Effekte, wie der „Alternative Lengthening of Telomeres“ ALT-Weg sein. Während ca. 90% der Tumorzellen Telomerase zur Stabilisierung ihrer Telomere benutzen, wird der ALT-Mechanismus für virustransformierte humane Zellen und einige humane Tumorzell-Linien ohne Telomerase-Aktivität beschrieben (Bryan et al., 1995), welche naturgemäß gegenüber Telomerase-Inhibitoren resistent sind.

Die pharmakologische Hemmung der Telomerase übt einen massiven Selektionsdruck auf die behandelten Zellen aus. Sind unter den telomerase-positiven Zellen einige, welche ihre Telomere über den ALT-Weg stabilisieren und daher keine Telomerase benötigen, so würde die Telomerase-Hemmung diesen Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil bieten. Darüber hinaus könnte auch die Selektion spezifischer Mutationen durch die Therapie mit Telomerase-

Inhibitoren die nötige Voraussetzung für ALT schaffen (Ibanez, I et al., 2004). Damit würde ALT einen möglichen Resistenz-Mechanismus gegenüber der Therapie mit Telomerase-Inhibitoren darstellen.

Dass eine Koexistenz von Telomerase und ALT überhaupt möglich ist, konnte durch die ektopische Expression von hTERT in telomerase-negativen ALT-Zellen (Cerone et al., 2001), sowie durch die Hybridisierung von telomerase-positiven und ALT-Zellen (Perrem et al., 1999) nachgewiesen werden.

Damm et al. (2001) fanden allerdings in ihren verwendeten Zell-Linien keinerlei Anzeichen einer telomerase-unabhängigen Stabilisierung oder Verlängerung der Telomere, welche auf ALT zurückgeführt werden könnte.

Die Möglichkeit durch Hemmung der Telomerase ALT zu aktivieren, wurde erstmals im Kolonkarzinom beschrieben (Bechter et al., 2004). Auffällig war hier der untypische ALT-Phänotyp, welcher sich unter anderem in fehlenden „ALT-assoziierten PML-Bodys“ (APB-Bodys) ausdrückte. Zurückgeführt wurde dieses Phänomen auf ein mögliches Wiederauftreten der Telomerase-Aktivität.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bieten außerdem die Ergebnisse von Kondo et al. (Kondo et al., 1998), welche vermuten lassen, dass Subpopulationen von Tumorzellen nach Hemmung der Telomerase in der Lage sind der drohenden Apoptose durch Differenzierung zu entgehen. In humanen Leukämie-Zellen, wie K562 und HL-60 (Xu et al., 1999; Yamada et al., 1998) und auch in anderen Zellen (Sharma et al., 1995) konnte durch Differenzierung der Zellen eine Hemmung der Telomerase-Aktivität, zum Teil auch mit stabilen Telomerlängen (Yamada et al., 1998), beobachtet werden.

Die unverändert hohe Telomerase-Aktivität nach Absetzen der Behandlung mit BIBR1532 spricht in der vorliegenden Arbeit allerdings gegen diese Theorie.

Im Gegensatz zur K562 zeigten schon die unbehandelten BV-173 Zellen abnehmende Telomerlängen. Es ist allerdings bekannt, dass die Telomerlänge kultivierter Zell-Linien über längere Kultivierungszeiträume deutlichen Schwankungen unterliegen kann (Brümmendorf et al., nicht veröffentlichte Daten). Während der Langzeitversuch 3 erst über ca. 137 PD beobachtet wurde, zeigt Langzeitversuch 2 (191 PD) nach anfänglicher Abnahme wieder eine Zunahme der Telomerlänge, was auf die oben genannten Schwankungen zurückgeführt werden könnte. Die Telomer-Verkürzung der behandelten Zellen war dennoch ausgeprägter als die der unbehandelten Zellen.

Durch die langen Ausgangstelomere der BCR-ABL-positiven Zellen wurde eine sehr lange Behandlungszeit mit dem Telomerase-Inhibitor BIBR1532 notwendig. Zum Vergleich wurde deshalb die AML-Linie HL-60, mit relativ

kurzen Telomeren untersucht. Während die unbehandelten Zellen eine stetige Zunahme der Telomere zeigten, fand sich bei den behandelten Zellen schon bald eine Stabilisierung der Telomerlänge bei ca. 2 TFU. Die Telomerlänge scheint sich demnach in einem Plateau zu stabilisieren. Trotz dieser sehr kurzen Telomere zeigten diese Zellen, wie auch die BCR-ABL-positiven Zellen, keine Anzeichen für eine beginnende Seneszenz.

Zu den Zeichen beginnender Seneszenz zählt unter anderem eine abnehmende Proliferationsfähigkeit der Zellen in Kultur. Ohne Telomerase können sich Zellen in Kultur nur eine begrenzte Zeit lange teilen (Hayflick, 1965). Die Proliferationsfähigkeit der behandelten Zellen, mit verkürzten Telomeren, unterschied sich hier nicht von der Proliferation unbehandelter Zellen.

Als weiteres Anzeichen für zelluläre Seneszenz wird von Narita et al. die Ausbildung sogenannter DNA-Foci beschrieben (Narita et al., 2003). Basierend auf diesen Arbeiten wurde die Kern-Struktur behandelter Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen untersucht. Wie schon beim Vergleich der Proliferationsfähigkeiten, wurden auch hier keine Hinweise auf zunehmende Seneszenz unter Therapie mit BIBR1532 gefunden. Die fehlenden Anzeichen der Seneszenz deuten ebenfalls auf eine Stabilisierung der Telomere hin.

Auch Strahl et al. fanden in Zellen nach Erreichen einer minimalen Telomerlänge weder eine Änderung der Zell-Proliferation, noch Anzeichen zellulärer Seneszenz (Strahl and Blackburn, 1996). Die Möglichkeit immortalisierter Zellen, sehr kurze Telomere für längere Zeit in Gegenwart eines Telomerase-Inhibitors zu stabilisieren, während sich die Verdopplungsrate nicht ändert, ist nach Strahl et al. ein Zeichen für telomerase-unabhängige Regulation der Telomerlänge. Ob die Telomere über die Telomerase oder über alternative Mechanismen stabilisiert werden, ist für jede Zell-Linie charakteristisch und kann zu verschiedenen Zeitpunkten variieren.

Durch die lange Behandlung mit BIBR1532 könnte sich dagegen auch infolge reaktiver Telomerase-Expression das Ausmaß der Telomerase-Aktivität in den behandelten Zellen geändert haben. Aufgrund dessen wurde die Telomerase-Aktivität der Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontroll-Linie gemessen. Durch die geringe Stabilität des Telomerase-Inhibitor-Komplexes genügte das Einsetzen der Zellen in BIBR1532-freie Medien um die relative Telomerase-Aktivität ohne Einfluss des Inhibitors testen zu können. Da sich hier keine signifikanten Unterschiede zeigten, konnte die postulierte Hochregulierung der Telomerase, als möglicher Resistenz-Mechanismus gegenüber der Therapie mit BIBR1532 weitgehend ausgeschlossen werden. Auch diese Ergebnisse

deuteten auf eine alternative Möglichkeit der Telomer-Stabilisierung, wie ALT hin. Zur Bestätigung dieser Theorie sind allerdings noch weitere, detaillierte Untersuchungen notwendig.

Ein immer größeres Problem der CML-Therapie, vor allem fortgeschrittener Stadien, ist die Zunahme an Resistenzen unter der Therapie mit Imatinib. Nach der Untersuchung der dafür verantwortlichen Mechanismen ist die Entwicklung von Substanzen zur Vermeidung oder Umgehung der Imatinib-Resistenz in den Vordergrund gerückt (Daub et al., 2004). Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung, inwiefern die Dauertherapie mit Telomerase-Inhibitoren, wie BIBR1532, eine Auswirkung auf die Sensivität der Zellen gegenüber Imatinib haben könnte.

Einigen Forschungsgruppen gelang es inzwischen einen Zusammenhang zwischen chemotherapie-induzierter Apoptose von Tumorzellen und abnehmender Telomerase-Aktivität nachzuweisen (Faraoni et al., 1997; Lin et al., 2001). Demgegenüber wird die Beziehung zwischen Telomerase-Aktivität in unbehandelten Tumorzellen und ihre Sensivität gegenüber Chemotherapie kontrovers diskutiert. Während die Sensivität von Mamma-Karzinomzellen gegenüber Topoisomerase-Hemmern durch Telomerase-Inhibition erhöht werden konnte, war gegenüber Cisplatin kein Effekt feststellbar (Ludwig et al., 2001). Maligne Gliomzellen dagegen konnten gegenüber Cisplatin sensibilisiert werden (Kondo et al., 2001). Die Beziehung zwischen Telomerase-Hemmung und der Sensivität gegenüber anderen therapeutisch eingesetzten Substanzen scheint demnach abhängig vom Zelltyp und von der ausgewählten Therapie zu sein.

Eine zunehmende Chemosensivität gegenüber Imatinib wurde von Tauchi et al. in telomestatin-behandelten K562 Zellen beschrieben (Tauchi et al., 2003). Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen unter Therapie mit BIBR1532 keine Sensitivierung gegenüber Imatinib.

Vielmehr wurden die unbehandelten K562 Zellen nach langer Zeit in Kultur zunehmend resistenter gegenüber Imatinib.

Die Sensivität der BV-173 Zellen gegenüber Imatinib änderte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen der K562 Zellen nicht. Die Kontrollzellen HL-60 zeigten sich trotz BIBR1532-Behandlung unverändert unempfindlich gegenüber Imatinib.

Durch die lange Kultivierungs-Zeit der Zellen sind zufällige Mutationen oder auch die Selektion resistenterer K562 Zellen durchaus möglich. Da Resistenzen gegenüber Imatinib, vor allem in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung

immer häufiger auftreten, sind genauere Untersuchungen der möglichen Ursachen dieser zunehmenden Resistenz unbehandelter K562-Zellen im Gegensatz zu BIBR1532-behandelten Zellen in Folgeprojekten notwendig.

6. Zusammenfassung

Bei Menschen und allen anderen Wirbeltieren setzen sich Telomere aus repetitiven TTAGGG-Sequenzen und verschiedenen telomerbindenden Proteinen zusammen. Dieser Telomer-Nukleoprotein-Komplex sitzt wie eine nicht-kodierende „Kappe“ an den Chromosomenenden und schützt diese so vor enzymatischer Degradation, Rekombination und Fusion. Während jeder Zellteilung der somatischen Zellen *in vitro* und während des Alterns *in vivo* kommt es zur Verkürzung der Telomere, was zum einen zu genetischer Instabilität und zellulären Seneszenz führt und zum anderen indirekt Informationen über die mitotische Geschichte der Zellen bietet.

Im Gegensatz dazu können Zellen bestimmter Gewebe, insbesondere die der Keimbahn, aber auch maligne Tumorzellen, der Telomer-Verkürzung durch Expression des Enzyms Telomerase entgegenwirken. Telomerase ist in der Lage an den Enden der Chromosomen Telomer-Sequenzen zu synthetisieren und so die Telomere zu stabilisieren.

Aufgrund nicht ausreichend hoher Telomerase-Expression zeigen dagegen auch hämatopoetische Stammzellen eine replikationsabhängige Verkürzung der Telomere.

Die Telomerlängen-Kinetik des Stammzellen-Kompartiments im Knochenmark spiegelt sich dabei in peripheren Blutzellen wieder. Um den zellulären Umsatz dieser leicht zugänglichen peripheren hämatopoetischen Zellen *in vivo* zu untersuchen, ist die Telomerlängen-Messung von Bedeutung.

Im Vergleich zur gesunden Hämatopoese sind klonale Erkrankungen wie die Chronische Myeloische Leukämie (CML) oder die Akute Myeloische Leukämie (AML) durch eine gesteigerte Proliferationsrate der malignen Stammzellpopulation gekennzeichnet.

Es stellt sich die Frage, inwieweit die Telomerlänge hämatologischer Malignome mit Beteiligung hämatopoetischer Stammzellen oder Vorläuferzellen und deutlich gesteigertem Turnover verändert ist.

Eine geeignete hämatologische Modellerkrankung zur Überprüfung dieser Frage stellt die CML dar. Frühere Untersuchungen zeigten eine deutliche Verkürzung der Telomerlänge peripherer Blutzellen von CML-Patienten gegenüber gesunden Zellen des gleichen Patienten, sowie gegenüber altersadaptierten Gesunden. Das Ausmaß der Telomer-Verkürzung korrelierte

dabei nicht nur mit Dauer und Stadium der Erkrankung, sondern auch mit dem prognostischen Hasford-Score.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einer prospektiven klinischen Studie die Bedeutung der Telomerbiologie für Prognose und klinischen Verlauf der Erkrankung, sowie deren Modifikation unter Therapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (Glivec®) untersucht.

Wie schon in der vorangegangenen Studie korrelierte die Verkürzung der Telomere mit dem Stadium und damit auch mit der Dauer der Erkrankung. Unter Therapie mit Imatinib fand sich allerdings eine signifikante Zunahme der durchschnittlichen Telomerlänge peripherer Granulozyten. Darüber hinaus zeigte die Normalisierung der Telomerlänge eine deutliche Abhängigkeit mit dem zytogenetischen, sowie dem molekularen Ansprechen auf die Therapie mit Imatinib.

Im Hinblick auf Untersuchungen an der Tyrosinkinase c-ABL, welche eine direkte Inhibition der Telomerase durch c-ABL nachwies, konnte ein direkter imatinib-vermittelter Effekt auf die Telomerlänge Ph⁺ Zellen als mögliche Ursache nicht ausgeschlossen werden. Die Hemmung von BCR-ABL durch Imatinib könnte, analog zur c-ABL-Wirkung, die Phosphorylierung von hTERT aufheben und damit über steigende hTERT-Aktivität eine Verlängerung der Telomere bewirken.

In den *in vitro* Untersuchungen unter Therapie mit Imatinib fand sich allerdings weder einen Effekt auf die Telomerlänge, noch auf die Telomerase-Aktivität der Zellen, was in dem gewählten Zell-Modell gegen diese Hypothese spricht.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verlängerung der vorher verkürzten Telomere in CML Patienten, unter Behandlung mit Imatinib einen steigenden Anteil an Ph⁻ Zellen (mit normalen oder nur wenig verkürzten Telomeren) als Ausdruck des Therapieansprechens widerspiegelt.

Wie die CML, stellt die AML eine Stammzell-Erkrankung dar. Obwohl ein großer Teil der Patienten einen normalen Karyotyp aufweist, zeigt diese Gruppe ein sehr uneinheitliches Ansprechen auf die Therapie. Da sich die Prognose der Patienten vor allem auf die Zytogenetik stützt, werden neben neuen Methoden, wie die Analyse von FLT3-Mutationen prognostische Faktoren zur weiteren Unterteilung dieser Patienten-Gruppe benötigt. Die bisher durchgeführten Studien zur Telomeraseaktivität und Telomerlänge von AML-Patienten wurden allerdings an sehr heterogenem Proben-Material durchgeführt. Um eine Aussage zu deren diagnostischen bzw. prognostischen Wert zulassen zu können, fehlten bisher systematische Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit konnte an einem großen und homogenen Proben- und Patienten-Kollektiv eine ausgeprägte, progressive Verkürzung der Telomere der AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontroll-Personen gezeigt werden. Dabei zeigte sich dass das Ausmaß der Verkürzung mit zunehmender zyto-genetischer Instabilität zunahm.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann der Telomerbiologie im Laufe der AML-Pathogenese eine wichtige Rolle bei der Entwicklung genetischer Instabilitäten, insbesondere komplexer karyotypischen Aberrationen zugesprochen werden. Darüber hinaus zeigten Patienten mit komplexem Karyotyp die ausgeprägteste Überexpression der hTERT (inklusive der funktionellen Splicing-Variante). Ausgehend davon kann angenommen werden, dass es mit fortgeschrittener Telomer-Verkürzung zu einer Aktivierung von Telomerase in AML-Blasten kommt was möglicherweise einen Mechanismus für die klonale Selektion im Verlauf der Erkrankung darstellt.

Die Regulation der Telomerase-Aktivität in AML Blasten scheint aber primär nicht auf transkriptioneller Ebene zu erfolgen, was in laufenden Studien noch genauer untersucht wird.

Über 90% der Tumorspezies erlangen ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation durch das Enzym Telomerase. Ein verhältnismäßig neuer und therapeutisch vielversprechender Ansatz für die Therapie maligner Tumoren stellt deswegen die Entwicklung neuer Telomerase-Inhibitoren, wie BIBR1532 dar.

Die chronische Phase der CML bietet sich hier als Modellsituation für den klinischen Einsatz von Telomerase-Inhibitoren an, da dieses Stadium durch einen erhöhten zellulären "turnover" bei (relativer) klinischer Stabilität, sowie durch eine verkürzte Telomerlänge bei erhöhter Telomeraseaktivität charakterisiert ist.

In der vorliegenden Arbeit zeigten beide CML-Linien eine signifikante Telomer-Verkürzung, welche sich allerdings bei Erreichen einer scheinbar linienspezifischen Telomerlänge, im Sinne eines Plateaus, stabilisierte. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der „Alternative Lengthening of Telomeres“ ALT-Weg bieten, welcher dadurch einen möglichen Resistenzmechanismus gegenüber der Therapie mit Telomerase-Inhibitoren darstellen würde. Seneszenz oder Apoptose konnte weder in den CML- noch in der AML-Linie nachgewiesen werden, was ebenfalls auf stabilisierte Telomere hindeutet.

Weitere detaillierte Untersuchungen sind zukünftig notwendig um diese Hypothese zu bestätigen.

Ein weiterer Teilaspekt dieser Arbeit war die Untersuchung, inwiefern die Dauertherapie mit Telomerase-Inhibitoren, wie BIBR1532, eine Auswirkung auf die Sensivität der Zellen gegenüber Imatinib haben könnte. Während sich die Sensivität gegenüber Imatinib unter BIBR1532-Therapie nicht änderte, zeigten sich die unbehandelten K562 Zellen zunehmend resistent gegenüber Imatinib. Untersuchungen der Ursachen dieser zunehmenden Resistenz sind in Folgeprojekten geplant.

In der vorliegenden Arbeit konnte die klinische Bedeutung der Telomere, sowie der Telomerase oder hTERT-Expression in myeloischen Leukämien beurteilt werden. Ein wichtiger Aspekt war dabei auch die Bedeutung der Telomerlängen-Messung unter pharmakologischer Modulation der CML mit Imatinib. Dadurch bieten sich prognostisch und diagnostische Informationen, welche für Art und Intensität von Therapiestrategien richtungsweisend sein können.

Die durchgeführten Untersuchungen zur Beeinflussung von Telomerase und Telomeren unter Therapie mit einem Telomerase-Inhibitor tragen zu einem besseren Verständnis von Nutzen, Risiko und Einsatzmöglichkeit einer solchen Therapieoption bei.

7. Literatur

Andersson,L.C., Nilsson,K., and Gahmberg,C.G. (1979). K562--a human erythroleukemic cell line. *Int. J. Cancer* 23, 143-147.

Baerlocher,G.M. and Lansdorp,P.M. (2003). Telomere length measurements in leukocyte subsets by automated multicolor flow-FISH. *Cytometry* 55A, 1-6.

Baerlocher,G.M., Mak,J., Tien,T., and Lansdorp,P.M. (2002). Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: tips and pitfalls. *Cytometry* 47, 89-99.

Beattie,T.L., Zhou,W., Robinson,M.O., and Harrington,L. (1998). Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr. Biol.* 8, 177-180.

Bechter,O.E., Zou,Y., Walker,W., Wright,W.E., and Shay,J.W. (2004). Telomeric recombination in mismatch repair deficient human colon cancer cells after telomerase inhibition. *Cancer Res* 64, 3444-3451.

Bennett,J.M., Catovsky,D., Daniel,M.T., Flandrin,G., Galton,D.A., Gralnick,H.R., and Sultan,C. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann. Intern. Med* 103, 620-625.

Bhatia,R., Holtz,M., Niu,N., Gray,R., Snyder,D.S., Sawyers,C.L., Arber,D.A., Slovak,M.L., and Forman,S.J. (2003). Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood* 101, 4701-4707.

Blackburn,E.H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569-573.

Blasco,M.A., Lee,H.W., Rizen,M., Hanahan,D., DePinho,R., and Greider,C.W. (1997). Mouse models for the study of telomerase. *Ciba Found. Symp.* 211, 160-170.

Bodnar,A.G., Kim,N.W., Effros,R.B., and Chiu,C.P. (1996). Mechanism of telomerase induction during T cell activation. *Exp. Cell Res.* 228, 58-64.

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.

Bouffler,S.D., Morgan,W.F., Pandita,T.K., and Slijepcevic,P. (1996). The involvement of telomeric sequences in chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 366, 129-135.

Boultonwood,J., Fidler,C., Shepherd,P., Watkins,F., Snowball,J., Haynes,S., Kusec,R., Gaiger,A., Littlewood,T.J., Peniket,A.J., and Wainscoat,J.S. (1999). Telomere length shortening is associated with disease evolution in chronic myelogenous leukemia. *Am. J. Hematol.* 61, 5-9.

Boultonwood,J., Peniket,A., Watkins,F., Shepherd,P., McGale,P., Richards,S., Fidler,C., Littlewood,T.J., and Wainscoat,J.S. (2000). Telomere length shortening in chronic myelogenous leukemia is associated with reduced time to accelerated phase. *Blood* 96, 358-361.

Braess,J., Jahns-Streubel,G., Schoch,C., Haase,D., Haferlach,T., Fiegl,M., Voss,S., Kern,W., Schleyer,E., and Hiddemann,W. (2001). Proliferative activity of leukaemic blasts and cytosine arabinoside pharmacodynamics are associated with cytogenetically defined prognostic subgroups in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 113, 975-982.

Broccoli,D., Young,J.W., and de Lange,T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 9082-9086.

Brummendorf,T.H., Holyoake,T.L., Rufer,N., Barnett,M.J., Schulzer,M., Eaves,C.J., Eaves,A.C., and Lansdorp,P.M. (2000). Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood* 95, 1883-1890.

Brummendorf,T.H., Mak,J., Sabo,K.M., Baerlocher,G.M., Dietz,K., Abkowitz,J.L., and Lansdorp,P.M. (2002). Longitudinal studies of telomere length in feline blood cells: implications for hematopoietic stem cell turnover in vivo. *Exp. Hematol.* 30, 1147-1152.

Brummendorf,T.H., Rufer,N., Holyoake,T.L., Maciejewski,J., Barnett,M.J., Eaves,C.J., Eaves,A.C., Young,N., and Lansdorp,P.M. (2001). Telomere length dynamics in normal individuals and in patients with hematopoietic stem cell-associated disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 938, 293-303.

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.

Buchdunger,E., Zimmermann,J., Mett,H., Meyer,T., Muller,M., Druker,B.J., and Lydon,N.B. (1996). Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 56, 100-104.

Bullinger,L., Dohner,K., Bair,E., Frohling,S., Schlenk,R.F., Tibshirani,R., Dohner,H., and Pollack,J.R. (2004). Use of Gene-Expression Profiling to Identify Prognostic Subclasses in Adult Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 350, 1605-1616.

Byrd,J.C., Mrozek,K., Dodge,R.K., Carroll,A.J., Edwards,C.G., Arthur,D.C., Pettenati,M.J., Patil,S.R., Rao,K.W., Watson,M.S., Koduru,P.R., Moore,J.O., Stone,R.M., Mayer,R.J., Feldman,E.J., Davey,F.R., Schiffer,C.A., Larson,R.A., and Bloomfield,C.D. (2002). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100, 4325-4336.

Carlesso,N., Frank,D.A., and Griffin,J.D. (1996). Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp. Med* 183, 811-820.

Cerone,M.A., Londono-Vallejo,J.A., and Bacchetti,S. (2001). Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1945-1952.

Cheson,B.D., Cassileth,P.A., Head,D.R., Schiffer,C.A., Bennett,J.M., Bloomfield,C.D., Brunning,R., Gale,R.P., Grever,M.R., Keating,M.J., and . (1990). Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 8, 813-819.

Chiu,C.P. and Harley,C.B. (1997). Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 214, 99-106.

Chou,T.C. and Talalay,P. (1981). Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. *Eur. J. Biochem.* 115, 207-216.

Chou,T.C. and Talalay,P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 27-55.

Colgin,L.M., Wilkinson,C., Englezou,A., Kilian,A., Robinson,M.O., and Reddel,R.R. (2000). The hTERTalpha splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia*. 2, 426-432.

Collins,S.J., Gallo,R.C., and Gallagher,R.E. (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270, 347-349.

Collins,S.J., Ruscetti,F.W., Gallagher,R.E., and Gallo,R.C. (1978). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75, 2458-2462.

Cong,Y.S., Wen,J., and Bacchetti,S. (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum. Mol. Genet.* 8, 137-142.

Coons,A.H. (1960). Immunofluorescence. *Public Health Rep.* 75, 937-943.

Counter,C.M., Gupta,J., Harley,C.B., Leber,B., and Bacchetti,S. (1995). Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85, 2315-2320.

Counter,C.M., Meyerson,M., Eaton,E.N., Ellisen,L.W., Caddle,S.D., Haber,D.A., and Weinberg,R.A. (1998). Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* 16, 1217-1222.

Cozzio,A., Passegue,E., Ayton,P.M., Karsunky,H., Cleary,M.L., and Weissman,I.L. (2003). Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev.* 17, 3029-3035.

Dalbagni,G., Han,W., Zhang,Z.F., Cordon-Cardo,C., Saigo,P., Fair,W.R., Herr,H., Kim,N., and Moore,M.A. (1997). Evaluation of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay for telomerase as a diagnostic modality in recurrent bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* 3, 1593-1598.

Daley,G.Q. and Baltimore,D. (1988). Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 9312-9316.

Daley,G.Q., Van Etten,R.A., and Baltimore,D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247, 824-830.

Dalton,W.T., Jr., Ahearn,M.J., McCredie,K.B., Freireich,E.J., Stass,S.A., and Trujillo,J.M. (1988). HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* 71, 242-247.

Damm,K., Hemmann,U., Garin-Chesa,P., Huel,N., Kauffmann,I., Priepke,H., Niestroj,C., Daiber,C., Enenkel,B., Guilliard,B., Lauritsch,I., Muller,E., Pascolo,E., Sauter,G., Pantic,M., Martens,U.M., Wenz,C., Lingner,J., Kraut,N., Rettig,W.J., and Schnapp,A. (2001). A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J.* 20, 6958-6968.

Dash,A. and Gilliland,D.G. (2001). Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 14, 49-64.

Daub,H., Specht,K., and Ullrich,A. (2004). Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 1001-1010.

de Lange, T. Telomere dynamics and genomic instability in human cancer. In: Blackburn EH, Greider C, eds. *Telomeres*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 265-293. 1995.

Ref Type: Generic

Deng,G., Chen,A., Hong,J., Chae,H.S., and Kim,Y.S. (1999). Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res.* 59, 2029-2033.

Dhut,S., Chaplin,T., and Young,B.D. (1990). BCR-ABL and BCR proteins: biochemical characterization and localization. *Leukemia* 4, 745-750.

Druker,B.J., Talpaz,M., Resta,D.J., Peng,B., Buchdunger,E., Ford,J.M., Lydon,N.B., Kantarjian,H., Capdeville,R., Ohno-Jones,S., and Sawyers,C.L. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med* 344, 1031-1037.

Druker,B.J., Tamura,S., Buchdunger,E., Ohno,S., Segal,G.M., Fanning,S., Zimmermann,J., and Lydon,N.B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* 2, 561-566.

Drummond,M., Lennard,A., Brummendorf,T.H., and Holyoake,T.L. (2004). Telomere shortening correlates with prognostic score at diagnosis and proceeds rapidly during progression of CML. *Leuk. Lymphoma*.

Ducrest,A.L., Amacker,M., Mathieu,Y.D., Cuthbert,A.P., Trott,D.A., Newbold,R.F., Nabholz,M., and Lingner,J. (2001). Regulation of human telomerase activity: repression by normal chromosome 3 abolishes nuclear telomerase reverse transcriptase transcripts but does not affect c-Myc activity. *Cancer Res.* 61, 7594-7602.

Ducrest,A.L., Szutorisz,H., Lingner,J., and Nabholz,M. (2002). Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene* 21, 541-552.

Egholm,M., Buchardt,O., Christensen,L., Behrens,C., Freier,S.M., Driver,D.A., Berg,R.H., Kim,S.K., Norden,B., and Nielsen,P.E. (1993). PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 365, 566-568.

El Daly,H., Kull,M., Zimmermann,S., Pantic,M., Waller,C.F., and Martens,U.M. (2005). Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532. *Blood* 105, 1742-1749.

Engelhardt,M., Mackenzie,K., Drullinsky,P., Silver,R.T., and Moore,M.A. (2000). Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture. *Cancer Res.* 60, 610-617.

Espejel,S., Franco,S., Rodriguez-Perales,S., Bouffler,S.D., Cigudosa,J.C., and Blasco,M.A. (2002). Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J.* 21, 2207-2219.

Falini,B., Mecucci,C., Tiacci,E., Alcalay,M., Rosati,R., Pasqualucci,L., La Starza,R., Diverio,D., Colombo,E., Santucci,A., Bigerna,B., Pacini,R., Pucciarini,A., Liso,A., Vignetti,M., Fazi,P., Meani,N., Pettrossi,V., Saglio,G., Mandelli,F., Lo-Coco,F., Pelicci,P.G., Matrelli,M.F., GIMEMA Acute Leukemia Working Party. (2005). Cytoplasmatic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N.Engl.J.Med.* 352, 254-266.

Faraoni,I., Turriziani,M., Masci,G., De Vecchis,L., Shay,J.W., Bonmassar,E., and Graziani,G. (1997). Decline in telomerase activity as a measure of tumor cell killing by antineoplastic agents in vitro. *Clin. Cancer Res* 3, 579-585.

Feist,H., Zeidler,R., Skrebsky,T., Schmatloch,S., and Kreipe,H. (1998). Induction of telomerase activity in stimulated human lymphocytes precedes expression of topoisomerase II alpha. *Ann. Hematol.* 76, 111-115.

Feller,S.M., Posern,G., Voss,J., Kardinal,C., Sakkab,D., Zheng,J., and Knudsen,B.S. (1998). Physiological signals and oncogenesis mediated through Crk family adapter proteins. *J. Cell Physiol* 177, 535-552.

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., and . (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236-1241.

Fujiwara,M., Kamma,H., Wu,W., Hamasaki,M., Kaneko,S., Horiguchi,H., Matsui-Horiguchi,M., and Satoh,H. (2004). Expression and alternative splicing pattern of human telomerase reverse transcriptase in human lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* 24, 925-930.

Gesbert,F. and Griffin,J.D. (2000). Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood* 96, 2269-2276.

Goldman,J.M. and Druker,B.J. (2001). Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood* 98, 2039-2042.

Graham,S.M., Jorgensen,H.G., Allan,E., Pearson,C., Alcorn,M.J., Richmond,L., and Holyoake,T.L. (2002). Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99, 319-325.

Greider,C.W. (1996). Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 337-365.

Greiner,J., Ringhoffer,M., Taniguchi,M., Li,L., Schmitt,A., Shiku,H., Dohner,H., and Schmitt,M. (2004). mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int. J. Cancer* 108, 704-711.

Griffith,J.D., Comeau,L., Rosenfield,S., Stansel,R.M., Bianchi,A., Moss,H., and de Lange,T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.

Grimwade,D., Walker,H., Oliver,F., Wheatley,K., Harrison,C., Harrison,G., Rees,J., Hann,I., Stevens,R., Burnett,A., and Goldstone,A. (1998). The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92, 2322-2333.

Gunes,C., Lichtsteiner,S., Vasserot,A.P., and Englert,C. (2000). Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Res.* 60, 2116-2121.

Hahn,W.C., Counter,C.M., Lundberg,A.S., Beijersbergen,R.L., Brooks,M.W., and Weinberg,R.A. (1999a). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468.

Hahn,W.C., Stewart,S.A., Brooks,M.W., York,S.G., Eaton,E., Kurachi,A., Beijersbergen,R.L., Knoll,J.H., Meyerson,M., and Weinberg,R.A. (1999b). Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat. Med.* 5, 1164-1170.

Hande,M.P., Samper,E., Lansdorp,P., and Blasco,M.A. (1999). Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J. Cell Biol.* 144, 589-601.

Harley,C.B., Futcher,A.B., and Greider,C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.

Harley,C.B., Vaziri,H., Counter,C.M., and Allsopp,R.C. (1992). The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp. Gerontol.* 27, 375-382.

Harrington,L., Zhou,W., McPhail,T., Oulton,R., Yeung,D.S., Mar,V., Bass,M.B., and Robinson,M.O. (1997). Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev.* 11, 3109-3115.

Harris,N.L., Jaffe,E.S., Diebold,J., Flandrin,G., Muller-Hermelink,H.K., Vardiman,J., Lister,T.A., and Bloomfield,C.D. (2000). The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology* 36, 69-86.

Hayflick,L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614-636.

Hehlmann,R., Heimpel,H., Hasford,J., Kolb,H.J., Pralle,H., Hossfeld,D.K., Queisser,W., Loffler,H., Hochhaus,A., Heinze,B., and . (1994). Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* 84, 4064-4077.

Herbert,B., Pitts,A.E., Baker,S.I., Hamilton,S.E., Wright,W.E., Shay,J.W., and Corey,D.R. (1999). Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14276-14281.

Hiyama,E., Hiyama,K., Yokoyama,T., Matsuura,Y., Piatyszek,M.A., and Shay,J.W. (1995a). Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat. Med.* 1, 249-255.

Hiyama,E., Saeki,T., Hiyama,K., Takashima,S., Shay,J.W., Matsuura,Y., and Yokoyama,T. (2000). Telomerase activity as a marker of breast carcinoma in fine-needle aspirated samples. *Cancer* 90, 235-238.

Hiyama,K., Hirai,Y., Kyoizumi,S., Akiyama,M., Hiyama,E., Piatyszek,M.A., Shay,J.W., Ishioka,S., and Yamakido,M. (1995b). Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 155, 3711-3715.

Hoare,S.F., Bryce,L.A., Wisman,G.B., Burns,S., Going,J.J., van der Zee,A.G., and Keith,W.N. (2001). Lack of telomerase RNA gene hTERC expression in alternative lengthening of telomeres cells is associated with methylation of the hTERC promoter. *Cancer Res.* 61, 27-32.

Holland,P.M., Abramson,R.D., Watson,R., and Gelfand,D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 7276-7280.

Holt,S.E., Aisner,D.L., Baur,J., Tesmer,V.M., Dy,M., Ouellette,M., Trager,J.B., Morin,G.B., Toft,D.O., Shay,J.W., Wright,W.E., and White,M.A. (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* 13, 817-826.

Hurley,L.H., Wheelhouse,R.T., Sun,D., Kerwin,S.M., Salazar,M., Fedoroff,O.Y., Han,F.X., Han,H., Izbicka,E., and Von Hoff,D.D. (2000). G-quadruplexes as targets for drug design. *Pharmacol. Ther.* 85, 141-158.

Ibanez,d.C., I, Frolova,N., Varkonyi,R.J., Dulaimi,E., Meropol,N.J., Broccoli,D., and Cairns,P. (2004). Telomerase is frequently activated in tumors with microsatellite instability. *Cancer Biol. Ther.* 3, 289-292.

Ishii,Y., Tsuyama,N., Maeda,S., Tahara,H., and Ide,T. (1999). Telomerase activity in hybrids between telomerase-negative and telomerase-positive immortal human cells is repressed in the different complementation groups but

not in the same complementation group of immortality. *Mech. Ageing Dev.* 110, 175-193.

Iwama,H., Ohyashiki,K., Ohyashiki,J.H., Hayashi,S., Kawakubo,K., Shay,J.W., and Toyama,K. (1997). The relationship between telomere length and therapy-associated cytogenetic responses in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer* 79, 1552-1560.

Jahns-Streubel,G., Braess,J., Schoch,C., Fonatsch,C., Haase,D., Binder,C., Wormann,B., Buchner,T., and Hiddemann,W. (2001). Cytogenetic subgroups in acute myeloid leukemia differ in proliferative activity and response to GM-CSF. *Leukemia* 15, 377-384.

Jamieson,C.H., Weissman,I.L., and Passegue,E. (2004). Chronic versus acute myelogenous leukemia: a question of self-renewal. *Cancer Cell* 6, 531-533.

Johansson,B., Mertens,F., and Mitelman,F. (1994). Secondary chromosomal abnormalities in acute leukemias. *Leukemia* 8, 953-962.

Takeji,Y., Maehara,Y., Koga,T., Shibahara,K., Kabashima,A., Tokunaga,E., and Sugimachi,K. (2001). Gastric cancer with high telomerase activity shows rapid development and invasiveness. *Oncol. Rep.* 8, 107-110.

Kang,S.S., Kwon,T., Kwon,D.Y., and Do,S.I. (1999). Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J. Biol. Chem.* 274, 13085-13090.

Kantarjian,H., Sawyers,C., Hochhaus,A., Guilhot,F., Schiffer,C., Gambacorti-Passerini,C., Niederwieser,D., Resta,D., Capdeville,R., Zoellner,U., Talpaz,M., Druker,B., Goldman,J., O'Brien,S.G., Russell,N., Fischer,T., Ottmann,O., Cony-Makhoul,P., Facon,T., Stone,R., Miller,C., Tallman,M., Brown,R., Schuster,M., Loughran,T., Gratwohl,A., Mandelli,F., Saglio,G., Lazzarino,M., Russo,D., Baccarani,M., and Morra,E. (2002). Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 346, 645-652.

Karlseder,J., Smogorzewska,A., and de Lange,T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 295, 2446-2449.

Kass-Eisler,A. and Greider,C.W. (2000). Recombination in telomere-length maintenance. *Trends Biochem. Sci.* 25, 200-204.

Kharbanda,S., Kumar,V., Dhar,S., Pandey,P., Chen,C., Majumder,P., Yuan,Z.M., Whang,Y., Strauss,W., Pandita,T.K., Weaver,D., and Kufe,D.

(2000). Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase. *Curr. Biol.* 10, 568-575.

Kharbanda,S., Pandey,P., Jin,S., Inoue,S., Bharti,A., Yuan,Z.M., Weichselbaum,R., Weaver,D., and Kufe,D. (1997). Functional interaction between DNA-PK and c-Abl in response to DNA damage. *Nature* 386, 732-735.

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,S.H., Kaminker,P., and Campisi,J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat. Genet.* 23, 405-412.

Kipling,D. and Cooke,H.J. (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347, 400-402.

Koga,S., Hirohata,S., Kondo,Y., Komata,T., Takakura,M., Inoue,M., Kyo,S., and Kondo,S. (2001). FADD gene therapy using the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter to restrict induction of apoptosis to tumors in vitro and in vivo. *Anticancer Res.* 21, 1937-1943.

Kondo,S., Tanaka,Y., Kondo,Y., Hitomi,M., Barnett,G.H., Ishizaka,Y., Liu,J., Haqqi,T., Nishiyama,A., Villeponteau,B., Cowell,J.K., and Barna,B.P. (1998). Antisense telomerase treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation. *FASEB J* 12, 801-811.

Kondo,Y., Koga,S., Komata,T., and Kondo,S. (2000). Treatment of prostate cancer in vitro and in vivo with 2-5A-anti- telomerase RNA component. *Oncogene* 19, 2205-2211.

Kondo,Y., Komata,T., and Kondo,S. (2001). Combination therapy of 2-5A antisense against telomerase RNA and cisplatin for malignant gliomas. *Int. J. Oncol.* 18, 1287-1292.

Krams,M., Claviez,A., Heidorn,K., Krupp,G., Parwaresch,R., Harms,D., and Rudolph,P. (2001). Regulation of telomerase activity by alternate splicing of

human telomerase reverse transcriptase mRNA in a subset of neuroblastomas. *Am. J. Pathol.* 159, 1925-1932.

Ku,W.C., Cheng,A.J., and Wang,T.C. (1997). Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 730-736.

Kushner,D.M., Paranjape,J.M., Bandyopadhyay,B., Cramer,H., Leaman,D.W., Kennedy,A.W., Silverman,R.H., and Cowell,J.K. (2000). 2-5A antisense directed against telomerase RNA produces apoptosis in ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 76, 183-192.

Kyo,S., Takakura,M., Kanaya,T., Zhuo,W., Fujimoto,K., Nishio,Y., Orimo,A., and Inoue,M. (1999). Estrogen Activates Telomerase. *Cancer Res* 59, 5917-5921.

Lai,C.K., Mitchell,J.R., and Collins,K. (2001). RNA binding domain of telomerase reverse transcriptase. *Mol. Cell Biol.* 21, 990-1000.

Langford,L.A., Piatyszek,M.A., Xu,R., Schold,S.C., Jr., and Shay,J.W. (1995). Telomerase activity in human brain tumours. *Lancet* 346, 1267-1268.

Lansdorp,P.M. (1996). Close encounters of the PNA kind. *Nat. Biotechnol.* 14, 1653.

Lansdorp,P.M., Verwoerd,N.P., van de Rijke,F.M., Dragowska,V., Little,M.T., Dirks,R.W., Raap,A.K., and Tanke,H.J. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* 5, 685-691.

Lawlor,M.A. and Alessi,D.R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.* 114, 2903-2910.

Lee,H.W., Blasco,M.A., Gottlieb,G.J., Horner,J.W., Greider,C.W., and DePinho,R.A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392, 569-574.

Lee,L.G., Connell,C.R., and Bloch,W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21, 3761-3766.

Lee,S.J. (2000). Chronic myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol.* 111, 993-1009.

Levy,M.Z., Allsopp,R.C., Futcher,A.B., Greider,C.W., and Harley,C.B. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* 225, 951-960.

Li,B., Oestreich,S., and de Lange,T. (2000a). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* 101, 471-483.

Li,B., Yang,J., Andrews,C., Chen,Y.X., Toofanfard,P., Huang,R.W., Horvath,E., Chopra,H., Raza,A., and Preisler,H.D. (2000b). Telomerase activity in preleukemia and acute myelogenous leukemia. *Leuk. Lymphoma* 36, 579-587.

Li,H., Zhao,L.L., Funder,J.W., and Liu,J.P. (1997). Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 272, 16729-16732.

Li,Y., Wu,J., Wang,L., Chen,F., and Hu,L. (2004). Detection of telomerase activity and the expression of telomerase subunits in the patients with acute myelogenous leukaemia. *J Huazhong. Univ Sci. Technol. Med Sci.* 24, 48-51.

Lin,Z., Lim,S., Viani,M.A., Sapp,M., and Lim,M.S. (2001). Down-regulation of telomerase activity in malignant lymphomas by radiation and chemotherapeutic agents. *Am. J Pathol.* 159, 711-719.

Liu,K., Hodes,R.J., and Weng,N. (2001). Cutting edge: telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation. *J. Immunol.* 166, 4826-4830.

Liu,K., Schoonmaker,M.M., Levine,B.L., June,C.H., Hodes,R.J., and Weng,N.P. (1999). Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 5147-5152.

Lowenberg,B., Downing,J.R., and Burnett,A. (1999). Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 341, 1051-1062.

Lowenberg,B., van Putten,W.L., Touw,I.P., Delwel,R., and Santini,V. (1993). Autonomous proliferation of leukemic cells in vitro as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med* 328, 614-619.

Lozzio,C.B. and Lozzio,B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334.

Ludwig,A., Saretzki,G., Holm,P.S., Tiemann,F., Lorenz,M., Emrich,T., Harley,C.B., and von Zglinicki,T. (2001). Ribozyme cleavage of telomerase mRNA sensitizes breast epithelial cells to inhibitors of topoisomerase. *Cancer Res.* 61, 3053-3061.

Martens,U.M., Zijlmans,J.M., Poon,S.S., Dragowska,W., Yui,J., Chavez,E.A., Ward,R.K., and Lansdorp,P.M. (1998). Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat. Genet.* *18*, 76-80.

Mata,J.E., Joshi,S.S., Palen,B., Pirruccello,S.J., Jackson,J.D., Elias,N., Page,T.J., Medlin,K.L., and Iversen,P.L. (1997). A hexameric phosphorothioate oligonucleotide telomerase inhibitor arrests growth of Burkitt's lymphoma cells in vitro and in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *144*, 189-197.

Melo,J.V. (1996). The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* *10*, 751-756.

Merlo,A., Herman,J.G., Mao,L., Lee,D.J., Gabrielson,E., Burger,P.C., Baylin,S.B., and Sidransky,D. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med* *1*, 686-692.

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., Bacchetti,S., Haber,D.A., and Weinberg,R.A. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* *90*, 785-795.

Mitchell,J.R., Wood,E., and Collins,K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* *402*, 551-555.

Morales,C.P., Holt,S.E., Ouellette,M., Kaur,K.J., Yan,Y., Wilson,K.S., White,M.A., Wright,W.E., and Shay,J.W. (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat. Genet.* *21*, 115-118.

Morin,G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* *59*, 521-529.

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.

Mrozek,K., Heinonen,K., and Bloomfield,C.D. (2001). Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* *14*, 19-47.

Murnane, J.P., Sabatier, L., Marder, B.A., and Morgan, W.F. (1994). Telomere dynamics in an immortal human cell line. *EMBO J.* *13*, 4953-4962.

Nair, S.K., Heiser, A., Boczkowski, D., Majumdar, A., Naoe, M., Lebkowski, J.S., Vieweg, J., and Gilboa, E. (2000). Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat. Med.* *6*, 1011-1017.

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*, 703-716.

Nettelbeck, D.M., Jerome, V., and Muller, R. (2000). Gene therapy: designer promoters for tumour targeting. *Trends Genet.* *16*, 174-181.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., and Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* *139*, 271-279.

Nielsen, P.E., Egholm, M., and Buchardt, O. (1994). Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconjug. Chem.* *5*, 3-7.

Nishimoto, A., Miura, N., Horikawa, I., Kugoh, H., Murakami, Y., Hirohashi, S., Kawasaki, H., Gazdar, A.F., Shay, J.W., Barrett, J.C., and Oshimura, M. (2001). Functional evidence for a telomerase repressor gene on human chromosome 10p15.1. *Oncogene* *20*, 828-835.

Norton, J.C., Piatyszek, M.A., Wright, W.E., Shay, J.W., and Corey, D.R. (1996). Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nat. Biotechnol.* *14*, 615-619.

Oexle, K. (1998). Telomere length distribution and Southern blot analysis. *J. Theor. Biol.* *190*, 369-377.

Ohyashiki, J.H., Ohyashiki, K., Fujimura, T., Kawakubo, K., Shimamoto, T., Iwabuchi, A., and Toyama, K. (1994). Telomere shortening associated with disease evolution patterns in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res.* *54*, 3557-3560.

Ohyashiki, J.H., Ohyashiki, K., Iwama, H., Hayashi, S., Toyama, K., and Shay, J.W. (1997a). Clinical implications of telomerase activity levels in acute leukemia. *Clin. Cancer Res.* *3*, 619-625.

Ohyashiki,J.H., Sashida,G., Tauchi,T., and Ohyashiki,K. (2002). Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene* 21, 680-687.

Ohyashiki,K., Iwama,H., Yahata,N., Tauchi,T., Kawakubo,K., Shimamoto,T., and Ohyashiki,J.H. (2001). Telomere dynamics in myelodysplastic syndromes and acute leukemic transformation. *Leuk. Lymphoma* 42, 291-299.

Ohyashiki,K., Ohyashiki,J.H., Iwama,H., Hayashi,S., Shay,J.W., and Toyama,K. (1997b). Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression. *Leukemia* 11, 190-194.

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.

Oshimura,M. and Barrett,J.C. (1997). Multiple pathways to cellular senescence: role of telomerase repressors. *Eur. J. Cancer* 33, 710-715.

Pascolo,E., Wenz,C., Lingner,J., Huel,N., Priepke,H., Kauffmann,I., Garin-Chesa,P., Rettig,W.J., Damm,K., and Schnapp,A. (2002). Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *J Biol. Chem.* 277, 15566-15572.

Pegoraro,L., Matera,L., Ritz,J., Levis,A., Palumbo,A., and Biagini,G. (1983). Establishment of a Ph1-positive human cell line (BV173). *J. Natl. Cancer Inst.* 70, 447-453.

Pendergast,A.M., Quilliam,L.A., Cripe,L.D., Bassing,C.H., Dai,Z., Li,N., Batzer,A., Rabun,K.M., Der,C.J., Schlessinger,J., and . (1993). BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75, 175-185.

Perrem,K., Bryan,T.M., Englezou,A., Hackl,T., Moy,E.L., and Reddel,R.R. (1999). Repression of an alternative mechanism for lengthening of telomeres in somatic cell hybrids. *Oncogene* 18, 3383-3390.

Poole,J.C., Andrews,L.G., and Tollefsbol,T.O. (2001). Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 269, 1-12.

Poon,S.S. and Lansdorp,P.M. (2001). Measurements of telomere length on individual chromosomes by image cytometry. *Methods Cell Biol.* 64, 69-96.

Poon,S.S., Martens,U.M., Ward,R.K., and Lansdorp,P.M. (1999). Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36, 267-278.

Reddel,R.R. (2003). Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer Lett.* 194, 155-162.

Rhodes,J., York,R.D., Tara,D., Tajinda,K., and Druker,B.J. (2000). CrkL functions as a nuclear adaptor and transcriptional activator in Bcr-Abl-expressing cells. *Exp. Hematol.* 28, 305-310.

Rigolin,G.M., Porta,M.D., Bugli,A.M., Castagnari,B., Mauro,E., Bragotti,L.Z., Ciccone,M., Cuneo,A., and Castoldi,G. (2004). Flow cytometric detection of accelerated telomere shortening in myelodysplastic syndromes: correlations with aetiological and clinical-biological findings. *Eur. J Haematol.* 73, 351-358.

Rudolph,K.L., Chang,S., Lee,H.W., Blasco,M., Gottlieb,G.J., Greider,C., and DePinho,R.A. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96, 701-712.

Rufer,N., Brummendorf,T.H., Kolvraa,S., Bischoff,C., Christensen,K., Wadsworth,L., Schulzer,M., and Lansdorp,P.M. (1999). Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J. Exp. Med.* 190, 157-167.

Rufer,N., Dragowska,W., Thornbury,G., Roosnek,E., and Lansdorp,P.M. (1998). Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat. Biotechnol.* 16, 743-747.

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.

Sawyers,C.L. (1992). The bcr-abl gene in chronic myelogenous leukaemia. *Cancer Surv.* 15, 37-51.

Sawyers,C.L. (1993). The role of myc in transformation by BCR-ABL. *Leuk. Lymphoma* 11 *Suppl* 1, 45-46.

Sawyers,C.L. (1999). Chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med* 340, 1330-1340.

Sawyers,C.L., Callahan,W., and Witte,O.N. (1992). Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell* 70, 901-910.

Sawyers,C.L., Hochhaus,A., Feldman,E., Goldman,J.M., Miller,C.B., Ottmann,O.G., Schiffer,C.A., Talpaz,M., Guilhot,F., Deininger,M.W., Fischer,T., O'Brien,S.G., Stone,R.M., Gambacorti-Passerini,C.B., Russell,N.H., Reiffers,J.J., Shea,T.C., Chapuis,B., Coutre,S., Tura,S., Morra,E., Larson,R.A., Saven,A., Peschel,C., Gratwohl,A., Mandelli,F., Ben Am,M., Gathmann,I., Capdeville,R., Paquette,R.L., and Druker,B.J. (2002). Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99, 3530-3539.

Sawyers,C.L., McLaughlin,J., Goga,A., Havlik,M., and Witte,O. (1994). The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 77, 121-131.

Sawyers,C.L., McLaughlin,J., and Witte,O.N. (1995). Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J. Exp. Med.* 181, 307-313.

Schaich,M., Ritter,M., Illmer,T., Liske,P., Thiede,C., Schakel,U., Mohr,B., Ehninger,G., and Neubauer,A. (2001). Mutations in ras proto-oncogenes are associated with lower *mdr1* gene expression in adult acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 112, 300-307.

Schmitt,C.A. (2003). Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 286-295.

Schoch,C. and Haferlach,T. (2002). Cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Curr. Oncol. Rep.* 4, 390-397.

Schwartz,H.S., Juliao,S.F., Sciadini,M.F., Miller,L.K., and Butler,M.G. (1995). Telomerase activity and oncogenesis in giant cell tumor of bone. *Cancer* 75, 1094-1099.

Seol,J.G., Kim,E.S., Park,W.H., Jung,C.W., Kim,B.K., and Lee,Y.Y. (1998). Telomerase activity in acute myelogenous leukaemia: clinical and biological implications. *Br. J. Haematol.* 100, 156-165.

Shah,N.P. and Sawyers,C.L. (2003). Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* 22, 7389-7395.

Shammas,M.A., Simmons,C.G., Corey,D.R., and Shmookler Reis,R.J. (1999). Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses 'immortality' of transformed human cells. *Oncogene* 18, 6191-6200.

Sharma,H.W., Sokoloski,J.A., Perez,J.R., Maltese,J.Y., Sartorelli,A.C., Stein,C.A., Nichols,G., Khaled,Z., Telang,N.T., and Narayanan,R. (1995). Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 12343-12346.

Shay,J.W. (1997). Telomerase in human development and cancer. *J. Cell Physiol* 173, 266-270.

Shay,J.W. and Bacchetti,S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* 33, 787-791.

Sieglova,Z., Zilovcova,S., Cermak,J., Rihova,H., Brezinova,D., Dvorakova,R., Markova,M., Maaloufova,J., Sajdova,J., Brezinova,J., Zemanova,Z., and Michalova,K. (2004). Dynamics of telomere erosion and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis? *Leuk. Res.* 28, 1013-1021.

Skorski,T., Kanakaraj,P., Nieborowska-Skorska,M., Ratajczak,M.Z., Wen,S.C., Zou,G., Gewirtz,A.M., Perussia,B., and Calabretta,B. (1995). Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 86, 726-736.

Slovak,M.L., Kopecky,K.J., Cassileth,P.A., Harrington,D.H., Theil,K.S., Mohamed,A., Paietta,E., Willman,C.L., Head,D.R., Rowe,J.M., Forman,S.J., and Appelbaum,F.R. (2000). Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96, 4075-4083.

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., van Steensel,B., Bianchi,A., Oelmann,S., Schaefer,M.R., Schnapp,G., and de Lange,T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell Biol.* 20, 1659-1668.

Sommerfeld,H.J., Meeker,A.K., Piatyszek,M.A., Bova,G.S., Shay,J.W., and Coffey,D.S. (1996). Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res.* 56, 218-222.

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., and Weinberg,R.A. (2002). Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 12606-12611.

Strahl,C. and Blackburn,E.H. (1996). Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol. Cell Biol.* 16, 53-65.

Suzuki,T., Kiyoi,H., Ozeki,K., Tomita,A., Yamaji,S., Suzuki,R., Koderu,R., Miyawaki,S., Asou,N., Kuriyama,K., Yagasaki,F., Shimazaki,C., Akiyama,H., Nishimura,M., Motoji,T., Shinagawa,K., Takeshita,A., Ueda,R., Kinoshita,T., Emi,N., Naoe,T. (2005). Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, Epub ahead of print.

Takauchi,K., Tashiro,S., Ohtaki,M., and Kamada,N. (1994). Telomere reduction of specific chromosome translocation in acute myelocytic leukemia. *Jpn. J. Cancer Res.* 85, 127-130.

Talpaz,M., Silver,R.T., Druker,B.J., Goldman,J.M., Gambacorti-Passerini,C., Guilhot,F., Schiffer,C.A., Fischer,T., Deininger,M.W., Lennard,A.L., Hochhaus,A., Ottmann,O.G., Gratwohl,A., Baccarani,M., Stone,R., Tura,S., Mahon,F.X., Fernandes-Reese,S., Gathmann,I., Capdeville,R., Kantarjian,H.M., and Sawyers,C.L. (2002). Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* 99, 1928-1937.

Tanaka,H., Shimizu,M., Horikawa,I., Kugoh,H., Yokota,J., Barrett,J.C., and Oshimura,M. (1998). Evidence for a putative telomerase repressor gene in the 3p14.2-p21.1 region. *Genes Chromosomes. Cancer* 23, 123-133.

Tauchi,T., Nakajima,A., Sashida,G., Shimamoto,T., Ohyashiki,J.H., Abe,K., Yamamoto,K., and Ohyashiki,K. (2002). Inhibition of human telomerase enhances the effect of the tyrosine kinase inhibitor, imatinib, in BCR-ABL-positive leukemia cells. *Clin. Cancer Res.* 8, 3341-3347.

Tauchi,T., Shin-Ya,K., Sashida,G., Sumi,M., Nakajima,A., Shimamoto,T., Ohyashiki,J.H., and Ohyashiki,K. (2003). Activity of a novel G-quadruplex-interactive telomerase inhibitor, telomestatin (SOT-095), against human leukemia cells: involvement of ATM-dependent DNA damage response pathways. *Oncogene* 22, 5338-5347.

Thiede,C., Steudel,C., Mohr,B., Schaich,M., Schakel,U., Platzbecker,U., Wermke,M., Bornhauser,M., Ritter,M., Neubauer,A., Ehninger,G., and Illmer,T.

(2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99, 4326-4335.

Tommerup,H., Dousmanis,A., and de Lange,T. (1994). Unusual chromatin in human telomeres. *Mol. Cell Biol.* 14, 5777-5785.

Udomsakdi-Auewarakul,C., Pratyay,Y., Boonmoh,S., and Vatanavicharn,S. (2000). Detection of molecular variants of BCR-ABL gene in bone marrow and blood of patients with chronic myeloid leukemia by reverse- transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *J. Med. Assoc. Thai.* 83, 928-935.

Ulaner,G.A., Hu,J.F., Vu,T.H., Giudice,L.C., and Hoffman,A.R. (1998). Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res.* 58, 4168-4172.

Ulaner,G.A., Hu,J.F., Vu,T.H., Oruganti,H., Giudice,L.C., and Hoffman,A.R. (2000). Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *Int. J. Cancer* 85, 330-335.

Valk,P.J.M., Verhaak,R.G.W., Beijen,M.A., Erpelinck,C.A.J., van Doorn-Khosrovani,S.B.v.W., Boer,J.M., Beverloo,H.B., Moorhouse,M.J., van der Spek,P.J., Lowenberg,B., and Delwel,R. (2004). Prognostically Useful Gene-Expression Profiles in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 350, 1617-1628.

van der Kuip,.H., Goetz,A.W., Miething,C., Duyster,J., and Aulitzky,W.E. (2001). Adhesion to fibronectin selectively protects Bcr-Abl+ cells from DNA damage-induced apoptosis. *Blood* 98, 1532-1541.

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., and de Lange,T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.

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.

Vaziri,H., Dragowska,W., Allsopp,R.C., Thomas,T.E., Harley,C.B., and Lansdorp,P.M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic

stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 9857-9860.

Vaziri,H., Squire,J.A., Pandita,T.K., Bradley,G., Kuba,R.M., Zhang,H., Gulyas,S., Hill,R.P., Nolan,G.P., and Benchimol,S. (1999). Analysis of genomic integrity and p53-dependent G1 checkpoint in telomerase-induced extended-life-span human fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 19, 2373-2379.

Veldman,T., Horikawa,I., Barrett,J.C., and Schlegel,R. (2001). Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J. Virol.* 75, 4467-4472.

Verstovsek,S., Manshour,T., Smith,F.O., Giles,F.J., Cortes,J., Estey,E., Kantarjian,H., Keating,M., Jeha,S., and Albitar,M. (2003). Telomerase activity is prognostic in pediatric patients with acute myeloid leukemia: comparison with adult acute myeloid leukemia. *Cancer* 97, 2212-2217.

Vigneri,P. and Wang,J.Y. (2001). Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat. Med.* 7, 228-234.

von Zglinicki,T., Saretzki,G., Docke,W., and Lotze,C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* 220, 186-193.

Wan,M.S., Fell,P.L., and Akhtar,S. (1998). Synthetic 2'-O-methyl-modified hammerhead ribozymes targeted to the RNA component of telomerase as sequence-specific inhibitors of telomerase activity. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8, 309-317.

Wang,J., Xie,L.Y., Allan,S., Beach,D., and Hannon,G.J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev.* 12, 1769-1774.

Watson,J.D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.* 239, 197-201.

Weller,T.H. and Coons,A.H. (1954). Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86, 789-794.

White,L.K., Wright,W.E., and Shay,J.W. (2001). Telomerase inhibitors. *Trends Biotechnol.* 19, 114-120.

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.

Wong,S. and Witte,O.N. (2001). Modeling Philadelphia chromosome positive leukemias. *Oncogene* 20, 5644-5659.

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.

Wu,G., Jiang,X., Lee,W.H., and Chen,P.L. (2003). Assembly of functional ALT-associated promyelocytic leukemia bodies requires Nijmegen Breakage Syndrome 1. *Cancer Res.* 63, 2589-2595.

Xu,D., Gruber,A., Bjorkholm,M., Peterson,C., and Pisa,P. (1999). Suppression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in differentiated HL-60 cells: regulatory mechanisms. *Br. J Cancer* 80, 1156-1161.

Xu,D., Gruber,A., Peterson,C., and Pisa,P. (1998). Telomerase activity and the expression of telomerase components in acute myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol.* 102, 1367-1375.

Xu,D., Wang,Q., Gruber,A., Bjorkholm,M., Chen,Z., Zaid,A., Selivanova,G., Peterson,C., Wiman,K.G., and Pisa,P. (2000). Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 19, 5123-5133.

Yamada,O., Oshimi,K., Motoji,T., and Mizoguchi,H. (1995). Telomeric DNA in normal and leukemic blood cells. *J. Clin. Invest* 95, 1117-1123.

Yamada,O., Takanashi,M., Ujihara,M., and Mizoguchi,H. (1998). Down-regulation of telomerase activity is an early event of cellular differentiation without apparent telomeric DNA change. *Leuk. Res* 22, 711-717.

Yang,Y., Chen,Y., Zhang,C., Huang,H., and Weissman,S.M. (2002). Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function. *Exp. Cell Res.* 277, 201-209.

Yeager,T.R., Neumann,A.A., Englezou,A., Huschtscha,L.I., Noble,J.R., and Reddel,R.R. (1999). Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.* 59, 4175-4179.

Yi,X., Shay,J.W., and Wright,W.E. (2001). Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. *Nucleic Acids Res.* 29, 4818-4825.

Yi,X., White,D.M., Aisner,D.L., Baur,J.A., Wright,W.E., and Shay,J.W. (2000). An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity. *Neoplasia.* 2, 433-440.

Yokoyama,Y., Takahashi,Y., Shinohara,A., Wan,X., Takahashi,S., Niwa,K., and Tamaya,T. (2000). The 5'-end of hTERT mRNA is a good target for hammerhead ribozyme to suppress telomerase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 316-321.

Yui,J., Chiu,C.P., and Lansdorp,P.M. (1998). Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood* 91, 3255-3262.

Zaffaroni,N., Della,P.C., Villa,R., Botti,C., Buglioni,S., Mottolese,M., and Grazia,D.M. (2002). Transcription and alternative splicing of telomerase reverse transcriptase in benign and malignant breast tumours and in adjacent mammary glandular tissues: implications for telomerase activity. *J. Pathol.* 198, 37-46.

Zakian,V.A. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 270, 1601-1607.

Zhang,W., Piatyszek,M.A., Kobayashi,T., Estey,E., Andreeff,M., Deisseroth,A.B., Wright,W.E., and Shay,J.W. (1996). Telomerase activity in human acute myelogenous leukemia: inhibition of telomerase activity by differentiation-inducing agents. *Clin. Cancer Res.* 2, 799-803.

Zhu,L., Smith,S., de Lange,T., and Seldin,M.F. (1999). Chromosomal mapping of the tankyrase gene in human and mouse. *Genomics* 57, 320-321.

Eigene Veröffentlichungen

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden / werden veröffentlicht in:

1. Originalarbeiten

Brümmendorf T.H., Ersöz I., Hartmann U., Bartolovic K., Balabanov S., Wahl A., Paschka P., Kreil S., Lahaye T., Berger U., Gschaidmeier H., Bokemeyer C., Hehlmann R., Dietz K., Lansdorp P.M., Kanz L. and Hochhaus A. (2003). Telomere length in peripheral blood cells reflects response to treatment with Imatinib in patients with chronic myeloid leukemia (Research letter) *Blood* 101, 375-376

Brümmendorf T.H., Ersöz I., Hartmann U., Balabanov S., Wolke H., Paschka P., Lahaye T., Berner B., Bartolovic K., Kreil S., Berger U., Gschaidmeier H., Bokemeyer C., Hehlmann R., Dietz K., Lansdorp P.M., Kanz L. and Hochhaus A. (2003). Normalisation of previously shortened telomere length under treatment with imatinib argues against a preexisting telomere length deficit in normal hematopoietic stem cells from patients with chronic myeloid leukaemia. *Ann N Y Acad Sci.* 996:26-38

Hartmann U., Balabanov S., Ziegler P., Fellenberg J., van der Kuip H., Duyster J., Lipp H.P., Kanz L., Bokemeyer C. and Brümmendorf T.H. (2005). Telomere length and telomerase activity is not impaired by treatment with imatinib in the BCR-ABL transformed murine pro-B cell line BaF3; *Exp. Hematology* 33, 542-549

Hartmann U., Brümmendorf T.H., Balabanov S., Thiede C., Illmer T., and Schaich M. for the SHG AML 96 study group (2005). Telomere length in patients with acute myeloid leukemia correlates with karyotypic instability. *Haematologica* 90, 307-316

2. Abstracts

Brümmendorf T.H., Ersöz I., Hartmann U., Wahl A., Paschka P., Kreil S., Lahaye T., Berger U., Gschaidmaier H., Bokemeyer C., Lansdorp P.M., Hehlmann R., Kanz L. and Hochhaus A. (2001). Telomere Length in Peripheral Blood Granulocytes Correlates with Response to Treatment with STI571
Vortrag: Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), Mannheim; Onkologie 24 (Sonderheft 6) [Abstract 720]

Brümmendorf T.H., Ersöz I., Hartmann U., Wahl A., Paschka P., Kreil S., Lahaye T., Berger U., Gschaidmaier H., Bokemeyer C., Lansdorp P.M.,

Hehlmann R., Kanz L. and Hochhaus A. (2001). Telomere Length in Peripheral Blood Granulocytes Correlates with Response to Treatment with STI571
Poster: 43th Annual Meeting American Society of Hematology (ASH), Orlando, USA [Abstract 2592]

Hartmann U., Ersöz I., Wahl A., Wolke H., Berner B., Bartolovic K., Lipp H.-P., Bokemeyer C., Kanz L., Hehlmann R., Hochhaus A., Lansdorp P. M. and Brümmendorf T. H. (2001). Telomerbiologische Untersuchungen an Patienten mit Chronischer Myeloischer Leukämie (CML): Prognostische Implikationen und neue Therapieansätze
Poster: 2. Forum Pharmazeutische Onkologie Deutschland, Österreich und Schweiz (PODOS), Aarau, Schweiz

Brümmendorf T.H., Ersöz I., Hartmann U., Wahl A., Paschka P., Kreil S., Lahaye T., Berger U., Gschaidmaier H., Bokemeyer C., Lansdorp P.M., Hehlmann R., Kanz L. and Hochhaus A. (2002) Telomere Length in Peripheral Blood Granulocytes Reflects Response to Treatment with STI571
Vortrag: 31th Annual Meeting International Society for Experimental Hematology (ISEH), Montreal, Kanada; Exp. Hematol. 30:61001 [Abstract 178]

Hartmann U., Balabanov S., van der Kuip H., Duyster J., Lipp H.-P., Bokemeyer C., Kanz L. and Brümmendorf T.H. (2003). Telomere length and telomerase activity is not impaired by treatment with imatinib in the BCR-ABL transformed murine pro-B cell line
Poster: Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), Basel; Onkologie 26 (Suppl.5) [Abstract P639]

Hartmann U., Brümmendorf T.H., Balabanov S., Illmer T., Soucek S., Kanz L., Ehninger G. and Schaich M. (2003). Telomere length in patients with acute myeloid leukemia correlates with karyotypic instability
Poster: 45th Annual Meeting American Society of Hematology (ASH), San Diego, USA [Abstract 3229]

Hartmann U.*, Brümmendorf T.H.*, Balabanov S., Illmer T., Schaich M. for the SHG AML 96 study group (2004). Telomere Length and hTERT Expression Correlate with Karyotypic Instability in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML)
Vortrag: Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), Innsbruck; Onkologie; 27 (Suppl.3) [Abstract O 130]

Weitere Veröffentlichungen

1. Originalarbeiten

Scheding S., Ersöz I., Hartmann U., Wahl A., Bartolovic K., Balabanov S., Salama A., Kanz L., and Brümmendorf T.H. (2003) Peripheral Blood Telomere Length Measurements indicate that Hematopoetic Stem Cell Turnover is not Significantly Increased in Whole Blood and Apheresis Platelet Donors. *Transfusion* 43, 1089-95

Bartolovic K., Balabanov S., Hartmann U., Komor M., Boehmler A.M., Buehring H.J., Moehle R., Hoelzer D., Kanz L., Hofmann W.K., Brümmendorf T.H. (2004). Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells in vitro. *Blood*. 103, 523-9.

Appel S., Boehmler A.M., Grünebach F., Muller M.R., Rupf A., Weck M.M., Hartmann U., Reichardt V.L., Kanz L., Brümmendorf T.H. and Brossart P. (2004). Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood* 103, 538-44.

Beier F., Balabanov S., Buckley T., Dietz K., Hartmann U., Rojewski M., Kanz L., Schrezenmeier H. and Brummendorf T.H. (2005). Accelerated telomere shortening in glycosylphosphatidylinositol (GPI)-negative as compared to GPI-positive granulocytes from patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) detected by Proaerolysin Flow-Fish. *Blood in press*

2. Reviews

Hartmann U., Brümmendorf T.H. (2003) Telomerase-Hemmstoffe: Ein neuer Ansatz für die Behandlung maligner Tumoren. *Arzneimitteltherapie* 21, 176-85

Hartmann U., Beier F. and Brümmendorf T.H. (2004). Telomere length measurement - approach and perspective. *Journal of Laboratory Medicine / LaboratoriumsMedizin* 28, 307-316

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Carsten Bokemeyer und Herrn Dr. Tim Brümmendorf für die Überlassung des interessanten und abwechslungsreichen Themas, sowie für die wissenschaftliche Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Lutz Heide danke ich für sein Interesse und die Bereitschaft, die Betreuung der Arbeit von Seiten der Pharmazeutischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu übernehmen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. Tim Brümmendorf danke ich außerdem für die außergewöhnlich engagierte Betreuung, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die jederzeit gewährte Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. L. Kanz danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in der Abteilung II, Hämatologie und Onkologie, der Universitätsklinik durchführen zu können.

Bei Herrn Dr. Hans-Peter Lipp möchte ich für die Gelegenheit diese Dissertation neben der Arbeit in der Universitäts-Apotheke anzufertigen ganz herzlich bedanken.

Ebenso danke ich den Mitarbeiter/innen der Universitäts-Apotheke und ganz besonders dem Team des Onkologie-Service Kinderklinik für die Unterstützung während der Doktorarbeit.

Bei Frau Alexandra Wahl, Frau Bettina Kirchner und Frau Iris Schäfer möchte ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft herzlich bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe für die sehr gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und das hervorragende Arbeitsklima.

Bei Herrn Dr. Patrick Ziegler und Herrn Dr. Dr. Stefan Balabanov möchte ich mich darüber hinaus für das hilfreiche Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Ich danke Herrn PD Dr. M. Schaich von der Universitätsklinik in Dresden für die Überlassung des Probenmaterials und die gute Zusammenarbeit im Rahmen des AML-Projekts.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. A. Hochhaus von der Universitätsklinik in Mannheim für das Probenmaterial im Rahmen des CML-Projekts.

Die Zelllinien BaF3 und BaF3p185 wurden mir freundlicherweise von Dr. J. Duyster, TU München, zur Verfügung gestellt. Dafür bedanke ich mich herzlich.

Der Firma Novartis GmbH, Basel danke ich für die freundliche Überlassung des Arzneistoffes Imatinibmesylat; Glivec[®] und der Firma Böhringer Ingelheim, Biberach für den Telomerase-Inhibitor BIBR1532

Frau Beate Braun und Herrn Andreas Hirneth danke ich für die mir entgegen gebrachte Hilfe bei der Lösung kleinerer und größerer Computerprobleme.

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die ich hier nicht erwähnen konnte, die mir aber in den letzten Jahren nicht nur fachlich zur Seite standen, sondern auch für ein angenehmes Umfeld sorgten.

Ein besonderer Dank geht auch an meinen Bruder Andreas und allen Freunden für die große Unterstützung, die einen nicht unwesentlichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern, die mir die Ausbildung und die Doktorarbeit ermöglicht haben und mich dabei so liebevoll begleitet und unterstützt haben.

Akademische Lehrer

Ich danke meinen akademischen Lehrerinnen und Lehrern

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon

Frau Prof. Dr. G. Drews

Herrn Prof. Dr. L. Heide

Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar

Herrn Prof. Dr. E. Reinhard

Herrn Prof. Dr. H. J. Roth

Herrn Prof. Dr. P.C Schmidt

Herrn Prof. Dr. J.E. Schultz

Herrn Prof. Dr. M. Wahl

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ulrike Hartmann
Geburtsdatum: 04. April 1971
Geburtsort: Laupheim

Schule und Ausbildung:

1981 – 1987 Dollinger Realschule Biberach
Abschluss: Mittlere Reife

1987 – 1990 Karl-Arnold-Schule, Biberach
Abschluss: Pharmazeutisch Technische Assistentin

1990 – 1993 Ernährungswissenschaftliches Gymnasium,
Biberach
Abschluss: Abitur

Studium und Praktika:

1993 – 1998 Pharmaziestudium an der Eberhard-Karls-Universität
in Tübingen

09/1995 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

10/1997 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

11/1997 – 04/1998 Praktikum in der Universitäts-Apotheke, Tübingen

05/1998 – 10/1998 Praktikum in der Steinach Apotheke, Reutlingen

11/1998 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

11/1998 Approbation zur Apothekerin

Beruflicher Werdegang:

Seit 12/1998 Universitäts-Apotheke Tübingen
Schwerpunkt: Pädiatrische Onkologie

Seit 04/2000 Pharmakologie-Unterricht in der Krankenpflege-
schule der Universitätsklinik Tübingen

01/2001 – 12/2004 Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter
Betreuung von Dr. Brümmendorf, Abteilung für
Hämatologie und Onkologie, Prof. Dr. Kanz, Tübingen

Seit 05/2004 Beginn der Weiterbildung zur
„Fachapothekerin für Klinische Pharmazie“

