

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Abteilung Innere Medizin I
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

**Auswirkungen der spezifischen Telomeraseinhibition durch BIBR 1532
auf CD8⁺ T-Lymphozyten in vitro**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i.Br.

Vorgelegt 2004
von Carolin Exner
geboren in München

Dekan: Prof. Dr. med. Josef Zentner

1. Gutachter: PD Dr. med. C. Waller

2. Gutachter: PD Dr. med. U. Walker

Jahr der Promotion: 2004

Meinen Eltern und Großeltern

DANKSAGUNG:

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn PD Dr. med. Cornelius Waller für die stetige Unterstützung während der Entstehung der Arbeit und vielfältige konstruktive Kritik sowie für die Erstellung des Erstgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Uwe Martens für die Bereitstellung der interessanten und herausfordernden Promotionsthematik sowie ganz besonders für die hervorragende Betreuung. Seinem ständigen Engagement, seiner steten Hilfsbereitschaft und seinen zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen ist das Zustandekommen dieser Arbeit zu verdanken.

Für viele wertvolle konstruktive Hinweise und Anregungen, außerdem für die Erstellung des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Herrn PD Dr.med. Ulrich Walker besonders bedanken.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Klaus Damm von der Firma Boehringer Ingelheim für die freundliche Überlassung des Telomeraseinhibitors BIBR 1532, sowie für wertvolle Hinweise während der Erstellung der Versuche.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Nicole Augustin vom Institut für Mathematik für die statistische Auswertung der Experimente.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors von Dr. Uwe Martens und der wissenschaftlichen Labors der Abteilung für Hämatologie bedanken. Deren vielfältige wissenschaftliche Anregungen in zahlreichen fruchtbaren Gesprächen, die stetige Unterstützung und wertvolle Hilfe haben entschieden zur Lösung so manchen Problems beigetragen. Besonders bedanken möchte ich mich auch für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt gilt ein Dank auch meiner Familie. Ihre Anteilnahme und Geduld waren mir während der Erstellung der Arbeit immer eine große Hilfe.

Inhaltsverzeichnis:

I. EINLEITUNG	4
I.1. Telomere und Telomerase	4
I.1.1. Definition der Telomere	4
I.1.2. Historischer Rückblick	4
I.1.3. Das End-Replikations-Problem	5
I.1.4. Aufgaben der Telomere	5
I.1.5. Telomere und replikatives Altern	6
I.1.6. Telomerase	6
I.1.6.1. Definition der Telomerase	6
I.1.6.2. Vorkommen von Telomerase	7
I.1.7. Modelle zur Regulation der Telomerfunktion	8
I.2. Das lymphatische System	8
I.2.1. Zusammensetzung des lymphatischen Systems	8
I.2.2. T-Lymphozyten: Entwicklung und Reifung	9
I.2.3. Telomerase in T-Lymphozyten	10
I.2.4. Telomerlängendynamik in T-Zellen	11
I.2.5. Immunseneszenz	12
I.3. Telomerase und Tumorwachstum	13
I.3.1. Telomerase und maligne Transformation	13
I.3.2. Regulation der Telomerase	14
I.3.3. Telomeraseinhibition	15
I.3.3.1. Anforderungen an einen Telomeraseinhibitor	15
I.3.3.2. BIBR 1532, ein spezifischer Telomeraseinhibitor	16
I.4. Fragestellung und Ziel dieser Arbeit	17
II. MATERIAL UND METHODEN	18
II.I Material	18
II.1.1. Laborgeräte	18
II.1.2. Chemikalien	19

II.1.3. Lösungen	20
II.1.4. Plastikwaren und Einmalmaterial	22
II.2. Methoden	23
II.2.1. FICOLL - Dichtezentrifugation	23
II.2.2. Isolation von T-Lymphozyten über Magnetseparation	23
II.2.3. Reinheitsbestimmung am FACS	26
II.2.4. Stimulation peripherer T-Lymphozyten	27
II.2.5. Expansion von T-Lymphozyten mit BIBR 1532	29
II.2.6. Wachstumsbestimmung einer Kultur	30
II.2.7. Bestimmung der Telomerlänge mittels Durchflusszytometrie (Flow-FISH)	31
II.2.8. TRAP-Assay	34
II.2.9. Proliferations-Assay	38
II.2.10. Apoptose-Assay	40
II.2.11. Seneszenz- Assay	41
II.2.12. Statistische Testverfahren	42
III: ERGEBNISSE	43
III.1. Wachstum, Telomerdynamik und Telomeraseaktivität in CD8⁺ T-Lymphozyten	43
III.1.1. Proliferation CD8-positiver T-Lymphozyten in vitro	43
III.1.2. Telomeraseaktivität in T-Lymphozyten	45
III.1.3. Telomerlängendynamik in T-Zell-Expansionskulturen	46
III.2. Kultivierung von T-Lymphozyten mit einem neuartigen Telomeraseinhibitor	49
III.2.1. Telomeraseprofil	49
III.2.2. Proliferationsverhalten unter Telomeraseinhibition	50
III.2.2.1. Wachstumskurven und maximaler CPDL	51
III.2.2.2. Proliferationskinetik im WST-1-Assay	54
III.2.3. Telomerlängenverlauf	55
III.2.3.1. Telomerverluststraten	55
III.2.3.2. Initiale Telomerverlängerung und Telomeraseinhibition	56
III.2.4. Vitalitätsbestimmungen	59
III.2.4.1. Anteil toter Zellen	59
III.2.4.2. Bestimmung der Apoptoseraten	60
III.2.5. Detektion von Seneszenz versus Apoptose	62

IV. DISKUSSION	64
IV.1. Telomerlängendynamik und Rolle von Telomerase in aktivierten T-Zellen	64
IV.1.1. Kinetik der Telomerase in T-Zellen	64
IV.1.2. In-vitro-Proliferation von T-Zellen	65
IV.1.3. Telomerlängendynamik in T-Zellen in vitro	66
IV.1.4. Zellzyklus-Aktivität	68
IV.2. Telomeraseinhibition mit BIBR 1532 in T-Zellen in-vitro	69
IV.2.1. Ausschluss toxischer Nebeneffekte	69
IV.2.2. Keine Beeinflussung der Proliferationskapazität durch BIBR 1532	70
IV.2.3. Telomerlängendynamik unter Exposition mit BIBR 1532	71
IV.3. Interpretation der fehlenden Effekte von BIBR 1532 auf T-Zellen	72
V. ZUSAMMENFASSUNG	75
VI. LITERATURVERZEICHNIS	76
VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	85

I. EINLEITUNG

I.1. Telomere und Telomerase

I.1.1. Definition der Telomere

Die Enden der Chromosomen sind in den letzten 10 Jahren zunehmend in den Blickpunkt der onkologischen Grundlagenforschung gerückt. Diese als Telomere bezeichneten Strukturen wurden in Zusammenhang gebracht mit Alterungsprozessen, mit der Sterblichkeit von Zellen, aber auch mit Immortalisierungsvorgängen und damit der Entstehung von Krebs. Gleichzeitig eröffnete die Erforschung der chromosomalen Endstrukturen hoffnungsvolle neue Ziele der Tumorthherapie.

Telomere sind Nukleoproteinkomplexe, bestehend aus identischen, sich vielfach wiederholenden DNA-Sequenzen des Musters (TTAGGG)_n und assoziierten Proteinen. [7] Sie sind an den Enden eukaryotischer Chromosomen lokalisiert und dienen dem Schutz des Genoms. Durch ihre Lokalisation und wegen ihrer Schutzfunktion werden sie auch als „Kappen“ der Chromosomen bezeichnet.

I.1.2. Historischer Rückblick

Bereits 1961 machte L. Hayflick die Beobachtung, dass Fibroblasten in Kultur nur eine bestimmte Anzahl an Zellteilungen vollziehen können, und danach ihre proliferative Tätigkeit einstellen. [32] Dieser Zustand wird als Seneszenz bezeichnet, und der Zeitpunkt des Proliferationsstops als sog. Hayflick-limit oder *Mortality stage 1*.

Rund 20 Jahre vorher hatten Muller und McClintock beobachtet, dass durch Strahlung geschädigte Chromosomen zwar Translokationen und Deletionen innerhalb des Chromatins zeigten, die Enden davon jedoch nicht betroffen waren. 1941 konnte McClintock zeigen, dass zwar gebrochene Chromosomen mit ihren freien gebrochenen Enden fusionieren und so dizentrische Chromosomen bilden, dass aber solche, deren Endstrukturen intakt sind, vor einer End-zu-End-Fusion geschützt sind. [55, 61] Daraus schlossen beide auf die besondere Rolle der Chromosomenenden beim Erhalt der chromosomalen Stabilität.

Diese Endstrukturen der Chromosomen konnten später als Telomere identifiziert werden.

1990 zeigte Harley in Fibroblasten erstmals, dass sich die Telomerasequenzen mit fortschreitender Kulturdauer und Zahl der Zellteilungen verkürzen. [30] Als wichtiger Grund

dieser kontinuierlichen Telomerverkürzung wird die unvollständige Replikation der Chromosomenenden angesehen, die als End-Replikations-Problem bezeichnet wurde. [64, 65, 89]

I.1.3. Das End-Replikations-Problem

Im Rahmen der Zellteilung kommt es in der Zelle zu einer Verdopplung der DNA, die anschließend an beide Tochterzellen weitergegeben wird. Von jedem DNA-Strang der Mutterzelle wird von DNA-Polymerasen ein komplementärer Tochterstrang neu synthetisiert. Der Ablesevorgang ist jedoch nur in 5'→3'-Richtung möglich. Der zweite Strang wird daher fragmentweise, am 3'Ende beginnend, rückwärts in sog. Okazaki-Fragmenten ebenfalls in 5'→3'-Richtung synthetisiert. Zum Start des Vorgangs werden jedesmal RNA-Primer benötigt, die am Ende der Replikation wieder entfernt werden. Von DNA-Polymerasen wird dort die fehlende DNA eingefügt. An den beiden freien 3'-Enden der DNA ist diese „Kittung“ durch Ligasen allerdings nicht möglich. Der Primer wird entfernt, aber es verbleibt am 3'-Ende ein kurzes Stück einzelsträngiger, unreplizierter DNA. Durch die fehlende Endreplikation nimmt die DNA bei jeder Abschrift um 50–200 Basenpaare ab. [46]

I.1.4. Aufgaben der Telomere

Telomere als hochrepetitive Sequenzen am Ende der Chromosomen schützen das Chromosom vor dem Verlust funktioneller DNA durch wiederholte Zellteilungen. Darüberhinaus erfüllen Telomere weitere Aufgaben zum Schutz der chromosomalen Integrität. Die Telomerstruktur ermöglicht beispielsweise Reparaturenzymen eine Unterscheidung zwischen natürlichen und durch Brüche entstandenen Chromosomenenden. Wie Kappen schützen Telomere die Chromosomen damit vor Fusionsereignissen, Translokationen, oder dem Angriff von DNA-Polymerasen. [24]

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass Telomere mit ihren doppelsträngigen Enden eine Schlinge, als „t-loop“ bezeichnet, bilden, durch die sie ein stumpfes Ende erhalten. Der einzelsträngige 3'-Überhang interkaliert dabei mit der doppelsträngigen DNA, wird quasi in sie eingebettet. Man nimmt an, dass zur Bildung dieser Schleife eine minimale Telomerlänge sowie die Anwesenheit bestimmter telomerbindender Proteine (TRF-1; TRF-2) nötig sind. [25] Das Phänomen der Seneszenz scheint assoziiert zu sein mit der Auflösung der loop-Struktur. [25, 52]

I.1.5. Telomere und replikatives Altern

Durch wiederholte Teilungen werden die Telomere einer Zelle kürzer. Bei Erreichen einer kritisch kurzen Telomerlänge wird vermutlich die T-loop-Struktur beeinträchtigt und ein DNA-Schadenssignal ausgelöst. [87] Damit ist das Stadium der replikativen Seneszenz erreicht, das durch das Ende der Zellteilungsfähigkeit somatischer Zellen gekennzeichnet ist.[1]

Seneszenz äußert sich durch Sistieren des Zellzyklus, fehlende proliferative Antwort auf mitoseinduzierende Stimuli [65], veränderte Proteinexpression [19] und chromosomale Instabilität mit Degradationen, Fusionen und Translokationen [6].

Telomere können in unterschiedlicher Längen in fast allen somatischen Zellen verschiedener Spezies gefunden werden. Sie sind in ihrer Funktion eng verknüpft mit dem Enzym Telomerase, das für den Erhalt und die Stabilisierung der chromosomalen Endstrukturen von Bedeutung ist.

I.1.6. Telomerase

I.1.6.1. Definition der Telomerase

Telomerase ist ein Nukleo-Proteinkomplex, bestehend aus einer katalytischen Untereinheit hTERT (human telomerase reverse transcriptase) mit einer reversen Transkriptase und einer der telomerischen Sequenz komplementären RNA-Vorlage, hTR, sowie mehreren regulierenden Proteinen. [21, 63]

Durch den Anteil der Reversen Transkriptase hTERT ist das Enzym in der Lage, nach der Vorlage ihrer RNA-Komponente neue DNA-Sequenzen der Form TTAGGG an das 3'-Ende des telomerischen Überhangs zu synthetisieren. Telomeraseaktivität findet sich vor allem in Tumorzellen. Der Großteil somatischer Zellen hingegen zeigt keine Telomeraseaktivität und ist dadurch infolge stetigen Telomerverlusts in der Lebensspanne limitiert.

Erstmals wurde das Enzym in Tetrahymena beschrieben [23]. Beim Menschen bilden die katalytische Untereinheit (hTERT) und die RNA-Vorlage (hTR) die beiden aktivitätslimitierenden Komponenten des Enzyms. [15] Die Funktion der Telomerase ist weiter reguliert durch eine Reihe interagierender Proteine (TRF-1, TRF-2, TIN-2, Tankyrase) sowie einer Reihe assoziierter Proteine (TLP-1, EST2, Hsp90 und p23, p80, p95) [63, 82]. Sie wirken teils permissiv, teils gegenregulatorisch auf den Angriff von Telomerase [76].

I.1.6.2. Vorkommen von Telomerase

In der Mehrzahl aller Tumorzellen dient das Enzym Telomerase als Mechanismus, um die Telomere stabil zu halten und immortales Wachstum zu ermöglichen. Einige wenige somatische Zellen besitzen aufgrund ihrer speziellen proliferativen Anforderungen ebenfalls Aktivität von Telomerase. Hierzu gehören die Keimzellen, Zellen des hämatologischen Systems wie Stammzellen, T- und B-Lymphozyten [12, 36]

Vor allem Keimzellen und hämatopoetische Vorläuferzellen unterliegen hohen replikativen Anforderungen und müssen daher fähig sein, durch regulierte Telomeraseexpression ihr proliferatives Potential auch bei hohem Zellumsatz zu erhalten.

Im übrigen Teil der somatischen Zellen wird eine Repression der Telomeraseaktivität über transkriptionelle sowie posttranskriptionelle Mechanismen ausgeübt, so dass das Enzym in diesen Zellen nicht aktiviert vorliegt. [14]

Abb. 1 zeigt die Zusammenhänge zwischen Telomeraseaktivität, Telomerlänge und Wachstumspotential für diese Zelltypen.

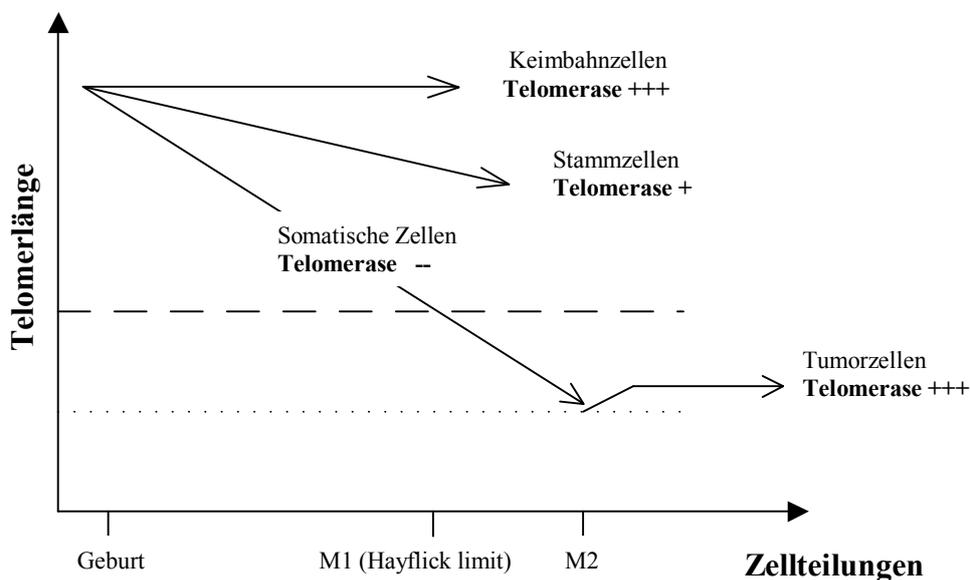


Abb.1: Telomeraseaktivität, Telomerlänge und proliferative Aktivität der verschiedenen Zelltypen im Vergleich

I.1.7. Modelle zur Regulation der Telomerfunktion

Inzwischen sind eine Reihe telomerassoziierter Proteine wie TRF-1 und TRF-2 (telomeric repeat binding factor 1 und 2), TIN-2 (TRF-1 interacting nuclear protein 2), Tankyrase und das End-bindende Protein Pot-1, charakterisiert, die an der Regulation des Telomerkomplexes und der Schleifenformation beteiligt zu sein scheinen. [4, 11, 78, 79, 83, 84]

Insbesondere das Protein TRF-2 scheint eine wichtige Rolle bei der loop-Formation und damit der Protektion der telomerischen Enden zu spielen, indem es in Interaktion mit den TTAGGG-Sequenzen die Schleifenformation und die Interkalation des 3'-Einzelstranges unterstützt. Inhibition des Proteins durch Expression einer dominant-negativen Mutante führte zu Telomerdysfunktion, die sich in der Öffnung der Schleifenformation, einem schnellen Verlust des 3'-Telomerüberhangs und letztlich der Induktion von Apoptose manifestierte. [38]

Die Telomerfunktion als Wahrscheinlichkeitsmodell:

Die Funktion der Telomere wurde 2000 von E. Blackburn als Wahrscheinlichkeitsmodell beschrieben. Danach können Telomere sich in zwei Zuständen, einem gekappten, in dem die Integrität des Chromosoms gewährleistet ist, sowie einem ungekappten Zustand befinden, zwischen denen sie in einer bestimmten stochastischen Häufigkeit wechseln. Mit zunehmendem Telomerverlust steigt die Wahrscheinlichkeit für einen Verbleib im ungekappten Zustand, worauf die Zelle mit Zellzyklusarrest oder der Einleitung von Apoptose reagiert. Daher wird nicht mehr das Modell einer kritischen Telomerverkürzung, sondern die stochastische Funktion des „Kappungszustandes“ (capping status) als entscheidender Faktor der Telomerfunktion gesehen. [6]

Auch Proteine des DNA-Doppelstrangbruch-Reparatursystems wie das Ku-Protein sind am Telomerlängenerhalt beteiligt. [6, 22] Ungekappte Telomere scheinen hier ähnlich zu wirken wie DNA-Strang-Brüche und statt der üblicherweise stattfindenden DNA-Reparatur die Telomerverlängerung durch den Angriff von Telomerase zu vermitteln.

I.2. Das lymphatische System

I.2.1. Zusammensetzung des lymphatischen Systems

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der spezifischen Telomeraseinhibition auf die Telomerlängenregulation in T-Lymphozyten dargestellt. Deshalb erfolgt zunächst eine kurze

Darstellung des lymphatischen System, dessen immunologischen Funktionen und der Auswirkungen des Telomerverlusts.

Das lymphatische System setzt sich aus den zwei großen Gruppen der B- und der T-Lymphozyten zusammen. B-Lymphozyten sind verantwortlich für die Antikörperproduktion und bilden die humorale Seite der Immunantwort. T-Zellen gliedern sich in die zwei großen Klassen der Helfer- und der zytotoxischen T-Lymphozyten, die nach ihren Oberflächenproteinen auch als $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen bezeichnet werden. Daneben existieren noch NK-Zellen und gamma-delta-T-Zellen. Sie alle gehören der zellulären Seite des Immunsystems an. [40] $CD4^+$ -T-Lymphozyten unterstützen durch Antigenerkennung und Zytokinproduktion unter anderem die T-B-Zell-Kooperation. Zytotoxische T-Lymphozyten besitzen die Fähigkeit zur Lyse der Zielzelle nach Antigenerkennung.

Die Antigenerkennung geschieht in $CD4^+$ sowie $CD8^+$ T-Zellen über den mit dem Oberflächenantigen CD3 assoziierten T-Zell-Rezeptor (TCR) in Interaktion mit einem Molekül des Major Histocompatibility Complex (MHC). Es existieren zwei große Typen von MHC-Komplexen. MHC-I-Proteine werden auf allen somatischen Zellen exprimiert, MHC-II-Proteine finden sich dagegen vor allem auf lymphohämatopoetischen Zellen. $CD8^+$ -T-Lymphozyten agieren nur mit dem MHC-Komplex der Gruppe I, $CD4^+$ -T-Lymphozyten dagegen nur mit dem der Gruppe II. [40]

I.2.2. T-Lymphozyten: Entwicklung und Reifung

T-Zellen durchschreiten auf ihrem Weg von der unreifen Vorläuferzelle zum peripheren Blutlymphozyten mehrere Entwicklungsschritte in verschiedenen Organkompartimenten.

Die T-Zell-Vorläufer entstammen dem Knochenmark. Im Thymus findet unter enormer Proliferation unreifer Thymozyten eine Selektion der für adäquate Immunantwort geeigneten Lymphozyten statt [40]. Diese reifen dann in mehreren Schritten zu $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ positiven T-Lymphozyten heran. [94] Die reifen T-Lymphozyten zirkulieren als naive T-Lymphozyten im peripheren Blut.

Aktivierung von T-Lymphozyten:

Die T-Zell-Aktivierung geschieht, unabhängig vom T-Zell-Subtyp, über den T-Zell-Rezeptor. Antigene, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden, werden von B-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen und verdaut. Schließlich wird auf dem MHC-Komplex ein Peptid präsentiert, das von entsprechenden T-Zellen über den TCR erkannt

werden kann. Meist ist zur Aktivierung noch eine Costimulation über weitere Oberflächenproteine erforderlich.

Nach der Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und Peptid-MHC- Komplex erfolgt im T-Lymphozyten eine Reaktionskaskade zur Aktivierung der Zelle. Im Zellkern wird die IL-2-Transkription eingeleitet, Il-2 wird sezerniert und fördert autokrin die Proliferation des T-Lymphozyten. Zusätzlich wird die Proliferation durch parakrine Stimuli anderer Immunzellen unterstützt und der T-Lymphozyt so zur klonalen Expansion angeregt. Da für die unterschiedlichen Antigene nur jeweils sehr wenige T-Zellen die passende Bindungsstelle besitzen, müssen diese im Falle einer Rezeptor-Antigenbindung die Kapazität besitzen, sehr schnell zu differenzieren und klonal zu expandieren. Dies erfordert von der Zelle in kurzer Zeit viele Teilungsschritte. [92, 93] Nach erfolgter Immunantwort geht der Großteil der T-Zellen durch Apoptose zugrunde. Einige der nun spezifischen Zellen existieren differenziert als Memory-T-Zelle weiter, um im Falle eines späteren Antigenkontakts durch klonale Expansion schnell eine erneute Immunantwort auslösen zu können.

I.2.3. Telomerase in T-Lymphozyten

Im Gegensatz zu den meisten normalen somatischen Zellen besitzen T-Zellen vorübergehend Telomeraseaktivität. 1995 wiesen Hiyama et al. Telomeraseaktivität sowohl in Knochenmarks- wie auch peripheren Blutlymphozyten und hämatopoetischen Vorläuferzellen nach. [12, 36] Die Telomeraseaktivität der T-Lymphozyten in vivo erfolgt streng reguliert nur in Entwicklungsstadien mit hoher proliferativer Aktivität. [92] Zur Zeit der Selektion und Reifung im Thymus finden sich hohe Telomeraseaktivitäten, die im Bereich von Tumorzell-Aktivität liegen. Die ruhenden naiven T-Lymphozyten des peripheren Blutes haben hingegen keine oder nur sehr geringe Telomeraseaktivität.

Die Bindung eines Antigens an den T-Zell-Rezeptor induziert in der Zelle das Signal zur Proliferation. T-Lymphozyten aus lymphatischen Organen, in denen eine T-Zell-Aktivierung stattfindet, zeigten deutliche Telomeraseaktivität in vivo. [90]

Es wird vermutet, dass die transiente Telomeraseaktivität in T-Lymphozyten die Zelle vor einem übermäßigen Telomerverlust bei einer massiven klonalen Expansion im Rahmen einer Immunantwort schützt. So könnte eine vorzeitige Erschöpfung des Immunzellpools aufgehalten werden.

I.2.4. Telomerlängendynamik in T-Zellen

Trotz intermittierender Telomeraseaktivität unterliegen T-Zellen, wie andere somatische Zellen, einer limitierten Lebensspanne. Während in-vitro-Expansion beobachtete man in peripheren Blutlymphozyten und Knochenmarkszellen fortschreitenden Telomerverlust. [30, 84] In-vivo-Untersuchungen der Telomerlänge von Immunzellen verschiedener Altersgruppen zeigten eine progrediente Telomerverkürzung mit dem Alter. [73]

Die Telomerlänge von Effektor- und Memory-Zellen von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten in vivo ist um etwa 1,4 KB gegenüber den entsprechenden naiven T-Zellen verkürzt, eine Beobachtung, die den höheren bereits vollzogenen Zellumsatz widerspiegelt. [93] Auch in der $CD28^-CD8^+$ -Subpopulation der T-Zellen konnten signifikant gegenüber der $CD28^+$ -Subpopulation verkürzte Telomere gezeigt werden. Seneszenz in T-Zellen ist begleitet von einem Verlust der $CD28$ -Expression. Gleichzeitig nimmt der Anteil $CD28^-CD8^+$ T-Zellen mit dem Alter zu, was auf die fortschreitende replikative Seneszenz des $CD8^+$ Immunzellpools hinweist. [60]

1999 zeigten Rufer et al. durch Flow-FISH-Untersuchungen, dass die Telomerverlustrate im Verlauf des Lebens keinesfalls immer konstant ist. Sowohl Granulozyten als auch T-Lymphozyten unterlagen innerhalb des ersten Lebensjahres einem deutlich höheren Telomerverlust als in den weiteren Lebensjahren, in denen die Telomerverlustrate relativ konstant blieb. Dies deutet auf einen deutlich höheren Umsatz dieser Zellen im ersten Lebensjahr hin. [72]

Telomerlängendynamik in B-Zellen:

Im Gegensatz zu den T-Memory-Zellen haben B-Memory-Zellen verlängerte Telomere gegenüber naiven B-Zellen. Man nimmt an, dass telomerase-vermittelt in Memory B-Zellen eine proliferative „Reserve“ in Form verlängerter Telomere für künftige Immunantworten geschaffen wird. Allerdings nimmt auch in B-Zellen die Telomerlänge mit zunehmendem Alter ab. [50, 91]

Die transiente Telomeraseaktivität in Lymphozyten scheint demnach nur zu einer Verzögerung, nicht zu einer Überwindung des progredienten Telomerverlustes und damit der limitierten Lebensspanne dieser Zellen zu führen. Tatsächlich konnte bei Patienten während und bis zu einem Jahr nach einer akuten EBV-Infektion kein erhöhter Telomerverlust in $CD8^+$ -T-Zellen festgestellt werden, während zu späteren Zeitpunkten die Telomere deutlich gegenüber

gesunden Vergleichspersonen verkürzt waren. [68] Diese Beobachtung zeigt einen möglichen präventiven Effekt von Telomerase auf die Telomerstabilität von T-Lymphozyten, der aber nicht ausreichend ist für den kompletten Telomererhalt.

I.2.5. Immunseneszenz

Eine limitierte Anzahl an Immunzellen durchläuft im Laufe eines Lebens eine große Anzahl klonaler Expansionen. Dieses hat vermuten lassen, dass Zeichen der Immundysfunktion, wie sie im Alter beobachtet werden, mitbedingt sind durch fortschreitenden Telomerverlust und letztlich einer Erschöpfung des Immunsystems durch replikative Seneszenz.

Alte Menschen sind häufig anfälliger für schwere Infektionskrankheiten, sprechen weniger gut auf Impfungen an, und haben eine herabgesetzte Abwehr für primäre Infektionen mit neuen Pathogenen. Die Involution des Thymus, eine herabgesetzte Gesamtzahl immunologisch tätiger Zellen [20], sowie eine veränderte Zusammensetzung der einzelnen Subpopulationen der T- und B-Lymphozyten beim alten Menschen. [49, 58] sind einige der Faktoren, die zu dieser Immundefizienz beitragen.

Hinzu kommt der fortschreitende Telomerverlust der Immunzellen, durch den die Fähigkeit zu schneller klonaler Expansion vermindert ist. Für eine adäquate Immunantwort ist die massive Vervielfachung der beteiligten Zellen notwendig. Der Anteil naiver CD8⁺-positiver T-Lymphozyten geht mit zunehmendem Alter fast bis zur totalen Erschöpfung zurück [20], zugunsten eines steigenden Anteils an Memory-Zellen. [58]. Um gegen neue Antigene eine Immunantwort erzeugen zu können, werden naive Lymphozyten mit der Fähigkeit zur Expansion und Differenzierung in ausreichender Zahl benötigt. Zur Abwehr bekannter Erreger müssen die entsprechenden Memory-T-Zellen massiv proliferieren. Es ist denkbar, dass bei stark verkürzten Telomeren diese Antworten nur eingeschränkt möglich sind, und es daher zu keiner adäquaten Immunantwort kommen kann. Dieses Phänomen wurde als Immunseneszenz bezeichnet. [19]

Eine Reihe von Erkrankungen wie Trisomie 21, Dyskeratosis congenita oder Teleangiectasia hereditaria wurden in Verbindung gebracht mit Phänomenen vorzeitiger Alterung. Interessanterweise sind diese Erkrankungen darüberhinaus assoziiert mit Immundefekten, wie sie typischerweise beim geriatrischen Patienten auftreten. [59] Vaziri et al. untersuchten 1993 die Telomerlänge in T-Zellen von Patienten mit Down-Syndrom. Tatsächlich fanden sich bei

Down-Syndrom-Patienten kürzere Telomere und ein stärkerer Telomerverlust pro Jahr als bei einer gesunden Vergleichspopulation. [86]

Eine interessante Entdeckung wurde kürzlich für die autosomal-dominante Form der Dyskeratosis congenita gemacht. Neben den typischen Hautsymptomen fallen D. congenita-Patienten auf durch Immundefekte und Symptome der Anämie. Diese Krankheit ist ebenfalls gekennzeichnet durch beschleunigten Telomerverlust und chromosomale Instabilität. In der RNA-Komponente (hTR) der Telomerase wurde ein genetischer Defekt festgestellt, was auf die enge Verbindung von Telomerasedysfunktion und Immundefizienz hinweist. [88]

Bei HIV-Patienten, die als Ausdruck der Erkrankung einen hohen Umsatz CD8-positiver T-Lymphozyten haben, zeigte sich eine beträchtliche Telomerverkürzung der CD28⁻CD8⁺-Fraktion. Gleichzeitig nahm der Anteil CD8⁺CD28⁺-Zellen ab. Dies wurde als Zeichen der Erschöpfung des CD8-T-Zell-Pools durch anhaltende klonale Expansion gewertet. [95] Auch chronische Erkrankungen wie SLE werden aufgrund der chronischen Lymphozytenstimulation in Verbindung mit verstärktem Telomerumsatz gebracht. [37]

Aufschlussreiche Ergebnisse ergaben Untersuchungen an Mäusen, deren Telomerase-Gen genetisch ausgeschaltet wurde (*knock-out-Maus*). Diese Tiere zeigten nach mehreren Generationen bei zunehmender telomerischer Instabilität neben herabgesetzter Fertilität und kürzerer Überlebenszeit auch ein reduziertes Potential der T- und B-Lymphozyten zu Proliferation und klonaler Expansion [34, 35, 44]

I.3. Telomerase und Tumorwachstum

I.3.1. Telomerase und maligne Transformation

Die maligne Transformation einer Zelle ist ein multifaktorieller Prozess. Das Zusammenwirken genetischer Mutationen, die Aktivierung von Onkogenen oder Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen, sowie fehlgesteuerte Signaltransduktionskaskaden können ein verändertes, malignes Wachstum und den Verlust der Zellzykluskontrolle zur Folge haben. [29]

Ein zweiter wesentlicher Schritt der Tumorentstehung ist die Überwindung der replikativen Blockaden, die erst die Immortalisierung der Zelle bewirkt. Durch die Aktivierung von Telomerase sind Zellen in der Lage, die replikative Seneszenz durch Addition neuer telomerischer Sequenzen zu umgehen, und das im Sinne einer Tumorzelle veränderte Genom zu stabilisieren. Die Telomeraseaktivierung wird daher als ein wesentlicher Faktor im Prozess der malignen Transformation betrachtet. [10, 14, 54]

Im Prozess der malignen Transformation muss zunächst die durch Telomerverkürzung erreichte proliferative Blockade des *Mortality stage 1* überwunden werden. Man nimmt an, dass zu diesem Zeitpunkt normalerweise ein p53-vermittelter *DNA-damage pathway* einsetzt, der den Austritt aus dem Zellzyklus und letztlich den apoptotischen Zelluntergang induziert. Durch bestimmte Faktoren wie die Transformation mit SV40-Virus oder Large-T-Antigen, die zu einer Inaktivierung von p53 führen, sind manche Zellen in der Lage, eine Anzahl weiterer Teilungsschritte bis zu einer zweiten Replikationsblockade, dem *Mortality stage 2* (M2) oder *Crisis* zu durchlaufen. [26]. Der Eintritt in *Mortality stage 2* scheint ein entscheidender Zeitpunkt der malignen Transformation zu sein: die Telomere haben eine kritisch kurze Länge erreicht und DNA-Instabilitäten wie Doppelstrangbrüche, Deletionen oder Translokationen und End-zu-end-Fusionen sind häufig. Die meisten Zellen gehen anschließend in Apoptose über. In einigen wenigen Fällen scheinen die genomischen Veränderungen hingegen zu chromosomalen Aberrationen zu führen, die eine Überwindung der Replikationsbarriere durch die Aktivierung von Telomerase, und eine weitere Proliferation als maligne transformierte Zelle ermöglichen. [54] (siehe auch Abb.1, S.7)

Tatsächlich besitzen etwa 90% aller Tumorarten eine hohe Aktivität von Telomerase. Die meist relativ kurzen Telomeren werden durch das reaktivierte Enzym auf stabiler Länge gehalten. [13, 57] Die restlichen 10 % der untersuchten Tumorarten sind dagegen telomerase-negativ. Hier wird ein Telomerlängenerhalt über Mechanismen wie ALT (*alternative lengthening of telomeres*) diskutiert. [39]

I.3.2. Regulation der Telomerase

Die beiden wesentlichen Komponenten von Telomerase sind die RNA-Vorlage „human telomerase RNA template“, hTER, und die katalytische Untereinheit „human telomerase reverse transkriptase“, hTERT. Die RNA-Komponente hTER liegt ubiquitär in allen menschlichen Zelltypen, auch den telomerasenegativen, vor, und ist daher nicht mit dem Aktivitätszustand des Enzyms korreliert. [2, 15]. Zwischen der Telomeraseaktivität und der mRNA-Expression von hTERT besteht hingegen ein enger Zusammenhang. Das hTERT-Protein scheint daher die Aktivierung des Enzyms zu kontrollieren. [14, 57] Tatsächlich konnte durch experimentellen Transfer des hTERT-Gens in normale somatische Zellen wie Fibroblasten ein Tumorzell-ähnlicher Phänotyp induziert werden. Die transformierten Zellen zeigten ektope Telomeraseaktivität, Telomerlängenerhalt und unlimitiertes Wachstum. [9, 98]

I.3.3. Telomeraseinhibition

Telomerase wurde als eine von 6 Komponenten identifiziert, die Krebs definieren und als essentiell für das unbegrenzte Tumorwachstum gelten. [28] Daraus wurde der therapeutische Ansatz postuliert, durch gezielte Inhibition des Enzyms einen tumorspezifischen Mechanismus zu blockieren, ohne Einfluss auf normale Zellen zu haben.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Möglichkeiten zur Inhibition von Telomerase untersucht. Das Spektrum reicht hierbei von Antisense-Oligonukleotiden gegen die RNA-Vorlage von hTERT [33, 43] über die pharmakologische Blockade mit G-Quadruplex-Inhibitoren bis zur Anwendung von Reverse Transkriptase-Hemmern zur unspezifischen Inhibition der Telomerase-RT in immortalen Zelllinien. [81, 75] In den meisten Experimenten konnte tatsächlich eine Reduktion der Telomeraseaktivität, und, in Folge, ein progredienter Telomerverlust sowie Zelltod durch Apoptose gezeigt werden. Kürzlich wurde durch Transfektion mit der dominant-negativen Mutante von hTERT in Tumorzellen der Verlust der Immortalität durch genetisches „Ausschalten“ der Telomeraseaktivität erreicht. [27, 97] All diese Versuche sind jedoch in ihrer Anwendung für den klinischen Gebrauch limitiert, da sie entweder, wie die Gen-Therapie, komplizierte und unphysiologische Applikationsmodi erfordern, oder, wie der Versuch mit RT-Inhibitoren, in ihrer Spezifität eingeschränkt sind.

I.3.3.1. Anforderungen an einen Telomeraseinhibitor

Eine Tumorthherapie durch Telomeraseinhibition weist eine Reihe von Besonderheiten auf, und stellt daher ganz bestimmte Anforderungen an einen therapeutischen Wirkstoff. Nach Beginn der Behandlung kommt es, abhängig von der Ausgangstelomerlänge der malignen Zellen, erst nach einer Reihe von Zellteilungen zur Telomerverkürzung auf eine kritische Länge. Daher ist die Wirkung eines Inhibitors erst nach einem bestimmten zeitlichen Intervall nach Anwendungsbeginn zu erwarten. Für den klinischen Gebrauch bedeutet dies eine Langzeitanwendung mit relativ konstanten Spiegeln des Medikaments. Daher sollte ein Telomeraseinhibitor leicht zu verabreichen und gut oral resorbierbar sein und wenig toxische Nebeneffekte zeigen.[16, 75] Die Telomeraseinhibition ist in Tumorzellen mit kürzeren Telomeren sicherlich effektiver. [71]

I.3.3.2. BIBR 1532, ein spezifischer Telomeraseinhibitor

Der spezifische Telomeraseinhibitor BIBR 1532 (2-(E)3-naphtalen-2-yl-but-2-enoylamino)-benzoic acid), der von der Firma Boehringer identifiziert wurde, ist ein Stoff einer Gruppe kleiner Moleküle, der die katalytische Komponente des Telomerase-Enzyms in vitro dosisabhängig, nicht-kompetitiv inhibiert. [67]

Damit zeigt das Wirkprinzip gewisse Ähnlichkeiten zu Nicht-Nukleosidischen Inhibitoren der Reversen Transkriptase, wie sie in der HIV-Therapie angewendet werden. Die Wirkung von BIBR 1532 ist jedoch spezifisch für Telomerase, experimentell konnte eine Inhibierung anderer Enzyme weitestgehend ausgeschlossen werden. Die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von BIBR 1532 wurde bei 93 nM festgestellt. [16]

Versuche von Damm et al. zeigten, dass auch Dosen 100-fach über dem IC_{50} keinen Anhalt für Toxizität gaben. Daher wurde die Konzentration von 10 μ M als optimale Wirkkonzentration in vitro angenommen und eingesetzt.

BIBR 1532 und Tumorzellen:

Die Wirkung von BIBR 1532 konnte bislang in einer Reihe von Tumorzelllinien bestätigt werden. Diese Zelllinien (NCI-H460 Bronchialkarzinom, HAT 1080 Fibrosarkom, MDA-MB231 Mammakarzinom, DU145 Prostatakarzinom) zeigten unter Telomerase-Inhibition eine progrediente Telomerverkürzung. Nach anfänglich unverändertem Wachstum kam es nach weiterer Kulturzeit zu einer Verlangsamung und schließlich zum vollständigen Sistieren der Proliferationsaktivität inhibitorbehandelter Zelllinien. Nach Wegnahme des Telomeraseinhibitors zeigte sich eine vollständige Reversibilität der Wirkung, mit einem Wiedereinsetzen des Wachstums und einer erneuten Telomerlängenzunahme. [16]

I.4. Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

T-Lymphozyten gehören zu den wenigen Zellpopulationen des menschlichen Körpers, die trotz limitierter Lebensspanne und Erosion der Telomere über Telomeraseaktivität verfügen. Über Auswirkungen der Telomeraseinhibition auf Zellen des Körpers, die ebenfalls Telomeraseaktivität besitzen, ist noch wenig bekannt. Damit muss diesen Zellen besondere Aufmerksamkeit im Rahmen potentieller neuer Tumortherapien wie der spezifischen Telomeraseinhibition gewidmet werden.

In dieser Arbeit sollten mögliche Auswirkungen des Telomeraseinhibitors BIBR 1532 auf proliferierende CD8⁺T-Zellen in-vitro untersucht werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird zunächst das Proliferationsverhalten, die Dynamik der Telomerlängen sowie das Profil der Telomeraseaktivität in CD8-positiven T-Lymphozyten während in-vitro-Expansion verifiziert.

Ausgehend von diesen Resultaten wird im zweiten Teil eine mögliche Beeinflussung des Wachstums, des Telomerlängenverhaltens und der Vitalität von CD8⁺ T-Zellen unter Exposition mit einem neuartigen Telomeraseinhibitor untersucht. Diese Untersuchungen können erste Hinweise zu erwartender Nebenwirkungen auf den Immunzellpool liefern, die bei klinischer Anwendung der Telomeraseinhibition auftreten könnten.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.I Material

II.1.1. Laborgeräte

- Auswertcomputer für Durchflusszytometrie (Power-PC, Macintosh)
- Digitalthermometer (D 2000)
- Durchflusszytometer: FACS Calibur (Becton Dickinson)
- Einfriebehälter (Nalgene)
- ELISA-Lesegerät (DPC)
- ELISA-Auswertcomputer (Zenith)
- Fluoreszenzmikroskop; Axiphot (Zeiss)
- Heizblock (Liebisch)
- Hybridisierungsofen (Heraeus)
- Inkubations-Schüttler
- Inkubator (Heraeus)
- Kühlschrank + 4°C (Liebherr)
- Laserdrucker (Hewlett Packard)
- Mikroskop; CK2 (Olympus)
- Multipipette (Eppendorf)
- Neubauer-Zählkammer (Brand)
- Nylonfilter, 30 µm für MACS-Säulen (Miltenyi)
- Personalcomputer (Pyramid)
- pH-Meter (Knick)
- Photometer
- Pipetboy (Integra)
- Pipette 1-10 µl (Gilson)
- Pipette 1-20 µl (Gilson)
- Pipette 20-200 µl (Gilson)
- Pipette 200-1000µl (Gilson)
- Sterilbank (Baker Company)
- Stickstofftank (Arpege)
- Thermocycler; Gene Amp 9700 (Perkin Elmer)
- Tischzentrifuge; Biofuge 15 (Heraeus)

- Ultraschallwasserbad
- Vortexer (Heidolph)
- Wasserbad (Julabo)
- Wasser-Vakuum-Saugvorrichtung
- Zentrifuge; Megafuge 3,0 R (Heraeus)
- Zellseparationsmagnet (Miltenyi)

II.1.2. Chemikalien

- Apoptose-Detection-Kit; Annexin-V-FLUOS (Roche)
- Aqua ad injectabile (Fresenius)
- Bio Rad Dye Solution (Bio Rad)
- CD3 Antibeats (Miltenyi Biotech)
- CD 8 Isolationskit (Miltenyi Biotech)
- CD 4 Antikörper –PE-markiert (Becton-Dickinson)
- CD 8 Antikörper- FITC-markiert (Becton-Dickinson)
- Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma)
- Dimethyl-Sulfoxide=DMSO (Sigma)
- Fetales Kälberserum =FCS (Gibco)
- Ficoll-Hypaque Solution (Biochrom)
- Fluoreszenzbeads
- Formaldehyd (Merck)
- Formamide (Merck)
- Humanalbumin (Baxter)
- IgG-Antikörper (Becton-Dickinson)
- Interleukin 2 (Chiron)
- Orthoclone OKT-3 (Janssen-Cilag)
- Penicillin (Bio Whitacker)
- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung = PBS ohne Ca⁺ und Mg²⁺(Gibco)
- Propidiumiodid (PI)
- Proteinlösung (Bio Rad)
- RNase, DNase frei (Boehringer Mannheim)
- RPMI Zellkulturmedium ohne Glutamin (Gibco)
- Senescence Detection Kit (Trevigen)

- Streptomycin (Bio Whittaker)
- Telomerase-Inhibitor BIBR 1532 (Boehringer Ingelheim)
- Telomerase PCR ELISA Kit ^{plus} (Roche Diagnostics)
- Telomer-PNA-Sonde, FITC-gelabelt, Sequenz (AATCCC)₃ (Perseptive)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane= TRIS (Sigma)
- TRIS-HCl pH=8,0 (Gibco)
- Trypanblau (Gibco)
- Tween 20 (Sigma)
- WST-1 Proliferations-Assay (Roche)

II.1.3. Lösungen

Annexin-V Fluos labeling solution:

Für jede Probe

20 µl Annexin.V labeling reagent

20 µl Propidium Iodid solution

1 ml Inkubations-Puffer

Formaldehydlösung 3% (Fixative):

8% 37%iges Formaldehyd

92% PBS

Hybridisierungs-Mix für Telomerprobe:

20 mMol TRIS/HCl; pH= 7,0

0,1 % BSA

70% deionisiertes Formamid

0,3 µg/µl FITC-gelabelte Telomer-PNA

aqua ad injectabile

Hybridisierungsmix für Negativkontrolle:

20 mMol TRIS/HCl

0,1% BSA

70 % Formamid

aqua ad injectabile

Kulturmedium für T- Lymphozyten:

RPMI

10 % FCS

1 % Penicillin

1% Streptomycin

PI-Mix:

PBS

0,1% BSA

10 µg/ml RNase

0,05 µg/ml Propidiumiodid

Säulenpuffer für die MACS-Säule:

PBS, pH = 7,2

0,5% BSA

2mM EDTA

Lösung im Ultraschall-Wasserbad 30-60 min. entgasen

Waschlösung I:

10mM TRIS

0,1 % BSA

0,1 % Tween 20

70 % Formamide

Waschlösung II:

PBS

0,1 % BSA

0,1 % Tween 20

II.1.4. Plastikwaren und Einmalmaterial

- Blutentnahme-Monovetten, 10 ml (Sarstedt)
- Combitips für Multipette; 5 ml (Eppendorf)
- Deckgläser für Objektträger; 18x18mm (Langenbrinck)
- Einmalhandschuhe (Ansell)
- FACS-Röhrchen (Falcon)
- Filter zur Sterilfiltration 20 µm (Miltenyi)
- Magnetsäule LS (Miltenyi)
- Objektträger; 76x26 mm (Langenbrinck)
- Parafilm (Parafilm)
- PCR-Tubes 200 µl (Perkin Elmer)
- Perfusorspritzen; 50 ml (Braun)
- Photometrie-Küvetten (Greiner)
- Pipetten für Pipetboy 2ml, 5 ml (Falcon)
- Pipetten für Pipetboy 10 ml, 25ml, 50 ml (Costar)
- Pipettenspitzen 10,20,200,1000 µl (ART)
- Plastikröhrchen; 0,5; 1,5 ml (Eppendorf)
- Plastikröhrchen 10 ml, 50 ml (Falcon)
- Sterilfilter (Millipore)
- Sterilfiltrationsflaschen (Corning)
- Zellkulturflaschen: 25 cm³, 75 cm³, 175 cm³ (Falcon)
- Zellkulturplatten; 6 well, 12 well, 24 well, 96 well (Falcon)

II.2. Methoden

II.2.1. FICOLL - Dichtezentrifugation

Material:

Buffy coat bzw. Peripheres Blut

PBS +0,1%BSA

Ficoll-Hypaque solution

Zur Separation mononukleärer Zellen (MNCs), zu denen die Subpopulationen der T- und B-Lymphozyten sowie Monozyten gehören, nutzt man die Methode der Dichtezentrifugation.

Es wurden je etwa 10ml Blut mit PBS (Raumtemperatur) in einem 50 ml Falcon-Tube auf 35 ml verdünnt. Für jedes Röhrchen wurden in einem neuen Falcon-Tube 15 ml Ficoll-Hypaque-Lösung vorgelegt. Über diese ließ man anschließend vorsichtig das vorverdünnte Blut fließen, ohne das Blut mit dem Ficoll zu mischen.

Die Röhrchen wurden bei 2100U/min und 18-20°C für 25 min. ohne Bremse zentrifugiert.

Die Dichte von Ficoll-Hypaque liegt zwischen der von Mononukleären Zellen und der von Erythrozyten und Granulozyten. Durch diesen Dichteunterschied lagern sich Blutbestandteile und Ficoll während der Zentrifugation schichtweise übereinander. Ganz unten im Röhrchen befinden sich als Pellet die Erythrozyten und Granulozyten, bedeckt von Ficoll. Darüber lagert sich ein schmaler Ring aus mononukleären Zellen. In der obersten Schicht befindet sich Plasma mit Thrombozyten.

Die von den übrigen Blutbestandteilen getrennten mononukleären Zellen konnten nun, nach Verwerfen der Plasmaschicht, vorsichtig mit der Pipette abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt werden.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die MNCs in PBS+0,1%BSA aufgenommen und gezählt.

II.2.2. Isolation von T-Lymphozyten über Magnetseparation

Nach der Gewinnung von MNCs durch Ficoll-Dichtezentrifugation können aus diesen Lymphozyten sowie deren Subpopulationen isoliert werden. Dazu bedient man sich des Prinzips der Magnetseparation. Über die Kopplung der Oberflächenproteine an eisenhaltige Kolloide können die so markierten Zellen in einem Magneten separiert werden. Es stehen zwei Prinzipien, die Positiv- und die Negativselektion, zur Verfügung.

Für eine **Positivselektion** werden Oberflächenmarker der gesuchten Zellen durch spezifische Antikörper gebunden, die außerdem mit Eisenpartikeln beladen sind. Lässt man die so markierten Zellen durch eine in einen starken Magneten eingebettete Säule fließen, so bleiben die antikörpermarkierten Zellen in der Säule haften, die unmarkierten dagegen werden durch Spülen ausgewaschen.

Zur Isolation der CD3 T-Zell-Population, bestehend aus T-Helfer ($CD4^+$) und zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) wurde eine Positivselektion des T-Zell-Oberflächenmarkers **CD3** durchgeführt.

Die **Negativselektion** bedient sich des gleichen Prinzips der magnetischen Kopplung. Hier werden jedoch die nicht erwünschten Zellen mit einem Antikörpercocktail markiert und so aus dem Zellgemisch entfernt. Lediglich die gesuchte Zellpopulation wird nicht durch die magnetische Säule abgefangen und findet sich nach der Separation im ausgewaschenen Eluat.

Die Isolierung der $CD8^+$ positiven T-Zellen erfolgte durch eine Negativselektion mit einem Antikörper-Cocktail gegen die Oberflächenantigene CD4, CD11b, CD16, CD19, CD36 und CD56. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Antikörper-Bindungsstellen der $CD8^+$ -Zellen unbesetzt bleiben. Damit wird z.B. eine ungewünschte Prästimulation der Zellen oder eine Zytokinexpression durch Antikörperbindung vermieden.

a) Markierung der Zellen zur Säulenseparation:

Material:

MNCs

Anti-CD3-Microbeads (Miltenyi)

bzw. Anti-Hapten-Antibody-Cocktail für CD8

Säulenpuffer

MACS-Separationssäule, Größe VS⁺, Säulenständer

Positivselektion

Die MNC-Zellsuspension wurde in kaltem Puffer für die Säulenseparation (MACS-Puffer) gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in 80µl Puffer pro 1×10^7 Zellen aufgenommen. Pro 1×10^7 Zellen wurden 20 µl Anti-CD3 Micro Beads Antikörper hinzugegeben und 20 min. bei +4°C zur Antikörperbindung inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Antikörper mit MACS-Puffer vorsichtig herausgewaschen und die Zellen in 3ml Puffer aufgenommen.

Negativselektion:

Bei der Negativselektion der CD8⁺ T-Zellen geschieht die Markierung der Zellen in zwei Schritten. Zunächst wurde ein Hapten-Antikörper Cocktail (20 µl/1x10⁷ Zellen) hinzugegeben. Dieser enthält Antikörper gegen den größten Teil der in PBMCs zu erwartenden Leukozytenfraktionen. Nach Inkubation bei +4°C für 10 Minuten wurden die Zellen mit kaltem MACS-Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden magnetisch gelabelte Anti-Hapten Micro-Beads hinzugegeben, die an die gebundenen Antikörper im Zellgemisch binden und so die antikörperbesetzten Zellen magnetisch detektierbar machen. Nach erneuter 20 minütiger Inkubation und einem weiteren Waschschrift konnten die Zellen wie oben beschrieben in Puffer aufgenommen werden.

b) Säulenseparation:

Da die Zahl der MNCs in allen Ansätzen stets über 1x10⁷ lag, wurde die Säule der Größe VS+ verwendet.

Zur Separation wurde die Säule in den Magneten eingesetzt und zunächst mit 3 ml Puffer äquilibriert. Jetzt wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Zum Ausschluss eventueller Klumpen ist es sinnvoll, die Zellen vorher durch einen Filter laufen zu lassen. Nachdem die Suspension vollständig durch die Säule getropft war, wurde die Säule viermal mit einem vorgegebenen Volumen MACS-Puffer gespült. (VS+: 4x3ml)

Bei der Positivselektion der T-Zellen befindet sich die Fraktion CD3-positiver Zellen nun durch die magnetische Wirkung in der Säule gebunden. Der ausgespülte Puffer enthält alle Nicht-CD3-positiven MNCs. Zur Gewinnung der isolierten CD3⁺-Zellen wurde die Säule dem Magneten entnommen und nach Zugabe von 3 ml Puffer der Inhalt mit Hilfe des Spritzenstempels in ein neues Röhrchen ausgespült.

Nach Negativselektion befindet sich die gesuchte Fraktion der CD8⁺ Zellen im durchgetropften Puffer. Die restlichen Zellfraktionen sind in der Säule fixiert.

Jetzt konnten die Zellen gezählt und ein Aliquot zur Reinheitsbestimmung am FACS entnommen werden.

II.2.3. Reinheitsbestimmung am FACS

Mit Hilfe des Durchflusszytometers ist es möglich, den Anteil einer einzelnen Zellfraktion, wie auch die prozentuale Verteilung zweier Zelltypen in einem Zellgemisch zu bestimmen. Dieses geschieht über eine Einfach- bzw. Doppelfluoreszenzmarkierung der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und anschließender Anteilsbestimmung in der Durchflusszytometrie. Zur Reinheitsbestimmung der CD8⁺-Fraktion wurde eine Einfachfluoreszenzmessung durchgeführt.

Es wurden zwei Antikörper benötigt:

- Antikörper gegen Oberflächenantigen der gesuchten Fraktion (z.B. CD8), markiert mit FITC oder PE
- Antikörper gegen IgG₁, markiert mit dem gleichen Farbstoff wie oben, zur Detektion der Hintergrundfluoreszenz

In zwei FACS-Röhrchen wurden jeweils $1-2 \times 10^5$ Zellen gegeben und mit 1 ml kaltem PBS+0,1% BSA gewaschen. Nach Zentrifugation mit 1200U/min für 5 min. bei +4°C wurde der Überstand abgekippt, und 10µl des entsprechenden Antikörpers zum Zellpellet gegeben. Nach 20 minütiger Inkubation bei +4°C wurde zunächst ungebundener AK durch Waschen mit PBS entfernt, und die Zellen anschließend in 300 µl PBS bzw. 300 µl PBS mit 1% Formalin zur Stabilisierung aufgenommen.

Reinheitsbestimmung am FACS-Gerät:

Am FACS erfolgte zunächst eine Erfassung der IgG-markierten Zellen im Dot Plot nach Größe (Forward Scatter, FSC) auf der Abszisse versus Granularität (Sideward Scatter, SSC) auf der Ordinate, und die Präselektion der gesuchten Population über ein Gate. In einem weiteren Fenster wurde die Größe (FSC) gegen die gewählte Markierungsfluoreszenz (FITC bzw. PE) aufgetragen.

Zunächst wurde die Fluoreszenz der Negativkontrolle gemessen, und in diesem Fenster eine Markierung oberhalb der Population so gesetzt, dass > 99% der Zellen darunter erfasst waren.

Anschließend erfolgte die Messung der Positivkontrolle mit unveränderten Einstellungen. Die Population der Zellen oberhalb der gesetzten Markierung entspricht den antikörperbeladenen positiven Zellen. Durch statistische Auswertung konnte ihr prozentualer Anteil bestimmt werden.

II.2.4. Stimulation peripherer T-Lymphozyten

Die Gewinnung CD3- bzw. CD8-positiver T-Lymphozyten erfolgte aus zwei verschiedenen Quellen: In den Vorversuchen und den Kulturen, die mit „BC“ bezeichnet sind, wurden die Zellen aus dem nach Blutspenden anfallenden lymphozytenreichen Rest, dem sogenannten „buffy coat“, extrahiert. Die Gewinnung der CD8⁺ T-Zellen geschah aus dem peripheren Blut gesunder Spender im Alter zwischen 20 und 30 Jahren. Aus beiden wurden zunächst mononukleäre Zellen (MNCs) isoliert, aus denen anschließend mittels Magnetseparation die gesuchten CD3⁺- bzw. CD8⁺-T-Zell-Populationen separiert werden konnten.

Die T-Zellen wurden zum einen unspezifisch mit OKT-3 und IL-2 stimuliert, später erfolgte eine spezifische Stimulation der CD-8-positiven Zellen mit T2- Feeder-Zellen.

a. Stimulation mit OKT-3 und IL-2:

OKT-3 ist ein Antikörper gegen das Oberflächenprotein CD3, das, gekoppelt mit dem T-Zell-Rezeptor, auf T-Zell- Untergruppen vorhanden ist.

Die Besetzung und Stimulation des T-Zell-Rezeptors ist das erste Signal in der Aktivierung einer T-Zelle. Die Bindung von OKT-3 an den Zell-Rezeptor ahmt die Bindung von Antigen nach. Das kostimulatorisch wirkende, normalerweise autokrin von T-Zellen sezernierte IL-2 ist dem Kulturmedium zugegeben. Die Simulation der Rezeptor-Antigen-Bindung führt so zur polyklonalen Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten.

Material:

OKT-3 Coat-Lösung:

10 µl OKT-3 (=10µg)

10 ml HEPES-Puffer

Zunächst muss eine Beschichtung („coating“) der benötigten Kulturgefäße mit OKT-3 erfolgen. Der Boden einer 25 cm³ Kulturflasche wurde mit 5-10 ml der Coat-Lösung bedeckt und für 24h bei +4°C inkubiert. Während dieser Zeit kann sich der Antikörper an das Plastikmaterial anheften.

Vor der Verwendung wurde die Flüssigkeit abgegossen und die Flasche 1x mit PBS gewaschen.

Kultivierung:Material:

OKT-3-präpariertes Zellkulturgefäß

CD3⁺ T-Zellen

RPMI + Zusätze

IL-2-Stocklösung

Die mit dem Verfahren der Säulenseparation isolierten T-Lymphozyten wurden gewaschen und anschließend in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in T-Zell-Kulturmedium aufgenommen. Das Medium wurde mit IL-2 in einer Konzentration von 100 IU/ml versetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension in die OKT-3-beschichtete Kulturflasche gegeben. Nach 24 h Kultivierung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Zellsuspension in ein frisches Kulturgefäß überführt. Anschließend konnten die Zellen bis zum Mediumwechsel darin weiter kultiviert werden.

Bei jedem Mediumwechsel wurden die Zellen gezählt, eventuelle Aliquots zur Durchführung von Experimenten entnommen und nach einem Waschvorgang mit PBS in der gleichen Dichte neu ausplattiert. IL-2 wurde ebenfalls in oben angegebener Konzentration bei jedem Wechsel des Kulturmedium neu zugegeben.

Nach 14 Tagen erfolgte die erste Restimulation durch 24-stündige Kultivierung in einem OKT-3-gecoateten Zellkulturgefäß. Die Restimulation wurde in 14-tägigem Abstand durchgeführt.

b. Stimulation mit bestrahlten T2-Feeder-Zellen:

Für die Expansionsexperimente durch spezifische Stimulation wurden CD8⁺-selektionierte T-Lymphozyten aus peripherem Blut gesunder Spender verwendet. Zur Stimulation wurden mit 90 Gy bestrahlte T2-Zellen als Feeder-Zellen eingesetzt. Hierdurch kann eine deutliche Proliferationsantwort mit der Induktion EBV-spezifischer T-Lymphozyten induziert werden.

T2 ist eine Zelllinie, entstanden aus der Fusion der T-Zell-Leukämie-Linie CEM^R und der TAP-defizienten, EBV-transformierten B-lymphoblastoiden Zelllinie LCL. Der CEM^R-HLA-Locus ist in der Hybrid-Zelllinie T2 nach Negativselektion weitgehend verschwunden. TAP ist ein Protein, das für die MHC-I-Beladung und -Präsentation in der Prozessierung endogener Antigene verantwortlich ist. Bestimmte Membranproteine des Epstein-Barr-Virus (EBV)

werden in einer TAP-unabhängigen Weise prozessiert und von LCLs über HLA-A2 präsentiert. Der EBV-transformierte Charakter bleibt in T2-Zellen erhalten. [42, 45, 69] Daher können HLA-A2-positive T-Lymphozyten durch Kontakt mit T2-Zellen zu einer EBV-spezifischen Immunantwort angeregt werden. Zur T-Zell-Expansion kommen nur HLA-A2-positive Spender in Betracht.

Material:

CD8⁺ T-Lymphozyten (HLA-A2⁺ Spender)

RPMI +Zusätze

IL-2

T2-Zellen, bestrahlt mit 90 Gy

Die isolierten CD8-positiven T-Lymphozyten wurden gewaschen, und für jede Kultur 1×10^6 Zellen in 10ml Medium mit 100 IU/ml IL-2 in ein 25cm^3 Zellkulturgefäß aufgenommen. 5×10^5 der mit 90 Gy bestrahlten T2-Zellen wurden zu jeder T-Zell-Suspensionskulturen hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte wie oben angegeben bei 37°C und 5% CO_2 . Beim Mediumwechsel wurden die Zellen gezählt, eventuelle Anteile entnommen, und nach dem Waschen eine definierte Menge T-Zellen in frisch mit IL-2 versetztem Kulturmedium neu eingesetzt. Wöchentlich wurden bestrahlte Feederzellen in einer Größenordnung von 5×10^5 T2-Zellen pro 1 Million CD8⁺ T-Lymphozyten zur Restimulation hinzugefügt.

II.2.5. Expansion von T-Lymphozyten mit BIBR 1532

Die Expansion von CD8⁺ T-Zellen im Telomeraseinhibitions-Experiment erfolgte in Dreifachansätzen. Insgesamt wurden von 5 verschiedenen Spendern jeweils drei Ansätze T2-stimulierter T-Zellen mit unterschiedlichen Zusätzen expandiert:

- 1) Der erste Ansatz blieb unbehandelt und wurde nur mit bestrahlten Feeder-T2-Zellen und IL-2 (100U/ml) kultiviert.
- 2) Dem zweiten Ansatz, bezeichnet als „DMSO“, wurde zusätzlich DMSO als Negativkontrolle in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ zugegeben.
- 3) Der dritte Ansatz erhielt statt DMSO den Telomeraseinhibitor BIBR 1532 in der gleichen Konzentration von $10 \mu\text{M}$.

Alle Kulturen wurden solange expandiert, bis kein Wachstum mehr festgestellt werden konnte.

Material:CD8⁺ T-Lymphozyten

RPMI+IL2

T2-Feeder-Zellen, bestrahlt mit 90 Gy

DMSO

BIBR 1532

Alle drei Ansätze wurden mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^6 bei einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 10 ml Kulturmedium mit 5×10^5 bestrahlten Feeder-Zellen eingesetzt, den Ansätzen 2 und 3 wurde außerdem der jeweilige Zusatz beigefügt.

Die Restimulation erfolgte analog den oben beschriebenen T2-stimulierten T-Zellen in wöchentlichem Abstand. Die spezifischen Zusätze DMSO bzw. BIBR 1532 wurden bei jedem Mediumwechsel in einer Menge von 10 μ M erneuert, ebenso wurde dem Medium IL-2 hinzugefügt.

II.2.6. Wachstumsbestimmung einer Kultur

Das Wachstum wurde auf zwei Arten verfolgt: einmal durch regelmäßige Zellzahlbestimmung und daraus errechnet die mittlere Anzahl der Zellteilungen, und zum zweiten über einen enzymatisch basierten Proliferationsassay.

Bestimmung der Zellzahl

Material:

Neubauer-Zählkammer

Trypanblau-Lösung

Zum Zählen wurden die Zellen geerntet, resuspendiert und 10 μ l der Zelllösung mit der gleichen Menge Trypanblau (Verdünnungsfaktor 2) vermischt. Die Auszählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer, welche die Gesamtzahl der Zellen pro ml errechnen lässt.

Von diesem Gemisch wurden 10 μ l in eine präparierte Neubauer-Zählkammer gegeben, und die vier Quadranten unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die Bestimmung der Zellzahl pro ml geschah nach der Formel

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Ausgezählte Zellzahl}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Das Wachstum von Zellen erfolgt logarithmisch nach der Formel

$$\text{Endzellzahl} = \text{Ausgangszellzahl} \times 2^x \quad \text{mit} \quad x = \text{Anzahl der Zellteilungen}$$

Dadurch konnte aus der eingesetzten und der neu ermittelten Zellzahl die Anzahl der Verdopplungen der Population (Population doublings, PD), errechnet werden.

Dies erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{PD} = \ln \frac{\text{Neu ermittelte Zellzahl}}{\text{Eingesetzte Zellzahl}} \times 1,44$$

Die Gesamtsumme aller bereits durchlaufener PDs wird bezeichnet als Cumulative Population Doubling Level (CPDL).

Bestimmung des Anteils nekrotischer Zellen:

In der Trypanblau-Färbung lassen sich viable von toten Zellen durch den unterschiedlichen Grad ihrer Anfärbung unterscheiden. Während viable Zellen nur einen hellen blauen Rand erkennen lassen, färben sich nekrotische aufgrund ihrer zerstörten Membranintegrität komplett blau an. Durch Auszählung dieser Zellen konnte analog der Anteil nekrotischer Zellen bestimmt werden.

II.2.7. Bestimmung der Telomerlänge mittels Durchflusszytometrie (Flow-FISH)

Die Telomerlänge wurde durch eine Kombination einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und der Durchflusszytometrie, dem sogenannten Flow-FISH-Verfahren bestimmt. [72] Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, dass die telomerischen Enden der Chromosomen durch eine fluoreszenzmarkierte PNA-Sonde der Sequenz (AATCCC)₃ gebunden, und anschließend im Durchflusszytometer sichtbar gemacht und quantifiziert werden können. Durch zusätzliche Inkubation der Proben mit Propidiumiodid, einem Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet, können die Zellen im Durchflusszytometer nach ihrem DNA-Gehalt

getrennt und die Population der 2n-haltigen Zellen präselektiert werden. Die Intensität der FITC-Fluoreszenz in dieser Population ist korreliert mit der Anzahl gebundener Telomersequenzen einer Probe. [3, 51, 53]

Material:

Hybridisierungsmix

Waschlösung I

Waschlösung II

PI-Mix

4x 2x10⁵ Kontroll-PBLs

Bei jedem Experiment wurden 2 Kontrollen, bestehend aus PBLs bekannter Telomerlänge einer 23-jährigen Spenderin, mitgeführt. Vor Beginn einer Hybridisierung von Proben wurden zunächst die Kontrollen vorsichtig aufgetaut, 2x mit PBS+0,1%BSA gewaschen und gezählt. Die Telomerlängenbestimmung der Kontrollen erfolgte als Doppelansatz, daher wurden 4x 2x10⁵ Kontrollzellen auf 4 Eppendorf-Röhrchen verteilt.

Für jede Probe und die zwei Kontrollen benötigt man zwei Ansätze, einen zur Bestimmung der Telomerfluoreszenz und eine Negativkontrolle zur Messung der Autofluoreszenz. Für jede Probe wurden 2 Eppendorf-Tubes mit je 2x10⁵ Zellen befüllt, und die Tubes anschließend in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Danach wurde der Überstand möglichst rasch und vollständig abgesaugt. Anschließend wurde zu jeder Probe je 200µl Hybridisierungsflüssigkeit zugegeben; zum ersten Ansatz die PNA-haltige Lösung, zum zweiten Ansatz die Kontrolllösung. Die Zellen wurden gut resuspendiert und konnten nun entweder gleich weiterverarbeitet oder bei -80° C gelagert werden.

Hybridisierung:

Für die Bindung der PNA-Sonde an die telomerischen Sequenzen muss zunächst die DNA durch Hitze denaturiert und die Einzelstränge voneinander getrennt werden. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 85°C im Heizblock denaturiert. Anschliessend ließ man die Röhrchen 2 Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubieren. Durch das im Hybridisierungsmix enthaltene Formamid entstehen während der Inkubationszeit kleine Lecks in der Zellmembran, durch welche die DNA im Zellkern von der Sonde erreicht werden kann, ohne dass die Integrität der Zelle zerstört wird.

Waschvorgang:

Nach der Inkubationszeit wurden alle Proben zunächst bei 2900 U/min und 16°C für 7 min. zentrifugiert. Danach wurde der Überstand bis auf ein kleines Restvolumen, das in allen Proben möglichst gleich sein sollte, abgesaugt.

Die Proben wurden nun zweimal mit je 1 ml der Waschlösung I gewaschen, im Anschluss einmal mit je 1 ml der Waschlösung II. Der letzte Zentrifugationsschritt sollte jetzt nur noch mit 1900 U/min bei 16°C für 7 min. erfolgen. Nach Absaugen des Überstandes auf ein kleines, aber möglichst gleiches Restvolumen wurden zuletzt jeder Probe 300µl des PI-Mix zugegeben und gut resuspendiert.

Erneut wurden die Proben für 2 Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Jetzt konnten die Proben vor Durchführung der FACS-Analyse bei +4°C für maximal 48 h gelagert werden.

FACS-Messung:

In der FACS-Analyse erfolgte zunächst eine Darstellung der Zellen nach Größe und DNA-Gehalt. Dazu wurden im Dot-oder Density plot die Größe (FSC, Forward scatter) auf der Abszisse gegen die Fluoreszenz des Propidiumiodid (PI-3) auf der Ordinate aufgetragen. Es ergeben sich im allgemeinen zwei Populationen: die Zellen der Interphase mit einfachem Chromosomensatz (2n) und die sich teilenden Zellen bzw. Zellcluster mit mindestens vierfachem Chromosomensatz (4n). Die letztere Population darf nicht für die Messung verwendet werden, da sie durch den doppelten Chromosomensatz falsch hohe Telomerfluoreszenzen wiedergeben würde.

Die 2n Population wurde deshalb durch Setzen eines Gates präselektiert. Für diese Population konnte nun die Intensität der Fluoreszenz für FITC, den Farbstoff, den die telomerbindende PNA-Sonde trägt, und deren Verteilung in einem Histogramm dargestellt werden. Hier zeigte sich ein Peak, der sich zusammensetzt aus der Fluoreszenz der gebundenen Sonde und der Autofluoreszenz. Durch die Messung der ohne PNA-Sonde hybridisierten Negativkontrolle ließ sich die Autofluoreszenz der Zellen ermitteln. Nach Anwendung der Statistikfunktion konnte durch Subtraktion der Autofluoreszenz von der Telomerfluoreszenz die Fluoreszenzintensität der markierten Telomere wiedergegeben werden.

Hierbei handelt es sich um einen fiktiven, dimensionslosen Wert, der keine Aussage über die Telomerlänge in Basenpaaren erlaubt.

Bestimmung der Telomerlänge:

Die Telomerlänge wird in dieser Arbeit in Telomere Fluorescence Units (TFU^{trf}) angegeben, einer Einheit, die aus Kalibrationsexperimenten mit den im Southern Blot ermittelten Telomere Restrictions Fragments (TRF) gewonnen wurde. [50] Die Fluoreszenzintensität (TFU) im Flow-FISH ist korreliert mit der Telomerlänge in TRF, wobei eine Intensität von 0 einer Telomerlänge von 3,78 kbp entspricht. Diese Differenz entspricht der Länge der sogenannten subtelomerischen Sequenzen, die, anders als in der Flow-FISH-Messung, im Southern Blot mitbestimmt werden. Es handelt sich um DNA-Abschnitte, die den Telomeren unmittelbar vorausgehen und ähnliche, TTAGGG-verwandte Sequenzen tragen. Deshalb wurde die Telomerlänge der Einheit TFU^{trf} definiert als die Summe der „reinen“ Telomerlänge, wie sie im Flow-FISH bestimmt wurde, und der subtelomerischen Sequenzen der Länge 3,78 kbp. 1 TFU^{trf} entspricht dabei 1 KB.

Um interexperimentelle Unterschiede zu minimieren, wurde bei jedem Experiment zusätzlich eine Kontrolle als Doppelansatz mitgeführt. Diese bestand aus PBLs einer Spenderin mit einer bekannten, mehrfach ermittelten Telomerlänge von 4,98 kb. Die mittlere Fluoreszenz dieser Kontrollen erlaubte die Ermittlung eines Korrekturfaktors, mit dem die Fluoreszenzen aller weiteren Proben angepasst werden konnte.

II.2.8. TRAP-Assay

Die Bestimmung der Telomerase-Aktivität erfolgte über den TRAP-Assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol) „Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA^{plus}“ der Firma Roche. Das Prinzip dieses Assays besteht in einer Kombination aus PCR und nachfolgendem ELISA. Zunächst werden durch Telomeraseaktivität neu entstandene Telomersequenzen in einem PCR-Schritt vervielfältigt, anschließend kann das PCR-Produkt in einem weiteren Schritt mittels ELISA quantifiziert werden.

Zur semiquantitativen Auswertung wird vom Hersteller eine Kontrolle in Form eines Telomerstücks bekannter Länge (*Control template*) mitgeführt, zu dem die Signalintensität der Probe in Relation gesetzt werden kann. Durch dieses Verfahren sind intraexperimentelle Aussagen gut möglich, Vergleiche zwischen verschiedenen Experimenten aufgrund der nur relativen Aussagen jedoch eingeschränkt. Zur besseren Quantifizierbarkeit der Telomeraseaktivität wurde daher zusätzlich bei jedem Versuch die Telomeraseaktivität einer immortalen Zelllinie (*Phoenix-Ampho-Cells*) bestimmt und die Telomeraseaktivität der Proben als prozentualer Anteil der Aktivität in Phoenix-Zellen ausgedrückt.

Material:

Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA^{plus} (Roche) :

Lysis reagent	Reaction mixture
Internal standard (216bp)	Control template (low)
Denaturation reagent	Nuclease free water
Hybridisation buffer T/IS	Washing buffer
Anti-DIG-HRP	TMB substrate solution
Stop reagent	Microtiter-plate, coated

a. Vorbereitung der Zellen zur Telomerasebestimmung

Für die Bestimmung der Telomeraseaktivität wurden die Zellen der Zellkultur entnommen, gewaschen und je nach Zellgröße, $2-4 \times 10^5$ Zellen in ein Eppendorf-Tube gegeben. Die Zellen wurden 2x mit kaltem PBS gewaschen und bei $+4^\circ\text{C}$ bei 5800 U/min für 10 min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vollständig abgenommen. Das trockenliegende Zellpellet konnte nun zügig bei -80°C schockgefroren werden.

Proteinbestimmung

Um die Telomeraseaktivitäten der Zellen vergleichbar zu machen, ist es wichtig, dass für jede Reaktion die gleiche Zellmenge bzw. die gleiche Menge an Protein eingesetzt wird. Deshalb erfolgt zunächst eine Lyse und anschließende Proteinbestimmung

Die Zellpellets aller Proben wurden auf Eis aufgetaut, mit je 150-200 μl „Lysis-Puffer“ aus dem Versuchskit resuspendiert und 30 min. auf Eis inkubiert. Durch diesen Schritt erfolgt die Lyse der Zell- und Kernmembranen, durch welche die Telomerase sowie die Kern- und Zytoplasmaproteine freigesetzt werden. Die Lysate wurden anschließend 20 min. bei $+4^\circ\text{C}$ mit 13000 U/min zentrifugiert. Im Anschluss wurden etwa 120-150 μl des oben im Tube befindlichen Proteinüberstands abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Röhrchen überführt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe der Bradford-Methode am Photometer. Zunächst wurde aus der Proteinlösung BSA Bio-Rad und der Verdünnungslösung Prot-Bio-Rad eine Verdünnungsreihe für die Standardkurve hergestellt. Anschließend wurden 10 μl jeder Probe zu 800 μl Farbstofflösung Bio-Rad in eine Küvette gegeben und photometrisch mit der Methode von Bradford mittels einer Eichgerade die Proteinkonzentration bestimmt. Jetzt konnte das einer Menge von 0,5 μg Protein entsprechende Volumen, wie in der nachfolgenden PCR-Reaktion benötigt, berechnet werden.

b. PCR

Prinzip:

Das PCR-Gemisch enthält, neben den für die Amplifikation nötigen Nukleotiden, zwei biotinmarkierte Primer, einer für die Addition telomerischer Sequenzen durch Telomerase, der andere für den anschließenden Amplifikationsvorgang, sowie ein DNA-Stück nicht-telomerischer Sequenz mit bekannter Länge (216bp) als Interner Standard.

Nach Zugabe dieses Reaktionsmixes kann Telomerase, sofern in der Probe enthalten, neue Telomersequenzen der Form TTAGGG an den entsprechenden Primer anfügen.

In der folgenden PCR-Reaktion werden diese neu entstandenen Sequenzen sowie die DNA-Sequenz des Internen Standards amplifiziert. Durch die „Konkurrenz“ der Telomersequenzen und des Internen Standards um die im Reaktionsgemisch vorhandenen Nukleotide kann später von der Relation der beiden unterschiedlichen PCR-Produkte auf die Stärke der ursprünglichen Telomeraseaktivität geschlossen werden. Weiterhin dient der Standard als Positivkontrolle zum Ausschluss falsch-negativer Proben, z.B. durch Taq-Polymerase-Inhibitoren.

Neben den Proben wurde in der PCR ein Control template, bestehen aus einer bekannten Anzahl aus 8 telomerischen Sequenzen, zur späteren relativen Quantifizierung mitgeführt. Außerdem wurde von jeder Probe ein RNase-behandelter Ansatz zur Bestimmung des Hintergrundsignals, und ein Reaktionsansatz Lysis-Puffer als Negativkontrolle, amplifiziert.

PCR: Durchführung

Zunächst wurden zur Herstellung der Negativkontrolle je 5µl der Probe zu je 10 µl RNase pipettiert und 30 min. bei 37°C inkubiert. Pro PCR-Reaktion wurden 25 µl Reaktionsgemisch und 5 µl Interner Standard als sog. „Master Mix“ zusammengegeben, gut resuspendiert und 30 µl in jedes PCR-Tube vorgelegt. Nun wurde Proteinüberstand der Proben, entsprechend der Menge von 0,5µg, in die Tubes pipettiert. Von den RNase-behandelten Proben wurden je 2µl, von Lysis-Puffer und Control-Template je 1µl zum Master-Mix gegeben. Anschließend wurde das Volumen jedes Tubes mit Nukleasefreiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt.

Die PCR lief nach folgendem Schema:

Dauer:	Temp:	Arbeitsschritt:
10-30 min	25° C	Telomerasereaktion (Primerverlängerung)
5 min	94°C	Telomeraseinaktivierung

30 Zyklen Amplifikation:

30 s	94°C	Denaturierung	
30 s	50°C	Annealing	
90 s	72°C	Polymerisation	
10 min	72°C	Extension step	=> 4°C Stop; Lagerung

c. ELISAPrinzip:

Im nun folgenden ELISA-Schritt wurden die PCR-Produkte der Proben sowie des Control templates mit zwei unterschiedlichen Digoxigenin-(DIG)-markierten Hybridisierungs-Puffern inkubiert. Diese binden spezifisch an die telomerische Sequenz bzw. an die Sequenz des internen Standards. Durch sandwichartige weiteren Kopplung eines mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörpers gegen Digoxigenin kann letztendlich eine am ELISA-Reader messbare Farbreaktion stattfinden.

ELISA: Durchführung:

Pro PCR-Produkt wurden zwei Eppendorf-Tubes mit je 10 µl Denaturierungsreagenz vorbereitet und nach Zugabe von jeweils 2,5 µl des PCR-Produkts für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zum einen Aliquot 100 µl des telomerspezifischen Sondenpuffers, zum anderen 100 µl des Sondenpuffers für den internen Standard zugegeben. Für die Negativkontrollen wurde nur ein Ansatz benötigt, dieser wurde mit Telomerpuffer hybridisiert.

100µl jedes Röhrchens wurden im Anschluss in eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Mit seiner Biotin-markierten Seite kann der Primer nun an der Platte haften und so die PCR-Produkte für die weiteren Schritte dort fixieren. Zur Hybridisierung der einzelsträngigen PCR-Produkte mit den entsprechenden Sonden wurde die Platte zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Flüssigkeit entfernt und jede Vertiefung 3x mit Waschpuffer gewaschen.

Für die Farbreaktion erfolgt eine Bindung des an der Sonde haftenden DIG mit einem an Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper. Dazu wurden in jede Vertiefung 100 µl (=2 U) der mit Verdünnungspuffer angesetzten Anti-DIG-HRP-Antikörperlösung gegeben und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Antikörperlösung und erneutem Waschen wurden zu jedem Ansatz 100 µl TBM-Substrat-Lösung gegeben. Das in der Lösung

enthaltene 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat der Peroxidase (HRP) wird so unter Farbentwicklung umgesetzt. Dazu wurde die Mikrotiterplatte 10-20 min bei 300 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µl Stop-Lösung. Durch sie erfolgt ein Farbumschlag nach gelb.

Die einzelnen Absorbtionen konnten nun am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm bestimmt werden.

d. Auswertung:

Zunächst wurden die Absorptionswerte der RNase behandelten Negativkontrollen von denen der Proben abgezogen. Um eine Probe als Telomerase-positiv einzustufen, sollte dieser Wert höher als die doppelte Hintergrund-Absorption sein.

Anschließend wurde der Wert der Probe in Relation gesetzt zum Absorptionswert des entsprechenden Internen Standards. Als Bezugswert wurde dieselbe Relation für das Control template, hier mit Lysis-Puffer als Hintergrundabsorption, berechnet.

Die Relative Telomerase Aktivität ergab sich schließlich aus dem Quotient der beiden Relationen x 100 nach der Formel

$$RTA = \frac{(A_{\text{Probe}} - A_{\text{RNase}}) / A_{\text{IntSt Probe}}}{(A_{\text{CT}} - A_{\text{LysisPuffer}}) / A_{\text{IntSt CT}}} \times 100$$

Um von dem relativen Wert der RTA zu vergleichbareren Werten zu gelangen, wurde in dieser Arbeit die Relative Telomeraseaktivität der Proben als prozentualer Anteil der RTA der Phoenix-Zelllinie angegeben.

II.2.9. Proliferations-Assay

Material:

WST-1 cell proliferation reagent

96-well Mikrotiterplatte

ELISA-Lesegerät

In viablen Zellen findet sich ein Enzymsystem mitochondrialer Dehydrogenasen, das „mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system“, das Tetrazoliumsalze spalten kann zu Formazan. Das in der Reaktionslösung enthaltenen WST-1 ist ein stabiles, wasserlösliches

Tetrazoliumsalz, das im Kulturmedium umgesetzt wird und dabei einen Farbumschlag von hell- zu dunkelrot vollzieht. Mit Zunahme der Zellzahl nimmt die Aktivität der spaltenden Enzyme im Kulturmedium zu. Damit steigt auch der Grad der Farbreaktion. Im ELISA-Reader kann die Absorptionsänderung bestimmt und so das Wachstum unterschiedlicher Proben verglichen werden.

Der Vorteil von WST-1 gegenüber anderen Tetrazoliumsalzen liegt in einer schnelleren Farbentwicklung und insbesondere einem breiteren linearen Absorptionsbereich, wodurch der Messbereich deutlich vergrößert ist.

Durchführung:

Die Messung erfolgte für jede Kultur als Drei-, besser Vierfach-Ansatz. Dazu wurden in 3-4 Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte je 4×10^4 Zellen in 100 μ l Medium mit entsprechenden Zusätzen eingesetzt. Für den Leerwert wurden 3-4 Ansätze mit je 100 μ l reinem Medium+IL-2 in die gleiche Platte pipettiert. Bei 37°C und 5% CO₂ ließ man die Zellen 48-96 Stunden proliferieren. Anschließend wurden zu jedem 100 μ l-Ansatz 10 μ l des WST-1-Proliferations-Reagenz gegeben. Die so behandelten Platten wurden für 4h zur Farbentwicklung erneut im Brutschrank inkubiert.

Anschließend konnten am ELISA-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm die Absorption der einzelnen Ansätze bestimmt werden.

Auswertung:

Die Absorption des reinen Kulturmediums gibt die Hintergrundabsorption wieder. Es wurde der Mittelwert der drei- oder Vierfachansätze der Proben sowie des Leerwertes errechnet und anschließend die Hintergrundabsorption von den Absorptionswerten der Proben subtrahiert. Die Stärke der Absorption bei 450 nm gibt die Proliferationsaktivität der Probe in den letzten 48-96 h wieder. Dabei handelt es sich um einen fiktiven, dimensionslosen Wert, der eine relative Beurteilung und Vergleichbarkeit der Ansätze untereinander zulässt.

Voraussetzung hierbei sind vergleichbare Kulturbedingungen, der Einsatz der gleichen Zellzahl und identische Inkubationszeiten.

II.2.10. Apoptose-Assay

Im Rahmen der Apoptose kommt es zu einer Reihe von Veränderungen der Zelloberfläche. Eine davon ist die Translokation des normalerweise an der Membraninnenseite lokalisierten Phosphatidylserins (PS) an die Zelloberfläche. Das phospholipidbindende Protein Annexin-V zeigt eine hohe Affinität zu PS und kann daher zur spezifischen Bindung des Membranproteins, und damit zur Detektion apoptotischer Zellen verwendet werden.

Hier wird Fluorescein-markiertes Annexin-V zur Darstellung gebundener Zellen in der Durchflusszytometrie verwendet. Da PS neben den apoptotischen Zellen auch von nekrotischen Zellen an der Membranoberfläche exprimiert wird, müssen diese beiden Populationen durch Gegenfärbung mit Propidiumiodid (PI) unterschieden werden. In Zellen mit zerstörter Membranintegrität, wie sie bei nekrotischen Zellen vorkommt, wird durch PI die DNA angefärbt, nicht hingegen in früh apoptotischen Zellen mit noch intakter Membran.

Material:

Annexin-V-Fluos labeling solution

Incubation Puffer

PBS

Durchführung:

1×10^6 Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 100 μ l der „labeling solution“ gut resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurden 0,5 ml des Inkubations-Puffers hinzugegeben. Nach erneutem Resuspendieren konnte nun die FACS-Analyse erfolgen.

FACS-Analyse:

In einem ersten Fenster wurden die Zellen nach Größe (FSC) auf der Abszisse versus Granularität (SSC) auf der Ordinate aufgetragen und die homogene Population der Lymphozyten durch Setzen eines Gates präselektiert. (siehe Teil III, Abb. 8a)

In einem weiteren Fenster wurde die Fluorescein-Intensität (Fl-1) als Ausdruck der AnnexinV-Beladung auf der Abszisse gegen den PI-Gehalt als Marker der nekrotischen Zellen aufgetragen und die Lymphozytenpopulation darin dargestellt.

Hier zeigten sich im allgemeinen drei Populationen:

- 1) die PI-positiven und AV-positiven Zellen: späte apoptotische bzw. nekrotische Zellen
- 2) die PI-negativen, aber AV-positiven Zellen: frühe apoptotische Zellen
- 3) die PI- und AV-negativen Zellen: vitale Zellen

Die beiden Populationen der viablen und früh-apoptotischen Zellen sind oft im Dot plot nicht eindeutig voneinander abgrenzbar. Durch Setzen eines Gates um beide Populationen, und anschließende Darstellung der Fluoreszenz F1-1 in einem Histogramm ließen sich jedoch zwei Zellpopulationen unterschiedlicher Annexin-V-Beladung darstellen. Durch Anwendung der Statistikfunktion konnte nun die prozentuale Verteilung apoptotischer und viabler Zellen an der Gesamtpopulation abgeschätzt werden.

II.2.11. Seneszenz- Assay

Senescente Zellen unterscheiden sich biochemisch von viablen Zellen durch erhöhte Werte bestimmter Marker wie Fibronectin, Collagenase I oder β -Galactosidase. [17] Der in dieser Arbeit verwendete Assay beruht auf dem histochemischen Nachweis der seneszenz-assoziierten β -Galactosidase (SA- β -Gal). Dieser Biomarker lässt sich spezifisch im Cytosol seneszenter, nicht aber viabler, präseneszenter Zellen nachweisen. [17]

Die auf Seneszenz zu untersuchenden Zellen wurden mit X-Gal inkubiert, das ein chromogenes Substrat der β -Galactosidase darstellt. Bei Vorhandensein des freien Enzyms bilden sich blaue Präzipitate im Cytosol der Zelle. Für die Positivkontrolle wurde ein Aliquot der Zellen mit einer sauren Lösung (Positive Control Solution) versetzt. Dadurch wird lysosomale β -Gal ins Cytosol freigesetzt und durch X-Gal angefärbt.

Material:

3% Formaldehydlösung

Senescence Detection Solution:	pro Probe:	5 μ l X-Gal
		100 μ l SDS

Positive Control Solution:	pro Probe:	5 μ l X-Gal
		100 μ l Positive Control Reagent

Nuclear Fast Red (NFR)

Durchführung:

1-2 x 10⁵ Zellen wurden in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben und 1x mit PBS gewaschen. Nach Zentrifugation mit 4900 rpm für 2 min. wurde der Überstand abgenommen und die Zellen 5 min bei Raumtemperatur mit 500 µl Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, mit 100 µl frisch angesetzte Senescence Detection Solution resuspendiert und 12-15h bei 37°C inkubiert. Für die Positivkontrolle wurde stattdessen 100 µl Positiv Control Solution zugegeben. Während der Inkubationszeit findet die Reaktion des X-Gal mit der β -Galactosidase und damit die Farbentwicklung statt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen 2x in PBS gewaschen. Das Pellet wurde mit wenig PBS resuspendiert und ein Tropfen von 10µl auf einen Objektträger aufgebracht. Nach dem Trocknen konnte das Cytosol der Zellen mit „Nuclear Fast Red“ gegengefärbt werden, um auch die nicht seneszenten ungefärbten Zellen sichtbar zu machen. Dazu wurde der Objektträger mit NFR bedeckt und dieses für 2 min. zur Färbung belassen. Anschließend wurde der Objektträger mit deionisiertem Wasser gespült.

Jetzt konnten die Zellen unter dem Dunkelmikroskop betrachtet und der Anteil seneszenten Zellen ausgezählt werden.

II.2.12. Statistische Testverfahren

Zur Bestimmung möglicher Unterschiede der Telomerlängendynamik zwischen den drei Behandlungen wurde ein *mixed effect model* angewendet. Hier erfolgte eine Mittelwertbildung aus den Telomerlängenrohwerten aller Kulturen eines Messzeitpunkts und einer Behandlung. Der statistische Vergleich bezieht sich auf Unterschiede der Steigungen dieser aus den Mittelwerten gewonnenen Telomerlängenverläufe und erlaubt so Aussagen über Unterschiede des Telomerverlusts zwischen den drei Behandlungen.

III: ERGEBNISSE

III.1. Wachstum, Telomerdynamik und Telomeraseaktivität in CD8⁺ T-Lymphozyten

Ziel der Versuche des ersten Teils war es, das Proliferationsverhalten von T-Lymphozyten nach Wachstumsstimulation im Zusammenhang mit der Dynamik der Telomeraseaktivität und Telomerlängenveränderungen zu untersuchen.

III.1.1. Proliferation CD8-positiver T-Lymphozyten in vitro

Zur Expansion wurden periphere CD8⁺ T-Lymphozyten über eine Säulenseparation, wie im Methodenteil beschrieben, angereichert. CD8⁺T-Zell-Kulturen aus Buffy coat (n=2) wurden mit OKT-3, einem Antikörper, der sich gegen den spezifischen T-Zell-Rezeptor richtet, und IL-2 in einer Konzentration von 100 IU/ml Medium stimuliert. Die Restimulation fand hierbei in 14-tägigen Abständen statt.

Zusätzlich wurden CD8⁺-T-Lymphozyten aus peripherem Blut mittels bestrahlter T2-Feeder-Zellen und 100 IU/ml IL-2 in vitro expandiert.

In Vorversuchen wurden zusätzlich nach ihrer CD3⁺-Eigenschaft selektierte T-Lymphozyten, d.h. Mischkulturen aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, expandiert.

Zur Ermittlung der maximalen Zahl möglicher Zellteilungen wurden die T-Zellen bei jedem Passagieren gezählt. Dadurch konnte die mittlere Zahl der Zellteilungen errechnet werden. Der *Cumulative Population Doubling Level* (CPDL) gibt die Summe aller bereits durchlaufenen Zellteilungen an.

Nach primärer Stimulation erkennt man in allen Kulturen zunächst eine relativ geradlinig ansteigende Wachstumskurve. Infolge der Restimulationen an Tag 14, 21, etc. ist zeitweise ein erneuter Proliferationsschub zu erkennen.

Nach einer Anzahl zwischen 10,6 bis 18,3 Zellteilungen in den unterschiedlich stimulierten Kulturen kam es zu einem Sistieren des Wachstums. Auch nach erneuter Stimulation mit OKT-3 bzw. T2-Feeder-Zellen war keine weitere Zellexpansion zu beobachten, was als Plateau in der Wachstumskurve zum Ausdruck kommt. Die maximale Kulturdauer bis zu diesem Zeitpunkt lag zwischen 43 und 65 Tagen. (Tab.1)

	Kulturdauer (Tage)	Kumulative Zellteilungen (CPDL)
BC 4 CD8	65	10,6
BC 5 CD8	61	11,8
E I	49	18,3
E II	64	15,1
E III	43	11,0

Tab.1: Kulturzeit und Anzahl der kumulativen Zellteilungen

Abb.1 zeigt die Wachstumskurven der OKT-3-stimulierten (BC4CD8⁺; BC5CD8⁺), sowie der T2-stimulierten (E I-III) Expansionskulturen.

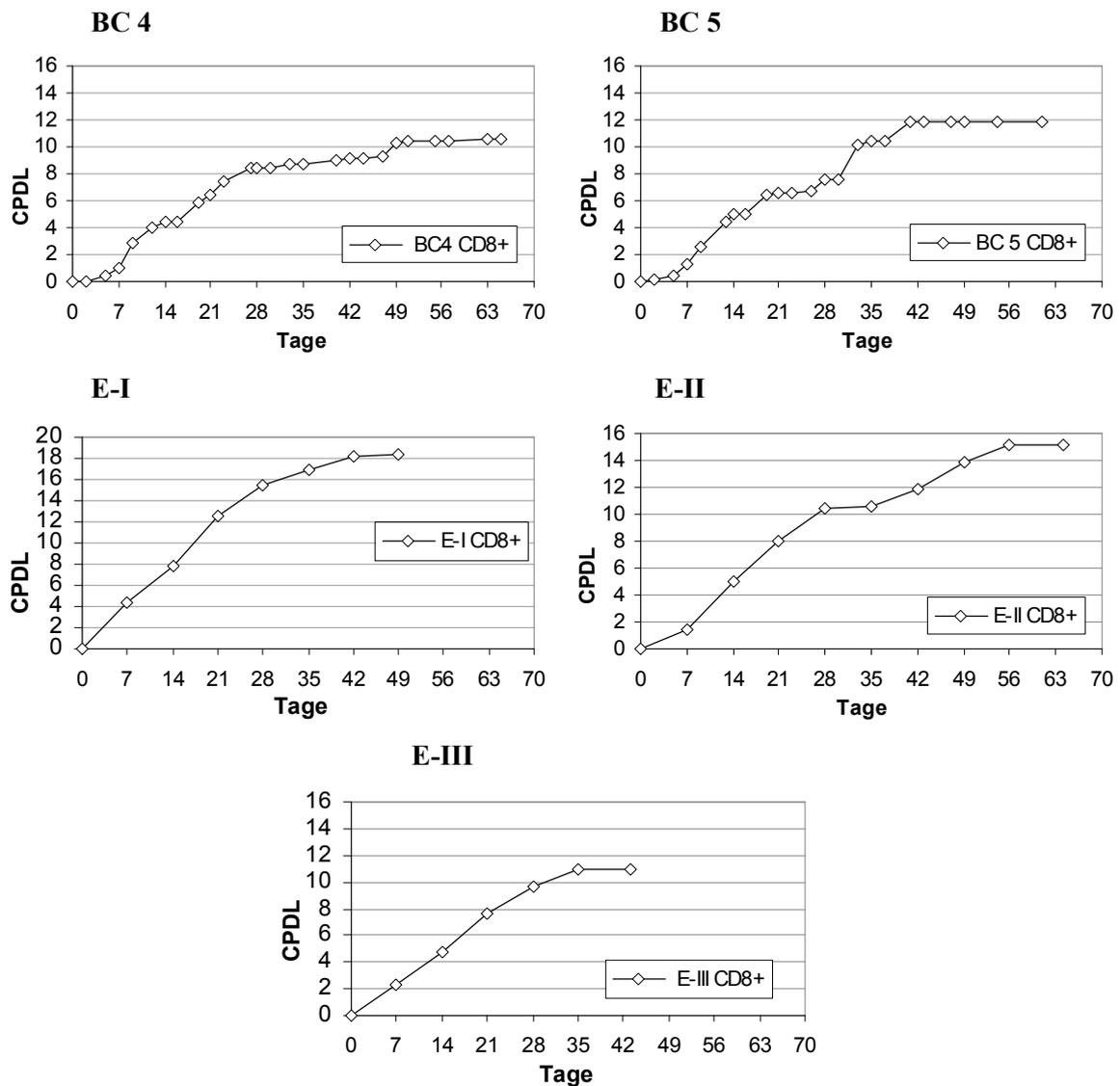


Abb. 1: Wachstumskurven der fünf CD8⁺ T-Zell-Expansionskulturen

Die Methode der Stimulation hatte keinen wesentlichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der T-Zellen. Die T2-stimulierten T-Zellen (Kulturen EI-III) wurden in größeren Abständen, zumeist 7-tägig, gezählt.

III.1.2. Telomeraseaktivität in T-Lymphozyten

T-Lymphozyten werden nach Stimulation durch ein Antigen oder durch Besetzung des T-Zell-Rezeptors zum Wachstum und zur Expression von Telomerase angeregt. Um den Verlauf der Telomeraseaktivität in den expandierten T-Zellen zu verfolgen, wurde das Enzym in wöchentlichen Abständen, beginnend mit dem Tag der Isolation, und zusätzlich engmaschiger 3-4 Tage nach der ersten Stimulation bestimmt.

Die untersuchten CD8⁺ T-Zellen zeigten als naive T-Lymphozyten, wie sie aus dem Blut gesunder Spender isoliert wurden, keine oder nur sehr geringe Telomeraseaktivität. Nach der Stimulation mit OKT-3 bzw. T2-Feeder-Zellen kam es zu einem deutlichen Anstieg der Telomeraseaktivität. Die Maximalwerte wurden dabei 3 bis 4 Tage nach initialer Stimulation erreicht und lagen zwischen 21 % (BC4) und 65 % (E-I) der Aktivität von Phoenix-Zellen. Dieser Wert muss als relative Aktivität, bezogen auf die Telomeraseaktivität einer immortalen Zelllinie, gesehen werden.

Die maximale Telomeraseinduktion scheint durch Stimulation mit T2-Feeder-Zellen geringfügig höhere Werte zu zeigen (65% und 37 %) als durch Stimulation mit OKT-3 (28 und 21 %).

Nach initialem Aktivitätsmaximum sank die Enzymaktivität in allen Kulturen rasch ab, erreichte jedoch nach erneuter Stimulation der T-Zellen einen weiteren, zumeist geringer ausgeprägten Anstieg. In nur einer der insgesamt vier betrachteten Profile (E-I) ließ sich nach Kulturtag 28 noch Telomeraseaktivität nachweisen. Die maximale Telomerase-Aktivität wurde in drei der vier gezeigten CD8⁺-Telomerase-Profilen, sowie in den zwei CD3-Mischkulturen (nicht gezeigt), nach der ersten Stimulation erreicht. In nur einer Kultur (BC4CD8⁺) war die Telomerase nach der 2. Stimulation an Tag 14 auf dem Maximalwert.

(Abb. siehe III.1.3., Abb.2)

III.1.3. Telomerlängendynamik in T-Zell-Expansionskulturen

Um das mögliche Ausmaß der Telomerlängenveränderungen nach Telomeraseinduktion zu studieren, wurde im Folgenden die Dynamik des Telomerlängenverlaufs untersucht.

Mit der Flow-FISH-Technik wurden die Telomerlängen im wöchentlichen Abstand bestimmt. Die erste Messung fand dabei am Tag der Zellisolierung vor der ersten Stimulation (= Tag 0) statt. Der hier wiedergegebene TFU^{trf} -Wert ist jeweils der Mittelwert einer Dreifachbestimmung. Die Messungen wurden durchgeführt, bis die Zellkultur keine weitere Proliferation zeigte, d.h. das Stadium der Seneszenz erreicht hatte.

a) Gesamtprofil des Telomerlängenverlaufs

Tabelle 2 gibt die Bilanz der Telomerlänge in den $CD4^+/CD8^+$ -Mischkulturen sowie den 5 reinen $CD8^+$ -Expansionskulturen wieder.

Abb.2 zeigt den Telomerlängenverlauf der fünf $CD8^+$ T-Zell-Kulturen in Gegenüberstellung mit der entsprechenden Telomeraseaktivität.

<u>Kultur</u>	TFU^{trf} Tag 0	TFU^{trf} Zellzyklusarrest	ΔTFU^{trf}	Kulturdauer (Tage)	CPDL
$CD4^+/CD8^+$:					
BC 4	8,5	8,9	+ 0,4	35	10,8
BC 5	7,6	5,7	- 1,9	54	12,7
BC 6	7,9	7,6	- 0,3	57	11,1
$CD8^+$:					
CD8+ BC4	9,2	6,4	- 2,6	65	10,6
CD8+ BC5	7,8	6,4	- 1,4	61	11,8
EBV I	7,2	7,2	-0,0	49	18,3
EBV II	9,3	5,3	- 4,0	64	15,1
EBV III	7,0	7,7	+ 0,7	43	11

Tab.2

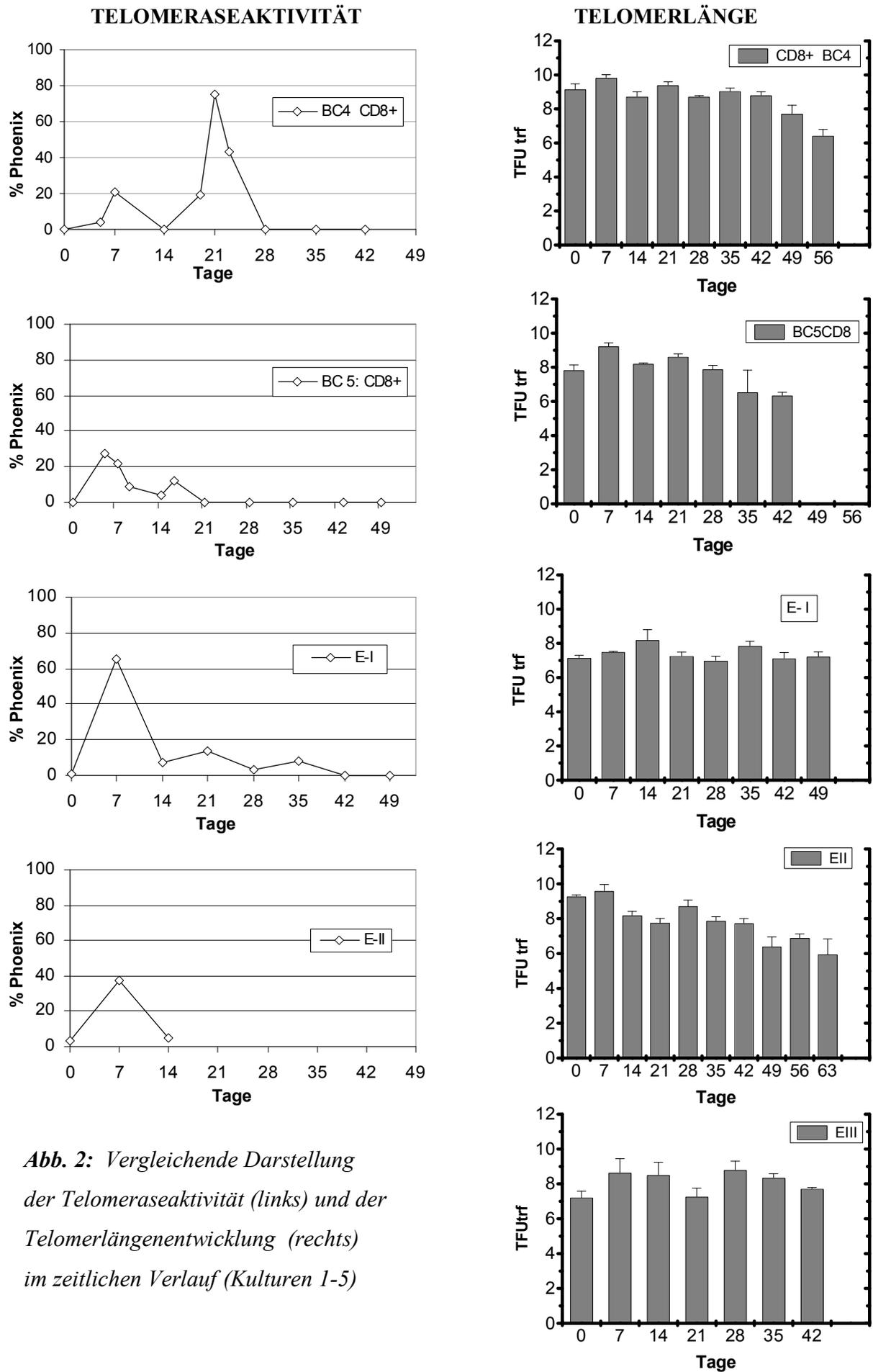


Abb. 2: Vergleichende Darstellung der Telomeraseaktivität (links) und der Telomerlängenentwicklung (rechts) im zeitlichen Verlauf (Kulturen 1-5)

Im Verlauf der Expansion war in 5 der 8 untersuchten Kulturen eine Abnahme der Telomerlänge in den T-Zellen zu erkennen. Der mittlere Telomerlängenrückgang zwischen dem Tag der Isolation und dem Eintritt in die Seneszenz, definiert durch die horizontale Phase der Wachstumskurve, betrug $-1,2 \pm 1,7$ kb (n=8).

Die Telomerlänge stellt sich hier als dynamisches System ohne strenge, kontinuierliche Telomerabnahme dar. Trotz fortschreitendem Wachstum ließ sich zeitweise ein Telomererhalt oder sogar geringfügige Verlängerung der Telomere erkennen. Mögliche Ursachen hierfür werden im vierten Teil der Arbeit diskutiert. Die Gesamtbilanz der Telomerlänge zwischen Kulturbeginn und Proliferationsende zeigte in den meisten Kulturen eine expansionsbedingte Telomerverkürzung.

b) Telomerverlängerung nach initialer Stimulation

Zu Beginn der Expansionskultur zeigte sich eine eindeutige Telomerverlängerung. Nach der ersten Stimulation fiel eine Zunahme der Telomerlänge zwischen Tag 0 (dem Tag der Isolation) und Tag 7 auf. Diese Telomerverlängerung ließ sich in sämtlichen weiteren Ansätzen verifizieren. Sie erreichte Werte von +0,3 kb (E-II) bis maximal +1,4 kb (E-III) in allen untersuchten Kulturen. Die größte Telomerlängenzunahme wurde in E-III bei einer mittleren Telomerlänge von $7,2 \pm 0,38$ kb an Tag 0 und einem Anstieg auf $8,6 \pm 0,81$ kb an Tag 7 erreicht. Abb. 3 zeigt den Telomerlängenanstieg in diesem Zeitraum für die sechs untersuchten Kulturen.

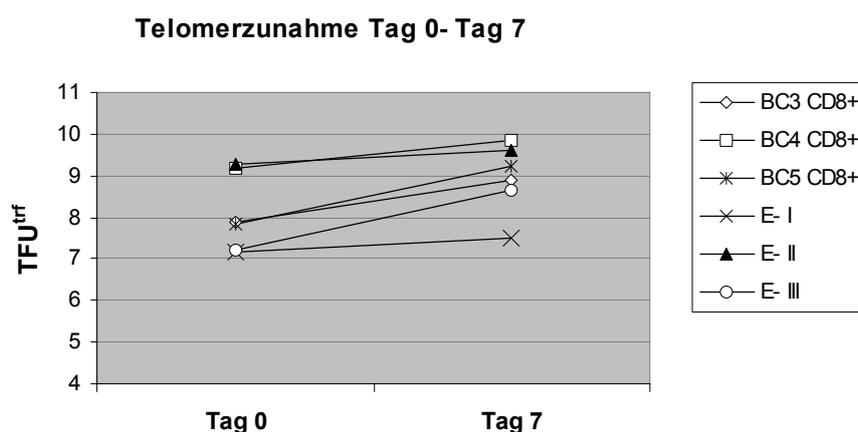


Abb.3: Initiale Zunahme der Telomerlänge aller CD8⁺T-Zell-Kulturen

III.2. Kultivierung von T-Lymphozyten mit einem neuartigen Telomeraseinhibitor

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Wachstum und die Telomerlängenentwicklung in CD8⁺ T-Lymphozyten während der Exposition mit einem spezifischen Telomerase-Inhibitor untersucht. Für die pharmakologisch wirksame Substanz BIBR 1532 wurden Effekte der Telomeraseinhibition in immortalen Zelllinien bereits nachgewiesen. Über eventuelle Auswirkungen auf temporär telomeraseaktivierende Zellen wie T-Lymphozyten ist bisher jedoch nichts bekannt.

Der Versuchsaufbau bestand aus einem Dreifachansatz der CD8⁺-Lymphozyten eines Spender, wie im Methodenteil beschrieben. CD8-positive T-Lymphozyten des ersten Ansatzes wurden nur mit Feeder-Zellen und IL-2, die des zweiten zusätzlich mit 10µM DMSO und die Zellen der dritten Behandlung mit BIBR 1532 in einer Konzentration von 10µM kultiviert, die weit über der beschriebenen IC₅₀ liegen. Insgesamt wurden 5 T-Zell-Kulturen unterschiedlicher gesunder Spender auf diese Weise expandiert.

III.2.1. Telomeraseprofil

Für BIBR 1532 konnte in Experimenten von Damm et al. eine hohe Reversibilität der Telomeraseinhibition nach Entfernung des Inhibitors gezeigt werden. Durch den Versuchsablauf des TRAP-Assays mit zahlreichen Waschschritten und Inkubationsperioden ohne BIBR 1532-Exposition kann ein direkt inhibitorischer Effekt auf Telomerase durch diesen Ansatz nicht nachgewiesen werden (*Persönliche Mitteilung K. Damm, Entwickler der Substanz*).

Für die Kultur IK 1 wurde die Telomeraseaktivität der Tage 1-14 in allen drei Ansätze bestimmt, hier zeigte sich keine signifikante Reduktion der Telomeraseaktivität unter Behandlung mit BIBR 1532 (Abb. 4a, n=1).

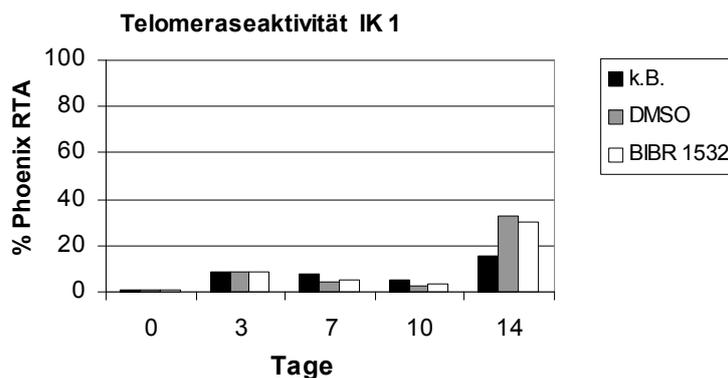


Abb. 4a

Im folgenden wurde auf die separate Bestimmung der Enzymaktivität in den verschiedenen behandelten Ansätzen verzichtet, da der TRAP-Assay, wie oben erläutert, nicht die geeignete Methode zur Detektion der Telomeraseinhibition durch BIBR 1532 darstellt. Von den Kulturen IK 2-4 wurde die Telomeraseaktivität des unbehandelten Ansatzes analog zu den Vorversuchen an den Tagen 0,3,7,10,14 und anschließend in mindestens 7tägigem Abstand als Kontrolle bestimmt. Die Telomerasewerte sind in Abb. 4b dargestellt.

Potentielle Effekte der Telomeraseinhibition auf T-Zellen sollten aufgrund der Unsicherheit der direkten Telomerasemessung in dieser Arbeit durch die möglichen Auswirkungen auf die Proliferation und das Telomerlängenverhalten detektiert werden.

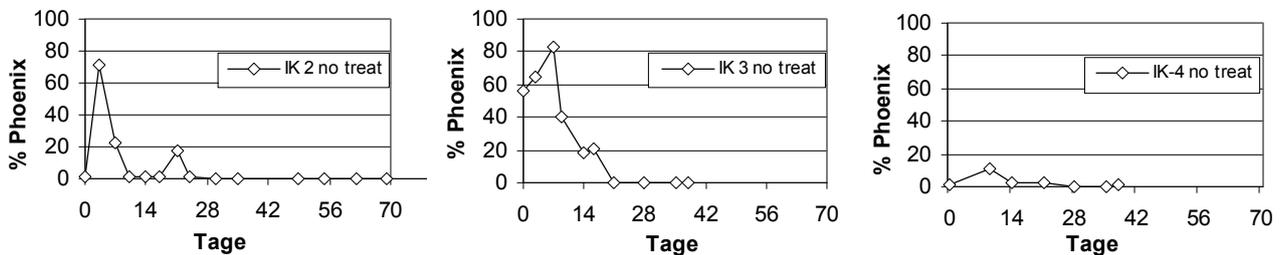


Abb. 4b : Telomeraseaktivität der unbehandelten Ansätze (IK 2-4)

III.2.2. Proliferationsverhalten unter Telomeraseinhibition

Zunächst wurde untersucht, ob durch die Behandlung mit dem Telomeraseinhibitor ein verändertes Proliferationsverhalten von expandierten T-Lymphozyten, beispielsweise verzögertes Wachstum oder beschleunigter Eintritt von Seneszenz, zu beobachten ist. Das Wachstumsverhalten wurde auf zwei Arten bestimmt:

1. durch die Darstellung der Wachstumskurven mit der maximalen Teilungsrate (CPDL), wie bereits in den Vorversuchen durchgeführt.
2. durch Bestimmung der Zellteilungsaktivität auf enzymatischer Basis mittels des WST-1 Proliferations-Assays.

III.2.2.1. Wachstumskurven und maximaler CPDL

Zur Detektion eventueller Unterschiede im Proliferationsverhalten der drei verschiedenartig behandelten Zellen eines Spenders erfolgte zunächst ein Vergleich der Wachstumskurven. Die mittlere Zahl der Kulturverdopplungen, ausgedrückt als CPDL, bevor Wachstumsstop eintrat, erreichte $12,6 \pm 6,8$ (n=5) in unbehandelten, $12,6 \pm 7,0$ (n=5) in mit DMSO kultivierten und $12,8 \pm 4,6$ (n=5) in BIBR 1532-behandelten Zellen. Der Wachstumsstop wurde definiert als fehlendes Auftreten weiterer PDs in mindestens drei aufeinanderfolgenden Zellzählungen.

Die maximale Kulturdauer lag zwischen 64 und 111 Tagen. Hier zeigten sich größere Unterschiede zwischen den Spendern als zwischen den drei Ansätzen einer Kultur. Die Kulturdauer der drei verschieden behandelten Zellen desselben Spenders war, wie Tabelle 3 zeigt, weitgehend identisch. In Abb. 5 sind vergleichend die Wachstumskurven der drei Behandlungen aller fünf Spender dargestellt.

		Kulturdauer (Tage)	Kumulierte Zellteilungen (CPDL)
IK 1	k.B.	71	23,1
	DMSO	71	22,3
	BIBR 1532	71	20,0
IK 2	k.B.	111	11,1
	DMSO	111	7,1
	BIBR 1532	111	9,7
IK 3	k.B.	106	10,4
	DMSO	106	16,6
	BIBR 1532	106	13,9
IK 4	k.B.	81	13,6
	DMSO	81	12,0
	BIBR 1532	81	12,7
IK 5	k.B.	64	4,2
	DMSO	64	4,6
	BIBR 1532	85	6,9

Tab. 3 : Kulturzeit und Zahl der Kulturverdopplungen von T-Zellen unter den drei verschiedenen Behandlungen (IK 1-5)

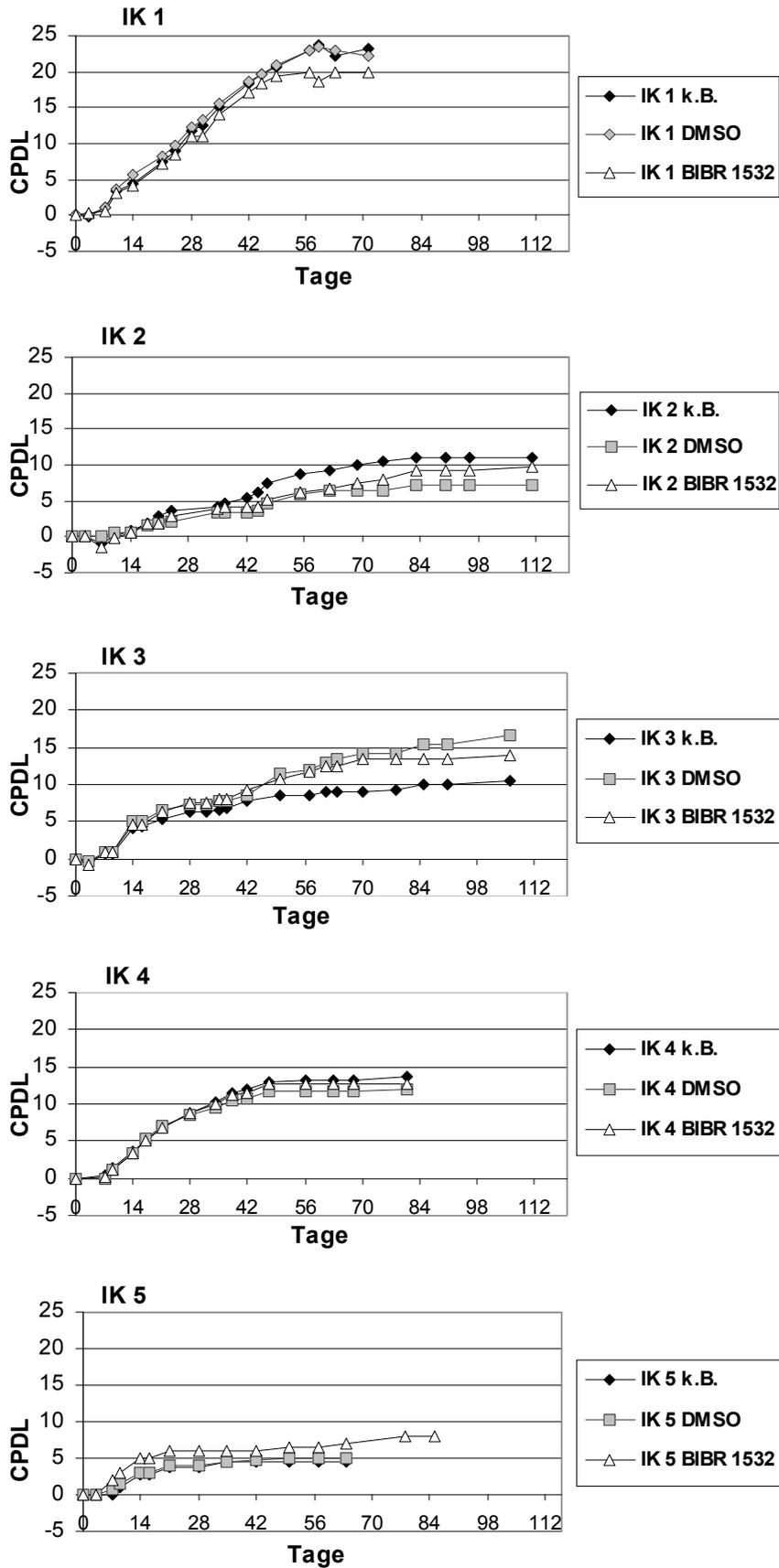


Abb. 5: Wachstumskurven der drei Ansätze von Kultur IK 1-IK 5

Bei Betrachtung der Wachstumskurven fällt auf, dass sich zwar geringe Abweichungen in den drei Ansätzen innerhalb eines Spenders zeigen. Eine eindeutige Wachstumsverzögerung durch eine bestimmte Behandlung kann jedoch nicht festgestellt werden. Lediglich in einer Kultur (IK 1) war unter der Behandlung mit BIBR 1532 ein verzögertes Wachstum mit einer geringeren Rate der CPDL zu beobachten (unbehandelt: 20 pd gegenüber DMSO: 22,3 bzw. BIBR 1532: 23,1 pd).

III.2.2.2. Proliferationskinetik im WST-1-Assay

Das Wachstumsverhalten wurde in den Kulturen IK 2 - IK 4 zusätzlich durch den WST-1-Proliferationsassay analysiert. Wie im Methodenteil beschrieben, gibt der Test das Proliferationsverhalten der zurückliegenden 48 h wieder. Die am ELISA-Reader bestimmte Absorptionsänderung des mit WST-1 versetzten Kulturmediums ist hier proportional zum Zellwachstum. Stärkere Proliferation wird durch höhere Absorptionswerte angezeigt.

Der WST-1-Assay wurde für die Kulturen IK 2 bis IK 4 ab dem Kulturtag 0 in 7- bis 14-tägigen Abständen durchgeführt. Für die Kulturen IK 1 und IK5 liegen aus technischen Gründen keine Messungen vor.

In Abb.6 sind die Absorptionswerte des WST-1-Assays für die untersuchten Spender dargestellt. Wie daraus ersichtlich, zeigen die Absorptionswerte keine auffälligen Abweichungen zwischen den drei unterschiedlichen Behandlungen, und damit kein unterschiedliches Wachstumsverhalten, über den Verlauf der Kulturzeit.

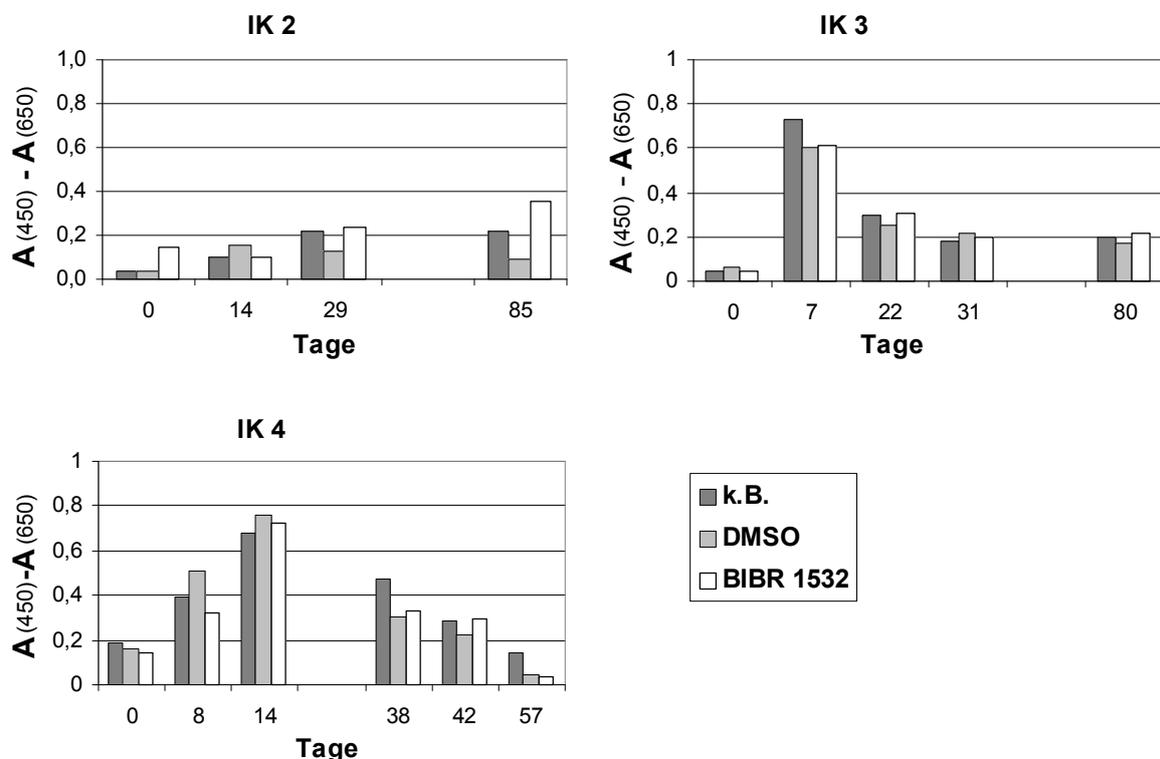


Abb.6: Proliferationskinetik der drei Behandlungen im WST-1-Assay (Kulturen IK2-IK4)

III.2.3. Telomerlängenverlauf

Da unter Telomeraseinduktion zu Beginn der Zellkultur eine geringe Telomerverlängerung beobachtet wurde, wäre ein Einfluss der Telomeraseinduktion auf die Telomerlängenkinetik in T-Lymphozyten denkbar. Um dieses zu überprüfen, wurde die Telomerlänge aller drei Ansätze, wie in den vorausgegangenen Kulturen, in regelmäßigen Abständen bestimmt. Nach der ersten Messung am Tag der Zellisolation erfolgte die Bestimmung in jedem Ansatz in 7-tägigem Abstand. Bei ausreichender Zellzahl (IK3) wurde die Telomerlänge auch drei Tage nach der ersten Stimulation gemessen. Um interexperimentelle Unterschiede auszuschließen, wurden die Messungen der drei Behandlungsreihen eines Tages im gleichen Hybridisierungsexperiment durchgeführt.

III.2.3.1. Telomerverlustraten

Insgesamt kam es unter jeder der drei Behandlungen durch die Expansion zu einem Telomerverlust der T-Zellen. Die mittlere Verkürzung lag bei **-1,18** \pm 1,0 kb (n=5) in unbehandelten, **-0,93** \pm 1,2 kb (n=5) in den DMSO-behandelten und **-1,26** \pm 0,6 (n=5) in BIBR 1532-exponierten T-Zellen. Bei Kulturrende betrug die mittlere Telomerlänge noch 7,1 kb in unbehandelten, 7,3 kb in DMSO- und 7,0 kb in BIBR 1532-behandelten Zellen. (n=5). Die Telomerlängen der einzelnen Ansätze zu Beginn und Ende der Kultur, sowie der resultierende Telomerverlust sind in Tab. 4 angegeben.

Die Telomerlänge im Verlauf der Kulturen zeigten teils deutliche Schwankungen zwischen den drei Ansätzen innerhalb eines Spenders. Es traten Unterschiede der Telomerlänge zu gleichen Messzeitpunkten sowie unterschiedliche Telomerverlustraten auf. Dies wurde so bei allen Spendern gesehen. Insgesamt entsteht ein heterogenes Bild des Telomerlängenverlaufs im Vergleich der drei Behandlungen (siehe Abb. 7). Im vierten Teil der Arbeit wird auf mögliche Ursachen dieser Beobachtung näher eingegangen.

Trotz dieser Variabilitäten der Telomerlänge konnte mit keiner Behandlung eine wesentliche Abweichung der Telomerlängendynamik assoziiert werden. Die höchste Telomerverlustrate wurde in 3 der 5 Kulturen (IK1, IK2, IK 5, siehe Tabelle 4) unter Telomerase-Inhibition erreicht, in 2 von 5 Kulturen trat der höchste Telomerverlust in den DMSO-behandelten Kulturen auf.

Zum weiteren Vergleich der Telomerverlustraten zwischen den drei Behandlungen wurde eine statistische Auswertung durchgeführt. Hierzu wurde ein *mixed effect model* angewendet, das die

Unterschiede in intercepts und Steigungen der Telomerkurven der drei Behandlungen als Mittelwerte aller Kulturen betrachtet. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Telomerverlustraten zwischen den drei Behandlungen festgestellt werden ($p < 0,05$).
(*telomere experiment: statistical analysis; Nicole Augustin, Fakultät für Mathematik und Statistik, Universität Freiburg*)

		Tag 0	Kulturende	Differenz	
IK1	k.B.	8.1 *)	6.9	-1.2	*) angegeben sind die Mittelwerte aus drei Messungen
	DMSO 10 μ M	8.1	7.1	-1.0	
	BIBR 1532 10 μ M	8.1	6.7	-1.4	
IK2	k.B.	8.8	8.0	-0.8	
	DMSO 10 μ M	8.8	8.0	-0.8	
	BIBR 1532 10 μ M	8.8	7.5	-1.3	
IK3	k.B.	7.6	7.3	-0.3	
	DMSO 10 μ M	7.6	5.2	-2.4	
	BIBR 1532 10 μ M	7.6	5.4	-2.2	
IK 4	k.B.	8.4	5.4	-3.0	
	DMSO 10 μ M	8.4	7.0	-1.4	
	BIBR 1532 10 μ M	8.4	7.7	-0.7	
IK 5	k.B.	8.4	7.9	-0.5	
	DMSO 10 μ M	8.4	9.3	0.9	
	BIBR 1532 10 μ M	8.4	7.4	-1.0	

Tab. 4: Unterschiede der TFU^{trf} in den unterschiedlichen Behandlungen zu Beginn und Ende der Kultur

III.2.3.2. Initiale Telomerverlängerung und Telomeraseinhibition

In den Voruntersuchungen war zu Beginn der Kultur nach initialer Stimulation eine Zunahme der Telomerlänge von durchschnittlich +0,9 kb aufgefallen. Dieser Telomerlängenzuwachs ist in erster Linie auf die Induktion von Telomerase zurückzuführen. [78] Daher interessierte insbesondere, ob auch unter Telomerase-Inhibition mit BIBR 1532 eine initiale Telomerverlängerung auftritt.

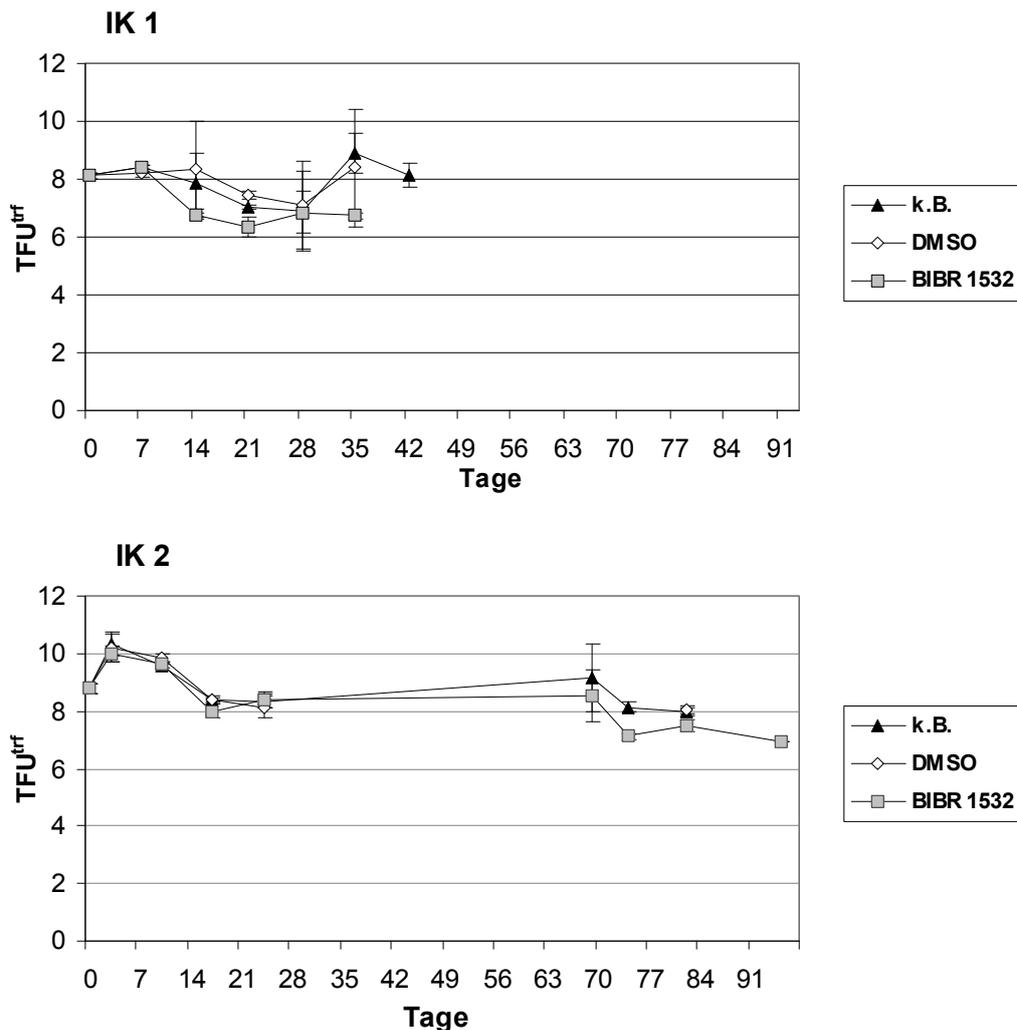
Es zeigte sich erneut eine vorübergehende Zunahme telomerischer Sequenzen in allen drei Behandlungreihen jedes Spenders, damit auch in den telomerase-inhibierten Zellen. Der

mittlere Telomerzuwachs betrug hier $+0,8 \pm 0,7$ kb ($n=3 \times 5$) in unbehandelten, $+1,1 \pm 0,7$ kb ($n=3 \times 5$) in DMSO- und $+0,7 \pm 0,6$ kb ($n=3 \times 5$) in BIBR1532-exponierten Zellen. Damit zeigt sich unter allen drei Behandlungen ein Telomerlängenanstieg innerhalb der ersten Kulturwoche. Auf mögliche Gründe hierfür wird in Teil IV näher eingegangen.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

1. Es kommt in allen drei Behandlungen zu einem Telomerverlust über die Kulturzeit.
2. Der Telomerverlust ist variabel, er lässt sich jedoch keiner bestimmten Behandlung zuordnen.
3. Der initiale Telomerlängenanstieg findet sich in allen Ansätzen, auch unter Telomeraseinhibition.

Abb.7 zeigt die Telomerlängenverläufe der unterschiedlichen Ansätze aller fünf Kulturen.



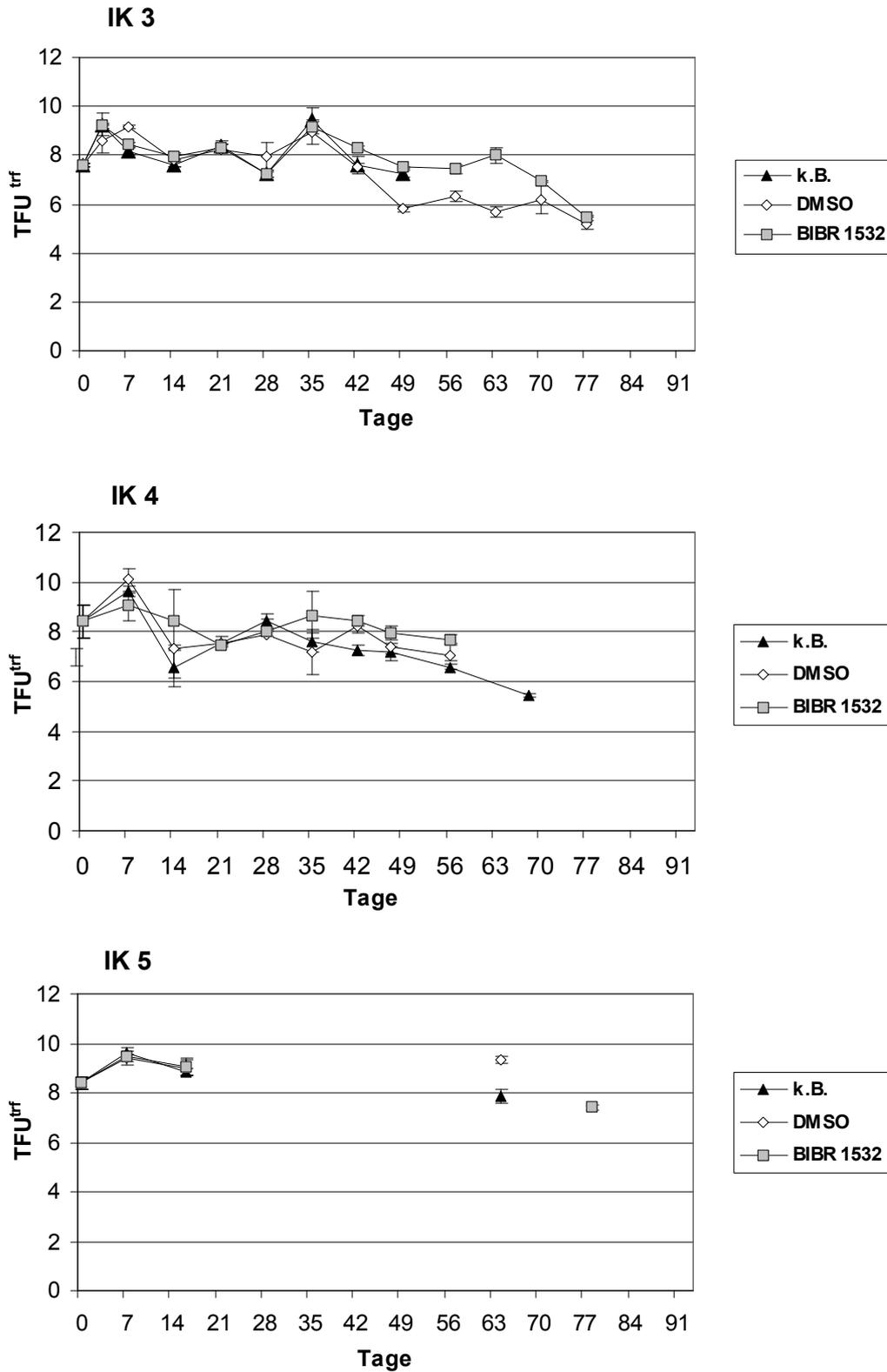


Abb.7: Telomerlängenverläufe der drei Behandlungen in Kulturen IK1 –IK5

III.2.4. Vitalitätsbestimmungen

III.2.4.1. Anteil toter Zellen

Das Proliferationsverhalten und die Viabilität von in-vitro-Zellkulturen ist maßgeblich abhängig von den Kulturbedingungen. Änderungen an der Zusammensetzung des Kulturmediums können verbunden sein mit Sistieren des Wachstums, mit Eintritt von Apoptose und damit dem Untergang von Zellen.

Die Zugabe einer chemischen Substanz kann ebenfalls, unabhängig vom Wirkstoff, die Viabilität der Zellen beeinflussen.

Um auszuschließen, dass die Zusätze DMSO bzw. BIBR 1532 toxische Wirkung besitzen, wurde die Anzahl toter Zellen exemplarisch in den Ansätzen der Kulturen IK 1 und IK 4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels Trypanblau-Viabilitätstestung bestimmt.

Tabelle 5 gibt die Anteile wieder.

<i>Anteil toter Zellen</i> <i>in %</i>	Tag	0	14	21	24	28	31	42
IK 1								
keine Behandlung		0	19,4	27,8	21,3	32,5	25,4	8,5
DMSO		0	14,3	20,9	34,4	14,8	25,7	10,6
BIBR 1532		0	17,9	15,2	34,7	24,0	48,1	10,3

<i>Anteil toter Zellen</i> <i>in %</i>	Tag	0	14	21	38	42	47	56	63
IK 4									
keine Behandlung		0	12,6	8,73		13,8	20,8	49,3	60,3
DMSO		0				28,2	25,0	50,6	76,0
BIBR 1532		0	11,1	4,2	22,7	32,9	11,8	44,2	79,4

Tab. 5: Anteile toter Zellen an der Gesamtpopulation (IK3, IK4) im Vergleich für die drei Behandlungen

Es zeigen sich keine erhöhten Raten toter Zellen unter den Zusätzen DMSO bzw. BIBR 1532 gegenüber unbehandelten T-Lymphozyten. Damit ist ein unmittelbar toxischer Effekt des Medikamentes in der verwendeten Konzentration von 10µM unwahrscheinlich.

III.2.4.2. Bestimmung der Apoptoseraten

Parallel zur Analyse toter Zellen wurden die Anteile apoptotischer Zellen im Verlauf einer T-Zell-Expansion vergleichend für die drei Behandlungen bestimmt. Durch fluoreszenzmarkiertes Annexin-V als Indikator der früh-apoptotischen Zellen und Gegenfärbung mit Propidiumiodid zur DNA-Markierung nekrotischer Zellen kann zwischen diesen beiden Populationen im Durchflusszytometer differenziert und ihr Anteil an der Gesamtpopulation bestimmt werden.

In Abb. 8a ist das FACS-Profil der drei Behandlungen der Kultur IK 3 an Tag 14 dargestellt. Abb. 8b zeigt exemplarisch die Entwicklung der Apoptoseraten über den Kulturverlauf in IK 3. Wie der Grafik zu entnehmen, stieg die Rate apoptotischer Zellen mit dem Kulturverlauf, geringer ausgeprägt auch die der nekrotischen Zellen. Anfänglich sieht man ein deutliches Überwiegen vitaler Zellen. Die Apoptoseraten unter BIBR 1532 zeigen sich im gesamten Verlauf, insbesondere auch in der ersten Kulturhälfte, nicht erhöht gegenüber den unbehandelten und DMSO-exponierten Zellen. In den Kulturen IK 2 und IK 4 erfolgte die Bestimmung stichprobenartig zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur.

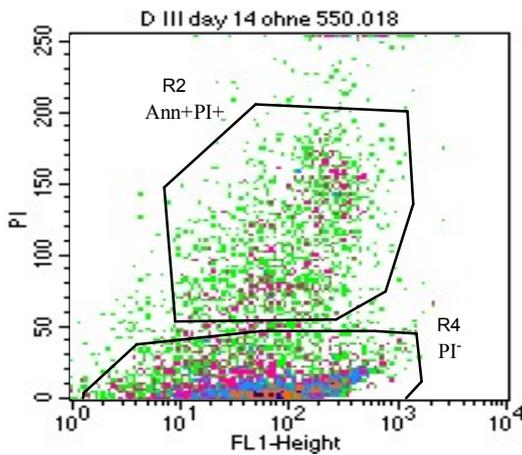
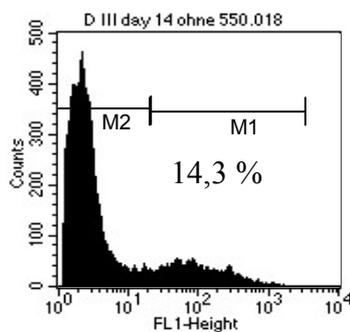
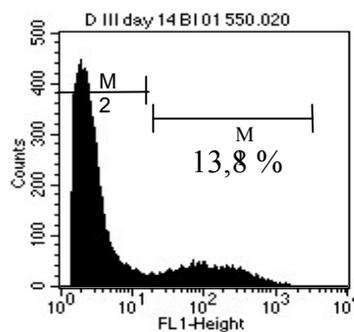


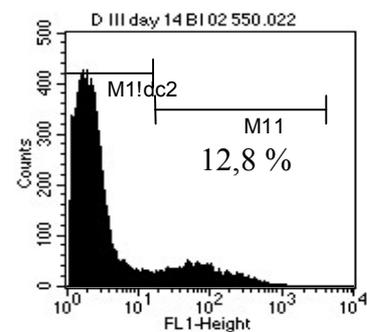
Abb. 8a: FACS-Profil der Apoptose-Bestimmung im Annexin-V-Assay
M1:frühaoptotische Zellen



keine Behandlung



DMSO



BIBR 1532

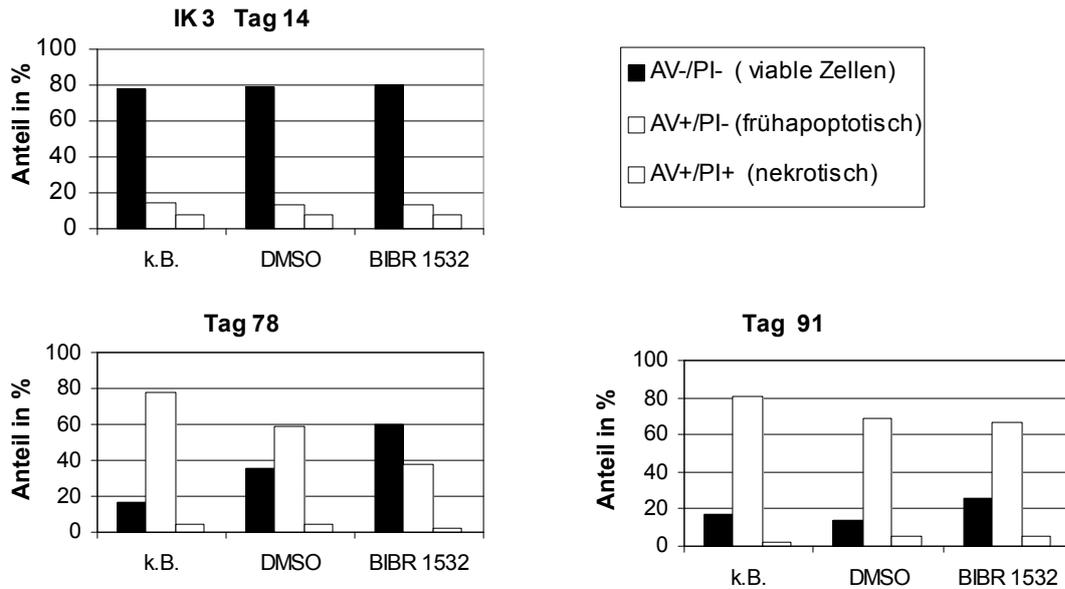


Abb. 8b: Verlauf der Anteile viable, apoptotischer und nekrotischer Zellen (IK 3)

Es konnte in keiner Kultur eine signifikant erhöhte Rate apoptotischer Zellen durch die Behandlung mit BIBR 1532 festgestellt werden, so dass anzunehmen ist, dass BIBR 1532 keinen direkt apoptose-induzierenden Einfluss auf T-Lymphozyten in der Dosierung von 10 μ M hat.

Tab.6 fasst die Raten vitaler, apoptotischer (AV^+PI^-) und nekrotischer Zellen (AV^+PI^+) zum Zeitpunkt des Proliferationsarrests zusammen.

	% viable Zellen	% AV^+PI^-	% AV^+PI^+
<u>IK 2 Tag 89</u>			
k.B.	6,3	79,0	14,4
DMSO 10 μ M	4,1	83,8	10,8
BIBR 1532 10 μ M	8,3	65,1	27,0
<u>IK 3 Tag 91</u>			
k.B.	17,0	80,2	2,5
DMSO 10 μ M	14,3	68,7	5,6
BIBR 1532 10 μ M	26,2	67,1	5,0
<u>IK 4 Tag 69</u>			
k.B.	55,3	38,3	5,4
DMSO 10 μ M	48,6	43,0	6,7
BIBR 1532 10 μ M	50,8	48,0	7,1

Tab. 6

III.2.5. Detektion von Seneszenz versus Apoptose

Am Ende der Kulturen zeigte sich eine Abflachung der Wachstumskurve, ein Proliferationsstopp und ein fehlendes Ansprechen auf Stimulation. Diese Phänomene treten in den meisten Zelltypen, verbunden mit morphologischen Veränderungen, als Ausdruck der Seneszenz bei kurzen Telomeren ein.

Um zu prüfen, ob in T-Zellen das Ende des Zellzyklus bei kurzen Telomeren durch Seneszenz vermittelt wird, wurde ein Test zum Nachweis seneszenten Zellen durchgeführt. Dieser Test basiert auf dem Nachweis eines seneszenzspezifischen Proteines, der beta-Galaktosidase. Bei Vorhandensein dieses Proteins färben sich seneszente Zellen blau an und können so im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Der Test wurde in den Kulturen IK 2 und IK 5 am Tag 89 bzw. Tag 84 und von IK 4 am Tag 58 von allen drei Ansätzen durchgeführt. Keine Kultur zeigte zum Zeitpunkt noch Proliferationszeichen. In Abb.9 ist die Kultur IK 2 an Tag 89 nach beta-Galaktosidasenachweis dargestellt.

In der Positivkontrolle wurden 165 positive Zellen auf eine Gesamtzellzahl von 304 Zellen gezählt, das entspricht einem Anteil von 54 %.

In keiner der T-Zell-Kulturen fand sich dagegen, auch nach wiederholter Durchführung des Experiments (n=3), eine blaue Anfärbung der T-Zellen als Nachweis von beta-Galaktosidase.

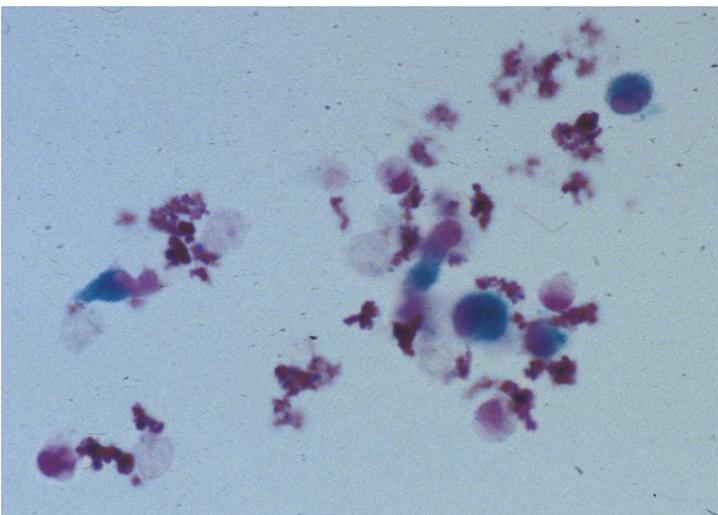
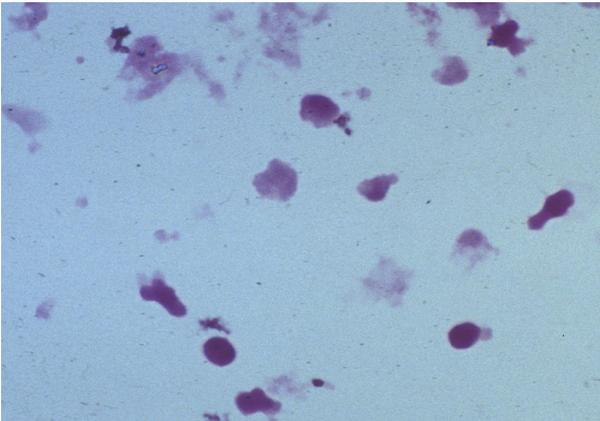
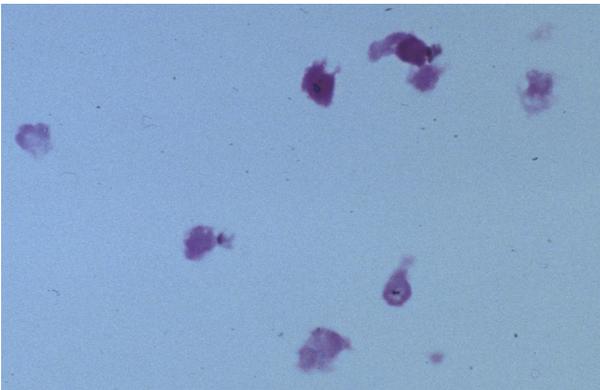


Abb. 9a: Positivkontrolle (IK2 Tag 89, inkubiert mit Positive Control Solution, x100)

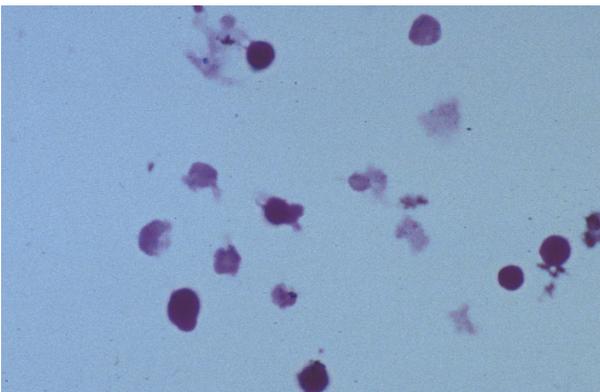
Abb.9b:



IK 2, keine Behandlung, Tag 89 (x100)



IK 2, DMSO, Tag 89 (x100)



IK 2, BIBR 1532, Tag 89 (x100)

Abb. 9 a,b: Seneszenz-Assay aller drei Behandlungen von IK2 (Tag 89) (keine Blaufärbung) im Vergleich mit einer Positivkontrolle (Abb. 9a: IK 2 nach Inkubation mit Positive Control Solution: deutliche Blaufärbung der Zellen)

IV. DISKUSSION

Die Telomeraseinhibition gilt durch ihre hohe Tumorspezifität als ein möglicher neuer Ansatz künftiger Krebstherapien. In diesem Zusammenhang gilt es jedoch auch, den somatischen Zellen des Menschen, die ebenfalls Telomerase exprimieren, besondere Aufmerksamkeit zu schenken.

Zunächst soll hier die Rolle der Telomerase und die Telomerlängendynamik in T-Lymphozyten diskutiert werden. Erst dann kann die Bedeutung der Telomeraseinhibition auf Lymphozyten, wie sie im zweiten Teil durchgeführt wurde, adäquat eingeschätzt werden.

IV.1. Telomerlängendynamik und Rolle von Telomerase in aktivierten T-Zellen

IV.1.1. Kinetik der Telomerase in T-Zellen

Aktivierte T-Lymphozyten zeigen, anders als die meisten Körperzellen, transiente Telomeraseaktivität. Neben T-Zellen sind auch B-Zellen sowie Zellen der granulozytären Reihe, hämatopoetische Vorläuferzellen und die Zellen der Keimbahn in der Lage, Telomerase zu aktivieren [12, 36]

Es ist bekannt, dass naive T-Zellen des peripheren Blutes mit geringer Telomeraseaktivität nach Stimulation mit einem proliferationsinduzierenden Agens in-vitro eine temporäre Aktivierung von Telomerase zeigen. Ohne weitere Restimulation fällt diese nach wenigen Tagen wieder ab. [36, 66] Durch erneuten Antigenkontakt kann bis zu 3 mal eine Reaktivierung erreicht werden, mit der Anzahl der Restimulationen sinkt jedoch die Aktivität des Enzyms, bis schließlich keine Telomerase mehr induzierbar ist. [8]

Bisher waren quantitative Aussagen durch den TRAP-Assay vor allem innerhalb eines Experiments möglich. Das vom Hersteller mitgeführte *Control Template* erlaubt durch die Bestimmung der Relativen Telomeraseaktivität (RTA) nur relative und daher nur für das gleiche Experiment gut vergleichbare Aussagen. In dieser Arbeit wurden die relativen Telomerase-Aktivitätswerte (RTA) als prozentualer Anteil der Aktivität von Phoenix-Ampho-Zellen angegeben, einer immortalen Nierenzell-Linie, die von der 293T-Zelllinie abgeleitet ist.

Der höchste Wert der Telomeraseaktivität in CD8⁺ selektierten T-Zellen wurde in dieser Arbeit in 3 Fällen nach der ersten Stimulation zwischen Tag 3 und Tag 7 erreicht. Insgesamt lag die maximale Telomeraseaktivität der T-Zellen zwischen 21% und 75% verglichen mit der Kontroll-Zelllinie. Mit diesen Resultaten konnten die Ergebnisse früherer Studien bestätigt werden. [12, 36, 90]

Es wird angenommen, dass die Telomeraseaktivität die Zellen während der hoher Teilungsraten im Rahmen einer Immunantwort vor übermäßigem Telomerverlust schützt. [91]. Die deutliche Aktivierung der anfangs minimalen Telomeraseaktivität nach Proliferationsinduktion zeigt, dass die mitogene Stimulation von T-Zellen mit einer Aktivierung von Telomerase verbunden ist.

Die Stimulation mit T2-Zellen erfolgte wöchentlich. Trotzdem läßt sich ein ähnliches Profil der Telomeraseaktivität mit einem initialen Gipfel in der ersten Kulturwoche, anschließendem Aktivitätsabfall trotz Stimulation und erster erneuter Reinduktion an Kulturtag 14 erkennen. Der Grund hierfür ist bisher nicht völlig klar, denkbar wäre eine temporäre Ausschaltung bestimmter Signalproteine nach Telomeraseaktivierung in T-Zellen, wodurch eine permanente Aktivierung des Enzyms verhindert werden könnte.

IV.1.2. In-vitro-Proliferation von T-Zellen

Trotz Telomeraseaktivität führen anhaltende Zellteilungen in T-Zellen nach einiger Zeit zum telomervermittelten Proliferationsarrest. In dieser Arbeit lag die mittlere Verdopplungsrate der im ersten Teil untersuchten CD8⁺ Kulturen bei CPDL=13,4 (n=5), bei einer mittleren Kulturdauer von 56 Tagen. In der Literatur werden für T-Zellen maximale Zellteilungsraten von 17 ±3 PDs [93] bis 23 PDs [66] angegeben. Für naive T-Zellen sind die Werte etwas höher als für Memory-T-Zellen. [93]

Diese Unterschiede sind zum Teil darauf zurückzuführen, dass T-Zellen in anderen Arbeiten klonal expandiert wurden, und die maximale Teilungsrate eines selektierten Klons angegeben wird. In dieser Arbeit dagegen wurden heterogene *bulk*-Kulturen verwendet. Hier gibt die maximale Teilungsrate (CPDL) einen Mittelwert der Verdopplungsrate aller Zellen der Kultur wieder. In diesen heterogenen Kulturen proliferieren nicht alle Zellen in gleichem Maße, dieses erklärt den geringeren Gesamtwert der maximalen Zellteilungen.

Das vorzeitige Ende der Kultur durch andere Faktoren, wie schlechte Kulturverhältnisse, oder fehlende Stimulation ist unwahrscheinlich, da alle Kulturen unabhängig voneinander nach einer ähnlichen Zahl an Zellteilungen die Proliferation einstellten.

VI.1.3. Telomerlängendynamik in T-Zellen in vitro

Trotz Telomeraseaktivität bis zu 75% des Phoenixzellniveaus zeigten T-Zellen einen fortschreitenden Telomerverlust und sind in ihrer Lebensspanne eingeschränkt. Dieser Telomerverlust wurde bereits in einer Reihe von Studien, zumeist mittels der Southern Blot-Methode, gezeigt und konnte hier bestätigt werden [92]. In der Literatur werden für den in-vitro Telomerverlust von T-Zellen Werte im Bereich von 35-120 bp pro Zellteilung angegeben. [73, 86] In vivo-Untersuchungen ergaben einen Telomerverlust für T-Lymphozyten von 33 bis 59 bp / Jahr [93,72].

Zum Zeitpunkt des Proliferationsarrests lag die Telomerlänge in unseren Experimenten zwischen 5,3 und 7,7 kb. Durch die Größe dieses Intervalls lässt sich keine bestimmte Telomerlänge eingrenzen, durch die der Austritt aus dem Zellzyklus vermittelt wird. Für Memory-CD4⁺ T-Zellen hatten Weng et al. in der Vergangenheit eine ähnliche Spannbreite der kritischen Telomerlänge von 4,3 bis 8,4 kb festgestellt. [93] Ergebnisse von Pan et al. dagegen ermittelten für T-Zellen eine mittlere Telomerlänge von 7,0 kb bei Eintritt in die Seneszenz. [66]

VI.1.3.a. Initiale Telomerlängenzunahme: ein telomerasevermittelter Effekt?

In der Literatur wurde zunächst keine funktionelle Telomerverlängerung in T-Zellen durch die anfängliche Telomeraseaktivität beschrieben. Im Gegensatz dazu ist in B-Zellen eine Verlängerung der Telomere nach Stimulation und Telomeraseaktivierung bekannt. [91]

Die Gruppe um Son et al. zeigte erstmals in Flow-FISH-Messungen, dass auch in T-Lymphozyten nach initialer Wachstumsinduktion eine Telomerverlängerung stattfindet. Die Höhe der Telomerlängenzunahme war korreliert mit der Telomeraseaktivität. [80]

In unseren Versuchen ließ sich die Zunahme der Telomerlänge mit einem mittleren Zuwachs von 860 bp bestätigen. Demzufolge scheint auch in T-Zellen, wie bisher nur für Memory-B-Zellen gezeigt, eine stimulationsbedingte Telomerverlängerung vorzuliegen. Die Telomerverlängerung ist zeitlich mit der Phase höchster Telomeraseaktivität in den T-Zellen assoziiert. Auch wenn die genauen Mechanismen der Telomeraseaktivität in T-Lymphozyten noch nicht vollständig geklärt sind, deutet vieles darauf hin, dass diese Telomerverlängerung

Telomerase-vermittelt ist. Die Fähigkeit der Telomerase zur Addition neuer telomerischer Sequenzen in Lymphozyten konnte kürzlich bestätigt werden durch ektopen Transfer von hTERT in T-Zellen. Hier wurde bei funktionellem Telomeraseniveau eine Verlängerung der Telomere und eine Ausdehnung der Lebensspanne gesehen. [74]

VI.1.3.b. Variationen der Telomerlänge:

Der Telomerverlust in T-Zellen wurde in früheren Arbeiten als kontinuierlich mit der Zahl der Zellteilungen abfallend beschrieben. [66] In unseren Experimenten zeigte sich dagegen eine variabel abnehmende Telomerlänge mit zeitweisigem Telomererhalt, vereinzelt sogar geringfügiger Telomerverlängerung. (siehe II, Abb. 2; 7)

Die beobachtete Telomerlängenheterogenität ist, wie die beobachteten Variationen der Proliferationskinetik, möglicherweise auf klonale Selektionsvorgänge innerhalb der Kultur zurückzuführen. Innerhalb der Vielzahl von Einzelzellen in den T-Zell-Expansionskulturen können einzelne Zellen oder Zellpopulationen durch längere Telomere klonal expandieren und eine Überzahl erhalten. Zellen mit längeren Telomeren haben möglicherweise einen Überlebensvorteil in der Kultur, und führen so zu insgesamt scheinbar verlängerten Telomeren. Umgekehrt könnten Zellen mit verkürzten Telomeren präferentiell apoptotisch werden. Allerdings könnte auch die genauere Erfassung der Telomerlänge durch die Flow-FISH-Methode eine tatsächliche Variation der T-Zell-Telomerlänge zeigen, die bisher nicht detektiert werden konnte. Es ist durchaus denkbar, dass im stark regulierten System der Telomerlänge in T-Zellen vereinzelt Telomererhalt oder sogar geringe Telomerzunahmen auftreten, möglicherweise vermittelt über die Aktivität von Telomerase. Mit Flow-Fish lässt sich durch die spezifische Markierung auf der Basis der Fluoreszenz von Einzelzellen die reale Telomerlänge sehr sensitiv erfassen. [73] Die bisherige Bestimmungen der Telomerlänge erfolgte meist über Southern Blot-Messungen. Hier werden sowohl telomerische als auch subtelomerische Sequenzen in einer langgezogenen Bande dargestellt, daher ist die feine Detektion von Längenunterschieden nur eingeschränkt möglich.

Zur sicheren Erfassung des Telomerverlusts in expandierten T-Zellen wäre eine zusätzliche Telomerlängenbestimmung der T2-Feeder-Zellen als Negativkontrolle sicherlich sinnvoll. In diesen bestrahlten Zellen einer Zelllinie sollte sich, im Gegensatz zum Telomerverlust in T-Lymphozyten, eine relativ konstante Telomerlänge über den gesamten Verlauf zeigen.

IV.1.4. Zellzyklus-Aktivität

Bei einer kritisch kurzen Telomerlänge tritt die Zelle aus dem Zellzyklus aus und erreicht damit das Stadium der Seneszenz. Seneszenz ist gekennzeichnet durch Wachstumsstop, die Unfähigkeit zu weiterer DNA-Synthese und kurzen Telomeren bei viablen, metabolisch aktiven Zellen. [30, 31] Phänotypisch fallen morphologische Veränderungen in Form von vergrößerten, vakuolisierten Zellen, z.T. mit mehreren Nuklei, als Zeichen der Seneszenz auf [32, 77]

Im beta-Galaktosidase-Assay zum Nachweis seneszenten Zellen zeigte sich in den hier durchgeführten Experimenten bei verkürzten Telomeren und bereits eingetretenem Wachstumsstop in keiner Kultur eine positive Färbung im Sinne eines Seneszenznachweises. Dieses lässt vermuten, dass der Austritt aus dem Zellzyklus in T-Lymphozyten nicht dem typischen Seneszenzphänomen entspricht.

Wie jüngere Forschungsergebnisse vermuten lassen, wird durch zunehmenden Telomerverlust in einigen Zelltypen statt der Seneszenz der apoptotische Zelltod getriggert. In diesem Falle wird angenommen, dass kurze Telomere wie Doppelstrangbrüche wirken und so über die Aktivierung von p53 der Weg der Apoptose eingeleitet wird. Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von TRF2 in einigen Zelltypen, darunter auch CD4⁺T-Zellen, zu einer Erosion telomerischer Enden und der Einleitung von Apoptose führte. [38] Auch der fortschreitende Telomerverlust durch Telomerase-Inhibition in Tumorzellen war in einer Reihe von Studien gefolgt von apoptotischem Zelltod [27, 33, 97]

In Übereinstimmung mit dieser Vermutung nahm in unseren Ergebnissen der Anteil apoptotischer Zellen mit der Dauer der Kultur zu. Zum Zeitpunkt des Proliferationsstops bildeten apoptotische Zellen die Mehrheit in allen Ansätzen. Daher muss man annehmen, dass telomerische Erosion in T-Lymphozyten nicht mit Seneszenz, sondern über die Induktion von Apoptose beantwortet wird.

Andere Ursachen des fehlenden β -Galaktosidasenachweises zum Zeitpunkt des Proliferationsstops, wie beispielsweise suboptimale Kulturbedingungen, können letztlich nicht sicher ausgeschlossen werden. Die relativ gleiche Größenordnung der Zahl möglicher Zellteilungen in den unterschiedlichen Kulturen bis zum Sistieren des Wachstums, sowie der Nachweis von Apoptose bei kurzen Telomeren auch in anderen Zelltypen lassen diese Erklärung jedoch weniger wahrscheinlich erscheinen.

IV.2. Telomeraseinhibition mit BIBR 1532 in T-Zellen in-vitro

Die Behandlung mit dem neuen pharmakologischen Telomeraseinhibitor BIBR 1532 führte in immortalen Zellen zu progredientem Telomerverlust, gefolgt von Wachstumsstop. [16] Die Tumorspezifität von BIBR 1532 ist möglicherweise eingeschränkt durch das gleichzeitige Vorkommen von Telomerase in Lymphozyten, Keimzellen und hämatopoetischen Stammzellen. Telomerasevermittelte Effekte auf die Telomerlänge in T-Zellen sind nach bisherigen Ergebnissen wahrscheinlich. Daher sind Auswirkungen der Inhibition von Telomerase auf das Wachstumsverhalten oder die Telomerlängendynamik von T-Zellen ebenfalls denkbar.

Die Ergebnisse der Kultivierung von T-Lymphozyten mit BIBR 1532 in dieser Arbeit deuten hingegen darauf hin, dass die Telomeraseinhibition keinen Einfluss auf das in-vitro-Verhalten zu haben scheint. Diese Resultate werden im folgenden diskutiert.

IV.2.1. Ausschluss toxischer Nebeneffekte

Um Aussagen über Effekte einer Medikamentenbehandlung machen zu können, müssen zuerst mögliche andere Einfluss- und Störfaktoren, beispielsweise Toxizität des zugeführten Stoffes auf die Zielzellen, ausgeschlossen werden. Toxische Einflüsse würden in der Zelle zu selbstvermitteltem Zelltod, der Apoptose, oder in höheren Konzentrationen zum Absterben der Zelle, der Nekrose, führen.

Für Tumorzelllinien war bereits von Damm et al. die Verträglichkeit von BIBR 1532 ohne Zeichen der Toxizität bis zu Konzentrationen von 10 μ M gezeigt worden. [16] Hier wurde die Verträglichkeit an T-Zellen durch die Ermittlung des Anteils toter Zellen im Verlauf der Kultur, und der Bestimmung der Apoptose-Raten getestet.

Die Raten apoptotischer als auch nekrotischer Zellen waren für alle drei Behandlungen ähnlich. Es war kein schnelleres Ansteigen der Rate apoptotischer Zellen unter einer Behandlung nachzuweisen. Daher erscheint ein toxischer Effekt von BIBR 1532 in einer Dosierung von 10 μ M auf T-Lymphozyten unwahrscheinlich.

IV.2.2. Keine Beeinflussung der Proliferationskapazität durch BIBR 1532

Die mittlere Verdopplungsrate der unbehandelten T-Zellen des Inhibitionsversuchs lag bei CPDL= 12,6, und zeigt damit in der Größenordnung keinen Unterschied zu den Vorversuchen ohne Inhibitor.

Wie die Vergleiche des Wachstums zwischen unbehandelten, DMSO- und inhibitorbehandelten T-Zellen zeigen, ist kein Unterschied im Wachstumspotential aller drei Behandlungen erkennbar. Die Verdopplungsraten der Ansätze (CPDL) liegen mit Mittelwerten von 12,6 (*keine Behandlung*), 12,6 (*DMSO*) und 12,8 (*BIBR 1532*) in derselben Größenordnung. Dies weist darauf hin, dass sich das Wachstumspotential, d.h. der maximal mögliche Zellumsatz, unter den drei Behandlungen nicht verändert hat. Auch die „Geschwindigkeit“ des Wachstums, der Zellumsatz, der mit Hilfe des WST-1 Assay erfasst wurde, war nicht reduziert durch Telomeraseinhibition. Diese Ergebnisse sprechen gegen einen direkt hemmenden Einfluss von BIBR 1532 auf die proliferativen Aktivität der T-Lymphozyten.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit Beobachtungen von Damm et al. an BIBR 1532-behandelten Tumorzellen. Deren Proliferationsverhaltens blieb über den Expansionsverlauf unverändert gegenüber unbehandelten Zellen und zeigte erst einen Einbruch beim Eintritt replikativer Seneszenz. [16]

Intrakulturell zeigten sich zwischen den Behandlungen teils deutliche Unterschiede der Wachstumskapazität und dem Verlauf der Wachstumskurven. Auch die maximale Zahl der Zellteilungen zum Zeitpunkt der Seneszenz variierte zwischen den drei Behandlungen, wie aus Tabelle 3 ersichtlich. Die größte Differenz zeigte die Kultur IK 3, mit einem Unterschied von 6,2 PDs zwischen dem unbehandelten und dem DMSO-behandelten Ansatz. (*ohne Behandlung*: CPDL=10,4; *DMSO*: CPDL=16,6; *BIBR 1532*: CPDL=13,9). In nur einer Kultur (IK 1) trat die geringste Verdopplungsrate im telomeraseinhibierten Ansatz auf, in den anderen Kulturen hingegen zeigten die DMSO- (IK2; IK4) bzw. unbehandelten Zellen (IK 3; IK5) das geringste Teilungspotential. Es konnte also keine bestimmte Behandlung mit einer reduzierten oder veränderten Zahl an Gesamt-CPDL assoziiert werden. Daher wurden Variabilitäten des CPDL nicht als inhibitionsvermittelter Effekt beurteilt. Eher sind sie Ausdruck klonaler Selektionsvorgänge innerhalb innerhalb eines Ansatzes, insbesondere deshalb, da die Variabilitäten mit der Kulturdauer zunehmen.

Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen führte die Kultivierung von PBMCs mit Reverse-Transkriptase-Hemmern wie AZT oder d4T als Telomerase-Inhibitoren zu einer

Wachstumsreduktion. [5] Die Telomerase-Spezifität dieser Wirkstoffe ist jedoch gering. Daher ist gut vorstellbar, dass andere Effekte als die Inhibition von Telomerase zu diesem Effekt beigetragen haben.

IV.2.3. Telomerlängendynamik unter Exposition mit BIBR 1532

Die engmaschige, für alle Ansätze vergleichende Bestimmung der Telomerlänge sollte eventuelle Änderungen der Telomerlängendynamik durch BIBR 1532 detektierbar machen. In allen Kulturen kam es unter jeder Behandlung zu Telomerverlust. Der Vergleich der Ansätze innerhalb eines Spenders zeigt dabei durchaus unterschiedliche Telomerverkürzungen. Beispielsweise liegt in der Kultur IK 4 der Unterschied der Telomerverlustrate zwischen unbehandelten und BIBR 1532-behandelten Zellen bei 2,3 KB. (*Unbehandelt*: -3,0 kb; *BIBR 1532*: -0,7 kb). In Kultur IK 1 dagegen zeigt der telomerase-inhibierte Ansatz mit -1,4 kb den größten Telomerverlust.

Um von einem BIBR 1532-vermittelten Effekt auszugehen, müsste ein veränderter oder verstärkter Telomerverlust jedoch konsequent unter Telomeraseinhibition auftreten. Dieses war nicht der Fall (Tab. 4), es zeigten sich in der Auswertung mittels eines *mixed effect models* keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Behandlungen.

Diese Resultate weisen darauf hin, dass eine Telomeraseinhibition mit BIBR 1532 in proliferierenden T-Zellen keine Auswirkungen hat auf die Telomerlängendynamik.

In Übereinstimmung mit diesen Resultaten beobachteten Wolthers et al., dass die Behandlung von HIV-Patienten mit Reverse Transkriptase-Inhibitoren zwar wie vorbeschrieben [81] zu einer Reduktion der Telomeraseaktivität in PBMCs dieser Patienten führte, jedoch keine verstärkte Telomerverkürzung in diesen Zellen durch die Behandlung auftrat. [96]

Ein interessanter Aspekt ist schließlich die Betrachtung der im ersten Teil festgestellten initialen Telomerverlängerung der CD8⁺ T-Zellen. Diese wird in der Literatur der ausgeprägten Telomeraseexpression nach initialer Stimulation zugeschrieben. [80] Erstaunlicherweise trat eine leichte Telomerverlängerung in der ersten Kulturwoche unter allen drei Behandlungen, auch den telomeraseinhibierten, in ähnlichem Ausmaß auf. Die mittlere Telomerlängenzunahme erreichte hier $+0,8 \pm 0,7$ kb (n=5) in unbehandelten, $+1,1 \pm 0,7$ kb (n=5) in DMSO- und $+0,7 \pm 0,6$ kb (n=5) in BIBR1532- behandelten T-Zellen und war damit in allen Behandlungen nachweisbar.

Der Grund für das Auftreten der Telomerverlängerung als vermutlich telomerasevermittelter Effekt auch unter Inhibition des Enzyms ist bisher unklar. Denkbar wäre, dass andere telomerverlängernde Mechanismen, wie ALT (*alternative lengthening of telomeres*) [39] oder homologe Rekombination [56] zur Telomerverlängerung beitragen. Auch Selektionsprozesse innerhalb der Kultur führen möglicherweise zu einer scheinbaren Telomerverlängerung.

In der Zusammenschau weisen die Resultate - das unveränderte Wachstumspotential, die unveränderte Telomerlängendynamik und auch die erhaltene Telomerverlängerung – darauf hin, dass die Telomeraseinhibition mit BIBR 1532 keine wesentlichen Effekte auf T-Zellen *in vitro* zeigt.

IV.3. Interpretation der fehlenden Effekte von BIBR 1532 auf T-Zellen

1a. Zunächst muss die Möglichkeit einer suboptimalen Wirkstoffkonzentration in Erwägung gezogen werden. Wir verwendeten BIBR 1532 in einer Konzentration von 10 μ M. Die IC₅₀ des Medikaments beträgt 93 nM, damit liegt die verwendete Konzentration mehr als 100-fach über dem IC₅₀. Mit der gleichen Konzentration wurden in Tumorzelllinien Wachstumsretardierung und Telomerverlust gesehen. [16] Damit ist eine zu geringe Konzentration als Erklärung sehr unwahrscheinlich.

1b. Ebenso könnten suboptimale Kulturbedingungen für fehlende Unterschiede der Telomerlängendynamik in T-Zellen unter den verschiedenen Behandlungen mitverantwortlich sein. Dieses muss auch im Zusammenhang mit dem fehlenden Seneszenznachweis mittels des β -Galaktosidaseassays in den Zellen diskutiert werden. Da der Wachstumsstopp jedoch zumeist nach einer konstanten Rate von 10-13 CPDL auftrat, sowie zu diesem Zeitpunkt bereits ein Telomerverlust stattgefunden hatte, ist ein Apoptoseeintritt durch exogene Faktoren nicht als primäre Ursache zu sehen.

2. Unterschiede der Enzymstruktur zwischen Telomerase in T-Zellen und der in Tumorzellen könnten ausschlaggebend sein für unterschiedliche pharmakologische Effekte. Es ist jedoch bekannt, dass Telomerasen unterschiedlicher Zellen ähnliche Strukturen zeigen, und sogar Telomerasen verschiedener Organismen, wie Mensch, Einzeller (*Euplotes*) und Hefe (*S.cerevisiae*), hohe Verwandtschaftsgrade aufweisen. [62, 63] Daher ist eine unterschiedliche Enzymstruktur als Ursache unterschiedlichen Inhibitionsverhaltens eher unwahrscheinlich. Ebenso sind bisher keine Isoenzyme der Telomerase beschrieben. Neuere Forschungsergebnisse

weisen jedoch auf Splice-Varianten des hTERT-Proteins mit unterschiedlicher Funktionalität der Telomerase hin. [41] Inwieweit solche Varianten auch mit unterschiedlicher Wirksamkeit der Telomeraseinhibition in den untersuchten Zellen zusammenhängen könnte, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden.

3. Die Art der Telomeraseregulation spielt möglicherweise eine Rolle zur Erklärung der unterschiedlichen Wirkung von BIBR 1532 auf Tumorzellen und Lymphozyten. In immortalen Zellen wird Telomeraseaktivität über die Transkription des hTERT-Gens vermittelt. In Lymphozyten dagegen wurde hTERT mRNA in allen untersuchten Zellen nachgewiesen, auch solchen ohne Telomeraseaktivität. Das Vorhandensein von hTERT-Transkripten scheint daher in T-Zellen unabhängig zu sein von dem Aktivierungsgrad der Telomerase [48]. Kürzlich zeigten Liu et al., dass es während der T-Zell-Aktivierung zu einer Phosphorylierung und Translokation des hTERT-Proteins aus dem Zytoplasma in den Zellkern kommt. [47] Diese Beobachtungen stärken die Vermutung, dass Telomerase in Lymphozyten erst posttranskriptionell, möglicherweise durch diese Modifikation des hTERT-Proteins, reguliert wird.

Der Wirkmechanismus von BIBR 1532 wird beschrieben als Inhibition der katalytischen Einheit der Telomerase, d.h. des hTERT-Proteins. [16]. Da die Telomerase-Regulation in Lymphozyten offenbar nicht abhängig ist vom quantitativen Vorliegen des hTERT-Proteins, sondern über weitere molekulare Veränderungen aktiviert wird, wäre es denkbar, dass auch die Inhibition mit BIBR 1532 hier geringere Effekte zeigt.

Zudem ist Telomerase in Lymphozyten nur vorübergehend nachweisbar, und liegt in ihrer Aktivität deutlich unter der von Tumorzellen. Dies wird von einigen Autoren als Argument dafür angeführt, dass Telomerase in T-Zellen möglicherweise weniger als bisher angenommen Bedeutung für die chromosomale Stabilität besitzt, und daher auch ihre Inhibition wenig oder keine Effekte zeigt. [29]

4. Jüngste Ergebnisse geben Hinweis darauf, dass Telomerase in T-Zellen vor allem eine Rolle spielt für die sporadische telomerische Reparatur einzelner Zellen mit kritisch verkürzten Telomeren, nicht jedoch für den Telomererhalt einer ganzen Population. T-Zellen, bei denen eine dominant-negative Mutante von hTERT ektopisch exprimiert wurde, zeigten in einzelnen Zellen einen deutlichen Telomerverlust, die mittlere Telomerlänge in einer Kultur war jedoch nicht reduziert. [71] Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Telomerase in T-Lymphozyten eine Rolle spielt beim Telomererhalt einzelner Zellen mit kritisch verkürzten Telomeren, dass

jedoch T-Lymphozyten mit ausreichend langen Telomeren, wie sie üblicherweise in der Mehrzahl zum Zeitpunkt der Telomeraseaktivierung vorliegen, von Telomerase unbeeinflusst bleiben. [71, 6, 73]

Ähnliche Vermutungen wurden bereits von Ducray et al. nach Experimente mit Fibroblasten, die mit exogener Telomerase transformiert waren, angestellt. Hier ließ sich beobachten, dass telomerase-vermittelte Effekte wie erneuerte chromosomale Stabilität erst auftraten, nachdem bei fortgeschrittenen Zellteilungen bereits eine kritisch kurze Telomerlänge vorlag. [18]

5. Im Gegensatz zur pharmakologischen Telomeraseinhibition mit BIBR 1532 konnte unter genetischer Telomeraseinhibition mit der dominant-negativen Mutante nach einer Reihe von Zellteilungen eine deutliche Wachstumsverzögerung der T-Lymphozyten gezeigt werden. [71] Möglicherweise liegt in diesem System eine effizientere Telomerasehemmung vor als bei dem pharmakologischen Ansatz, bei dem gegebenenfalls limitierte Reparaturvorgänge stattfinden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Aktivierungsgrad der hTERT-Transkription in T-Lymphozyten eng verknüpft ist mit dem Expressionsgrad des c-myc-Gens, welcher mit zunehmender Anzahl an Zellteilungen deutlich abfällt.[70] Damit sind möglicherweise auch die pharmakologischen Effekte von BIBR 1532 auf die Inhibition der Telomerase abhängig vom Expressionsgrad dieses Transkriptionsfaktors.

Weiteres Verständnis von Auswirkungen der Telomeraseinhibition auf T-Zellen wird durch weitere Erkenntnisse des differenziert regulierten Systems der Telomerase in Lymphozyten erwachsen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach diesen präklinischen Ergebnissen die Exposition von CD8⁺ T-Lymphozyten mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 keine nachteiligen Auswirkungen auf deren proliferatives Verhalten und die Telomerlängendynamik zeigt.

Allerdings können in-vitro Experimenten nicht ohne weiteres direkt auf eine in-vivo-Situation übertragen werden. Unter klinischen Bedingungen wäre am ehesten eine Langzeittherapie mit konstanten Spiegeln eines Telomeraseinhibitor erforderlich. Die Effekte einer solchen Therapie auf das lymphatische Systems in vivo, sowie mögliche Nebenwirkungen im Sinne vorzeitiger Immunseneszenz, sind durch vorliegende in-vitro-Ergebnisse nicht zu beantworten. Auch bleibt festzuhalten, dass in dieser Studie Zellen von Erwachsenen untersucht wurden. T-Lymphozyten jüngerer Individuen, insbesondere solche von Neugeborenen, könnten sich aufgrund längerer

Telomere und einem größeren Anteil naiver T-Zellen möglicherweise auch unter Telomeraseinhibition anders verhalten.

Weitergehende Studien mit veränderten Konzentrationen von BIBR 1532, und letztendlich die in-vivo-Evaluation werden unerlässlich sein, um mögliche Dysfunktionen des T-Zell-Systems und die vorzeitige replikative Seneszenz des Immunsystems durch therapeutische Telomeraseinhibition auszuschließen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die präferentielle Expression von Telomerase in Tumorzellen macht dieses Enzym zu einem interessanten Ansatz für zielgerichtete Therapieansätze in der Krebsbehandlung.

T-Lymphozyten bilden eine der wenigen Ausnahmen somatischer Zellen, die Aktivität des Enzyms Telomerase zeigen. Die Telomeraseaktivität in T-Lymphozyten ist in-vitro bis zu dreimal durch Proliferationsstimuli zu induzieren. Sie reicht jedoch nicht aus, um einen Verlust von Telomersequenzen zu vermeiden.

Dem Telomerlängenverhalten von T-Lymphozyten gilt daher besondere Aufmerksamkeit im Rahmen einer therapeutischen Telomeraseinhibition. In dieser Arbeit wurden die Einflüsse des pharmakologischen Telomeraseinhibitor BIBR 1532 auf T-Zellen in-vitro untersucht. Das Proliferationsverhalten der Zellen zeigte sich unverändert unter Telomeraseinhibition, ebenso kam es zu keinem veränderten Telomerverlust unter Exposition mit BIBR 1532, so dass von diesen präklinischen Experimenten kein eindeutiger Hinweis für einen nachteiligen Einfluss von BIBR 1532 auf T-Zellen anzunehmen ist.

Mögliche Nebenwirkungen im Sinne verfrühter Immunseneszenz, wie sie im Rahmen bestimmter Erkrankungen und im Alter beobachtet werden, stellen nach diesen ersten Ergebnissen keine spezifische Gefahr der therapeutischen Telomeraseinhibition mit BIBR 1532 dar. Die in-vivo-Evaluation der Substanz ist jedoch unerlässlich, um mögliche Nebeneffekte einer klinischen Telomeraseinhibition auf das lymphatische System zu erfassen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allsopp, RC, Vaziri, H, Patterson, C, Goldstein, S, Younglai, EV, Futcher, AB, Greider, CW and Harley, CB (1992). *Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A; **89**(21): 10114-10118
2. Avilion, AA, Piatyszek, MA, Gupta, J, Shay, JW, Bacchetti, S and Greider, CW (1996). *Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues*. Cancer Res; **56**(3): 645-50
3. Baerlocher, GM, Mak, J, Tien, T and Lansdorp, PM (2002). *Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: Tips and pitfalls*. Cytometry; **47**(2): 89-99
4. Baumann, P and Cech, TR (2001). *Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans*. Science; **292**(5519):1171-1175
5. Beltz, L, Moran, R, Elsayy, O, Sadler, J and Jurgenson, J (1999). *The effects of telomerase inhibitors on lymphocyte function*. Anticancer Res; **19**(4B): 3205-11
6. Blackburn, EH (2000). *Telomere states and cell fates*. Nature; **408**(6808): 53-6
7. Blackburn, EH and Gall, JG (1978). *A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena*. J Mol Biol; **120**:33-53
8. Bodnar, AG, Kim, NW, Effros, RB and Chiu, CP (1996). *Mechanism of telomerase induction during T cell activation*. Exp Cell Res; **228**(1): 58-64
9. Bodnar, AG, Ouellette, M, Frolkis, M, Holt, SE, Chiu, CP, Morin, GB, Harley, CB, Shay, JW, Lichtsteiner, S and Wright, WE (1998). *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. Science; **279**(5349): 349-352
10. Broccoli, D, Godley, LA, Donehower, LA, Varmus, HE and de Lange, T (1996). *Telomerase activation in mouse mammary tumors: lack of detectable telomere shortening and evidence for regulation of telomerase RNA with cell proliferation*. Mol Cell Biol; **16**(7): 3765-72
11. Broccoli, D, Smogorzewska, A, Chong, L and de Lange, T (1997). *Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2*. Nat Genet; **17**(2): 231-5
12. Broccoli, D, Young, JW and de Lange, T (1995). *Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A; **92**(20): 9082-6
13. Counter, CM, Botelho, FM, Wang, P, Harley, CB and Bacchetti, S (1994). *Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes*. J Virol; **68**(5): 3410-4

14. Counter, CM, Hahn, WC, Wei, W, Dickinson Caddle, S, Beijersbergen, RL, Lansdorp, PM, Sedivy, JM and Weinberg, RA (1998). *Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; **95**:14723-14728
15. Counter, CM, Meyerson, M, Eaton, EN, Ellisen, LW, Caddle, SD, Haber, DA and Weinberg, RA (1998). *Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase*. Oncogene; **16**(9): 1217-22
16. Damm, K, Hemmann, U, Garin-Chesa, P, Huel, N, Kauffmann, I, Priepke, H, Niestroj, C, Daiber, C, Enenkel, B, Guilliard, B, Lauritsch, I, Muller, E, Pascolo, E, Sauter, G, Pantic, M, Martens, UM, Wenz, C, Lingner, J, Kraut, N, Rettig, WJ and Schnapp, A (2001). *A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation*. Embo J; **20**(24): 6958-68
17. Dimri, G, Lee, X, Basile, G, Acosta, M, Scott, G, Roskelley, C, Medrano, E, Linskens, M, Rubelj, I and Pereira-Smith, O (1995). *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA; **92**(20): 9363-7
18. Ducray, C, Pommier, JP, Martins, L, Boussin, FD and Sabatier, L (1999). *Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process*. Oncogene; **18**(29): 4211-23
19. Effros, RB and Pawelec, G (1997). *Replicative senescence of T cells: does the Hayflick Limit lead to immune exhaustion?* Immunol Today; **18**(9): 450-4
20. Fagnoni, FF, Vescovini, R, Passeri, G, Bologna, G, Pedrazzoni, M, Lavagetto, G, Casti, A, Franceschi, C, Passeri, M and Sansoni, P (2000). *Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging*. Blood; **95**(9): 2860-8.
21. Feng, J, Funk, WD, Wang, SS, Weinrich, SL, Avilion, AA, Chiu, CP, Adams, RR, Chang, E, Allsopp, RC, Yu, J and et al. (1995). *The RNA component of human telomerase*. Science; **269**(5228): 1236-1241
22. Gravel, S, Larrivee, M, Labrecque, P and Wellinger, R (1998). *Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure*. Science; **280**(5364): 741-4
23. Greider, CW and Blackburn, EH (1985). *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*. Cell; **43**(2 Pt 1): 405-413
24. Greider, CW and Blackburn, EH (1996). *Telomeres, telomerase and cancer*. Sci Am; **274**(2): 92-7

-
25. Griffith, JD, Comeau, L, Rosenfield, S, Stansel, RM, Bianchi, A, Moss, H and de Lange, T (1999). *Mammalian telomeres end in a large duplex loop*. Cell; **97**(4): 503-14
 26. Hahn, WC, Counter, CM, Lundberg, AS, Beijersbergen, RL, Brooks, MW and Weinberg, RA (1999). *Creation of human tumour cells with defined genetic elements*. Nature; **400**(6743): 464-468
 27. Hahn, WC, Stewart, SA, Brooks, MW, York, SG, Eaton, E, Kurachi, A, Beijersbergen, RL, Knoll, JH, Meyerson, M and Weinberg, RA (1999). *Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells*. Nat Med; **5**(10): 1164-70
 28. Hanahan, D and Weinberg, RA (2000). *The hallmarks of cancer*. Cell; **100**(1): 57-70
 29. Harley, CB (2002). *Telomerase is not an oncogene*. Oncogene; **21**(4): 494-502
 30. Harley, CB, Futcher, AB and Greider, CW (1990). *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature; **345**(6274): 458-460
 31. Harley, CB, Vaziri, H, Counter, CM and Allsopp, RC (1992). *The telomere hypothesis of cellular aging*. Exp Gerontol; **27**(4): 375-82
 32. Hayflick, L and Moorhead, PS (1961). *The serial cultivation of human diploid strains*. Exp Cell Res; **25**:585-621
 33. Herbert, B, Pitts, AE, Baker, SI, Hamilton, SE, Wright, WE, Shay, JW and Corey, DR (1999). *Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A; **96**(25): 14276-81
 34. Herrera, E, Martinez, AC and Blasco, MA (2000). *Impaired germinal center reaction in mice with short telomeres*. Embo J; **19**(3): 472-81
 35. Herrera, E, Samper, E, Martin-Caballero, J, Flores, JM, Lee, HW and Blasco, MA (1999). *Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres*. Embo J; **18**(11): 2950-60
 36. Hiyama, K, Hirai, Y, Kyoizumi, S, Akiyama, M, Hiyama, E, Piatyszek, MA, Shay, JW, Ishioka, S and Yamakido, M (1995). *Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells*. J Immunol; **155**(8): 3711-5
 37. Honda, M, Mengesha, E, Albano, S, Nichols, WS, Wallace, DJ, Metzger, A, Klinenberg, JR and Linker-Israeli, M (2001). *Telomere shortening and decreased replicative potential, contrasted by continued proliferation of telomerase-positive CD8⁺CD28(lo) T cells in patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Immunol; **99**(2): 211-221
 38. Karlseder, J, Broccoli, D, Dai, Y, Hardy, S and de Lange, T (1999). *p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2*. Science; **283**(5406): 1321-5

-
39. Kass-Eisler, A and Greider, CW (2000). *Recombination in telomere length maintenance*. Trends Biochem Sci; **25**(4): 200-4
 40. Kayser, FH, Bienz, KA, Eckert, J and Zinkernagel, RM (1998). *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme; 65-78
 41. Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA (1997). *Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types*. Hum Mol Genet; **6**(12):2011-9.
 42. Kobayashi, H, Kimura, S, Aoki, N, Sato, K, Celis, E and Katagiri, M (2001). *Existence of MHC class I-restricted alloreactive CD4+T cells reacting with peptide transporter-deficient cells*. Immunogenetics; **53**(8): 626-33
 43. Kondo, S, Kondo, Y, Li, G, Silverman, RH and Cowell, JK (1998). *Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA*. Oncogene; **16**(25): 3323-30
 44. Lee, HW, Blasco, MA, Gottlieb, GJ, Horner, JW, 2nd, Greider, CW and DePinho, RA (1998). *Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs*. Nature; **392**(6676): 569-74
 45. Lee, SP, Thomas, WA, Blake, NW and Rickinson, AB (1996). *Transporter (TAP)-independent processing of a multiple membrane-spanning protein, the Epstein-Barr-virus latent membrane protein 2*. Eur J Immunol; **26**(8): 1875-83
 46. Levy, MZ, Allsopp, RC, Futcher, AB, Greider, CW and Harley, CB (1992). *Telomere end-replication problem and cell aging*. J Mol Biol; **225**(4): 951-60
 47. Liu, K, Hodes, RJ and Weng, NP (2001). *Telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation*. J Immunol; **166**(8): 4826-30
 48. Liu, K, Schoonmaker, MM, Levine, BL, June, CH, Hodes, RJ and Weng, NP (1999). *Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci; **96**(9): 5147-52
 49. Malaguarnera, L, Ferlito, L, Imbesi, RM, Gulizia, GS, Di Mauro, S, Maugeri, D, Malaguarnera, M and Messina, A (2001). *Immunosenescence: a review*. Arch Gerontol GeriatrM; **32**(1): 1-14.

-
50. Martens, U, Brass, V, Sedlacek, L, Pantic, M, Exner, C, Guo, Y, Engelhard, M, Lansdorp, P, Waller, C and Lange, W (2002). *Telomere maintenance in human B lymphocytes*. Br J Haematol; **119**(3): 810-8
 51. Martens, UM, Brass, V, Glaser, S, Engelhardt, M, Waller, CF, Lange, W, Schmoor, C, Poon, SSS and Lansdorp, PM (2000). *Telomere length measurements in hematopoietic cells using in situ hybridization techniques*. Biochemical Society Transactions; **28**(2): 245-250
 52. Martens, UM, Chavez, EA, Poon, SS, Schmoor, C and Lansdorp, PM (2000). *Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence*. Exp Cell Res; **256**(1): 291-299
 53. Martens, UM, Zijlmans, JM, Poon, SS, Dragowska, W, Yui, J, Chavez, EA, Ward, RK and Lansdorp, PM (1998). *Short telomeres on human chromosome 17p*. Nat Genet; **18**(1): 76-80
 54. Maser, RS and DePinho, RA (2002). *Connecting Chromosomes, Crisis, and Cancer*. Science; **297**(5581): 565-569
 55. McClintock, B (1941). *The stability of broken ends of chromosomes of Zea mays*. Genetics; **26**:234-282
 56. McEachern, MJ and Blackburn, EH (1996). *Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in Kluyveromyces lactis lacking telomerase*. Genes Dev; **10**(14): 1822-34
 57. Meyerson, M, Counter, CM, Eaton, EN, Ellisen, LW, Steiner, P, Caddle, SD, Ziaugra, L, Beijersbergen, RL, Davidoff, MJ, Liu, Q, Bacchetti, S, Haber, DA and Weinberg, RA (1997). *hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization*. Cell; **90**(4): 785-95
 58. Miller, RA (1996). *The aging immune system: primer and prospectus*. Science; **273**(5271): 70-4.
 59. Mitchell, JR, Wood, E and Collins, K (1999). *A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita*. Nature; **402**(6761): 551-5
 60. Monteiro, J, Batliwalla, F, Ostrer, H and Gregersen, PK (1996). *Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28+CD8+ counterparts*. J Immunol; **156**(10): 3587-90
 61. Muller, HJ (1938). *The remaking of chromosomes*. The Collecting Net; **13**:181-195

-
62. Nakamura, TM, Morin, GB, Chapman, KB, Weinrich, SL, Andrews, WH, Lingner, J, Harley, CB and Cech, TR (1997). *Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human*. Science; **277**(5328): 955-959
 63. Nugent, CI and Lundblad, V (1998). *The telomerase reverse transcriptase: components and regulation*. Genes & Development; **12**:1073-1085
 64. Olovnikov, AM (1971). *Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides*. Dokl Akad Nauk SSSR; **201**(6): 1496-9
 65. Olovnikov, AM (1973). *A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon*. J Theor Biol; **41**(1): 181-90
 66. Pan, C, Xue, BH, Ellis, TM, Peace, DJ and Diaz, MO (1997). *Changes in telomerase activity and telomere length during human T lymphocyte senescence*. Exp Cell Res; **231**(2): 346-53
 67. Pascolo, E, Wenz, C, Lingner, J, Huel, N, Priepke, H, Kauffmann, I, Garin-Chesa, P, Rettig, WJ, Damm, K and Schnapp, A (2002). *Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate*. J Biol Chem; **277**(18): 15566-72
 68. Plunkett, FJ, Soares, MV, Annels, N, Hislop, A, Ivory, K, Lowdell, M, Salmon, M, Rickinson, A and Akbar, AN (2001). *The flow cytometric analysis of telomere length in antigen-specific CD8+ T cells during acute Epstein-Barr virus infection*. Blood; **97**(3): 700-707.
 69. Regner, M, Claesson, M, Bregenholt, S and Ropke, M (1996). *An improved method for the detection of peptide-induced upregulation of HLA-A2 molecules on TAP-deficient T2 cells*. Exp Clin Immunogenet; **13**(1): 30-5
 70. Remes, K, Norrback, K, Rosenquist, R, Mehle, C, Lindh, J and Roos, G (2000). *Telomere length and telomerase activity in malignant lymphomas at diagnosis and relapse*. Br J Cancer; **82**(3): 601-7
 71. Röth, A, Yssel, H, Pene, J, Chavez, EA, Schertzer, M, Lansdorp, PM, Spits, H, Luiten, RM (2003). *Telomerase levels control the lifespan of human T lymphocytes*. Blood; **102**:849-857
 72. Rufer, N, Brummendorf, TH, Kolvraa, S, Bischoff, C, Christensen, K, Wadsworth, L, Schulzer, M and Lansdorp, PM (1999). *Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood*. J Exp Med; **190**(2): 157-67

-
73. Rufer, N, Dragowska, W, Thornbury, G, Roosnek, E and Lansdorp, PM (1998). *Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry*. Nat Biotechnol; **16**(8): 743-747
 74. Rufer, N, Migliaccio, M, Antonchuk, J, Humphries, RK, Roosnek, E and Lansdorp, PM (2001). *Transfer of the human telomerase reverse transcriptase (TERT) gene into T lymphocytes results in extension of replicative potential*. Blood; **98**(3): 597-603
 75. Sharma, S, Raymond, E, Soda, H, Sun, D, Hilsenbeck, SG, Sharma, A, Izbicka, E, Windle, B and Von Hoff, DD (1997). *Preclinical and clinical strategies for development of telomerase and telomere inhibitors*. Ann Oncol; **8**(11): 1063-74
 76. Shay, JW (1999). *At the end of the millennium, a view of the end*. Nat Genet; **23**(4): 382-3
 77. Smith, JR and Pereira-Smith, OM (1996). *Replicative Senescence: Implications for in Vivo Aging and Tumor Suppression*. Science; **273**:63-67
 78. Smith, S, Giriati, I, Schmitt, A and de Lange, T (1998). *Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres*. Science; **282**(5393): 1484-7
 79. Smogorzewska, A, van Steensel, B, Bianchi, A, Oelmann, S, Schaefer, MR, Schnapp, G and de Lange, T (2000). *Control of human telomere length by TRF1 and TRF2*. Mol Cell Biol; **20**(5): 1659-68
 80. Son, NH, Murray, S, Yanovski, J, Hodes, RJ and Weng, N-P (2000). *Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity for telomerase expression in human T and B lymphocytes with age*. J Immunol; **165**:1191-1196
 81. Strahl, C and Blackburn, EH (1996). *Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines*. Mol Cell Biol; **16**(1): 53-65
 82. Urquidi, V, Tarin, D and Goodison, S (2000). *Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis*. Ann Rev Med; **51**:65-79
 83. van Steensel, B and de Lange, T (1997). *Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1*. Nature; **385**(6618): 740-3
 84. van Steensel, B, Smogorzewska, A and de Lange, T (1998). *TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions*. Cell; **92**(3): 401-13
 85. Vaziri, H, Dragowska, W, Allsopp, RC, Thomas, TE, Harley, CB and Lansdorp, PM (1994). *Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age*. Proc Natl Acad Sci U S A; **91**(21): 9857-60

-
86. Vaziri, H, Schachter, F, Uchida, I, Wei, L, Zhu, X, Effros, R, Cohen, D and Harley, CB (1993). *Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes*. Am J Hum Genet; **52**(4): 661-7
 87. Vaziri, H, West, MD, Allsopp, RC, Davison, TS, Wu, YS, Arrowsmith, CH, Poirier, GG and Benchimol, S (1997). *ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase*. Embo J; **16**(19): 6018-33
 88. Vulliamy, T, Marrone, A, Goldman, F, Dearlove, A, Bessler, M, Mason, PJ and Dokal, I (2001). *The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita*. Nature; **413**(6854): 432-5.
 89. Watson, JD (1972). *Origin of concatemeric T7 DNA*. Nat New Biol; **239**(94): 197-201
 90. Weng, N, Levine, BL, June, CH and Hodes, RJ (1997). *Regulation of telomerase RNA template expression in human T lymphocyte development and activation*. J Immunol; **158**(7): 3215-20
 91. Weng, NP, Granger, L and Hodes, RJ (1997). *Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A; **94**(20): 10827-32
 92. Weng, NP, Hathcock, KS and Hodes, RJ (1998). *Regulation of telomere length and telomerase in T and B cells: a mechanism for maintaining replicative potential*. Immunity; **9**(2): 151-7
 93. Weng, NP, Levine, BL, June, CH and Hodes, RJ (1995). *Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential*. Proc Natl Acad Sci U S A; **92**(24): 11091-4
 94. Weng, NP, Palmer, LD, Levine, BL, Lane, HC, June, CH and Hodes, RJ (1997). *Tales of tails: regulation of telomere length and telomerase activity during lymphocyte development, differentiation, activation, and aging*. Immunol Rev; **160**:43-54
 95. Wolthers, KC, Bea, G, Wisman, A, Otto, SA, de Roda Husman, AM, Schaft, N, de Wolf, F, Goudsmit, J, Coutinho, RA, van der Zee, AG, Meyaard, L and Miedema, F (1996). *T cell telomere length in HIV-1 infection: no evidence for increased CD4+ T cell turnover*. Science; **274**(5292): 1543-7
 96. Wolthers, KC, Otto, SA, Wisman, GB, Fleury, S, Reiss, P, ten Kate, RW, van der Zee, AG and Miedema, F (1999). *Normal T-cell telomerase activity and upregulation in human immunodeficiency virus-1 infection*. Blood; **93**(3): 1011-9

97. Zhang, X, Mar, V, Zhou, W, Harrington, L and Robinson, MO (1999). *Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells*. *Genes Dev*; **13**(18): 2388-99
98. Zhu, J, Wang, H, Bishop, JM and Blackburn, EH (1999). *Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **96**(7): 3723-8

VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALT	alternative lengthening of telomeres
BC	buffy coat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	cluster of differentiation
CPDL	cumulative population doubling level
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E I,II,III	T2-stimulierte T-Zell-Kultur
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
FACS	fluorescence activated cell scan
FI	Fluoreszenzintensität
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinthiocyanat
Fl-3	Fluoreszenzkanal 3
FSC	Forward Scatter
Gy	Gray
HLA	human leucocyte antigen
HRP	Meerrettichperoxidase
hTER	human Telomerase RNA
hTERT	human Telomerase Reverse Transkriptase
IC ₅₀	Konzentration der halbmaximalen Wirkung
IK	Inhibitionskultur
IL-2	Interleukin 2
PBL	periphere Blutleukozyten
pd	population doubling
PE	Phytoerythrocin
PI	Propidiumiodid
PNA	Peptido-Nukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
kb	Kilobasenpaare
k.B.	keine Behandlung

M1, M2	mortality stage 1,2
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MNC	Mononukleäre Zelle
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
NK-cells	natural killer-cells
nM	Nano-Molar
nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RTA	Relative Telomeraseaktivität
SSC	Sideward Scatter
TCR	T-Zell-Rezeptor
TFU	telomere fluorescence units
TFU ^{trf}	TFU nach Kalibration mit southern blot
TRAP	telomere repeat amplification protocol
TRF	telomere restriction fragment
TRF-1,TRF-2	telomere repeat binding factor 1,2