

**p53-unabhängige Kontrollpunkte
in Antwort auf Telomerdysfunktion
in Leberzellen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. André Lechel

geboren am 19.08.1971 in Hamburg-Bergedorf

2007

Referent: Prof. Dr. K.L. Rudolph
Koreferentin: Prof. Dr. B. Schlegelberger
Tag der Promotion: 23. Februar 2007

Zusammenfassung

In der Karzinogenese haben Telomerverkürzungen eine ambivalente Rolle. Einerseits führt Telomerdysfunktion zur Induktion von chromosomaler Instabilität und damit zur Entstehung von Tumoren, andererseits hemmen dysfunktionelle Telomere den Tumorprogress durch Aktivierung des p53-abhängigen DNA-Schädigungssignalweges. In den meisten Tumoren im Menschen tritt eine Stabilisierung der Telomere durch Telomerase-Reaktivierung auf. Gleichzeitig weist die Mehrzahl menschlicher Tumore eine Inaktivierung des p53-abhängigen DNA-Schädigungssignalweges auf. Die Funktion von Telomeraseaktivierung für den Progress p53-defizienter Tumore ist bislang nicht in einem *in vivo* Modell der Karzinogenese untersucht worden. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein Mausmodell der Hepatokarzinogenese entwickelt, in dem Telomerdysfunktion und eine Deletion des p53 Gens in Leberzellen vorlag. Es wurden Geschwistermäuse untersucht, die entweder eine homozygote Deletion der Telomerase RNA Komponente trugen (mTERC^{-/-}) oder eine heterozygote Wiederherstellung des TERC-Genlokus aufwiesen (mTERC^{+/-}). Zusätzlich wurde die Rolle von p53 hinsichtlich der Induktion von Seneszenz und Apoptose in Antwort auf akute Telomerdysfunktion in der Mausleber untersucht.

Die Arbeit zeigt, dass Telomerase den Progress von p53-defizienten, Telomerdysfunktionellen hepatozellulären Karzinomen (HCC) verstärkt. Verminderte Tumorprogression in mTERC^{-/-} Tumoren korrelierte mit einer massiven Akkumulation von Aneuploidie und DNA-Schädigung, einer verminderten Tumorzellproliferation und einer gesteigerten Tumorzellapoptose. In nicht-transformierten Leberzellen zeigte sich in Antwort auf akute Telomerdysfunktion eine p53-unabhängige Induktion von Leberzellapoptose, wohingegen die Induktion von Seneszenz-Markern p53-abhängig war. Diese Ergebnisse indizieren, dass Telomerase für den Progress von p53-defizienten Lebertumoren mit verkürzten Telomeren notwendig ist und dass p53-unabhängige Mechanismen der Tumorsuppression den Progress von Telomerase-defizienten Tumoren in diesem Kontext inhibieren. Diese Ergebnisse indizieren, dass eine Inhibition von Telomerase in menschlichen Tumoren mit Telomerdysfunktion und Defekten im p53-Signalweg ein erfolgreiches therapeutisches Konzept darstellen könnte.

Schlagwörter: Hepatokarzinogenese – p53-Deletion – Telomerdysfunktion

Summary

Telomere shortening has a dual role in carcinogenesis. On one hand telomere dysfunction induces chromosomal instability and the initiation of cancer, on the other hand dysfunctional telomere limit tumor progression by the induction of p53-dependent DNA damage pathways. In most human cancers telomerase reactivation stabilizes telomere function. In addition, most human cancer show an inactivation of the p53-pathway. The function of telomerase for the progression of p53-mutant tumors has not been studied in animal models of carcinogenesis. To this end, we have generated a mouse model of hepatocarcinogenesis in the presence of p53-deletion and telomere dysfunction. Hepatocarcinogenesis was analyzed in cohorts of siblings that were either homozygous knockout for the telomerase RNA component (TERC^{-/-}) or genetically rescued for TERC gene expression (TERC^{+/-}). In addition, we studied the function of p53 for the induction of apoptosis and senescence in response to acute telomere dysfunction in mouse liver.

The studies show, telomerase promotes progression of p53-mutant hepatocellular carcinoma (HCC) with dysfunctional telomeres. Suppressed tumor progression of mTERC^{-/-} HCC correlated with an accumulation of aneuploidy and DNA damage in tumor cells, suppressed tumor cell proliferation and increased tumor cell apoptosis. In non-transformed liver cells induction of apoptosis in response to acute telomere dysfunction was p53-independent, whereas induction of senescence markers was p53-dependent. These results indicate that telomerase is required for the progression of p53-mutant tumors with dysfunctional telomeres and that p53-independent mechanisms limit tumor progression in this molecular context when telomerase is absent. These results suggest that inhibition of telomerase could represent an effective therapeutic approach for the treatment of human tumors characterized by telomere dysfunction and p53-mutation.

Keywords: Hepatocarcinogenesis – p53-deletion – telomere dysfunction

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	6
1.1. Telomere	6
1.2. TRF2 ein Telomer-bindendes Protein des Shelterin Komplex	6
1.3. Telomerase	9
1.4. Endreplikationsproblem	10
1.5. Das Crisis Modell der Karzinogenese	11
1.6. Tumorentstehung in Telomerase Knockout Mäusen	13
1.7. Das hepatozelluläre Karzinom im Mensch	15
1.8. Genetische Mausmodelle der Hepatokarzinogenese	16
1.9. Ziele der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Mausstämme, Bakterienstämme, Adenoviren	19
2.1.1. Mausstämme	19
2.1.2. Zellen	19
2.1.3. Adenoviren	19
2.2. Molekulargenetische Methoden	20
2.2.1. Behandlung von Geräten und Lösungen	20
2.2.2. Phenol/Chloroform DNA Extraktion	20
2.2.3. RNA-Extraktion	20
2.2.4. Fällung von Nukleinsäuren	21
2.2.5. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	21
2.2.6. Standard-Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.7. Gelextraktion von Nukleinsäuren	22
2.2.8. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	22
2.2.9. Southern Blot	23
2.2.10. Sondenmarkierung	23
2.2.11. Hybridisierung	24
2.2.12. Array CGH	24
2.2.13. Synthese von cDNA	25
2.2.14. Real Time PCR	25
2.2.15. Genotypisierung mittels PCR	26
2.2.16. Isolierung von Gesamtprotein	27

2.2.17. SDS-PAGE	27
2.2.18. Western-Blot	28
2.2.19. TRAP Assay	28
2.2.20. FACS-Analysen	29
2.3. Adenovirale Arbeitstechniken	30
2.3.1. Vermehrung von Adenoviren	30
2.3.2. Isolierung und Aufreinigung von Adenoviren	30
2.3.3. Titerbestimmung der Adenoviren	31
2.3.4. Dialyse von Adenoviren für intravenöse Injektionen	32
2.4. Tierexperimentelle Methoden	33
2.4.1. Tierhaltung	33
2.4.2. Injektionen	33
2.4.3. Töten der Tiere und Gewebeentnahme	33
2.4.4. Dissektion der Tumore	33
2.4.5. Leberperfusion	33
2.4.6. Herstellung von Metaphase Spreads nach Colcemid Behandlung	34
2.5. Histologische Methoden	35
2.5.1. H&E-Färbung	35
2.5.2. Feulgen-Färbung	35
2.5.3. Telomerlängenbestimmung	36
2.5.4. Markierung von FISH-Sonden	38
2.5.5. FISH (Fluoreszenz In Situ Hybridisierung)	38
2.5.6. Immunhistochemische-Färbungen	39
2.5.7. TUNEL-Assay (Apoptosenachweis)	39
2.5.8. Seneszenz-Färbung (SA- β -Gal-Färbung)	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Mausmodell der Crisis induzierten Hepatokarzinogenese	41
3.1.1. Mausmodell	41
3.1.2. Ausschnitt von <i>Trp53</i> mittels Ad Cre	44
3.1.3. Tumorinzidenz	45
3.1.4. Telomerlängenbestimmung	48
3.1.5. Analyse des p53 Status in Leber und HCC	50
3.1.6. Telomerase limitiert Aneuploidie in p53 deletierten HCC mit kurzen Telomeren	54

3.1.7.	Akkumulation von DNA Schädigungs-Foci in iG4 p53 ^{Δ/Δ} HBs ⁺ HCC	58
3.1.8.	Co-Lokalisation von DNA-Damage Foci und Telomersignal	59
3.1.9.	Verminderte Proliferation und erhöhte Apoptose in Telomerase negativen HCC	60
3.2.	Mausmodell der akuten Telomerdysfunktion	65
3.2.1.	Experimentelles Design des TRF2 ^{ΔBΔM} Systems	65
3.2.2.	Ad GFP als Kontrolle	67
3.2.3.	Western Blot zum Nachweis von TRF2 ^{ΔBΔM} Protein	68
3.2.4.	Dosis abhängige Induktion von Telomerdysfunktion durch TRF2 ^{ΔBΔM} Expression	68
3.2.5.	Induktion von Apoptose und Seneszenz	72
3.2.6.	Die Induktion von Apoptose und Seneszenz in Abhängigkeit des TRF2 ^{ΔBΔM} Expressionslevels	73
3.2.7.	Die Rolle von p53 bei der Induktion von Apoptose und Seneszenz	76
4.	Diskussion	78
4.1.	Mausmodell der Hepatokarzinogenese	78
4.2.	Akute Telomerdysfunktion durch TRF2 Inhibition	83
4.3.	Ausblick	85
5.	Literaturverzeichnis	87
6.	Lebenslauf	99
7.	Liste der Publikationen	100
8.	Danksagung	101

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ad	Adenovirus
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
β-gal	β-Galaktosidase
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CHAPS	3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CIN	chromosomale Instabilität
CTP	Cytosintriphosphat
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
FCS	Fetal Calf Serum
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GFP	Green Fluorescent Protein
HBs Ag	Hepatitis B Oberflächen Antigen
HCl	Salzsäure
HEPES i.v.	N-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazino-Ethansulfonsäure intravenös
Kb	Kilobase
KRB	Krebs-Ringer-Buffer
LB	Luria Broth
Min	Minute

MWCO	molecular weight cut off
NEB	New England Biolabs
O.D.	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered
PCNA	Proliferating Cell Nuclea Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNA	Peptid Nucleic Acid
PFU	plaque forming units
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotations per Minute = Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute - Medium
SA- β -Gal	senescence assoziated β -gal (staining)
SDS	Sodiumdodecylsulfate = Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TERC	Telomerase RNA Komponente
TERT	Telomerase reverse Transkriptase
TFI	Telomer Fluoreszenz Intensität
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
U	Units = Mengenangabe bei Enzymen
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Weight/Volume = Masse/Volumen
X-Gal	5-Bromo 4-chloro 3-indolyl-Galactosid

1. Einleitung

1.1. Telomere

Bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden die später als Telomer (griechisch: End-Teil) benannten Endstücke der Chromosomen als spezielle Strukturen am Ende der Chromosomen von Barbara McClintock und Hermann Joseph Muller beschrieben (McClintock, 1941; Muller, 1938). Die Telomere bilden die Enden der Chromosomen (Abb.1), sie bestehen bei Säugetieren aus hochrepetitiven Sequenzen (5'-TTAGGG-3')_n (Forney et al., 1987) und speziellen DNA-Bindeproteinen (Zhong et al., 1992; Bilaud et al., 1997; Broccoli et al., 1997; Smith et al., 1998;; Kim et al., 1999; Baumann & Cech, 2001; Houghtaling et al., 2004; de Lange, 2005), welche einen Nukleo-Protein-Komplex bilden (Blackburn, 1991; McEachern et al., 2000; Blackburn, 2001; Smogorzewska et al., 2004). Die Hauptfunktion der Telomere besteht darin, die Chromosomenenden zu stabilisieren und die ansonsten offenen DNA-Enden von DNA-Doppelstrangbrüchen zu unterscheiden und vor DNA-Reparaturmechanismen, Degradation, chromosomalen Fusionen und chromosomaler Instabilität zu schützen (Counter et al., 1992; Blasco et al., 1997, Hande et al.; 1999).

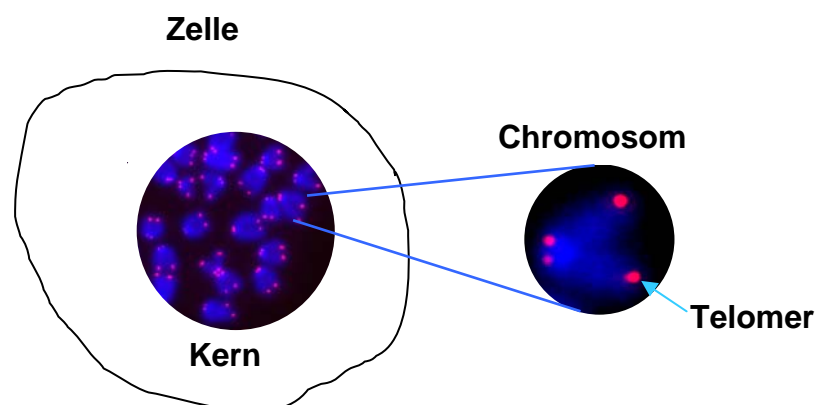


Abb. 1: Darstellung eines akrozentrischen Maus-Chromosoms. Die DNA ist mit DAPI gefärbt (blau), die Telomere wurden mittels Hybridisierung (FISH) mit einer Telomer-spezifischen DNA-Repeat-Probe (TTAGGG)₃ rot angefärbt.

1.2. TRF2 ein Telomer-bindendes Protein des Shelterin Komplex

Die Telomere bestehen aus Wiederholungen der Basensequenz TTAGGG. Die Integrität der Telomere wird von einer Reihe von Telomer-spezifischen Proteinen aufrechterhalten,

die am Telomer binden. Dieser Protein Komplex wird als Shelterin bezeichnet (de Lange, 2005) (Abb.2). Drei Proteine dieses Komplexes können direkt die Sequenz TTAGGG erkennen, es sind die Proteine: TRF1 (telomere repeat binding factor 1; Zhong et al., 1992; Chong et al, 1995), TRF2 (telomere repeat binding factor 2; Bilaud et al., 1997; Broccoli et al., 1997) und Pot1 (protection of telomeres 1; Baumann & Cech, 2001). Sie bilden zusammen mit TIN2 (TRF interacting nuclear protein 2; Kim et al., 1999), TPP1 (ehemals TINT1 = TIN2 interacting protein 1; Houghtaling et al., 2004) und Rap1 (repressor/activator protein 1; Li et al., 2000) den Shelterin Komplex.

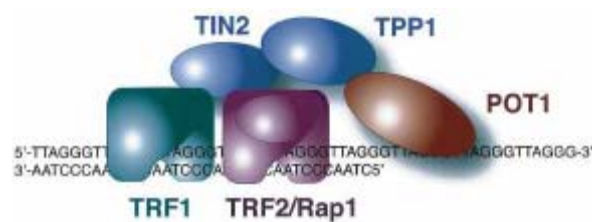


Abb. 2: Shelterin Komplex (aus de Lange, 2005)

TRF2 spielt eine wichtige Rolle bei der Formierung des T-Loops, welcher bereits 1999 im elektronenmikroskopischen Bild dargestellt wurde (Abb.3). Der T-Loop beschreibt die Struktur, bei der sich Telomersequenz zurückfaltet und eine Lasso ähnliche Struktur bildet. Dabei wird der 3'-Einzelstrangüberhang in weiter proximal gelegene doppelsträngige Telomersequenz inseriert (Griffith et al., 1999; Munoz-Jordan et al., 2001).

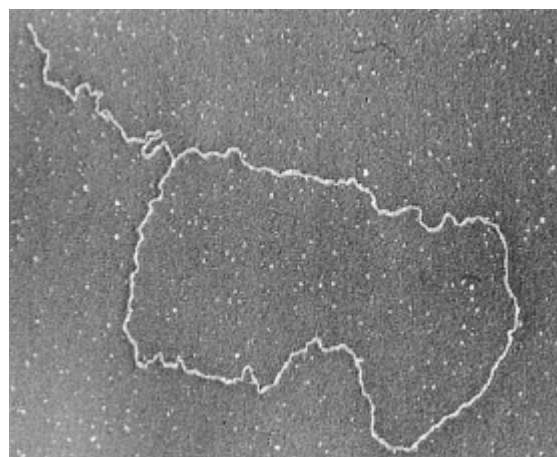


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Abbildung des T-Loops (aus Griffith et al., 1999). Die lassoähnliche Struktur stellt den T-Loop dar, welcher in seiner geschlossenen Form eine abschirmende Funktion hat.

TRF2 bindet dabei als Dimer an die doppelsträngige DNA, unter Bildung der T-Loop Struktur, welche zur Protektion vor Fusionen, Degradation und Rekombination am Telomerende essentiell ist. Der 3'-Überhang wird dabei in einer D-Loop Formation eingebunden (Abb.4).

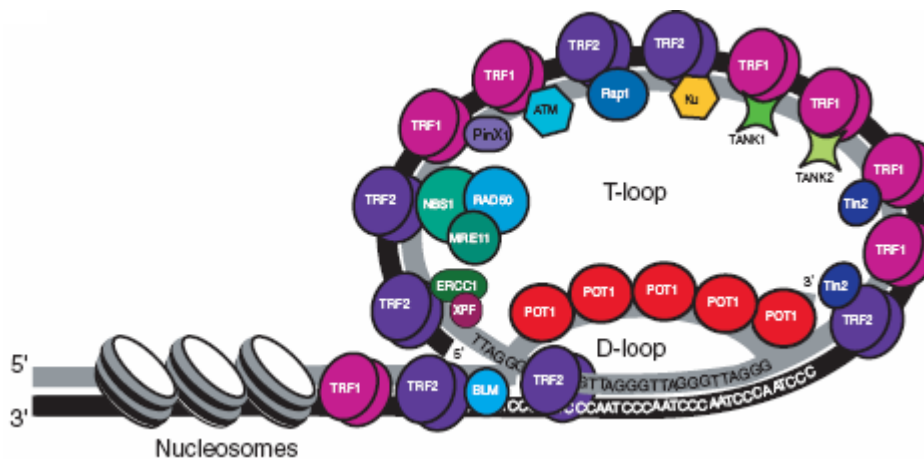


Abb. 4: T-Loop und D-Loop Struktur (nach Colgin und Reddel, 2004). TRF1 und TRF2 binden als Dimer an doppelsträngige Telomersequenz. Pot1 hingegen bindet an einzelsträngige Telomersequenz des D-Loops.

In Telomerase defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass Telomerverkürzung zwei unterschiedliche zelluläre Antworten auslöst: Apoptose und Seneszenz (Lee et al., 1998; Satyanarayana et al., 2003). Um den Einfluss von akuter Telomerdysfunktion auf die zelluläre Antwort zu analysieren, wurde das experimentelle System der TRF2 Inhibierung erforscht, in dem eine dominant negative Form des TRF2 (TRF2^{ΔBAM}) kloniert wurde, welche zu Telomerdysfunktion und chromosomalen Fusionen führte (van Steensel et al., 1998). *In vitro* Studien zeigten, dass TRF2 Inhibierung die gleiche Antwort wie Telomerverkürzung bewirkt, so konnte in diesem Modell Apoptose und Seneszenz gezeigt werden (Karlseder et al., 1999; Karlseder et al., 2002; Smogorzewska & de Lange, 2002). Neuere Daten zeigen, dass TRF2 nicht nur eine protektive Rolle am Telomer spielt, sondern auch einen Einfluss in der Alterung und auf die Karzinogenese hat. So konnte in einem transgenen Mausmodell in K5-TRF2 Mäusen gezeigt werden, dass gesteigerte TRF2 Expression zu einem vorzeitigem Altern der Haut bzw. zu Hauttumoren führt (Munoz et al., 2005). In einem Modell des konditionellen TRF2 Knockouts in der Leber führte der Verlust von TRF2 zu einer Akkumulierung von γ H2AX, einem Marker für DNA Schädigung, und zu Telomerefusionen (Lazzerini Denchi et al., 2006). Hinzu wurde bei diesen Mäusen die Leberregeneration untersucht. Während der Leberregeneration zeigten

die Hepatozyten dieser Mäuse eine Endoreduplikation und Zellwachstum aber keine Zellteilung, da es zu Segregationsproblemen der Chromosomen kam (Lazzerini Denchi et al., 2006).

1.3. Telomerase

Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, welches zur Gruppe der reversen Transkriptasen gehört. Telomerase besteht aus zwei essentiellen Untereinheiten, der Telomerase RNA-Komponente (TERC, funktionelle RNA), welche die komplementäre Telomersequenz besitzt und als Matritze der zu synthetisierenden Telomersequenz dient (Greider et al., 1989), und der Telomerase Reversen Transkriptase (TERT), der katalytischen Untereinheit (Greider et al., 1985; Morin, 1989; Feng et al., 1995; Meyerson et al., 1997; Nugent et al., 1998). Der Enzymkomplex ermöglicht eine *de novo* Synthese von Telomersequenz an den Enden der Telomere (Abb.5). Das Enzym wurde erstmals 1985 in Tetrahymena nachgewiesen (Greider et al., 1985).

Während die RNA-Komponente der Telomerase konstitutiv exprimiert wird, ist die Expression der TERT-Untereinheit in humanen Zellen und Geweben streng reguliert (Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997; Kim et al., 1999). Telomerase ist im Menschen nur während der Embryogenese aktiv (Wright et al., 1996), nachgeburtlich aber nur noch in bestimmten Keim-, Stamm- und Progenitorzellen (Counter et al., 1995; Hiyama et al., 1995; Harle-Bachor et al., 1996; Wright et al., 1996; Hiyama et al., 2001). In der Mehrzahl der somatischen Zellen ist die TERT-Expression und damit die Telomeraseaktivität unterdrückt (Wright et al., 1996; Burger et al., 1997; Shay et al., 1997; Kim et al., 1999).

Anders als im Menschen ist TERT in der Maus in den meisten Geweben auch postnatal exprimiert, was mit dem Vorhandensein von Telomeraseaktivität in den meisten Geweben und Organen von adulten Mäusen korreliert (Prowse & Greider, 1995; Greenberg et al., 1998). Im Einklang mit diesen Unterschieden hinsichtlich der Telomeraseaktivität zeigen Gewebe und Zellen von Mäusen sehr viel längere Telomere (40-60 kb) (Prowse & Greider, 1995) als menschliche Zellen und Gewebe (7-14 kb) (Allshire et al., 1989; Wright et al., 1996).

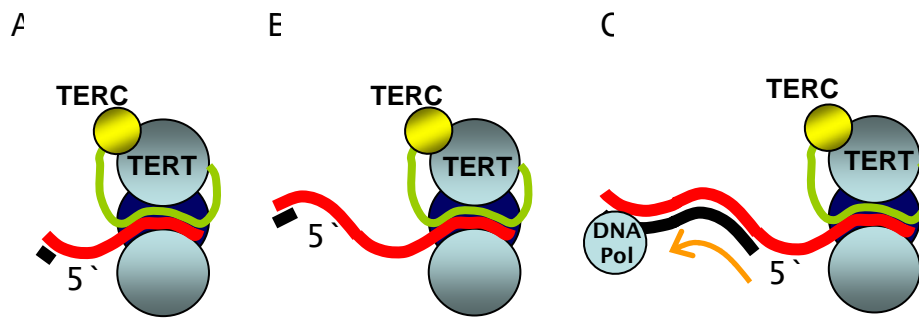


Abb. 5: (A) Telomerasekomplex (TERT: Telomerase reverse Transkriptase; TERC: Telomerase RNA-Component) binden am 3'-Einzelstrang. (B) Elongation des 3'-Stranges, die RNA-Komponente dient als Matrize. (C) Die DNA-Polymerase (DNA Pol) synthetisiert den 5'-Strang.

1.4. Endreplikationsproblem

Hayflick und Moorhead beschrieben erstmals 1961, dass humane Fibroblasten nur eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen durchführen können (Hayflick et al., 1961). Fast 30 Jahre später konnte gezeigt werden, dass dies im Zusammenhang mit Telomerverkürzung und dem sogenannten "Endreplikationsproblem" der DNA-Polymerase in Zusammenhang steht (Abb.6). Die DNA-Polymerase δ repliziert DNA während der S-Phase des Zellzyklus. Das Enzym kann einen neuen DNA-Strang nur in 5'-3'-Richtung synthetisieren. Der so genannte Leitstrang (Leading-Strand) wird auf diese Weise kontinuierlich von der DNA-Polymerase δ repliziert, bis die DNA-Polymerase δ auf eine weitere Replikationsgabel trifft. Der „Folgestrang“ (Lagging strand) hingegen muss entgegen der Laufrichtung der Replikationsgabel, welche die doppelsträngige DNA des Kerns zur DNA Synthese auftrennt, synthetisiert werden. Dies geschieht mit Hilfe von RNA-Primern in vielen Einzelsegmenten, die als Okazaki-Fragmente bezeichnet werden. Die RNA-Primer werden anschließend durch die DNA-Polymerase α beseitigt und durch Desoxynukleotide ersetzt und durch die DNA-Ligase miteinander verbunden. Am Ende des Folgestranges kann kein RNA-Primer mehr angesetzt werden, wodurch es bei jeder Zellteilung zu einem Verlust von Telomerasequenz kommt. Auf diese Weise verlieren humane Chromosomen bei jeder Zellteilung ca. 100 Basenpaare (Levy et al., 1992).

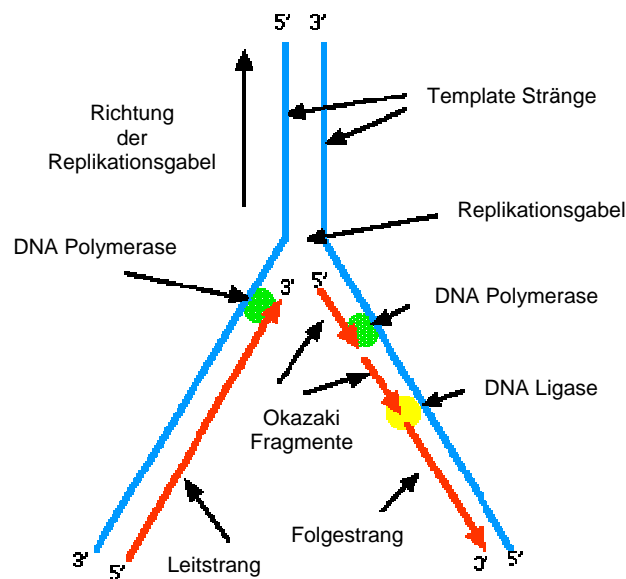


Abb. 6: Modell der DNA-Replikation, Dargestellt ist eine Replikationsgabel, die DNA-Polymerase δ kann den neuen DNA-Strang nur in 5'-3'-Richtung synthetisieren. Der „Leitstrang“ kann deshalb in einem Stück durchsynthetisiert werden, bis er auf eine weitere Replikationsgabel trifft. Der „Folgestrang“ hingegen muss entgegen der Laufrichtung der Replikationsgabel synthetisiert werden. Die Synthese erfolgt hier in mehreren Einzelfragmenten mit einer Länge von 100-200 Nukleotiden (Okazaki-Fragmente) mit Hilfe von RNA-Primern. Die RNA-Primer werden von der DNA-Polymerase α abgebaut und die Lücken mit Desoxynukleotiden aufgefüllt. Die Fragmente werden von der DNA-Ligase miteinander ligiert.

1.5. Das Crisis Modell der Karzinogenese

In somatischen Zellen verkürzen sich bei jeder Zellteilung die Telomere. Nach 60-80 Zellteilungen (Hayflick-Limit) erreichen die Telomere von menschlichen Zellen eine kritisch kurze Telomerlänge, wodurch die Zellen ihre Teilungsfähigkeit verlieren (Harley, 1991).

Telomerverkürzung führt zum Verlust der Telomerfunktion, dies induziert eine DNA-Schädigungsantwort an den ungeschützten Chromosomenenden (Shay et al., 1991; Chin et al., 1999; d'Adda di Fagagna et al., 2003; Satyanarayana et al., 2004). In Zellkultur-Experimenten wurde gezeigt, dass Telomerverkürzung abhängig vom Ausmaß der Telomerdysfunktion zwei Kontrollpunkte auslösen kann (Shay et al., 1991) (Abb.7): Der Seneszenz Kontrollpunkt repräsentiert einen ersten Kontrollpunkt in Antwort auf Telomerverkürzung (Mortalitätsstadium 1 = M1). Seneszenz ist durch Aktivierung des ATM/p53/p21-Signalwegs charakterisiert, wodurch ein permanenter Zellzyklusarrest induziert wird (Brown JP et al., 1997; d'Adda di Fagagna et al., 2003). Man geht heute davon aus, dass 3-10 dysfunktionelle Telomere ausreichen, um diesen Seneszenz-

Kontrollpunkt zu aktivieren (Zou et al., 2004). Der Seneszenz-Kontrollpunkt kann überwunden werden, wenn der p53 und/oder Rb-Signalweg deletiert wird (Shay et al., 1991). Geschieht dies, können Zellen trotz kurzer Telomere weiter proliferieren, was den weiteren Verlust von Telomersequenzen und einen Anstieg an Telomerdysfunktion zur Folge hat. Hierdurch kommt es dann zur Induktion eines 2. Kontrollpunktes, der als Crisis oder Mortalitätsstadium 2 (M2) bezeichnet wird. Der Crisis Kontrollpunkt ist durch massive chromosomale Instabilität und Zelltod charakterisiert (Abb.7). Im Gegensatz zu dem Seneszenz-Kontrollpunkt sind die molekularen Signalwege des Crisis-Kontrollpunktes bislang nicht im Detail charakterisiert worden. Es ist darüber hinaus ein aktive bearbeitetes Forschungsfeld, welche Rolle die Seneszenz- und Crisis-Kontrollpunkte *in vivo* im Rahmen von Alterung und Krebsentstehung haben.

Es wird angenommen, dass Seneszenz- und Crisis- Kontrollpunkte Mechanismen darstellen, die den Organismus vor der Krebsentstehung schützen (Tumorsuppressor-Kontrollpunkte). Gleichzeitig könnte die begrenzte Proliferations- und Lebensspanne von Zellen aber auch die Regeneration und den Organerhalt während der Alterung limitieren. In den hier beschriebenen Arbeiten sollte die Funktion von p53-unabhängigen Crisis-Kontrollpunkten im Rahmen der Leberkrebsentstehung untersucht werden.

Allgemein wird angenommen, dass premaligne Zellen mit p53 Deletion weitere Alteration von Crisis-Kontrollpunkten erwerben müssen, um das für Tumorzellen typische Charakteristikum des unbegrenzten Wachstums (Immortalisierung) zu erlangen. Zellkulturuntersuchungen haben gezeigt, dass primäre menschliche Fibroblasten in einer Rate von 1:10⁷ Zellen das Crisis-Stadium überleben können. Zellklone, die dann auswachsen zeigen in 60-80 Prozent eine Reaktivierung von Telomerase (Shay et al., 1993). Es wird angenommen, dass die übrigen Zellklone einen alternativen, Telomerase-unabhängigen Mechanismus der Telomerstabilisierung entwickelt haben, der als ALT-Mechanismus bezeichnet wird, und wahrscheinlich auf Mechanismen der homologen Rekombination beruht (Duncan & Reddel, 1997; Montalto et al., 1999). ALT ist in humanen Zelllinien mit „PML bodies“ assoziiert (Yeager et al., 1999), welche Telomersequenz, Telomer spezifische Bindeproteine, DNA Reparaturproteine, Replikationsproteine und RecA Helikasen aufweisen (Yeager et al., 1999; Henson et al., 2002; Nabetani et al., 2004). Ebenso zeigen ALT Zellen eine hohe Rate an postreplikativem Austausch von Telomeresequenz zwischen Geschwisterchromatiden (Wu et al., 2000; Bailey et al., 2004; Bechter et al., 2004; Londono-Vallejo et al., 2004). Diese Daten zeigen, dass die DNA-Doppelstrang Reparaturmechanismen, vor allem für die

homologe Rekombination in ALT Mechanismen eine wichtige Rolle spielen (Dunham et al., 2000; Reddel, 2003).

Im Menschen weisen die meisten Tumore (60-90%) Telomeraseaktivität auf, so auch im HCC. Es konnte gezeigt werden, dass auch in menschlichen, Telomerase-negativen Tumoren eine Verlängerung der Telomere mittels ALT stattfinden kann (Shay & Bacchetti, 1997, Bryan et al., 1997).

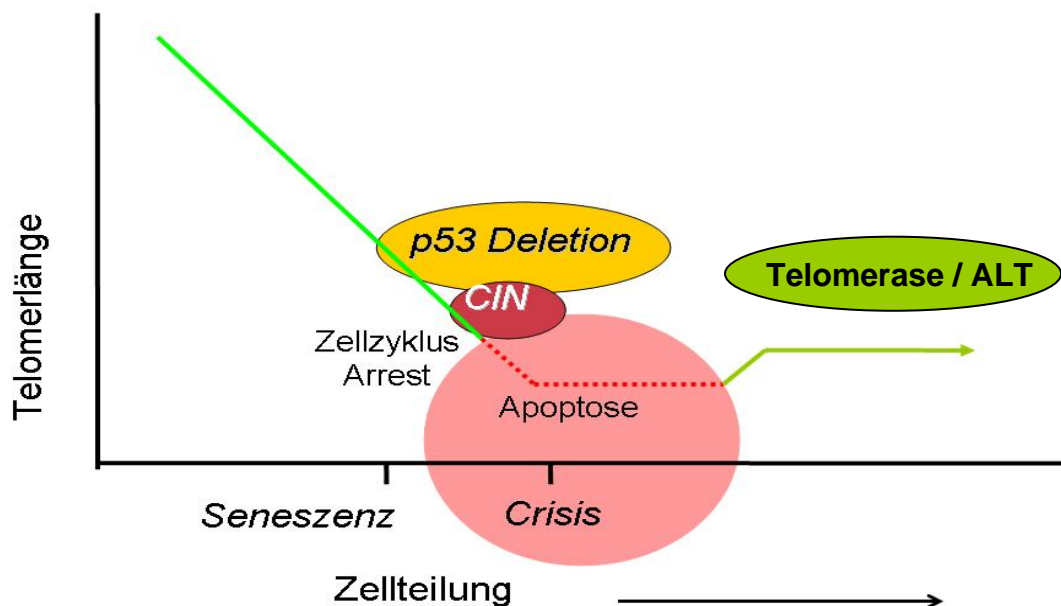


Abb. 7: Zweistufenmodell der Telomerhypothese: Die schematische Darstellung zeigt den Zusammenhang zwischen Zellteilungen (x-Achse) und Telomerverkürzung (y-Achse) in menschlichen Zellen. Aufgrund des Endreplikationsproblems (siehe oben) verkürzen sich die Telomere bei jeder Zellteilung um 50-100 bp. In Antwort auf Telomerverkürzung kommt es zunächst zur Induktion von Seneszenz, ein p53-abhängiger Kontrollpunkt der durch einen permanenten Zellzyklusarrest gekennzeichnet ist. Zellen, die diesen Kontrollpunkt überwinden, erreichen einen 2. Kontrollpunkt, der durch p53-unabhängige Apoptose, massive Telomerdysfunktion und Zelltod gekennzeichnet ist und als Crisis-Kontrollpunkt bezeichnet wird. Die molekularen Signalwege die zelluläres Überleben im Crisis-Stadium limitieren sind nicht bekannt und könnten für die Tumorentstehung von Bedeutung sein. Die Alteration von Crisis-Kontrollpunkten könnte das Überleben von chromosomal instabilen (CIN), premalignen Zellen mit defektem p53-Genstatus ermöglichen und entstehenden Tumoren erlauben, im Verlauf Mechanismen der Immortalisierung (Telomerase, ALT) zu aktivieren.

1.6. Tumorentstehung in Telomerase Knockout Mäusen

Studien an Telomerase defizienten Mäusen haben gezeigt, dass Telomerverkürzungen und Telomerdysfunktion eine ambivalente Rolle bei der Tumorentstehung und Tumorentstehung haben:

Einerseits zeigten mTERC^{-/-} Mäuse eine erhöhte Rate der Tumorentstehung. Es traten vermehrt Tumore im Rahmen der Alterung auf (Rudolph et al., 1999), insbesondere wurde eine erhöhte Rate von frühen, mikroskopischen Tumorstufen beobachtet (Rudolph et al., 2001; Farazi et al., 2003). Die vermehrte Tumorentstehung wurde mit der Induktion von chromosomaler Instabilität in Folge von Telomerdysfunktion in Zusammenhang gebracht (Rudolph et al., 2001; Satyanarayana & Rudolph, 2004). Ein Kennzeichen von Telomerdysfunktion ist die Ausbildung von chromosomalen Fusionen als Folge von DNA-Reparaturmechanismen, welche die Telomer-freien Chromosomenenden ligieren (Blasco et al., 1997). Treten Zellen mit fusionierten Chromosomen in den Zellzyklus, kommt es in der Mitose zum Zerreißen der Fusionen und erneuter Ligation von Bruchpunkten in den Tochterzellen. Diese wiederholten „Fusion-Zerreißungszyklen“ führen zur Aneuploidie, zum Verlust oder zur Hinzugewinnung von Chromosomenabschnitten in den Tochterzellen. Als morphologisches Korrelat dieses Prozesses sind Anaphase-Brücken zu beobachten. Hierbei handelt es sich um Chromatinbrücken in der Anaphase die sich zwischen den auseinander weichenden Chromosomenplatten ausbilden und bei den es sich um fusionierte, im Zerreißen begriffene Chromosomen handelt. Neben der Entwicklung von Aneuploidie kommt es in Antwort auf Telomerverkürzung auch vermehrt zu der Entwicklung von Translokationen zwischen verschiedenen Chromosomen (Artandi et al., 2000). Beide Mechanismen der chromosomalen Instabilität (CIN) kennzeichnen Tumore im alternden Menschen (siehe oben). Ein deutlicher Anstieg von CIN war in mTERC^{-/-} Mäusen nach Deletion von p53 zu beobachten, was indiziert, dass ein Ausschalten des Seneszenz-Kontrollpunktes und der Eintritt in das Crisis-Stadium die Entstehung von CIN verstärken (Artandi et al., 2000; siehe oben).

Im Gegensatz zu der vermehrten Tumorentstehung war in mTERC^{-/-} Mäusen der Progress von Tumoren gehemmt und es entwickelten sich nach Karzinogenbehandlung oder nach Deletion von Tumorsuppressorgenen eine geringere Anzahl von makroskopischen Tumoren (Greenberg et al., 1999; Gonzalez-Suarez et al., 2000; Rudolph et al., 2001; Farazi et al., 2003; Chang et al., 2003). Der gehemmte Tumorprogress wurde in Telomerase Knockout Mäusen mit einer Aktivierung von p53-abhängigen DNA Schädigungsantworten in Verbindung gebracht (Rudolph et al., 2001; Chang et al., 2003). Dagegen führte die Deletionen im p53 Gen zu einer verringerten Tumorunterdrückung (Farazi et al., 2006). Ob es zusätzliche, p53-unabhängige Kontrollpunkt gibt, welche den Progress von genetisch instabilen Tumoren in mTERC^{-/-} Mäusen hemmen, ist nicht

bekannt und sollte in dieser Arbeit im Modell der Leberkrebsentstehung untersucht werden.

1.7. Das hepatozelluläre Karzinom im Mensch

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der am fünft häufigsten vorkommende Krebs beim Menschen (Parkin et al., 2000). Die häufigsten Ursachen der HCC Entstehung sind chronische Hepatitis B Virus Infektion (HBV), chronische Hepatitis C Virus Infektion (HBC) und Alkoholabusus (Bruix et al., 2004). In bestimmten Regionen stellt zusätzlich das Mycotoxin Aflatoxin B1 (AFB1) das am potentiell größte Karzinogen für die Leber dar (Bruix et al., 2004). Das Risiko der HCC Entstehung ist in nicht geschädigter Leber und frühen Stufen chronisch geschädigter Leber gering, steigt aber im Stadium der Leberzirrhose sehr stark an (Lotze et al., 1993).

Wie bei anderen menschlichen Tumoren, weisen die Mehrzahl der menschlichen HCC starke Telomerverkürzung im Vergleich zum umliegenden Lebergewebe auf (Miura et al., 1997; Plentz et al., 2004) und zeigen gleichzeitig eine Reaktivierung von Telomerase in über 90% der Fälle (Miura et al., 1997; Takahashi et al., 2000). Zusätzlich zeigt auch das HCC in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle einen Defekt im p53 Signalweg. Im Gegensatz zu anderen Tumoren liegt aber nur selten eine Mutation im p53 Genlokus vor (Tannapfel et al., 2001; Thorgerirsson et al., 2002). Weiterhin ist das Auftreten von Aneuploidie eine weitere molekulare Alteration im HCC, (Nishida et al., 2003; Hashimoto et al., 2004; Wilkens et al., 2004; Plentz et al., 2004; Plentz et al., 2005).

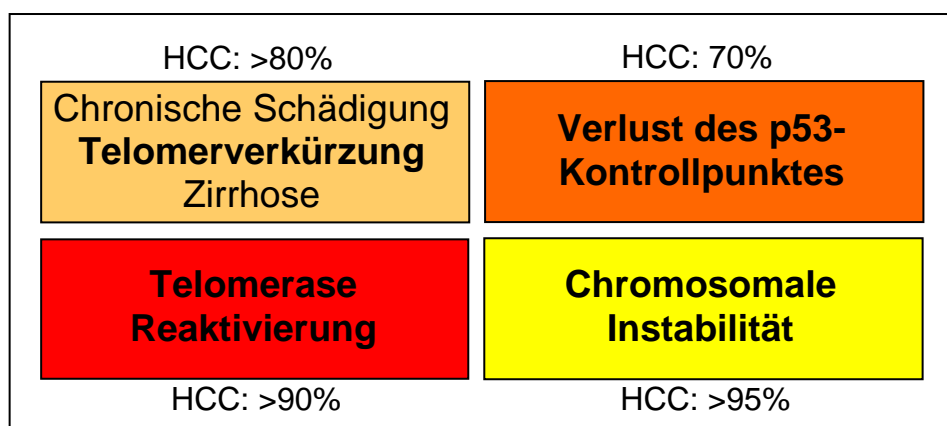


Abb. 8: Molekulare Charakteristika menschlicher HCCs, die Prozentzahlen geben die Häufigkeiten der molekularen Veränderungen im menschlichen HCC an (Ohashi et al., 1996; Miura et al., 1997; Takahashi et al., 2000; Tannapfel et al., 2001; Thorgerirsson et al., 2002; Nishida et al., 2003; Hashimoto et al., 2004; Wilkens et al., 2004; Plentz et al., 2004; Plentz et al., 2005).

Die oben beschriebenen Charakteristika der menschlichen Tumorentwicklung und des HCC indizieren, dass Telomerverkürzung, p53-Verlust, chromosomale Instabilität und Telomerasereaktivierung eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese haben. Welche funktionelle Rolle die Telomerasereaktivierung für den Progress von HCC mit deletiertem p53 Kontrollpunkt hat, und welche p53-unabhängigen Kontrollpunkte den Progress von Tumoren mit dysfunktionellen Telomeren inhibieren, ist nicht im Detail bekannt. Die Aufklärung solcher Mechanismen erscheint von grundlegendem wissenschaftlichen Interesse und scheint auch klinische Bedeutung zu haben, zum Beispiel um die Möglichkeit einer Telomerase-Inhibition als Therapieansatz zur Behandlung von p53 mutierten HCC zu evaluieren.

1.8. Genetische Mausmodelle der Hepatokarzinogenese

Mausmodelle können die Entwicklung der Karzinogenese im Menschen nachahmen und beschreiben. Sie erlauben eine Aufklärung der molekularen Mechanismen, die bei der Karzinogenese von Bedeutung sind. Im Menschen liegen überwiegend Spätstufen der Tumorentwicklung vor, da frühe Stadien meist keine Beschwerden hervorrufen und daher erst eine Erkennung im herangereiften Stadium erfolgt. Das Mausmodell erlaubt eine Untersuchung von frühen Stadien. So wäre es für die Hepatokarzinogenese wichtig die Entstehung unter Verwendung der molekularen Alterationen, wie sie im humanen HCC vielfach beschrieben sind, zu charakterisieren, um klinisch relevante Therapien entwickeln zu können und Tumormarker zu identifizieren, die ein vorzeitigeres Erkennen der Tumore vereinfachen. Vor der Entwicklung transgener Mausmodelle wurde vielfach versucht, die Entwicklung vom HCC in der Maus mittels chemischen Agenzien zu untersuchen, Zum Einsatz kamen Substanzen wie CCl₄, DEN (Diethylnitrosamin). Diese Modelle liessen aber nur partiell einen Aufschluss der Initiierung und Charakterisierung der Karzinogenese zu, da nicht bekannt war, welche genetischen Läsionen zur Tumorentstehung führten (Kalinichenko et al., 2004; Barone et al., 2006; Farazi et al., 2006).

Die Entwicklung der transgenen und Knockout Maustechnologien erlaubte es, häufig auftretende Läsionen im humanen HCC im Mausmodell nachzuahmen und so Mausmodelle zu generieren, welche die Hepatokarzinogenese des Menschen besser widerspiegeln (Lee et al., 2004). Es wurden beispielsweise Mausmodelle entwickelt, in denen die Überexpression von c-myc, TGF- α (Transforming Growth Factor α), E2F1 (E2F transcription factor 1) oder HGF (Hepatocyte Growth Factor) (Conner et al., 1997;

Lee et al., 2004; Calvisi und Thorgeirsson, 2005; Calvisi et al., 2005) zu Lebertumorentstehung führten.

Die Rolle von p53 auf die Karzinogenese wurde in p53 Knockout Mäusen analysiert (Jacks et al., 1994). Diese Mäuse entwickelten bei Verlust beider Allele im Alter von 6-8 Monaten überwiegend Lymphome, in p53^{+/-} Mäusen hingegen wurde ein breiteres Tumorspektrum analysiert, hier entstanden neben Lymphomen ebenfalls häufig Weichteilsarkoma und Osteosarkome (Jacks et al., 1994; Venkatachalam et al., 1998) (Abb.9).

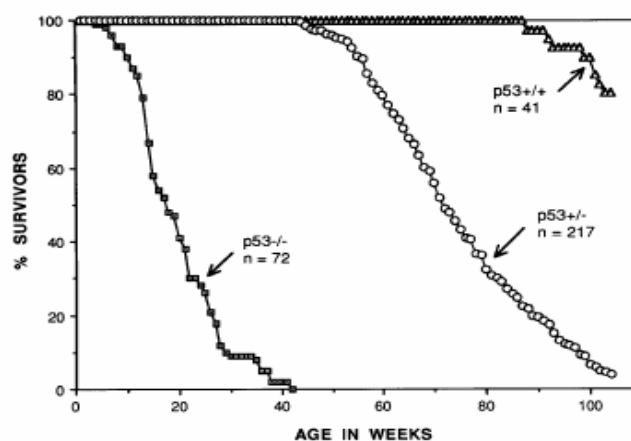


Abb. 9: Tumorzinzidenz und Überlebenskurve von p53^{-/-}, p53^{+/-} und p53^{+/+} Mäusen (aus Venkatachalam et al., 1998). Die Mäuse hatten einen C57BL/63129/Sv Hintergrund. Es traten auch Karzinome in p53 heterozygoten Tieren auf, was auf einen Gendosiseffekt oder die Deletion des verbleibenden p53 Allels zurückzuführen sein könnte.

In einem Mausmodell der Hepatokarzinogenese konnte der Einfluss von heterozygotem p53-Status in Telomerase Knockout Mäusen (TERT Knockout) mit chronischer Leberschädigung durch CCl₄ Injektionen gezeigt werden (Farazi et al., 2006). Die Deletion eines Allels (p53^{+/-}) zeigte keinen Einfluss auf die Hepatokarzinogenese in Telomerase Wildtyp Mäusen, hingegen erhöhte der heterozygote p53-Status die Entstehung von HCC in mTERT^{-/-} Mäusen, wobei nicht der Verlust des zweiten p53 Allels auftrat, sondern eventuell reduzierte p53 Level den Progress der mTERT^{-/-} HCC erlaubten (Farazi et al., 2006).

Der Einfluss von kurzen Telomeren auf die Hepatokarzinogenese wurde ebenfalls in der Kreuzung von Telomerase Knockout Mäusen (Blasco et al., 1997) mit HBs transgenen Mäusen untersucht (Chisari et al., 1989). HBs Mäuse exprimieren das Hepatitis B Oberflächenantigen unter einem leberspezifischen Albuminpromotor, was zu einer chronischen Leberzellschädigung führt (Chisari et al., 1989). Telomerase Wildtyp Mäuse die das HBs Transgen exprimierten entwickelten hepatozelluläre Karzinome, hingegen

entstanden in Telomerase Knockout HBs Mäusen nur dysplastischen Foci im Alter von 15 Monaten, somit war hier der Tumorprogress gestoppt (Wiemann et al., 2005).

1.9. Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit wurden zwei Ziele verfolgt:

- 1.) Die Untersuchung der Funktion von Telomerase im Crisis Stadium der Hepatokarzinogenese. Welches durch
 - a) Telomerverkürzung
 - b) chromosomale Instabilität und
 - c) p53 Verlustgekennzeichnet ist.

- 2.) Die Untersuchung von p53-abhängigen und p53-unabhängigen Antworten in der Mausleber gegenüber akuter Telomerdysfunktion und in der Hepatokarzinogenese.

2. Material und Methoden

2.1. Mausstämme, Bakterienstämme, Adenoviren

2.1.1. Mausstämme

Tab. 1: Mausstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
mTERC	mTERC ^{+/-} ; mTERC ^{-/-}	Blasco et al., 1997
konditional p53	Trp53 ^{loxP/loxP}	Jonkers et al., 2001
HBs	HBs ^{+/-}	Chisari et al., 1989

Die beiden Mausstämme mTERC und HBs befanden sich im C57BL/6J Hintergrund. Die konditionelle p53 Maus befand sich im gemischten Hintergrund und wurde vorab 4 mal mit C57BL/6J Mäusen rückgekreuzt.

2.1.2. Zellen

Tab. 2: Eukaryontische Zellen

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
293	Humane primäre embryonale Nieren Zelllinie durch Adenovirus Typ 5 transformiert	Graham et al., 1977

2.1.3. Adenoviren

Tab. 3: Adenoviren

Bezeichnung	Expression von	Referenz
Ad CRE-GFP	Cre-Rekombinase GFP	Akagi et al., 1997
Ad GFP	GFP	Eigenes Labor
Ad TRF2 ^{ΔBΔM}	dominant negative Form von TRF2	Van Steensel et al., 1998

2.2. Molekulargenetische Methoden

2.2.1. Behandlung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden für 25min bei 121°C autoklaviert, um Nukleasen zu inaktivieren. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 70%igem (v/v) Ethanol abgewischt oder abgeflammt, hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

Beim Arbeiten mit RNA wurden die verwendeten Geräte doppelt autoklaviert, dieser Schritt wurde nach jeder Benutzung wiederholt. Die verwendeten Lösungen wurden zuerst mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und 12Std. bei 37°C inkubiert. DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikation (FEDORCSAK und EHRENBERG, 1966) und zersetzt sich beim anschließenden Autoklavieren zu CO₂ und Ethanol. Da Hände erfahrungsgemäß die Hauptquelle für Kontaminationen mit RNasen darstellen, wurden alle Arbeiten grundsätzlich mit Einweghandschuhen durchgeführt. Zusätzlich wurden alle benutzten Arbeitsplätze mit 70%igem Ethanol abgewischt, die Arbeiten erfolgten nach Möglichkeit unter einer Sterilbank.

2.2.2. Phenol/Chloroform DNA Extraktion

Die Phenol/Chloroform Extraktion diente der Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäure-Lösungen. Bei kleinen Ansätzen wurde das Volumen der Lösung auf mindestens 200µl erhöht, um Ausbeuteverluste so gering wie möglich zu halten. Dann erfolgte die Zugabe von 1Vol. Phenol/Chloroform-Lösung. Nach gründlichem Mischen wurde zur Phasentrennung zentrifugiert (12000rpm, 5min), und die wäßrige Oberphase abgenommen. Wenn in der Interphase noch Proteine sichtbar waren, wurde die Extraktion wiederholt. Anschließend erfolgte die Fällung der Nukleinsäuren mit Ethanol oder Isopropanol.

Phenol/Chloroform-Lösung: 25 ml Tris-gesättigtes Phenol, pH 8,0 (ROTH, Karlsruhe)
24 ml Chloroform
1 ml Isoamylalkohol

2.2.3. RNA-Extraktion

Ein 2mm großes Gewebestück wurde in 500µl RNAzol B-Lösung (WAK-Chemie) aufgenommen und mit einem Plastik-Pistel zerkleinert. Es wurden 50µl Chloroform hinzugegeben und 5min auf Eis inkubiert. Das Homogenat wurde bei 12000g für 15min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit gleichem Volumenanteil

Isopropanol zur RNA Fällung vermenegt. Es wurde für 15min auf Eis inkubiert und anschließend die RNA bei 12000g für 15min bei 4°C präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 20µl TE-Puffer aufgenommen. RNA wurde aliquotiert bei -80°C gelagert.

2.2.4. Fällung von Nukleinsäuren

Zur Ethanol-fällung nukleinsäurehaltiger Lösungen wurde dieser 0,1Vol. 3M Na-Acetat und 2,5Vol. 96%iges (v/v) Ethanol zugesetzt. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz für mindestens 1Std. bei -20°C inkubiert und dann in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert (12000rpm, 30min, 4°C). Das Pellet wurde mit 70%iger (v/v) wäßriger Ethanol-lösung gewaschen und erneut zentrifugiert (12000rpm, 5min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ca. 10min an der Luft getrocknet. Je nach weiterer Verwendung wurde die DNA in H₂O dest. oder TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer:	Tris-HCl	10mM
	EDTA	1mM
	pH 8,0	

2.2.5. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen wurde durch Messung ihrer Absorption bei 260nm mit einem Spektrometer (Eppendorf) bestimmt. Dabei entsprechen einer Absorption von 1,0 folgende Konzentrationen:

- doppelsträngige DNA : 50µg/ml
- Oligonukleotide : 31µg/ml
- RNA : 40µg/ml

Zur Überprüfung der Reinheit von DNA-Proben wurden auch Absorptionsmessungen bei 280 nm durchgeführt. Für proteinfreie Lösungen galt dabei $OD_{260nm} : OD_{280nm} = 1,8-1,9$.

2.2.6. Standard-Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern bei 80V für 1-2Std. Die Agarosekonzentration in den Gelen betrug je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0,8-2,0%. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose vollständig in 1×TAE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst, als Laufpuffer diente

ebenfalls 1×TAE. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2Vol. Ladepuffer beschwert. Nach der Auftrennung wurde das Agarosegel mit einem Genius Bio Imaging System und der GeneSnap Software (Syngene, Cambridge, England) betrachtet und gegebenenfalls fotografiert.

TAE-Puffer (50×):	Tris-HCl	2M
	EDTA	50mM
	Essigsäure	1M
	pH 8,0	
Ladepuffer:	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol	0,25% (w/v)
	Glycerol	40,0% (w/v)

2.2.7. Gelextraktion von Nukleinsäuren

DNA-Fragmente, die zur Klonierung oder als Sonden für Hybridisierungen eingesetzt werden sollten, wurden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gewonnen. Die Isolierung der Fragmente aus dem Gel erfolgte mit dem 'QIAquick Gel Extraction Kit' (Qiagen, Hilden). Das Prinzip der Methode besteht in der Bindung der DNA an die Silicagel-Membran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (VOGELSTEIN & GILLESPIE, 1979) und anschließender Elution bei geringen Ionenstärken. Zunächst wurde das Gelstück mit dem gewünschten Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit dem dreifachen Vol. Puffer QG ('Solubilization buffer') versetzt, anschließend für 10min bei 50°C inkubiert und regelmäßig gemischt. Hatten die zu isolierenden Fragmenten eine Größe <500 bp oder >4 kb, so wurde 1 Gelvolumen Isopropanol hinzugegeben. Die Probe wurde auf die QIAquick-Säule gegeben. Nach kurzer Zentrifugation (12000rpm, 1min) wurde die Säule nacheinander mit 500µl Puffer QG und 750µl PE ('Washbuffer') gewaschen. Die DNA wurde mit 30 - 50µl EB-Puffer von der Säule unter Zentrifugation (12000rpm, 1min) eluiert.

2.2.8. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die vollständige Spaltung von DNA erfolgte in einem Volumen von mindestens 20µl und mit etwa 5U Restriktionsenzym pro µg DNA bei 37°C über Nacht, mindestens jedoch für

2Std.. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen. Der Verdau erfolgte in den vom Hersteller empfohlenen und als 10-fach konzentrierte Stammlösung mitgelieferten Puffern. Bei gleichzeitigem Verdau mit zwei Restriktionsenzymen wurde der vom Hersteller für den Doppelverdau empfohlene Puffer eingesetzt und eine längere Reaktionszeit als beim Einzelverdau gewählt.

2.2.9. Southern Blot

Die DNA-Fragmente wurden in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Agarosegel wurde anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und auf eine minimale Größe zurechtgeschnitten. Für die Depurinierung wurde das Gel für 5min in 0,25M HCl geschwenkt, zum Neutralisieren hinterher in H₂O dest. abgespült. Die Denaturierung fand 2x15min in Denaturierungslösung statt. Anschließend wurde das Gel für 2x15min in Neutralisierungslösung geschwenkt. Die Nylonmembran (Hybond+ Nylonmembran, Amersham) wurde zuerst 20min in sterilem Wasser getränkt und anschließend 10min in 10×SSC. Als Transferpuffer für den Kapillar-Blot diente 10×SSC. Die feuchte Nylonmembran wurde nach dem Blotten für 30sec mit UV-Licht bestrahlt, wodurch die DNA auf der Membran fixiert wurde. Die Membran wurde bis zur Hybridisierung zwischen Whatman-Papier in einer Plastikhülle bei RT gelagert.

Denaturierungslösung:	Natriumhydroxid	0,5N
	Natriumchlorid	1,5M
Neutralisierungslösung:	Natriumchlorid	3M
	Tris-HCl	0,5M
	pH 7,5	
10× SSC:	Natriumchlorid	1,5M
	Natriumcitrat	150mM
	pH 7,0	

2.2.10.Sondenmarkierung

Es wurden 25ng DNA (PCR-Amplifikat) in TE-Puffer verdünnt und bei 95°C für 5min denaturiert. Die Probe wurde anschließend sofort für 5min auf Eis abgekühlt und kurz

abzentrifugiert. Die DNA wurde in das Reaktionsröhrchen (rediprimeTMII, random prime labelling system, Amersham) pipettiert. Anschließend wurden 5µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (50µCi) hinzugefügt, gemischt und 60min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5µl 0,2M EDTA gestoppt.

2.2.11. Hybridisierung

Die auf der Nylonmembran fixierte DNA wurde mit einer $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markierten Sonde hybridisiert. Salzreste wurden von der Membran durch Schwenken in sterilem Wasser entfernt. Danach wurde die Membran mit 5-10ml (je nach Größe der Membran) Prähybridisierungspuffer in ein Hybridisierungsröhrchen gelegt, und für mindestens 1Std. bei ca. 65°C (je nach verwendeter Sonde abweichend) prähybridisiert.

Die radioaktiv-markierte Sonde (25µl) wurde zwecks Denaturierung für 10min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde der Prähybridisierungspuffer durch Hybridisierungspuffer (= Prähybridisierungspuffer + Sonde [10^6 counts/ml]) ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C (DNA-Sonde aus PCR-Amplifikaten).

Die Membran wurde anschließend bei Raumtemperatur 2×5min in 2×SSC mit 0,1% SDS und anschließend 2×15min bei Hybridisierungstemperatur in 0,5×SSC mit 0,1% SDS gewaschen.

Die Detektion fand mit dem Storm 820 Phosphorimager und der Image Quant Software (Amersham) statt.

Hybridisierungspuffer:	5× SSC	
	Blockierungsreagenz	1 % (w/v)
	N-Laurylsarcosin	0,1 % (w/v)
	SDS	0,02 % (w/v)

2.2.12. Array CGH

Lebertumore bzw. Milzgewebe wurden über Nacht mit ProteinaseK Lysepuffer rotierend inkubiert. Die DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert. 25µg DNA wurde mit *Hae*III verdaut und mit Cy3 oder Cy5 unter Verwendung des ULS aRNA Fluorescent Labeling Kit (Kreatech) markiert. Cy5-ULS markierte Tumor-DNA wurde mit Cy3-ULS markierter Referenz-DNA (Milz vom gleichem Tier) gemischt und auf einen Mouse 3K BAC Array hybridisiert (Chung et al., 2004). Die Experimente wurden zweifach mit invers

markierten DNA-Proben durchgeführt. Die Mouse 3K BAC Arrays wurden von der NKI Microarray Facility (Amsterdam, Niederlande) hergestellt. Nach der Hybridisierung wurden die Arrays von einem Agilent Scanner eingelesen und die Daten mit der ImaGene Software prozessiert. Jeder Array der Fluoreszenz-Reversen-Hybridisierungen enthielt die BAC-Klone als Duplikate, um mögliche Fehlhybridisierungen besser ausschließen zu können, die Datenpunkte wurden in Vierfach-Messungen nach dem Rosetta Error Model (Hughes et al., 2000) analysiert. Die Fluoreszenz Signale wurden in \log_2 Werte konvertiert um Amplifikation bzw. Deletionen von Chromosomen oder Chromosomenabschnitten gleichermaßen gewichten zu können.

2.2.13.Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA wurde mit SuperScriptTMIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) durchgeführt. Es wurden 2 μ g Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese eingesetzt. 2 μ g Gesamt-RNA wurden mit 50 μ M Oligo(dT)₂₀ Primer und 10mM dNTP Mix 5min bei 65°C inkubiert und auf Eis gestellt. Danach wurde RT-Puffer, Magnesiumchlorid (5mM), DTT (0,01M), RNaseOUT (40U) und SuperScriptTMIII RT (200U) hinzugefügt und 50min bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde für 5min bei 85°C gestoppt und auf Eis gestellt. Abschließend wurde RNase H (2U) zugefügt und 20min bei 37°C inkubiert um die cDNA RNA-frei zu bekommen. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.14.Real Time PCR

Die quantitative Real Time PCR wurde mit Hilfe des ABI Prism 7700 Detectors unter Verwendung von SYBR Green bzw. Taqman Genexpression Assays (Applied Biosystems) durchgeführt. SYBR Green ist ein DNA-interkalierender Fluoreszenz-Farbstoff, das nach Bindung an doppelsträngige DNA detektiert werden kann, wobei die Intensität der Fluoreszenz direkt proportional zur vorhandenen DNA Menge ist. Nach einer initialen Aktivierung der HotStarTaqTM DNA-Polymerase durch 15min bei 95°C folgten 45 Zyklen zu jeweils 20sek bei 95°C, 20sek bei 56°C, 20sek bei 72°C und 20sek Messung. Bei der Verwendung der Taqman-Assays wurden 45 Zyklen zu jeweils 20sek bei 95°C und 60sek bei 60°C durchgeführt. Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von PCR-Zyklen. Alle Messungen wurden als Triplets und in mindestens zwei unabhängigen Läufen durchgeführt.

Für die Bestimmung der Trp53 Deletion wurde chromosomale DNA in der Real Time PCR eingesetzt (Primersequenzen: Trp53A: 5'-CAC AAA AAC AGG TTA AAC CCA G-3'; Trp53B: 5'-AGC ACA TAG GAG GCA GAG AC-3'; Trp53E: 5'-CCA TGA GAC AGG GTC TTG CT-3').

2.2.15. Genotypisierung mittels PCR

Die Genotypisierung der einzelnen Mausstämme erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion. Der Reaktionsablauf bestand aus drei Grundelementen:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA zur Herstellung eines Templates
2. Annealing, Anlagern der eingesetzten Primer an die Template-DNA
3. Amplifikation des komplementären DNA-Stranges, ds DNA entsteht

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Eppendorf) durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten ein Volumen von 25µl.

Der Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

Template-DNA	50-200ng
Reaktionspuffer (5×)	5µl
Primer	5pmol
Magnesiumchlorid	1,5-3,0mM
dNTP-Mix	0,2mM
Taq-Polymerase (Promega)	2U
H ₂ O dest.	ad 25µl

Der Ansatz wurde 5min bei 95° inkubiert, danach folgten 30 Zyklen mit folgenden Schritten durchgeführt:

Denaturierung	30sek bei 95°C
Annealing	30sek bei 55-60°C
Extension	1min bei 72°C

Danach erfolgte noch ein zusätzlicher Zyklus mit verlängerter Extensionszeit bei 72°C. Anschließend wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt. Jeweils 10 µl der Reaktionsansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.16. Isolierung von Gesamtprotein

Es wurden 50-100mg Gewebe zur Lyse in 500µl RIPA-Puffer aufgenommen und homogenisiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C für 15min. Der Gesamtprotein-Überstand wurde abgenommen und bei -80°C gelagert.

RIPA-Puffer	Tris-HCL, pH8	50mM
	Natriumchlorid	150mM
	NP-40	1%
	Deoxy Cholic Acid	0,5%
	SDS	0,1%
	Natriummetavanadat	1mM
	DTT	1mM
	Protease Inhibitor (Complete Mini; Roche, Mannheim)	1 Tablette in 10ml RIPA-Puffer
PMSF	1mM	

2.2.17. SDS-PAGE

Es wurden 50-200µg Protein im Polyacrylamid Gel aufgetragen. Für das Gel wurde ein 10%iges Separationsgel und ein 5%iges Sammelgel gefertigt. Als Laufpuffer wurde 1xSDS Puffer eingesetzt. Das Gel wurde mit 70V gestartet, bei Erreichen des Separationsgels wurde die Spannung auf 100V erhöht.

Separationsgel	Acrylamid (30:0,8)	10ml
	1,5M Tris, pH8,8	7,5ml
	dH ₂ O	12,2ml
	10% APS	300µl
	TEMED	30µl
Sammelgel	Acrylamid (30:0,8)	850µl
	0,5M Tris, pH6,8	625µl
	dH ₂ O	3,47ml
	10% APS	50µl
	TEMED	5µl

10x SDS Laufpuffer (1L)	Tris	30,3g
	Glycin	144g
	SDS	10g
	pH8,8	

2.2.18. Western-Blot

Das Acrylamid Gel wurde auf eine Immobilon-P Transfer Membran (Millipore) geblottet. Die Membran wurde zuvor kurz in Methanol dann in dH₂O und zuletzt in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer erfolgte für 30min bei einer Stromstärke von 300mA.

2.2.19. TRAP Assay

Der TRAP Assay (TRAPeZe[®] Telomerase Detection Kit, Chemicon) diente zum Nachweis von Telomerase Aktivität aus Geweben. Es wurde auf Trockeneis ein 2mm großes Gewebstück (Leber, Lebertumor) aus dem gesamten Gewebe herausgeschnitten und in CHAPS Lysis Buffer (enthielt 200U RNase Inhibitor/ml) aufgenommen und mit einem Plastik Pistel zerkleinert. Die Proben wurden 30min auf Eis inkubiert und anschließend bei 12000g und 4°C für 20min zentrifugiert. Der Überstand, welcher den Telomerase-Extrakt enthält wurde abgenommen, und die Proteinkonzentration ermittelt (BCA-Kit, Pierce). Anschließend wurde die Konzentration auf 200ng/μl eingestellt und 5μl Aliquots bei -80°C eingefroren.

Zur Detektion der Telomerase Aktivität wurde der Telomerase Substrat Primer TS radioaktiv markiert.

Markierungsreaktion für 10 Ansätze:	γ- ³² P-ATP	2,5μl
	TS Primer	10,0μl
	10x Kinase Puffer	2,0μl
	T4 Polynukleotid Kinase	0,5μl
	dH ₂ O	5,0μl

Die Markierung erfolgte für 20min bei 37°C, danach wurde 5min bei 85°C hitzeinaktiviert. Darauf folgte nach Ansatz des PCR-Mix die Telomerase-Reaktion (30min bei 30°C), in der die Telomerase den Substratprimer verlängert und die sogenannten

Telomeraseprodukte bildet. Anschließend fand eine 2-Schritt PCR mit 28 Zyklen (94°C 30sek, 60°C 30sek) statt, wobei die Telomeraseprodukte amplifiziert wurden.

PCR-Mix:	10x TRAP Reaktionspuffer	5,0µl
	50x dNTP Mix	1,0µl
	³² P-TS Primer	2,0µl
	TRAP Primer Mix	1,0µl
	GoTaq (Promega, 5U/µl)	0,4µl
	dH ₂ O	35,6µl
	Zellextrakt (200ng/µl)	5,0µl

Die Produkte wurden im 12,5% Polyacrylamidgel separiert (4Std., 200V) und mit dem Phosphorimager (Amersham) detektiert.

2.2.20.FACS-Analysen

Die Zellen wurden durch Leberperfusion gewonnen und in Ethanol fixiert. Die Hepatozyten wurden vor der Färbung abzentrifugiert (1000rpm) und mit PBS gewaschen. Für die jeweilige Färbung wurden 500.000 Zellen in 1ml 1xPBS aufgenommen und für 2Std. leicht schüttelnd auf einer Laborwippe mit dem jeweiligen Primär-Antikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde mit einem Fluoreszenz markiertem Sekundär-Antikörper für 1Std. inkubiert. Anschließend wurden sie im FACS Calibur Flow Cytometer (Becton Dickenson) analysiert. Seneszente Zellen wurden nach Literaturvorgabe (Gorbunova et al. 2003; Martin-Ruiz et al. 2004) nach Zellgröße im Forward Scatter (FSC) nach großen seneszenten und kleinen nicht-seneszenten Zellen eingeteilt.

2.3. Adenovirale Arbeitstechniken

2.3.1. Vermehrung von Adenoviren

Es wurden replikationsdefiziente Adenoviren des humanen Serotyps 5 verwendet. Die Vermehrung der Adenoviren fand in permissiven 293 Zellen statt, einer humanen, embryonalen Nierenzelllinie (ATCC CRL-1573), die durch die stabile Integration der adenoviralen E1 Region transformiert wurde und den viralen Defekt transkomplementiert (Graham & Prevec 1995).

Zur Herstellung infektiöser Viren wurden 293 Zellen bis zu einer Konfluenz von 60-70% in DMEM (supplementiert mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und mit einer MOI von 10 (Multiplicity of Infection) infiziert. Nach etwa 1-4 Tagen, wenn ein deutlicher zytopathischer Effekt (CPE) sichtbar wurde, wurden die Viren geerntet. Der CPE ist morphologisch durch Zellabrundung und dem Verlust der Adhäsionsfähigkeit der Zellen gekennzeichnet. Durch Auf- und Abpipettieren des Mediums wurde der Zellrasen vorsichtig resuspendiert und in ein 50ml Greinerröhrchen überführt. Nach 10min Zentrifugation bei 500g wurde das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen. Um eine möglichst hohe Ausbeute an infektiösen Partikeln zu erhalten, wurden 40 Kulturflaschen für eine Viruspräparation infiziert. Die Zellsuspensionen wurden während der Zentrifugations- und Waschschrte vereinigt, so daß die Zellen von zehn Kulturflaschen in einem Volumen von 2ml PBS aufgenommen werden konnten. Das Zellpellet mit den darin enthaltenen Viruspartikeln wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zur Aufreinigung der Adenoviren gelagert.

2.3.2. Isolierung und Aufreinigung von Adenoviren

Zur Lyse der Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und sofort wieder bei 37°C aufgetaut. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Suspension wurde bei 2000rpm und 4°C für 10min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Es folgte die Isolierung und Aufreinigung der Adenoviren mit einem Cäsiumchlorid-Dichtegradienten, bestehend aus jeweils 3,5ml CsCl₂ der Dichten 1,4g/ml und 1,2g/ml. Auf diesen Gradienten wurde jeweils in 4ml die Ernte von zwanzig Zellkulturflaschen aufgetragen. Bei 27500rpm (Beckmann Rotor SW-28) und 10°C wurde für 4Std. ultrazentrifugiert. Mit einer Kanüle (0,8mm) wurde die Virusbande durch seitliches Einstechen in das Röhrchen in einem möglichst kleinen Volumen aus dem

CsCl₂-Gradienten gezogen und mit 1 Vol. 2x Lagerungspuffer versetzt. Die Viruslösung wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

2x Lagerungspuffer	100µl 1M Tris-HCl, pH8,0
	200µl 5M Natriumchlorid
	10µl 1M Magnesiuchlorid
	5ml Glycerol
	4,69ml dH ₂ O
	100µl 10% BSA (frisch präpariert)
	sterilfiltriert

2.3.3. Titerbestimmung der Adenoviren

Der Gehalt an viralen Partikeln wurde photometrisch durch die Bestimmung der OD bei 260nm einer 1:20 Verdünnung in 0,1% SDS ermittelt. Eine OD₂₆₀=1 entspricht 10¹² viralen Partikeln/ml. Zur Bestimmung virulenter Partikel (Plaque Forming Units, PFU), wurde eine Titerbestimmung mit Hilfe des Plaque Assays durchgeführt. Es wurde eine Konzentration nach OD₂₆₀ Messung von 1x10¹⁰ Viruspartikel/ml eingestellt. Aus dieser Stocklösung wurden Verdünnungsstufen mit Infektionsmedium hergestellt. 1ml Infektionsmedium der jeweiligen Verdünnungsreihe (0,5x10²-10⁵) wurde im doppelten Ansatz auf 70% konfluente 293-Zellen (Ø 6cm Zellkulturschalen) gegeben, und für 2Std. langsam schüttelnd bei RT inkubiert. Danach wurde das Infektionsmedium vollständig abgenommen. Man geht davon aus, dass alle infektiösen Viruspartikel innerhalb dieser Zeit eine Zelle infizieren konnten. 5ml Maintenance-Medium wurden mit Seaplaque-Agarose gemischt und auf jede Zellkulturschale gegeben. Die Viruspartikel wurden somit an einer Ausbreitung im Zellkulturmedium gehindert, und konnten jeweils nur benachbarte Zellen nach Lyse der Wirtszelle infizieren, sodass am Ende des Assays es zu nur einer Plaquebildung pro erstinfizierter Zelle kam. Nach weiteren 48Std. wurden weitere 5ml Maintenance-Medium inkl. Seaplaque-Agarose zur Nährstoffversorgung vorsichtig hinzugegeben. Die Zellen wurden jeweils bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 96-120Std. wurden die Plaques ausgezählt. Ein Plaque entspricht einem infektiösem Viruspartikel.

Infektionsmedium:	49ml RPMI-Medium
	500µl HEPES (10%)
	500µl BSA (10%)
	sterilfiltriert
Maintenance-Medium:	85ml DMEM-Medium
	10ml Tryptose Phosphate Broth
	2ml FBS
	2ml 1M MgCl ₂
	1ml Pennicillin/Streptomycin-Lösung
	469mg Seaplaque-Agarose (zuvor in 12,5ml dH ₂ O gelöst)

2.3.4. Dialyse von Adenoviren für intravenöse Injektionen

Zur Infektion von Mäusen mit Adenoviren ist ein Austausch des Lagerungspuffers des Adenovirus gegen ein physiologisches Medium mit Hilfe einer Dialyse notwendig. Da Adenoviren in glycerolfreien, physiologischen Medien nur begrenzt haltbar sind, wurde die Dialyse erst kurz vor Beginn der Infektionsversuche durchgeführt.

Es wurde hierzu das zu verabreichende Adenovirusvolumen in eine zuvor im Dialysepuffer äquilibrierte Dialysekassette (Pierce, Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, 10000 MWCO) mit einer Kanüle (0,8mm) injiziert. Anschließend wurde die überschüssige Luft aus der Kassette abgezogen. Dialysiert wurde für 16h bei 4°C gegen Dialysepuffer, der einmal nach 12h ausgetauscht wurde. Danach wurde die Virussuspension aus der Kassette abgezogen und das Volumen erneut bestimmt, da infolge der Dialyse eine Volumenänderung auftritt.

Dialysepuffer	20ml 1M Tris-HCl, pH8,0
	2ml 1M Magnesiumchlorid
	56ml 5M Natriumchlorid
	ad 2L dH ₂ O

2.4. Tierexperimentelle Methoden

Alle Tierexperimentellen Methoden wurden unter Berücksichtigung der im Tierschutzgesetz verankerten Richtlinien durchgeführt.

2.4.1. Tierhaltung

Die spezifisch pathogenfreien Tiere wurden in den zentral klimatisierten Tierräumen des Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover mit einem Temperaturbereich von 20-24°C und einer Luftfeuchte von 50-60% in IVC-Käfigen gehalten und verpaart. Es herrschte ein 14 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Den Tieren stand Futter (Fa. Altromin) und Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung.

2.4.2. Injektionen

Die Injektion von Adenoviren erfolgte intravenös in die Schwanzvene in Konzentrationen von 4×10^9 – 20×10^9 infektiösen Viruspartikeln.

2.4.3. Töten der Tiere und Gewebeentnahme

Das Töten der Tiere erfolgte nach einer CO₂-Narkose durch Genickbruch. Anschließend wurden die Organe entnommen, ein Teil für Gefrierschnitte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die beiden medianen Leberlappen wurden ü/N in 4% Formalin fixiert und dann quer in 4 Abschnitte geteilt und in Paraffin eingebettet. Für die histologische Analyse wurden H&E-Färbungen angefertigt.

2.4.4. Dissektion der Tumore

Lebertumore wurden nach dem Töten der Tiere halbiert. Eine Hälfte wurde mit angrenzendem normalem Lebergewebe in Formol fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die andere Hälfte wurde vom normalen Lebergewebe abgetrennt und bei -80°C schockgefroren. Die Gefrierproben wurden zur DNA-,RNA- und Protein-Isolierung genutzt.

2.4.5. Leberperfusion

Zur Durchführung von FACS-Analysen und zur Herstellung von Metaphasen wurden Einzelzellsuspensionen von Hepatozyten benötigt, welche mittels Leberperfusion gewonnen wurden.

Das Tier wurde mit Ketanest/Rompun anästhesiert. Die Lösungen wurden vorab 30min bei 37°C vorgewärmt und während der ganzen Perfusion bei 37°C bewahrt. Die Maus wurde median aufgeschnitten und eine Kanüle in die untere Hohlvene (Vena cava inferior) gelegt. Die Leber wurde mit KRB2 (Krebs-Ringer-Buffer 2) für 3min durchspült bis die Leber blutleer war. Kurz nach Beginn der Spülung war ein Anschwellen der Leber und Gefäße zu erkennen, als Ablauf wurde die Pfortader (Vena portae) durchtrennt. Anschließend wurde mit KRB3 Puffer die Leber für 5min perfundiert (ca. 50ml KRB3 Puffer).

Die Leber wurde in 1xPBS in einer sterilen Petrischale aufgenommen und die Leberzellen wurden vorsichtig mit einer Pinzette aus der Leber ausgeklopft. Die Zellen wurden bei 500rpm für 3min abzentrifugiert und anschließend durch einen 70µm Filter zum Abtrennen von Zellaggregaten gegeben. Das Zellpellet wurde für FACS-Analysen in 3ml 1xPBS aufgenommen und anschließend unter vortexen 7ml 100% EtOH tropfenweise zur Fixierung der Zellen hinzugefügt. Die fixierten Zellen wurden kurzzeitig in 70% EtOH bei 4°C aufbewahrt.

KRB1	9g	NaCl
	0,42g	KCl
	0,99g	Glukose
	2,1g	Natriumhydrogencarbonat
	20ml	1M HEPES
	ad 1L	dH ₂ O
		pH 7,4

KRB2	100ml	KRB1
	1ml	0,1M EDTA

KRB3	100ml	KRB1
	4,5ml	11mM Calciumchlorid
	50mg	Collagenase IV (Sigma)

2.4.6. Herstellung von Metaphase Spreads nach Colcemid Behandlung

Den Mäusen wurden intraperitoneal 20mg einer Demecolcine Lösung (Sigma) verabreicht. 24Std. darauf wurde eine Leberperfusion durchgeführt und die Hepatozyten gewonnen. Die aufgereinigten und abzentrifugierten Hepatocyten wurden mit 1xPBS gewaschen und

anschließend in 0,075M KCl bei 37°C für 30min inkubiert. Darauf wurden die Zellen 2x in 1xPBS gewaschen und anschließend in 15min Methanol-Eisessig (3:1) bei RT fixiert. Die Zellen wurden 5min bei 800rpm abzentrifugiert. Der Fixierungsschritt mit anschließender Zentrifugation wurde 4x wiederholt, um eine bessere Qualität bei den Metaphase Spreads zu erzielen. Die fixierten Zellen wurden auf Objektträger aufgetropft und getrocknet. Anschließend wurden Sie mit einer Cy3 gelabelten telomerspezifischen PNA-Probe hybridisiert und DAPI gefärbt, um Fusionen und Verlust von Telomersequenz sichtbar zu machen.

2.5. Histologische Methoden

2.5.1. H&E-Färbung

Die H&E-Färbung (Hämalaun und Eosin) ist eine klassische Färbemethode, zur Beurteilung der Morphologie eines Gewebeschnittes. Hierbei sind die Zellkerne blau und das Zytoplasma blassrosa eingefärbt. Diese Färbung wurde auf 5µm Paraffin-Gewebeschnitten (Zell- und molekulare Pathologie, MHH) durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte zunächst 15min in Xylol deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (abs., 90% und 70% Ethanol) gewässert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte für 5-10sek in Hämalaun getaucht und anschließend für 5min in lauwarmem Leitungswasser gespült. Es folgte kurzes Waschen in dest. Wasser, danach wurden die Schnitte 2min in einer mit Eisessig angesäuerten Eosinlösung gefärbt. Nachfolgend wurden die Schnitte in dest. Wasser gewaschen, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und abs. Ethanol) behandelt und in Xylol bis zum Eindecken mit Entellan gelagert.

2.5.2. Feulgen-Färbung

Die Feulgen Färbung dient der Bestimmung des DNA-Gehalts von Zellkernen. Dazu wird die genomische DNA mit Schiff's Reagenz angefärbt und die Intensität anhand von Mikroskopbildern ausgewertet.

Paraffinschnitte (4µm) wurden für 15min in Xylol deparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (abs. Ethanol, 90%, 70%) gewässert. Die Schnitte wurden für eine Stunde in 4% gepuffertem Formaldehyd (pH7) bei Raumtemperatur fixiert und darauf

kurz in Wasser gewaschen. In 5%-iger HCl wurden für 50min die Purinbasen der DNA durch Hydrolyse abgespalten. Danach wurden die Schnitte in Wasser gewaschen und exakt 20min mit Schiff's Reagenz gefärbt, wobei der enthaltene Farbstoff Pararosanilin an die nun freiliegenden Aldehydgruppen der DNA gebunden wurde. Anschließend wurde kurz in Wasser inkubiert. Nicht gebundener Farbstoff wurde zusätzlich für 20min mit Sulfidwasser aus dem Zytoplasma und den Zellkernen gewaschen und danach die Schnitte für 5min in Leitungswasser geschwenkt. Durch eine anschließende aufsteigende Alkoholreihe (jew. 2x 1min 70%, 90%, abs. Ethanol, anschließend noch einmal 2min abs. Ethanol) wurden die Schnitte entwässert und anschließend nach kurzem Schwenken in Xylol mit Entellan eingedeckt. Die Färbung wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und mit dem Ahren's Computerprogramm ausgewertet (Pathologie, MHH). Dabei wurden pro Schnitt mindestens 300 Zellkerne sowie 30 Lymphozyten als Referenzzellkerne ausgewertet. Es wurde darauf geachtet, dass bei den Messungen die Kriterien der von der ESACP (European Society of Analytical Cellular Pathology) vorgeschlagenen Richtlinien zur Qualitätssicherung eingehalten wurden (u.a. CV der Referenzzellen <5%, Korrelationskoeffizient Kernfläche IOD der Referenzzellen ($r < 0,4$), etc.).

2.5.3. Telomerlängenbestimmung

Die Bestimmung der Telomerlänge erfolgte mit Hilfe einer Cy3 markierten telomerspezifischen PNA Sonde (cy3-OO-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA), welche die Telomere *in situ* markiert und anschließend die Intensität der Signale quantitativ mittels Computersoftware (Poon et al., 1999) auswertet. Die Menge gebundener Sonde und damit die Intensität der positiven Signale ist direkt proportional zur Telomerlänge. Paraffinschnitte (5 μ m) wurden deparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe gewässert gefolgt von zweimaligem Waschen in 1x PBS. Permeabilisiert wurde in 0,01M Citratpuffer. Hierfür wurden die Schnitte im Citratpuffer in der Mikrowelle bei 800W für 5min zum Kochen gebracht. Anschließend wurde sie 10min bei 240W weiter in der Mikrowelle inkubiert und danach für 30min bei RT abgekühlt. Nach Waschen in 1x PBS folgte für 15min bei 37°C die Denaturierung der im Gewebe vorhandenen Proteine in einer vorgewärmten Pepsinlösung. Anschließend wurden die Schnitte in 1xPBS gewaschen und in 4% Formaldehyd für 2min fixiert. Dem Waschen in 1xPBS folgte nun die Dehydrierung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und abs. Ethanol). Nach Trocknen der Schnitte wurden 15 μ l der Hybridisierungslösung auf die Proben gegeben

und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Bei 80°C wurde die DNA für 3min denaturiert und anschließend für 2 Stunden bei RT in einer feuchten Kammer mit der Sonde inkubiert. Die Deckgläschen wurden anschließend in Waschpuffer schüttelnt entfernt und die Schnitte erneut im Waschpuffer für 15min gewaschen. Nach 3x5min waschen in TBS-Tween wurde mit DAPI Mounting Medium eingedeckt. Die Telomersignale wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes und einer Digitalkamera bei konstanten Einstellungen angefertigt. Die Bilder wurden anschließend mit Hilfe des TFL-TELO V1.0a Programms ausgewertet (Poon et al., 1999).

100x Citratpuffer	Zitronensäure	1M
	Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat pH 6,0	1M
Pepsin-Lösung	200mg Pepsin	
	168µl 37%ige HCL	
	ad 200ml dH ₂ O	
Hybridisierungslösung	2,5µl 1M Tris pH 7,2	
	21,4µl Magnesiumchlorid-Puffer pH 7,0	
	175µl deionisiertes Formamid	
	12,5µl Blocking Reagenz (10% Lösung, Roche)	
	5µl PNA Telomer-Probe (25µg/ml, Applied Biosystems)	
	33,6µl dH ₂ O	
Magnesiumchlorid-Puffer	Magnesiumchlorid	25mM
	Zitronensäure	9mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	82mM
Waschpuffer	Formamid	70%
	Tris pH7,2	10mM
	BSA	0,1%

2.5.4. Markierung von FISH-Sonden

Es wurden Sonden aus BAC-Klonen hergestellt, mit denen chromosomale Abberationen in Interphase Zellkernen nachgewiesen werden sollten. Die BAC-DNA wurde mit dem BACMAX Kit (Epicentre) isoliert. Es wurden 200ng BAC DNA in 5µl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen und mit 20µl 2,5x Random Primer gemischt und 5min bei 97°C inkubiert. Es wurde auf Eis abgekühlt, 5µl dNTP Mix hinzugegeben und auf 50µl mit dH₂O aufgefüllt. Nach Zugabe von 1µl Klenow Fragment (40U/µl) wurde für 3Std. bei 37°C inkubiert und danach mit 5µl Stop-Puffer (0,5M EDTA) die Reaktion beendet. Die Sonde wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

dNTP-Mix	1,0µl	dATP	10mM
	1,0µl	dCTP	10mM
	1,0µl	dGTP	10mM
	0,5µl	dTTP	10mM
	2,0µl	dUTP-Cy3	25nmol

2.5.5. FISH (Fluoreszenz In Situ Hybridisierung)

Die Präparate wurden wie bei der Q-FISH Methode bis zum Hybridisierungsschritt behandelt. Die Objektträger wurden mit 40µl Hybridisierungsmix beschichtet und mit Deckgläschen und flüssigem Kleber versiegelt. Die Proben wurden bei 80°C für 10min denaturiert und anschließend bei Dunkelheit über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde 4x für 15min in 2xSSC bei 50-65°C (in Abhängigkeit von der Probe) gewaschen. Abschließend wurde mit DAPI-Fluoreszenz-Mounting-Lösung (DAKO) eingedeckelt.

Hybridisierungslösung	100µl	deionisiertes Formamid
	50µl	20xSSC
	16µl	CotI-DNA (1mg/ml, Invitrogen)
	8µl	Herringssperm-DNA (10mg/ml, Sigma)
	2µl	100x Denhardts Lösung
	2µl	Chaps (10µg/ml)
	2µl	0,5M EDTA, pH8,0
	4µl	fluoreszenz markierte Probe
	20,8µl	dH ₂ O

2.5.6. Immunhistochemische-Färbungen

Es wurden 4µm Paraffinschnitte angefertigt und in Xylol deparaffiniert. In einer absteigenden Ethanolreihe wurden die Präparate gewässert und anschließend zweimalig in PBS inkubiert. Permeabilisiert wurde in 10mM Citratpuffer, hierfür wurde zuerst in der Mikrowelle bei 800W für 5min die Lösung zum Sieden gebracht und anschließend für 10min bei 240W kurz unterhalb des Siedepunktes weiter inkubiert. Nach 30min Abkühlung wurde mit PBS gewaschen und mit dem Erstantikörper zum Nachweis des jeweiligen Proteins über Nacht bei 4°C inkubiert (mouse anti-TRF2-Antikörper, 1:300 in PBS, Upstate; mouse anti-γH2AX, 1:1000, Upstate; mouse anti-PCNA, 1:250 in PBS Santa Cruz). Da der γH2AX Antikörper einen relativ hohen Hintergrund aufwies, wurde bei dieser Färbung der M.O.M. Kit (DAKO) verwendet. Der Zweitantikörper (rabbit anti-mouse-cy3, 1:300 in PBS, Sigma; rabbit anti-mouse-FITC, 1:200 in PBS, Zymed; rabbit anti-mouse-HRP, 1:300 in PBS, Zymed) wurde für 1Std bei RT inkubiert. War der Zweitantikörper mit einer Peroxidase gekoppelt so wurde noch 10min mit AEC- oder DAB-Lösung inkubiert.

2.5.7. TUNEL-Assay (Apoptosenachweis)

Die Fragmentierung der DNA wird als ein biochemisches Schlüsselereignis der Apoptose angesehen. Die dabei auftretenden DNA-Strangbrüche können dargestellt werden, indem die freiliegenden 3'-OH-Enden in einer enzymatischen Reaktion mit modifizierten Nukleotiden markiert werden. Beim TUNEL-Assay (TdT-mediated dUTP nick labeling) markiert die terminale-desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) die durch Strangbrüche freiliegenden 3'-OH-Enden mit Fluoreszein-markierten Nukleotiden. Die apoptotischen Zellkerne können dadurch fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden.

Fixierte und bei -20°C gelagerte Gefrierschnitte aus Lebergewebe wurden für 15min aufgetaut. Nach zweimaligem Waschen in 1xPBS erfolgte eine Inkubation in Proteinase-K-Lösung (15 µg/ml) für 30 min. Nach einem weiteren Waschschrift in 1xPBS wurden die Schnitte für 10min in einer Permeabilisierungslösung (0,1% TritonX-100, 0,1% Natriumcitrat) auf Eis inkubiert. Auf den nächsten Waschvorgang mit 1xPBS folgte die Zugabe des TUNEL-Mixes auf die Schnitte, es schloß sich eine Inkubation bei 37°C für 2Std. in einer feuchten Kammer an. Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS erfolgte die Auswertung an einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 456 nm.

2.5.8. Seneszenz-Färbung (SA- β -GAL-Färbung)

Für die Seneszenz-assoziierte- β -GAL-Färbung wurden 7 μ m Gefrierschnitte für 30min in 4% Formalin fixiert und anschließend dreimal für 5min in PBS gewaschen. Darauf folgte eine 14-16stündige lichtgeschützte Inkubation bei 37°C in Seneszenz-Färbelösung. Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte eine Hematoxylin Kernfärbung. Seneszente Zellen zeigten ein blaues Zytoplasma.

Seneszenz-Färbelösung:

Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer	40mM
Natriumchlorid	1M
Kaliumhexacyanoferrat (II)	5mM
Kaliumhexacyanoferrat (III)	5mM
Dimethylformamid	2%
Magnesiumchlorid	20mM
X-Gal	50mg
dH ₂ O	ad 50ml
pH 5,2-6,0	

3. Ergebnisse

3.1. Mausmodell der Crisis induzierten Hepatokarzinogenese

3.1.1. Mausmodell

Das humane hepatozelluläre Karzinom (HCC) zeigt vier molekularbiologische Kennzeichen, die auch das Crisis-Stadium in Antwort auf Telomerdysfunktion kennzeichnen (siehe Einleitung):

- 1.) Über 80% der HCC zeigen eine Telomerverkürzung.
- 2.) Rund 70% humaner HCC sind durch einen Verlust des p53-Kontrollpunktes gekennzeichnet.
- 3.) Über 95% aller Tumore weisen chromosomale Instabilität (CIN) auf.
- 4.) In mehr als 90% liegt eine Reaktivierung der Telomerase vor (welches ein Kennzeichen von Zellen ist, die das Crisis-Stadium überleben)

Ziel meiner Arbeit war es, diese Merkmale des menschlichen HCC im Mausmodell der Hepatokarzinogenese zu untersuchen, um 1. p53-unabhängige Signalwege die das Tumorwachstum im Crisis-Stadium inhibieren zu detektieren und 2. den Einfluss von Telomerase auf den Tumorprogress im Crisis-Stadium zu analysieren.

Alle verwendeten transgenen Mausmodelle lagen in Rückkreuzung auf den C57BL/6J Mausstamm vor (mindestens vierfache Rückkreuzung mit C57BL/6J Wildtypmäusen; Charles River Wiga). Andere Inzuchtstämme wie z.B. FVB/NJ besitzen bis zu 200kb lange Telomere (Hemann et al., 2000). Demgegenüber besitzt der Laborstamm C57BL/6J mit 30-40kb relativ kurze Telomere. Dies war von Vorteil, um im Mausmodell kritisch kurze Telomere zu erzeugen. Telomerase Knockout führt im C57BL/6J Hintergrund nach 3-4 Generationen zu kritisch kurzen Telomeren. Im Gegensatz werden 6-7 Generationen in anderen Hintergründen benötigt (Blasco et al., 1997).

Zur Generierung des Mausmodells der Crisis induzierten Hepatokarzinogenese wurden mTERC^{-/-} Mäuse (Blasco et al., 1997), bei denen die RNA Komponente der Telomerase fehlt, mit konditionellen p53 Knockout Mäusen gekreuzt (Jonkers et al., 2001). Die Deletion der RNA-Komponente in den mTERC^{-/-} Mäusen führte zum Verlust von Telomeraseaktivität. Kreuzt man mTERC^{-/-} Mäuse miteinander, so verkürzten sich die

Telomere von Generation zu Generation (Abb.10), da alle Zellteilungen während der Embryogenese in Abwesenheit von Telomerase stattfinden und sich aufgrund des Endreplikations-Problems (siehe Einleitung) die Telomere deswegen verkürzen. In unseren Versuchen konnten mTERC^{-/-} Mäuse bis in die vierte Generation gekreuzt werden (G4 mTERC^{-/-}). In dieser Generation trat Infertilität, kleiner Wuchs und vorzeitige Alterung der Tiere auf.

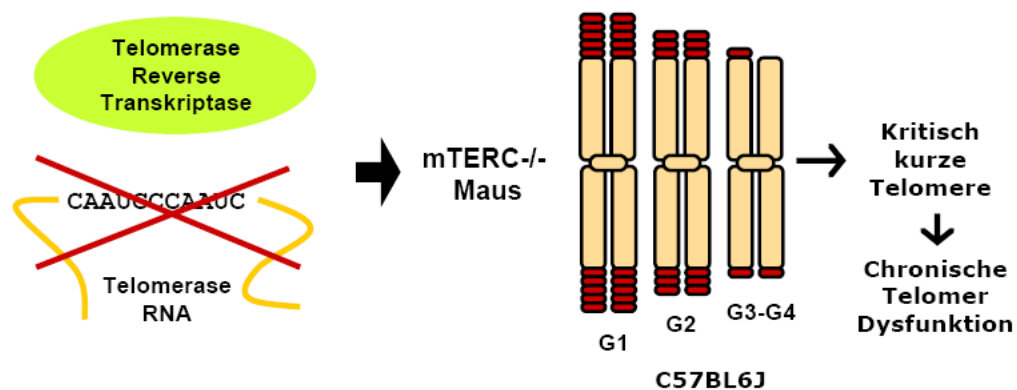


Abb. 10: Modell der mTERC^{-/-} Maus. Die Funktion des Enzymkomplexes Telomerase wird durch die Deletion der Telomerase RNA Komponente ausgeschaltet. Kreuzt man mTERC^{-/-} miteinander, so verkürzen sich die Telomere von Generation zu Generation. In C57BL/6J mTERC^{-/-} Mäusen entstehen in der 3.-4. Generation kritisch kurze Telomere, welche zu einer chronischen Telomerdysfunktion führen.

Als weiteres Knockout Mausmodell wurden konditionelle p53 Knockout Mäuse eingekreuzt (Jonkers et al., 2001). Diese Mäuse zeigen *per se* keinen Phänotyp. Bei diesen Mäusen sind in Intron 2 und 10 des *Trp53* Gens jeweils eine loxP-Sequenz inseriert (Abb.11). LoxP Sequenzen können durch das Enzym Cre-Rekombinase miteinander rekombiniert werden, wodurch es in den verwendeten Mäusen zur Deletion von Exon 2-10 des *Trp53* Genlokus kommt. Infolgedessen wird kein funktionelles p53 Protein mehr gebildet und es liegt ein funktioneller Knockout des *Trp53* Gens vor.

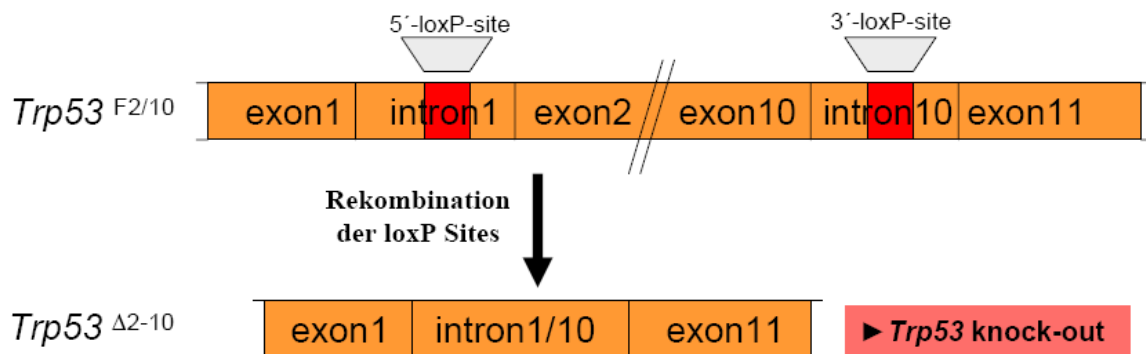


Abb. 11: Modell der konditionellen p53 Knockout Maus. Dargestellt ist das gefloخته (durch 2 LoxP-Sequenzen flankierte) *Trp53* Gen ($Trp53^{F2-10}$), welches nach Rekombination eine Deletion von Exon 2 bis Exon 10 aufweist ($Trp53^{\Delta2-10}$) und somit einen funktionellen Knockout darstellt.

Die konditionellen p53 Knockout Mäuse wurden homozygot ($Trp53^{F2-10/F2-10}$) mit heterozygoten mTERC^{+/-} Mäusen gepaart. Die aus dieser Kreuzung entstandenen $Trp53^{F2-10/+}$, mTERC^{+/-} Mäuse wurden im zweiten Schritt untereinander verpaart, um $Trp53^{F2-10/F2-10}$, G1 mTERC^{-/-}-Mäuse herzustellen (G1 = erste Generation mTERC^{-/-}). $Trp53^{F2-10/F2-10}$, G1 mTERC^{-/-} wurden dann untereinander gekreuzt, um $Trp53^{F2-10/F2-10}$, G2 mTERC^{-/-} Mäuse und schließlich $Trp53^{F2/10,F2/10}$, G3mTERC^{-/-} herzustellen. Parallel wurden $Trp53^{F2-10/F2-10}$, mTERC^{+/-}, HBsAg⁺ Mäuse hergestellt. HBsAg⁺ Mäuse exprimieren das Hepatitis B Oberflächen (surface) Antigen unter dem Leber-spezifischen Albuminpromotor. Die Leber-spezifische Expression von HBsAg löste in diesen Mäusen eine chronische Leberschädigung aus, wodurch eine chronische Proliferation der Hepatozyten induziert wird (Chisari et al., 1989). Dieses Modell erlaubt somit, das für die menschliche Hepatokarzinogenese typische Kennzeichen der chronischen Organschädigung und Regeneration nachzuahmen. In HBs⁺ Mäusen führt die chronische Leberschädigung im Alter von 12-20 Monaten zur Entstehung von hepatozellulärem Karzinom (Dunsford et al., 1990). In unseren Versuchen wurden $Trp53^{F2-10/F2-10}$, mTERC^{+/-}, HBsAg⁺ Mäuse mit $Trp53^{F2-10/F2-10}$, G3 mTERC^{-/-}, HBsAg⁻ Mäusen verpaart. Aus dieser Kreuzung wurden die zwei experimentellen Kohorten gewonnen, die sich bezüglich des Telomerasegenotyps unterschieden und in unseren Studien untersucht wurden (Abb.12):

1. iF1 G4 mTERC^{-/-}, $Trp53^{F2-10/F2-10}$, HBs⁺
2. iF1 mTERC^{+/-}, $Trp53^{F2-10/F2-10}$, HBs⁺

Die eine Gruppe hatte einen Telomerase Verlust durch das Ausschalten der Telomerase RNA Komponente, die andere Gruppe war heterozygot für die Telomerase RNA Komponente und hatte somit einen funktionsfähigen Telomerase Komplex.

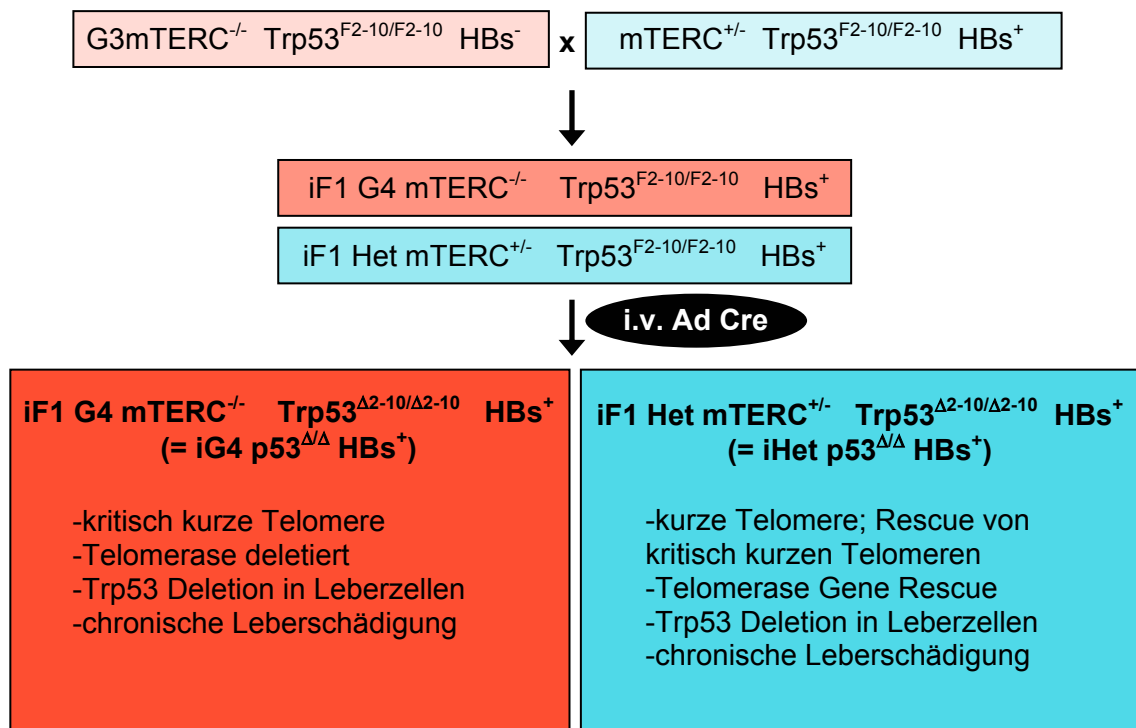


Abb. 12: Kreuzungsschema und molekulare Charakteristika der beiden Versuchskohorten. Durch eine intravenöse Injektion eines nicht replizierenden Ad Cre (8×10^9 PFU) kommt es zur Expression von Cre-Rekombinase in der Leber, wodurch leberzellenspezifisch $Trp53$ durch Rekombination der loxP Sequenzen deletiert wird.

In den aus dieser intermediären Kreuzung entstandenen Mauskohorten wurden im folgenden mittels Adenovirus Cre Expression das $p53$ Gen deletiert (siehe unten) und die Mäuse wurden wie folgt bezeichnet: $iG4 p53^{\Delta/\Delta} HBs^{+}$ bzw. $iHet p53^{\Delta/\Delta} HBs^{+}$.

3.1.2. Ausschnitt von $Trp53$ mittels Ad Cre

Das $Trp53$ Gen in der Leber wurde in diesem Mausmodell durch eine einmalige Applikation von 8×10^9 PFU Ad Cre deletiert (es wurde ein humaner Serotyp 5 Adenovirus verwendet, in dem eine cDNA zur Expression der Cre-Rekombinase inkliniert wurde). Dieser Virus exprimiert Cre-Rekombinase, was zur Deletion von $Trp53$ in transduzierten Zellen führte (siehe oben). Der Adenovirus wurde über die Schwanzvene in 4 Monate alte Mäuse injiziert. In einem Vorversuch wurden 3 unterschiedliche Konzentrationen von Ad Cre injiziert, um einen möglichst effizienten Ausschnitt von $Trp53$ hervorzurufen, ohne eine große Schädigung seitens des Adenovirus zu bewirken, da Adenovirus eine Lebertoxische Wirkung bei hohen Titer ($> 2 \times 10^{10}$ PFU) zeigt. Die Leber wurde 4 Tage nach Ad Cre i.v. Injektion analysiert. Aus der Leber wurde chromosomale DNA isoliert und mit $BglIII$ verdaut. Mit einer spezifischen $Trp53$ -DNA-Sonde konnte sowohl das deletierte

Trp53 (9,4kb Bande nach *Trp53* Deletion) als auch das gefloخته *Trp53* (18kb Bande) nachgewiesen werden (Abb.13). Es wurde hier eine recht gute Korrelation des Ausschnitts von *Trp53* und dem applizierten Adenovirustiter festgestellt. Bei einem Titer von 12×10^9 PFU wurden 90% der Leberzellen *Trp53* deletiert, bei 8×10^9 PFU 70% und mit 4×10^9 PFU 20%.

Vorversuche hatten gezeigt, dass Adenovirus Infektion nicht zu einer signifikanten Infektion von anderen Organen führte (Rudolph et al., Science 2000).

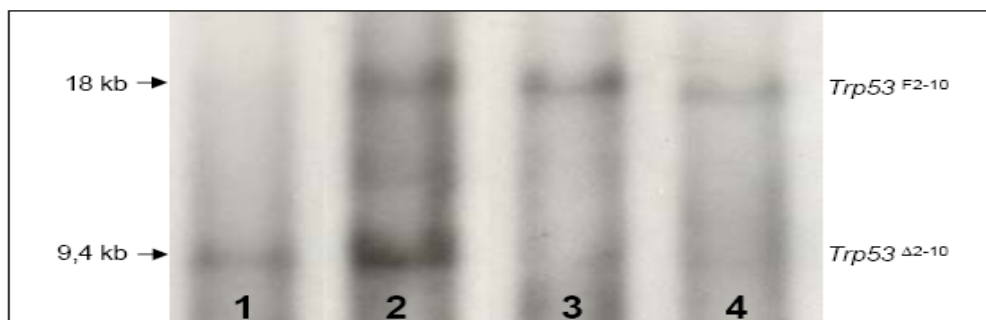


Abb. 13: Southern Blot *Bgl*III verdauter genomischer DNA (Leber) 4 Tage nach Ad Cre Injektion (1: 12×10^9 PFU; 2: 8×10^9 PFU; 3: 4×10^9 PFU; 4: ohne Ad Cre Injektion) zum Nachweis der *Trp53* Deletion. Für weitere Versuche wurden 8×10^9 PFU injiziert.

3.1.3. Tumorinzidenz

Beide Mauskohorten wurden zweimal wöchentlich kontrolliert. Im Alter von 12-15 Monaten entwickelten sich in beiden Mauskohorten (iG4 $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs⁺ und iHet $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs⁺) Lebertumore (Abb.14, 15). Die Tumore imponierten teilweise als abdominelle Tumore im rechten Oberbauch.

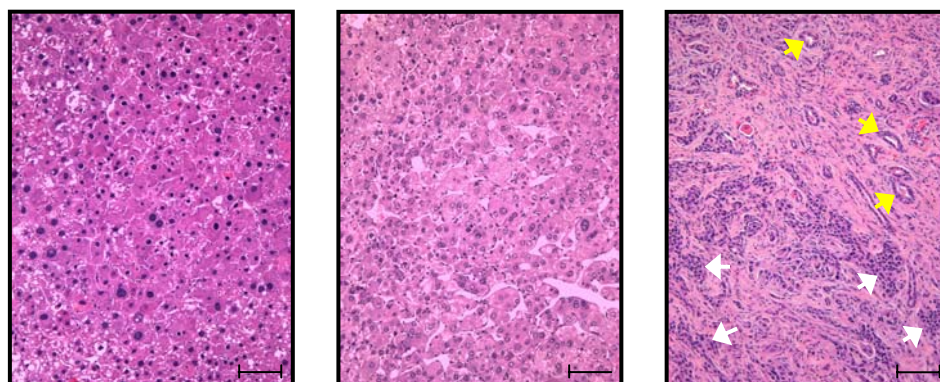


Abb. 14: Repräsentative Bilder von H&E gefärbten Histologien von solidem HCC (links), trabekulärem HCC (mitte) und szirrhösem HCC das sich aus hepatozellulärem Karzinom (weiße Pfeile) und cholangiozellulärem Karzinom (gelbe Pfeile) zusammensetzt (rechts) (Vergrößerungsbalken: 100 μ m).

Alle Mäuse wurden im Alter von 12-15 Monaten getötet, um die Inzidenz makroskopischer Lebertumore nach Dissektion der Leber zu quantifizieren. Das Durchschnittsalter war in beiden Kohorten nicht signifikant unterschiedlich (Durchschnittsalter: 12,8 Monate in iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen und 13,6 Monate in iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen; p=0,27). Entwicklung makroskopischer Tumore war in iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen (n=17 Mäuse; n=25 Tumore) verglichen zu iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen (n=15 Mäuse; n=98 Tumore) deutlich unterdrückt (p=0,001) (Abb.15).

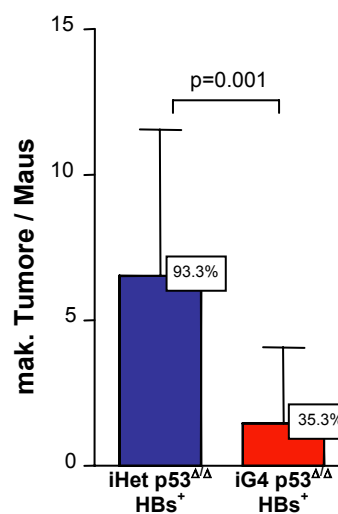


Abb. 15: Tumorinzidenz makroskopischer Tumore von iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ und iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen. Die Zahl in den Kästen zeigt den Prozentsatz der Mäuse mit makroskopischem Tumor. Das Säulendiagramm zeigt die mittlere Anzahl makroskopischer Tumore pro Maus.

Durch histologische Analysen wurden 25,2% aller Tumore als prämaligene Knoten (dysplastische Foci) und 59,3% der Tumore als HCC (hepatozelluläres Karzinom) eingestuft. Die Tumorinzidenz und die durchschnittliche Anzahl an dysplastischen Foci und HCC war in iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen deutlich verringert (Abb.16). 23,5% aller iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäuse zeigten HCC (n=13 HCCs), während in der Gruppe der iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Kohorte 80% der Mäuse ein oder mehr HCCs entwickelten (n= 60 HCCs).

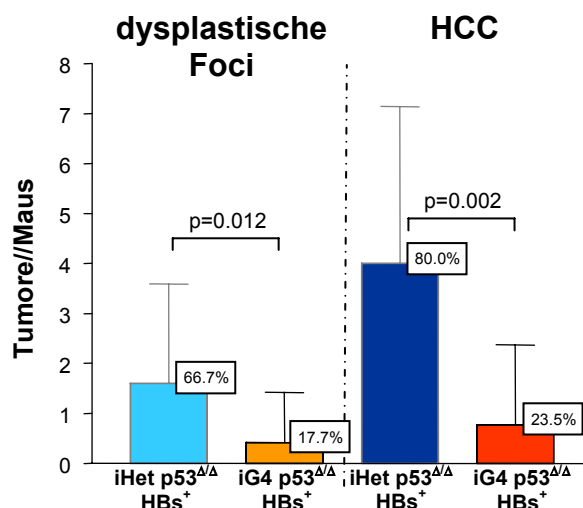


Abb. 16: Inzidenz von dysplastischen Foci und HCC in iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ und iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen. Die Zahl in den Kästen beschreibt den prozentualen Anteil der Mäuse mit dysplastischen Foci bzw. HCC. Die Säulendiagramme zeigen die durchschnittliche Anzahl der entsprechenden Tumore in den beiden Mäuskohorten, die Errorbars zeigen die Standardabweichung.

Die histologische Einstufung der Tumordifferenzierung wurde von einem Pathologen vorgenommen (Prof. Schirmacher, Heidelberg) und zeigte in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Es kamen in beiden Gruppen gut differenzierte, mäßig differenzierte als auch schlecht differenzierte HCC vor (Abb.17).

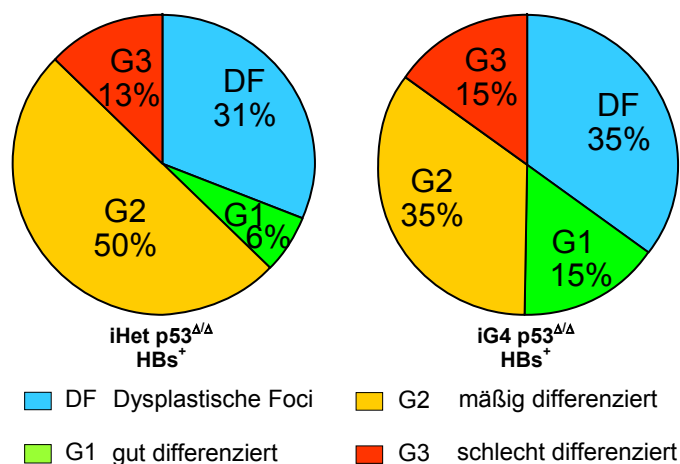


Abb. 17: Histologische Einstufung der Differenzierung der makroskopischen Lebertumore von iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ und iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen

Die histopathologische Analyse von nicht-tumorösen Lebergewebe ergab eine ähnliche Anzahl von prämaligen mikroskopischen Foci in beiden Gruppen (Abb.18). H&E gefärbte Leberschnitte wiesen in iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen im Durchschnitt $0,37 \pm 0,09$ Foci pro Gesichtsfeld gegenüber $0,22 \pm 0,07$ Foci pro Gesichtsfeld in Lebern von iG4

$p53^{\Delta/\Delta}$ HBs^+ Mäusen auf (Abb.18). Diese Daten indizierten, dass die Tumorentstehung in beiden Gruppen in ähnlichem Ausmaß erfolgte, dass aber der Tumorprogress hin zu makroskopischen Tumoren und zum HCC in $iG4$ $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs^+ Mäusen im Vergleich zu $iHet$ $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs^+ Mäusen signifikant gehemmt war.

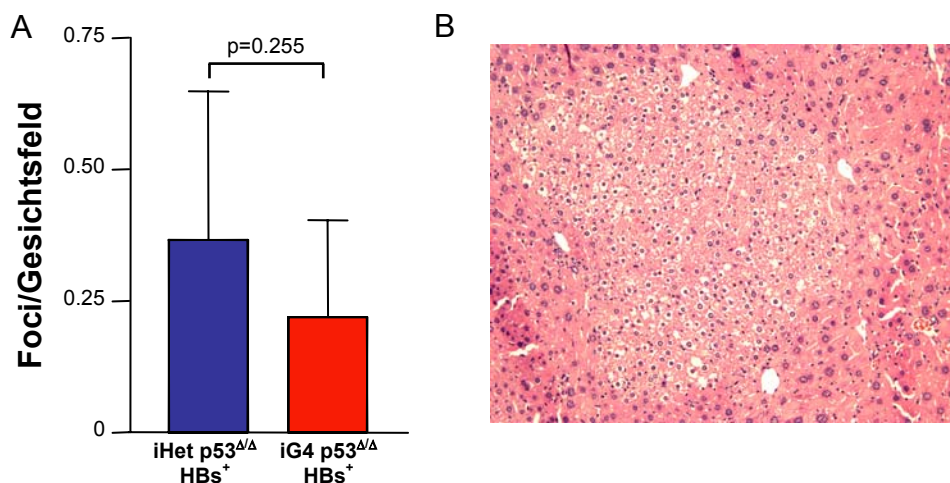


Abb. 18: Anzahl mikroskopischer Foci. (A) Das Diagramm zeigt den Mittelwert der Anzahl mikroskopischer Foci pro Gesichtsfeld (100x Vergrößerung) in Mausleber von $iHet$ $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs^+ und $iG4$ $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs^+ Mäusen. Die Errorbars zeigen die Standardabweichung. (B) H&E-Färbung eines Foci in Leber von $iHet$ $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs^+ Maus (Vergrößerung: 100x).

3.1.4. Telomerlängenbestimmung

Die Telomerlängenbestimmung erfolgte mittels quantitativer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (qFISH). Als Kontrolle dienten Lebern (n=5) von C57BL/6J Wildtypmäusen (Abb.19A). Die Telomerfluoreszenzintensität (TFI) korreliert bei dieser Methode mit der Telomerlänge (Poon et al., 1999). Diese Untersuchungen zeigten, dass in chronisch geschädigter Leber beider generierten Mauskohorten ($iHet$ $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs^+ und $iG4$ $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs^+) kürzere Telomere vorlagen als in C57BL/6J Wildtypmäusen (Abb.19A-C). Frühere Studien hatten gezeigt, dass der Phänotyp der Telomerdysfunktion abhängig von der Ausprägung sehr kurzer Telomere ist und nicht von der mittleren Telomerlänge (Hemann et al., 2001). Es wurde der prozentuale Anteil an Telomeren in Interphase Zellkernen von Hepatozyten mit sehr kurzen Telomeren ermittelt (TFI < 200) (Abb.19D). In $iG4$ $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs^+ Mäusen ohne chronische Leberschädigung (n=5) konnte ein signifikant höherer Anteil an sehr kurzen Telomeren detektiert werden als in $iHet$ $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs^+ Geschwistertieren (n=5). Hingegen zeigten sowohl Leber als auch HCC von $iG4$ $p53^{\Delta/\Delta}$

HBs⁺ Mäusen (n=5) und iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen (n=5) eine vergleichbare Anzahl an sehr kurzen Telomeren auf (Abb.19D).

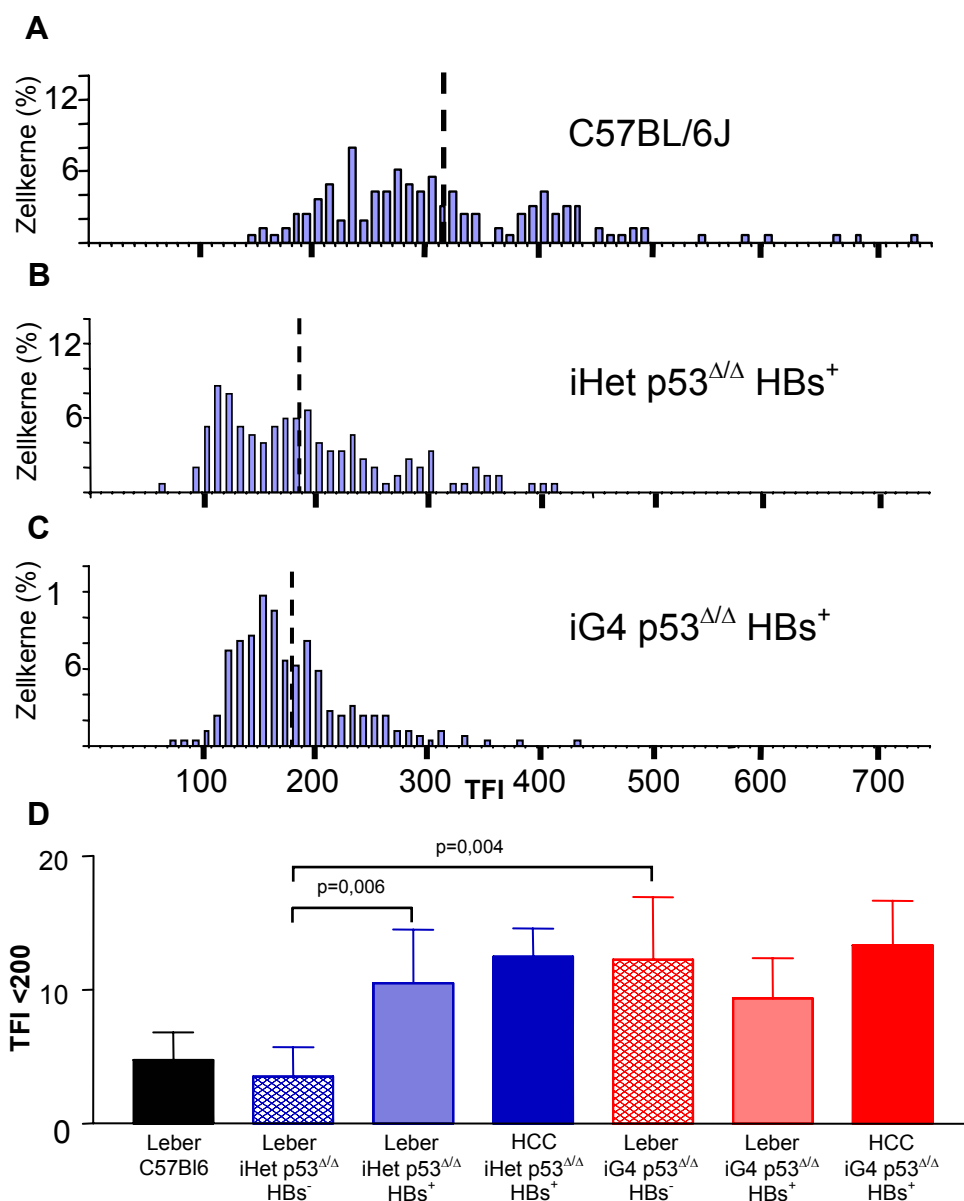


Abb. 19: TFI-Analyse in C57BL/6J Leber (A), iHet p53^{Δ/Δ}HBs⁺ (B) und iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ (C). Es ist der prozentuale Anteil an Zellkernen gegenüber der TFI (Telomer-Fluoreszenz-Intensität) aufgetragen. Schwarz gestrichelt ist die mittlere TFI aller gemessenen Zellkerne (n_{Zellkerne}=50/Maus und n_{Mäuse}=5) aufgetragen. (D) Das Histogramm zeigt den prozentualen Anteil der Telomere innerhalb der Interphase Zellkerne von Hepatozyten (n_{Zellkerne}=50/Maus und n_{Mäuse}=5) mit einer sehr geringen Telomere Fluoreszenz Intensität (TFI<200). Es ist ein Anstieg an kurzen Telomeren in nicht chronisch geschädigter Leber von iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁻ und iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁻ zu sehen (p=0,006). Hingegen ist die Anzahl an sehr kurzen Telomeren ähnlich in chronisch geschädigter Leber und in HCC von iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ und iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen.

3.1.5. Analyse des p53 Status in Leber und HCC

Da die Deletion von p53 mittels Adenovirus Cre nur in ~70% der Leberzellen erfolgte (siehe oben), musste nachgewiesen werden, ob die sich entwickelten Lebertumore eine Deletion von *Trp53* zeigten - von p53-deletierten Zellen ausgingen - oder nicht. Dies wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden analysiert: mit Hilfe des Southern Blot und der quantitativen Real Time PCR (qRT-PCR). Für beide Verfahren wurde genomische DNA verwendet, die aus Leber, dysplastischen Foci und HCC von iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ und iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen isoliert wurde. Für die qRT-PCR wurden zwei unterschiedliche PCR durchgeführt, einerseits zum Nachweis der Deletion von *Trp53* (*Trp53*^{Δ2-10}), andererseits zum Nachweis von gefloxtem *Trp53* (*Trp53*^{F2-10}) (Abb.20).

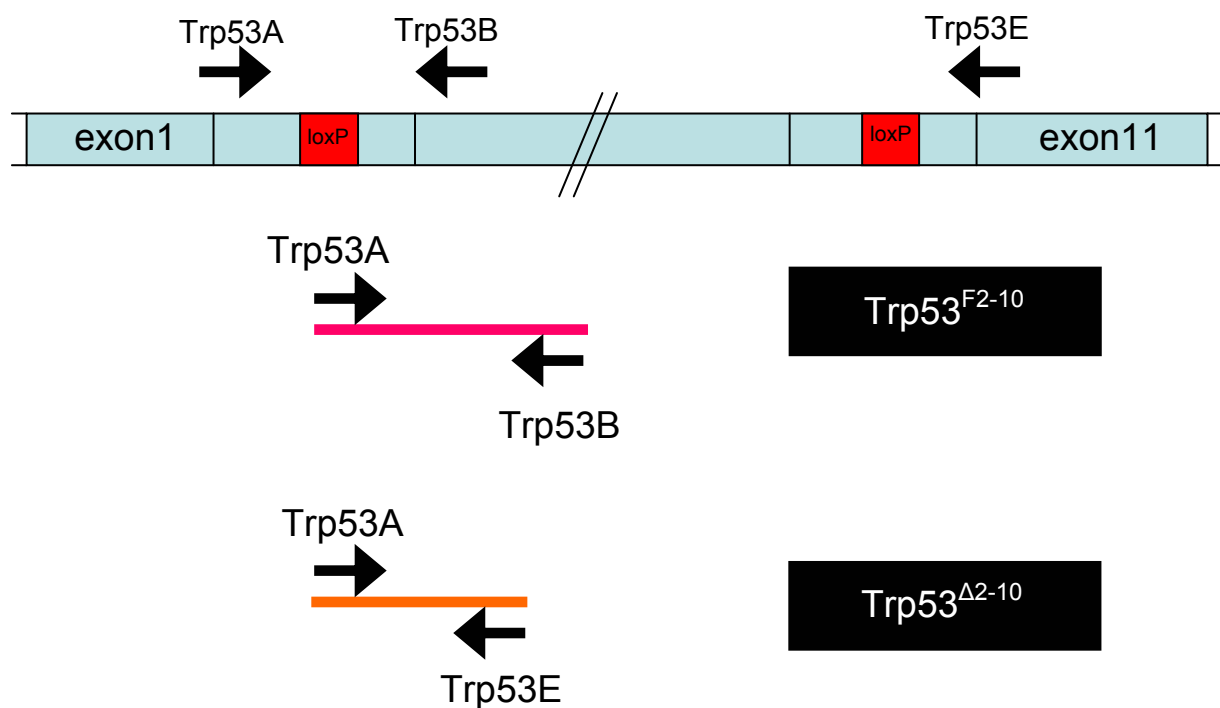


Abb.20: Lokalisation der *Trp53* spezifischen Primer, die in der quantitativen Real Time PCR zum Nachweis des *Trp53* Status eingesetzt wurden.

Als Kontrolle diente genomische DNA aus embryonalen Fibroblasten Zelllinien von *Trp53*^{F2-10/F2-10} sowie von *Trp53*^{Δ2-10/Δ2-10} (*Trp53* deletiert) Mäusen. Die DNA beider Zelllinien wurden in definiert unterschiedlichen Mengen gemischt, sodass man eine Eichkurve zum Ausschnitt des *Trp53* Gens erhielt, indem man die quantitativen Ergebnisse beider Real Time SybrGreen™ PCR als Quotient gegenüber der prozentualen *Trp53* Deletion, welche durch das Verhältnis der Fibroblastenzelllinien vorgegeben war, auftrug (Abb.21).

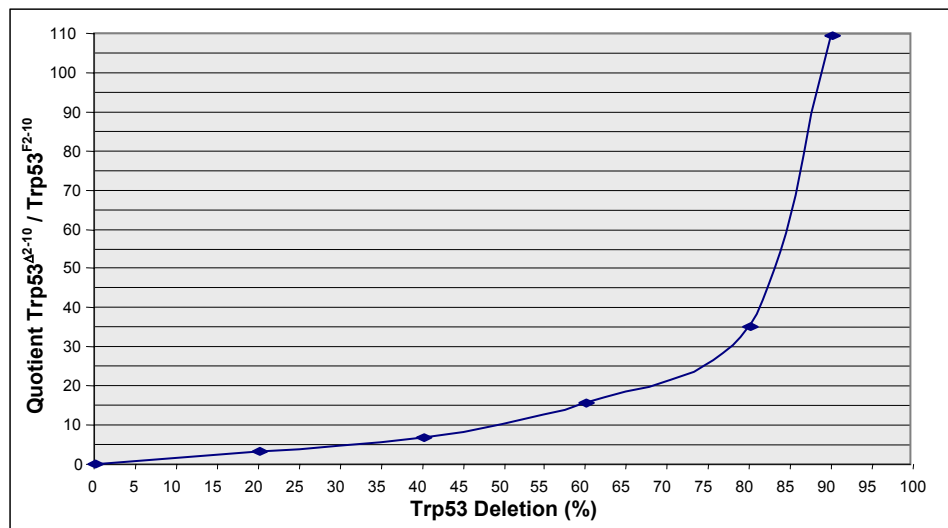


Abb. 21. Eichkurve qRT PCR: Punkte stellen die gemessenen Quotienten ($\text{Trp53}^{\Delta 2-10} / \text{Trp53}^{\text{F2-10}}$) der Kontrollen aus Fibroblasten Zelllinien dar die in folgenden Verhältnissen miteinander gemischt wurden: 100% $\text{Trp53}^{\text{F2-10}}$; 80% $\text{Trp53}^{\text{F2-10}}$ + 20% $\text{Trp53}^{\Delta 2-10}$; 60% $\text{Trp53}^{\text{F2-10}}$ + 40% $\text{Trp53}^{\Delta 2-10}$; 40% $\text{Trp53}^{\text{F2-10}}$ + 60% $\text{Trp53}^{\Delta 2-10}$; 20% $\text{Trp53}^{\text{F2-10}}$ + 80% $\text{Trp53}^{\Delta 2-10}$; 10% $\text{Trp53}^{\text{F2-10}}$ + 90% $\text{Trp53}^{\Delta 2-10}$. Mit allen Mischungsverhältnissen wurde eine quantitative PCR zum Nachweis von $\text{Trp53}^{\Delta 2-10}$ bzw. $\text{Trp53}^{\text{F2-10}}$ durchgeführt und der Quotient gebildet.

Anhand dieser Eichkurve konnte durch Quotientenbildung beider PCR's der prozentuale Ausschnitt von *Trp53* analysiert werden (Abb.22).

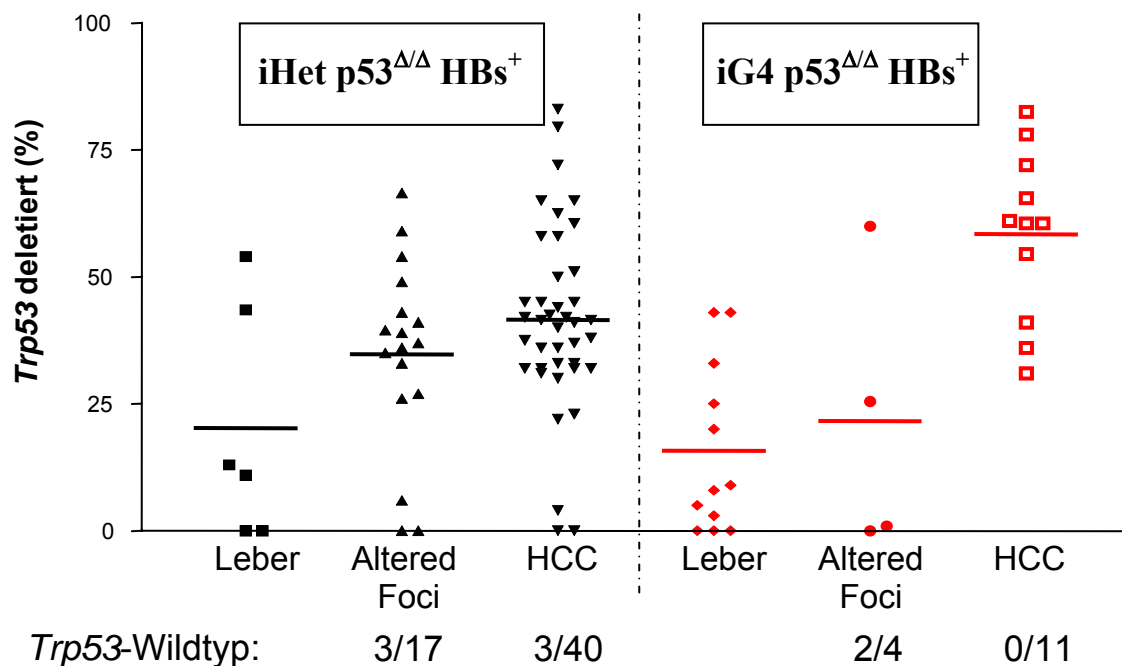


Abb. 22: Quantitative Real Time PCR zeigt den prozentualen Anteil an *Trp53* Deletion in Leber und Lebertumoren von iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ und iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen. Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert in jeder Gruppe dar. Makroskopische Lebertumore aus beiden Kohorten zeigten einen ähnlichen Prozentanteil von deletierten *Trp53*. Der prozentuale Anteil des *Trp53* Ausschnitts lag in den meisten HCC zwischen 25-70%, was dem Bindegewebsanteil der Tumore entsprach (siehe unten). Schlussfolgernd sind in iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen 89,5% (51 von 57 Lebertumore) und in den iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen 86,7% (13 von 15 Lebertumoren) als *Trp53* deletiert anzusehen. Die Zahlen unter dem Graphen geben die Zahl der *Trp53* Wildtyp Lebertumore von der Gesamtzahl makroskopischer Lebertumore an.

Die Analyse ergab, dass in iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ 6 *Trp53*-Wildtyp Tumore (10,5%) und in iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen 2 *Trp53*-Wildtyp Tumore (13,3%) vorkamen. Es war auch nach Abzug dieser *Trp53*-Wildtyp Tumoren eine signifikante Unterdrückung von p53-deletierten HCC in iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen gegenüber p53-deletierten iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen zu erkennen (Mann-Whitney-Test: p=0,006), was indiziert, dass p53-unabhängige Mechanismen die HCC-Entstehung in iG4 Mäusen inhibierte.

Die Lebertumore beider Kohorten zeigten keinen vollständigen Ausschnitt des *Trp53* Gens in den Lebertumoren. Dies begründet sich an dem Anteil von Stromazellen (Fibroblasten und Blutzellen), die in jedem Tumor in unterschiedlicher Anzahl auftreten und nicht *Trp53* deletiert sind. Es wurde histologisch der Anteil an Tumorzellen ermittelt und mit dem prozentualen Anteil der *Trp53* Deletion aus der quantitativen Real Time PCR verglichen. Dieser Vergleich resultiert in einer guten Korrelation ($R^2=0,69$) zwischen dem Prozentsatz

an p53-Deletion in der PCR-Analyse und dem Anteil an Stromazellen im Tumor der histologischen Analyse (Abb.23).

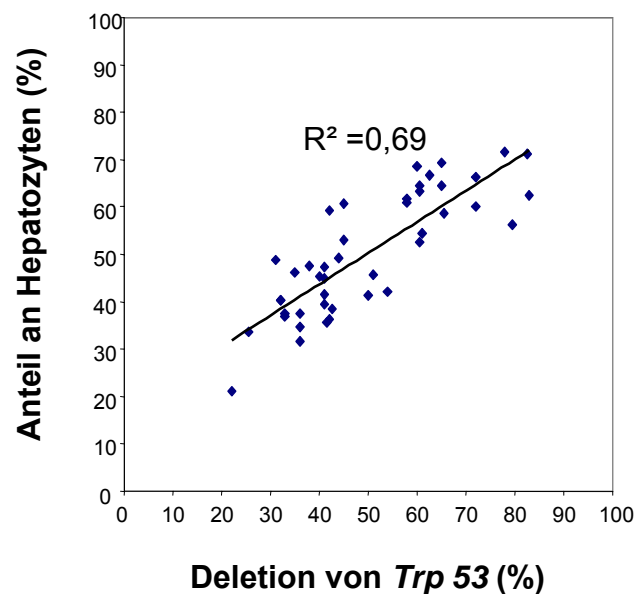


Abb. 23: Das Histogramm zeigt den prozentualen Anteil an Hepatozyten (H&E Histologie) gegenüber dem prozentualen Ausschuss an *Trp53* (quantitative Real Time PCR) der einzelnen, analysierten Lebertumore. Die *Trp53* Deletion der Lebertumore zeigt eine gute Korrelation zum Anteil der Stromazellen, welche neben den Hepatozyten im Tumor auftreten.

Der p53-Ausschnitt wurde für einen Teil der Tumore auch mittels Southern Blot überprüft (Abb.24). Genomische DNA wurde über Nacht mit dem Restriktionsenzym *Bgl*III verdaut und im Agarosegel aufgetragen und anschließend geblottet. Mit einer *Trp53* spezifischen DNA-Sonde konnte in einer Hybridisierung sowohl das gefloxtete Allel (*Trp53*^{F2-10}) als auch das deletierte Allel (*Trp53*^{Δ2-10}) nachgewiesen werden.

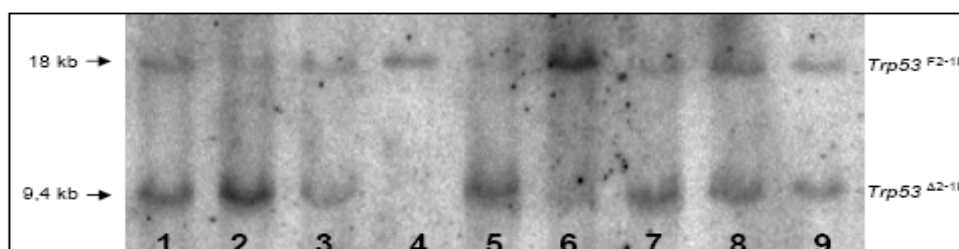


Abb. 24: Southern Blot *Bgl*III verdauter DNA makroskopischer Lebertumore von iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ und iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen. Der Anteil der *Trp53*^{F2-10} Wildtyp-Bande korreliert gut mit dem prozentualen Anteil an Stromazellen aus der histologischen Analyse und den Ergebnissen der *TRP53* Deletion aus der quantitativen Real Time PCR. Spur 4 und 6 zeigen p53-Wildtyp Tumore, was indiziert, dass diese Tumore nicht aus Ad Cre infizierten Leberzellen entstanden sind.

Die Analysen in den Southern Blots korrelierten gut mit der histologischen Auswertung des prozentualen Anteils an Tumorzellen und den Ergebnissen der quantitativen Real Time PCR.

3.1.6. Telomerase limitiert Aneuploidie in p53 deletierten HCC mit kurzen Telomeren

In primären menschlichen Zellen und Telomerase Knockout Mäusen kooperieren Telomerdysfunktion mit dem Verlust von p53 Kontrollpunktfunktion hinsichtlich der Induktion von chromosomaler Instabilität (Counter et al., 1992; Chin et al., 1999; Artandi et al., 2000). Die Analyse chromosomaler Instabilität, wurde mittels Array Comparative Genomic Hybridization (Array CGH) am NKI (Amsterdam/Niederlande) in der Arbeitsgruppe von Jos Jonkers an makroskopischen Lebertumoren mit *Trp53* Deletion durchgeführt. Es wurde hierfür Lebertumor-DNA isoliert und als Kontrolle Milz-DNA vom gleichen Tier genommen, um eine erhöhte Streuung der Signale durch individuelle Unterschiede der Mäuse auf chromosomaler Ebene zu unterbinden. Unter Verwendung eines 3K Mouse BAC Array mit einer Auflösung von 1Mb (Chung et al., 2004) wurden 16 Tumore in dieser Analyse untersucht (Abb.25).

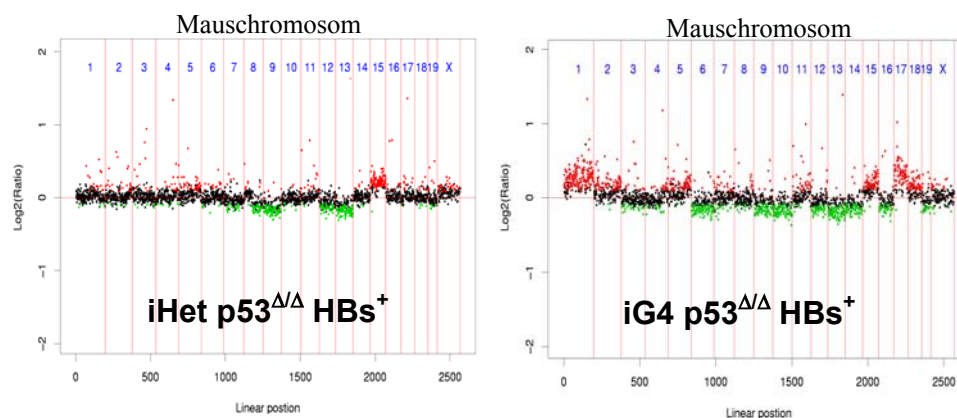


Abb. 25: Repräsentative CGH Plot-Diagramme von Array CGH Analysen von iHet p53 Δ/Δ HBs $^+$ und iG4 p53 Δ/Δ HBs $^+$ HCC (rot: Amplifikationen; grün: Deletionen).

Von allen BAC-Klonen, die sich auf dem Array befanden, zeigten 44% Aberrationen (Amplifikation oder Deletion) in iG4 p53 Δ/Δ HBs $^+$ Tumoren und 28% in iHet p53 Δ/Δ HBs $^+$ Tumoren (Abb.26). Der Level an Aneuploidie war in iG4 p53 Δ/Δ HBs $^+$ Tumoren (n=6

Tumore) signifikant höher ($p=0,02$) als in iHet $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs⁺ Tumoren (n=10 Tumore) (Abb.26).

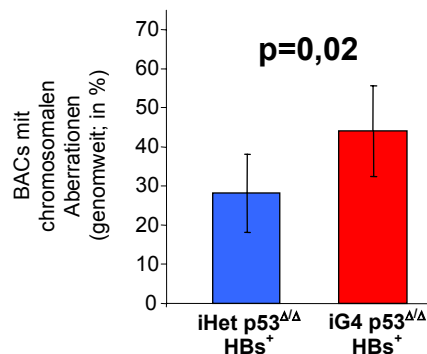


Abb. 26: Das Säulendiagramm zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil aller analysierten BAC Klone, die eine Amplifikation oder Deletion der entsprechenden Genregion anzeigten (definiert durch einen \log_2 Ratio signifikant unterschiedlich von Null, $p < 0,01$). Lebertumore von iG4 $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs⁺ Mäusen zeigten eine signifikant erhöhte Aneuploidie im Vergleich zu Tumoren aus iHet $p53^{\Delta/\Delta}$ HBs⁺ Mäusen. Die Errorbars zeigen die Standardabweichung der beiden Gruppen an.

Ein Vergleich von Aberrationen im humanen HCC (Tab.4) mit der in dieser Arbeit analysierten Aberrationen in Maustumoren (Tab.) ergab, dass 5 von 6 häufig auftretenden Aberrationen, welche in über 67% aller untersuchten Maustumore auftraten (Tab.5), auch auf syntenen Chromosomen in humanen HCC auftreten (Kitay-Cohen et al., 2001; Buendia et al., 2002; Thorgeirsson et al., 2002; Pang et al., 2003; Cazals-Hatem et al., 2004; Hashimoto et al., 2004; Raidl et al., 2004; Tischoff et al., 2005) (Tab.4). Diese Daten indizieren, dass chromosomale Aberrationen in HCC des hier vorgestellten Mausmodells gut mit den human typischen chromosomalen Aberrationen im HCC korrelieren.

Tab. 4: Interspezies Vergleich (Maus – Mensch) von häufig betroffenen chromosomalen Aberrationen in HCC des in dieser Arbeit vorgestellten Mausmodells

Häufig betroffene Maus Chromosomen in Lebertumoren (>68%)	Häufig betroffene Synthene Region in humanen Lebertumoren	Frequenz der Alterationen in humanen Lebertumoren
1+	1q+	25-79%
15+	8q+	37-68%
9-	11q- in DN* 3p- LOH und Hypermethylierung	7-20% 20-80%
10-	6q-	30-40%
12-	14q- in DN* und HCC/CCC	53-68%
13-	-	-

* Dysplastische Nodule

Tab. 5: Chromosomale Amplifikationen und Deletionen der einzelnen Tumore aus iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ und iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen (+: Amplifikation; -: Deletion; 0: keine Aberration; 5': Aberration am proximalen Ende; 3': Aberration am distalen Ende des Chromosoms)

Tumor Nr. Histologie Chr.	iG4 p53 ^{Δ/Δ} HBs ⁺						iHet p53 ^{Δ/Δ} HBs ⁺								
	691T1 HCC	691T3 AF	703T1 HCC	793T3 AF	1181T3 HCC	1181T6 HCC	822T1 HCC	953T1 HCC	975T1 HCC	978T1 HCC	978T4 HCC	985T1 HCC	1061T1 HCC	1093T9 AF	1093T11 HCC
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0
2	+	0	0	-	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
3	-	-	0	0	-	0	0	0	0	-	0	-	0	0	0
4	-	-	0	0	0	0	-5'	0	0	0	-5'	0	-	0	0
5	+3'	+	+3'	0	+	0	+3'	0	+	0	+3'	0	0	0	+3'
6	-	0	-	0	-	+	0	-	0	0	0	+	0	0	-
7	-	0	0	-3'	0	0	0	0	0	0	+3'	0	-	0	0
8	+	-	0	0	0	0	+3'	0	0	0	0	+	0	-3'	0
9	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	0	0	-	0	0	0	-	-	0	-
11	+	0	0	0	0	0	+3'	0	0	0	0	0	0	0	0
12	-	-	-	0	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	0
13	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	0	0	-	-	-
14	0	0	-	0	-	-	-	+	0	0	+	+	-	0	0
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	-	+3'	0	+	+	-5'	0	0	+	0	0	0	0
17	0	-	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	+
18	+	+	+	0	0	+	0	0	0	+5';-3'	0	0	0	0	+
19	-	0	-	-	-	-	0	-	0	0	-	0	0	0	-
X	+	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0

Der Anstieg an Aberrationen in iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Tumoren gegenüber iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Tumoren betraf nicht alle Chromosomen im gleichen Ausmaß (Abb.27).

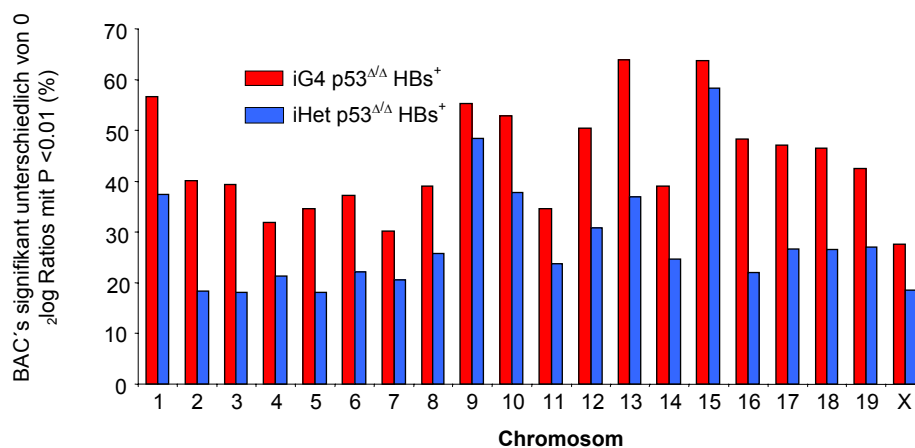


Abb. 27: Histogramm Array CGH Analyse: Gezeigt ist der prozentuale Anteil aller BAC Klone von einzelnen Chromosomen, die eine Amplifikation oder Deletion aufwiesen (\log_2 Ratio signifikant unterschiedlich von Null, $p < 0,01$), in allen analysierten Lebertumoren von iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ (n=10) und iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ (n=6) Mäusen.

Eine häufige chromosomale Aberration im HCC im Mausmodell war die Amplifikation des gesamten Chromosom 15. Auf Chromosom 15 befindet sich der c-myc Genlocus, welcher auch häufig im humanen HCC amplifiziert ist (Thorgerirsson et al., 2002; Wilkens et al., 2004). Das Chromosom 15 zeigte einen ähnlichen Prozentsatz von Amplifikationen in beiden Mausekohorten. Im Gegensatz dazu sind die syntenen Regionen des Mausechromosom 17 selten in menschlichen HCC amplifiziert oder deletiert. Dieses

Chromosom zeigte signifikant mehr Aberrationen in iG4 im Vergleich zu iHet Tumoren. Diese Arbeiten indizierten, dass häufige chromomale Aberrationen, die auch im menschlichen HCC auftreten, in beiden Mauskohorten auftraten, wohingegen nicht HCC-spezifische, willkürliche Aberrationen vermehrt in der Kohorte der iG4 Tiere auftraten. Um diesen Trend aus der Array CGH Analyse zu bestätigen, wurden spezifische Sonden für Chromosom 15 und 17 synthetisiert und eine FISH Analyse durchgeführt. Die FISH Untersuchung bestätigte das Ergebnis der Array CGH Analyse und zeigte einen signifikanten Unterschied ($p=0,001$) für Chromosom 17, welches in iG4 $p53^{\Delta\Delta}$ HBs^+ Tumoren vermehrt amplifiziert war im Vergleich zu iHet $p53^{\Delta\Delta}$ HBs^+ Tumoren (Abb.28). Chromosom 15 ergab in der FISH Analyse keinen signifikanten Unterschied ($p=0,394$). Es war in beiden Gruppen amplifiziert, als Kontrolle wurde Leber von C57BL/6J Mäusen untersucht (Abb.29).

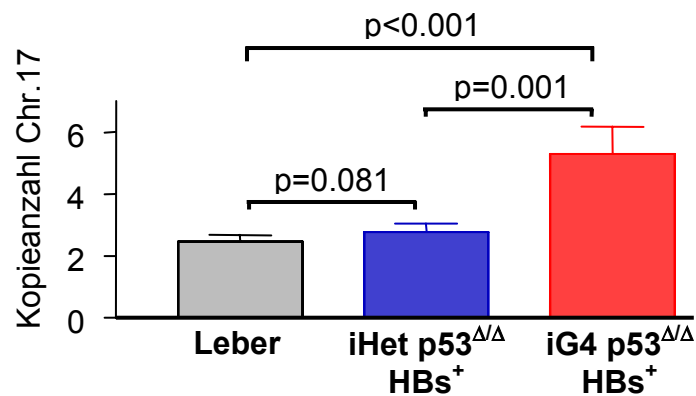


Abb. 28: FISH Analyse für Chromosom 17: Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Kopieanzahl des verwendeten Genlocus (BAC-Klon: RP23-43402) des Chromosom 17 von C57BL/6J Leber ($n=5$), iHet $p53^{\Delta\Delta}$ HBs^+ ($n=6$) und iG4 $p53^{\Delta\Delta}$ HBs^+ ($n=5$) HCC.

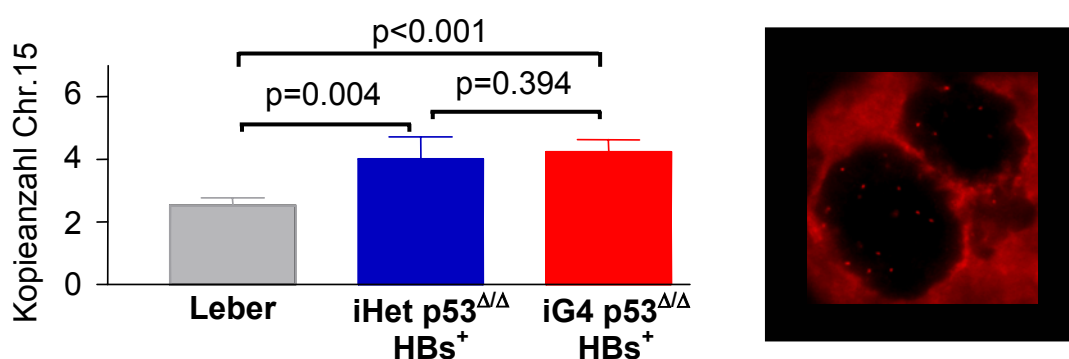
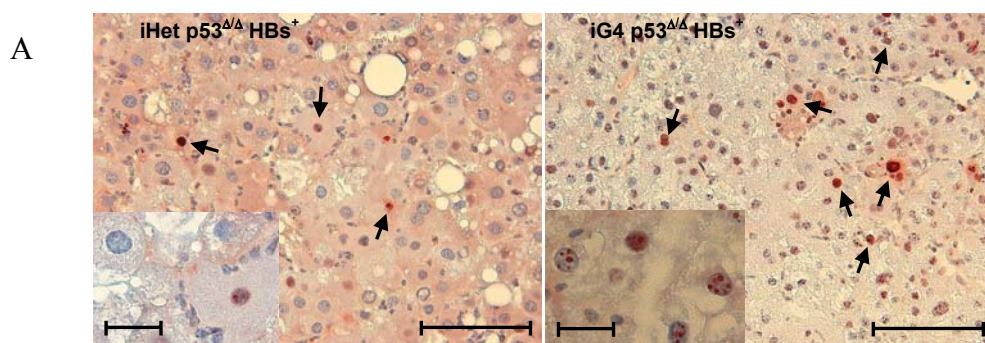


Abb. 29: FISH Analyse für Chromosom 15: Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Kopieanzahl des verwendeten Genlocus des Chromosom 15 von C57BL/6J Leber ($n=5$), iHet $p53^{\Delta\Delta}$ HBs^+ ($n=6$) und iG4

p53^{ΔΔ} HBs⁺ (n=5) HCC. Das Foto zeigt eine FISH mit einer Cy3 gelabelten Chromosom 15 spezifischen Probe (BAC-Klon: RP23-299O23) für ein HCC in iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen.

3.1.7. Akkumulation von DNA Schädigungs-Foci in iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ HCC

Die Formation von DNA Schädigungs-Foci stellt das früheste detektierbare Zeichen in Antwort auf Telomerdysfunktion dar (siehe Einleitung). Es wurde die Frequenz von intranukleären γ -H2AX Foci, analysiert. Das Histon H2AX wird bei DNA Doppelstrangbrüchen aktiviert und lagert sich in seiner phosphorylierten Form an die DNA an. Es wurden Leber und HCC von iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen und iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen untersucht. Als Kontrolle wurde Leber von C57BL/6J Mäusen auf γ -H2AX Foci analysiert. Leber von C57BL/6J Mäusen zeigte erwartungsgemäß nahezu keine γ -H2AX Foci auf (0,25% \pm 0,13 der Kerne zeigte Foci). In nicht-transformierten Lebergewebe der Untersuchungskohorten wurde in der iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Gruppe eine Rate von 1,24% \pm 0,62 ermittelt werden gegenüber 4,46% \pm 2,18 (p=0,309) in der iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ Gruppe. Eine gesteigerte Rate an γ -H2AX Foci konnte in den HCC beider Gruppen festgestellt werden, verglichen mit der jeweiligen Rate an γ -H2AX Foci im gesunden Lebergewebe. Die iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ HCC wiesen 5,60% \pm 2,18 γ -H2AX Foci auf und lagen damit signifikant unter der Rate von γ -H2AX Foci in iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ HCC (18,54% \pm 4,70 der Nuclei zeigten γ -H2AX Foci, p=0,022) (Fig.30).



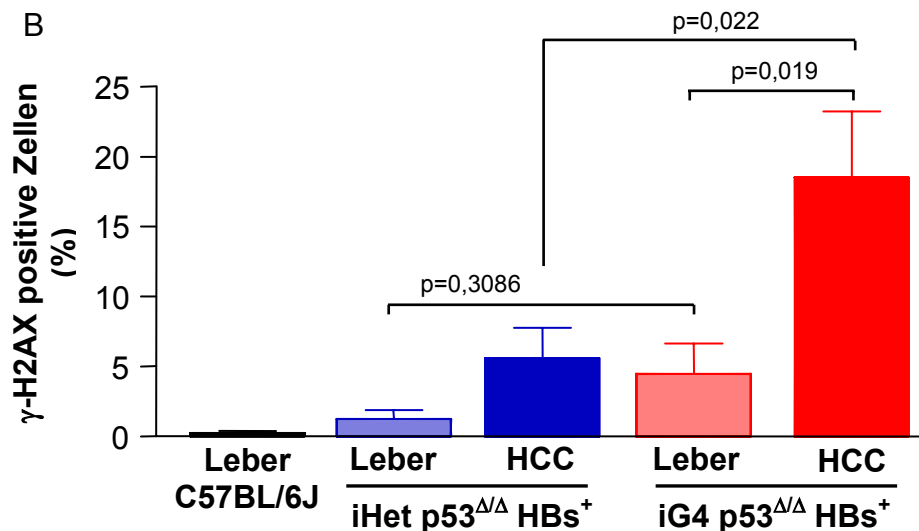


Abb. 30: (A) Repräsentative Abbildung von γ -H2AX Foci in HCC von iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ (links) und iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ (rechts) Mäusen, die Pfeile zeigen auf γ -H2AX positive Zellen (Vergrößerungsbalken entspricht 100 μ m bzw. 20 μ m im Vergrößerungsausschnitt). (B) Der Graph zeigt den prozentualen Anteil der Zellkerne mit γ -H2AX Foci innerhalb der Hepatozyten in C57BL/6J Leber (n=5), chronisch geschädigter Leber von iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ (n=5) und iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ (n=5) Mäusen, und HCC (n=5) in iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ (n=5) und iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ (n=5) Mäusen.

Diese Daten indizierten, dass iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäuse eine höhere Rate an DNA Schädigung im chronisch geschädigten Lebergewebe und den entstandenen HCC im Vergleich zu Lebergewebe und HCC aus iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen aufwiesen.

3.1.8. Co-Lokalisation von DNA-Damage Foci und Telomersignal

Durch die Kombination von γ -H2AX Färbung und qFISH wurde überprüft, ob DNA-Schädigungssignale (γ -H2AX Foci) Telomer-assoziiert auftraten oder genomweit in den Tumoren auftraten. Die Analyse ergab eine Co-Lokalisation von γ -H2AX Foci und Telomersignalen in 25,8% aller DNA Damage Foci in iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ HCC und 25,4% in iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ HCC (Abb.31). Auffällig war, dass die Telomer-assoziierte γ -H2AX Foci immer mit schwachen Telomersignalen co-lokalisierten, was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um dysfunktionelle Telomere handeln könnte. Demzufolge ist es auch möglich, dass unsere Analyse das wahre Ausmaß der Co-Lokalisation von γ -H2AX Foci mit dysfunktionellen Telomere unterbewertete, das dysfunktionelle Telomere häufig keine

detektierbaren Telomersequenzen mehr aufweisen und im Falle der Metaphasen-Analyse als Telomer-freie Enden imponieren.

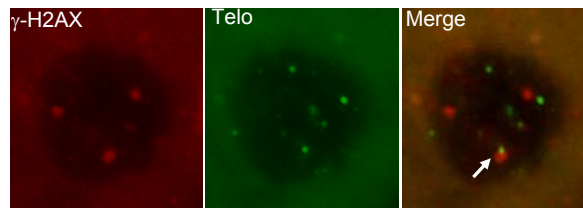


Abb. 31: Repräsentative Abbildungen einer Co-Lokalisierung zwischen γ -H2AX Foci und Telomersignal. γ -H2AX Foci (links), Q-FISH (mitte), Überlappende Darstellung (rechts) (Auflösung 1000x). Der Pfeil zeigt auf eine Co-Lokalisation zwischen γ -H2AX Foci und Telomersignal.

3.1.9. Verminderte Proliferation und erhöhte Apoptose in Telomerase negativen HCC

Um Mechanismen des gehemmten Tumorprogresses in iG4 p53 $^{\Delta/\Delta}$ HBs $^+$ Mäusen zu analysieren, wurde Telomeraseaktivität, Tumor Proliferation und Apoptose in iHet p53 $^{\Delta/\Delta}$ HBs $^+$ und iG4 p53 $^{\Delta/\Delta}$ HBs $^+$ Mäusen untersucht. Die Telomeraseaktivität wurde mittels TRAP-Assay bestimmt. Darüber hinaus wurde auf RNA-Ebene die Expression beider Telomerase-Komponenten bestimmt. Für den TRAP-Assay wurden Gesamtgewebslysate aus iG4 p53 $^{\Delta/\Delta}$ HBs $^+$ HCC sowie aus iHet p53 $^{\Delta/\Delta}$ HBs $^+$ Leber und HCC hergestellt. Als Kontrolle diente Gesamtgewebslysate aus einer murinen HCC Zelllinie, mit hoher Telomeraseaktivität. Die Analyse zeigte, dass nicht-transformierte Lebergewebe nur geringe oder keine messbare Telomeraseaktivität aufwies. In den HCC zeigten 18 von 21 Tumoren aus iHet p53 $^{\Delta/\Delta}$ HBs $^+$ Mäusen Telomeraseaktivierung (85,7%) (Abb.32), was die Situation im humanen HCC widerspiegelt, wo ca. 90% der HCC eine Telomeraseaktivierung aufweisen (Miura et al, 1997; Takahashi et al., 2000). Erwartungsgemäß war in den HCC aus iG4 Mäusen keine Telomeraseaktivierung nachweisbar.

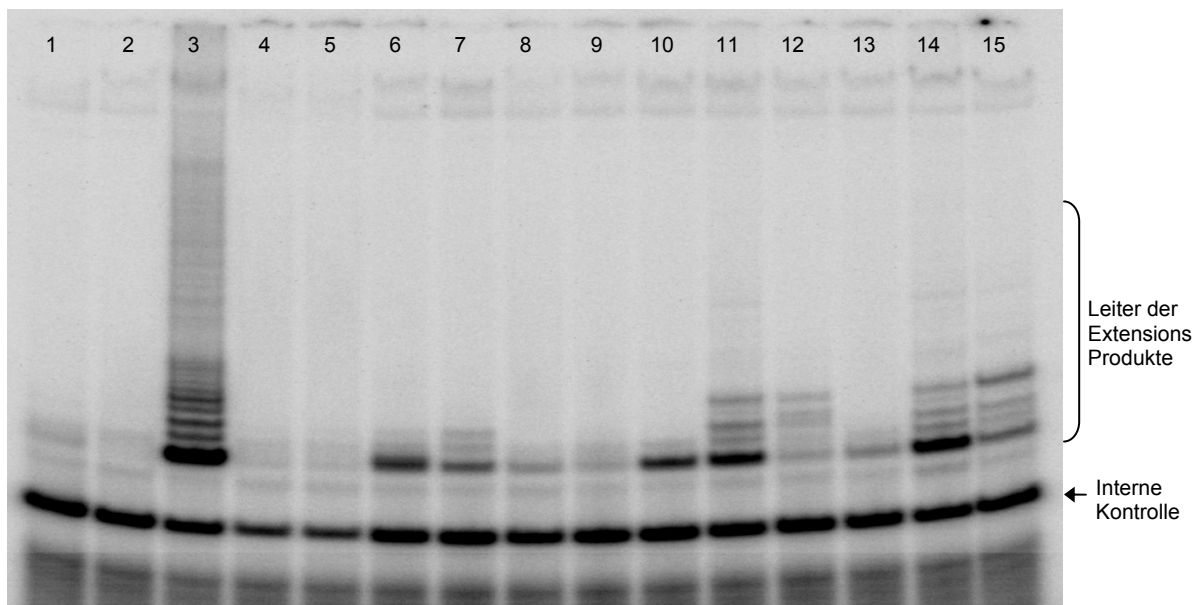


Abb. 32: Repräsentative Abbildung eines TRAP-Gels, welches die Aktivierung von Telomerase in HCC aus iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen zeigt. Die DNA-Leiter beruht auf 6bp Extensionsprodukten, welche bei Vorhandensein von Telomeraseaktivität an den Initialprimer (TS) synthetisiert werden und unter Verwendung eines Reversen Primer Extensionsprodukte von 50+6n bp bilden. Aufgetragen sind die Extensionsprodukte die nach Hinzugabe von Gesamtgewebslysate (1000ng Protein) aus folgenden Proben entstanden: (1) Negativ Kontrolle: DEPC dH₂O, (2) hitzeinaktivierte HCC Zelllinie AL1698T1 (aus p53^{ΔΔ} HBs⁻ Maus), (3) HCC Zelllinie AL1698T1 (aus p53^{ΔΔ} HBs⁻ Maus), (4,5) HCC aus iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen, (6-10) Leber aus iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen, (11-15) HCC aus iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen.

Die Expression von TERT und TERC wurde im Taqman-Assay (Applied Biosystems) analysiert. Die RNA-Komponente wurde erwartungsgemäß nur in Leber, Altered Foci und HCC der iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Gruppe exprimiert. Es gab einen nicht signifikanten Anstieg an TERC Expression in dysplastischen Foci ($1,64 \pm 0,64$) und HCC ($1,26 \pm 0,32$) gegenüber der Leber in iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen (Abb.33).

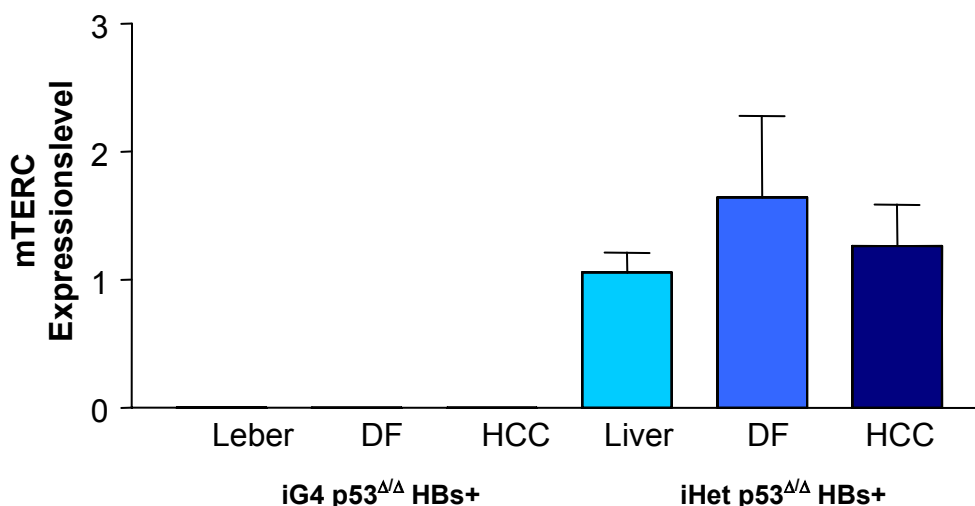


Abb. 33: Regulationsunterschiede in der TERC-Expression in Leber (n=11 und 7), dysplastischen Foci (n=2 und 5) und HCC (n=7 und 12) von iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ und iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen nach Taqman Assay (Mm01261365_s1, Applied Biosystems). Als Housekeeping-Gene wurde GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) verwendet. Der mittlere Expressionslevel in Leber von iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen wurde als basale Expression genommen und gleich eins gesetzt. Der Expressionslevel wurde als $2^{-\Delta\Delta ct}$ dargestellt, wobei $\Delta\Delta ct = \Delta ct_{Tumor} - \Delta ct_{Leber}$ ist. Telomerase Knockout Mäuse (iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺) zeigen aufgrund des TERC-Knockouts keine TERC-Expression.

Die Expression der TERT-Komponente konnte sowohl in der iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Gruppe als auch in der iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ Gruppe in Leber, dysplastischen Foci und HCC nachgewiesen werden (Abb.34). Zwischen den beiden Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied. Zusammengefasst indizieren diese Ergebnisse, dass der Anstieg von Telomerase-Aktivität in iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ HCC auf posttranskriptionellen Mechanismen beruhen könnte. Dies würde in Einklang mit Studien stehen, die eine posttranskriptionelle Telomerase-Aktivierung in humanen Lymphozyten und primären Fibroblasten gezeigt haben (Liu et al., 1999; Swiggers et al., 2004).

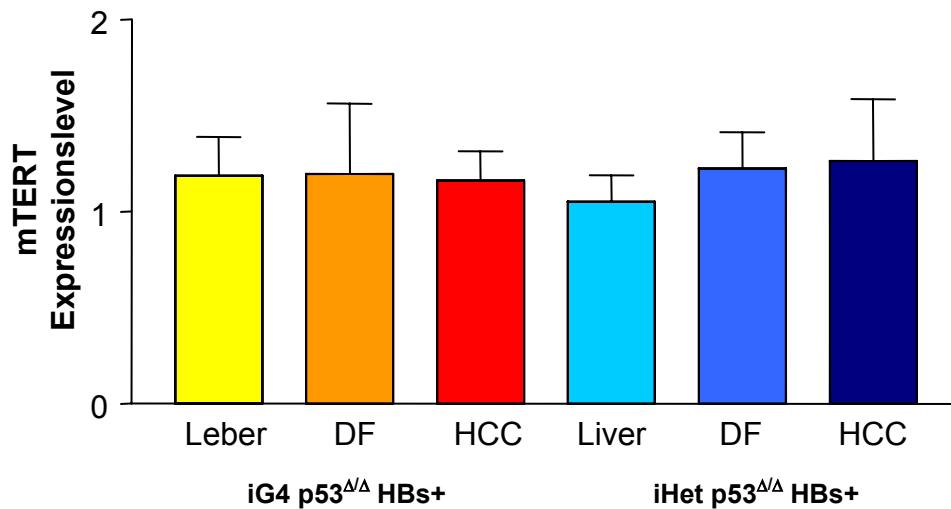


Abb. 34: Expressionsanalyse von TERT-RNA in Leber (n=11 und 7), dysplastischen Foci (n=2 und 5) und HCC (n=7 und 12) von iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ und iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen mittels Taqman Assay (Mm00436930_g1, Applied Biosystems). Als Housekeeping-Gene wurde GAPDH verwendet. Der mittlere Expressionslevel in Leber von iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen wurde als basale Expression genommen und gleich eins. Der Expressionslevel wurde als $2^{-\Delta\Delta ct}$ dargestellt, wobei $\Delta\Delta ct = \Delta ct_{Tumor} - \Delta ct_{\text{Leber}}$ ist.

Apoptotische Zellen wurden mittels TUNEL-Färbung detektiert. Hierbei handelt es sich um eine Färbung, welche die im Rahmen der Apoptose entstehenden DNA Einzelstrangbrüche in einer enzymatischen Reaktion am 3'-Ende markieren. Es wurde eine signifikant erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ HCC (1,86% ± 0,73) verglichen mit iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ HCC (0,51% ± 0,07, p=0,029) gemessen (Abb.35).

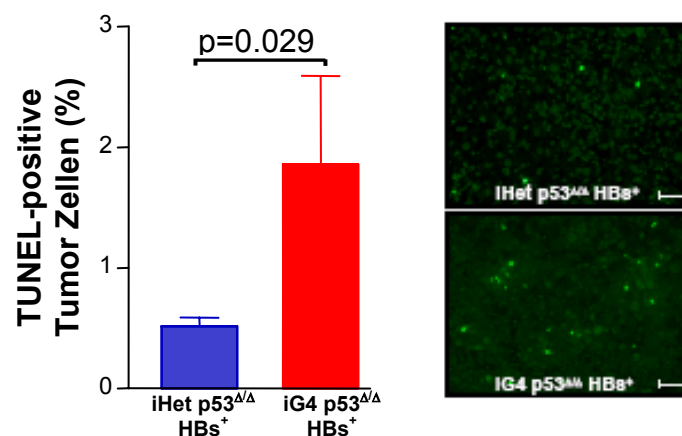


Abb. 35: Das Histogramm zeigt den Mittelwert des prozentualen Anteil von apoptotischen Zellen (TUNEL-positiv) in HCC von iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ und iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen. Die Errorbars zeigen die Standardabweichung der beiden Gruppen an. Repräsentative Abbildungen apoptotischer Zellen nach TUNEL-Assay in HCC von iHet p53^{ΔΔ} HBs⁺ (oben) und iG4 p53^{ΔΔ} HBs⁺ Mäusen (unten). Vergrößerungsbalken entsprechen 50μm.

Die Proliferationsrate der Tumore wurde mittels PCNA-Färbung (PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen) bestimmt. PCNA ist ein 36kDa großes Protein, welches in der frühen G1 und der S Phase exprimiert wird. Die Zellproliferation war in iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ HCC (1,41% ± 0,37) signifikant unterdrückt (p=0,019) gegenüber iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ HCC (2,68% ± 0,29) (Abb.36).

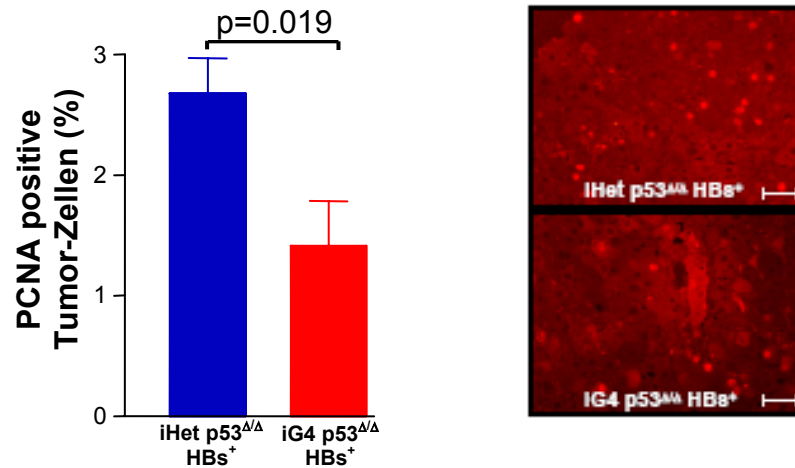


Abb. 36: Das Histogramm zeigt den prozentualen Anteil von PCNA positiv gefärbten Zellkernen in HCC von iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ und iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen. Die Errorbars zeigen die Standardabweichung der beiden Gruppen an. Repräsentative Abbildungen PCNA positiver Zellkerne in HCC von iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ (oben) und iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ (unten) Mäusen. Vergrößerungsbalken entsprechen 50μm. PCNA positive Zellen zeigen eine rote Kernfärbung.

3.2. Mausmodell der akuten Telomerdysfunktion

3.2.1. Experimentelles Design des TRF2^{ΔBAM} Systems

In Telomerase Knockout Mäusen (mTERC^{-/-}) wird durch Telomerverkürzung Telomerdysfunktion hervorgerufen, welche zwei unterschiedliche zelluläre Antworten induziert, Apoptose und Zellzyklusarrest/Seneszenz (Lee et al., 1998; Satyanarayana et al., 2003). Durch Deletion von p53 wurde in mTERC^{-/-} p53^{-/-} Doppelknockout Mäusen, die Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest in Antwort auf Telomerdysfunktion aufgehoben (Chin et al. 1999).

Zur Untersuchung der zellulären Antwort auf Telomerdysfunktion in Mausleber, wurde in dieser Arbeit das experimentelle System der TRF2 Inhibition gewählt. Das Protein TRF2 (telomere repeat binding factor 2) bindet als Dimer am Telomer und hat eine essentielle Rolle für die Formation der Telomerstruktur (T-Loops, siehe Einleitung). Die Telomerstruktur ist für die Abschirmungsfunktion des Telomers am Chromosomenende von essentieller Bedeutung und die Inhibition von TRF2 führt zur akuten Telomerdysfunktion (van Steensel et al., 1998). In dieser Arbeit wurde ein adenovirales System benutzt, um eine dominant negative Form des humanen hTRF2 (TRF2^{ΔBAM}) in Leberzellen der Maus zu exprimieren. Murines TRF2 (495aa) und humanes hTRF2 (500aa) weisen eine hohe Homologie auf (84%ige Identität), sodass eine Inhibition des murinen TRF2 durch Expression der humanen Mutante erwartet wurde, was die unten stehenden Versuche bestätigten (Abb.37 und siehe unten).

H.sapiens	1	MAGGGGSSDGSRAAGRASRRSSGRARRGRHEPGLGGPAERGAGEARLEEAVNRWVLKIFY	60
		MAGGGGSSD SGRAA RRASRS GRARRGRHEPGLGG AERGAGEARLEEAVNRWVLKIFY	
M.musculus	1	MAGGGGSSDSSGRAASRRASRSRSGRARRGRHEPGLGGAAERGAGEARLEEAVNRWVLKIFY	60
H.sapiens	61	FHEALRAFRGSRYGDFRQIRDIMQALLVRPLGKEHTVSRLLRVMQCLSRIE EGENLDCSF	120
		FHEALRAFR SRY DFRQIRDIMQALLVRPLGKEHTVSRLLRVMQCLSRIE EGENLDCSF	
M.musculus	61	FHEALRAFRRSSRYRDFRQIRDIMQALLVRPLGKEHTVSRLLRVMQCLSRIE EGENLDCSF	120
H.sapiens	121	DMEAE LTPLESAINVLEMIKTEFTLT TEAVV ESSRKL VKEAAV IICIKNKEFEKASKILKK	180
		DMEAE LTPLESAINVLEMIKTEFTLT+++VESSRKL VKEAAV IICIKNKEFEKASKILKK	
M.musculus	121	DMEAE LTPLESAINVLEMIKTEFTLTDSMV ESSRKL VKEAAV IICIKNKEFEKASKILKK	180
H.sapiens	181	HMSKDPTTQKLRNDLLNI IREKNLAHPVIQNF SYETFQ QKMLRFLESHLDDAEPYLLTMA	240
		+MSKDPTTQKLR DLLNI IREKNLAHPVIQNF SYE FQ QKMLRFLESHLDD EPYLLTMA	
M.musculus	181	YMSKDPTTQKLRDLDLLNI IREKNLAHPVIQNF SYEVFQ QKMLRFLESHLDDTEPYLLTMA	240
H.sapiens	241	KKALKSESAASSTGKEDQ PAPGPVEKPPREPARQLRNPPTTIGM MTLKAAFKTLSGAQD	300
		KKALKSESAASST +E+K P PVEKP REP RQ +NPP TIG+ TLKAAFK LS AQD	
M.musculus	241	KKALKSESAASSTMREEKHPE--PVEKPLREPPRQPQNPPATIGIRTLKAAFKALSTAQD	298
H.sapiens	301	SEAAFAKLDQKDLVLP TQALPASPALKNKRPRK DENESSAPADGEGGSELQPKNKRMTIS	360
		SEAAFAKLDQKDLVL A P+SPA K+KRPRKDE+ES+APA+GEGGS QP+N MTIS	
M.musculus	299	SEAAFAKLDQKDLVLANL ASPSSPAHKHKRPRKDEHESAAPAEGEGGSSRQPRNSPMTIS	358

H.sapiens	361	RLVLEEDSQSTEPSAGLNSSQEAASAPPSKPTVLNQPLPGEKNPKVPGKWNSSNGVEEK	420
		RL+LEEDSQSTEPS GLNSS EA SA SKP LNQP PGEK PK K KWNS NG+E EK	
M.musculus	359	RLLEEDSQSTEPSPGLNSSHEAMSA--SKPRALNQPHPGEKKPKASKDKWNSPNGLEEK	416
H.sapiens	421	ETWVEEDELQVQAAPEDEDSTTNI TKKQKWTVEESEWVKAGVQKYGEGNWAAISKNYPFV	480
		E W+EED+LF+VQ AP ED ++++T+KQKWT+EESEWVK GV+KYGEGNWAAISK+YPFV	
M.musculus	417	EVWLEEDQLFEVQ-APGEDRSSSLTRKQKWTIEESEWVKDGVRKYGEGNWAAISKSYPFV	475
H.sapiens	481	NRTAVMIKDRWRMTMKRLGMN	500
		NRTAVMIKDRWRMTMK+LGMN	
M.musculus	476	NRTAVMIKDRWRMTMKLGMN	495

Abb. 37: Homologievergleich der TRF2 Aminosäuresequenz zwischen Mensch und Maus

Durch Deletion der Basic Domäne (ΔB) und DNA-bindenden Myb-Domäne (ΔM) im TRF2 ^{$\Delta B\Delta M$} kann das Protein zwar noch dimerisieren, ist jedoch nicht mehr in der Lage an DNA-Sequenzen zu binden (Abb.38). Vermutlich wird hierdurch endogen aktives Wildtyp TRF2 vom Telomer wegtitriert und es kommt zur Telomerdysfunktion.

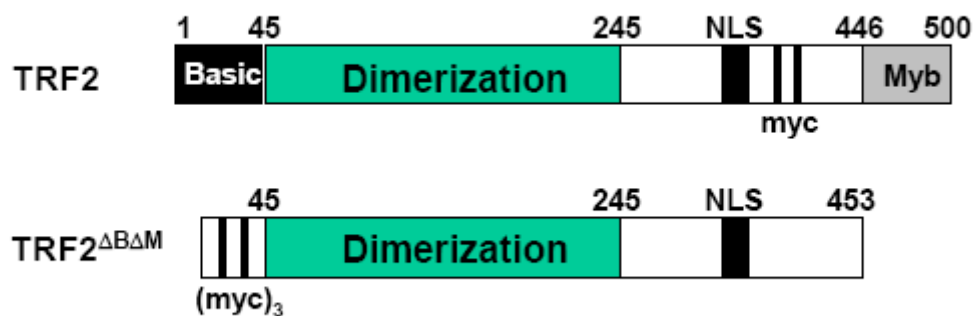


Abb. 38: Schematischer Aufbau: TRF2 und TRF2 ^{$\Delta B\Delta M$} . Die Myb-DNA-Binde-Domäne ist neben der Telomer-Binding-Factor spezifischen Basic-Domäne in TRF2 ^{$\Delta B\Delta M$} deletiert.

Das TRF2 ^{$\Delta B\Delta M$} wurde im adenoviralen System exprimiert (Abb.39). Der Adenovirus TRF2 ^{$\Delta B\Delta M$} (Ad TRF2 ^{$\Delta B\Delta M$}) wurde unter Verwendung von humanen 293-Zellen hergestellt, mit einem Caesiumchlorid Dichtegradienten aufgereinigt und anschließend zur Entsalzung dialysiert. Der Virus wurde in unterschiedlichen Konzentrationen ($2,5 \times 10^9$ bis 20×10^9 PFU) intravenös in eine der Schwanzvenen der Mäuse injiziert, und die Leber der infizierten Tiere zwischen 1 und 14 Tagen nach Virusapplikation analysiert.

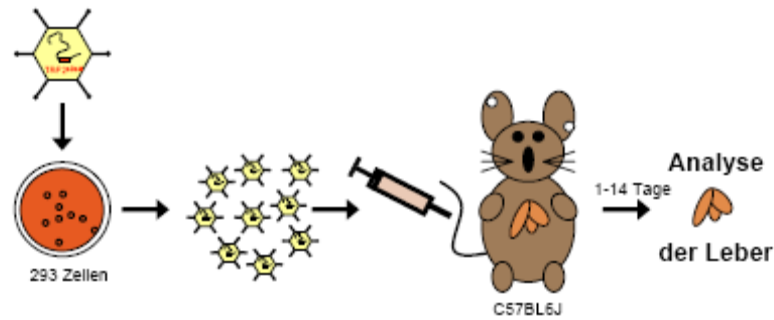


Abb. 39: Versuchsaufbau des adenoviralen TRF2^{ΔBΔM} Systems

Es wurde der Ad TRF2^{ΔBΔM} und als Kontrolle ein GFP exprimierender Adenovirus (Ad GFP) in einer Konzentration von 10×10^9 PFU den Mäusen injiziert ($n=21$ /Gruppe) und die Leber nach 1, 2, 3, 4, 7 und 14 Tagen analysiert ($n=3$ /Zeitpunkt und Gruppe).

3.2.2. Ad GFP als Kontrolle

Zur Kontrolle einer homogenen Infektion durch Adenovirus und der damit einhergehenden Gen-Expression, wurden Gefrierschnitte ($7\mu\text{m}$) aller 5 Leberlappen der Ad GFP infizierten Mäuse auf die Fluoreszenz des GFP-Proteins untersucht. Alle Leberlappen zeigten eine gleichmäßig verteilte Grünfluoreszenz des GFP-Proteins auf (Abb.40). Es lag eine durchschnittliche Infektionsrate von 70% aller Leberzellen vor. Die Versuchsmäuse wurden mit gleichen Titern von Ad GFP oder Ad TRF2^{ΔBΔM} infiziert, so dass eine gleiche Infektionsrate der Leber vorgelegen haben sollte.

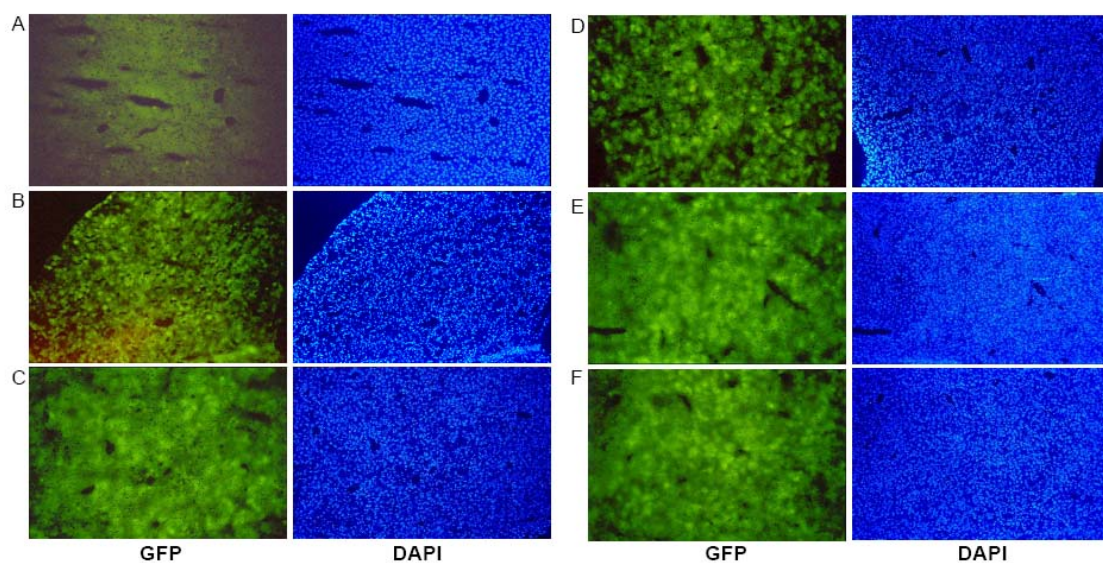


Abb. 40: Bestimmung der Fluoreszenz von Gefrierschnitten der Leber bei der Wellenlänge von 508nm: (A) Negativkontrolle, nicht-infiziert, (B-F) Leber 48 Std. nach Ad GFP Infektion (1×10^{10} PFU): (A) rechter

lateralen Lappen, (C) rechter medianer Lappen, (D) caudaler Lappen, (E) linker lateraler Lappen, (F) linker medianer Lappen (Vergrößerung 100x).

3.2.3. Western Blot zum Nachweis von TRF2^{ΔBΔM} Protein

Zum Nachweis der TRF2^{ΔBΔM} Expression wurden Western-Blot Analysen mit einem Antikörper gegen humanes TRF2 durchgeführt (Abb.41). Dieser Antikörper zeigte keine Kreuzreaktivität gegen murines TRF2 im Western Blot oder der Immunofluoreszenz (IF). Für die Analyse wurden jeweils gleiche Mengen aus Ad TRF2^{ΔBΔM} infizierten Mäusen (n=3) für einen Zeitpunkt gepoolt. Es konnte in Proteinlysaten aller 7 untersuchten Zeitpunkte das TRF2^{ΔBΔM} Protein nachgewiesen werden, wobei die höchste Expression 24h nach Virusinfektion auftrat. Im Zeitverlauf nahm die Expression von TRF2^{ΔBΔM} stetig ab (Abb.41). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Tatsache das replikationsdefiziente Adenoviren zu einer transienten Genexpression führen, da sie nicht in das Wirtsgenom integrieren und Adenovirus-infizierte Zellen durch das Immunsystem abgeräumt werden. (Yang et al., 1995; Chirmule et al., 1999). Außerdem wurde in einem Großteil der infizierten Zellen Apoptose aufgrund der akuten Telomerdysfunktion induziert, wodurch eine weitere Abnahme der TRF2^{ΔBΔM} exprimierenden Zellen erfolgte (siehe unten).

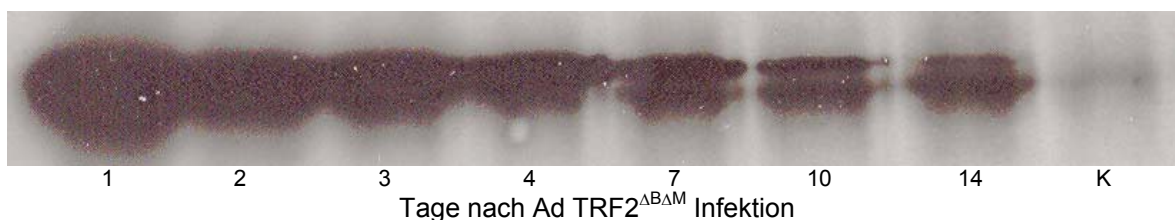


Abb. 41: Western Blot von Leberlysaten aus Ad TRF2^{ΔBΔM} infizierten Mäusen 1-14 Tagen nach Infektion zum Nachweis der TRF2^{ΔBΔM} Expression (K: Kontrolle, nicht infizierte Leber)

3.2.4. Dosis abhängige Induktion von Telomerdysfunktion durch TRF2^{ΔBΔM} Expression

Es wurde die Induktion von chromosomalen Fusionen, Anaphasebrückenbildung und Leberzell-Ploidie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ad TRF2^{ΔBΔM} Expression untersucht. Zunächst wurden die Mäuse mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ad TRF2^{ΔBΔM} infiziert und die Leber nach 5 Tagen analysiert (Abb.42).

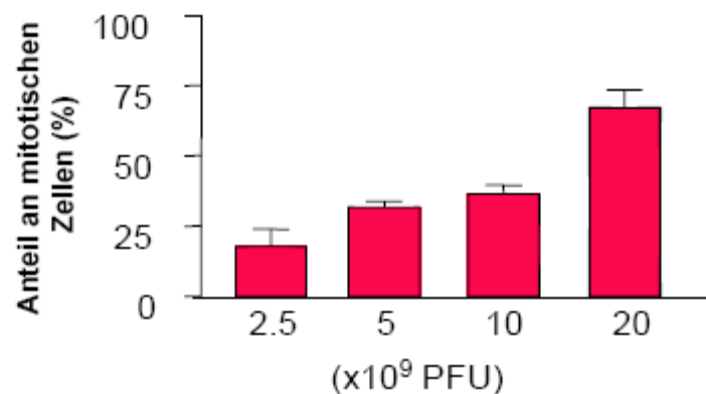


Abb. 42: Prozentualer Anteil an aberranten Mitosen von der Gesamtzahl mitotischer Zellen in Mausleber 5 Tage nach Ad TRF2^{ΔBΔM} Infektion (2,5x10⁹ – 20x10⁹ PFU).

Das Vorkommen aberranter Mitosen (aberrante Mitosen sind massive Störungen des Spindelapparates und der damit verbundenen Fehlverteilung der Chromosomen bei der Mitose, welche im mikroskopischen Bild als Chromatinbrücken in der Anaphase oder in fehlverteilte Chromosomen zu sehen sind) korrelierte mit ansteigender Viruslast und wurde in Kontrollvirus (GFP) infizierten Mäusen nur mit sehr geringer Häufigkeit beobachtet. In 2,5x10⁹ PFU Ad TRF2^{ΔBΔM} infizierten Lebern wurden 17,78% ± 6,29 aberrante Mitosen gezählt, in 5x10⁹ PFU Ad TRF2^{ΔBΔM} infizierten Lebern 31,83% ± 2,05, in 10x10⁹ PFU Ad TRF2^{ΔBΔM} infizierten Lebern 36,52% ± 3,09 und in 20x10⁹ PFU Ad TRF2^{ΔBΔM} infizierten Lebern 67,17% ± 6,26. Alle weiteren Versuche wurden mit einer Viruskonzentration von 1x10¹⁰ PFU durchgeführt.

C57BL/6J Mäusen wurden mit Ad TRF2^{ΔBΔM} bzw. Ad GFP infiziert und 48 Std. danach mit Colcemid behandelt, um Metaphasen *in vivo* zu arretieren und auf Fusionen zu analysieren. 72 Std. nach adenoviraler Infektion wurde die Leber entnommen und die Rate der Fusionen pro Metaphase ermittelt. Zusätzlich wurden die Metaphasen mit Hilfe einer Telomer-spezifischen Sonde hybridisiert, welche mit dem Fluorochrom Cy3TM markiert war und Telomere sichtbar macht. Während die mit Ad GFP infizierten Lebern keinerlei Fusionen aufwiesen, lag die Rate der Ad TRF2^{ΔBΔM} infizierten Zellen bei 1,03 Fusionen/Metaphase (Abb.43).

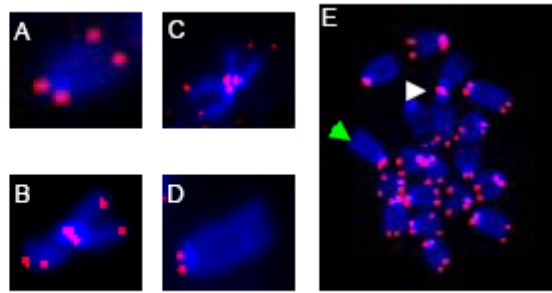


Abb. 43: Metaphasen von Mauschromosomen aus Leberzellen 72Std. nach Ad TRF2^{ΔBΔM} Infektion. (A) Mauschromosom (blau) mit Telomersignal (rot), (B) Fusion beider P-Arme, (C) Fusion eines P-Arms, (D) Telomer freie Enden am Q-Arm, (E) Metaphase (weißer Pfeil: chromosomale Fusion; grüner Pfeil: Telomer freies Ende).

Die detektierten Fusionen enthielten sowohl Telomersequenz, als auch Telomer freie Enden. Das Vorkommen von Telomersequenz an fusionierten Chromosomen steht in Einklang mit der Beobachtung, dass TRF2 Inhibition zur akuten Telomerdysfunktion führen kann, ohne das hierfür ein Verlust der Telomersequenz zugrunde liegen muss (Brunori et al., 2006). Es wird angenommen, dass stattdessen Telomerdysfunktion aufgrund der Inhibition der normalen Telomerstruktur (T-Loop) hervorgerufen wird.

Während Ad TRF2^{ΔBΔM} infizierte Mäuse bereits nach 3 Tagen ein erhöhtes Vorkommen aberranter Mitosen aufwiesen (Durchschnitt Tag₃₋₁₄: $0,15 \pm 0,02$), konnte lediglich am Tag 4 der Ad GFP infizierten Mäuse eine sehr geringe Anzahl aberranter Mitosen festgestellt werden ($0,04 \pm 0,01$) (Abb.44).

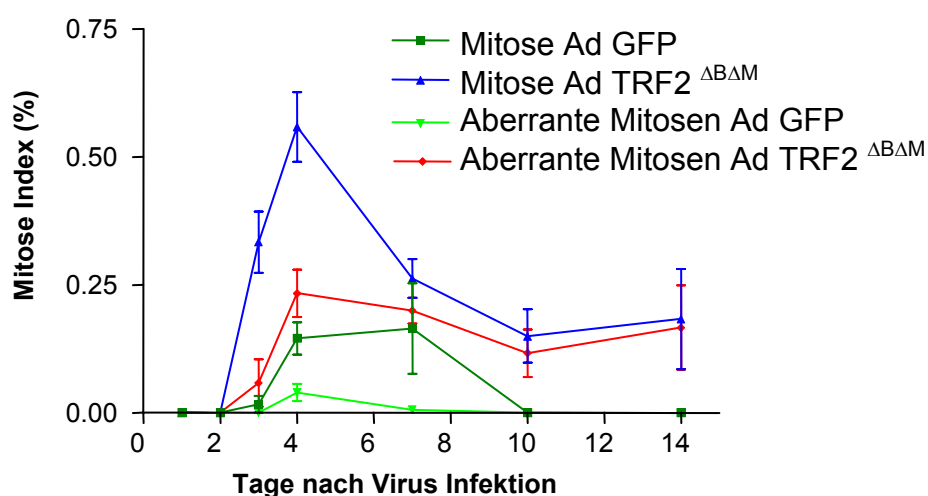


Abb. 44: Aberrante Mitosen, 1-14 Tage nach viraler Infektion mit Ad TRF2^{ΔBΔM} bzw. Ad GFP in Mausleber. Dargestellt ist der Index aller Mitosen und der Index von aberranten Mitosen in Ad TRF2^{ΔBΔM} und Ad GFP infizierter Mausleber.

Die aberranten Mitosen wurden in fehlgepaarten Chromosomen, Anaphasebrücken und triphasischen Spindeln aufgeteilt (Abb.45). Prozentual gesehen war die Anaphasebrückenbildung (57,6%) die am häufigsten auftretende mitotische Abnormalität, danach folgten fehlgepaarte Chromosomen (28,8%) und triphasische Spindeln (13,6%).



Abb. 45: H&E-Färbung von Mauslebern nach Ad TRF2^{ΔBΔM} Infektion. Zur Darstellung kommen aberrante Mitosen: fehlgepaartes Chromosom, triphasischer Spindel und Anaphasenbrücke (von links nach rechts).

Zur Bestimmung von der Ploidie der Leberzellen wurde eine Feulgen Analyse durchgeführt. Hierbei wird die DNA der Zellen im Gewebeschnitt mit Schiff's Reagenz gefärbt. Die Intensität der Färbung entspricht dem DNA Gehalt und erlaubt so Rückschlüsse auf den Ploidiegrad. Diese Analyse zeigte, dass in Ad GFP infizierten Mäusen die meisten Leberzellen einen DNA-Gehalt von 2n hatten, eine kleine Subpopulation wies einen DNA-Gehalt von 4n auf. Demgegenüber hatten Ad TRF2^{ΔBΔM} infizierte Mäuse einen erhöhten DNA-Gehalt in den Leberzellen (Abb.46).

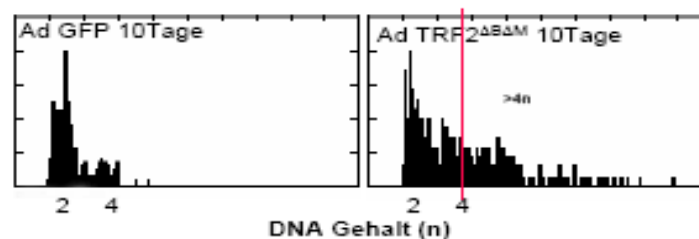


Abb. 46: Ploidie 10 Tage nach Adenovirusapplikation (Feulgen Messung), murine Hepatozyten weisen überwiegend einen DNA-Gehalt von 2n auf, während eine kleinere Subpopulation 4n aufweist nach Ad GFP Infektion. Ad TRF2^{ΔBΔM} infizierte Hepatozyten zeigten im Mittel einen höheren Ploidiegrad bis zu 16n und Aneuploidie auf.

3.2.5. Induktion von Apoptose und Seneszenz

Die Induktion von Apoptose wurde mittels TUNEL-Assay untersucht. Ad TRF2^{ΔBΔM} induzierte eine signifikant höhere Apoptoserate als Ad GFP Infektion in der Mausleber. Eine maximale Apoptoserate war 2-3 Tage nach Ad TRF2^{ΔBΔM} Applikation erreicht. Bei Ad GFP infizierten Zellen waren zu diesem Zeitpunkt deutlich weniger apoptotische Zellen detektierbar (Abb.47A,B). Nach 4-14 Tagen war eine annähernd gleiche Rate an apoptotischen Zellen in beiden Versuchsgruppen festzustellen (Abb.47A). Dies könnte auf die Immunabwehr zurückzuführen sein, die zur Abräumung Adenovirus infizierter Zellen führte (Yang et al., 1995; Chirmule et al., 1999).

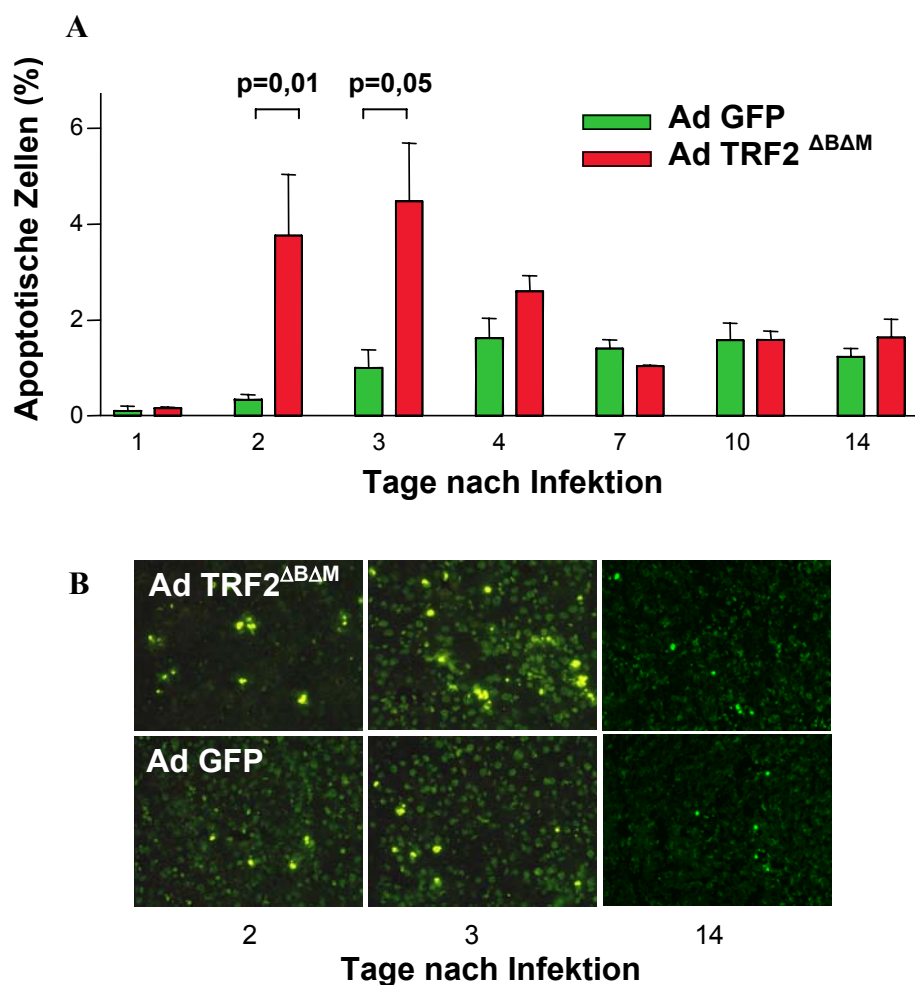


Abb. 47: TRF2^{ΔBΔM} induziert Apoptose in der Mausleber, (A) graphische Zeitverteilung der Apoptose 1-14 Tage nach Ad TRF2^{ΔBΔM} bzw. Ad GFP Infektion, (B) repräsentative Bilder der Apoptose an Tag 2, 3 und 14 nach Ad TRF2^{ΔBΔM} und Ad GFP Infektion

Zur Detektion von Seneszenz wurde die Seneszenz-assoziierte-β-Gal Färbung (SA-β-Gal) durchgeführt (Dimri et al., 1995). Diese Färbung ist nicht sehr spezifisch, stellt aber nach wie vor einen der besten Marker für replikative Seneszenz dar. SA-β-Gal positive Zellen

wurden nur nach Ad TRF2^{ΔBΔM} Infektion in Leberzellen detektiert (Abb.48A,B). Ad GFP induzierte dagegen zeigten keine SA-β-Gal-Aktivität in der Mausleber (Abb.48A,B).

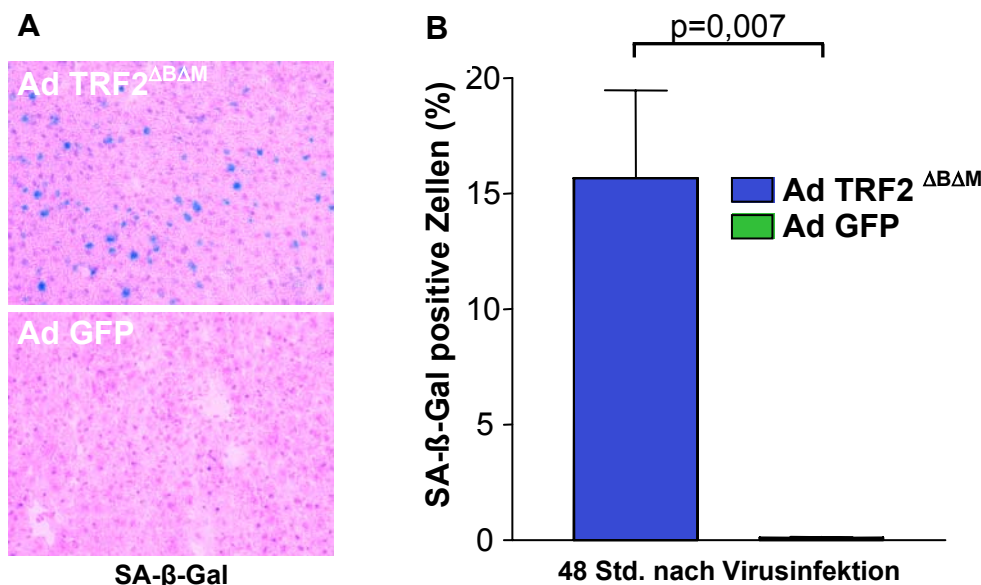


Abb. 48: TRF2^{ΔBΔM} induziert SA-β-Gal-Aktivität in der Mausleber, (A) repräsentative Bilder der SA-β-Gal-Färbung 48Std. nach Ad TRF2^{ΔBΔM} bzw. Ad GFP Infektion, (B) prozentualer Anteil an SA-β-Gal positiven Zellen nach Ad Infektion

3.2.6. Die Induktion von Apoptose und Seneszenz in Abhängigkeit des TRF2^{ΔBΔM} Expressionslevels

Es sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem TRF2^{ΔBΔM} Expressionslevel und der Induktion von Apoptose oder Seneszenz in der Leber bestand.

Die FACS Analyse von Leberzellsuspensionen 48h nach Virus Infektion zeigte eine Korrelation zwischen der TRF2^{ΔBΔM} Expressionsstärke und TUNEL-Färbung. Zusätzlich zeigte die FACS Analyse eine Korrelation zwischen TRF2^{ΔBΔM} Expression und der Autofluoreszenz (Zellgröße), die im Forward Scatter (FSC) aufgetrennt wurde und einen Seneszenz-Marker darstellt (Gorbunova et al. 2003; Martin-Ruiz et al. 2004).

Leberzellen mit starker TRF2^{ΔBΔM} Expression wiesen 52,81% TUNEL-positive Zellen auf, während in Leberzellen mit niedriger TRF2^{ΔBΔM} Expression nur 9,85% der Fälle TUNEL-positiv waren (Abb.49B). Eine gesteigerte Autofluoreszenz vereinbar mit Seneszenz wurde hingegen vermehrt in Leberzellen ausgelöst, die eine niedrige TRF2^{ΔBΔM} Expression zeigten. So zeigten 14,98% der Leberzellen mit hoher TRF2^{ΔBΔM} Expression eine gesteigerte Autofluoreszenz im Gegensatz zu 44,10% der Zellen mit niedriger TRF2^{ΔBΔM} Expression (Abb.49C).

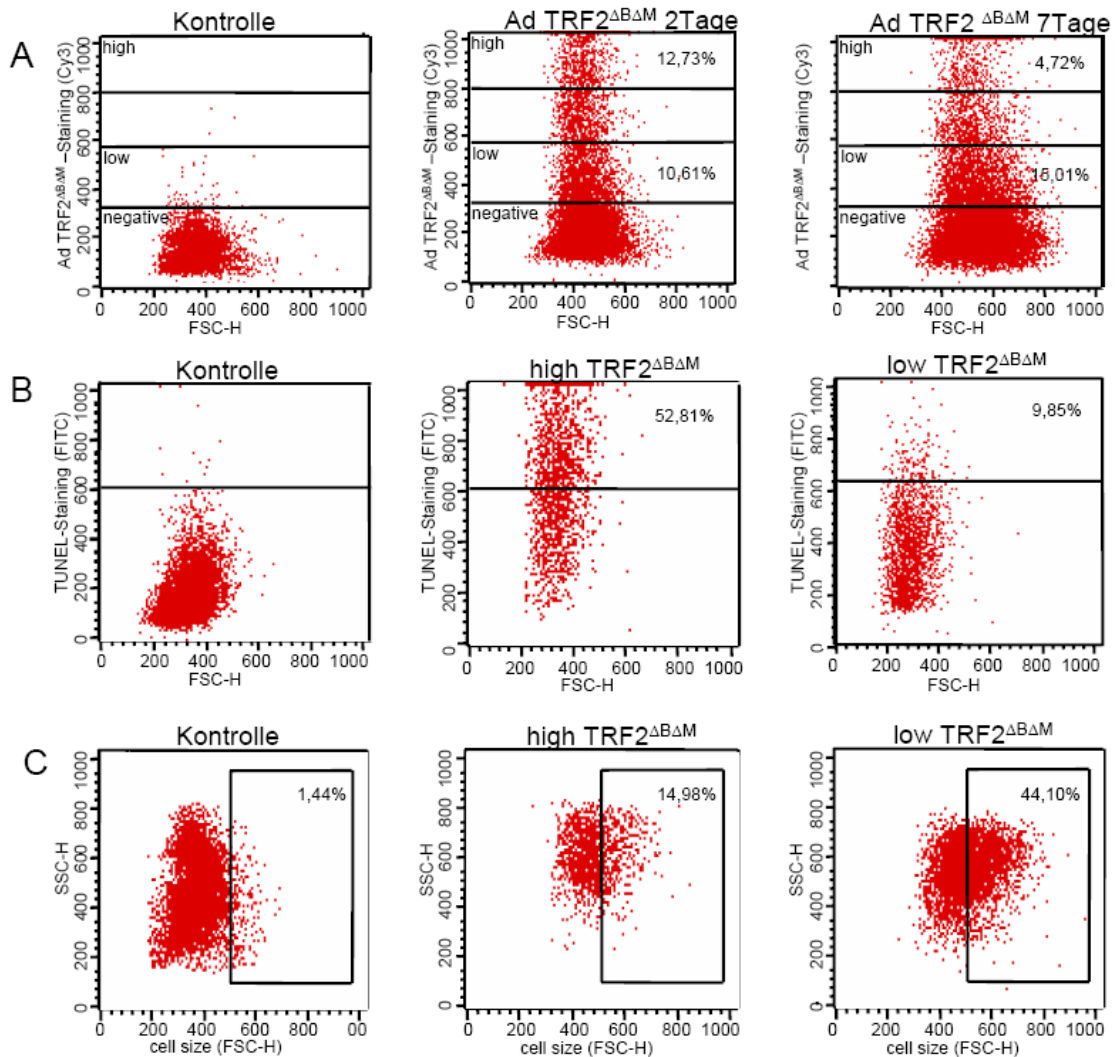


Abb. 49: FACS Analyse, (A) Prozentuale Verteilung an TRF2 Δ B Δ M positiven Leberzellen (links: Kontrolle Ad GFP infizierter Zellen; mitte, rechts: Ad TRF2 Δ B Δ M infizierte Leberzellen nach 2 und 7 Tagen. (B) Verteilung der TUNEL-positiven Zellen (links: Ad GFP Kontrolle; mitte: Leberzellen mit hohem TRF2 Δ B Δ M Expressionslevel; rechts: Leberzellen mit niedrigem TRF2 Δ B Δ M Expressionslevel). (C) Verteilung der zellulären Autofluoreszenz, Zellen mit verstärkter Autofluoreszenz sind eingerahmt, der prozentuale Anteil dieser potenziell seneszenten Zellen ist in Prozent angegeben (links: Ad GFP Kontrolle; mitte: Leberzellen mit hohem TRF2 Δ B Δ M Expressionlevel; rechts: Leberzellen mit niedrigem TRF2 Δ B Δ M Expressionslevel).

Die Ergebnisse der FACS Analyse konnten immunhistochemisch bestätigt werden. Ein Großteil der TUNEL positiven Zellen zeigte auch eine hohe Signalintensität in der TRF2 Δ B Δ M-IHC auf (Abb.50A,C). Hingegen zeigten die meisten SA- β -Gal positiven Leberzellen eine geringe Signalintensität in der TRF2 Δ B Δ M-IHC auf (Abb.50B,C).

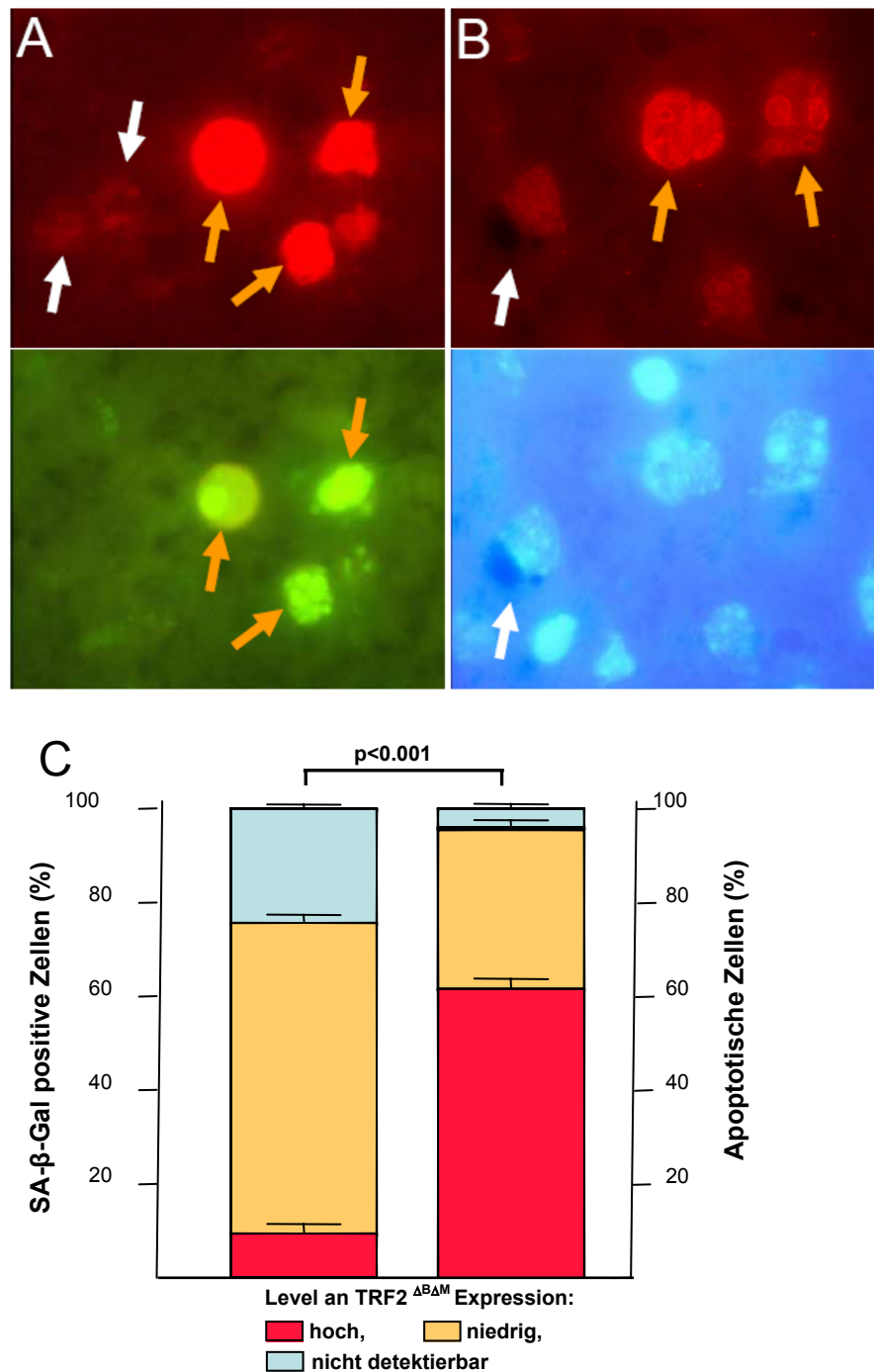
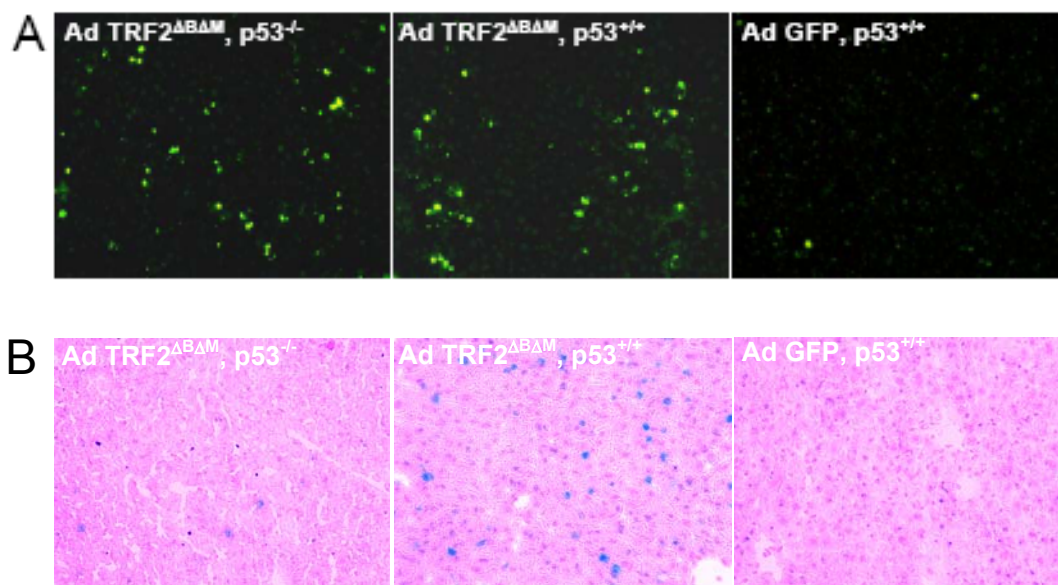


Abb. 50: (A) Repräsentative Abbildungen nach TRF2 und TUNEL Co-IHC (Vergrößerung 1000x), Zellen mit hoher TRF2^{ΔBAM} Expression (oranger Pfeil; rote Färbung) sind positiv im TUNEL-Assay (oranger Pfeil; grüne Färbung), Zellen mit niedriger TRF2^{ΔBAM} Expression (weißer Pfeil; rote Färbung) sind vorwiegend TUNEL-negativ. (B) Repräsentative Abbildungen nach TRF2 und SA-β-Gal Färbung (Vergrößerung 1000x), Zelle mit niedriger TRF2^{ΔBAM} Expression (weißer Pfeil; rote Färbung) zeigt SA-β-Gal Färbung (weißer Pfeil; dunkelblaue Färbung), Zellen mit hohem TRF2^{ΔBAM} Expressionslevel (oranger Pfeil; rote Färbung) zeigen keine SA-β-Gal-Aktivität. (C) Prozentuale Verteilung der SA-β-Gal positiven bzw. apoptotischen Zellen nach zellulärem TRF2^{ΔBAM} Expressionslevel.

3.2.7. Die Rolle von p53 bei der Induktion von Apoptose und Seneszenz

Es sollte der Einfluss von p53 auf die Induktion von Apoptose und Seneszenz in Folge von akuter Telomerdysfunktion untersucht werden. Hierzu wurden Wildtyp und p53 Knockout Mäuse mit Ad TRF2^{ΔBΔM} bzw. Ad GFP infiziert und die Leber nach 48 Std. analysiert. Die Rate an TUNEL-positiven Zellen war in p53 Knockout und in Wildtyp Mäusen nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,171$) (Abb.51A,C). Demgegenüber war ein signifikanter Unterschied in der Induktion von SA-β-Gal-Aktivität zu erkennen ($p=0,039$) (Abb.51B,D). In p53 Wildtyp Mäusen kam es zu einer hohen Induktion von SA-β-Gal ($15,67\% \pm 3,80$), während in p53 Knockout Tieren nur eine schwache Induktion von SA-β-Gal nach Ad TRF2^{ΔBΔM} Infektion zeigten ($2,25\% \pm 0,58$) (Abb.51B,D). Die Ergebnisse indizieren, dass in Antwort auf Telomerdysfunktion die Induktion von Apoptose p53-unabhängig war, wohingegen die Induktion von Seneszenz p53-abhängig war.



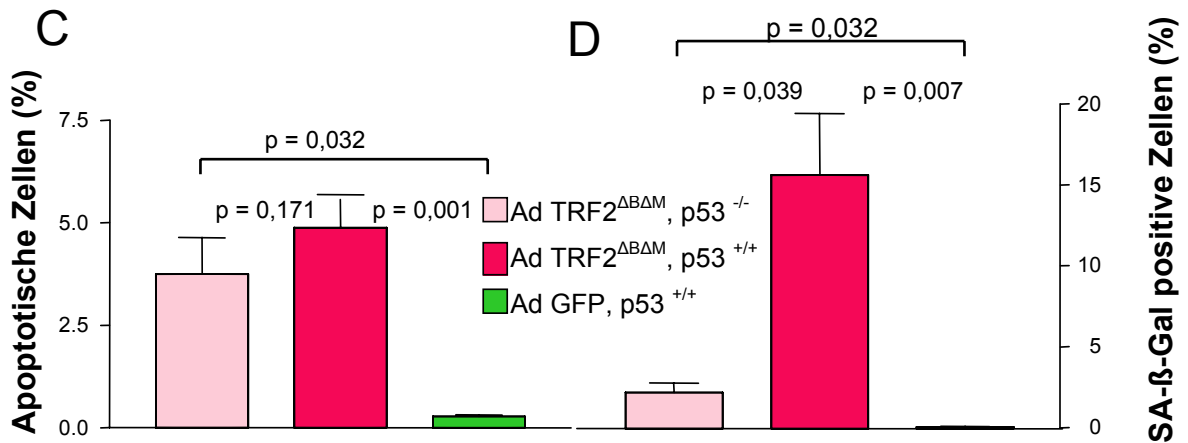


Abb. 51: Einfluss von p53 auf die Induktion von Apoptose und Seneszenz, (A) repräsentative Bilder von TUNEL gefärbten Leberschnitten 48Std. nach Ad TRF2^{ΔBΔM} bzw. Ad GFP Infektion (Vergrößerung 200x), (B) repräsentative Bilder von Sa-β-Gal gefärbter Leber 48Std. nach Ad TRF2^{ΔBΔM} bzw. Ad GFP Infektion (Vergrößerung 200x), (C) prozentualer Anteil TUNEL-positiver Leberzellen 48Std. nach Ad TRF2^{ΔBΔM} bzw. Ad GFP Infektion, (D) prozentualer Anteil Sa-β-Gal positiver Leberzellen 48Std. nach Ad TRF2^{ΔBΔM} bzw. Ad GFP Infektion.

4. Diskussion

4.1. Mausmodell der Hepatokarzinogenese

Es wurde ein Mausmodell der Hepatokarzinogenese entwickelt, welches die molekularen Kennzeichen des Crisis-Stadiums und des humanen HCC widerspiegelt (chronische Leberschädigung als Ursache der Karzinomentwicklung, Telomerdysfunktion, Verlust des p53 Kontrollpunktes, Entwicklung von Aneuploidie während der Tumorgenese). In dem Mausmodell zeigte sich eine signifikante Hemmung der Hepatokarzinogenese in Telomerase defizienten Mäusen im Vergleich zu Geschwistermäusen mit genetisch wiederhergestellter Telomerase Expression. Eine Reaktivierung von Telomerase führte in diesem Modell in den entstehenden Tumoren zu einer Stabilisierung der Telomerfunktion und limitierte dadurch die Akkumulation von DNA-Schädigung und die Entwicklung von Aneuploidie. Diese Daten zeigen erstmals in einem *in vivo* Modell der Karzinogenese, dass Telomerase für den Progress von p53-defizienten Tumoren mit dysfunktionellen Telomeren notwendig ist.

Im Menschen weist das HCC im Vergleich zum umliegenden nicht tumorösen Lebergewebe Telomerverkürzung auf (Ohashi et al., 1996; Miura et al., 1997; Oh et al., 2003; Plentz et al., 2004). Diese Telomerverkürzung tritt schon im geschädigten Lebergewebe und Vorstufen des HCC auf, wobei nochmals eine signifikante Telomerverkürzung in der Entwicklung zum HCC erfolgt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der gezeigt wurde, dass durch das Hepatitis B Oberflächenantigen geschädigte Leber einen höheren Anteil an sehr kurzen Telomeren aufweist, als ungeschädigte Leber. Hingegen ist nur ein geringer Unterschied in dem Anteil sehr kurzer Telomere zwischen geschädigter Leber und HCC detektiert worden.

Telomerverkürzung führt zu dysfunktionellen Telomeren, welche wiederum durch DNA-Degradation, Rekombination und Fusionen zu chromosomaler Instabilität führen können. Im menschlichen HCC konnte gezeigt werden, dass Telomerverkürzung mit chromosomaler Instabilität korreliert (Plentz et al., 2005). Hier wurde die Amplifikation des Chromosom 8 mit einer Abnahme der Telomerlänge beschrieben, wobei eine Kopienanzahl von mehr als 5 zu keinem weiteren Abfall der Telomerlänge mehr führte. Dies indiziert, dass die Telomere eine kritisch kurze Länge erreicht haben könnten.

Im humanen HCC treten chromosomale Aberrationen häufig auf, so sind Amplifikationen von 1q, 6p, 8q, 17q und 20q bzw. Deletionen der Chromosomen von 1p, 3p, 4q, 6q, 8p, 9p, 10q, 13q, 14q, 16q und 17p am häufigsten beschrieben worden (Kitay-Cohen et al., 2001; Buendia et al., 2002; Thorgeirsson & Grisham, 2002; Nishida et al., 2003; Pang et al., 2003; Cazals-Hatem et al., 2004; Hashimoto et al., 2004; Tischoff et al., 2005). Das Ausmaß an chromosomaler Instabilität korreliert hierbei mit der Dedifferenzierung der Tumorzellen und dem Anstieg an Aneuploidie, so weisen aneuploide Tumore mehr Aberrationen auf als diploide Tumore, was sich in der Telomerlänge widerspiegelt, die in aneuploiden Tumoren kürzer ist als in diploiden Tumoren (Wilkins et al., 2003; Plentz et al., 2004; Steinemann et al., 2006).

Die in dieser Arbeit analysierten Lebertumore zeigen ebenfalls ein hohes Ausmaß an chromosomalen Amplifikationen und Deletionen, welche sich in Telomerase defizienten Mäusen akkumulierte. Telomerase stabilisiert in p53-defizienten Tumoren die Telomerfunktion während der *in vivo* Hepatokarzinogenese ohne die Telomerlänge wieder aufzufüllen. Diese Daten stehen in Einklang mit früheren *in vitro* Experimenten, in denen in Zellkultur SV40 large T-Antigen transduzierten Fibroblasten eine Expression des Telomerase Gens den Crisis Kontrollpunkt umgehen konnten ohne die Telomerlänge aufzufüllen (Zhu et al., 1999). Es wird angenommen, dass Telomerase selber eine Schutzfunktion am dysfunktionellen Chromosom hat, indem die Telomerase eine sogenannte Capping Funktion ausübt (Zhu et al., 1999).

Die häufigstens chromosomalen Aberrationen, die sowohl in iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ als auch iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen auftraten betrafen die Chromosomen 1, 9, 10, 12, 13 und 15. Verglichen mit den synthenen Regionen im Menschen, traten 5 von diesen 6 Aberrationen auch im Menschen auf (Kitay-Cohen et al., 2001; Buendia et al., 2002; Thorgeirsson & Grisham, 2002; Nishida et al., 2003; Pang et al., 2003; Cazals-Hatem et al., 2004; Hashimoto et al., 2004; Tischoff et al., 2005), welches indiziert, dass diese Aberrationen eine Rolle in der Hepatokarzinogenese haben könnten, und dieses Mausmodell dem humanen HCC recht nahe kommt.

Das Tumorsuppressor Protein p53 ist in mehr als 50% aller Tumore im Menschen mutiert (Lane, 2005). Im Hepatozellulärem Karzinom hingegen treten Mutationen des p53 Gens weniger häufig auf, demgegenüber liegt aber in rund 70% der HCC eine Deletion des p53 Pathways vor (Tannapfel et al., 2001; Thorgeirsson & Grisham, 2002).

In einem Mausmodell der chronischen Leberschädigung, in dem HBs transgene Mäuse (Chisari et al., 1989) mit Telomerase Knockout Mäusen (Blasco et al., 1997) gekreuzt wurden, kam es im Vergleich sowohl in HBs⁺, Telomerase Knockout Mäusen als auch in HBs⁺, Telomerase Wildtyp Mäusen zur Entstehung von dysplastischen Foci, zu einem Progress zum HCC kam es aber nur in der HBs⁺, Telomerase Wildtyp Gruppe (Wiemann et al., 2005). In dieser Arbeit konnte hingegen gezeigt werden, dass der Verlust von p53 sowohl in Mäusen mit Telomerase Reaktivierung als auch in Telomerase defizienten Mäusen zur Entstehung von HCC führte. Es zeigt sich hier, dass der Verlust des p53 Kontrollpunktes einen signifikanten Einfluss im Tumorprogress ausübt.

Die Funktion der Telomerase Reaktivierung in p53 mutierten Tumoren am Crisis Kontrollpunkt und die Relevanz für die *in vivo* Formation von primären Tumoren mit mutiertem p53 sind bisher wenig beschrieben. Studien in Telomerase Knockout Mäusen haben die Tumorsuppression mit der Induktion des p53 Kontrollpunktes in Verbindung gebracht (Rudolph et al., 1999; Rudolph et al., 2001; Chang et al., 2003; Farazi et al., 2003). Dagegen verminderte die heterozygote p53 Deletion die Tumorsuppression in Antwort auf Telomerdysfunktion im Mausmodell (Farazi et al., 2006). Zusammengefasst zeigt die hier vorliegende Arbeit eine kritische Funktion der Telomerase für den Progress von p53 deletierten HCC im Mausmodell, welche relevant in der humanen Hepatokarzinogenese sein könnte.

Viele Studien demonstrieren eine Telomerase Reaktivierung in Tumoren und indizieren damit, dass Telomerase Reaktivierung ein limitierender Schritt in der Entstehung von menschlichen Tumoren ist, das Hepatozelluläre Karzinom eingeschlossen (Miura et al., 1997; Takahashi et al., 2000; Oh et al., 2003). Im menschlichen HCC konnte Telomerase Aktivität in über 90% der HCC nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu konnte in nicht tumorösem Lebergewebe keine oder nur eine geringe Telomeraseaktivität nachgewiesen werden (Miura et al., 1997; Takahashi et al., 2000). Die Telomeraseaktivität wird auch mit den Entwicklungsstadien des HCC in Verbindung gebracht. So sieht man in LGDN (low grade dysplastic nodule) eine vergleichbare Telomeraseaktivität zu geschädigter Leber (chronische Hepatitis, Leberzirrhose), während HGDN (high grade dysplastic nodule) eine erhöhte Telomeraseaktivität aufwies, die sich nicht signifikant von der Telomeraseaktivität im HCC unterschieden (Oh et al., 2003). Die Telomeraseaktivität wurde in dieser Arbeit in der Leber und im HCC ermittelt, wobei in der Leber von iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen wie in der Leber im Menschen keine oder nur eine sehr geringe

Telomeraseaktivität nachgewiesen wurde, wobei die Telomeraseaktivität so gering sein könnte, dass sie außerhalb des Detektionslevels liegen könnte. In den Tumoren von iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen konnte in 85,7% Telomeraseaktivität nachgewiesen werden, was dem HCC im Menschen sehr nahe kommt. Auch hier könnte in den als Telomerase-negativen Tumoren die Telomeraseaktivität unter einem detektierbaren Level liegen. Die Tumore in iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen hatten einen unterschiedlich hohen Anteil an Abwehrzellen und Bindegewebszellen, der Anteil der Tumorzellen an der Gesamtzellzahl des Tumors korrelierte aber nicht mit der Telomeraseaktivität.

Es wurde aufgezeigt, dass der Level an Telomeraseaktivität in Zusammenhang mit Expression der beiden Telomerasekomponenten hTERT und hTERC steht (Takahashi et al., 2000). Während hTERC mRNA sowohl im HCC als auch im nicht tumorösen Gewebe nachgewiesen werden konnte, wurde hTERT mRNA nur in den meisten HCC detektiert. Der Expressionslevel an hTERT mRNA korrelierte hierbei mit der Telomeraseaktivität, welches indiziert, dass Telomerasereaktivierung durch die Expression von hTERT gesteuert sein könnte. Im Mausmodell dieser Arbeit konnte hingegen kein signifikanter Unterschied in der Expression von mTERT und mTERC in der nicht tumorösen Leber und im HCC festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass Telomerase in den Lebertumoren posttranskriptional reguliert werden müssen oder weitere regulatorische Proteine, welche Telomeraseaktivität steuern, involviert sind (Liu et al., 1999; Akiyama et al., 2002; Swiggers et al., 2004).

Eine andere Möglichkeit der Verlängerung von Telomeren, könnte die Aktivierung von ALT sein (siehe Einleitung; Bryan et al., 1997), wobei dieser Mechanismus in einigen Tumorarten, wie Osteosarcome und Gehirntumore, vermehrt beschrieben ist (Ulaner et al., 2003; Hakin-Smith et al., 2003). In humanen HCC wurde ALT bisher nicht beschrieben.

Die Analyse mikroskopischer Foci ergab eine ähnliche Anzahl in iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ und iHet p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen, während der Progress zum dysplastischen Foci und zum HCC in iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺ Mäusen signifikant unterdrückt war. Erst der weitere Tumorprogress lief in beiden Gruppen unterschiedlich ab. Untersuchungen zwischen Telomerase Wildtyp und Telomerase Knockout Mäusen haben ergeben, dass die Telomerlänge einen entscheidenden Einfluss in der Tumorentstehung und dem Tumorprogress haben. Es kam hierbei zur einer gesteigerten Initiierung von mikroskopischen Foci in späten Generationen von Telomerase Knockout Mäusen gegenüber Telomerase Wildtyp Mäusen, auf der

anderen Seite konnten diese Tumore aber aufgrund fehlender Telomeraseaktivität nicht proliferieren (Rudolph et al., 2001).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Telomerase negative Tumore eine Akkumulation von Aneuploidie und DNA Schädigung zeigten, was mit einer Aktivierung von p53-unabhängigem Zellzyklusarrest und Apoptose korrelierte.

Es ist denkbar, dass in dem in dieser Arbeit beschriebenen Mausmodell, eine zu starke Instabilität von Nachteil für den Tumorprogress ist und p53-unabhängige Kontrollpunkte aktiviert werden. Hierbei könnten sogenannte Ploidy-Kontrollpunkte eine Rolle spielen, die durch hohe Expressionsraten zur Limitierung des Tumorprogress führen könnte. In diesem Zusammenhang könnte die erhöhte Telomeraseaktivität während der Tumorgenese im Menschen (Miura et al., 1997; Takahashi et al., 2000) einen selektiven Prozess darstellen, in dem Tumorzellen mit hoher Telomeraseaktivität die Ausbildung hoher chromosomaler Instabilität begrenzen und selektiv auswachsen können. Wobei die Telomeraseaktivität wahrscheinlich in den Anfangsstadien des HCC im Menschen schwach exprimiert ist und erst im fortgeschrittenen Tumorprogress stärker aktiviert wird (Oh et al., 2003). Dies indiziert, dass in frühen Entwicklungsstadien des HCC noch relativ lange Telomere vorliegen (Plentz et al., 2004), die aufgrund der geringen Telomerdysfunktion mit geringer chromosomaler Instabilität korreliert.

Ein möglicher Ansatz für die Behandlung von primären HCC mit dysfunktionellen Telomeren und deletierten p53 Signalweg im Menschen könnte die Telomerase-Inhibition oder die Telomer-Destabilisierung sein. Es wird diskutiert, ob p53 deletierte Tumore resistent gegenüber therapeutischen Ansätzen sind, welche sich auf ein Targeting der Telomere beziehen, da einige Signalwege in Antwort auf Telomerdysfunktion p53-abhängig sind, welches z.B. den Seneszenz Kontrollpunkt betrifft (Wright et al., 1992; Counter et al., 1992; Bond et al., 1994; Lechel et al., 2005). Zusätzlich haben Studien in Telomerase Knockout Mäusen gezeigt, dass Tumorsuppression in Antwort auf Telomerdysfunktion zu einer Aktivierung des p53-Signalweges führt (Rudolph et al., 2001; Chang et al., 2003; Farazi et al., 2006).

Die hier durchgeführte Arbeit zeigt erstmals, dass p53-unabhängige Tumorsuppressor Signalwege einen Einfluss auf die Progression von Telomerase defizienten Tumoren mit dysfunktionellen Telomeren während der *in vivo* Hepatokarzinogenese haben.

4.2. Akute Telomerdysfunktion durch TRF2 Inhibition

Die Überexpression von TRF2^{ΔBAM} induzierte *in vivo* in murinen Leberzellen akute Telomerdysfunktion, chromosomale Fusionen, aberrante Mitosen und Polyploidie. Weiterhin wird Seneszenz und Apoptose induziert, wobei die Seneszenz Antwort abhängig von p53 stattfindet, während Apoptose unabhängig von p53 induziert wird.

Es wurde sowohl in Zellkulturen von Mensch und Maus *in vitro* gezeigt, dass Überexpression von TRF2^{ΔBAM} zu Telomerdysfunktion führt (van Steensel et al., 1998; Karlseder et al., 1999; Smogorzewska & de Lange, 2002). Die Überexpression von TRF2^{ΔBAM} im retroviralen bzw. adenoviralen System führte dort zum Verlust des endogenen TRF2 vom Telomerende (van Steensel et al., 1998) und führte in Krebszelllinien zu chromosomalen Fusionen (van Steensel et al., 1998; Karlseder et al., 1999).

Es wurde in dieser Arbeit im Modell der akuten Telomerdysfunktion in der murinen Leber der Einfluss von p53 auf die zelluläre Antwort gezeigt. Die Apoptose Antwort widerspricht den bisher in der Literatur gezeigten Ergebnissen, wo eine p53-abhängige Apoptose Antwort in Mausfibroblasten und humanen Krebszelllinien *in vitro* gezeigt wurde (Karlseder et al., 1999). Dies könnte darauf hindeuten, dass Telomerdysfunktion durch Überexpression von TRF2^{ΔBAM} Leber-spezifische zelluläre Signale auslöst. Desweiteren induziert die hohe Expressionrate von TRF2^{ΔBAM} eine hohe Telomerdysfunktion in der Leber, welches ein Erreichen des Crisis-Stadiums indizieren könnte, was durch p53-unabhängige Apoptose charakterisiert ist (Shay and Wright 1992).

Es wurde in humanen Fibroblasten gezeigt, dass diese im Stadium der Seneszenz β-Galaktosidase exprimieren (Dimri et al., 1995). Durch diese Enzymaktivität kann das Substrat X-Gal umgesetzt werden, welches in einer Blaufärbung des Zytoplasmas resultiert. Diese Färbung ist nicht sehr spezifisch, stellt aber zur Zeit einen der besten Marker für replikative Seneszenz dar. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Kontrollpunkt der Seneszenz durch einige wenige dysfunktionelle Telomere induziert werden kann (Zou et al., 2004). In der hier vorliegenden Arbeit wurde Seneszenz durch geringe Level an TRF2^{ΔBAM} induziert. Diese niedrigen Expressionsraten führten zu einer geringen Telomerdysfunktion, welche eine p53-abhängige Seneszenzantwort hervorrufen konnte.

Im Gegensatz zum Modell der akuten Telomerdysfunktion kommt es im HCC Modell zu einem p53-unabhängigem Zellzyklusarrest in Telomerase defizienten iG4 p53^{Δ/Δ} HBs⁺

HCC. Dies könnte an den kritisch kurzen Telomeren liegen, welche einen Progress der Tumore einschränken und der fehlenden Möglichkeit zur Reaktivierung von Telomerase.

Dieses Zweistufenmodell der Signalantwort auf unterschiedliche Level an Telomerdysfunktion steht in Einklang mit dem klassischen Modell der Telomerhypothese, in der an humanen Fibroblasten der Einfluss von Telomerverkürzung gezeigt wurde (Shay, 1991). Moderate Telomerdysfunktion löst in diesem Modell p53-abhängige Seneszenz aus. Erst durch Deletion von Seneszenzkontrollpunkt Genen, wie z.B. p53, gehen die Zellen weitere Zellteilungen ein, was zu massiver Telomerdysfunktion führt bis zum Erreichen eines zweiten Kontrollpunktes (Crisis), in dem es zu einer massiven Apoptose der Zellen kommt. Dieses Modell spiegelt somit das Zweistufenmodell der Telomerhypothese gut wieder.

Diese Ergebnisse validieren den Nutzen des TRF2^{ABΔM} Systems als ein geeignetes System für die Untersuchung von zellulären Antworten auf akute Telomerdysfunktion *in vivo*. Eine Limitierung des Systems ist, dass die hervorgerufene akute Telomerdysfunktion nicht die graduelle Telomerverkürzung, wie sie in physiologischen Prozessen *in vivo* auftritt, widerspiegelt. Weiterhin kann die Überexpression von TRF2^{ABΔM} andere Signalantworten auslösen als dies durch natürliche Telomerverkürzung hervorgerufen wird. Die Inhibition von TRF2 könnte aber einen funktionellen Ersatz für Telomerdysfunktion, die normalerweise durch Telomerverkürzung in Folge des Verbrauch von Telomerasequenz entsteht, darstellen, da die TRF2 Inhibierung in diesem System die Fähigkeit zu Anaphasebückenbildung und chromosomalen Translokationen besitzt, welches Kennzeichen von Telomerdysfunktion und chromosomaler Instabilität darstellt. Das vorgestellte System kann benutzt werden, um spezifische Signalantwort-Mechanismen zu erforschen, die in Antwort auf Telomerdysfunktion in der murinen Leber induziert werden und es ermöglicht die Identifizierung p53-abhängiger und p53-unabhängiger Effekte von Telomerdysfunktion.

4.3. Ausblick

Die beiden beschriebenen Mausmodelle stellen Modellsysteme von unterschiedlich induzierter Telomerdysfunktion dar. Im Modell der Hepatokarzinogenese kam es durch Verlust von p53 und kurzen Telomeren zur Entwicklung von HCC, wobei es in Telomerase defizienten Tieren zur Inhibierung des Tumorprogress kam während DNA-Schädigung und chromosomale Instabilität akkumulierten. Das Mausmodell der akuten Telomerdysfunktion führte zu p53-unabhängiger Apoptose und p53-abhängiger Seneszenz nach Induktion von Telomerdysfunktion nach TRF2^{ABAM} Überexpression.

Die untersuchten Modelle deuten darauf hin, dass der p53-unabhängige Crisis-Kontrollpunkt in Antwort auf Telomerdysfunktion und Aneuploidie ein wichtiger Schritt in der Entstehung vom hepatozellulären Karzinom im Menschen ist. Es konnte gezeigt werden, dass Telomerase für den Progress der Karzinogenese im Mausmodell notwendig ist. Die Ergebnisse indizieren, dass p53-unabhängige Kontrollpunkte die Hepatokarzinogenese im Crisis-Stadium limitieren. Die molekularen Signalwege, welche die Tumorprogression im Crisis-Stadium inhibieren, sind bisher nicht beschrieben worden. Die Entstehung instabiler Chromosomen wird von der DNA-Reparaturmaschinerie erkannt, es erfolgt Reparatur oder Apoptose. Erst durch den Verlust von diesen normalerweise unüberwindbaren Kontrollpunktfunktionen der Apoptose und DNA-Reparatur können chromosomale Veränderungen in der Zelle verweilen. Diese Kontrollpunkte des Crisis-Stadiums müssen überwunden werden, damit Zellen immortalisieren können. Bei diesen Kontrollpunkten könnte es sich um Ploidie-Kontrollpunktgene handeln, z.B. BubR1 (budding uninhibited by benzimidazoles 1) (Shin et al., 2003; Hanks et al., 2004; Dai et al., 2004), aber auch essentielle Kontrollgene, die im subtelomeren Bereich liegen, könnten eine Rolle spielen (Sabatier et al., 2005; Kammori et al., 2006). Alterationen von Crisis-Kontrollpunkten könnten einen begrenzten Progress genetisch instabiler Tumore ermöglichen und entstehenden Tumoren erlauben, im Verlauf Mechanismen der Telomerstabilisierung und Immortalisierung zu aktivieren. Um einen Tumorprogress zu ermöglichen müsste zusätzlich die Aktivierung von Telomerase oder ALT erfolgen (Shay et al., 1996; Muntoni et al., 2004), um eine Telomerstabilisierung zu bewirken.

Es wäre von Interesse Signalwege und involvierte Gene des Crisis-Stadiums zu detektieren. Dies könnte durch eine genetische Analyse von Signalwegen im Crisis-Stadium der Hepatokarzinogenese sowie funktionellen Analysen erfolgen, die Kandidatengene hinsichtlich des Progress von Telomerase defizienten HCC im Crisis-

Stadium detektieren. Weiterhin würde die Durchführung funktioneller in vivo Screens zur Identifizierung von genetischen Läsionen, die einen Progress von Telomerase-defizienten HCC im Crisis-Stadium ermöglichen, dienen.

5. Literaturverzeichnis

- Akagi K, Sandig V, Vooijs M, Van der Valk M, Giovannini M, Strauss M, Berns A. Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:1766-1773.
- Akiyama M, Hideshima T, Hayashi T, Tai YT, Mitsiades CS, Mitsiades N, Chauhan D, Richardson P, Munshi NC, Anderson KC. Cytokines modulate telomerase activity in a human multiple myeloma cell line. *Cancer Res.* 2002;62(13):3876-3882.
- Allshire RC, Dempster M, Hastie ND. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(12):4611-4627.
- Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, DePinho RA. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000;406:641-645.
- Bailey SM, Goodwin EH, Cornforth MN. Strand-specific fluorescence in situ hybridization: the CO-FISH family. *Cytogenet Genome Res.* 2004;107(1-2):14-17.
- Barone M, Spano D, D'Apolito M, Centra M, Lasalandra C, Capasso M, Di Leo A, Volinia S, Arcelli D, Rosso N, Francavilla A, Tiribelli C, Iolascon A. Gene expression analysis in HBV transgenic mouse liver: a model to study early events related to hepatocarcinogenesis. *Mol Med.* 2006;12(4-6):115-123.
- Baumann P, Cech TR. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science.* 2001;292(5519):1171-1175.
- Bechter OE, Shay JW, Wright WE. The frequency of homologous recombination in human ALT cells. *Cell Cycle.* 2004;3(5):547-549.
- Bilud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet.* 1997;17(2):236-239.
- Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991;350(6319):569-573.
- Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell.* 2001;106(6):661-673.
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997;91:25-34.
- Bond JA, Wyllie FS, Wynford-Thomas D. Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene* 1994;9:1885-1889.

- Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet.* 1997;17(2):231-235.
- Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science.* 1997;277(5327):831-834.
- Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet JM. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell.* 2004;5(3):215-219.
- Brunori M, Mathieu N, Ricoul M, Bauwens S, Koering CE, Roborel de Climens A, Belleville A, Wang Q, Puisieux I, Decimo D, Puisieux A, Sabatier L, Gilson E. TRF2 inhibition promotes anchorage-independent growth of telomerase-positive human fibroblasts. *Oncogene.* 2006;25(7):990-997.
- Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med.* 1997;3(11):1271-1274.
- Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* 1995;14(17):4240-4248.
- Buendia MA. Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects. *Med Pediatr Oncol.* 2002;39(5):530-535.
- Burger AM, Bibby MC, Double JA. Telomerase activity in normal and malignant mammalian tissues: feasibility of telomerase as a target for cancer chemotherapy. *Br J Cancer.* 1997;75(4):516-522.
- Calvisi DF, Conner EA, Ladu S, Lemmer ER, Factor VM, Thorgeirsson SS. Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway confers growth advantages in c-Myc/E2F1 transgenic mouse model of liver cancer. *J Hepatol.* 2005;42(6):842-849.
- Calvisi DF, Thorgeirsson SS. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models of liver cancer. *Toxicol Pathol.* 2005;33(1):181-184.
- Cazals-Hatem D, Rebouissou S, Bioulac-Sage P, Bluteau O, Blanche H, Franco D, Monges G, Belghiti J, Sa Cunha A, Laurent-Puig P, Degott C, Zucman-Rossi J. Clinical and molecular analysis of combined hepatocellular-cholangiocarcinomas. *J Hepatol.* 2004;41(2):292-298.
- Chang S, Khoo CM, Naylor ML, Maser RS, DePinho RA. Telomere-based crisis: functional differences between telomerase activation and ALT in tumor progression. *Genes Dev.* 2003;17:88-100.

- Chin L, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee SL, Gottlieb GJ, Greider CW, DePinho RA. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 1999;97:527-538.
- Chirmule N, Propert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* 1999;6(9):1574-1583.
- Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989;59:1145-1156.
- Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, de Lange T. A human telomeric protein. *Science.* 1995;270(5242):1663-1667.
- Chung YJ, Jonkers J, Kitson H, Fiegler H, Humphray S, Scott C, Hunt S, Yu Y, Nishijima I, Velds A, et al. A whole-genome mouse BAC microarray with 1-Mb resolution for analysis of DNA copy number changes by array comparative genomic hybridization. *Genome Res.* 2004;14:188-196.
- Colgin L, Reddel R. Telomere biology: a new player in the end zone. *Curr Biol.* 2004;14(20):R901-902.
- Conner EA, Wirth PJ, Kiss A, Santoni-Rugiu E, Thorgeirsson SS. Growth inhibition and induction of apoptosis by HGF in transformed rat liver epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236(2):396-401.
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 1992;11:1921-1929.
- Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood.* 1995;85(9):2315-2320.
- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003;426:194-198.
- Dai W, Wang Q, Liu T, Swamy M, Fang Y, Xie S, Mahmood R, Yang YM, Xu M, Rao CV. Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Res.* 2004;64(2):440-445.
- de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005;19(18):2100-2110.

- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9363-9367.
- Duncan EL, Reddel RR. Genetic changes associated with immortalization. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 1997;62(11):1263-1274.
- Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet*. 2000;26(4):447-450.
- Dunsford HA, Sell S, Chisari FV. Hepatocarcinogenesis due to chronic liver cell injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Cancer Res*. 1990;50(11):3400-3407.
- Farazi PA, Glickman J, Horner J, DePinho RA. Cooperative Interactions of p53 Mutation, Telomere Dysfunction and Chronic Liver Damage in Hepatocellular Carcinoma Progression. *Cancer Res*. 2006;66:4766-4773.
- Farazi PA, Glickmann J, Jiang S, Yu A, Rudolph KL, DePinho RA. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63:5021-5027.
- Fedorcsak I, Ehrenberg L. Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem Scand*. 1966;20(1):107-112.
- Forney J, Henderson ER, Blackburn EH. Identification of the telomeric sequence of the acellular slime molds *Didymium iridis* and *Physarum polycephalum*. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(22):9143-9152.
- Gonzalez-Suarez E, Samper E, Flores JM, Blasco MA. Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat Genet*. 2000 Sep;26(1):114-117.
- Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. Evidence that high telomerase activity may induce a senescent-like growth arrest in human fibroblasts. *J Biol Chem*. 2003;278(9):7692-7698.
- Graham FL, Prevec L. Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol*. 1995;3(3):207-220.
- Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, Morin GB, DePinho RA. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*. 1998 Apr 2;16(13):1723-1730.
- Greenberg RA, Chin L, Femino A, Lee KH, Gottlieb GJ, Singer RH, Greider CW, DePinho RA. Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the *INK4a(delta2/3)* cancer-prone mouse. *Cell* 1999;97:515-525.

- Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*. 1989;337(6205):331-337.
- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405-413.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 1999;97(4):503-514.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 1999;400(6743):464-468.
- Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinberg RA. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med*. 1999;5(10):1164-1170.
- Hakin-Smith V, Jellinek DA, Levy D, Carroll T, Teo M, Timperley WR, McKay MJ, Reddel RR, Royds JA. Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme. *Lancet*. 2003;361(9360):836-838.
- Hanahan, D. DNA Cloning I - A Practical Approach. Glover, D.M. (Hrsg.) New York Oxford University Press/IRL Press 1985:205-225.
- Hande MP, Samper E, Lansdorp P, Blasco MA. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J Cell Biol*. 1999;144(4):589-601.
- Hanks S, Coleman K, Reid S, Plaja A, Firth H, Fitzpatrick D, Kidd A, Mehes K, Nash R, Robin N, Shannon N, Tolmie J, Swansbury J, Irrthum A, Douglas J, Rahman N. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet*. 2004;36(11):1159-1161.
- Harle-Bachor C, Boukamp P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 25;93(13):6476-6481.
- Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res*. 1991;256(2-6):271-282.
- Hashimoto K, Mori N, Tamesa T, Okada T, Kawauchi S, Oga A, Furuya T, Tangoku A, Oka M, Sasaki K. Analysis of DNA copy number aberrations in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinomas by conventional CGH and array CGH. *Mod Pathol*. 2004;17:617-622.

- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25:585-621.
- Hemann MT, Greider CW. Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(22):4474-4478.
- Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 2001;107:67-77.
- Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene.* 2002;21(4):598-610.
- Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Shay JW. Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia.* 2001;3(1):17-26.
- Houghtaling BR, Cuttonaro L, Chang W, Smith S. A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. *Curr Biol.* 2004;14(18):1621-1631.
- Hughes TR, Marton MJ, Jones AR, Roberts CJ, Stoughton R, Armour CD, Bennett HA, Coffey E, Dai H, He YD, et al. Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 2000;102:109-126.
- Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT, Weinberg RA. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 1994;4 :1-7.
- Jonkers J, Meuwissen R, van der Gulden H, Peterse H, van der Valk M, Berns A. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet.* 2001;29:418-425.
- Kalinichenko VV, Major ML, Wang X, Petrovic V, Kuechle J, Yoder HM, Dennewitz MB, Shin B, Datta A, Raychaudhuri P, Costa RH. Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev.* 2004;18(7):830-850.
- Kammori M, Onoda N, Nakamura K, Izumiyama N, Ogisawa K, Kurabayashi R, Ogawa T, Kaminishi M, Poon SS, Takubo K. Specific subtelomere loss on chromosome der(11)t(3;11)(q23;q23)x2 in anaplastic thyroid cancer cell line OCUT-1. *Int J Mol Med.* 2006;18(1):9-16.
- Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science.* 2002;295(5564):2446-2449.

- Karlseder J., Broccoli D., Dai Y., Hardy S., de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999;283: 1321-1325.
- Kim SH, Kaminker P, Campisi J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet.* 1999;23(4):405-412.
- Kitay-Cohen Y, Amiel A, Ashur Y, Fejgin MD, Herishanu Y, Afanasyev F, Bomstein Y, Lishner M. Analysis of chromosomal aberrations in large hepatocellular carcinomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001;131(1):60-64.
- Lane DP. Exploiting the p53 pathway for the diagnosis and therapy of human cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005;70:489-497.
- Lazzerini Denchi E, Celli G, de Lange T. Hepatocytes with extensive telomere deprotection and fusion remain viable and regenerate liver mass through endoreduplication. *Genes Dev.* 2006;20(19):2648-2653.
- Lechel A, Satyanarayana A, Ju Z, Plentz RR, Schaetzlein S, Rudolph C, Wilkens L, Wiemann SU, Saretzki G, Malek NP, et al.. The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. *EMBO Rep.* 2005;6:275-281.
- Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW 2nd, Greider CW, DePinho RA. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature.* 1998;392(6676):569-574.
- Lee JS, Chu IS, Mikaelyan A, Calvisi DF, Heo J, Reddy JK, Thorgeirsson SS. Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. *Nat Genet.* 2004;36(12):1306-1311.
- Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol.* 1992;225(4):951-960.
- Li B, Oestreich S, de Lange T. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell.* 2000;101(5):471-483.
- Liu K, Schoonmaker MM, Levine BL, June CH, Hodes RJ, Weng NP. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(9):5147-5152.
- Londono-Vallejo JA, Der-Sarkissian H, Cazes L, Bacchetti S, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res.* 2004;64(7):2324-2327.
- Lotze MT, Flickinger JC, Carr BI. Hepatobiliary neoplasm. In *Cancer: Principles and Practice of oncology*. V.T. DeVita, S. Hellman, S.A. Rosenberg, editors. 4th edition. Philadelphia, Lippincott. 1993:883-887.

- Martin-Rivera L, Herrera E, Albar JP, Blasco MA. Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(18):10471-10476.
- Martin-Ruiz C, Saretzki G, Petrie J, Ladhoff J, Jeyapalan J, Wei W, Sedivy J, von Zglinicki T. Stochastic variation in telomere shortening rate causes heterogeneity of human fibroblast replicative life span. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17826-17833.
- McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*, *Genetics* 1941;26: 234-282.
- McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. Telomeres and their control. *Annu Rev Genet*. 2000;34:331-358.
- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*. 1997;90(4):785-95.
- Miura N, Horikawa I, Nishimoto A, Ohmura H, Ito H, Hirohashi S, Shay JW, Oshimura M. Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;93:56-62.
- Montalto MC, Phillips JS, Ray FA. Telomerase activation in human fibroblasts during escape from crisis. *J Cell Physiol*. 1999;180(1):46-52.
- Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*. 1989;59(3):521-529.
- Müller HJ. The remaking of chromosomes, *The Collecting Net-Woods Hole* 1938;13: 181-198.
- Munoz P, Blanco R, Blasco MA. Role of the TRF2 telomeric protein in cancer and ageing. *Cell Cycle*. 2006;5(7):718-721.
- Munoz-Jordan JL, Cross GA, de Lange T, Griffith JD. t-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J*. 2001;20(3):579-588.
- Muntoni A, Reddel RR. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet*. 2005;14 Spec No. 2:R191-6.
- Nabetani A, Yokoyama O, Ishikawa F. Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and caffeine-sensitive DNA replication at the alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia body. *J Biol Chem*. 2004;279(24):25849-25857.

- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*;277(5328):955-959.
- Nishida N, Nishimura T, Ito T, Komeda T, Fukuda Y, Nakao K. Chromosomal instability and human hepatocarcinogenesis. *Histol Histopathol.* 2003;18:897-909.
- Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev.* 1998;12(8):1073-1085.
- Oh BK, Jo Chae K, Park C, Kim K, Jung Lee W, Han KH, Nyun Park Y. Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis. *J Hepatol.* 2003;39(5):786-792.
- Ohashi K, Tsutsumi M, Nakajima Y, Kobitsu K, Nakano H, Konishi Y. Telomere changes in human hepatocellular carcinomas and hepatitis virus infected noncancerous livers. *Cancer* 1996;77:1747-1751.
- Pang A, Ng IO, Fan ST, Kwong YL. Clinicopathologic significance of genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;146(1):8-15.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer.* 2001;94(2):153-156.
- Plentz RR, Caselitz M, Bleck JS, Gebel M, Flemming P, Kubicka S, Manns MP, Rudolph KL. Hepatocellular Telomere Shortening correlates with Chromosomal Instability and the Development of Human Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2004;40:80-86.
- Plentz RR, Schlegelberger B, Flemming P, Manns MP, Rudolph KL, Wilkens L. Telomere shortening correlates with increasing aneuploidy of chromosome 8 on a cellular level in primary human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:522-526.
- Poon SS, Martens UM, Ward RK, Lansdorp PM. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 1999;36:267-278.
- Prowse KR, Greider CW. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(11):4818-4822.
- Reddel RR, Bryan TM, Colgin LM, Perrem KT, Yeager TR. Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat Res.* 2001;155(1 Pt 2):194-200.
- Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer Lett.* 2003;194(2):155-162.
- Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C, DePinho RA. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell.* 1999 Mar 5;96(5):701-712.

- Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science*. 2000;287(5456):1253-1258.
- Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW, DePinho RA. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet*. 2001;28:155-159.
- Sabatier L, Ricoul M, Pottier G, Murnane JP. The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line. *Mol Cancer Res*. 2005 Mar;3(3):139-150.
- Sambrook J and Russell DW. (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Satyanarayana A, Greenberg RA, Schaetzlein S, Buer J, Masutomi K, Hahn WC, Zimmermann S, Martens U, Manns MP, Rudolph KL. Mitogen stimulation cooperates with telomere shortening to activate DNA damage responses and senescence signaling. *Mol Cell Biol*. 2004;24(12):5459-5474.
- Satyanarayana A, Wiemann SU, Buer J, Lauber J, Dittmar KE, Wustefeld T, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL. Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. *EMBO J*. 2003;22(15):4003-4013.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33(5):787-791.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33(5):787-791.
- Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res*. 1991;196(1):33-39.
- Shay JW, Van Der Haegen BA, Ying Y, Wright WE. The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res*. 1993;209(1):45-52.
- Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol*. 1996;8(1):66-71.
- Shin HJ, Baek KH, Jeon AH, Park MT, Lee SJ, Kang CM, Lee HS, Yoo SH, Chung DH, Sung YC, McKeon F, Lee CW. Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability. *Cancer Cell*. 2003;4(6):483-497.
- Smith S, Giriati I, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science*. 1998;282(5393):1484-1487.

- Smogorzewska A, de Lange T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* 2002;21(16):4338-4348.
- Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:177-208. Review.
- Steinemann D, Skawran B, Becker T, Tauscher M, Weigmann A, Wingen L, Tauscher S, Hinrichsen T, Hertz S, Flemming P, et al. Assessment of differentiation and progression of hepatic tumors using array-based comparative genomic hybridization. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006 Oct;4(10):1283-1291.
- Swiggers SJ, Nibbeling HA, Zeilemaker A, Kuijpers MA, Mattern KA, Zijlmans JM. Telomerase activity level, but not hTERT mRNA and hTR level, regulates telomere length in telomerase-reconstituted primary fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2004;297(2):434-443.
- Takahashi S, Kitamoto M, Takaishi H, Aikata H, Kawakami Y, Nakanishi T, Shimamoto F, Tahara E, Tahara H, Ide T, et al. Expression of telomerase component genes in hepatocellular carcinomas. *Eur J Cancer* 2000;36:496-502.
- Tannapfel A, Busse C, Weinans L, Benicke M, Katalinic A, Geissler F, Hauss J, Wittekind C. INK4a-ARF alterations and p53 mutations in hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2001;20:7104-7109.
- Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2002;31:339-346.
- Tischhoff I, Markwarth A, Witzigmann H, Uhlmann D, Hauss J, Mirmohammadsadeh A, Wittekind C, Hengge UR, Tannapfel A. Allele loss and epigenetic inactivation of 3p21.3 in malignant liver tumors. *Int J Cancer.* 2005;115(5):684-689.
- Ulaner GA, Huang HY, Otero J, Zhao Z, Ben-Porat L, Satagopan JM, Gorlick R, Meyers P, Healey JH, Huvos AG, Hoffman AR, Ladanyi M. Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma. *Cancer Res.* 2003;63(8):1759-1763.
- van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 1998;92(3):401-413.
- Venkatachalam S, Shi YP, Jones SN, Vogel H, Bradley A, Pinkel D, Donehower LA. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J.* 1998 Aug 17;17(16):4657-4667.

- Wiemann SU, Satyanarayana A, Buer J, Kamino K, Manns MP, Rudolph KL. Contrasting effects of telomere shortening on organ homeostasis, tumor suppression, and survival during chronic liver damage. *Oncogene*. 2005 Feb 24;24(9):1501-1509.
- Wilkens L, Flemming P, Gebel M, Bleck J, Terkamp C, Wingen L, Kreipe H, Schlegelberger B. Induction of aneuploidy by increasing chromosomal instability during dedifferentiation of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:1309-1314.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*. 1996;18(2):173-179.
- Wright WE, Shay JW. "The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization." *Exp Gerontol* 1992;27:383-389
- Wu G, Lee WH, Chen PL. NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem*. 2000;275(39):30618-30622.
- Yang Y, Xiang Z, Ertl HC, Wilson JM. Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(16):7257-7261.
- Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res*. 1999;59(17):4175-4179.
- Zheng YW, Taniguchi H. Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. *Semin Liver Dis*. 2003;23(4):337-348.
- Zhong Z, Shiue L, Kaplan S, de Lange T. A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol Cell Biol*. 1992;12(11):4834-4843.
- Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH. Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3723-3728.
- Zou Y, Sfeir A, Gryaznov SM, Shay JW, Wright WE. Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence? *Mol Biol Cell*. 2004;15(8):3709-3718.

6. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	André Lechel
Anschrift	Kiefkampstraße 21a 30629 Hannover E-Mail: lechel.andre@mh-hannover.de
Geboren am	19.08.1971 in Hamburg-Bergedorf
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder

Berufs- und Schulausbildung

Oktober 2001-Dezember 2006	Doktorarbeit an der Medizinischen Hochschule Hannover in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
Oktober 1994 – August 1999	Biologiestudium (Fachrichtung Mikrobiologie) an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, als Diplom-Biologe abgeschlossen
August 1997	Beschäftigung als studentische Hilfskraft im Robert Koch-Institut in Wernigerode
Oktober 1993 – September 1994	Maschinenbaustudium an der TU Hamburg-Harburg nach 2 Semestern beendet
August 1982 – Mai 1992	Besuch des Otto-Hahn-Gymnasium (Geesthacht/Schleswig-Holstein), mit Abitur abgeschlossen
August 1978 – Juli 1982	Besuch der Bundenskamp-Grundschule (Geesthacht)

7. Liste der Publikationen

Lechel A, Manns MP, Rudolph KL. Telomeres and telomerase: new targets for the treatment of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2004;41(3):491-497. Review.

Lechel A, Satyanarayana A, Ju Z, Plentz RR, Schaetzlein S, Rudolph C, Wilkens L, Wiemann SU, Saretzki G, Malek NP, Manns MP, Buer J, Rudolph KL. The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. *EMBO Rep.* 2005;6(3):275-281.

Roy Choudhury A, Ju Z, Djojotubroto MW, Schienke A, **Lechel A**, Schaetzlein S, Jiang H, Stepczynska A, Wang C, Buer J, Lee HW, von Zglinicki T, Ganser A, Schirmacher P, Nakauchi H, Rudolph KL. Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat Genet.* 2007;39:99-105.

Plentz RR, Park YN, **Lechel A**, Kim H, Nellessen F, Langkopf BHE, Wilkens L, Destro A, Fiamengo B, Manns MP, Roncalli M, Rudolph KL. Telomere shortening and inactivation of cell cycle checkpoints characterize human hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2007 Apr;45(4):968-976.

Lechel A, Holstege H, Begus Y, Schienke A, Kamino K, Lehmann U, Kubicka S, Schirmacher P, Jonkers J, Rudolph KL. Telomerase deletion limits progression of p53-mutant hepatocellular carcinoma with short telomeres in chronic liver disease. *Gastroenterology* 2007; in press.

8. Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Betreuer und Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. K.L. Rudolph für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas sowie für die Betreuung und der zahlreichen Diskussionen meiner Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. M.P. Manns für die Bereitstellung von Material und Arbeitsplatz in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie an der Medizinischen Hochschule Hannover.

Weiterer Dank gilt auch meinen ganzen Arbeitskollegen, die mich während meiner letzten fünf Jahre begleitet haben, mit denen ich Wissen und Techniken austauschen durfte, mit denen ich mich freuen durfte aber auch manchen Ärger überwinden musste: Aaheli, Andrea, Anna, Anne, Arpita, Birte, Britta, Christiane, Christoph, Frederike, Junius, Harsh, Holger, Hong, Kodanda, Luis, Meta, Nadia, Nadja, Ruben, Satya, Somayeh, Sonja, Steffi, Ujala und Zhenyu.

Dank gilt auch an unseren zahlreichen Kooperationspartnern innerhalb und außerhalb der Medizinischen Hochschule Hannover, die uns in unserer Arbeit unterstützen.

Desweiteren möchte ich mich bei Jos Jonkers und Henne Holstege vom Netherlands Kanker Institute (NKI) in Amsterdam bedanken, dass ich bei Ihnen die Array CGH Technik erlernen durfte.

Ganz besonderer Dank gilt auch meiner Frau Janine und meinen Söhnen Aaron und Ruben, die mich oftmals meiner Arbeit nachgingen ließen, und mich zahlreiche Stunden entbehren mussten.

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

„p53-unabhängige Kontrollpunkte in Antwort auf Telomerdysfunktion in Leberzellen“

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 29.11.2006



(Unterschrift)

Name: André Lechel