

**Telomerverkürzung in der humanen Leberzirrhose
sowie Einfluss von Telomerverkürzung im Rahmen chronischer
Leberschädigung auf das Überleben, die Organhomeostase und die
Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen im Mausmodell**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.biol. Stefanie U. Wiemann
geboren am 21.03.1975 in Kaiserslautern

2004

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Koreferent: P.D. Dr. K.L. Rudolph

Tag der Promotion: 02.August 2004

ZUSAMMENFASSUNG

Telomere haben als physikalische Enden eukaryotischer Chromosomen die Aufgabe, Fusionen und Chromosomale Instabilität zu verhindern, und damit die Proliferationsfähigkeit und das Überleben von Zellen zu erhalten. Auf Grund fehlender Expression von Telomerase und wegen des End-replikations-Problems der DNA-Polymerase verkürzen sich die Telomere menschlicher Zellen mit jeder Zellteilung. Kritische Telomerverkürzung führt zur Induktion von Seneszenz und wurde mit regenerativer Erschöpfung in der Alterung sowie mit chronischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Des weiteren hat Telomerverkürzung eine ambivalente Rolle im Rahmen der Tumorgenese: Einerseits führt die durch Telomerverkürzung induzierte chromosomale Instabilität zur Tumorentstehung, andererseits ist Telomerstabilisierung z.B. durch Telomerase-Reaktivierung ein notwendiger Schritt für den Tumorprogress.

Die vorliegende Arbeit konnte für die humane Leberzirrhose eine Hepatozyten-spezifische Telomerverkürzung zeigen, die mit dem Progress der Leberzirrhose korrelierte und mit kritisch kurzen Telomeren einherging. Im Stadium der Leberzirrhose waren die Telomere von infiltrierenden Lymphozyten und Stellatzellen signifikant länger als die der Hepatozyten. Diese Ergebnisse indizieren, dass Telomerverkürzung und Seneszenz von Hepatozyten eine ursächliche Rolle bei der Entstehung der humanen Leberzirrhose haben könnte.

Im Mausmodell chronischer Leberschädigung verringerte Telomerverkürzung signifikant das Überleben der Tiere, obwohl gleichzeitig die Entstehung von HCC signifikant gehemmt war. Telomerverkürzung verursachte eine erhöhte Rate an Aneuploidie, verhinderte aber die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen. Das verminderte Überleben in Mäusen mit kurzen Telomeren korrelierte mit einem gestörten Gleichgewicht aus Leberzellproliferation zu Leberzellapoptose und damit mit einer gestörten Organ-Homeostase. Die Arbeiten zeigten, dass im Rahmen chronischer Leberschädigung der negative Effekt von Telomerverkürzung auf die Organhomeostase und das Überleben den positiven Effekt von Telomerverkürzung auf Tumorsuppression überwiegen kann.

Telomerverkürzung im Rahmen chronischer Leberschädigung (CCl₄) korrelierte mit einer spezifischen Genexpressionsänderung u.a. von mitotischen Genen, die durch Telomerase-Reaktivierung normalisiert wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sprechen für einen möglichen Nutzen von Telomer-stabilisierenden Therapien für chronische geschädigte Leber in der regenerativen Medizin.

ABSTRACT

Telomeres play an important role in capping of eucaryotic chromosomes to avoid chromosomal fusions, chromosomal instability and to maintain regenerative capacity of cells. Due to the end replication-problem of DNA-polymerase and due to lack of telomerase in most of the human tissues, telomeres of human cells shorten with every cell cycle. Telomere shortening leads to cellular senescence and has been linked to regenerative exhaustion during aging and chronic diseases. Telomere shortening plays a diverse role in tumor development and tumor progression: While telomere shortening induces tumor initiation and chromosomal instability, tumor progression is inhibited and telomere stabilization e.g. by telomerase reactivation is necessary for tumor progression.

Using Q-FISH we could show that human liver cirrhosis is linked to hepatocyte-specific telomere shortening, which occurs more pronounced with progression of the cirrhosis stage and involves critically short telomeres. In cirrhotic samples infiltrating lymphocytes and activated stellate cells showed significant longer telomeres than hepatocytes. This gives evidence that fibrotic scarring at the cirrhosis stage is a consequence of hepatocyte-specific telomere shortening combined with lost of regenerative capacity of the hepatocytes. Besides it confirms the telomer hypothesis of liver cirrhosis.

In the mTERC^{-/-} HBsAg⁺ mouse model we investigated the impact of telomere shortening on development and progression of HCC. G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ mice showed a significant reduced survival despite a strong inhibition of HCC formation compared to mTERC^{+/+} HBsAg⁺ mice. Telomere shortening in G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ mice increased the rate of aneuploidy but at the same time reduced the development of tumors. Decreased survival correlated with impaired liver cell regeneration, increased liver cell apoptosis and therefore with disturbed organ homeostasis. The results indicate that in the model of chronic liver damage the negative effects of telomere shortening regarding liver homeostasis and survival are dominant over the positive effect on tumor suppression. Telomere shortening during experimental liver cirrhosis (CCl₄) correlated with specific gene expression changes including genes involved in regulation of mitotic progression. The results of this work indicate that telomere stabilizing-therapies could be a useful approach in regenerative medicine.

Schlagworte:

Telomerverkürzung

Leber

hepatozelluläres Karzinom

Key words:

telomere shortenig

liver

hepatocellular carcinoma

INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	EINLEITUNG.....	3
2.1	Telomere.....	3
2.2	Telomerbindende Proteine und ihre Funktion	4
2.3	Telomerase	5
2.4	Das DNA-End-Replikations Problem und zelluläre Seneszenz.....	7
2.5	Telomerverkürzung während Alterung und chronischer Schädigung	8
2.6	Chronische Leberschädigung und Leberzirrhose	10
2.7	Das hepatozelluläre Karzinom (HCC).....	11
2.8	Das mTERC^{-/-} Mausmodell der Telomerverkürzung	12
2.9	Mausmodelle der chronischen Leberschädigung und HCC Entwicklung.....	13
2.10	Zielsetzung der Arbeit.....	14
3	MATERIAL & METHODEN	15
3.1	Material	15
3.1.1	Chemikalien	15
3.1.2	Enzyme.....	16
3.1.3	Antikörper	17
3.1.4	Molekulargewichtstandards.....	17
3.1.5	Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide	18
3.1.6	Rekombinante Adenoviren.....	18
3.1.7	Kits	18
3.1.8	Oligonukleotide.....	18
3.1.9	Puffer, Lösungen und Medien	19
3.1.10	Sonstige Materialien und Geräte	22
3.1.11	Humanes Lebergewebe	23
3.1.12	Versuchstiere.....	23

3.2	Molekulargenetische Methoden	24
3.2.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	24
3.2.2	Agarosegelelektrophorese	24
3.2.3	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	24
3.2.4	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	25
3.2.5	Vermehrung transformierter Bakterien	26
3.2.6	Mini-Plasmidpräparation	26
3.2.7	Maxi-Plasmidpräparation	26
3.2.8	Konservierung von Bakterienstämmen	27
3.2.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
3.2.10	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	27
3.2.11	Präzipitation von Nukleinsäuren	28
3.2.12	Aufreinigung von DNA	28
3.2.13	Ligation von DNA-Fragmenten	29
3.2.14	Phenol-Chloroform-Isolierung genomischer DNA	29
3.2.15	Genotypisierung mittels PCR	30
3.2.16	Isolierung von RNA und denaturierendes RNA-Agarosegel	31
3.2.17	Micro-Array Hybridisierung und Analyse	32
3.2.18	Herstellung von cDNA (rt-PCR)	32
3.2.19	Quantitative Real Time PCR	33
3.2.20	DIG-Markierung der ayk RNA-Sonden	33
3.2.21	Whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung	34
3.3	Virale Arbeitstechniken	34
3.3.1	Vermehrung und Präparation von Adenoviren	34
3.3.2	Titerbestimmung der Adenoviren	35
3.3.3	Dialyse der Adenoviren	36
3.4	Tierexperimentelle Methoden	36
3.4.1	Injektionen	36
3.4.2	Töten der Tiere und Gewebeentnahme	36
3.5	Histologische Methoden	37
3.5.1	H&E-Färbung	37
3.5.2	Herstellung von Gefrierschnitten und Fixierung	37
3.5.3	Apoptosenachweis durch TUNEL-Assay im histologischen Schnitt	37
3.5.4	DAPI-Färbung	38
3.5.5	Immunhistochemischer Nachweis von PCNA, Albumin, HBsAg bzw. pHiston3	38
3.5.6	Nukleare β -Catenin Färbung	39
3.5.7	Feulgen-Färbung	40
3.5.8	Telomerlängenbestimmung mittels Q-FISH	41

4	ERGEBNISSE.....	42
4.1	Telomerverkürzung in der humanen Leberzirrhose	42
4.1.1	Hepatozyten in Leberzirrhosegewebe haben signifikant kürzere Telomere als Hepatozyten in nicht-zirrhotischer Kontrollleber	42
4.1.2	Die Telomerverkürzung der Hepatozyten ist abhängig vom Stadium der Leberzirrhose.....	44
4.2	Telomerverkürzung im mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mausmodell.....	45
4.2.1	Die Kombination von verkürzten Telomeren und chronischer Leberschädigung führt im Mausmodell zu verringertem Überleben	46
4.2.2	G3mTERC ^{-/-} HBsAg ⁺ Mäuse entwickeln verstärkt Aneuploidie, aber weniger Foci und HCC als mTERC ^{+/+} HBsAg ⁺ Mäuse.....	49
4.2.3	Ähnliches Ausmaß an Hepatitis in mTERC ^{+/+} HBsAg ⁺ und G3mTERC ^{-/-} HBsAg ⁺ Mäusen..	52
4.2.4	Vermindertes Wachstum HBsAg-negativer Regenerate in G3mTERC ^{-/-} HBsAg ⁺ Mäusen im Vergleich zu mTERC ^{+/+} HBsAg ⁺ Mäusen.....	53
4.2.5	G3mTERC ^{-/-} HBsAg ⁺ Mäuse haben im Vergleich zu mTERC ^{+/+} HBsAg ⁺ Mäusen ein verringerten Zellproliferations : Zellapoptose Verhältnis.....	55
4.2.6	Ähnliches prozentuales Lebergewicht bei vermindertem Gesamtkörpergewicht in G3mTERC ^{-/-} HBsAg ⁺ Mäusen im Vergleich zu mTERC ^{+/+} HBsAg ⁺ Mäusen.....	57
4.2.7	Erhöhte Leberzellhypertrophie in den G3mTERC ^{-/-} HBsAg ⁺ Mäusen im Vergleich zu den mTERC ^{+/+} HBsAg ⁺ Tieren	58
4.3	Genexpressions-Änderung in Abhängigkeit von Telomerverkürzung im Mausmodell chronischer Leberschädigung	60
4.3.1	Telomerverkürzung verursacht differenzierte Genexpressions-Änderungen im CCl ₄ Modell akuter Leberschädigung.....	60
4.3.2	Bestätigung der Expressionsänderungen von ayk-1 und cdc20 mittels RT-PCR	62
4.3.3	Überexpression von ayk-1 in Mausembryonen mit kurzen Telomeren	63
5.	DISKUSSION	65
5.1	Telomerverkürzung in der humanen Leberzirrhose	65
5.2	Einfluss von Telomerverkürzung auf das Überleben im HBsAg Mausmodell	66
5.3	Einfluss von Telomerverkürzung auf Tumorentwicklung und -progress im HBsAg Mausmodell.....	68
5.4	Genexpressionsänderungen in Abhängigkeit von Telomerverkürzung und Telomerase-Reaktivierung.....	69
5.5	Telomerase als Therapie?	70

6. LITERATURVERZEICHNIS	72
7. DANKSAGUNG	84
8. LEBENSLAUF	85

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

β-gal	β-Galaktosidase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
CaCl ₂	Calciumchlorid
CIS	Chromosomale Instabilität
cDNA	komplementäre DNA
CPE	zytopathischer Effekt
CsCl ₂	Cäsiumchlorid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
FCS	Fetal Calf Serum
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
H&E	Hämalaun und Eosin
HBV	Hepatitis B Virus
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HCl	Salzsäure
HZ	Hepatozyten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
hum.	human
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Kaliumhexacyanoferrat (II)
K ₄ [Fe(CN) ₆]	Kaliumhexacyanoferrat (III)
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton

LB	Luria Broth
MCS	Multiple Cloning Site
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MOI	Multiplicity of Infection = Anzahl infektiöser Partikel/ Zelle
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NEB	New England Biolabs
O.D.	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline = phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PFU	Plaque Forming Units
rpm	Rotations per Minute = Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfate = Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SZ	Stellatzellen
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TERC	Telomerase RNA Komponente
TERT	Telomerase reverse Transkriptase
TFI	Telomer Fluoreszenz Intensität
TRF1 und TRF2	TTAGGG repeat binding factor 1 und 2
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick labeling
U	Units = Mengenangabe bei Enzymen
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Weight/Volume = Masse/Volumen
X-gal	5-Bromo 4-chloro 3-indolyl-Galactosid

2 EINLEITUNG

2.1 Telomere

Als Telomere werden Protein-DNA Komplexe an den linearen Chromosomenenden von eukaryotischen Zellen bezeichnet (Moyzis *et al.* 1988; Blackburn 1991). Ihre Hauptfunktion besteht darin, die offenen DNA-Enden zu schützen und von Doppelstrangbrüchen innerhalb der Chromosomen zu unterscheiden. Dadurch verhindern die Telomere die Aktivierung von DNA-Reperaturmechanismen, die Bildung Chromosomaler Fusionen sowie von Chromosomaler Instabilität (CIS) (Counter *et al.* 1992; Vaziri & Benchimol 1996; Chin *et al.* 1999). Bereits 1938 bzw. 1942 entdeckten Forscher, dass die Enden der linearen Chromosomen sich anders als Doppelstrangbrüche verhielten und nicht miteinander fusionierten (Muller 1938; McClintock 1942). Heute weiß man, dass Telomere - von griechisch telos=Ende - aus einfachen repetitiven DNA-Elementen bestehen, deren Sequenz hochkonserviert ist und bei Menschen als (TTAGGG)_n vorliegt (Moyzis *et al.* 1988).

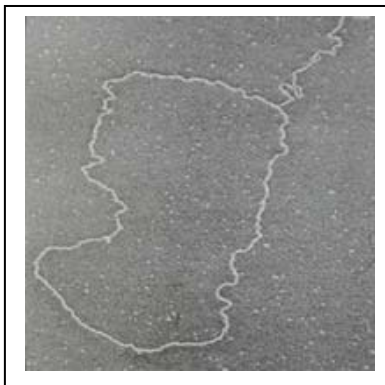


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Darstellung des Telomer T-Loops. In dieser geschlossenen dreidimensionalen Form erfüllen die Telomere in der Zelle ihre abschirmende Funktion am Chromosomenende (Griffith *et al.* 1999).

Neben doppelsträngiger DNA bilden Telomere einen G-reichen, etwa 200bp langen 3' Überhang (Makarov *et al.* 1997; Wright *et al.* 1997). Telomere werden nicht wie die restliche chromosomale DNA in Nukleosomen verpackt (Tommerup *et al.* 1994), sondern liegen zusammen mit sequenzspezifischen Telomerbindeproteinen vor, die die Telomere stabilisieren (van Steensel & de Lange 1997; van Steensel *et al.* 1998). Zusammen mit weiteren assoziierenden Proteinen wird der 3' Überhang Lasso-artig in die doppelsträngige Telomersequenz zum sogenannten T-Loop eingeführt und verankert (Griffith *et al.* 1999; Munoz-Jordan *et al.* 2001).

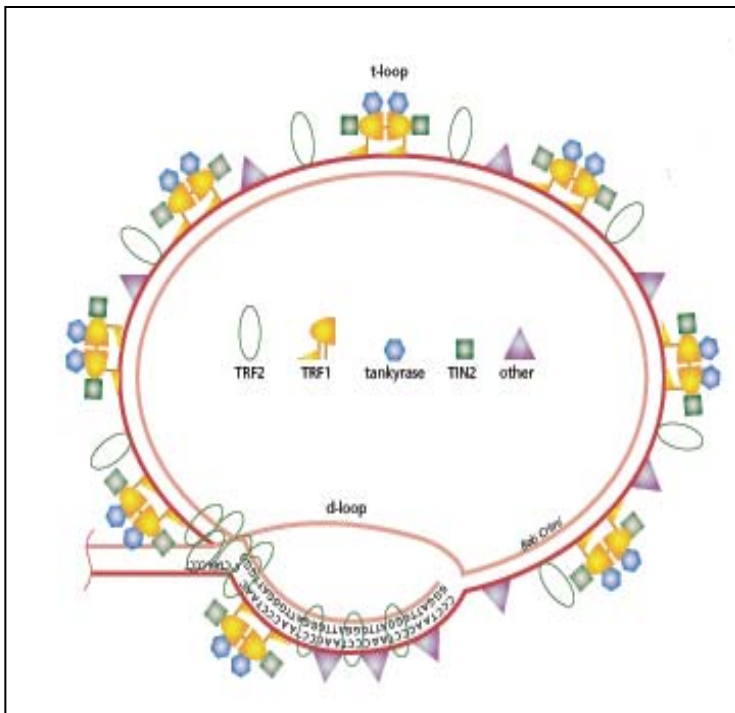


Abbildung 2: Schematische Darstellung der T-Loop/D-Loop Struktur mit Telomerbindeproteinen. Der 3' Überhang des Telomerendes wird vermittelt durch TRF2 zur T-Loop/D-Loop Struktur in die doppelsträngige Telomersequenz eingefädelt und verankert (Shay 1999).

Diese geschlossene tertiäre Form (s. Abb. 1) des Komplexes wird mit der Schutzfunktion der Chromosomen in Verbindung gebracht, während eine offene Form vermutlich notwendig ist, um dem DNA-Replikationskomplex während der S-Phase Zugang zu den Telomeren zu gewähren. Der Wechsel zwischen beiden Formen ist demnach vermutlich Zellzyklus abhängig.

2.2 Telomerbindende Proteine und ihre Funktion

Telomerbindende Proteine stabilisieren die Telomerstruktur und regulieren die Telomer-Homeostase. Vornehmlich TRF1, TRF2 und deren assoziierte Proteine sind für die Ausbildung und Stabilisierung des T-Loops sowie der Kontrolle der Telomerase-Aktivität verantwortlich (Griffith *et al.* 1999; Blackburn 2001; Karlseder *et al.* 2003; Smogorzewska & De Lange 2004). TRF1 und TRF2 binden über Myb-DNA-Erkennungsmotive sequenzspezifisch an doppelsträngige Telomer-DNA (Broccoli *et al.* 1997). Während TRF2 den T-Loop stabilisiert (van Steensel *et al.* 1998), verhindert an die Telomersequenz gebundenes TRF1 bei ausreichender Telomerlänge in cis vermutlich durch Blockierung der Telomerase-Bindung am Telomer die Telomerverlängerung (Ancelin *et al.* 2002). Pot1 bindet vermittelt durch TRF1 an den G-reichen 3' Telomerüberhang, stabilisiert so zum einen den Bereich, in dem der T-Loop inseriert, den D-Loop, und inhibiert vermutlich

damit den Zugang der Telomerase zum freien 3' Telomerende (Loayza & De Lange 2003). Tankyrase inhibiert TRF1 und TRF2 und erlaubt durch die Auflösung des T-Loops Enzymen wie Telomerase den Zugang zu den Telomeren (Broccoli *et al.* 1997). TIN2 hingegen stabilisiert die Bindung von TRF1 an die Telomere und schützt TRF1 vor Modifikation durch Tankyrase (Kim *et al.* 1999).

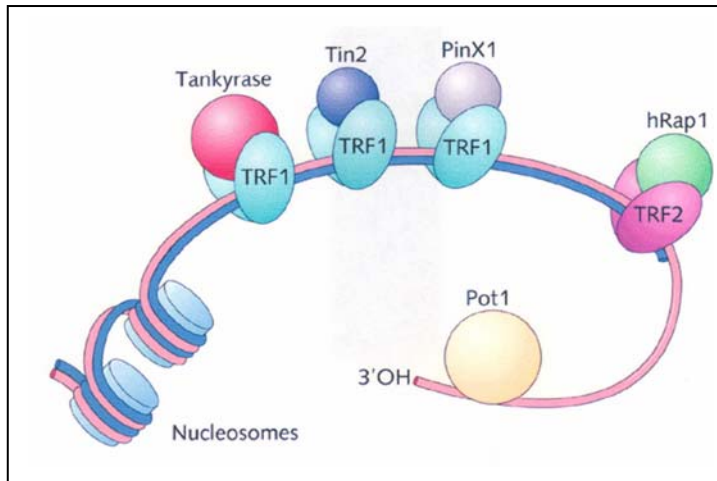


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Protein-DNA-Komplex. Neben TRF1 und TRF2 binden weitere assoziierte Proteine an den Telomeren (Rhodes *et al.* 2002).

Assoziierende Proteine wie z.B. Rap1p interagieren mit TRF2 und integrieren in den T-Loop Komplex (Li *et al.* 2000). Mit TRF2 kooperiert zudem der DNA-Schädigungskomplex RAD50/MRE11/NBS1 (Nugent & Lundblad 1998), wobei der MRE11-Komplex normalerweise innerhalb der DNA-Reperatur mittels homologer Rekombination eine Rolle spielt (de Jager *et al.* 2001) und damit eine Möglichkeit darstellt, kritisch kurze Telomere zu detektieren und Telomerase zu aktivieren. Es wird vermutet, dass der MRE11-Komplex zusätzlich eine stabilisierende Funktion an der Insertionsstelle des 3' Telomerüberhangs in die doppelsträngige Telomersequenz inne hat.

2.3 Telomerase

Telomerase ist ein Enzymkomplex, der Telomersequenz *de novo* synthetisiert (Blackburn 1992). 1985 wurde dieses Enzym im Einzeller *Tetrahymena thermophila* entdeckt (Greider & Blackburn 1985). Das Telomerase Holoenzym besteht aus zwei Untereinheiten: der Telomerase RNA-Komponente (TERC), die als Matritze der zu synthetisierenden Telomersequenz dient (Greider & Blackburn 1989), sowie einer reversen Transkriptase (TERT), die die katalytische Enzymeinheit bildet (Greider & Blackburn 1985; Morin 1989; Feng *et al.* 1995; Meyerson *et al.* 1997; Nugent & Lundblad 1998). Das humane

Holoenzym benötigt desweiteren die Faktoren EST1 und Dyskerin (Lundblad 2003; Mitchell et al. 1999), um die Telomerasekomponenten *in vivo* zu einem funktionellen Enzym zusammenzulagern. Der G-reiche 3' Überhang des Telomer-Endes wird von dem Telomerasekomplex erkannt und von ihm ausgehend wird durch die reverse Transkriptase in 5' → 3' Richtung mit der RNA-Komponente als Matrix einzelsträngige Telomersequenz neu synthetisiert. Der Telomer-Doppelstrang wird nachfolgend von DNA-Polymerasen vervollständigt.

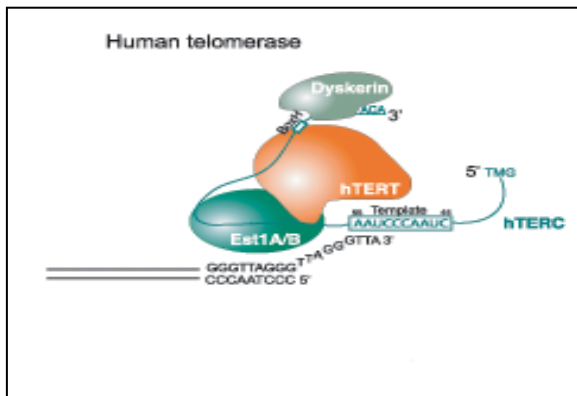


Abbildung 4: Die humane Telomerase. Vermittelt durch Dyskerin und Est1 werden die Untereinheiten hTERT und hTERC zu einem funktionellen Enzym zusammenlagert, das Telomere de novo synthetisieren kann. Die RNA-Komponente bildet dabei die Matrize für die enzymatische Untereinheit (Smogorzewska & deLange 2004).

In Zellen mit aktiver Telomerase sind Telomere einem ständig kontrolliertem Prozess aus Abbau und Neusynthese unterworfen, der die Telomerlängen-Homeostase aufrecht erhält und die Funktionalität der Telomere bewahrt (Blackburn 1997). Der Zugang der Telomerase an das Telomer wird dabei, wie bereits erwähnt, durch Telomerbindende Proteine beeinflusst. Im Menschen wird außerdem durch Kontrolle der TERT Expression die Bildung einer funktionellen Telomerase streng reguliert: Telomerase ist nur während der Embryogenese sowie postnatal in Keimbahn-, Stamm- und Progenitorzellen und in aktivierten Lymphocyten aktiv. In den meisten somatischen Geweben im Menschen fehlt jedoch Telomerase-Aktivität (Chiu *et al.* 1996; Wright *et al.* 1996; Weng *et al.* 1997; Maini *et al.* 1999; Norrback *et al.* 2001; Martens *et al.* 2002) durch die fehlende Expression von hTERT. Verschiedene Transkriptionsfaktoren wurden inzwischen identifiziert, welche die hTERT Expression steuern: Aktivierende Faktoren sind das an der E-Box im hTERT-Promotor bindende Onkoprotein c-Myc (Takakura *et al.* 1999) und der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor Sp1 (Kyo *et al.* 2000). Mögliche Repressoren sind das ebenfalls E-Box-bindende Mad1 (Gunes *et al.* 2000), die Tumorsuppressorgene p53 und WT1 (Lin & Elledge 2003) sowie der Zink-Finger Faktor MZF2 (Fujimoto *et al.* 2000). Im Gegensatz zu den meisten somatischen Geweben sind >80% der malignen Tumore des Menschen Telomerase-positiv (Satyanarayana *et al.* 2004). Ein in epithelialen

Tumorgewebe häufig amplifiziertes bzw. überexprimiertes Gen ist Aurora-A (auch *ayk-1*, BTAK, STK15, ARK1) (Tanner *et al.* 2000; Gritsko *et al.* 2003). In menschlichem Tumorgewebe verursachte Aurora-A die Überexpression des *c-myc* Gens, das hTERT Expression und damit Telomerase reaktiviert (Yang *et al.* 2004). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass Aurora-A durch die Phosphorylierung von p53 an Ser315 direkten Einfluss auf dessen Ubiquitinierung durch Mdm2 und die anschließende Degradierung von p53 hat und so einen wichtigen Repressor der hTERT Expression beeinflusst (Katayama *et al.* 2004). Erkenntnisse aus Tumorgewebe lassen damit auf die in normalem humanen Gewebe streng regulierte hTERT Expression schließen. Die postnatale Unterdrückung der Telomerase-Aktivität wird auch als ein potentieller Anti-Tumor Mechanismus interpretiert (Wright & Shay 2001).

2.4 Das DNA-End-Replikations Problem und zelluläre Seneszenz

Bei der Replikation von linearen Chromosomen ergibt sich eine Besonderheit: Die DNA-Polymerase synthetisiert DNA, beginnend bei kurzen RNA-Primern, immer in 5' → 3' Richtung. Am kodierenden 3' → 5' Strang wird somit kontinuierlich der neue 5' → 3' Strang in Laufrichtung der Replikationsgabel bis zum Erreichen einer neuen Replikationsgabel oder bis zum Ende des Chromosoms synthetisiert. Der 3' Strang dagegen wird diskontinuierlich in Gegenrichtung des Fortschreitens der Replikationsgabel gebildet. Immer wieder beginnend bei RNA-Primern werden kleine Segmente des neuen 5' Stranges, so genannte Okazaki-Fragmente, synthetisiert. Abschließend werden, nach Entfernen der RNA-Primer, die Okazaki-Fragmente durch DNA-Ligase miteinander verbunden.

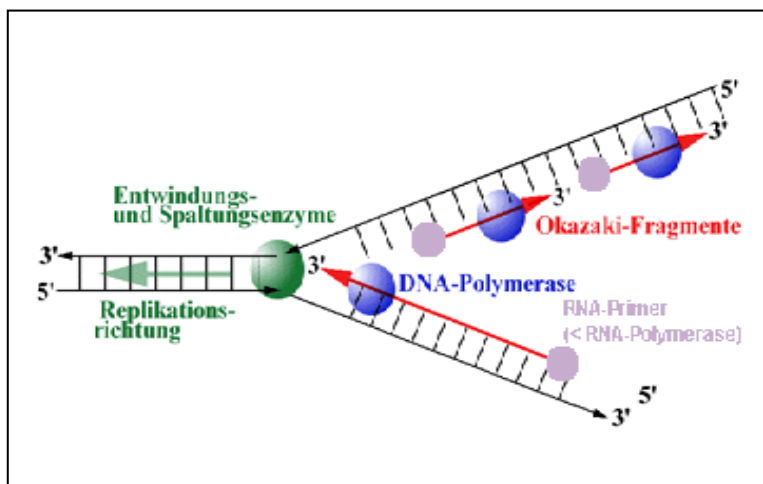


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Replikationsgabel. Während der 5' Strang kontinuierlich von der DNA-Polymerase synthetisiert wird, kann der 3' Strang nur diskontinuierlich in sogenannten Okazaki-Fragmenten gebildet werden. Nach Entfernen der für die DNA-Polymerase notwendigen RNA-Primer verkürzen sich jeweils die 5' Enden der Chromosomen.

Nach Entfernen des jeweils ersten RNA-Primers an den beiden neu synthetisierten 5' Enden der Chromosomen, ist die DNA-Polymerase jedoch dort nicht in der Lage, den DNA-Doppelstrang zu vervollständigen. Bereits 1973 postulierte Olovnikov auf Grund theoretischer Überlegungen, dass die Chromosomenenden sich mit jeder Zellteilung verkürzen müßten. Tatsächlich konnte später experimentell nachgewiesen werden, dass durch das End-Replikations-Problem der DNA-Polymerase die Chromosomen mit jeder Zellteilung etwa 50 bis 100bp verlieren (Hayflick 1965; Allsopp *et al.* 1995; Allsopp & Harley 1995), was etwa 10-15 TTAGGG Telomer-Elementen entspricht. Beim Menschen ergeben sich aus einer durchschnittlichen Telomerlänge von etwa 5-10kb damit 50 bis 70 mögliche Zellteilungen (Harley *et al.* 1990). Die Telomer-Hypothese besagt, dass kritisch kurze Telomere ihre Schutzfunktion verlieren und einen Zellzyklusarrest verursachen (Harley 1991). In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass menschliche Zellen *in vitro* bei Erreichen einer kritischen Telomerlänge in einen später als zelluläre Seneszenz bezeichneten Zustand übergehen, der gekennzeichnet ist durch Proliferationsverlust (Harley *et al.* 1990; Allsopp *et al.* 1992; Wright & Shay 1992; Vaziri *et al.* 1993). Die Anzahl an möglichen Zellteilungen war dabei direkt von der Telomerlänge der Anfangszellkultur abhängig (Allsopp *et al.* 1992). Es ist noch nicht abschließend geklärt, welche Signale kritisch kurzer Telomere die Zelle veranlaßt, in Seneszenz zu gehen, doch es ist bekannt, dass diese Signale den p53-abhängigen DNA-Schädigungs Signalweg (Chin *et al.* 1999; Sharpless & DePinho 2002) und den p16/RB-Signalweg beeinflussen (Kiyono *et al.* 1998). Man geht heute davon aus, dass funktionslose, kritisch verkürzte Telomere als DNA-Schaden wahrgenommen werden und eine DNA-Schädigungsantwort hervorrufen (Fagagna *et al.* 2003). Senescente menschliche Zellen arretieren vorwiegend im G1-Stadium des Zellzyklus (Pang & Chen 1994; Pignolo *et al.* 1998). In Mausmodellen ist gezeigt worden, dass Telomerverkürzung auch zu einem gestörten G2/M Progress führt und Apoptose auslöst (Rudolph *et al.* 2000). Die Erkenntnisse zur zellulären Seneszenz haben zu der Vermutungen geführt, dass Telomerverkürzung und Seneszenz auch die Regenerationsfähigkeit von Geweben und Organen während Alterung und bei chronischen Erkrankungen limitieren könnte.

2.5 Telomerverkürzung während Alterung und chronischer Schädigung

Durch die im Menschen größtenteils inaktive Telomerase, ergibt sich während des Alterungsprozesses in einer Vielzahl von Geweben Telomerverkürzung: In Hautfibro-

blasten (Allsopp & Harley 1995), Keratinozyten (Kang et al 2002), in peripheren Blutzellen (Satoh et al. 1996; Cawthon et al. 2003), in gastrointestinalen Epithelzellen (Furugori et al. 2000), Adrenokortikalen Zellen (Yang et al. 2001) im Kortex der Niere (Melk et al. 2000), in der Leber (Aikata et al. 2000; Takubo et al. 2000; Wiemann et al. 2002) sowie in der Milz (Takubo et al. 2002).

Während vor allem mitotisch aktive Organe von Telomerverkürzung betroffen sind, finden sich in inaktiven Organen wie Gehirn und Myocardium relativ stabile Telomerlängen während der Alterung (Takubo et al. 2002). Es gibt aber auch Telomerverkürzung in Geweben mitotisch schwach aktiver Organe, wie der Leber oder Niere. Eine mögliche Erklärung ist, dass nur eine mitotisch aktive Subpopulation von Zellen von der Telomerverkürzung betroffen ist, wie z.B. Hepatozyten in der chronisch geschädigten Leber. Im Menschen konnte für eine Reihe von chronischen Erkrankungen unterschiedlicher betroffener Organe eine erhöhte Telomerverkürzung gezeigt werden: Für Endothelzellen bei Atherosklerose (Samani et al. 2001), für die peripheren Blutzellen von Patienten unterschiedlicher Knochenmarkserkrankungen (Brummendorf et al. 2001; Vulliamy et al. 2001), für Hepatozyten in Patienten mit chronischen Lebererkrankungen und -zirrhose (Kitada et al. 1995; Urabe et al. 1996; Miura et al. 1997; Aikata et al. 2000; Wiemann et al. 2002) sowie für Kolonepithelzellen bei Patienten mit Colitis ulcerosa (Kinouchi et al. 1998).

Für die verstärkte Telomerverkürzung bei chronischen Erkrankungen werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert: Zum einen die Telomerase-Inhibierung durch Mutationen in den Enzym-Untereinheiten. Für Dyskeratosis congenita konnte z.B. eine 821bp Deletion am 3'Ende des hTERC Gens, das für die RNA Komponente der Telomerase kodiert, nachgewiesen werden (Vulliamy et al. 2001). Ein weiterer, u.a. in Zellkultur nachgewiesener Mechanismus ist Telomerverkürzung auf Grund von erhöhtem oxidativen Stress (Ren et al. 2001). Für eine große Anzahl von Erkrankungen spielt jedoch der durch die chronische Schädigung hervorgerufene erhöhte Zellumsatz eine Rolle: Bei chronischen Lebererkrankungen, Colitis ulcerosa oder HIV-Infektion verursacht die erhöhte Proliferation eine verstärkte Telomerverkürzung. In einzelnen Arbeiten konnte zudem eine Korrelation zwischen Telomerverkürzung und Voranschreiten der Erkrankung festgestellt werden (Ohashi et al. 1996; Engelhardt et al. 1997; Boulton et al. 1999; Brummendorf et al. 2000; Li et al. 2003).

2.6 Chronische Leberschädigung und Leberzirrhose

Bei der Leber handelt es sich um ein lebensnotwendiges Organ mit vielfältigen Aufgaben: Es ist das zentrale Organ der Synthetisierung, des Abbaus und der Speicherung einer Vielzahl von Substanzen sowie der Bereitstellung von aus der Nahrung aufgenommener Nährstoffe. Die funktionellen Leberzellen, die Hepatozyten, spielen eine zentrale Rolle im Kohlenstoff- und Fettstoffwechsel. Gleichzeitig werden über die Leber Stoffwechselprodukte in den Darm abgeben und ausgeschieden. Erkrankungen der Leber und Störungen der Leberfunktion können damit lebensbedrohlich sein.

Die Leberzirrhose ist ein Beispiel einer durch chronische Schädigung hervorgerufenen Erkrankung. Unabhängig von der Ethilogie der Schädigung stellt sie das Endstadium nach meist jahrelangem Einfluss von z.B. chronischen Verlaufsformen viraler Hepatitiden (Hepatitis B und C), Autoimmun-Hepatitis (AIH), Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC), Primär biliäre Zirrhose (PBC) und chronischem Alkoholeinfluss dar. In allen Verlaufsformen sind dabei die Hepatozyten durch ständig verursachten Zelltod eines Teils des funktionellen Gewebes einem erhöhten Regenerationsdruck unterworfen (Alcolado *et al.* 1997; Williams & Iredale 1998). Klassische Modelle der Zirrhoseentstehung gehen davon aus, dass zellarchitektonische Umbauvorgänge innerhalb der Leber, verursacht durch Prozesse wie chronische Lymphozyteninfiltration, Zytokinproduktion oder Umorganisation der extrazellulären Matrix, an einem bestimmten Punkt irreversibel werden (Friedman 1983; Alcolado *et al.* 1997; Williams & Iredale 1998). Die Telomerhypothese der Zirrhoseentstehung postuliert dagegen, dass durch den erhöhten Zellumsatz die damit einhergehende Telomerverkürzung letztendlich zum Verlust der Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten führt (Rudolph & DePinho 2001). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Hepatozyten der präzirrhotischen Leber, die einer chronischen Schädigung ausgesetzt sind, im Vergleich zu den ruhenden Hepatozyten gesunder Leber vermehrt proliferieren (Kaita *et al.* 1997), dass jedoch das Stadium der Leberzirrhose durch eine verminderte Proliferation der Hepatozyten gekennzeichnet ist (Rudi *et al.* 1995; Delhay *et al.* 1996; Kaita *et al.* 1997; Delhay *et al.* 1999). Die gemeinsame Endstufe der Leberzirrhoseentwicklung ist die Aktivierung der ansonsten ruhenden Zellen des Bindegewebes, die durch Proliferation das für die Zirrhose typische fibroblastische Narbengewebe ausbilden.

2.7 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

Das hepatozelluläre Karzinom (hepatocellular carcinoma, HCC) ist einer der weltweit am häufigsten auftretenden Tumorarten. In den meisten Fällen geht der HCC-Entwicklung eine Hepatitis Erkrankung (Hepatitis B oder C), eine wie z.B. die durch das Mycotoxin Aflatoxin B₁ (AFB₁) verursachte chronische Schädigung, oder eine alkoholische Leberzirrhose voraus (Feitelson *et al.* 2002). Zusammen mit anderen Risikofaktoren werden pro Jahr etwa 0,25-1 Million HCC Neuerkrankungen diagnostiziert (Feitelson 1986). Die Diagnose von HCC ist verbunden mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von 6 Monaten ab Diagnose sowie für unbehandelten Leberkrebs mit einer durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von <3% (Feitelson 2001). Zu den Todesursachen zählen akutes Leberversagen in Kombination mit Leberzirrhose und/oder rapides Wachstum von Lebertumoren. Die hohe HCC Inzidenz und Sterblichkeitsrate zeigt, wie wichtig es ist, die Mechanismen der HCC-Entwicklung zu verstehen und mögliche therapeutische Maßnahmen zu entwickeln.

Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass sich HCC aus einer Anreihung von unterschiedlichen Vorstufen mit jeweils charakteristischen genetischen Veränderungen entwickeln: Innerhalb des zumeist zirrhotischen Lebergewebes finden sich zunächst große preneoplastische regenerative Knoten, die auf Dysplasie oder adenomatöse Hyperplasie hinweisen (Theise *et al.* 2002). Es werden gering- oder hochgradige Dysplasien unterschieden (Oh *et al.* 2003). Diese grenzen sich zu den daraus entwickelnden dedifferenzierten HCCs ab. Die Unterscheidung adenomatöser Tumorstufen von Tumorzellen war Gegenstand vieler Studien. Neben Deletionen und Mutationen in Genen wie p53, RB und/oder des Insulin-like Wachstumsfaktor-Rezeptors 1 (IGF_{R1}) (Murakami & Tanaka 1991; Kim *et al.* 1996) wurde in HCC mehrfach die Überexpression von *c-myc* und cyclin D1 beschrieben (Himeno *et al.* 1988; Tiniakos *et al.* 1989; Peng *et al.* 1993; Nishida *et al.* 1994), sowie von Genen, die eine Rolle innerhalb des aktivierten Zellzyklus spielen (Xu *et al.* 2001). Eine Reihe von Studien konnten nachweisen, dass HCC generell im Gegensatz zum umliegenden Normalgewebe durch verkürzte Telomere gekennzeichnet sind (Ohashi *et al.* 1996; Urabe *et al.* 1996; Miura *et al.* 1997). Im Gegensatz dazu ist Telomerase-Reaktivierung ein wichtiges Charakteristikum der HCC Entwicklung (Oh *et al.* 2003), welche in 80% der HCC auftritt (Tahara *et al.* 1995; Miura *et al.* 1997; Nakayama *et al.* 1998).

Man geht heute davon aus, dass Telomerverkürzung und Telomerase-Aktivierung gegensätzliche Auswirkungen auf die Entstehung und den Progress von Tumoren haben. Einerseits verursacht Telomerfunktionsverlust die Entstehung Chromosomaler Instabilität (CIS) (Harley 1991; Wright & Shay 1992), wodurch die Entstehung von Tumoren ausgelöst wird. Andererseits hemmen dysfunktionelle Telomere die Zellproliferation und induzieren Apoptose, wodurch der Tumorprogress verhindert wird. Telomerverkürzung scheint somit bei der Entstehung von Tumoren eine auslösende Rolle zu spielen, wohingegen die Stabilisierung von Telomeren - z.B. durch Telomerase-Reaktivierung (Paradis *et al.* 1998; Ochiai *et al.* 2000) - für den Progress der Tumore notwendig ist.

2.8 Das mTERC^{-/-} Mausmodell der Telomerverkürzung

Für das Verständnis des Einflusses von Telomerverkürzung auf die Zellregeneration, die Auswirkungen innerhalb chronischer Erkrankung sowie ihrer divergente Rolle innerhalb der Tumorentwicklung und dessen Progress sind Mausmodelle unerlässlich. Für diese Art von Analysen wurde das mTERC^{-/-} Mausmodell der Telomerverkürzung entwickelt: Dieser Maus fehlt durch eine homozygote Deletion der mTERC-Komponente Telomerase Aktivität (Blasco *et al.* 1997). Auf Grund der bei Maus-Inzuchtstämmen relativ langen Telomere (40kb), zeigten Mäuse der ersten mTERC^{-/-} Generation keinen pathologischen Phänotyp, was darauf hindeutete, dass bei ausreichend langen Telomeren Telomerase Aktivität selbst nicht für die Entwicklung und Organ-Homeostase notwendig war. Dagegen hatten rückgekreuzte, späte Generationen G3-G6mTERC^{-/-} Mäuse kritisch kurze Telomere und damit einhergehend Verlust der Telomerfunktion sowie chromosomale Fusionen (Blasco *et al.* 1997). Die Entwicklung war so beeinträchtigt, dass Mäuse mit kritisch kurzen Telomeren zu hohem Anteil schon in der Embryogenese verstarben (Herrera *et al.* 1999). Postnatal zeigten mTERC^{-/-} Mäuse gestörte Organ-Homeostase besonders der hochproliferativen Organe wie des haematopoetischen Systems, der männlichen Fortpflanzungsorgane sowie der intestinalen Epithelien. Zudem zeigten sie eine erhöhte Apoptose- und eine verminderte Proliferationsrate (Lee *et al.* 1998; Rudolph *et al.* 1999). Alternde mTERC^{-/-} Mäuse zeigten eine verminderte regenerative Streßantwort sowie vermindertes Überleben (Rudolph *et al.* 1999). Die späten Generationen der mTERC^{-/-} Mäuse können als Modell für das alternde bzw. geschädigte hochproliferierende Gewebe des Menschen dienen und eignen sich damit auch als Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses von Telomerverkürzung innerhalb Langzeitschädigungen von Organen sowie

der Tumorentwicklung. Untersuchungen der Tumorentwicklung in Darm und Leber bestätigten eine divergente Rolle der Telomerverkürzung in Tumorentstehung und Tumorprogress (Rudolph *et al.* 2001; Farazi *et al.* 2003): Während mTERC^{-/-} Mäuse nach experimenteller Schädigung vermehrt Tumorstadien entwickelten, war der Tumorprogress signifikant gehemmt.

2.9 Mausmodelle der chronischen Leberschädigung und HCC Entwicklung

Experimentelle Leberschädigung kann im Mausmodell durch verschiedene Systeme verursacht werden: Die wiederholte Applikation des chemischen Toxins Carbontetrachlorid (CCl₄) ist ein weit verbreitetes und etabliertes Modell der chronischen Leberschädigung (Edwards 1942, Eschenbrenner 1946). CCl₄ führt zum Absterben der Hepatozyten und damit zu Destruktions- und Regenerationszyklen des funktionellen Lebergewebes, in deren Folge es schließlich zur Ausbildung von Leberzirrhose kommt. Wildtyp-Mäuse entwickelten Fibrose und verminderte Leberfunktion nach etwa 2-3 Monaten kontinuierlicher CCl₄-Gabe. Im Gegensatz dazu war in späten Generationen der mTERC^{-/-} Mäuse nach bereits 2-4 Wochen eine verfrühte und stärker ausgeprägte Ausbildung von Leberzirrhose und regenerativen Defekten beobachtet worden (Rudolph *et al.* 2000). Desweiteren konnte in diesem System gezeigt werden, dass die leberspezifische adenovirale Reaktivierung von Telomerase die Zirrhoseentstehung in den späten Generationen der mTERC^{-/-} Mäuse verzögerte und die Telomerkfunktion wieder herstellte. Als ein weiteres Modell der chronischen Leberschädigung dient die Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) transgene Maus, die ursprünglich zur Aufklärung der Mechanismen der Hepatitis B Infektion und der dadurch verursachten HCC Entstehung entwickelt wurde (Chisari *et al.* 1987). Das Hepatitis B Virus verursacht im Menschen neben akuter und chronischer Leberschädigung eine Entzündungsreaktion. Bei einer chronischen Hepatitis B Infektion erhöht sich das Risiko, HCC zu entwickeln, 200fach (Beasley *et al.* 1981). In der HBsAg transgenen Maus wird HBsAg unter Kontrolle des Hepatozyten-spezifischen Albumin-Promotors exprimiert. Die Genprodukte bilden in der Zelle nicht sekrierbare filamentöse Partikel, die innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums der Hepatozyten akkumulieren und dadurch zelltoxisch wirken (Chisari *et al.* 1986). Abhängig von der Transgen-Expressionsstärke verursachte die HBsAg Überexpression in den Mäusen des

hochexprimierenden Stammes 50-4, der in dieser Arbeit verwendet wurde, beginnend bei 2-3 Monaten, chronische Hepatozyten-Schädigung und Lymphozyteninflammation mit nachfolgender ständiger Regeneration der Hepatozyten. Bei etwa 6 Monaten wurden regenerative Knoten und zelluläre Dysplasie beobachtet, gefolgt von der Entwicklung von Tumorstufen (Adenomen), beginnend bei 9-12 Monaten die Entwicklung von HCC und bei 18-21 Monate alten Mäusen eine 100%ige HCC-Inzidenz (Chisari *et al.* 1989).

Dieses Mausmodell spiegelt mit dem erhöhten Zellumsatz und der HCC-Entwicklung somit zwei Hauptcharakteristika chronischer Lebererkrankungen des Menschen wieder.

2.10 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte zelltypspezifisch die Telomerlänge in humanen Leberzirrhoseproben untersucht werden und die Telomerhypothese der Zirrhoseentwicklung überprüft werden. Zusätzlich soll experimentell im Telomerase defizienten und HBsAg transgenen Mausmodell der Einfluss von Telomerverkürzung auf die Leberhomeostase, die Leberkrebsentwicklung und das Überleben im Rahmen chronischer Leberschädigung untersucht werden.

Desweiteren sollen die zu Grunde liegenden Genexpressionsänderungen der sich entwickelnden Leberzirrhose in Abhängigkeit von Telomerverkürzung identifiziert werden.

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Agarose (Electrophoresis grade)	Gibco
Agarose (Sea Plaque)	Gibco
Ammoniumacetat	AppliChem
Ampicillin	Sigma
Bacto-Trypton	Gibco
BES (N,N-bis (2-Hydroxyethyl)-2 aminoethansulfonsyre)	Sigma
Blocking Reagent	Boehringer Mannheim
Bromphenol Blau	Serva
BSA (bovines Serum Albumin)	Sigma
Chloroform	J.T.Baker
3, 3'-diaminobenzidin tetra-hydrochlorid (DAB)	Amersham
Deionisiertes Wasser	Ampuwa
Dimethylformamid (DMF)	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Eosin Y solution (wässrig)	Sigma
FCS (fetal cow serum)	Sigma
Ficoll	Sigma
Formaldehyd	Fluka
Glucose	Sigma
Glycerol	Serva
Glycin	AppliChem
Glutaraldehyd	Sigma
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)ethansulfonsyre)	ICN
Isopropanol	J.T. Baker

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)	Roth
Mayer's Haematoxylin solution	Sigma
Methanol	J.T.Baker
MOPS (3-(N-Morpholin)propansulfonsyre	Sigma
Mounting Medium für Fluoreszenz	Vectashield
Mounting Medium mit DAPI	Vectashield
Natriumacetat	AppliChem
PBS (Phosphate buffered saline)	Gibco
PCR Nucleotid Mix	Roche
Resin	Biorad
Ribonuclease Inhibitor	Sigma
RNA Clean	Hybaid
RNase Away	Roth
Roti-phenol/Chloroform	Roth
Sodium dodecylsulphate (SDS)	Sigma
SYBR Green	Sigma
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem
Triton-X-100	Sigma
Tryptose phosphate broth	Gibco
Tween-20 und -100	Sigma
Xylol	J. T. Baker

Alle in der Arbeit verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen oder entstammen einem der verwendeten Kits.

3.1.2 Enzyme

Collagenase	Sigma
Dispase	Sigma
DNase I, RNase-free	Boehringer, Mannheim
HotStarTaq TM Polymerase	Qiagen
Lysozym	Sigma
Pepsin	Sigma
Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen
Proteinase K	Invitrogen

Restriktions Endonukleasen	New England Biolabs
RNAse A	Sigma
Superscript II-RT	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Invitrogen
T4-Kinase (Polynucleotid-Kinase)	New England Biolabs
T7-RNA Polymerase	Roche
Taq DNA Polymerase	Qiagen

3.1.3 Antikörper

Mouse Anti-PCNA Ab-1 (PC 10) monoclonal antibody	Oncogene Science
Mouse Anti-human HBsAg (3E7) monoclonal antibody	Dako
Mouse Anti-human Desmin (clone D33) monoclonal antibody	Dako
Rabbit Anti-STK-6 antibody	Zymed
Fitc-conjugated Mouse Anti- β -Catenin	BD Bioscience
Rabbit Anti-Mouse Albumin	Cappel ICN
Rabbit polyclonal antibody p-Histone H3 (Ser-28)	Santa Cruz
Cy-3-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Zymed
Cy-3-conjugated Sheep Anti-Mouse IgG	Sigma
Cy-3-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG	Zymed
Cy-3-conjugated Sheep Anti-Rabbit IgG	Dako
Fitc-conjugated Swine Anti-Rabbit IgG	Dako
Fitc-conjugated Goat Anti-Mouse IgG	Zymed

3.1.4 Molekulargewichtstandards

Mit Hilfe von Standardfragmenten bekannter Länge können die Größen von Nukleinsäurefragmenten berechnet werden. Als Längenmarker wurden je nach zu erwartender Fragmentgröße folgende Molekulargewichtstandards verwendet:

100 bp-Leiter	New England Biolabs
1 kb-Leiter	Invitrogen
High molecular weight marker	Invitrogen

3.1.5 Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

pGEM-Teasy:ayk #3 sense	Dieses Plasmid des pGEM-Teasy Systems enthält die cDNA des ayk-1 Gens in sense Orientierung.
pGEM-Teasy:ayk #10 antisense	Dieses Plasmid des pGEM-Teasy Systems enthält die cDNA des ayk-1 Gens in antisense Orientierung.

3.1.6 Rekombinante Adenoviren

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Adenoviren handelt es sich um replikations-defiziente Adenoviren des humanen Serotyps 5. Sie weisen eine Deletion im Bereich der E3- sowie der E1-Region auf, wobei die E1-Deletion entscheidend für die Replikationsdefizienz ist. Die Vermehrung dieser Viren erfolgt in der permissiven Zelllinie 293, die die fehlende E1-Region transkomplementiert.

Ad-mTERC-GFP	Basiert auf pAdEasy-1 (He <i>et al.</i> 1998) und enthält ein 5kb mTERC EcoRI-Fragment von inkl. 4kb der upstream Promotorregion sowie das GFP-Gen (Rudolph <i>et al.</i> 2000).
Ad-GFP	Basiert auf pAdEasy-1 (He <i>et al.</i> 1998) und enthält das GFP-Gen (Rudolph <i>et al.</i> 2000).

3.1.7 Kits

Cell Proliferation Kit	Amersham
Gel Extraction Kit	Qiagen
<i>In situ</i> cell death detection kit, Fluorescein	Roche
Nucleotide Removal Kit	Qiagen
pGEM-T-Easy Vector Kit	Promega
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
DIG Labeling Kit	Roche

3.1.8 Oligonukleotide

Für Genotypisierung:

mTERC ^{-/-}	mTRR-5'-TTC TGA CCA CCA CCT ACT TCA AT-3'
	5ppgK-5'-GGG GCT GCT AAA GCG CAT-3'

	mTRwtF-5'-CTA AGC CGG CAC TCC TTA CAA G-3'
TgHBsAg	064 (HBV1)-5'-AAC ATG GAG AAC ATC ACA TC-3'
	065 (HBV2)-5'-AGC GAT AAC CAG GAC AAG TT-3'
	066 (ras1)-5'-ATG TAC TGG TCC CGC ATG GC-3'
	067 (ras2)-5'-TTT GCA GGA CTC CTA CCG G-3'
RT-PCR:	polyT-5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'
	RPS9 (1)-5'-CTG GAC GAG GGC AAG ATG AAG C-3'
	RPS9 (2)-5'-TGA CGT TGG CGG ATG AGC ACA-3'
	ayk (1)-5'-GCC TCG GCG TTC TCT GCT ATG-3'
	ayk (2)-5'-GGT CCC TGG CTC CCT CTG TCA-3'
	cdc20 (1)-5'-GTG GCC ATA GCC AGG AAG TA-3'
	cdc20 (2)-5'-AGT GAA TGT TTG CAG GGG AG-3'

Für cDNA und Riboprobe-Herstellung:

ayk cDNA:	cayk (1)-5'-GCA GGT TCC TGC CTG TGA-3'
	cayk (2)-5'-GGG TGT TTC TCA CAG TTG CAC-3'

3.1.9 Puffer, Lösungen und Medien

Nährmedien für die Zellkultur:

Alle adhärenenten Zelllinien wurden in DMEM mit Glutamax, versetzt mit 10% FCS (v/v) und 1% Penicillin/Streptomycin (v/v), kultiviert. Für Infektionsversuche mit Adenoviren wurde DMEM mit 2%-igem FCS Anteil verwendet.

Nährmedien für die Bakterienkultur:

LB-Medium:

10g Bactotrypton, 5g Hefeextrakt und 10g NaCl wurden auf 1l mit dest. Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika zur plasmidspezifischen Selektion erfolgte unmittelbar vor Inkulturnahme.

LB-Agarplatte:

1l LB-Medium wurde mit 15g Agar versetzt und autoklaviert. Zur Selektion plasmidtragender Klone wurde das entsprechende Antibiotikum nach Abkühlung auf unter 60°C zugefügt und der Ansatz in Petrischalen gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Platten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Puffer und LösungenDNA- und Enzympuffer

TE-Puffer

10mM Tris-HCl

1mM EDTA

pH 8,0

Ligationspuffer

500mM Tris-Cl

100mM MgCl₂

10mM rATP

10mM Dithiothreitol

50% (w/v) PEG 8000

Elektrophoreselösungen und -puffer

1xTBE-Puffer

90mM Tris

2mM EDTA

90mM Borsäure

10x DNA-Ladepuffer:

0,25% Bromphenolblau (w/v)

30% Glycerol

Lösungen für denaturierendes RNA-Gel

20x MOPs Puffer

400mM MOPs

50mM sodium acetate

10mM EDTA, pH 7.0

denaturierendes Agarosegel

1,2% Agarose

1x MOPs Puffer

0,74% Formaldehyd

Laufpuffer

1xMOPs

0,74% Formaldehyd

Titrationpuffer zur Herstellungkompetenter *E. coli* Zellen100 mM CaCl₂70 mM MgCl₂

40 mM Natriumacetat pH 5,5

Puffer für DNA-Isolierung

P1-Puffer

50mM Tris-Cl

10mM EDTA

pH 8.0

P2-Puffer

200mM NaOH

1% (w/v) SDS

P3-Puffer

2.55M K-Acetat

pH 4.8 (mit Eisessig einstellen)

Lyse-Puffer zur DNA Isolierung

50mM Tris pH 8,0

50mM EDTA

0,5% TritonX-100

8% Sucrose

Lösungen für Q-FISH

Pepsinlösung

125mg Pepsin
105µl 37% HCl
125ml ddH₂O

Hybridisierungslösung

10mM Tris-Cl pH 7,2
11,5% (v/v) [25mM MgCl₂, 9mM
Citric Acid, 82mM Na₂HPO₄]
70% Formamid deionisiert
0,5µg/ml PNA Probe
0,25% Blocking reagent

WASH I

70% Formamid
10mM TrisCl pH 7,2
0,1% BSA

TBS Tween 0,08%

100mM TrisCl pH 7,2
150mM NaCl
0,08% Tween 20

2 x Lagerungspuffer für Adenoviren:

10mM Tris/HCl pH 8,0
100mM NaCl
1mM MgCl₂
50% Glycerol
0,1% BSA

CsCl₂-Gradient Dichte 1,2 g/ml:

26,5g CsCl₂
92,5ml H₂O
1ml Tris/HCl pH 7,5

CsCl₂-Gradient Dichte 1,4 g/ml:

53,5g CsCl₂
85,5ml H₂O
1ml Tris/HCl pH 7,5

Dialysepuffer

10mM Tris pH 8,0
10mM MgCl₂
50mM NaCl

Immunhistochemische Lösungen

Paraformaldehyd in Cacodylatpuffer

21,4g Cacodylatnatriumsalz
735mg Calciumchlorid
40g Paraformaldehyd
ad 1l mit dest. Wasser
pH 7,4

1xPBS

10mM Natriumphosphat pH 7,4
150mM NaCl

Hitzepermeabilisierungspuffer

40mM Tris-Cl
1mM EDTA
pH 9,0 mit 25% HCl

TBS-Tween 0,3%

20mM TrisCl pH 7,6
137mM NaCl
0,3% Tween 20

Sulfidwasser für Feulgen-Färbung

0,5% Kaliumdisulfid
0,05N HCl

3.1.10 Sonstige Materialien und Geräte

ABI prism 7700 Sequence Detection System	PE applied Biosystems
Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Bakterien Kulturplatten	Greiner
Bakterienschüttler	Bühler
Cryoröhrchen	Nunc
Cryostat Microm HM 500 OM	Omega
Dialysekassetten	Pierce
Einmalpipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml (steril)	Greiner
Elektrophorese-Kammer	Labtech, Pharmacia Biotech
Fluoreszenz Mikroskop BX 60	Olympus
Gel doc	Biorad
Gene-chip Scanner	Affymetrix
Heizblock	Eppendorf
High density oligonucleotide chips	Affymetrix
Mikroskopkamera, digital	Sony
Mikroskop	Olympus
PCR Master Cycler	Eppendorf
PCR soft tubes	Biozym
Polypropylenröhrchen (Reagiergefäß, 15ml und 50ml)	Greiner
Power-Supply	Biometra
Reaktionsgefäß (1,5ml)	Eppendorf
Spektrophotometer	Contron
Telomere Analysis Program TFL-TELO V1.0a	Steven S.S. Poon, Peter M. Lansdorp
Ti-70-Rotor und SW 28.1-Swinging-Bucket-Rotor	Beckman
Tischzentrifuge	Eppendorf
Tissue Tek	Satura
Ultrazentrifuge	Beckman
Vortexer	Omnilab
Zellkultur Laminar Flow Bench	Heraeus
Zellkulturflaschen (250ml)	Cell star
Zellkulturinkubator	Heraeus

Zellkulturplatten (6 well)	Cell star
Zellkulturplatten (ø10cm)	Greiner
Zentrifugenröhrchen, steril (10ml)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen, steril (50ml)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen, Ultra-Clear™	Beckman

3.1.11 Humanes Lebergewebe

Alle verwendeten humanen Leberproben entstammen explantierten Lebern von Patienten, die eine Lebertransplantation bekommen haben. Der Entnahme der Proben wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover zugestimmt. Alle Gewebeproben wurden innerhalb von 30min nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Beurteilung des Zirrhosegrades nach den Ishak-Kriterien (Ishak *et al.* 1995) wurden H&E Färbungen von in Paraffin eingebetteten Schnitten angefertigt. Die Durchführung von Q-FISH erfolgte auf Gefrierschnitten. Neben einer nicht zirrhatischen Leber eines 50jährigen Patienten wurden 6 Proben stark zirrhatischer Leber der Stadien B und C unterschiedlicher Ethio-logie (AIH (n=2), PSC (n=1), PBC (n=1), eth. Zirrhose (n=1) und Hepatitiszirrhose (n=1), Alter 27,5±5 Jahre) sowie 2 Proben mild ausgeprägter Zirrhose der Stadien A und B (PBC (n=2), Alter 26±4,2 Jahre) untersucht.

3.1.12 Versuchstiere

Für die in dieser Arbeit generierten Mäuse wurden zwei Mausstämme verwendet: mTERC^{-/-} Mäuse (C57BL6-Hintergrund) (Blasco *et al.* 1997), sowie HBsAg-transgene Mäuse (C57BL6/6J-TgN(Alb1HBV)44Bri, Stamm 50-4, Chisari *et al.* 1986), bezogen über The Jackson Laboratory, USA.

Die spezifisch pathogenfreien Tiere wurden in den zentral klimatisierten Tierräumen des Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover mit einem Temperaturbereich von 20-24°C und einer Luftfeuchte von 50-60% in Makrolonkäfigen gehalten und verpaart. Es herrschte ein 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Den Tieren stand Futter (Fa. Altromin) und Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung. Die Genotypisierung erfolgte wie unter 3.2.15 beschrieben.

3.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion der DNA- bzw. RNA-Lösung bei 260nm gemessen. Hierbei entspricht eine OD von 1,0 ca. 50µg/ml doppel-strängiger DNA und ca. 40µg/ml RNA. Aussagen über die Reinheit der Nukleinsäurelösung konnte durch zusätzliche Messung der Extinktion bei 280nm getroffen werden. Der Quotient E_{280}/E_{260} liegt bei geringen Verunreinigungen für DNA bei 1,7-1,9. Sehr geringe DNA-Konzentrationen wurden im Agarosegel durch Vergleich mit 50ng der 1,6kb-Bande des 1kb Standards abgeschätzt.

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung und Visualisierung von Nukleinsäurefragmenten. Da sich diese aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld gerichtet bewegen, lassen sie sich mit Hilfe einer Agarose-Gelmatrix ihrer Größe entsprechend auftrennen. Dabei ist die Mobilität einer RNA bzw. eines DNA-Fragments proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes, wobei die Mobilität als Laufstrecke im Gel gemessen wird. Entscheidend ist dabei neben der Größe die dreidimensionale Struktur des Moleküls. Beeinflusst wird das Laufverhalten außerdem durch die Agarosekonzentration des Gels. Durch Ethidiumbromidfärbung können Nukleinsäurefragmente visualisiert werden, weil Ethidiumbromid die Nukleinsäuren interkaliert. Bei Betrachtung unter UV-Licht (254nm oder 366nm) fluoresziert das Ethidiumbromid intensiv orange. Es wurden 0,8-2,0%-ige (w/v) Gele in TBE-Puffer mit 0,0001Vol. Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 0,1Vol. 10x Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm mit TBE als Laufpuffer.

3.2.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Es wurde der modifizierte *E. coli*-Stamm JM109 verwendet, der zur stabilen Replikation von Plasmiden in hoher Kopienzahl entwickelt wurde (Genotyp: F' {*traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15*} *endA1 hsdR17(r_k⁻,m_K⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Δ(lac-proAB)*, Fa. Gibco). Da *E. coli* über kein natürliches Transformationssystem verfügt, mussten

transformationskompetente Zellen durch CaCl_2 Behandlung hergestellt werden. Dazu wurden die Bakterien zunächst in 25ml LB-Medium bei 37°C und 225rpm im Bakterien-schüttler über Nacht kultiviert. 5ml dieser Kultur wurden mit 500ml LB-Medium verdünnt, zu je 250ml portioniert und bis zu einer OD_{600} von 0,45-0,55 bei 37°C und 225rpm angereichert. Die Bakteriensuspension wurde zwei Stunden in Eiswasser inkubiert und anschließend 20min bei 4°C und 3.800rpm (Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor JA-10) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20ml eiskaltem Titrationspuffer resuspendiert, das Volumen mit Titrationspuffer auf 500ml aufgefüllt und 45min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden 10min bei 4°C und 3.200rpm (Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor JA-20) abzentrifugiert und in 50ml eiskaltem Titrationspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde unter Rühren tropfenweise mit 80%-igem Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 15% versetzt. Die Bakterien wurden aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

100µl chemisch kompetente *E. coli* JM109 Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 10-20ng zirkulärer Plasmid-DNA bzw. einem vollständigen Ligationsansatz vermischt und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt (90sec bei 42°C) und danach für 2min auf Eis regeneriert. Der Ansatz wurde mit 950µl LB-Medium versetzt und eine Stunde bei 37°C und 225rpm im Heizblock inkubiert. Ein Aliquot von 150µl wurde direkt auf eine vorbereitete IPTG/X-Gal Platte (s.u.) ausplattiert. Die restlichen Zellen wurden bei 1.500rpm für 5min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes in 200µl LB-Medium resuspendiert. Jeweils 100µl dieses Ansatzes wurden auf weitere IPTG/X-Gal Platten ausplattieren, kurz trocknen gelassen und dann invertiert bei 37°C ü/N im Brutschrank inkubiert. Die Platten enthielten das dem Resistenzgen des jeweiligen Plasmids entsprechende Antibiotikum.

Für IPTG/X-Gal Platten wurden 100µl 10mM IPTG und 5µl 100mg/ml X-Gal in DMF pro Platte als Mastermix gemischt, jeweils 105µl auf eine Platte ausplattiert und trocknen gelassen. Einzelkolonien sollten weiß sein, wenn die Plasmide das Insert enthalten und blau, wenn kein Insert enthalten ist.

3.2.5 Vermehrung transformierter Bakterien

Zur Vermehrung plasmidtragender *E. coli*-Klone wurde zunächst eine Vorkultur (etwa 3ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) bei 37°C über Nacht im Schüttler bei 225rpm inkubiert. Aus 1,5ml der erhaltenen Bakteriensuspension konnte eine Mini-Plasmidpräparation durchgeführt werden. Zur Isolierung großer DNA-Mengen (Maxi-Plasmidpräparation) wurde die Vorkultur auf ein Volumen von 250ml mit Medium aufgefüllt und weitere 12h kultiviert. Antibiotikakonzentration: Ampicillin 100µg/ml.

3.2.6 Mini-Plasmidpräparation

Diese Methode dient zur schnellen Präparation von Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen und Klonierungen, die isolierte DNA ist jedoch relativ stark verunreinigt. Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 13.000rpm in der Tischzentrifuge durchgeführt. 1,5ml der Bakteriensuspension wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend 2min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 200µl P1-Puffer resuspendiert. Dann wurden 200µl P2-Lyse-Puffer und 200µl P3-Puffer zugegeben und zweimal invertiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand auf 500µl Isopropanol gegeben und mehrmals invertiert, um die DNA zu fällen. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation (20 min) pelletiert und anschließend mit 500µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 2min wurde der Überstand verworfen, die DNA 20min luftgetrocknet und anschließend in 50µl TE-Puffer aufgenommen. Zum Lösen der DNA wurde für 5 min auf 70°C erhitzt und die DNA anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.7 Maxi-Plasmidpräparation

Mit Hilfe von Ionentauschersäulen (Qiagen) wurde Plasmid-DNA in größeren Mengen isoliert. 10µl RNase A (10mg/ml) und 1µl RNase T1 (0.3 U/µl) pro ml P1-Puffer wurden frisch zugeben. Zellen aus einer Vorkultur wurden abzentrifugiert und in 10ml P1-Puffer resuspendiert. Danach wurden 10ml P2-Puffer und 10ml P3-Puffer zugeben, sofort sechsmal invertiert und anschließend für 20min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 30min bei 3700rpm und 4°C zentrifugiert. Die Säule wurde inzwischen für mindestens 10min mit 10ml QBT-Puffer äquilibriert und dann der Zentrifugationsüberstand auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 2x 20ml QC-Puffer gewaschen und anschließend die DNA

mit 15ml QF-Puffer eluiert. Durch Zugabe von 10,5ml Isopropanol wurde die DNA gefällt und dann für 30min bei 3200rpm und 4°C abzentrifugiert. Nach Abziehen des Überstands wurde das DNA-Pellet mit 5ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen und für 2min bei 13000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen, das DNA-Pellet 5min bei RT getrocknet und danach in 500µl 0,1mM TrisCl pH 8.0 resuspendiert. Zum Lösen der DNA wurde für 5min auf 70°C erhitzt und danach kurz abzentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.2.8 Konservierung von Bakterienstämmen

Auf selektivem Festmedium konfluent gewachsene Bakterienstämme wurden in 500µl LB-Flüssigmedium resuspendiert, mit 600µl 87% (v/v) Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert.

3.2.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsenzymen der Firma New England Biolabs gespalten. Die Reaktionsbedingungen wurden nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Restriktionspuffer (NEB 1-4, ggf. Spezialpuffer) und bei Bedarf mit mitgeliefertem BSA (bovines Serumalbumin) gewählt. Bei Spaltung von Plasmid-DNA aus Minipräparationen wurden in der Regel 5-10µl DNA-Lösung mit 2,5 bis 5 Units des entsprechenden Enzyms inkubiert. Die jeweils einzusetzende Menge an Enzymeinheiten (Units) wurde nach folgenden Grundsätzen abgeschätzt:

1 U eines Enzyms schneidet 1µg DNA in 1h. Das Enzym sollte in 3- bis 4-fachem Überschuss vorliegen und das Volumen der Enzymlösung maximal ein Zehntel des Gesamtvolumens betragen. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Restriktionsenzym, falls notwendig, nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert.

3.2.10 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsspaltung wurde die gewünschte Bande nach gelelektrophoretischer Auftrennung ausgeschnitten. Die Extraktion erfolgte unter Verwendung des Gelextraction Kits (Firma Qiagen) nach Anweisungen des Herstellerprotokolls: Die zu isolierende DNA-Bande wurde aus dem Agarosegel

ausgeschnitten, das Gelstück gewogen und mit 300µl QG-Puffer pro 100mg Gel versetzt. Anschließend wurde bei gelegentlichem Durchmischen bei 50°C bis zur vollständigen Auflösung des Gelstückes inkubiert (ca. 10min). Bei Fragmenten <100bp und >4kb wurde nun pro 100mg des ursprünglichen Gelstücks 100µl Isopropanol zugegeben und invertiert, bis sich die Lösungen vollständig vermischt hatten. Die Mischung wurde dann zu jeweils höchstens 800µl auf eine im Kit enthaltene Säule pipettiert, diese auf ein Auffanggefäß gesteckt und 1min bei 13.000rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis das vollständige Volumen auf die Säule aufgetragen war. Nach Zugabe von 750µl PE-Puffer auf die Säule und einer 2minütigen Inkubation wurde erneut zum Waschen der Matrix zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Zentrifugationsschritt zum vollständigen Durchlauf des Puffers wiederholt. Mit 50µl TE-Puffer wurde dann die DNA durch Zentrifugation der Säule in einen neuen Eppendorfgefäß eluiert. Die eluierte DNA (ca. 48µl) wurde bei -20°C gelagert, ein Aliquot wurde zur Messung des DNA-Gehalts verwendet.

3.2.11 Präzipitation von Nukleinsäuren

Die DNA wurde aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von 0,16 Vol. 5M Lithiumchlorid (Endkonzentration 0,8M) sowie 3 Vol. eisgekühltem Ethanol (100%, Endkonzentration 70%) gefällt, wobei die Präzipitation für 1-2 h bei -80°C oder über Nacht bei -20°C erfolgte. Nach einer Zentrifugation (15.000g, 4°C, 20min) wurde der Überstand abgenommen, das Pellet ca. 20min luftgetrocknet und anschließend in dest. Wasser aufgenommen.

3.2.12 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA erfolgte mit dem Qiaquick PCR Purification Kit. Diese Methode ist geeignet, einzel- oder doppelsträngige DNA-Fragmente (100bp bis 10kb) von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen zu reinigen. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben: Zu 1 Vol. DNA-Lösung wurden 5 Vol. Puffer PB gegeben, anschließend wurde die Lösung auf eine Qiaquick-Säule übertragen und nachfolgend in der Tischzentrifuge zentrifugiert (30sec, 13.000rpm). Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule durch Zugabe von 750µl PE-Puffer und nachfolgender Zentrifugation (s.o.)

gewaschen. Danach konnte die DNA mit dem gewünschten Volumen an EB-Puffer eluiert werden.

3.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden homolog-kohäsive (sticky ends) bzw. stumpfe Enden (blunt ends) von DNA-Fragmenten miteinander verknüpft. Die hierzu notwendige DNA-Ligase ist in eukaryontischen Zellen ein wichtiges Reparaturenzym für aufgebrochene Phosphodiesterbindungen in der DNA. Bei Klonierungsexperimenten kann diese Eigenschaft des Enzyms dazu genutzt werden, DNA-Moleküle *in vitro* miteinander zu verknüpfen. Die hierbei am häufigsten eingesetzte Ligase ist die T4-DNA-Ligase, die sich aus mit dem Bakteriophagen T4 infizierten *E. coli*-Bakterien isolieren läßt. Obwohl das Enzym am effektivsten homolog-kohäsive Enden verbindet, ist es auch in der Lage, stumpfe Enden miteinander zu verknüpfen. Das Enzym hat sein Temperaturoptimum bei 37°C, dennoch wird es für Ligationen bei niedrigeren Temperaturen eingesetzt, um die Anlagerung der DNA-Fragmente aneinander zu erleichtern. Alle Ligationen wurden in mitgelieferten T4-DNA-Ligase Puffer unter Zusatz von 1µl 10mM ATP, 200 Weiss-U T4-DNA-Ligase und einem Reaktionsvolumen von 20µl angesetzt. Die Ligation erfolgte durch eine Inkubation bei 16°C über Nacht. Der Vektor und das zu ligierende Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, die benötigte DNA-Menge lag in der Regel bei 500ng.

3.2.14 Phenol-Chloroform-Isolierung genomischer DNA

Gewebestücke vom Schwanz der Mäuse wurden über Nacht, Proben von der Leber für eine halbe Stunde in Lysepuffer mit Proteinase-K bei 56°C unter Schütteln inkubiert. Der Lösung wurde dann 1ml Phenol-Chloroformisoamylalkohol zugegeben, kurz gevortext und danach für 5min bei 10.000rpm (wie alle folgenden Zentrifugationsschritte in der Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Es bildeten sich eine organische und eine wässrige Phase. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 1ml Chloroform wurde kurz gevortext und danach für 5min bei 10.000rpm zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1ml 2-(Iso)propanol gefällt. Nach 3-4maligem Invertieren wurde für 10min bei 13.000rpm die DNA abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde nach Abziehen des 2-(Iso)propanols mit 1ml 70% Alkohol gewaschen. Nach

Zentrifugation für 10min bei 13.000rpm wurde der Überstand abpipettiert und das DNA-Pellet getrocknet. Die DNA wurde in 300-500µl ddH₂O resupendiert, für mindestens 1 Stunde bei 60°C gelöst und anschließend bei 4°C gelagert.

3.2.15 Genotypisierung mittels PCR

Die Genotypisierung der mTERC^{+/+}, mTERC^{+/-} und mTERC^{-/-} Mäuse erfolgte in folgendem 25µl Ansatz: 1µg DNA, 1x PCR Puffer, 2,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP's, je 0,4pmol mTRR-Primer, 5ppgK-Primer und TRwtF-Pimer, sowie 0,01U Taq DNA-Polymerase. Nach einer initialen Denaturierung für 2min bei 94°C folgten 30 Zyklen aus Denaturierung für 30sec bei 94°C, Annealing für 30sec bei 55°C und Verlängerung für 30sec bei 72°C. Abschließend folgten 4°C bis zum Auftragen der PCR-Produkte auf einem 2% Agarosegel, versetzt mit 25µl Ethidiumbromid [1mg/ml] auf 100ml Agarosegel. Für mTERC^{+/+} Wildtyp Mäuse wurde ein 250bp Produkt erwartet, für mTERC^{-/-} Mäuse eine 180bp Bande und beide Produkte für heterozygote mTERC^{+/-} Mäuse (s. Abb. 6).

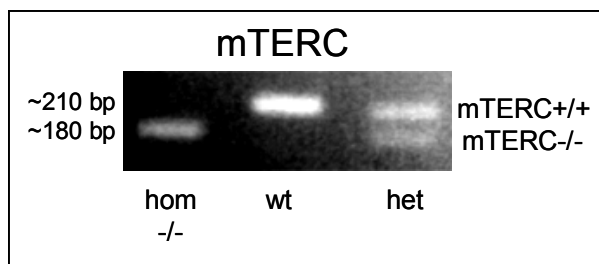


Abb. 6: Exemplarische Darstellung der PCR Produkte nach Genotypisierung von mTERC Mäusen. Die erste Reihe zeigt die 250bp Bande eines mTERC^{+/+} Tieres, die zweite Reihe das 180bp Fragment einer homozygoten mTERC^{-/-} Maus. Die letzte Reihe ergibt das Bild bei heterozygoten mTERC^{+/-} Tieren.

Bei der Genotypisierung der Tg(Alb1-HBV)Bri44 (HBsAg) Mäuse wurden die Angaben des Herstellers (The Jackson Laboratory) befolgt. Der 25µl Ansatz bestand aus: 1µg DNA, 1x PCR Puffer, 2,5mM MgCl₂, 2mM dNTP's, je 0,5pmol 064-Primer, 065-Primer, 066-Primer und 067-Primer, sowie 0,005U Taq DNA Polymerase. Nach 3min initialer Denaturierung bei 94°C folgten 35 Zyklen zu je 20sec Denaturierung bei 94°C, 20sec Annealing bei 55°C und 30sec Verlängerung bei 72°C. Abschließend folgten 2min 72°C und danach die Lagerung bei 4°C bis zum Auftragen auf ein 2% Agarosegel, versetzt mit 25µl Ethidiumbromid [1mg/ml] auf 100ml Agarosegel. Die beiden Primer 064 und 065

ergaben ein Produkt von 223bp Größe für alle HBsAg positiven Mäuse und die Primer 066 und 067 für alle Tiere als Positivkontrolle ein 113bp Fragment (s. Abb. 7).

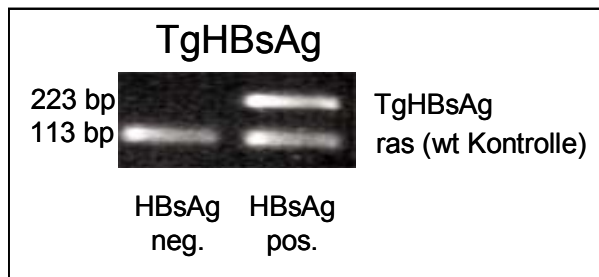


Abb. 7: Exemplarische Darstellung der PCR-Produkte nach Genotypisierung auf HBsAg. Die erste Reihe zeigt die 113bp ras-Kontrollbande eines HBsAg⁻ Tieres, die zweite Reihe zusätzlich das 223bp Fragment einer HBsAg⁺ Maus.

3.2.16 Isolierung von RNA und denaturierendes RNA-Agarosegel

Die RNA-Isolierung aus Lebergewebe erfolgte mit Hilfe der RNazol Lösung nach Protokoll des Herstellers: Das Gewebe wurde in 2ml/100mg Gewebe RNazol mit Hilfe eines sterilen und RNase freien Plotters homogenisiert. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde gründlich gevortext und für 5min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Lösung eines Ansatzes auf Eppendorfgefäße aufgeteilt und bei 12.000g und 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die sich bildende obere RNA-haltige wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in einem neuen Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt und für 15min bei 4°C inkubiert. Die gefällte RNA wurde für 15min bei 12.000g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand anschließend entfernt. Das RNA-Pellet wurde mit 800µl 70% Alkohol in DEPC-Wasser gewaschen und bei 7.500g und 4°C für 8min wieder abzentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das RNA-Pellet getrocknet und danach in 40µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die am Anfang getrennten Ansätze wurden wieder vereinigt, nachdem die RNA für 10-15min bei 60°C vollständig gelöst wurde. Zur Lagerung wurden Aliquots bei -80°C weggefroren, ein Aliquot diente zur Konzentrationsbestimmung durch photometrische Messung bei 260nm. Die Qualität der RNA wurde zudem im denaturierenden Agarosegel überprüft. Dazu wurde Wasser und 1,2% Agarose aufgekocht, nach Abkühlen der Lösung mit 1xMOPs und 0,74% Formaldehyd unter dem Abzug vermengt und zu einem Agarosegel gegossen. Nach Erhärten des Gels wurden 1µl Ethidiumbromid, 1,5µl 10xMOPs, 3,75µl 37% Formaldehyd und 3µl Ladepuffer mit jeweils 5µl der RNA-Probe gemischt, bei 56°C für 15min

denaturiert, dann kurz auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Dieses wurde in 1xMOPs bei 100V laufen gelassen.

3.2.17 Micro-Array Hybridisierung und Analyse

Zur Durchführung der Genexpressions-Analysen wurde RNA aus den Lebern folgender Tiere isoliert: mTERC^{+/+} AdGFP Mäuse, späte Generationen mTERC^{-/-} AdGFP Mäuse sowie späte Generationen mTERC^{-/-} mTERC⁺ Mäuse zu jeweils 5-6 Tieren pro Gruppe. Alle Tiere wurden nach Injektion der Adenoviren über einen Zeitraum von zwei Wochen CCl₄ injiziert (s. 3.4.1) und drei Tage nach letzter CCl₄ Gabe zur Leberentnahme getötet. Aus den Lebern wurde RNA wie unter 3.2.16 beschrieben isoliert und anschließend in den jeweiligen Versuchsgruppen gepoolt. In Kooperation mit der Array-Arbeitsgruppe in der GBF, Braunschweig, erfolgte die Durchführung des GeneChip Experiments: Zunächst wurde die Qualität der Gesamt RNA durch Analyse im Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) überprüft. Die biotinylierte RNA Sonde wurde nach Herstellerangaben (s. Affymetrix GeneChip Expression Analysis Handbuch), hergestellt: 5µg Gesamt-RNA wurde mittels 100pmol T7T23V Primer (Eurogentec; Seraing, Belgium) und reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Konzentration der nun Biotin markierten cRNA wurde durch UV-Spektrographie gemessen und jeweils 12,5µg der gepoolten Ansätze wurden denaturiert zu einem Hybridisierungs-Cocktail mit 4 Biotin markierten Hybridisierungs-Kontrollen (BioB, BioC, BioD, and Cre) gegeben. Die Proben wurden für 16 Stunden auf einen Affymetrix MG-U74Av2 Chip hybridisiert und nach anschließendem Waschen mit SA-PE gefärbt. Die Messung der Färbung erfolgte mittels Affymetrix GeneChip Station und eines Scanners, die Auswertung der Daten mit Hilfe der Programme Affymetrix Microarray Suite 5.0, Affymetrix MicroDB 3.0 und Affymetrix Data Mining Tool 3.0. Gene wurden als reguliert exprimiert gewertet, wenn der Fold difference größer oder gleich ± 2 war. Die statistische Auswertung sollte für hochregulierte Gene $p < 0,001$ sein, für runterregulierte Gene $p > 0,999$.

3.2.18 Herstellung von cDNA (rt-PCR)

Zur Überprüfung von Genexpressionsänderungen mittels quantitativer Real Time-PCR wurde cDNA der für den Array gepoolten RNAs hergestellt. Dazu wurden jeweils 5µg RNA (auf 11,6µl mit ddH₂O) mit 1µl dTT Primer (100pmol) gemischt und für 10min bei

70°C denaturiert. Nach 2min auf Eis wurde 7,4µl eines Mastermixes (1x FirstStrand Puffer, 0,1M DTT, je 10mM dNTPs und 0,4µl RNasin) zugegeben und für 2min bei 42°C präinkubiert. Nach Zugabe von jeweils 1µl Superscript II Reverse Transkriptase wurde für weitere 60min bei 42°C inkubiert. Abschließend wurde nach Hinzufügen von jeweils 40µl ddH₂O das Enzym für 5min bei 90°C deaktiviert und mit Hilfe von RNase (für 30min bei 37°C) die RNA verdaut. Bis zur Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

3.2.19 Quantitative Real Time PCR

Die quantitative Real Time PCR wurde mit Hilfe des ABI Prism 7700 Detectors unter Verwendung von SYBR Green durchgeführt. SYBR Green ist ein DNA-interkalierendes Fluoreszein, das erst nach Bindung an doppelsträngiger DNA detektiert werden kann, wobei die Intensität der Fluoreszenz direkt proportional zur vorhandenen DNA Menge ist. Da SYBR Green auch an Primer-Dimere bindet, mußte zunächst für jedes Primerpaar eine Schmelztemperaturbestimmung des gewünschten Produktes und von unspezifischen Signalen einer Leerkontrolle ermittelt werden, indem nach einer Amplifizierungs-PCR während der Messung die Temperatur 0,5°C-schrittweise erhöht wurde. Die optimalen Meßtemperaturen wurden jeweils für die RT-PCR verwendet. Nach einer initialen Aktivierung der HotStarTagTM DNA-Polymerase durch 15min 95°C folgten 45 Zyklen zu jeweils 20sek bei 94°C, 20sek bei 72°C, 20sek bei 56°C und 20sek Messung. Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von PCR-Zyklen. Alle Messungen wurden als Triplets und in mindestens zwei unabhängigen Läufen durchgeführt. Durch Analyse der resultierenden Kurven mit Hilfe von GraphPadPrism wurde der c_{t50} Wert bestimmt und mit den Werten des Haushaltgens RPS9 normalisiert. Angegeben sind die gemittelten Ergebnisse von jeweils zwei Läufen mit Standardabweichung.

3.2.20 DIG-Markierung der ayk RNA-Sonden

Zur Herstellung einer DIG markierten RNA Sonde zum Nachweis von ayk wurde zunächst die cDNA von ayk in pGEM-Teasy kloniert. Dazu wurde das mit cayk (1) und cayk (2) Primern amplifizierte 1250bp PCR-Produkt aus dem Gel isoliert und mittels pGEM-Teasy Kit blunt end in den pGEM-Teasy Vektor ligiert. Nach Transformation in *E.coli*, Minipräparation und Probeverdau mit *EcoRI* und *EcoRV* wurden Klone für die Sequenzierung durch AGOWA ausgewählt und so die Sequenz und Orientierung

überprüft. Zur Herstellung einer sense Sonde wurde pGEM-Teasy:ayk #3 sense ausgewählt, für die antisense Sonde der Klon pGEM-Teasy:ayk #10 antisense. Die Plasmide wurden zunächst mit EcoRV linearisiert und anschließend aus dem Gel extrahiert. 10µl jeder isolierten Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben des DIG Labeling Kits mit 2µl DIG NTPs, 2µl T7-Polymerase, 2µl 10x T7-Puffer und 4µl H₂O gemischt und anschließend für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von DNase wurde für 15min bei 37°C die DNA verdaut. Es folgte die Inkubation auf Eis und abschließend die Fällung der RNA mit 4M Lithiumchlorid. Die RNA Sonde wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.21 Whole mount *in situ* Hybridisierung

13,5 Tage alte mTERC^{+/+} bzw. G3mTERC^{-/-} Mausembryos von mTERC^{+/+} bzw. G2mTERC^{-/-} Verpaarungen wurden isoliert, in 1x PBS gewaschen und anschließend ü/N in 4% Formaldehyd in 1xPBS bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Embryos für 2x 30min in 1x PBS auf Eis gewaschen und danach jeweils 10min auf Eis in einer aufsteigenden Methanolreihe dehydriert (25%, 50%, 75% und 100% Methanol in DEPC-H₂O). Bis zur Färbung wurden die Embryos bei -20°C gelagert. Die Whole mount *in situ* Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden (s. 3.2.20) wurde in Kooperation mit der AG Gossler, MHH, in dem Roboter InsituPro (Abimed) unter Verwendung des Standard Herstellerprotokolls durchgeführt. Zur Detektion der gebundenen Sonden wurde für etwa 30min unter ständiger Kontrolle der Färbereaktion bei 37°C mit NBT/X-Phospat gefärbt.

3.3 Virale Arbeitstechniken

3.3.1 Vermehrung und Präparation von Adenoviren

Da es sich bei den verwendeten Adenoviren um replikationsdefiziente Viren des humanen Serotyps 5 handelte, war eine Vermehrung der Viren nur in permissiven 293 Zellen möglich, einer humanen, embryonalen Nierenzelllinie (ATCC CRL-1573), die durch die stabile Integration der adenoviralen E1 Region transformiert wurde und den viralen Defekt transkomplementiert (Graham & Prevec 1995).

Zur Herstellung infektiöser Viren wurden 293 Zellen bis zu einer Konfluenz von 60-70% in DMEM (supplementiert mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und mit einer MOI (Multiplicity of Infection) von etwa 10 infiziert. Die

Transfektionskontrolle erfolgte über das in jedem Adenovirusplasmid enthaltene GFP. Vor der Infektion wurde die Serumkonzentration durch einen Mediumwechsel auf 2% gesenkt. Durch diese Maßnahme sollte die Infektionseffizienz erhöht werden. Nach etwa 2 Tagen, wenn ein deutlicher zytopathischer Effekt (CPE) sichtbar wurde, wurden die Flaschen geerntet. Der CPE ist morphologisch durch Zellabrundung und dem Verlust der Adhäsionsfähigkeit der Zellen gekennzeichnet. Durch Auf- und Abpipettieren des Mediums wurde der Zellrasen vorsichtig resuspendiert und in ein 50ml Reagiergefäß überführt. Nach 10min Zentrifugation bei 500xg wurde das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen. Um eine möglichst hohe Ausbeute an infektiösen Partikeln zu erhalten, wurden 40 Kulturflaschen für eine Viruspräparation infiziert. Die Zellsuspensionen wurden während der Zentrifugations- und Waschschrte vereinigt, so daß die Zellen von zehn Kulturflaschen in einem Volumen von 2ml PBS aufgenommen werden konnten. Zur Lyse wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und sofort wieder aufgetaut und kräftig gevortext. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Suspension wurde bei 7.000xg und 4°C für 10min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Es folgte die Anreicherung und Reinigung der Viruspräparation auf einem Cäsiumchlorid-Stufengradienten, bestehend aus jeweils 3,5ml CsCl₂ der Dichten 1,4g/ml und 1,2g/ml. Auf diesen Gradienten wurde jeweils in 4ml die Ernte von zehn Zellkulturflaschen aufgetragen. Bei 28.000rpm (Rotor SW-28) und 10°C wurde für 4h ultrazentrifugiert. Mit einer Kanüle (Ø 0,8mm) wurde die Virusbande durch seitliches Einstechen in das Röhrchen in einem möglichst kleinen Volumen aus dem CsCl₂-Gradienten gezogen und mit 1 Vol. 2x Lagerungspuffer versetzt. Die Viruslösung wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

3.3.2 Titerbestimmung der Adenoviren

Der Gehalt an viralen Partikeln in einer Adenovirussuspension wurde photometrisch durch die Bestimmung der OD bei 260nm einer 1:20 Verdünnung in 0,1% SDS ermittelt. Eine OD₂₆₀=1 entspricht 10¹² viralen Partikeln/ml. Dies ist lediglich eine Aussage über die Gesamtzahl der viralen Partikel, um die Anzahl virulenter Partikel (Plaque forming Units, PFU) zu bestimmen, wurde eine Titerbestimmung mit Hilfe des GFP durchgeführt. Hierzu wurden Verdünnungsstufen von 10⁻⁷ bis 10⁻¹⁴ des präparierten Virus in DMEM mit 2% FBS angefertigt. Diese wurden zu jeweils einer Verdünnung pro Reihe in eine 96well Platte pipettiert, die mit 10.000 293-Zellen pro Well versehen worden war. Nach 10 Tagen

erfolgte die Auswertung der Titerbestimmung durch Auszählen der GFP-positiven Wells. Durch folgende Rechnung wurde die PFU/ml bestimmt: Für jedes GFP-positive Well wurden 0,1 zu 6 addiert (entspricht positiven Wells der Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6}). $TCID_{50}/ml = 10 * 10^{1+(Wert-0,5)}$. Dieser Wert wurde um $10^{-0,7}$ reduziert, um die PFU/ml zu ermitteln.

3.3.3 Dialyse der Adenoviren

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

Hierzu wurde die benötigte Adenovirusmenge in einem Volumen von mindestens 500µl in eine zuvor angefeuchtete Dialyskassette mit einer 0,8mm-Kanüle injiziert. Anschließend wurde die überschüssige Luft aus der Kassette abgezogen. Dialysiert wurde für 16h gegen Dialysepuffer, der einmal nach 12h ausgetauscht wurde. Danach wurde die Virussuspension aus der Kassette abgezogen und die OD aufgrund der infolge der Dialyse auftretenden Volumenänderung erneut bestimmt, wobei von gleichbleibender Infektiosität ausgegangen wurde.

3.4 Tierexperimentelle Methoden

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

3.4.1 Injektionen

Zwei Tage vor Beginn der CCl₄ Behandlung erfolgte die Injektion von Adenoviren mit 10^{12} infektiösen Viruspartikeln intravenös in die Schwanzvene. Die CCl₄ Injektionen erfolgten für 2 Wochen 3x wöchentlich intraperitoneal durch die Gabe von 10% CCl₄ in Mineralöl zu jeweils 10µl/g Gesamtkörpergewicht.

3.4.2 Töten der Tiere und Gewebeentnahme

Das Töten der Tiere erfolgte nach einer CO₂-Narkose durch Genickbruch. Anschließend wurde die Leber entnommen, ein Teil für Gefrierschnitte in flüssigem Stickstoff

schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die beiden medianen Leberlappen wurden ü/N in 4% Formalin fixiert und dann quer in 4 Abschnitte geteilt. Von diesen Scheiben wurden durch Mitarbeiter der Zell- und molekularen Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover, nach Einbettung in Paraffin 4µm Schnitte für H&E Färbung (s. 3.5.2) hergestellt. Zur Abschätzung der Anzahl an makroskopischer Knoten wurden alle erhabenen Wucherungen auf den Leberlappen ab einer Größe von 2x2x2mm ausgemessen und protokolliert.

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 H&E-Färbung

Die H&E-Färbung (Hämalaun und Eosin) ist eine klassische Färbemethode, um die Morphologie eines Gewebeschnittes beurteilen zu können. Hierbei sind die Zellkerne blau und das Zytoplasma blassrosa eingefärbt. Diese Färbung wurde auf Paraffin-Gewebeschnitten durch Mitarbeiter der Zell- und molekularen Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover, durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte zunächst durch 15min Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (abs., 90% und 70% Ethanol) gewässert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte für 5-10sec in Hämalaun getaucht und anschließend für 5min in lauwarmem Leitungswasser gebläut. Es folgte kurzes Waschen in dest. Wasser, danach wurden die Schnitte 2min in einer fertigen Eosinlösung gefärbt, die kurz vor Benutzung mit Eisessig angesäuert wurde. Nachfolgend wurden die Schnitte in dest. Wasser gewaschen, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und abs. Ethanol) behandelt und in Xylol bis zum Eindecken mit Entellan gelagert. Die Auswertung erfolgte in Kooperation mit Prof. K. Kamino, Zell- und molekulare Pathologie, MHH, Hannover.

3.5.2 Herstellung von Gefrierschnitten und Fixierung

Von dem bei -80°C gelagertem Lebergewebe der Mäuse wurden am Kryostaten nach Einbetten des Gewebes in Tissue Tek 7µm-Gefrierschnitte hergestellt. Diese wurden über Nacht getrocknet und dann bei Raumtemperatur für 30min in 4%-igem Paraformaldehyd in Cacodylatpuffer fixiert. Anschließend wurden die Schnitte für 2x 5min in 1xPBS gewaschen und mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Die getrockneten Schnitte

wurden dann bei -20°C gelagert und zügig für die folgenden Assays und immunhistochemischen Verfahren verwendet.

3.5.3 Apoptosenachweis durch TUNEL-Assay im histologischen Schnitt

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

Fixierte und bei -20°C gelagerte Gefrierschnitte aus Lebergewebe wurden aufgetaut. Nach zweimaligem Waschen in 1xPBS erfolgte eine Inkubation in Proteinase-K-Lösung (15 µg/ml) für 30 min. Nach einem weiteren Waschschrift in 1xPBS wurden die Schnitte für 5min in einer Permeabilisierungslösung (0,1% Triton, 0,1% Natriumcitrat) auf Eis inkubiert. Auf den nächsten Waschvorgang mit 1xPBS folgte die Zugabe des TUNEL-Mixes auf die Schnitte, es schloß sich eine Inkubation bei 37°C für 1,5 Stunden in einer feuchten Kammer an. Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS erfolgte die Auswertung an einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 456 nm.

3.5.4 DAPI-Färbung

Zur Darstellung von Zellkernen in histologischen Schnitt wurde mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) eine DNA-interkalierende Agens verwendet, welches fluoreszenz-mikroskopisch sichtbar ist (Jeppesen *et al.*, 1989). Die Färbung erfolgte über Inkubation in einer DAPI-Lösung (1µg/ml DAPI in PBS) für 15 min bei Raumtemperatur und anschließendem Waschen mit 1xPBS, oder durch das Verwenden einer mit DAPI versetzten mounting solution.

3.5.5 Immunhistochemischer Nachweis von PCNA, Albumin, HBsAg bzw. pHiston3

Der Nachweis von PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) diente der Detektion proliferierender Zellen. Positive Zellkerne befinden sich in der S-Phase. pHiston3 dagegen

wird in mitotisch aktiven Zellen nachgewiesen, und ist damit ebenfalls ein Marker für proliferierende Zellen. Die Albumin- bzw. HBsAg Expression diente dem Nachweis der Alb-Promotoraktivität. Albumin wird ausschließlich in ausdifferenzierten Hepatozyten exprimiert, ist also leberspezifisch reguliert. Innerhalb des TgN(Alb1HBV)44Bri Mausmodells wurde das Transgen HBsAg unter Kontrolle des Alb-Promotors in der Leber exprimiert. Für die immunhistochemischen Nachweise wurden bei -20°C gelagerte Gefrierschnitte der Leberproben aufgetaut und zunächst für 5min in 1xPBS gewaschen. Durch 15min Hitzecitratbehandlung in der Mikrowelle (240W) wurden die Zellen permeabilisiert. Nach 20min Abkühlzeit wurden die Schnitte für 2x 5min in 1xPBS gewaschen und anschließend für eine Stunde in einer feuchten Kammer mit dem entsprechenden Erstantikörper inkubiert. Die Antikörper wurden wie folgt jeweils in 1xPBS verdünnt angewendet: Anti-PCNA (Mouse) 1:150, Anti-pHiston3 (Rabbit) sowie Anti-Albumin (Rabbit) 1:50 und Anti-human HBsAg (Mouse) 1:80 in einem Ansatz. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurde danach in 1xPBS für 3x 3min gewaschen und anschließend für 45min in der feuchten Kammer mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert: Cy3-conjugated Anti-Mouse (1:300) für PCNA, Fitc-conjugated Anti-Rabbit für pHiston3 (1:200) sowie Fitc-conjugated Anti-Rabbit für Albumin (1:200) zusammen mit cy3-conjugated Anti-Mouse (1:150) für HBsAg. Nach abschließendem Waschen in 1xPBS wurde mit Fluoreszein Mounting Medium eingedeckt und die Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.5.6 Nukleare β -Catenin Färbung

β -Catenin ist ein 92kDa großes Protein, das an das cytoplasmatische Ende von E-Cadherin bindet. Dieses ist ein transmembranes Adhäsionsprotein, so dass die Färbung der immunhistochemischen Markierung der Zellwände in Gewebeschnitten dient. Gefrierschnitte der Leberproben wurden dafür aufgetaut und für 5min in 1xPBS gewaschen. Eventuell in den Zellen vorhandene interne Peroxidaseaktivität wurde durch Inkubation in 0,3% H_2O_2 in Methanol für 30min inhibiert. Nach 3x Waschen für jeweils 3min in 1xPBS folgte die Permeabilisierung durch 20min kochen in Tris-EDTA pH9,0. Nachdem die Lösung wieder auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden nach 5min Waschen in 1xPBS unspezifische Bindungen für 15min in 1% BSA geblockt. Erneutem Waschen folgte die Inkubation für 2 Stunden mit dem FITC gelabelten Anti β -Catenin Antikörper, der 1:50 in 0,05% BSA (in 1xPBS) verdünnt wurde. Die Schnitte wurden nach abschließendem 3maligen Waschen

mit Fluoreszein Mounting Medium eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Ausgezählt wurden Proben von 10 bzw. 15 Monate alten männlichen mTERC^{+/+} HBsAg⁺ und G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen, als Kontrolle dienten entsprechende HBsAg⁻ Tiere. Die Zellgröße wurde nach computergestützter Zell-Umfangsmessungen mit analySISDoku mittels Excel-Tabelle errechnet.

3.5.7 Feulgen-Färbung

Die Feulgen Färbung dient der Bestimmung des DNA-Gehalts von Zellkernen. Dazu wird die genomische DNA mit Schiff's Reagenz angefärbt und die Intensität anschließend mit Hilfe des Ahren's Computerprogrammes (freundlich zur Verfügung gestellt durch Dr. Soudah, Pathologie, MHH) anhand von Mikroskopbildern ausgewertet.

Zunächst wurden Paraffinschnitte (4µm) für 15min in Xylol deparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (abs. Ethanol, 90%, 70%) gewässert. Die Schnitte wurden für eine Stunde in 4% gepuffertem Formaldehyd (pH7) bei Raumtemperatur fixiert und danach kurz in Wasser gewaschen. In 5%-iger HCl wurden für 50min die Purinbasen der DNA durch Hydrolyse abgespalten. Nach Waschen der Schnitte in Wasser wurde exakt 20min mit Schiff's Reagenz gefärbt, wobei der enthaltene Farbstoff Pararosanilin an die nun freiliegenden Aldehydgruppen der DNA gebunden wurde. Anschließend wurde kurz in Wasser inkubiert. Nicht gebundener Farbstoff wurde zusätzlich für 20min mit Sulfidwasser aus dem Zytoplasma und den Zellkernen gewaschen und danach die Schnitte für 5min in Leitungswasser geschwenkt. Durch eine anschließende aufsteigende Alkoholreihe (jew. 2x 1min 70%, 90%, abs. Ethanol, anschließend noch einmal 2min abs. Ethanol) wurden die Schnitte entwässert und anschließend nach kurzem Schwenken in Xylol mit Entellan eingedeckt. Die Färbung wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und anschließend am Computer für zwei mTERC^{+/+} HBsAg⁻ Proben, eine mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Maus, zwei G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tiere und eine G3mTERC^{-/-} HBsAg⁻ Leber ausgewertet. Dabei wurden pro Schnitt mindestens 300 Zellkerne sowie 30 Lymphozyten als Referenzzellkerne ausgewertet. Es wurde darauf geachtet, dass bei den Messungen die Kriterien der von der ESACP (European Society of Analytical Cellular Pathology) vorgeschlagenen Richtlinien zur Qualitätssicherung eingehalten wurden (u.a. CV der Referenzzellen <5%, Korrelationskoeffizient Kernfläche IOD der Referenzzellen (r<0,4), etc.)

3.5.8 Telomerlängenbestimmung mittels Q-FISH

Zur Bestimmung der Telomerlängen wurden mit Hilfe einer Fluoreszein markierten spezifischen PNA Sonde (cy3-OO-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA) die Telomere *in situ* markiert und die Intensität der Signale quantitativ mittels Computersoftware (Lansdorp) ausgewertet. Die Menge gebundener Sonde und damit die Intensität der positiven Signale ist direkt proportional zur der Telomerlänge. Verwendet wurden Gefrierschnitte humaner Leberproben. Nach dem Auftauen und Waschen in 1x PBS wurden die Schnitte zunächst für 2min in 4% Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Nach Waschen in 1x PBS folgte für 15min bei 37°C die Degradierung der im Gewebe vorhandenen Proteine in einer vorgewärmten Pepsinlösung. Anschließend wurden die Schnitte in 1xPBS gewaschen und in 4% Formaldehyd für 2min fixiert. Dem Waschen in 1xPBS folgte nun die Dehydrierung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und abs. Ethanol). Nach Trocknen der Schnitte für etwa 5min wurden jeweils auf Deckgläschen Tropfen (ca. 15µl) der Hybridisierungslösung gegeben und die Proben invertiert eingedeckt. Bei 80°C wurde die DNA für 3min denaturiert und anschließend für 2 Stunden in einer feuchten Kammer mit der Sonde inkubiert. Die Deckgläschen wurden anschließend in WASH I bei kräftigem Schütteln entfernt und die Schnitte für 15min gewaschen. Nach 3x5min in TBS-Tween und einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und abs. Ethanol) wurden die Schnitte an der Luft getrocknet und mit DAPI mounting medium eingedeckt. Nach etwa 15min waren die Chromosomen durch DAPI angefärbt. Die Lagerung der gefärbten Schnitte erfolgte bei 4°C bis zur zeitnahen Auswertung. Dazu wurden von Hepatozyten- bzw. Stellatzellkernen jeweils Dapi- und korrespondierende cy3-Aufnahmen in 1000x Vergrößerung mit einer digitalen Mikroskopkamera bei konstanten Einstellungen (1,25sec Verschlusszeit) angefertigt. Die cy3 Bilder wurden anschließend mit Hilfe des TFL-TELO V1.0a Programms ausgewertet. Eine Probe wurde bei jeder Hybridisierung mitlaufen gelassen und diente als interner Abgleich der Versuche. Insgesamt wurden 245 Hepatozyten-Zellkerne aus stark zirrhotischer Leber (AIH#310 n=23, AIH#151 n=47, PBC#162 n=15, PSC#360 n=62, eth.C.#358 n=64 und Hep#96 n=34) mit 78 Hepatozyten-Zellkernen aus Kontrollleber verglichen bzw. die Fluoreszenz von 170 Stellatzellen (AIH#310 n=12, AIH#151 n=26, PSC#360 n=51, eth.C.#358 n=60 und Hep#96 n=21) und von 26 Lymphozyten-Zellkernen (Hep#96 n=11 und PBC#162 n=15) ermittelt. Desweiteren wurden 52 Hepatozyten-Zellkerne aus mild ausgeprägter Zirrhose untersucht (PSC#334 n=73 und PSC#428 n=77).

4 ERGEBNISSE

4.1 Telomerverkürzung in der humanen Leberzirrhose

Das Stadium der Leberzirrhose ist, unabhängig von der Ethnologie der chronischen Erkrankung, durch eine generelle Telomerverkürzung gekennzeichnet. Bisherige Arbeiten haben die Telomerlänge jedoch in Gesamtlebergewebe und nicht zelltypspezifisch untersucht. Innerhalb der Zirrhose kommt es jedoch auf Grund der starken Umbauvorgänge, wie z.B. Ausbildung von fibrotischem Narbengewebe, zu starken Veränderungen der Zellkomposition der Leber, was Auswirkungen auf die Gesamt-Telomerlänge haben könnte.

Um zu überprüfen, ob speziell in den Hepatozyten Telomerverkürzung das Stadium der Zirrhose kennzeichnet, wurde mit Hilfe von Q-FISH (quantitative Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) zelltypspezifisch die Telomer-Fluoreszenzintensität (TFI) bestimmt. Die TFI korreliert direkt proportional mit der Telomerlänge (Lansdorp *et al.* 1996). Um die Telomersignale den unterschiedlichen Zelltypen zuordnen zu können, wurden die Zellkerne zusätzlich mit DAPI angefärbt. So konnten die Hepatozyten-Zellkerne auf Grund ihrer Zellkernmorphologie und ihrer Anordnung klar von den länglichen Zellkernen der Stellatzellen (s. Abb. 8) und den kleineren Zellkernen der Lymphozyten unterschieden werden.

4.1.1 Hepatozyten in Leberzirrhosegewebe haben signifikant kürzere Telomere als Hepatozyten in nicht-zirrhosischer Kontrollleber

Die Hepatozyten aus 6 Proben stark ausgeprägter Leberzirrhose unterschiedlicher Ethnologie (2x AIH, 1x PSC, 1x PBC, 1x eth. Zirrhose und 1x Hepatitiszirrhose) zeigten eine signifikant verminderte TFI von $100,0 \pm 44,2$ im Vergleich zu den Kontroll-Hepatozyten aus nicht-zirrhosischer Leber (TFI von $214,7 \pm 72,6$, $p < 0,0001$, s. Abb. 8D). Innerhalb der Leberzirrhoseproben zeigten Stellatzellen eine mittlere TFI von $143,5 \pm 75,3$ und damit einen signifikant höheren Wert als die Hepatozyten ($p < 0,0001$). Infiltrierende Lymphozyten hatten mit einer mittleren TFI von $205,0 \pm 102,5$ ebenfalls signifikant höhere Werte als Hepatozyten der zirrhosischen Lebern ($p < 0,0001$, s. Abb. 8D).

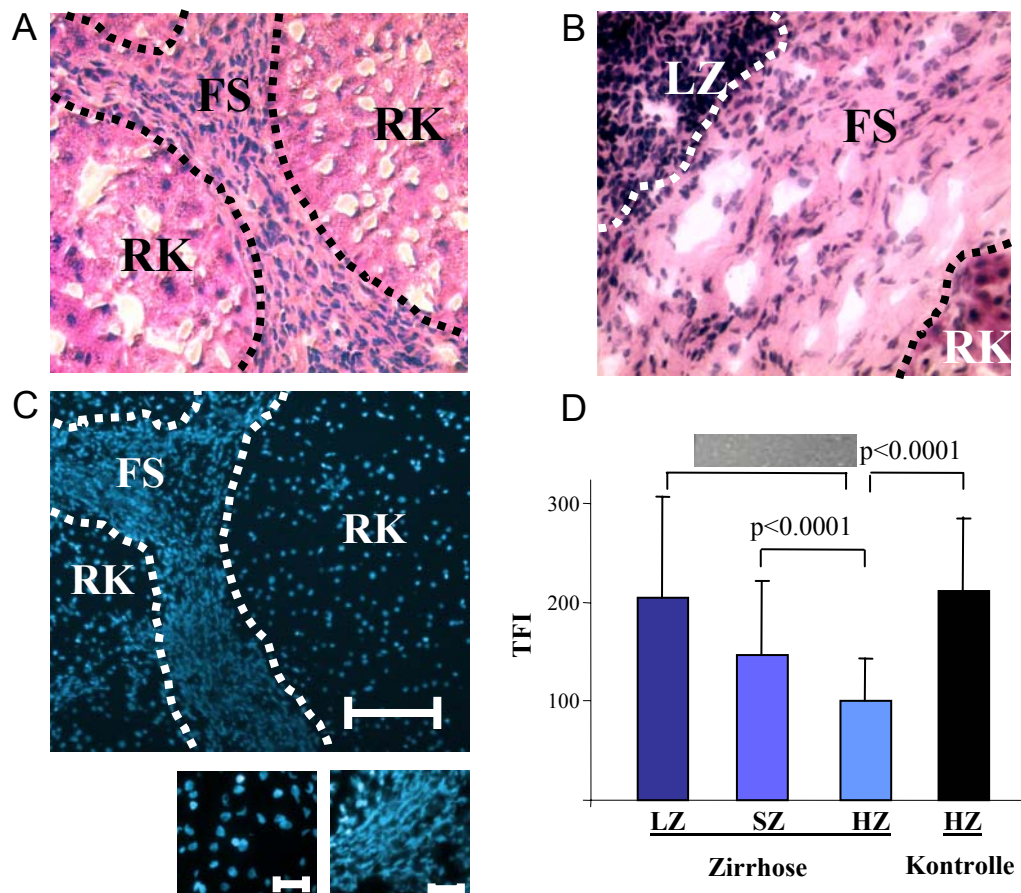


Abb. 8: Hepatozyten-spezifische Telomerverkürzung im Stadium der Leberzirrhose. A) und B) Repräsentative Fotos H&E gefärbter Schnitte von Leberzirrhose-Proben. A) Fibrotische Septen (FS) waren morphologisch klar von Hepatozyten in den Regeneratsknoten (RK) abgrenzbar. B) Lymphozyteninfiltrate (LZ) unterschieden sich morphologisch klar von den fibrotischen Septen (FS) und den Regeneratsknoten (RK). C) DAPI gefärbte Zellkerne in einer Leberzirrhose-Probe. Die Hepatozyten-Zellkerne in den Regeneratsknoten (RK) sind von Stellatzellen in fibroblastischen Septen (FS) klar zu differenzieren. D) Diagramm der mittleren TFI-Werte von Hepatozyten (HZ) zirrhotischer und nicht-zirrhotischer Leberproben sowie von Stellatzellen (SZ) und Lymphozyten (LZ) der Leberzirrhosen. Insbesondere die Hepatozyten der zirrhotischen Lebern zeigten eine deutliche Telomerverkürzung im Vergleich zu den Kontroll-Hepatozyten. Stellatzellen und Lymphozyten zeigten im Vergleich zu den Hepatozyten im Zirrhosestadium relativ lange Telomere.

Im Einklang mit der verminderten mittleren TFI von Hepatozyten im Stadium der Leberzirrhose zeigte die Verteilung der einzelnen Zellkern-TFIs ($n=245$) eine deutliche Verschiebung zu niedrigen TFI-Werten (Linksverschiebung, Abb. 9B), sowohl im Vergleich zu Hepatozyten in nicht-zirrhotischer Leber ($n=78$, Abb. 9A) als auch im Vergleich zu Stellatzellen aus fibroblastischen Septen im Stadium der Leberzirrhose ($n=170$, Abb. 9C). Diese Analyse ergab zudem einen erhöhten Anteil von Zellen mit sehr geringen TFI-Werten in der Gruppe der Hepatozyten aus Zirrhoseleber-Proben: 76,3% dieser Hepatozyten zeigten eine TFI von ≤ 125 im Gegensatz von nur 9,0% der Kontroll-

Hepatozyten und 40,9% der Stellatzellen im Stadium der Leberzirrhose (in Abbildung 9 jeweils rot hinterlegt).

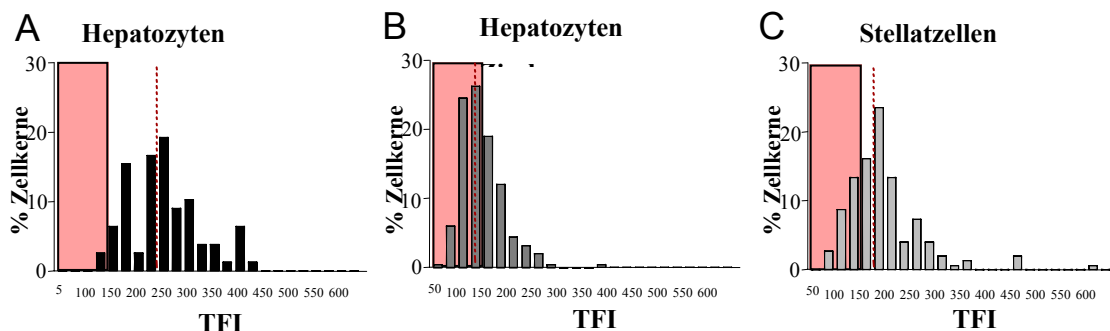


Abb. 9: Erhöhter Anteil an Zellkernen mit verminderter TFI in Hepatozyten aus Leber zirrhoseproben. A-C) Die Diagramme zeigen die Verteilung der TFI-Werte für Zellkerne von A) Hepatozyten aus Kontrollleber, B) Hepatozyten bzw. C) Stellatzellen der Leberzirrhoseproben. Die Hepatozyten der Leberzirrhoseproben zeigten im Vergleich die meisten Zellkerne mit TFIs ≤ 125 (Bereich im Diagramm rot hinterlegt).

4.1.2 Die Telomerverkürzung der Hepatozyten ist abhängig vom Stadium der Leberzirrhose

Um zu überprüfen, ob die Telomerverkürzung in den Hepatozyten mit dem Stadium der Leberzirrhose korrelierte, untersuchten wir die Proben unterteilt nach Zirrhosegrad nach den Ishak-Kriterien (Ishak et al. 1995). Hierzu wurden die hepatozellulären Telomerlängen von 6 Leberproben mit stark ausgeprägter Leberzirrhose (s. oben) mit denen von 2 PSC-Proben mit milder Leberzirrhose verglichen. Für die Hepatozyten der mild ausgeprägten Leberzirrhose ergab sich eine mittlere TFI von $205,6 \pm 109,2$, die damit signifikant höher war als die der Hepatozyten aus den Proben mit starker Zirrhose und einer mittleren TFI von $100,0 \pm 44,2$ ($p < 0,0001$, s. Abb. 10). Hepatozyten im Stadium schwach ausgeprägter Leberzirrhose hatten damit nicht signifikant kürzere Telomere als Hepatozyten aus nicht-zirrhotoser Kontrollleber mit einer mittleren TFI von $214,7 \pm 72,6$ ($p = 0,5441$). Allerdings können diese Daten auf Grund der geringen Fallzahlen nur eine Tendenz aufzeigen.

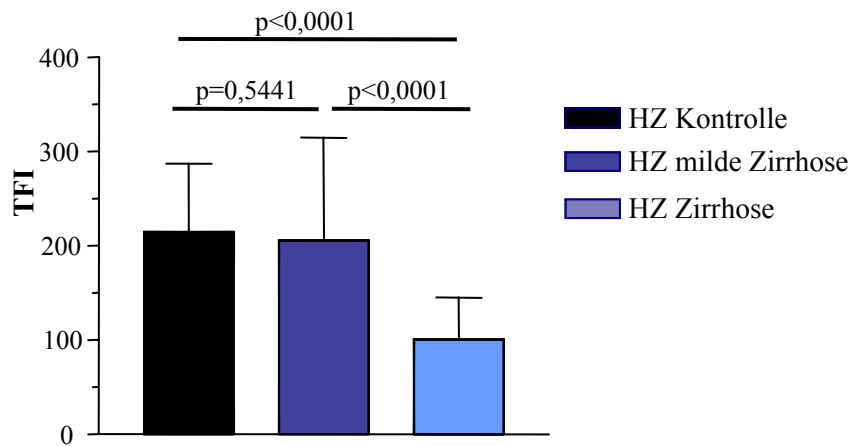


Abb. 10: Die verminderte mittlere TFI der Hepatozyten korreliert mit der Zirrhoseprogression. Diagramm der mittleren TFI Werte von Hepatozyten aus Kontrollleber, aus Leberproben mit milder Leberzirrhose und mit stark ausgeprägter Leberzirrhose. Die TFI Werte der Hepatozyten von Proben milder Leberzirrhose unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontroll-Hepatozyten, waren jedoch signifikant größer als die der Hepatozyten aus Proben stark ausgeprägter Leberzirrhose.

4.2 Telomerverkürzung im mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mausmodell

Nach den Ergebnissen aus der menschlichen Leberzirrhose sollte der Einfluss von Telomerverkürzung im Rahmen der chronischen Leberschädigung im Mausmodell untersucht werden. Als Modell für Telomerverkürzung diente die mTERC^{-/-} Maus, in der die Deletion des Gens der für die Enzymfunktion essentiellen Telomerase RNA Komponente (TERC) zur Telomerase-Inaktivierung führt (Blasco et.al. 1997).

Als Modell der chronischen Leberschädigung diente die AlbTg HBsAg Maus, das Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) Hepatozyten-spezifisch unter Kontrolle des Albumin Promotors exprimiert, wodurch eine chronische Leberschädigung und schließlich hepatozelluläre Karzinome hervorgerufen werden (Chisari et.al. 1987). Durch Kreuzen dieser beiden Stämme wurden in dieser Arbeit Mäuse mit folgenden Genotypen generiert (s. Paarungsschema, Abb. 11): mTERC^{+/-} bzw. mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäuse mit langen Telomeren sowie leberspezifischer HBsAg Expression und damit chronischer Leberschädigung. mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse, die, ebenfalls einer chronischen Leberschädigung ausgesetzt, in der ersten, zweiten oder dritten Generation fehlende Telomerase Aktivität haben. Während die G1 und G2mTERC^{-/-} Mäuse ausreichende Telomerreserven haben, treten bei den G3mTERC^{-/-} Mäusen kritisch kurze Telomere auf. Als Kontrollen dienten die jeweils entsprechenden mTERC-Genotypen ohne HBsAg Expression (HBsAg⁻).

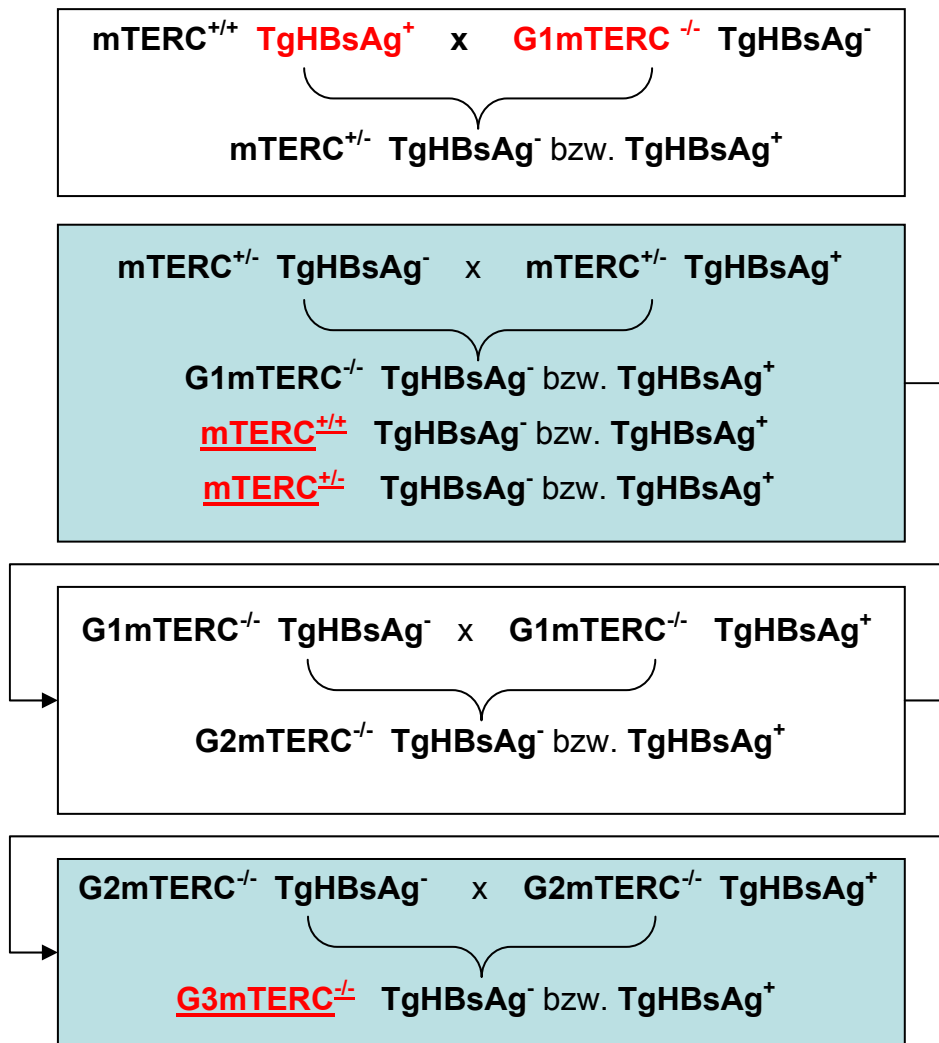


Abb. 11: Verpaarungsschema der in dieser Arbeit generierten Mäuse aus der Kreuzung von $mTERC^{-/-}$ Mäusen mit $HBsAg^{+}$ Mäusen. Nach der Kombination beider Genotype wurden $mTERC^{+/-} HBsAg^{+}$ und $mTERC^{+/-} HBsAg^{-}$ Mäuse miteinander verpaart, um $G1mTERC^{-/-} HBsAg^{+}$ Mäuse zu erhalten. Weitere Nachkommen dieser Kreuzung waren $mTERC^{+/+}$ bzw. $mTERC^{+/-}$ Mäuse, jeweils $HBsAg^{+}$ oder $HBsAg^{-}$. Durch weitere Vepaarung homozygoter $mTERC^{-/-}$ Mäuse, jeweils $HBsAg^{+}$ bzw. $HBsAg^{-}$, wurden $G3mTERC^{-/-} HBsAg^{+}$ bzw. $HBsAg^{-}$ Mäuse generiert.

4.2.1 Die Kombination von verkürzten Telomeren und chronischer Leberschädigung führt im Mausmodell zu verringertem Überleben

Untersucht wurde das Überleben der oben beschriebenen Mausgruppen (s. Tabelle 1). Es wurde zwischen männlichen und weiblichen Tieren unterschieden, da die HBsAg Expression in den männlichen Tieren hormonell bedingt stärker ist (Chisari *et al.* 1989). Alle Gruppen wurden über einen Zeitraum von 15 Monaten beobachtet. Die $mTERC^{+/+}$ bzw. $mTERC^{+/-}$ Tiere wurden hier und in allen folgenden Versuchen zusammengefasst dargestellt, da die heterozygote Deletion neben einem hypomorphen Effekt auf Telomer-Verlängerung keinen Phänotypen *in vivo* erzeugt (Hodes *et al.* 2002).

Tabelle 1: Die Anzahl der für die Überlebenskurven in den jeweiligen Gruppen herangezogenen Tiere.

mTERC HBsAg	mTERC ^{+/+} bzw. mTERC ^{+/-}				G3mTERC ^{-/-}				G1 und G2mTERC ^{-/-}			
	HBsAg ⁺		HBsAg ⁻		HBsAg ⁺		HBsAg ⁻		HBsAg ⁺		HBsAg ⁻	
Geschlecht	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Anzahl gesamt	47	40	38	29	38	37	30	23	38	28	51	33
bis 5 Monate	47	40	38	29	38	37	30	23	38	28	51	33
bis 10 Monate	34	27	27	23	28	24	19	11	32	23	37	20
bis 15 Monate	12	11	10	8	9	6	7	6	15	11	11	10

Die mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäuse zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Überlebensrate der mTERC^{+/+} HBsAg⁻ Kontrollmäuse. Im Gegensatz dazu hatten G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tiere sowohl im Vergleich zu mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen ($p=0,0004$) als auch zu G3mTERC^{-/-} HBsAg⁻ Tieren ($p=0,0209$) eine signifikant verminderte Überlebensrate (s. Abb. 12A). Das Überleben der G1 und G2mTERC^{-/-} Mäuse war unabhängig von der HBsAg Expression im Vergleich zu mTERC^{+/+} HBsAg⁺ bzw. HBsAg⁻ Mäusen unverändert (s. Abb 12B). Diese Daten indizieren, dass die durch HBsAg Expression verursachte chronische Leberschädigung nicht bei dem Verlust von Telomerase Aktivität *per se*, sondern erst im Zusammenhang mit verkürzten Telomeren einen negativen Einfluss auf das Überleben der Mäuse im Beobachtungszeitraum hatte.

Im Einklang mit der stärkeren HBsAg Expression und damit einhergehenden stärkeren Leberschädigung, zeigten männliche G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tiere im Vergleich zu weiblichen G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen ein tendentiell, aber auf Grund der geringen Fallzahl nicht signifikant, verkürztes Überleben ($p=0,3018$). Innerhalb der männlichen Tiere ergab sich für G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tiere sowohl im Vergleich zu G3mTERC^{-/-} HBsAg⁻ Mäusen ($p=0,0375$) als auch zu den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Tieren ($p=0,0034$) signifikant verkürztes Überleben. In gleicher Weise zeigten die weiblichen G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse gegenüber den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen einen signifikanten Unterschied ($p=0,0443$, Abb. 12C). Der Unterschied gegenüber den weiblichen G3mTERC^{-/-} HBsAg⁻ Mäusen war auf Grund der geringen Fallzahl jedoch nicht signifikant.

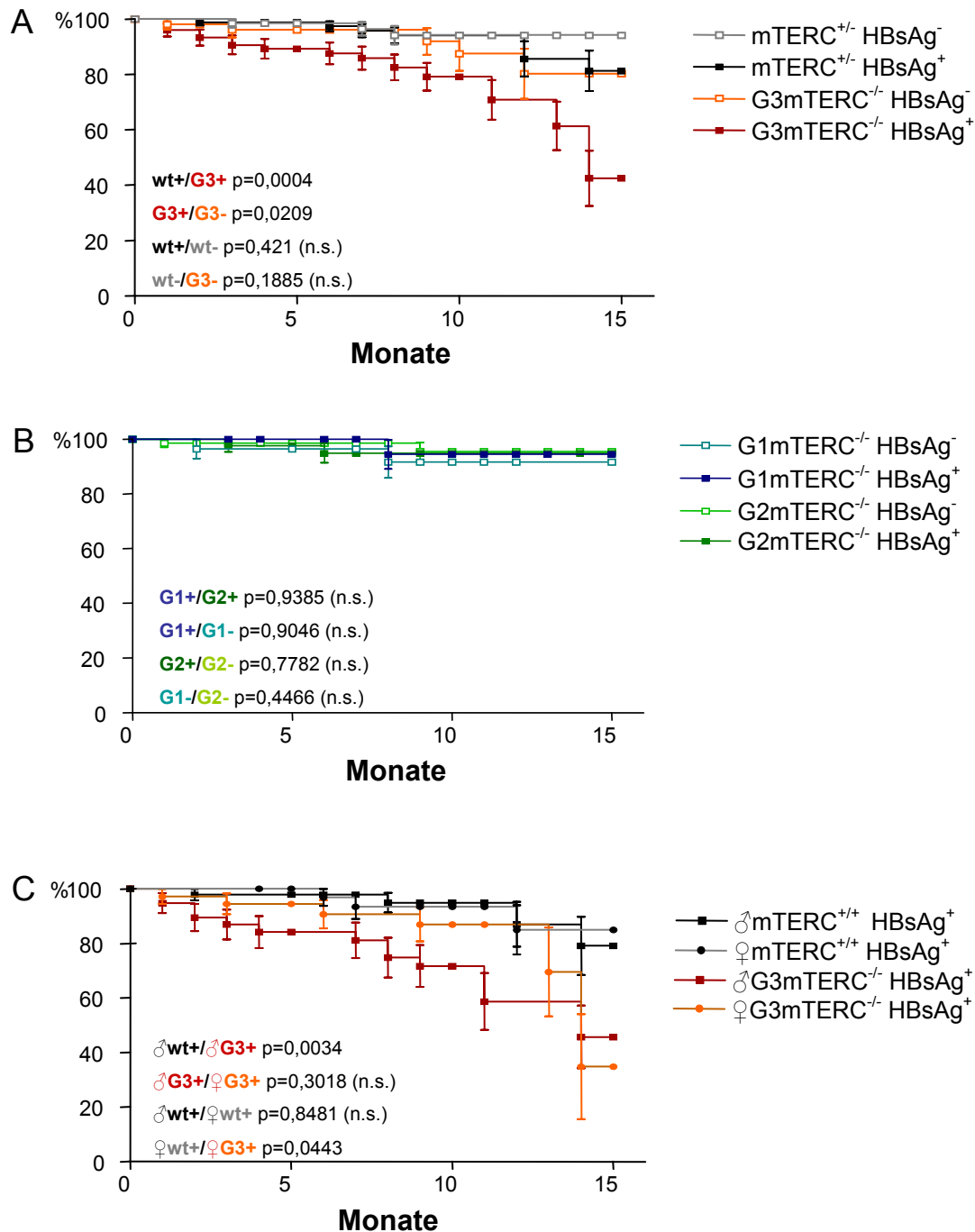


Abb. 12: Vermindertes Überleben der Mäuse mit kurzen Telomeren und gleichzeitiger chronischer Leberschädigung. A) Zusammengefasst dargestellt sind die Überlebenskurven männlicher und weiblicher Tiere der induzierten Genotype: G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse hatten ein signifikant verkürztes Überleben sowohl im Vergleich zu G3mTERC^{-/-} HBsAg⁻ Mäusen als auch zu mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Tieren. Innerhalb der mTERC^{+/+} Mäuse hatte HBsAg Expression keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben. B) Das Überleben aller G1 bzw. G2mTERC^{-/-} Tiere zeigte unabhängig von der HBsAg Expression keinen Unterschied im Vergleich zu den mTERC^{+/+} Mäusen. C) Getrenntgeschlechtliche Darstellung des Überlebens von HBsAg⁺ Mäusen der induzierten Genotype. Männliche und weibliche G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse zeigten ein verkürztes Überleben im Vergleich zu männlichen und weiblichen mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen. Männliche G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse zeigten ein tendentiell aber nicht-signifikant verkürztes Überleben im Vergleich zu weiblichen G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tieren.

4.2.2 G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse entwickeln verstärkt Aneuploidie, aber weniger Foci und HCC als mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäuse

Ein Grund für das verminderte Überleben der G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse könnte in der Entwicklung von HCC liegen. Um dies beurteilen zu können, wurde die Anzahl, Größe und Inzidenz makroskopischer Leberknoten, von Adenomen sowie von hepatozellulären Karzinomen (HCC) bestimmt und H&E Färbungen der Leberproben histologisch analysiert. Untersucht wurden Mausgruppen von 5, 10 bzw. 15 Monate alten mTERC^{+/+} HBsAg⁺ bzw. G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen, sowie die entsprechenden HBsAg⁻ Kontrolltiere. Es wurde zwischen männlichen und weiblichen Tieren unterschieden.

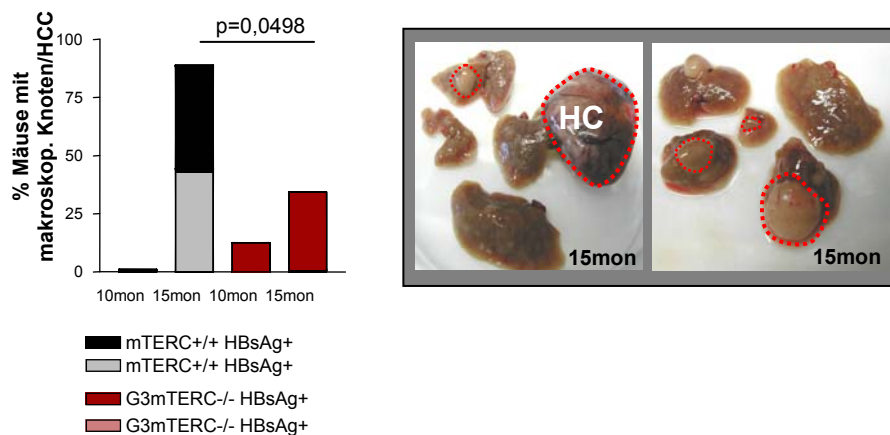


Abb. 13: Durch Telomerverkürzung verursachte verminderte Inzidenz makroskopischer Tumore und von HCC. Diagramm der Inzidenz von makroskopischen Knoten und von HCC in 10 und 15 Monate alten mTERC^{+/+} HBsAg⁺ bzw. G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen. Die mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäuse zeigten signifikant häufiger makroskopische Knoten ($p=0,0498$) und entwickelten im Gegensatz zu den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen zu 44,5% HCC. Die Fotos zeigen repräsentativ makroskopische Knoten der Leberlappen 15 Monate alter mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Tiere.

Die HBsAg⁻ Mäuse ($n=58$), sowie 5 Monate ($\sigma n=12$, $\text{♀} n=10$) und 10 Monate ($\sigma n=16$, $\text{♀} n=10$) alte mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Tiere wiesen generell keine makroskopische Knoten auf. Auch bei den 15 Monate alten weiblichen mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Tieren ($n=8$) wurden keine makroskopisch sichtbaren Tumore beobachtet. Dagegen entwickelten 8 von 9 der 15 Monate alten männlichen mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Tiere makroskopische Lebertumore (88,9%), von denen wiederum 4 als HCC charakterisiert wurden (50%, entspricht 44,5% der Gesamtanzahl der Mäuse, s. Abb. 13). Bei den männlichen G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen ($n=7$) entwickelte 1 von 7 Tieren (14,3%) bei 10 Monaten einen makroskopischen Knoten, der jedoch histologisch als Adenom charakterisiert wurde. Die 15 Monate alten männlichen G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse ($n=9$) zeigten in 36,7% makroskopisch sichtbare

Tumore. Histologische Untersuchungen zeigten in diesen Fällen das Vorliegen von Adenomen. Die $G3mTERC^{-/-}$ $HBsAg^{+}$ Tiere entwickelten bis zu diesem Zeitwert, im Gegensatz zu den $mTERC^{+/+}$ $HBsAg^{+}$ Tieren, in keinem Fall HCC (s. Abb. 13). Bei den $G3mTERC^{-/-}$ $HBsAg^{+}$ Mäusen zeigten alle weiblichen ($n=27$) und die 5 Monate alten männlichen Mäuse ($n=5$) keine makroskopischen Auffälligkeiten.

Des Weiteren wurden die Proben hinsichtlich Auftreten und Anzahl von Foci als Krebsvorstufen untersucht. Die Anzahl von Foci war in männlichen $G3mTERC^{-/-}$ $HBsAg^{+}$ Mäusen sowohl bei 10 als auch bei 15 Monaten signifikant geringer als in den männlichen $mTERC^{+/+}$ $HBsAg^{+}$ Mäusen ($p=0,0177$ bzw. $p=0,0007$, s. Abb. 14A). Die weiblichen Tiere entwickelten erst bei 15 Monaten Foci und zwar in den $G3mTERC^{-/-}$ $HBsAg^{+}$ Mäusen signifikant weniger als in den $mTERC^{+/+}$ $HBsAg^{+}$ Mäusen ($p=0,0048$, s. Abb. 14B).

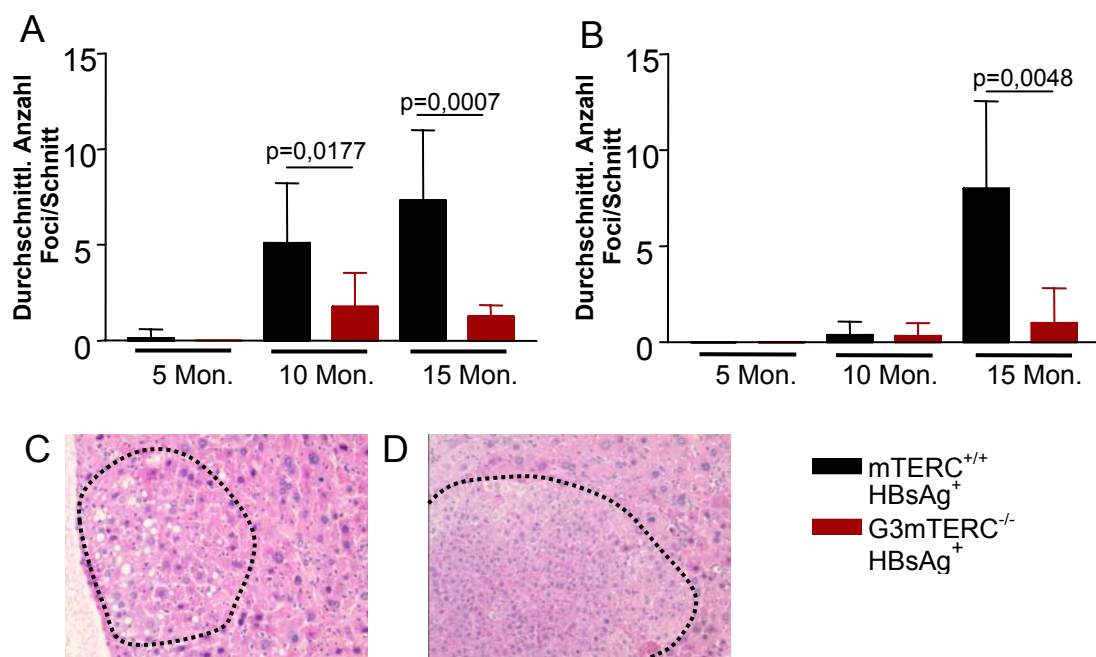


Abb. 14: Durch Telomerverkürzung verminderte Foci Inzidenz. A) Darstellung der durchschnittlichen Anzahl von Foci pro Leberquerschnitt bei männlichen $HBsAg^{+}$ Tieren. B) Diagramm der durchschnittlichen Anzahl an Foci pro Leberquerschnitt bei weiblichen $HBsAg^{+}$ Tieren. C und D) Repräsentative Fotos von Foci in H&E gefärbten histologischen Leberschnitten.

Ein weiteres wichtiges Merkmal der Tumorentwicklung ist chromosomale Instabilität, die sich in Aneuploidie widerspiegelt. Mit Hilfe der Feulgenfärbung wurde in Proben männlicher 15 Monate alter $mTERC^{+/+}$ $HBsAg^{+}$ bzw. $G3mTERC^{-/-}$ $HBsAg^{+}$ Mäuse sowie entsprechender $HBsAg^{-}$ Mäuse der DNA-Gehalt der Hepatozyten-Zellkerne bestimmt. Die Auswertung ergab für die $mTERC^{+/+}$ $HBsAg^{-}$ Proben eine für Lebergewebe normale DNA-

Polyploidie mit einer Verteilung auf 2N und 4N (s. Tabelle 2 und Abb. 15). Die mTERC^{+/+} HBsAg⁺ bzw. die G3mTERC^{-/-} HBsAg⁻ Proben zeigten im Vergleich zu den mTERC^{+/+} HBsAg⁻ Mäusen keinen signifikanten Unterschied. Die G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse dagegen zeigten eine deutlich abweichende Verteilung des DNA-Gehaltes: Mit 32,9±2,8% wurden vermehrt Zellkerne detektiert, die einen DNA Gehalt zwischen 2N und 4N aufwiesen, was normalerweise proliferierenden Zellen in der S-Phase entspricht. Dies können jedoch auch aneuploide Zellkerne sein, was in diesem Fall wahrscheinlicher ist, da durch PCNA-Färbung kein erhöhter, sondern eher verminderter Anteil an proliferierenden Zellen nachgewiesen werden konnte (s. 4.6). Zusätzlich zeigte die Feulgen Untersuchung, dass die G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse, als einzige der untersuchten Gruppen, Zellkerne mit abnormal erhöhtem DNA-Gehalt aufwiesen (12,4±10,0% im Vergleich zu 0% der Zellen der restlichen untersuchten Gruppen), mit einer auffällig erhöhten Ploidie von bis zu 22,55±8,15.

Tabelle 2: Darstellung der durch Feulgen-Färbung ermittelten prozentualen Verteilungen des DNA-Gehaltes in Hepatozyten der untersuchten Proben männlicher Mäuse.

	mTERC ^{+/+} HBsAg ⁻	G3mTERC ^{-/-} HBsAg ⁻	mTERC ^{+/+} HBsAg ⁺	G3mTERC ^{-/-} HBsAg ⁺
2N [%]	84,45±4,95	91,8	90,2	56,65±7,65
2N<>4N [%]	9,23±4,75	5,7	9,8	32,9±2,8
4N [%]	5,9±0,2	2,5	0,0	10,45±10,45
>4N [%]	0,0±0,0	0,0	0,0	12,4±10,0
Ploidie	1,95±0,05- 9,35±0,45	2,0-7,0	1,9-7,4	2,0±0,0- 22,55±8,15

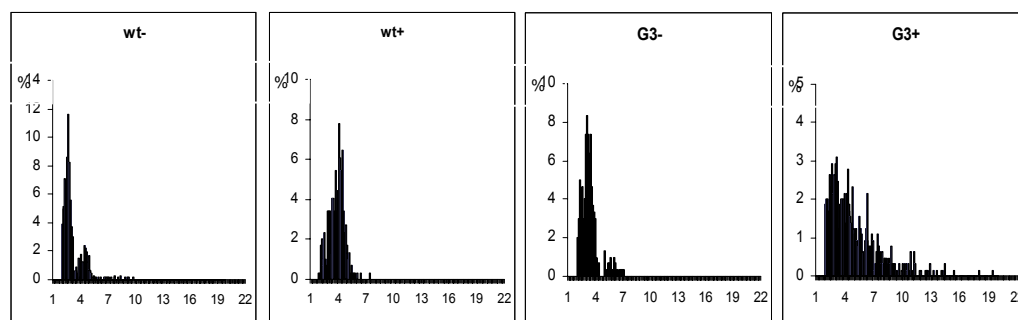


Abb. 15: Vermehrte Aneuploidie in G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen. mTERC^{+/+} HBsAg⁻ bzw. HBsAg⁺ Mäuse sowie die HBsAg⁻ G3mTERC^{-/-} Maus zeigten jeweils eine für Lebergewebe normale Verteilung auf 2N und 4N. Dagegen findet sich in G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen ein großer Anteil aneuploider Hepatozyten mit einer weiten Spanne an unterschiedlichem DNA-Gehalt und deutlich erhöhten Werten.

4.2.3 Ähnliches Ausmaß an Hepatitis in mTERC^{+/+} HBsAg⁺ und G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen

Unsere Daten zur Tumorentwicklung zeigten eine vermehrte Aneuploidie bei gleichzeitig vermindertem Tumorprogress in den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen im Vergleich zu den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen. Um einen Zusammenhang zum Ausmaß der durch die HBsAg Expression verursachten generellen chronischen Schädigung zu untersuchen, wurden H&E gefärbte Proben von 5, 10 bzw. 15 Monate alten mTERC^{+/+} HBsAg⁺ und G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen sowie der HBsAg⁻ Kontrolltiere histologisch hinsichtlich Hepatitis untersucht. Hepatitisentwicklung, gekennzeichnet durch Lymphozyten-Infiltration und Mikrogranuloma sowie nekrotische bzw. degenerierte Zellen (s. Abb. 16), trat nur in HBsAg⁺ Mäusen auf.

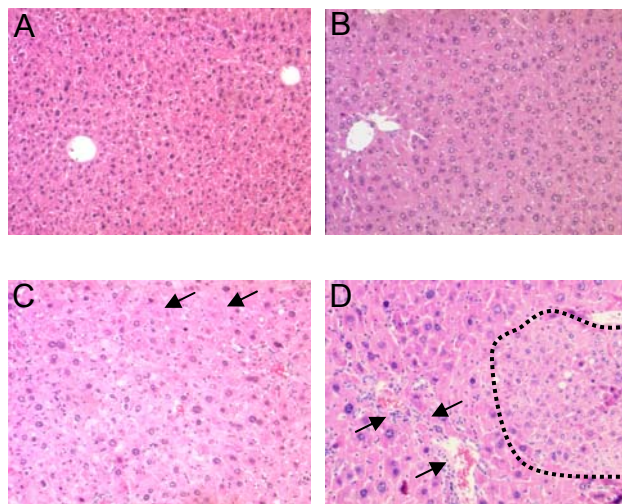


Abb. 16: Repräsentative Fotos von H&E gefärbten Leberschnitten. Dargestellt ist A) normales Lebergewebe, B) leichte Hepatitis, gekennzeichnet durch Leukozyten-Infiltration, C) nekrotische Zellen (Pfeile), D) stärker ausgeprägte Hepatitis mit deutlicher Leukozyten-Infiltration (Pfeile).

Bei 5 Monate alten Tieren zeigte sich eine leichte Tendenz zu einer verminderten Rate an Hepatitis in G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen im Vergleich zu den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäuse. Allerdings war der Unterschied nicht signifikant und zu späteren Zeitwerten nicht mehr nachweisbar (s. Abb. 17). Die weiblichen HBsAg⁺ Mäuse hatten tendentiell später Hepatitis, als die männlichen HBsAg⁺ Tiere.

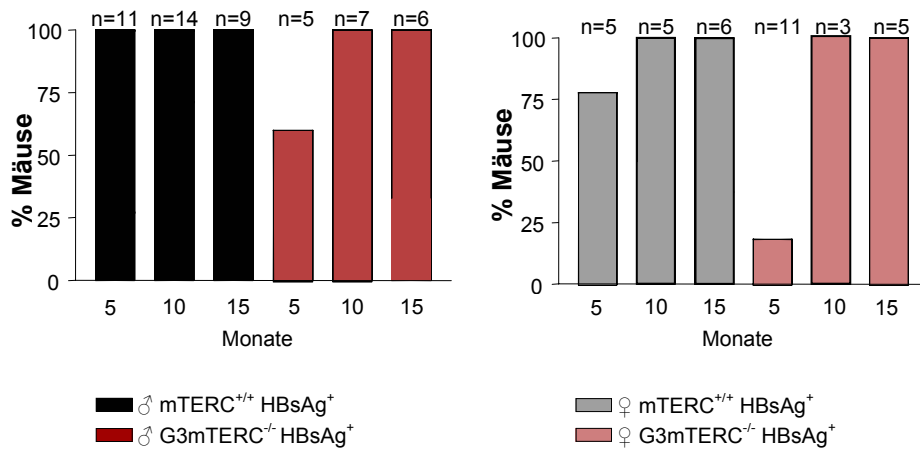


Abb. 17: Grafische Darstellung der Verteilung von Hepatitis bei 5, 10 bzw. 15 Monate alten mTERC^{+/+} bzw. G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tieren. A) Diagramm des prozentualen Anteils an Mäusen mit Hepatitis der männlichen mTERC^{+/+} HBsAg⁺ und G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tiere. B) Diagramm des prozentualen Anteils an Mäusen mit Hepatitis der weiblichen mTERC^{+/+} HBsAg⁺ und G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tiere. Die weiblichen Tiere hatten tendentiell später Hepatitis als die männlichen Mäuse.

4.2.4 Vermindertes Wachstum HBsAg-negativer Regenerate in G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen im Vergleich zu mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen

Aus der Charakterisierung der HBsAg⁺ Maus war bekannt, dass sich mit zunehmendem Alter der Mäuse im Lebergewebe Bereiche bildeten, in denen durch transkriptionelle Veränderungen HBsAg nicht mehr exprimiert wurde (Chisari et al. 1989). Um die Expression des HBsAg Gens in der Leber unserer Versuchstiere zu untersuchen, wurden die Genprodukte mit Hilfe eines HBsAg-spezifischen Antikörpers immunhistochemisch im Zytoplasma der Hepatozyten nachgewiesen (s. Abb. 18A).

Die Auswertung ergab für 3 der 4 untersuchten männlichen mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäuse eine 100%ige Färbung bei 5 Monaten (s. Abb. 18B). Bei 10 Monaten (n=9) entwickelten sich zu 34,56±36,38% HBsAg negative Bereiche und bei 15 Monate alten Tieren (n=5) wurden zu 60,6±25,33% große konfluierende Areale ohne HBsAg Expression gesehen (s. Abb. 18B). Die männlichen G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse zeigten, vergleichbar mit den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Tieren, bei 5 Monaten (n=5) keine negativen Bereiche, hatten jedoch bei 10 Monaten (n=4) mit 10±7,91% und bei 15 Monaten (n=5) mit 36±20,43% weniger HBsAg negative Hepatozyten als die mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Tiere (s. Abb. 18B). In den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen entwickelten sich damit früher und in größerem Umfang Bereiche, in denen keine HBsAg Expression nachgewiesen werden konnte. Die Färbung auf HBsAg blieb bei den mTERC^{+/+} HBsAg⁻ bzw. G3mTERC^{-/-} HBsAg⁻ Mäusen wie erwartet negativ (s. Abb. 18A).

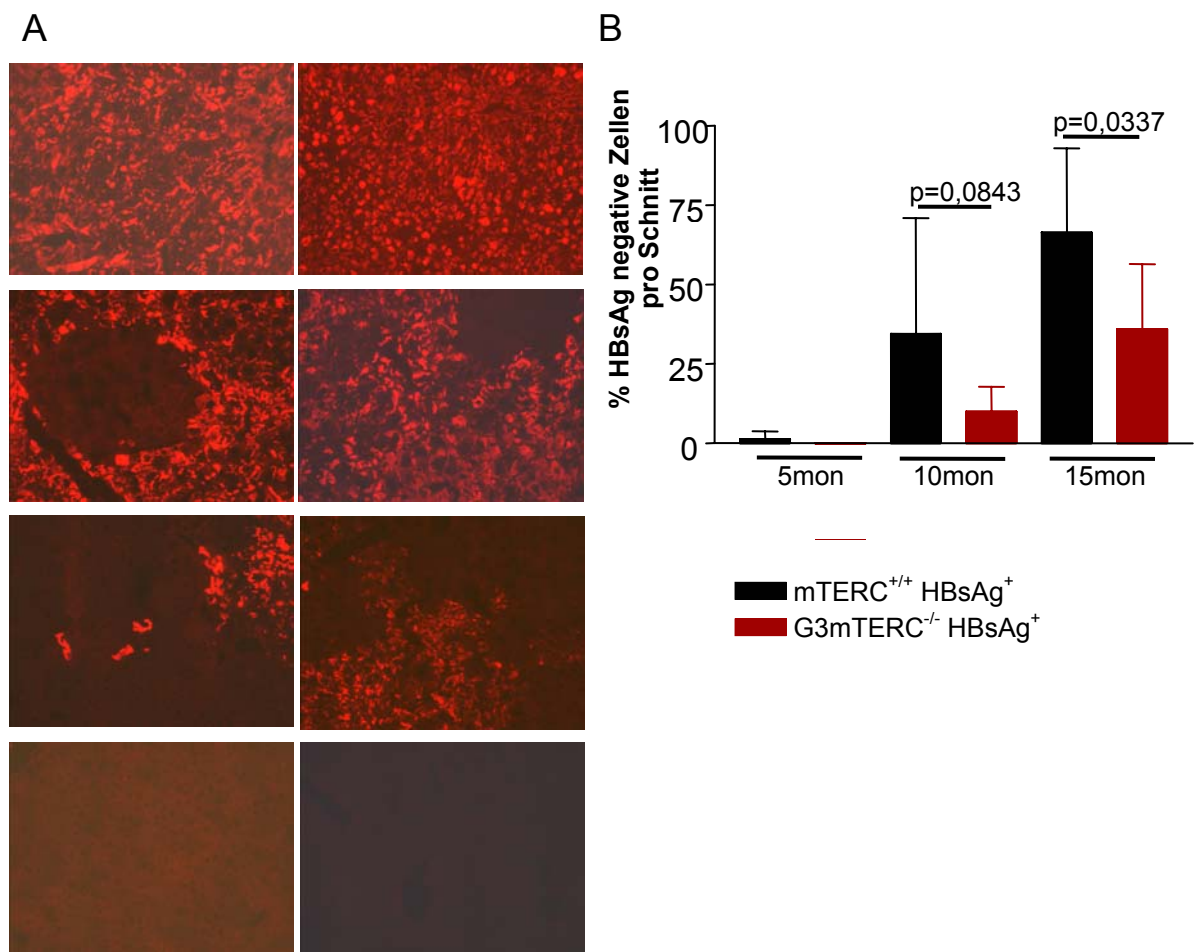


Abb. 18: Vermindertes Wachstum HBsAg negativer Regenerate in G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen im Vergleich zu mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen. A) Repräsentative Fotos des immunhistochemischen HBsAg-Nachweises in den Lebern von 5, 10 und 15 Monate alten männlichen Tieren (von oben nach unten); die linke Spalte zeigt den zunehmenden Verlust von HBsAg Expression in den Lebern der mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäuse, die rechte Spalte die bei den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tieren. Jeweils die unterste Reihe zeigt die negative Färbung von HBsAg⁻ Mäusen. B) Grafische Darstellung des Ausmaßes an HBsAg negativen Regeneraten in Lebern von G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen im Vergleich zu mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen. Während junge HBsAg⁺ Tiere eine nahezu vollständige HBsAg Expression zeigten, entwickelten in 10 bzw. 15 Monate alten HBsAg⁺ Tieren zunehmend HBsAg negative Bereiche. In G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen war das Ausmaß dieser Areale im Vergleich zu den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen vermindert.

Um zu überprüfen, ob der schrittweise Verlust der HBsAg Expression mit der Aktivität des Albumin-Promotors zusammenhing, unter dessen Regulation das HBsAg Transgen leberspezifisch exprimiert wurde, wurde immunhistochemisch die Albuminexpression detektiert. In allen untersuchten Leberproben war Albuminexpression unabhängig von den auftretenden HBsAg negativen Bereichen als flächige positive Färbung nachweisbar (s. Abb. 19A und B). Des Weiteren wurde ein Antikörper gegen pHiston3 (als Marker für das G2/M Stadium des Zellzyklus) zur immunhistochemischen Färbung proliferierender Zellen

verwendet, um zu untersuchen, ob Zellproliferation mit dem Auftreten der HBsAg negativen Bereiche korrelierte. Diese Färbung ergab überwiegend positive Signale in den HBsAg negativen Bereichen (s. Abb. 19C).

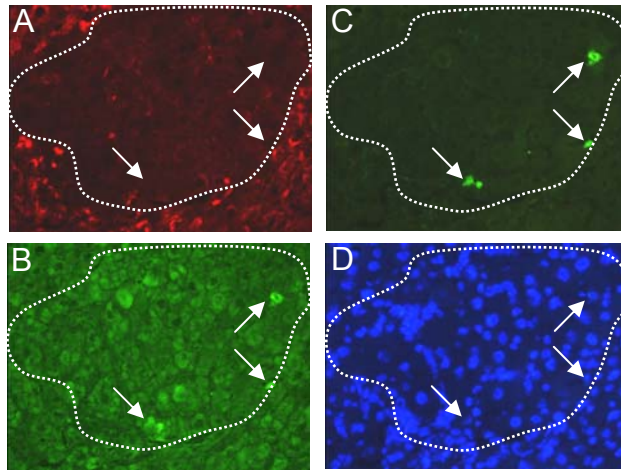


Abb. 19: Albumin ist, unabhängig von den HBsAg-negativen Regeneraten, im gesamten Lebergewebe nachweisbar. A) Immunhistochemische Färbung auf HBsAg ergab, wie hier repräsentativ dargestellt, negative Bereiche, während der immunhistochemische Nachweis von Albumin davon unabhängig flächig positiv ausfiel (B). Die Färbung auf pHiston3 als Mitosemarker war überwiegend in Zellkernen HBsAg negativer Hepatozyten nachweisbar (C, Pfeile). Die DAPI Gegenfärbung ist repräsentativ im Bild D gezeigt.

4.2.5 G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse haben im Vergleich zu mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen ein verringerten Zellproliferations : Zellapoptose Verhältnis

Im Rahmen chronischer Organschädigung bestimmt das Gleichgewicht aus Zellregeneration und Zellapoptose, ob eine Organhomeostase aufrecht gehalten werden kann. Da die Leber der HBsAg⁺ Mäuse einer ständigen chronischen Schädigung ausgesetzt war, die eine laufende Zellerneuerung des funktionellen Lebergewebes erforderte, interessierte uns die Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten. Sie wurde immunhistochemisch durch den Nachweis von PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ermittelt. PCNA-positive Zellkerne befinden sich im Zellzyklus in der S-Phase und sind damit proliferierend. Ausgezählt wurden PCNA-positive Hepatozyten im Verhältnis zu der Gesamtzellzahl. Verglichen wurden die Werte von männlichen mTERC^{+/+} bzw. G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tieren sowie HBsAg⁻ Mäusen als Kontrollen. Während 5 und 15 Monate alte G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse keinen Unterschied zu den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Tieren zeigten, ergab die Analyse bei 10 Monaten eine Tendenz zu einer geringeren Proliferationsrate bei den G3mTERC^{-/-} Mäusen, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,1284$, s. Abb. 20A). Nachfolgend wurde mit Hilfe des TUNEL-Assays die Anzahl apoptotischer Zellen im Lebergewebe der männlichen mTERC^{+/+} und G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tiere untersucht. Als Kontrolle dienten entsprechende HBsAg⁻ Mäuse. Hier zeigte sich bei 10 Monate alten HBsAg⁺ Tieren eine signifikant höhere Apoptoserate bei den G3mTERC^{-/-} Tieren im Vergleich zu den mTERC^{+/+} Mäusen ($p=$

0,0035, s. Abb. 20B). Zusammen mit der leicht geringeren Proliferationsrate ergab sich für 10 Monate alte Tiere ein deutlich verändertes Verhältnis von proliferierenden und apoptotischen Zellen in den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen im Vergleich zu mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen ($p=0,0006$, s. Abb. 20C).

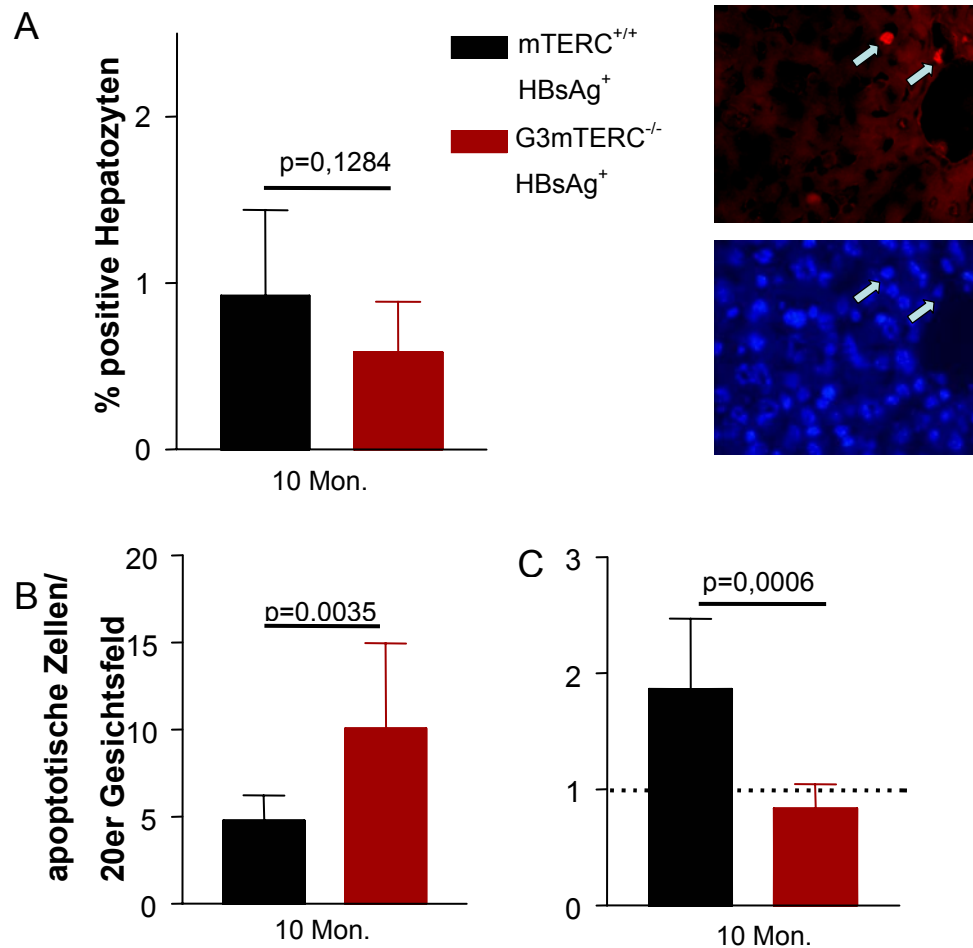


Abb. 20: Vershobenes Gleichgewicht von Proliferation und Apoptose in G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen. A) Repräsentative Fotos der PCNA-Färbung und grafische Darstellung der PCNA-positiven Zellen. Bei 10 Monaten hatten G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse eine tendenziell aber nicht-signifikant geringere Anzahl proliferierender Hepatozyten als mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Tiere. B) Diagramm der Rate TUNEL-positiver Zellen. Die 10 Monate alten G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse zeigten eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu gleichaltrigen mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen. C) Der sich aus dem PCNA/TUNEL Quotienten ergebenden Verhältnisses von proliferierenden Zellen zu apoptotischen Zellen der 10 Monate alten Mäuse. Der Quotient der G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tiere ist signifikant verschoben im Vergleich zu den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen.

4.2.6 Ähnliches prozentuales Lebergewicht bei vermindertem Gesamtkörpergewicht in G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen im Vergleich zu mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen

Um zu überprüfen, ob die negative Bilanz aus Zellproliferation und -apoptose in den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen in einem im Vergleich zu den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen verringerten prozentualen Lebergewicht resultierte, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten das Gesamtkörpergewicht sowie das prozentuale Lebergewicht der mTERC^{+/+} HBsAg⁺ bzw. HBsAg⁻ und der G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ bzw. HBsAg⁻ Mäuse ermittelt. Im Einklang mit früheren Veröffentlichungen (Rudolph *et al.* 1999) zeigte sich ein vermindertes Gesamtkörpergewicht in alternden G3mTERC^{-/-} Mäusen im Vergleich zu mTERC^{+/+} Mäusen. Dieser Unterschied war unabhängig vom Geschlecht der Mäuse und von der HBsAg Expression (s. Abb. 21A und B).

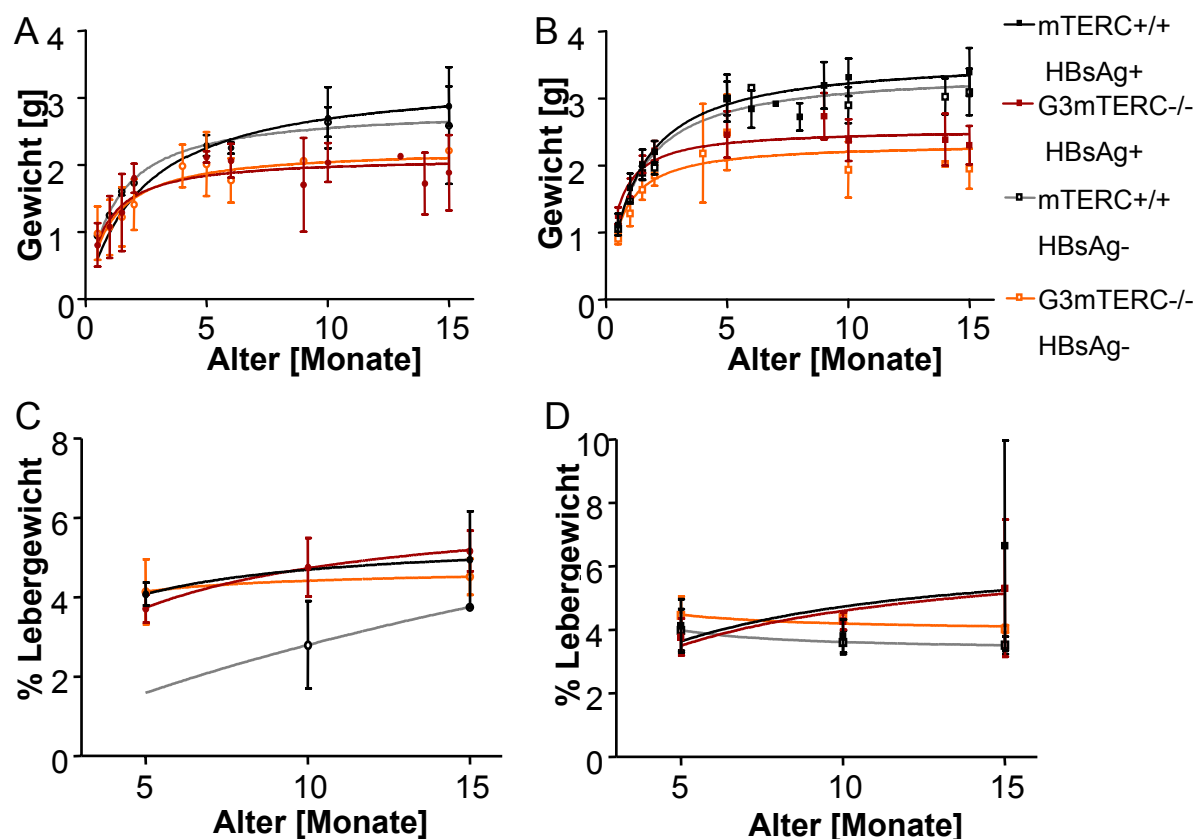


Abb. 21: Ähnliches prozentuales Lebergewicht bei vermindertem Gesamtkörpergewicht in G3mTERC^{-/-} Mäusen im Vergleich zu mTERC^{+/+} Mäusen unabhängig von der HBsAg Expression. A und B) Grafische Darstellung des Gesamtkörpergewichts der weiblichen Tiere (A) und der männlichen Mäuse (B). C und D) Grafische Darstellung des prozentualen Lebergewichts der weiblichen Tiere (C) und der männlichen Tiere (D). Die große Standardabweichung beim 15 Monate Wert der HBsAg⁺ Mäuse ergab sich mit dem vermehrten Auftreten von makroskopischen Knoten und HCC in den Lebern der Tiere.

Mit Hilfe des Lebergewichts wurde nun im Verhältnis zum Gesamtkörpergewicht das prozentuale Lebergewicht berechnet. Das prozentuale Lebergewicht zeigte unabhängig von der HBsAg Expression keine signifikanten Änderungen mit zunehmendem Alter der Tiere (s. Abb. 21C und D). Bei den männlichen mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen wurden die höchsten Werte mit der umfangreichsten Standardabweichung erreicht, was mit dem Auftreten von makroskopischen Knoten bzw. HCC bei einzelnen Tieren dieser Gruppe und der damit einhergehenden zum Teil sehr deutlichen Zunahme der Leberzellmasse zusammenhing (s. Kapitel 4.2.2).

4.2.7 Erhöhte Leberzellhypertrophie in den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen im Vergleich zu den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Tieren

Nachdem trotz erhöhter Apoptoserate in den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen im Gegensatz zu den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen keine Abnahme der prozentualen Lebermasse nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob der Zellverlust in den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen durch Hypertrophie ausgeglichen wurde. Zellgrößenzunahme (Zellhypertrophie) ist als kompensatorischer Mechanismus der gestörten Organregeneration beschrieben worden (Minamishima & Nakayama 2002). Ein Maß für die Zunahme der Zellgröße ist der Zellumfang, der mit Hilfe von β -Catenin Färbung ermittelt wurde. Dafür wurden für 15 Monate alte männliche mTERC^{+/+} und G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tiere bzw. HBsAg⁻ Kontrolltiere die immunhistochemisch gefärbten Hepatozyten-Zellenwände computergestützt ausgemessen und die Zellfläche berechnet (s. Abb. 22).

Bei 15 Monaten zeigten die mTERC^{+/+} HBsAg⁺ und mTERC^{+/+} HBsAg⁻ Mäuse keinen signifikanten Unterschied in den Zellgrößen ($p=0,3018$, s. Abb 22A). Dagegen hatten G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse im Vergleich zu den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁻ Tieren signifikant größere Zellen ($p=0,0299$, s. Abb. 22A und B), was auf Zellhypertrophie hindeutet.

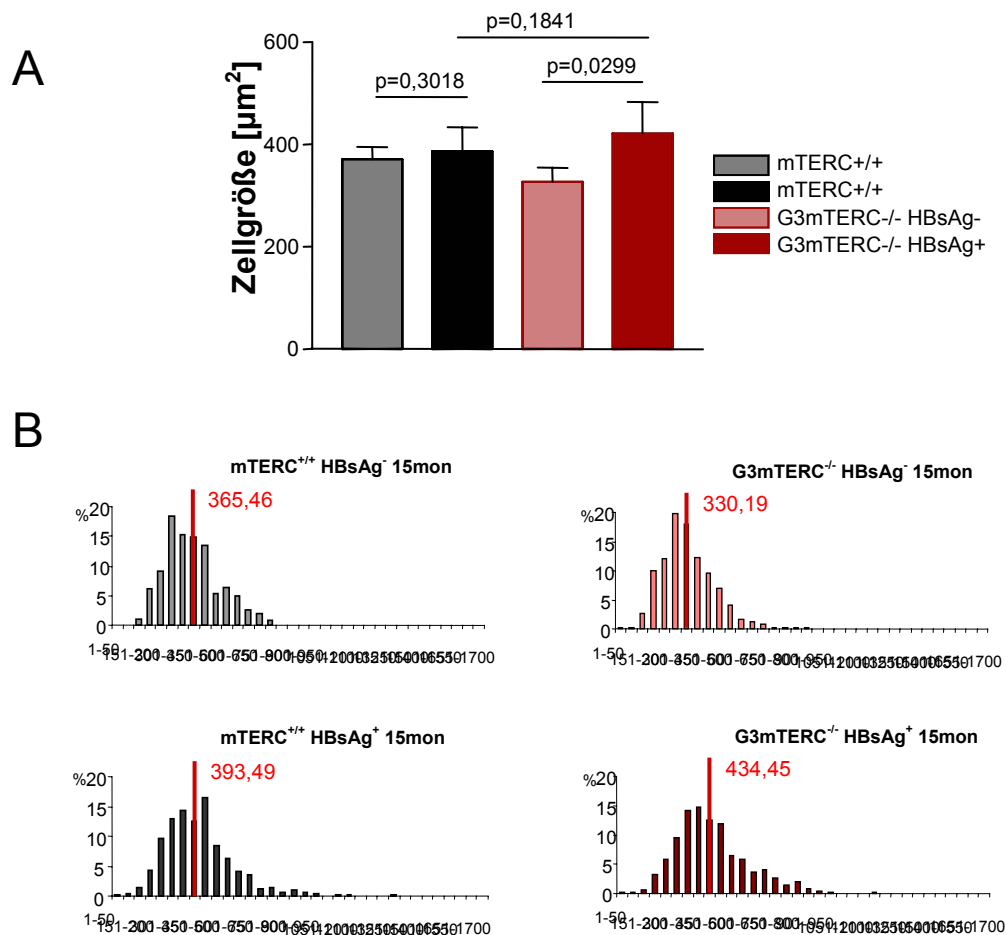


Abb. 22: Erhöhte Leberzellhypertrophie in den männlichen G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen bei 15 Monaten. A) Diagramm der gemessenen mittleren Zellgrößen der induzierten Genotype. Die mTERC^{+/+} HBsAg⁺ bzw. HBsAg⁻ Mäuse hatten nicht signifikant unterschiedliche mittlere Zellgrößen. Die G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse dagegen zeigten eine signifikante Hypertrophie im Vergleich zu den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁻ Mäusen. B) Die Verteilung der in 15 Monate alten Tieren gemessenen Leberzellgrößen.

4.3 Genexpressions-Änderung in Abhängigkeit von Telomerverkürzung im Mausmodell chronischer Leberschädigung

Um die molekularen Mechanismen der gestörten Organhomeostase in Antwort auf Telomerverkürzung und chronischer Leberschädigung verstehen zu können, wurden mittels Oligonukleotid-Microarray die zu Grunde liegenden Genexpressionsänderungen untersucht. Da die im HBsAg-Mausmodell teilweise sehr unterschiedliche HBsAg-Expression selbst Einfluss auf mögliche Genexpressionsänderungen haben könnte, wählten wir das Carbontetrachlorid (CCl₄) Modell. Wir analysierten das Lebergewebe von mTERC^{+/+} Mäusen und späten Generationen von mTERC^{-/-} Mäusen. Um zu untersuchen, ob eine Telomerase-Reaktivierung durch Telomerverkürzung hervorgerufene Genexpressionsänderungen wieder rückgängig machen könnte, wurden die Mausgruppen mit einem GFP-exprimierenden Kontrollvirus (AdGFP) und die mTERC^{-/-} Mäuse mit einem mTERC-exprimierenden Adenovirus (AdmTERC) infiziert und anschließend durch zweiwöchige CCl₄-Injektionen einer chronischen Leberschädigung ausgesetzt. 3 Tage nach der letzten Injektion wurde RNA aus den Lebern isoliert und für das GeneChip Experiment aufgearbeitet.

4.3.1 Telomerverkürzung verursacht differenzierte Genexpressions-Änderungen im CCl₄ Modell akuter Leberschädigung

Im Vergleich von mTERC^{+/+} AdGFP Mäusen mit den mTERC^{-/-} AdGFP Mäusen ergab die Auswertung des zweifach durchgeführten Arrays eine differenzierte Expression von 51 bzw. 64 Genen. Die Schnittmenge der in beiden Arrays signifikant unterschiedlich exprimierten Gene betrug 30 Gene aus folgenden Gruppen (Tabelle 3, Vergleich 1): metabolische Enzyme (n=10), Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren (n=2), Zellzyklus regulierende Gene (n=4), frühe und Akutphase Gene (n=2), Gene, die während der Entwicklung bzw. in Stammzellen aktiv sind (n=4), Chromatid-/Cytoskelettbestandteile (n=2), Transkriptionsfaktoren (n=2) sowie unbekannte Gene bzw. Gene unbekannter Funktion (n=4).

Tabelle 3 (nächste Seite): Liste der differenziert exprimierten Gene. Dargestellt sind die Fold Differences der Gene in Abhängigkeit von Telomerverkürzung im Vergleich von mTERC^{+/+} AdGFP Mäusen mit später Generation mTERC^{-/-} AdGFP Mäusen (Vergleich 1) und in Abhängigkeit von Telomerase-Reaktivierung im Vergleich von mTERC^{+/+} AdGFP Mäusen mit später Generation mTERC^{-/-} AdmTERC Mäusen (Vergleich 2). Die letzte Spalte markiert Gene, deren Expression durch Telomerase-Reaktivierung nicht (-), partiell (p), oder vollständig (+) normalisiert wurde.

Vergleich 1		Vergleich 2		Gen-Name	PubMed#	
Diff Change	Fold Change	Diff Change	Fold Change			
Metabolische Enzyme						
85±11,5	5,8±1,4			Aryl hydrocarbon	AB014494	+
8,2,8±71,7	2,3±0,0			Delta-amino dehydratase	X13752	+
293±14,4	2,3±0,1			Kupffer cell receptor	D88577	+
-2199±321,2	-3,9±0,1			Uridin-Phosphorylase-2	AI266885	+
-85,8±2,9	-3,6±0,2			Coenzym A reductase	M62766	+
1374±420,7	3,2±0,3	2180,9±35,4	4,15±0,1	Carboxylesterase prec.	AF034435	p
-207,2±11,3	-5,9±0,2	-167,7±19,5	-3,5±1,1	Thyroid hormon recept. α	U09504	p
338,9±33,4	22,1±1,8	503,8±50,1	26,7±11	Cytochrome P450 2b9	M21855	p
-518,7±37,9	-13,0±2,1	-506,7±84,9	-6,6±1,3	Cytochr. P450 CYP2C39	AF047726	p
395,9±23,6	2,7±0,2	360,65±11,9	2,55±0,2	Cytochr. P450 CYP4A10	AB018421	-
		514,3±130,1	3,35±0,8	Cytochrome P450 4A14	Y11638	
		-82,2±15,1	3,65±0,5	Ubiquitin-specif. protease	AF079565	
		273,5±9,1	2,65±0,4	Carboxylesterase	Y12887	
Transkriptionsfaktoren						
-302,4±47,4	-4,3±0,1			Orphan rec.: Rev-ErbA-α	AI834950	+
112,5±23,83	3,9±0,8			Cryptochrome 1	AB000777	+
		99,1±24,3	3,30±0,6	NFIL3/E4BP4 Transcr.f.	U83148	
Akutphaseproteine/ Frühe Proteine						
103,8±30,8	3,3±0,8	128,15±6,9	3,7±0,0	α-1-acid glycoprotein-3	S38219	-
-182,8±3,1	-4,2±0,4			Early growth response 1	M28845	+
Zytokine, Wachstumsfaktoren						
101,9±7,3	3,6±0,8			Neuroleukin	M14220	+
-111,9±37,7	-2,9±0,1			LtJ small inducible cyt.	AF065947	+
Stammzellen und Entwicklung						
-156,3±39,0	-3,3±0,0	-150,0±40,2	-3,0±0,1	H19 fetal liver	X58196	-
455,8±48,8	2,3±0,1	475,6±8,6	2,35±0,1	Erythroid diff. reg.	AJ007909	-
-255,7±67,3	-3,3±0,8			MRP14 Ca ⁺ -bind. prot.	M83219	+
-144,2±0,5	-10,0±0,1			Myeloid sec. granule prot.	L37297	+
Chromatide und Cytoskelett						
371,8±27,2	2,1±0,1			Histone 1	J03482	+
707,8±66,8	2,6±0,0	540,55±60,2	2,2±0,0	Tubulin beta-2	M28739	-
Mitose/Checkpoint Gene						
79,2±7,3	4,9±1,1			Serine/Threonine kinase 6	U80932	+
97,7±15,1	3,7±1,1			Protein reg. of cytokinesis	AA856349	+
552,8±33,3	3,7±0,0			cdc20	AW061324	+
-172,4±10,5	-6,3±0,4	-136,1±21,9	-3±0,6	MCM10 act. of DNA-prereplication complex	AA867646	p
unbekannte Gene oder Gene unbekannter Funktion						
97,1±0,9	5,9±1,6			Mus musc. cDNA 3end	AI847646	+
-591,5±30,1	-2,2±0,1			Mus musc. cDNA 3end	AW120896	+
-152,2±5,1	-3,0±0,9			Mus musc. cDNA 3end	AW046627	+
-198,7±61,7	-3,5±1,3	-183,5±48,7	-2,6±0,3	Mus musc. cDNA 3end	AI846522	p
		-234,1±23,1	-2,15±0,1	Mus musc. cDNA 3end	AW12049	
		-375,2±14,2	-2,35±0,2	Mus musc. cDNA 3end	AI042964	
		-78,1±11,7	-3,8±0,4	M. musc. anti-DNA IgG	U55641	
		856,6±124,8	2,15±0,1	Mus musc. cDNA 3end	AI841894	
		111,7±11,7	4,9±0,9	M. musc. unkn. mRNA	AF055638	
		-141,9±31,7	-7,85±0,8	Trefoil factor 3	D38410	
		-139,0±49,4	-3,3±1,1	rearranged IgG γ 2b	X67210	
		123,3±21,6	7,35±3,2	Cathepsin E gene, exon1	AJ009840	
		-127,7±16,9	-2,95±0,5	UBE-1c1, -1c2 und -1c3	AB030505	

Von den Zellzyklus regulierenden Genen waren 3 mitotische Gene in den mTERC^{-/-} AdGFP Tieren im Vergleich zu den mTERC^{+/+} AdGFP Mäusen hochreguliert: STK-6 (ayk-1), cdc20 und Protein regulator of cytokinesis (PRC-1). Alle drei Genprodukte spielen innerhalb der Mitose im Zusammenhang mit dem Spindel-Checkpoint eine wichtige Rolle (Marumoto et al. 2002, Sudakin et al. 2001, Tang et al. 2001). Ein weiteres Zellzyklus regulierendes Gen, MCM10, spielt durch Aktivierung von DNA-Replikationskomplexen eine entscheidende Rolle am Anfang der S-Phase (Lei & Tye 2001) und war in den mTERC^{-/-} AdGFP runterreguliert im Vergleich zu den mTERC^{+/+} AdGFP. Die Genexpressionsänderungen dieser Gene konnte durch Telomerasereaktivierung vollständig oder partiell normalisiert werden.

Der Vergleich der Genexpression in mTERC^{+/+} AdGFP Mäusen mit späten Generationen mTERC^{-/-} AdmTERC Mäusen mit reaktivierter Telomerase ergab die regulierte Genexpression von 24 Genen (s. Tabelle 3, Vergleich 2): 11 Gene waren bereits im ersten Vergleich identifiziert worden und bei 6 von ihnen änderte sich Telomerase-abhängig der Grad der Expressionsänderung im Vergleich zu den G3mTERC^{-/-} AdGFP Mäusen. Weitere 13 Gene wurden nur innerhalb dieses Screens als reguliert detektiert.

4.3.2 Bestätigung der Expressionsänderungen von ayk-1 und cdc20 mittels RT-PCR

Um die Genexpressionsunterschiede von Zellzyklus-regulierenden Genen zu verifizieren, wurde für ayk-1 (STK-6) und cdc20 die im Array gefundenen Fold differences durch quantitative RT-PCR überprüft. Sowohl die in G3mTERC^{-/-} AdGFP Mäusen für ayk gefundene 4,95±1,06fache Überexpression im Vergleich zu mTERC^{+/+} AdGFP Tieren, als auch die im Vergleich zu G3mTERC^{-/-} AdmTERC Mäusen normalisierte Expression konnte bestätigt werden (s. Abb. 23). Desweiteren wurde für cdc20 das gleiche Expressionsmuster gefunden, wie im Array.

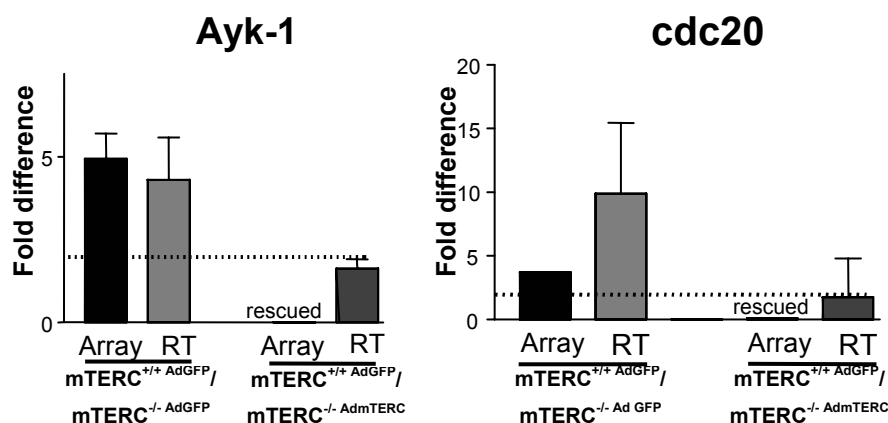


Abb. 23: Vergleich der im GeneChip Experiment sowie in quantitativer RT-PCR ermittelten Genexpressionsänderungen für *ayk-1* und *cdc20*. Die Überprüfung der Array-Daten mittels RT-PCR ergab eine Übereinstimmung der Werte. Im Array durch Telomerase Aktivität normalisierte Expression war auch innerhalb der RT-PCR unterhalb des Schwellenwertes von 2,0 reguliert.

4.3.3 Überexpression von *ayk-1* in Mausembryonen mit kurzen Telomeren

Es sollte untersucht werden, ob die, im Rahmen der durch CCl₄ verursachten chronischen Leberschädigung, gefundene Überexpression von *ayk-1* auch im Rahmen der Telomerverkürzung im Allgemeinen gezeigt werden konnte. Da *ayk-1* u.a. eine wichtige Rolle bei der Zellteilung am G2/M Übergang spielt, wählten wir die Embryogenese mit hohem Anteil an proliferierendem Gewebe. Wenn also *ayk-1* auf Grund der Telomerverkürzung erhöht exprimiert wird, sollte auch in G3mTERC^{-/-} Embryonen schon eine differenzierte Expression im Vergleich zu mTERC^{+/+} Embryonen sichtbar sein.

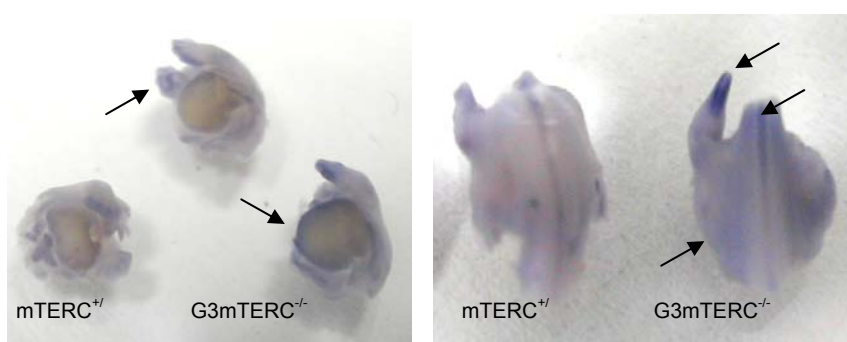


Abb. 24: Stärkere Expression von *ayk-1* in G3mTERC^{-/-} Embryonen im Vergleich zu mTERC^{+/+} Embryonen. Fotos der mit DIG-markierter *ayk*-antisense Sonde hybridisierten 13,5 Tage alten mTERC^{+/+} und G3mTERC^{-/-} Embryonen. Pfeile zeigen auf im Vergleich zu den mTERC^{+/+} Embryonen besonders intensiv gefärbten Areale in den G3mTERC^{-/-} Embryonen.

Mit Hilfe der Embryo Whole mount *in situ*-Technik und einer DIG-markierten *ayk*-spezifischen antisense Sonde untersuchten wir diese Fragestellung in 13,5 Tage alten Embryonen. Wie in Abbildung 24 gezeigt, konnte in G3mTERC^{-/-} Embryonen an den

Händen, entlang des Rückens und im Bereich der Leber eine intensivere Färbung gezeigt werden, als in gleichaltrigen mTERC^{+/+} Embryonen (s. Abb. 24). Embryonen mit einer ayk-sense Kontrollsonde blieben ungefärbt. Dieses Experiment gibt erste Hinweise auf die Regulation Zellzyklus beeinflussender Gene in Abhängigkeit von Telomerverkürzung während der Embryogenese, hat jedoch nur initialen Charakter und müßte durch weitergehende Versuche, z.B. durch einen vergleichenden Array und weitergehende funktionelle Analysen bestätigt werden.

5 DISKUSSION

5.1 Telomerverkürzung in der humanen Leberzirrhose

In dieser Arbeit wurden unter Verwendung von quantitativer *in situ* Fluoreszenz Hybridisierung (Q-FISH) in humanen Leberzirrhoseproben und in nicht-zirrhotischer Kontrollleber Telomer-Fluoreszenzintensitäten (TFI) bestimmt. Hepatozyten in Proben mit stark ausgeprägter Leberzirrhose hatten signifikant kürzere Telomere, als Hepatozyten nicht-zirrhotischer Kontrollleber. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen früherer Untersuchungen, dass die humane Leberzirrhose generell durch Telomerverkürzung charakterisiert werden kann (Kitada *et al.* 1995; Urabe *et al.* 1996; Miura *et al.* 1997; Wiemann *et al.* 2002). Allerdings beruhten die Ergebnisse früherer Arbeiten auf SouthernBlot Versuchen, bei denen Gesamt-DNA der Lebern untersucht wurde und nicht zwischen den einzelnen Zellarten unterschieden werden konnte. Damit ist nicht ausgeschlossen, dass die Änderung der Zellkomposition im Stadium der Leberzirrhose Einfluss auf die gemessenen Gewebstelomerlänge haben könnte. Im Gegensatz dazu konnten in dieser Arbeit die zelltyp-spezifischen Telomerlängen in der Leber analysiert werden.

Die Untersuchungen ergaben unterschiedliche Telomerlängen für die verschiedenen Zellarten der Leber: Die innerhalb der Leberzirrhoseproben infiltrierenden Lymphozyten sowie die Stellatzellen des umliegenden Bindegewebes hatten signifikant höhere TFI-Werte als die Hepatozyten. Dies belegt die Telomerhypothese der Leberzirrhoseentwicklung (Rudolph & DePinho 2001), wonach die chronische Leberschädigung zu einem erhöhten Zellumsatz der Hepatozyten führt. Da die Telomerase in menschlicher Leber nicht bzw. nur in sehr geringem Ausmaß aktiv ist (Tahara *et al.* 1995), hat dies eine Hepatozyten-spezifische Telomerverkürzung zur Folge.

Bei den Hepatozyten der zirrhotischen Leberproben war zudem die Anzahl an Zellkernen mit minimalen TFI-Werten erhöht, was auf das Vorhandensein kritisch kurzer Telomere hinweisen könnte, wobei bislang unklar ist, welche Telomerlänge als kritisch kurz definiert werden muß. Man geht heute jedoch davon aus, dass Telomere ab einer bestimmten kritischen Länge ihre Funktion verlieren, was die Aktivierung von DNA-Schädigungssignalwegen und mit Proliferationsarrest einhergehende zelluläre Seneszenz zur Folge hat. Im Einklang mit der Telomerhypothese der Leberzirrhoseentstehung kommt es in der

Leberzirrhose zur Aktivierung des p53- p21^{CIP/WAF} DNA-Schädigungssignalweges (Livni *et al.* 1995; Albrecht *et al.* 1997). Desweiteren finden sich in Übereinstimmung mit den hier vorgelegten Daten zur Hepatozyten-spezifischen Telomerverkürzung im Stadium der Leberzirrhose vermehrt Seneszenz-Marker positive Hepatozyten (Wiemann *et al.* 2002). Die durch Telomerverkürzung verursachte hepatozelluläre Seneszenz könnte damit eine Erklärung für die in der Leberzirrhose beobachteten herabgesetzte Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten sein (Delhay *et al.* 1996; Kaita *et al.* 1997; Delhay *et al.* 1999). Bei Fortschreiten der chronischen Leberschädigung kommt es im weiteren Verlauf der Leberzirrhoseentwicklung zur Aktivierung normalerweise nicht proliferierender Stellatzen. Diese Zellen bilden dann ein für Leberzirrhose typisches fibrotisches Narbengewebe aus (Alcolado *et al.* 1997).

Der Grad der Leberzirrhose korrelierte zudem mit der gemessenen Hepatozyten-spezifischen Telomerverkürzung: Es zeigten sich niedrigere TFI-Werte für Hepatozyten aus Proben mit stark ausgeprägter Leberzirrhose im Vergleich zu milder Leberzirrhose. Patienten mit langen Telomeren haben also vermutlich bessere Chancen bei chronischer Leberschädigung eine Leberzirrhose erst zu einem späteren Zeitpunkt zu entwickeln, als Patienten, deren Telomerlängen von vornherein kürzer sind. Der Vergleich der initialen Telomerlängen innerhalb jedes Patienten könnte also auch als prognostischer Marker Hinweise dafür geben, bei welchem Grad der chronischen Schädigung sich auf Grund der Telomerverkürzung eine Leberzirrhose ausbildet und wie sie verlaufen wird.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass chronische Schädigung in den betroffenen Zellen zu einer durch Telomerverkürzung verursachten Begrenzung der Proliferationsfähigkeit und damit einhergehend zur Ausbidung von Leberzirrhose führen kann.

5.2 Einfluss von Telomerverkürzung auf das Überleben im HBsAg Mausmodell

Die Untersuchungen im HBsAg transgenen Mausmodell der chronischen Leberschädigung zeigten, dass Telomerverkürzung unterschiedliche Wirkung auf die Organhomeostase, die Leberkrebsentwicklung und das Überleben der Tiere hatte. Interessanterweise ging der negative Effekt, den die Kombination von Telomerverkürzung mit chronischer Leberschädigung auf das Überleben der Mäuse hatte, mit einer gleichzeitig signifikant gehemmten Entwicklung von HCC einher.

Es wurde deutlich, wie wichtig ausreichende Telomerlänge - und nicht Telomerase-Aktivität *per se* - im Zusammenhang mit chronischer Leberschädigung für das Überleben war: Nur späte Generationen mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse mit kritisch kurzen Telomeren verstarben vorzeitig, während G1 und G2mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tiere ohne Telomerase-Aktivität, aber ausreichend langen Telomeren, keinen Unterschied im Überleben im Vergleich zu den Wildtypmäusen zeigten. Tendenziell war bei den G3mTERC^{-/-} Mäusen zudem eine Abhängigkeit des Überlebens von der Intensität der chronischen Schädigung zu beobachten: Männliche Tiere exprimieren das HBsAg Transgen hormonell bedingt in größerem Ausmaß als die weiblichen Tiere und haben damit auch eine höhere Hepatozyten-Schädigung (Chisari *et al.* 1989). Das Überleben der männlichen G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse war im Vergleich zu den weiblichen G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen tendentiell verkürzt, was auf eine Korrelation von HBsAg Expression und Überleben hinweist.

Nach den Beobachtungen in der humanen Leberzirrhose kann man davon ausgehen, dass auch im Mausmodell der chronischen Schädigung durch HBsAg Expression die Telomerverkürzung in den betroffenen Hepatozyten akkumuliert. Zwar kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die HBsAg Expression zusätzlich Auswirkungen auf andere Organe in der Maus hatte, jedoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine gestörte Leberhomeostase ursächlich für das verfrühte Versterben der G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäuse ist. Bei chronischer Schädigung, sind die ausdifferenzierten Hepatozyten durch eine hohe regenerative Kapazität normalerweise in der Lage, Zellverlust in einem hochreguliertem Prozess wieder auszugleichen. Dies setzt eine stringente Kontrolle von Zellproliferation und Zelltod voraus sowie eine ausreichende Telomerkapazität. Es muß also vermutet werden, dass das in den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tieren durch Telomerverkürzung gestörte Gleichgewicht aus Leberzellproliferation und -apoptose zu einer gestörten Organ-Homeostase führte und damit das Überleben nachhaltig negativ beeinflusste. Trotz des veränderten Gleichgewichts von Leberzellproliferation und -apoptose wurde keine Abnahme des prozentualen Lebergewichts beobachtet. Ein möglicher Kompensationsmechanismus könnte die beobachtete Zellgrößenzunahme in den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tieren darstellen. Hepatozyten-Hypertrophie ist bereits in anderen Mausmodellen gestörter Leberzellregeneration zur Erhaltung der Lebermasse beschrieben worden (Minamishima & Nakayama 2002). Desweiteren deutet die verminderte Ausbildung HBsAg-negativer Regenerate auf eine gestörte bzw. verminderte Hepatozyten-Regeneration in den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen hin. Dies entspräche früheren

Beobachtungen im mTERC^{-/-} Mausmodell, wo Telomerverkürzung eine verminderten Proliferationsrate zur Folge hatte (Rudolph *et al.* 2000).

Das beobachtete verminderte Überleben unterstreicht die dominante Relevanz ausreichender Telomerlänge für die Funktionsfähigkeit von Organen und die Gesamtkonstitution von Organismen.

5.3 Einfluss von Telomerverkürzung auf Tumorentwicklung und -progress im HBsAg Mausmodell

Im Einklang mit den von Chisari veröffentlichten Daten zur HBsAg transgenen Maus (Chisari *et al.* 1989) entwickelten männliche mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäuse beginnend bei 10 Monaten Tumorstadien wie Foci und Adenome und zeigten bei 15 Monaten zu 44,5% HCC. Im Gegensatz dazu war in den G3mTERC^{-/-} Mäusen der Tumorprogress signifikant gehemmt: Die durch Telomerverkürzung verursachte Rate an Aneuploidie, die in Folge von chromosomaler Instabilität auftritt und als Voraussetzung für Lebertumorentwicklung gilt (Wilkens *et al.* 2004, Plentz *et al.* 2004), war zwar erhöht. Trotzdem hatten die G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tiere weniger makroskopische Knoten und entwickelten in keinem Fall HCC. Dies steht im Einklang mit früheren Ergebnissen in der mTERC^{-/-} Maus: In drei Modellen chronischer Leberschädigung (Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) transgene Maus, CCl₄- bzw. Diethylnitrosamin (DEN)-Gabe) wurde in Abhängigkeit von Telomerverkürzung die signifikante Reduktion des Tumorprogress gezeigt (Farazi *et al.* 2003). Gleichzeitig wurden in diesen Modellen erhöhte Raten an Tumorstadien wie regenerative Knoten und Foci in den Lebern der Telomerase-defizienten Mäusen beobachtet, was die divergente Rolle von Telomerverkürzung in der Tumorentwicklung und dessen Progress belegt. In den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Tieren unserer Studie war bereits die Ausbildung von Foci und Adenomen im Vergleich zu den mTERC^{+/+} HBsAg⁺ Mäusen gehemmt. Damit bestätigte sich die entscheidende Rolle, die der Telomerase in der HCC Entwicklung zukommt.

Obwohl in den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen die Tumorentwicklung signifikant gehemmt war, zeigten die Mäuse ein vermindertes Überleben. Dies widerspricht Ergebnissen aus dem mTERC^{-/-} Apc^{Min} Modell: Diese Apc^{Min} Mäuse entwickeln nach Verlust des Apc-Gen-Allels intestinale Neoplasien (multiple intestinal neoplasie, Min) (Su *et al.* 1992). Apc^{Min} Mäuse später mTERC^{-/-} Generationen zeigten im Vergleich zu mTERC^{+/+} Apc^{Min} Mäusen

eine signifikant erhöhte Anzahl an adenomatösen Vorstufen intestinaler Karzinome (Microadenome) bei einem gleichzeitig signifikant gehemmten Progress zu Macroadenomen. Zudem zeigten diese Mäuse jedoch eine erhöhte Überlebensrate im Vergleich zu den mTERC^{+/+} Apc^{Min} Mäusen (Rudolph *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu äußerte sich bei den G3mTERC^{-/-} HBsAg⁺ Mäusen der Vorteil der verminderten Tumorentwicklung nicht in verlängertem Überleben. Die negativen Auswirkungen der Telomerverkürzung in Form von gestörter Organhomeostase, erhöhter Aneuploidie und verminderter Regenerationsfähigkeit scheinen im Fall der Leber dominant das Überleben zu verkürzen.

5.4 Genexpressionsänderungen in Abhängigkeit von Telomerverkürzung und Telomerase-Reaktivierung

Versuche mit der mTERC^{-/-} Maus zeigten, dass experimentelle Leberzirrhose durch adenovirale Reaktivierung von Telomerase gemildert werden kann (Rudolph *et al.* 2000). Wir untersuchten die diesem System zu Grunde liegenden Genexpressionsänderungen mittels MicroArray Experiment und detektierten im Vergleich von mTERC^{+/+} AdGFP mit späten Generationen mTERC^{-/-} AdGFP 30 Gene, die in Abhängigkeit von Telomerverkürzung differenziert exprimiert waren. Die Expressionsänderungen eines Teils der Gene konnte durch Telomerase-Reaktivierung im Vergleich mit späten Generationen mTERC^{-/-} AdmTERC wieder normalisiert werden. Drei dieser Gene - cdc20, PRC-1 und ayk-1 - spielen eine wichtige Rolle am G2/M Übergang im Zellzyklus und sind für die Regulation der Mitose essentiell (Marumoto *et al.* 2002, Sudakin *et al.* 2001, Tang *et al.* 2001, Glotzer 2001). Störungen der Schwesterchromatid-Teilung oder des regulierten Ablaufs der Mitose sind Ursachen für CIS und Aneuploidie (Lengauer *et al.* 1998). Deshalb kann die differenzierte Expression von Zellzyklusgenen ein Hinweis auf Ursachen der in Zusammenhang mit Telomerverkürzung beobachteten Phänotyp sein.

cdc20 ist u.a. an der Regulation des Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) direkt beteiligt und hindert innerhalb eines aktiven Spindel-Checkpoint-Komplexes (Sudakin *et al.* 2001, Tang *et al.* 2001) den APC/C daran, die Degradation von CyclinB und Securin zu vermitteln (Hixon & Gualberto 2000). In Folge dessen ist der Mitoseprogress verzögert. Die in Abhängigkeit von Telomerverkürzung erhöhte Expression von cdc20 könnte also auf eine durch den aktivierten Spindel-Checkpoint

inhibierte Mitose hindeuten und eine Erklärung für die bei kurzen Telomeren verringerte Proliferation liefern.

Überexpression von *ayk-1* (Aurora-A im Menschen) fiel als ein häufiger Marker von Tumorzellen auf (Zhou *et al.* 1998, Bischoff *et al.* 1998, Jeng *et al.* 2004) und konnte mit einem vorzeitigen Einstieg in die Mitose und mit einem "Überrennen" des mitotischen Spindel-Checkpoints in Verbindung gebracht werden (Marumoto *et al.* 2002, Jiang *et al.* 2003). Außerdem wirkt *ayk-1* vermittelter p53-Verlust und erhöhte c-myc Konzentration stimulierend auf die hTERT Expression und damit auf die Telomerase-Reaktivierung (Katayama *et al.* 2004, Yang *et al.* 2004). Die Frage, in welcher Funktion *ayk-1* im Zusammenhang mit Telomerverkürzung und der Zirrhoseentwicklung hoch reguliert ist, muß in funktionellen Analysen näher untersucht werden.

Des weiteren identifizierten wir Gene, deren Expression nur im Vergleich von mTERC^{+/+} AdGFP und später Generation mTERC^{-/-} AdmTERC reguliert war, obwohl in beiden Gruppen Telomerase aktiv ist, und kurze Telomere verlängert werden können. Dies deutet darauf hin, dass die durch Telomerverkürzung verursachten Vorgänge in der Zelle zu sekundären Genexpressionsänderungen führen, die selbst nach reaktiverter Telomerase nicht mehr rückgängig gemacht werden können. Damit wäre vermutlich der Zeitpunkt der Telomerase-Reaktivierung entscheidend, um durch Telomerverkürzung ausgelöste Veränderungen aufheben zu können.

Die Ergebnisse aus dem mTERC^{-/-} Mausmodell deuten darauf hin, dass bei einer zeitlich und örtlich begrenzten Telomerase-Reaktivierung und damit einhergehender Telomerverlängerung zum einen die Regenerationsfähigkeit geschädigter Zellen wieder hergestellt und damit das Krankheitsbild der Leberzirrhose positiv beeinflusst werden konnte (Rudolph *et al.* 2000), zum anderen, dass die zu Grunde liegenden Mechanismen mit der Expression der innerhalb der Mitose und des G2/M Checkpoints involvierten Gene zusammenhängen und diese durch Telomerase Aktivität normalisiert werden konnten. Weiterführende funktionelle Analysen müssen die genauen Zusammenhänge klären, um zu verstehen, inwiefern Telomerverkürzung den Zellzyklus beeinflusst.

5.5 Telomerase als Therapie?

Bei der humanen Leberzirrhose im Endstadium beträgt die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit 6 Monate und die bisher einzige mögliche Therapie - Lebertransplantation - kommt nur für einen geringen Teil der Patienten in Frage. Unsere Ergebnisse

aus der humanen Leberzirrhose legen einen Zusammenhang zwischen Hepatozyten-spezifischer Telomerverkürzung und Zirrhoseentwicklung nahe. Auch das im HBsAg Mausmodell beobachtete verminderte Überleben steht vermutlich mit einer gestörten Organhomeostase, verursacht durch ein gestörtes Verhältnis von Zellapoptose zu Zellproliferation, im Zusammenhang. Ursache in beiden Modellen ist nach der Telomer-Hypothese eine bei chronischer Schädigung durch Telomerverkürzung verminderte Hepatozyten-Regeneration. Es stellt sich damit die Frage, inwiefern die gezielte Verlängerung der Telomere durch Telomerase die verminderte Regenerationsfähigkeit wieder herstellen und als therapeutischer Ansatz genutzt werden könnte. *In vitro* hatte die Reaktivierung von Telomerase in humanen Zellen eine Verlängerung der Telomere und der Zell-Lebensdauer zur Folge (Bodnar *et al.* 1998). Zudem konnte *in vivo* experimentelle Leberzirrhose im mTERC^{-/-} Mausmodell durch adenovirale Reaktivierung von Telomerase gemildert werden (Rudolph *et al.* 2000). Telomerase stellt jedoch auch ein Risiko dar: Ein weitverbreitetes Charakteristikum von Tumorzellen ist die Telomerase-Reaktivierung, die einen Tumorprogress erst ermöglicht. In der Tumorgenese spielt Telomerverkürzung eine divergente Rolle, da es die Tumorentstehung durch z.B. erhöhte Aneuploidie fördert, dann aber den Tumorprogress hemmt.

Die Ergebnisse des HBsAg Mausmodells deuten darauf hin, dass im Rahmen chronischer Schädigung eine akute Verlängerung der Telomere durch Telomerase und der damit einhergehende positive Effekt auf das Überleben das Risiko der Tumorentwicklung überwiegen könnte. Wichtig wird es sein, Telomerase rechtzeitig einzusetzen, zum einen, um durch Telomerverkürzung verursachte zelluläre Seneszenz zu vermeiden, zum anderen, um in Zellen mit kritisch kurzen Telomeren unter dem Regenerationsdruck chronischer Schädigung hervorgerufene CIS zu verhindern. Dann könnte Telomerase die Telomere stabilisieren und die Regenerationsfähigkeit des Organs wieder herstellen. Zumindestens könnte so Zeit gewonnen werden, um eine notwendige Leber-Transplantation durchführen zu können.

Im Moment müssen jedoch weitere Studien und Untersuchungen in Mausmodellen durchgeführt werden, um die Folgen einer gezielten Telomerase-Reaktivierung abschätzen und einen therapeutischen Einsatz von Telomerase rechtfertigen zu können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aikata, H., Takaishi, H., Kawakami, Y., Takahashi, S., Kitamoto, M., Nakanishi, T., Nakamura, Y., Shimamoto, F., Kajiyama, G. und Ide, T. (2000). Telomere reduction in human liver tissues with age and chronic inflammation. *Exp Cell Res* **256**(2): 578-82.
- Albrecht, J. H., et al. (1997). Regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1/Sdi1) gene expression in hepatic regeneration. *Hepatology* **25**(3): 557-63.
- Alcolado, R., Arthur, M. J. und Iredale, J. P. (1997). Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci (Lond)* **92**(2): 103-12.
- Allsopp, R. C. und Harley, C. B. (1995). Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* **219**(1): 130-6.
- Allsopp, R. C., Chang, E., Kashefi-Aazam, M., Rogaev, E. I., Piatyszek, M. A., Shay, J. W. und Harley, C. B. (1995). Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* **220**(1): 194-200.
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W. und Harley, C. B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21): 10114-8.
- Blackburn, E. H. (1991). Telomeres. *Trends Biochem Sci* **16**(10): 378-81.
- Blackburn, E. H. (1992). Telomerases. *Annu Rev Biochem* **61**: 113-29.
- Blackburn, E. H. (1997). The telomere and telomerase: nucleic acid-protein complexes acting in a telomere homeostasis system. A review. *Biochemistry (Mosc)* **62**(11): 1196-201.
- Blackburn, E. H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**(6): 661-73.
- Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A. und Greider, C. W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**(1): 25-34.
- Blasco, M. A., Lee, H. W., Rizen, M., Hanahan, D., DePinho, R. und Greider, C. W. (1997). Mouse models for the study of telomerase. *Ciba Found Symp* **211**: 160-70; discussion 170-6.
- Boultonwood, J., Fidler, C., Shepherd, P., Watkins, F., Snowball, J., Haynes, S., Kusec, R., Gaiger, A., Littlewood, T. J., Peniket, A. J. und Wainscoat, J. S. (1999). Telomere length

- shortening is associated with disease evolution in chronic myelogenous leukemia. *Am J Hematol* **61**(1): 5-9.
- Broccoli, D., Chong, L., Oelmann, S., Fernald, A. A., Marziliano, N., van Steensel, B., Kipling, D., Le Beau, M. M. und de Lange, T. (1997). Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression and conserved protein domains. *Hum Mol Genet* **6**(1): 69-76.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. und de Lange, T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* **17**(2): 231-5.
- Brummendorf, T. H., Holyoake, T. L., Rufer, N., Barnett, M. J., Schulzer, M., Eaves, C. J., Eaves, A. C. und Lansdorp, P. M. (2000). Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood* **95**(6): 1883-90.
- Brummendorf, T. H., Rufer, N., Holyoake, T. L., Maciejewski, J., Barnett, M. J., Eaves, C. J., Eaves, A. C., Young, N. und Lansdorp, P. M. (2001). Telomere length dynamics in normal individuals and in patients with hematopoietic stem cell-associated disorders. *Ann N Y Acad Sci* **938**: 293-303; discussion 303-4.
- Cawthon, R. M., Smith, K. R., O'Brien, E., Sivatchenko, A. und Kerber, R. A. (2003). Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* **361**(9355): 393-5.
- Chin, L., Artandi, S. E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S. L., Gottlieb, G. J., Greider, C. W. und DePinho, R. A. (1999). p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* **97**(4): 527-38.
- Chisari, F. V., Pinkert, C. A., Milich, D. R., Filippi, P., McLachlan, A., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. (1985). A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science* **230**(4730): 1157-60.
- Chisari, F. V., Filippi, P., McLachlan, A., Milich, D. R., Riggs, M., Lee, S., Palmiter, R. D., Pinkert, C. A., Brinster, R. L. (1986). Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. *J Virol* **60**(3): 880-7.
- Chisari, F. V., Filippi, P., Buras, J., McLachlan, A., Popper, H., Pinkert, C. A., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. (1987). Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(19): 6909-13.

- Chisari, F. V., Klopchin, K., Moriyama, T., Pasquinelli, C., Dunsford, H. A., Sell, S., Pinkert, C. A., Brinster, R. L. und Palmiter, R. D. (1989). Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* **59**(6): 1145-56.
- Chiu, C. P., Dragowska, W., Kim, N. W., Vaziri, H., Yui, J., Thomas, T. E., Harley, C. B. und Lansdorp, P. M. (1996). Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells* **14**(2): 239-48.
- Counter, C. M., Ailion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B. und Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* **11**(5): 1921-9.
- de Jager, M., Dronkert, M. L., Modesti, M., Beerens, C. E., Kanaar, R. und van Gent, D. C. (2001). DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res* **29**(6): 1317-25.
- Delhaye, M., Louis, H., Degraef, C., Le Moine, O., Deviere, J., Gulbis, B., Jacobovitz, D., Adler, M. und Galand, P. (1996). Relationship between hepatocyte proliferative activity and liver functional reserve in human cirrhosis. *Hepatology* **23**(5): 1003-11.
- Delhaye, M., Louis, H., Degraef, C., Le Moine, O., Deviere, J., Peny, M. O., Adler, M. und Galand, P. (1999). Hepatocyte proliferative activity in human liver cirrhosis. *J Hepatol* **30**(3): 461-71.
- Edwards, J. E. und Dalton, A. J. (1942). Induction of cirrhosis of the liver and of hepatomas in mice with carbon tetrachloride. *J Nat Cancer Inst*: 19-41.
- Engelhardt, M., Drullinsky, P., Guillem, J. und Moore, M. A. (1997). Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **3**(11): 1931-41.
- Eschenbrenner, A. B. und Miller, E. (1946). Liver necrosis and the induction of carbon tetrachloride hepatomas in strain a mice. *J Nat Cancer Inst*: 325-341.
- Fagagna, F. F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P. und Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**: 194-198.
- Farazi, P. A., Glickman, J., Jiang, S., Yu, A., Rudolph, K. L. und DePinho, R. A. (2003). Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **63**(16): 5021-7.
- Feitelson, M. A. (1986). Products of the "X" gene in hepatitis B and related viruses. *Hepatology* **6**(2): 191-8.

- Feitelson, M. A. (2001). Chronic hepatitis C virus infection and the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **49 Suppl 2**: S65-74.
- Feitelson, M. A., Sun, B., Satiroglu Tufan, N. L., Liu, J., Pan, J. und Lian, Z. (2002). Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* **21**(16): 2593-604.
- Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J. und et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* **269**(5228): 1236-41.
- Fujimoto, K., Kyo, S., Takakura, M., Kanaya, T., Kitagawa, Y., Itoh, H., Takahashi, M. und Inoue, M. (2000). Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT. *Nucleic Acids Res* **28**(13): 2557-62.
- Furugori, E., Hirayama, R., Nakamura, K. I., Kammori, M., Esaki, Y. und Takubo, K. (2000). Telomere shortening in gastric carcinoma with aging despite telomerase activation. *J Cancer Res Clin Oncol* **126**(8): 481-5.
- Graham, F. L. und Prevec, L. (1995): *Methods for Construction of Adenovirus Vectors*, Mol. Biotechn. **3**: 207-220
- Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**(2 Pt 1): 405-13.
- Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**(6205): 331-7.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H. und de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**(4): 503-14.
- Gritsko, T. M., Coppola, D., Paciga, J. E., Yang, L., Sun, M., Shelley, S. A., Fiorica, J. V., Nicosia, S. V. und Cheng, J. Q. (2003). Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **9**(4): 1420-6.
- Gunes, C., Lichtsteiner, S., Vasserot, A. P. und Englert, C. (2000). Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Res* **60**(8): 2116-21.
- Harley, C. B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* **256**(2-6): 271-82.
- Harley, C. B., Futcher, A. B. und Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**(6274): 458-60.

- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**: 614-36.
- He, T. C., et al. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2509-14.
- Herrera, E., Samper, E., Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Lee, H. W. und Blasco, M. A. (1999). Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *Embo J* **18**(11): 2950-60.
- Himeno, Y., Fukuda, Y., Hatanaka, M. und Imura, H. (1988). Expression of oncogenes in human liver disease. *Liver* **8**(4): 208-12.
- Ishak, K., et al. (1995). Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* **22**: 696-699.
- Jeppesen, C. und Nielsen, P. E. (1989): Photofootprinting of Drug-binding Sites on DNA Using Diazo- and Azido-9-Aminoacridine Derivates, *Eur. J. Biochem.* **182**: 437-444
- Kaita, K. D., Pettigrew, N. und Minuk, G. Y. (1997). Hepatic regeneration in humans with various liver disease as assessed by Ki-67 staining of formalin-fixed paraffin-embedded liver tissue. *Liver* **17**(1): 13-6.
- Karlseder, J., Kachatrian, L., Takai, H., Mercer, K., Hingorani, S., Jacks, T. und de Lange, T. (2003). Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1. *Mol Cell Biol* **23**(18): 6533-41.
- Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H., Yuan, Z. M., Bondaruk, J., Suzuki, F., Fujii, S., Arlinghaus, R. B., Czerniak, B. A. und Sen, S. (2004). Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* **36**(1): 55-62.
- Kim, S. H., Kaminker, P. und Campisi, J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* **23**(4): 405-12.
- Kim, Y. T., Thomas, N. F., Kesis, T. D., Wilkinson, E. J., Hedrick, L. und Cho, K. R. (1996). p53 mutations and clonality in vulvar carcinomas and squamous hyperplasias: evidence suggesting that squamous hyperplasias do not serve as direct precursors of human papillomavirus-negative vulvar carcinomas. *Hum Pathol* **27**(4): 389-95.
- Kinouchi, Y., Hiwatashi, N., Chida, M., Nagashima, F., Takagi, S., Maekawa, H. und Toyota, T. (1998). Telomere shortening in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* **33**(3): 343-8.
- Kitada, T., Seki, S., Kawakita, N., Kuroki, T. und Monna, T. (1995). Telomere shortening in chronic liver diseases. *Biochem Biophys Res Commun* **211**(1): 33-9.

- Kiyono, T., Foster, S. A., Koop, J. I., McDougall, J. K., Galloway, D. A. und Klingelhutz, A. J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**(6706): 84-8.
- Kyo, S., Takakura, M., Taira, T., Kanaya, T., Itoh, H., Yutsudo, M., Ariga, H. und Inoue, M. (2000). Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res* **28**(3): 669-77.
- Lansdorp, P. M., et al. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* **5**(5): 685-91.
- Lee, H. W., Blasco, M. A., Gottlieb, G. J., Horner, J. W., 2nd, Greider, C. W. und DePinho, R. A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* **392**(6676): 569-74.
- Lei, M. und Tye, B. K. (2001). Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* **114**(Pt 8): 1447-54.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**(6712): 643-9.
- Li, B., Oestreich, S. und de Lange, T. (2000). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**(5): 471-83.
- Li, X., Leteurtre, F., Rocha, V., Guardiola, P., Berger, R., Daniel, M. T., Noguera, M. H., Maarek, O., Roux, G. L., de la Salmoniere, P., Richard, P. und Gluckman, E. (2003). Abnormal telomere metabolism in Fanconi's anaemia correlates with genomic instability and the probability of developing severe aplastic anaemia. *Br J Haematol* **120**(5): 836-45.
- Lin, S. Y. und Elledge, S. J. (2003). Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* **113**(7): 881-9.
- Livni, N., et al. (1995). p53 expression in patients with cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma. *Cancer* **75**(10): 2420-6.
- Loayza, D. und De Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* **423**(6943): 1013-8.
- Lundblad, V. (2003). Telomere replication: an est fest. *Curr Biol* **13**(11): R439-41.
- Maini, M. K., Soares, M. V., Zilch, C. F., Akbar, A. N. und Beverley, P. C. (1999). Virus-induced CD8+ T cell clonal expansion is associated with telomerase up-regulation and telomere length preservation: a mechanism for rescue from replicative senescence. *J Immunol* **162**(8): 4521-6.

- Makarov, V. L., Hirose, Y. und Langmore, J. P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* **88**(5): 657-66.
- Martens, U. M., Brass, V., Sedlacek, L., Pantic, M., Exner, C., Guo, Y., Engelhardt, M., Lansdorp, P. M., Waller, C. F. und Lange, W. (2002). Telomere maintenance in human B lymphocytes. *Br J Haematol* **119**(3): 810-8.
- Marumoto, T., Hirota, T., Morisaki, T., Kunitoku, N., Zhang, D., Ichikawa, Y., Sasayama, T., Kuninaka, S., Mimori, T., Tamaki, N., Kimura, M., Okano, Y. und Saya, H. (2002). Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells* **7**(11): 1173-82.
- McClintock, B. (1942). The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **28**: 458-463.
- Melk, A., Ramassar, V., Helms, L. M., Moore, R., Rayner, D., Solez, K. und Halloran, P. F. (2000). Telomere shortening in kidneys with age. *J Am Soc Nephrol* **11**(3): 444-53.
- Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D. A. und Weinberg, R. A. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**(4): 785-95.
- Minamishima, Y. A. und Nakayama, K. (2002). Recovery of liver mass without proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in Skp2-deficient mice. *Cancer Res* **62**(4): 995-9.
- Miura, N., Horikawa, I., Nishimoto, A., Ohmura, H., Ito, H., Hirohashi, S., Shay, J. W. und Oshimura, M. (1997). Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* **93**(1): 56-62.
- Morin, G. B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**(3): 521-9.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L. und Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(18): 6622-6.
- Muller, H. J. (1938). The remaking of chromosomes. *Collecting Net* **13**: 181-195.
- Munoz-Jordan, J. L., Cross, G. A., de Lange, T. und Griffith, J. D. (2001). t-loops at trypanosome telomeres. *Embo J* **20**(3): 579-88.

- Murakami, A. und Tanaka, H. (1991). Identification of RB and p53 mutations in mouse lymphoma cell lines. *Mol Carcinog* **4**(5): 354-7.
- Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Ide, T. und Ishikawa, F. (1998). Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* **18**(1): 65-8.
- Nishida, N., Fukuda, Y., Komeda, T., Kita, R., Sando, T., Furukawa, M., Amenomori, M., Shibagaki, I., Nakao, K., Ikenaga, M. und et al. (1994). Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **54**(12): 3107-10.
- Norrbäck, K. F., Hultdin, M., Dahlenborg, K., Osterman, P., Carlsson, R. und Roos, G. (2001). Telomerase regulation and telomere dynamics in germinal centers. *Eur J Haematol* **67**(5-6): 309-17.
- Nugent, C. I. und Lundblad, V. (1998). The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* **12**(8): 1073-85.
- Ochiai, T., Urata, Y., Yamano, T., Yamagishi, H. und Ashihara, T. (2000). Clonal expansion in evolution of chronic hepatitis to hepatocellular carcinoma as seen at an X-chromosome locus. *Hepatology* **31**(3): 615-21.
- Oh, B. K., Jo Chae, K., Park, C., Kim, K., Jung Lee, W., Han, K. H. und Nyun Park, Y. (2003). Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* **39**(5): 786-92.
- Ohashi, K., Tsutsumi, M., Kobitsu, K., Fukuda, T., Tsujiuchi, T., Okajima, E., Ko, S., Nakajima, Y., Nakano, H. und Konishi, Y. (1996). Shortened telomere length in hepatocellular carcinomas and corresponding background liver tissues of patients infected with hepatitis virus. *Jpn J Cancer Res* **87**(5): 419-22.
- Paradis, V., Eschwege, P., Loric, S., Dumas, F., Ba, N., Benoit, G., Jardin, A. und Bedossa, P. (1998). De novo expression of CD44 in prostate carcinoma is correlated with systemic dissemination of prostate cancer. *J Clin Pathol* **51**(11): 798-802.
- Pang, J. H. und Chen, K. Y. (1994). Global change of gene expression at late G1/S boundary may occur in human IMR-90 diploid fibroblasts during senescence. *J Cell Physiol* **160**: 531-538.
- Peng, S. Y., Lai, P. L. und Hsu, H. C. (1993). Amplification of the c-myc gene in human hepatocellular carcinoma: biologic significance. *J Formos Med Assoc* **92**(10): 866-70.

- Pignolo, R. J., Martin, B. G., Horton, J. H., Kalbach, A. N. und Cristofalo, V. J. (1998). The pathway of cell senescence: WI-38 cells arrest in late G1 and are unable to traverse the cell cycle from a true G0 state. *Exp Gerontol* **33**: 67-80.
- Plentz, R., Caselitz, M., Bleck, J. S., Gebel, M., Flemming, P., Kubicka, S., Manns, M. P. (2004) Hepatocellular telomere shortening correlates with chromosomal instability and the development of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (in press).
- Ren, J. G., Xia, H. L., Just, T. und Dai, Y. R. (2001). Hydroxyl radical-induced apoptosis in human tumor cells is associated with telomere shortening but not telomerase inhibition and caspase activation. *FEBS Lett* **488**(3): 123-32.
- Rhodes, D., et al. (2002). Telomere architecture. *EMBO Rep* **3**(12): 1139-45.
- Rudi, J., Waldherr, R., Raedsch, R. und Kommerell, B. (1995). Hepatocyte proliferation in primary biliary cirrhosis as assessed by proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen labelling. *J Hepatol* **22**(1): 43-9.
- Rudolph, K. L. und DePinho, R. (2001). Telomeres and Telomerase in experimental liver cirrhosis. In: *The Liver: Biology and Pathobiology*. M. I. Arias et al. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1001-1011.
- Rudolph, K. L., Chang, S., Lee, H. W., Blasco, M., Gottlieb, G. J., Greider, C. und DePinho, R. A. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* **96**(5): 701-12.
- Rudolph, K. L., Chang, S., Millard, M., Schreiber-Agus, N. und DePinho, R. A. (2000). Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* **287**(5456): 1253-8.
- Rudolph, K. L., Millard, M., Bosenberg, M. W. und DePinho, R. A. (2001). Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet* **28**(2): 155-9.
- Samani, N. J., Boulton, R., Butler, R., Thompson, J. R. und Goodall, A. H. (2001). Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* **358**(9280): 472-3.
- Satoh, H., Hiyama, K., Takeda, M., Awaya, Y., Watanabe, K., Ihara, Y., Maeda, H., Ishioka, S. und Yamakido, M. (1996). Telomere shortening in peripheral blood cells was related with aging but not with white blood cell count. *Jpn J Hum Genet* **41**(4): 413-7.
- Satyanarayana, A., Manns, M. und Rudolph, K. (2004). Telomeres and Telomerase: A dual role in hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **in press**.
- Sharpless, N. E. und DePinho, R. A. (2002). p53: good cop/bad cop. *Cell* **110**(1): 9-12.
- Shay, J. W. (1999). At the end of the millennium, a view of the end. *Nat Genet* **23**: 382-383.

- Smogorzewska, A. und De Lange, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* **73**: 177-208.
- Su, L. K., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Preisinger, A. C., Moser, A. R., Luongo, C., Gould, K. A. und Dove, W. F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* **256**(5057): 668-70.
- Sudakin, V., Chan, G. K. und Yen, T. J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* **154**(5): 925-36.
- Tahara, H., Nakanishi, T., Kitamoto, M., Nakashio, R., Shay, J. W., Tahara, E., Kajiyama, G. und Ide, T. (1995). Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* **55**(13): 2734-6.
- Takakura, M., Kyo, S., Kanaya, T., Hirano, H., Takeda, J., Yutsudo, M. und Inoue, M. (1999). Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res* **59**(3): 551-7.
- Takubo, K., Izumiyama-Shimomura, N., Honma, N., Sawabe, M., Arai, T., Kato, M., Oshimura, M. und Nakamura, K. (2002). Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp Gerontol* **37**(4): 523-31.
- Takubo, K., Nakamura, K., Izumiyama, N., Furugori, E., Sawabe, M., Arai, T., Esaki, Y., Mafune, K., Kammori, M., Fujiwara, M., Kato, M., Oshimura, M. und Sasajima, K. (2000). Telomere shortening with aging in human liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**(11): B533-6.
- Tang, Z., Bhargadwaj, R., Li, B. und Yu, H. (2001). Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell* **1**(2): 227-37.
- Tanner, M. M., Grenman, S., Koul, A., Johannsson, O., Meltzer, P., Pejovic, T., Borg, A. und Isola, J. J. (2000). Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **6**(5): 1833-9.
- Theise, N. D., Park, Y. N. und Kojiro, M. (2002). Dysplastic nodules and hepatocarcinogenesis. *Clin Liver Dis* **6**(2): 497-512.
- Tiniakos, D., Spandidos, D. A., Kakkanas, A., Pintzas, A., Pollice, L. und Tiniakos, G. (1989). Expression of ras and myc oncogenes in human hepatocellular carcinoma and non-neoplastic liver tissues. *Anticancer Res* **9**(3): 715-21.

- Tommerup, H., Dousmanis, A. und de Lange, T. (1994). Unusual chromatin in human telomeres. *Mol Cell Biol* **14**(9): 5777-85.
- Urabe, Y., Nouse, K., Higashi, T., Nakatsukasa, H., Hino, N., Ashida, K., Kinugasa, N., Yoshida, K., Uematsu, S. und Tsuji, T. (1996). Telomere length in human liver diseases. *Liver* **16**(5): 293-7.
- van Steensel, B. und de Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**(6618): 740-3.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A. und de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**(3): 401-13.
- Vaziri, H. und Benchimol, S. (1996). From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol* **31**(1-2): 295-301.
- Vaziri, H., Schachter, F., Uchida, I., Wei, L., Zhu, X., Effros, R., Cohen, D. und Harley, C. B. (1993). Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* **52**(4): 661-7.
- Vulliamy, T. J., Knight, S. W., Mason, P. J. und Dokal, I. (2001). Very short telomeres in the peripheral blood of patients with X-linked and autosomal dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol Dis* **27**(2): 353-7.
- Vulliamy, T., Marrone, A., Goldman, F., Dearlove, A., Bessler, M., Mason, P. J. und Dokal, I. (2001). The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* **413**(6854): 432-5.
- Weng, N., Levine, B. L., June, C. H. und Hodes, R. J. (1997). Regulation of telomerase RNA template expression in human T lymphocyte development and activation. *J Immunol* **158**(7): 3215-20.
- Wiemann, S. U., Satyanarayana, A., Tsahuridu, M., Tillmann, H. L., Zender, L., Klempnauer, J., Flemming, P., Franco, S., Blasco, M. A., Manns, M. P. und Rudolph, K. L. (2002). Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *Faseb J* **16**(9): 935-42.
- Wilkens, L., Flemming, P., Gebel, M., Bleck, J., Terkamp, C., Wingen, L., Kreipe, H. und Schlegelberger, B. (2004). Induction of aneuploidie by increasing chromosomal instability during dedifferentiation of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1309-1314.
- Williams, E. J. und Iredale, J. P. (1998). Liver cirrhosis. *Postgrad Med J* **74**(870): 193-202.

- Wright, W. E. und Shay, J. W. (1992). Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet* **8**(6): 193-7.
- Wright, W. E. und Shay, J. W. (1992). The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol* **27**(4): 383-9.
- Wright, W. E. und Shay, J. W. (2001). Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev* **11**(1): 98-103.
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W. und Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* **18**(2): 173-9.
- Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D. und Shay, J. W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* **11**(21): 2801-9.
- Xu, X. R., Huang, J., Xu, Z. G., Qian, B. Z., Zhu, Z. D., Yan, Q., Cai, T., Zhang, X., Xiao, H. S., Qu, J., et al. (2001). Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 15089-94.
- Yang, H., Ou, C. C., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Kruk, P. A. und Cheng, J. Q. (2004). Aurora-A kinase regulates telomerase activity through c-Myc in human ovarian and breast epithelial cells. *Cancer Res* **64**(2): 463-7.
- Yang, L., Suwa, T., Wright, W. E., Shay, J. W. und Hornsby, P. J. (2001). Telomere shortening and decline in replicative potential as a function of donor age in human adrenocortical cells. *Mech Ageing Dev* **122**(15): 1685-94.

7 DANKSAGUNG

Prof. Dr. Manns danke ich für die Unterstützung und die großzügige Bereitstellung von Material und Arbeitsplatz im Labor der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Bei Prof. Dr. Müller möchte ich mich für die freundliche und hilfreiche Unterstützung im Rahmen des Promotionsverfahrens bedanken.

PD Dr. Rudolph danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die intensive Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit u.a. in Form von tatkräftiger Unterstützung, produktiven Diskussionen und dem Gegenlesen meiner Dissertation.

Ein herzlicher Dank geht auch an die Mitglieder der AG Rudolph, für international-kollegiale Zusammenarbeit im Laboralltag, für produktive Diskussionen und für ihre Unterstützung: Sonja, Meta, André, Ruben, Christoph, Satya, Nadia, Martina, Kodanda und Zhenyu. Masami Rudolph danke ich für die Hilfe bei der Whole mount in situ Hybridisierung und die nette Zusammenarbeit, die die Einarbeitung sehr erleichterte.

PD Dr. Malek und den Mitgliedern der AG Malek danke ich für produktive Diskussionen im Rahmen des Labmeetings. Insbesondere Uta möchte ich für die kurzweiligen Gespräche und ihre Hilfe bezüglich der Beta-Catenin- und der Feulgen-Färbung danken.

Den Mitgliedern der AG's Kubicka und Trautwein danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die Ratschläge. Insbesondere Dank geht an Bettina für die nette und produktive Zusammenarbeit und Florian für die geduldige Beantwortung meiner Fragen. Desweiteren danke ich Christian K, Chritina, Nils, Christian L , Ulrike, sowie allen, die ich an dieser Stelle vergessen habe zu erwähnen..

Prof. Kamino danke ich für die große Unterstützung mit der Auswertung der histologischen Schnitte. Prof. Dr. Ungewickell danke ich für die Bereitstellung des Mikroskops für die Auswertung der Q-FISH-Proben. Dr. Soudah danke ich für die Verpflegung und kurzweilige Stunden im Rahmen der Feulgen Auswertung.

Desweiteren danke ich Gisela Weier für ihre fachliche Hilfe in allen histologischen Belangen.

Meinen Eltern, Stine und Ivo danke ich für ihre Unterstützung, für ihre Geduld und für ihr Verständnis.

8 LEBENSLAUF

Persönliche Angaben Stefanie U. Wiemann

Bodenstedtstr. 8
30173 Hannover
Tel.: 0511-1691538
steffiwiemann@gmx.de
geboren am 21.03.1975 in Kaiserslautern

Studium

- Okt. 1994- März 2000 Studium der Biologie an der Carl-von-Ossietzky Universität, Oldenburg, und an der Universität Bielefeld, Diplom-Biologin (Abschlußnote 1,2). Thema der Diplomarbeit:
„Der Promotor des Saccharosesynthase-Gens MtSucS1: Funktionelle Analyse in transgenen Wurzeln und Knöllchen von *Medicago truncatula* und Anwendung der *Medicago truncatula* Transformation“, Note 1,5
- April 2001- Juni 2004 Wiss. Angestellte und Promotion an der MHH, Hannover, Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie (Prof. M.P. Manns), Arbeitsgruppe PD Dr. K.L. Rudolph, Betreuung durch Prof. W.H. Müller (Institut für Biochemie)

Zusatzqualifikationen

- Kurs "Tierexperimentelle Methoden" zur Erlangung von Fachkenntnissen für einfache operative Eingriffe an kleinen Versuchstieren (nach §9(1) des Tierschutzgesetzes), MHH.
- Fortbildungslehrgang "Gentechnische Sicherheit" (nach §15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV), MHH, Hannover

Veröffentlichungen auf Tagungen und Kongressen

- Wiemann SU**, Kamino K, Manns MP, Rudolph KL. (2004) Telomere shortening has a diverse effect on tumor suppression, liver regeneration and survival in mTERC deficient mice. *J Hepatology* Apr;40(S1):105.
- Wiemann SU**, Buer J, Manns MP, Rudolph KL. (2003) Misregulation of mitotic genes in cirrhosis induced by telomere shortening. *J Hepatology* Apr;38(S2):87

Wiemann SU, Buer J, Zipfel B, Manns MP, Rudolph KL. (2002) Profiling of gene expression changes of cirrhosis induced by telomere shortening in telomerase deficient mice. *J Hepatology* Apr;36(S1):66-67

Publikationen

Wiemann SU*, Satyanarayana A*, Tsahuridu M*, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL. (2002) Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* Jul;16(9):935-42. PMID: 12087054 (*first three authors contributed equally to this work)

Wiemann SU, Manns MP, Rudolph KL. (2004) Senescence and Chromosomal Instability by Telomere Shortening affect Liver Regeneration and Hepatocarcinogenesis. In: *State of the Art of Hepatology: Molecular and Cell Biology, Falk Symposium 138*. Blum HE & Manns MP. Dordrecht, Niederlande, Kluwer Academic Publishers BV: 10-18.

Wiemann SU, Satyanarayana A, Buer J, Kamino K, Manns MP, Rudolph KL. (2004) Contrasting effects of Telomere Shortening on organ homeostasis, carcinoma suppression and survival during chronic liver damage. *Oncogene* (in press).

Satyanarayana A, **Wiemann SU**, Buer J, Lauber J, Dittmar KE, Wustefeld T, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL. (2003) Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. *EMBO J*. Aug 1;22(15):4003-13. PMID: 12881434

Plentz RR, **Wiemann SU**, Flemming P, Meier PN, Kubicka S, Kreipe H, Manns MP, Rudolph KL. (2003) Telomere shortening of epithelial cells characterises the adenoma-carcinoma transition of human colorectal cancer. *Gut* Sep;52(9):1304-7. PMID: 12912862

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt habe. Die Anfertigung erfolgte unter der Leitung von Prof. W. Müller und Prof. Dr. med. Manns unter der Betreuung von PD Dr. med. K.L. Rudolph.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt.

Ich versichere, daß ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.