

Alexandra Rueß  
Dr. med.

## **Experimentelle Untersuchungen zur Telomeraseaktivität und Telomerlängen in humanen Lymphoblasten nach ionisierender Bestrahlung**

Geboren am 22.10.1976 in Tokio, Japan  
Reifeprüfung am 23.06.1995 in Düsseldorf  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1995/96 bis WS 2001/02  
Physikum am 09.09.1997 an der Universität Greifswald  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg und Basel, Schweiz  
Staatsexamen am 13.05.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Radiologie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. K.-J. Weber

Die Fähigkeit der Tumorzellen im Gegensatz zu normalen menschlichen Zellen, ein uneingeschränktes Wachstumspotential zu erlangen, wird durch die Reaktivierung der Telomerase und die daraus entstehende Möglichkeit der Telomerstabilisierung erreicht. In den letzten Jahren wurde die Telomerase mit großem Interesse untersucht, da dieses Enzym in ca. 80% aller menschlichen Tumore aktiv ist. Auch das Tumorsuppressorgen TP53, dem eine wichtige Schutzfunktion vor genetischer Mutation und Entartung von Zellen zugeschrieben wird, steht im Zentrum der Tumorgenese-forschung.

Durch die Verwendung von verwandten Lymphoblasten-Zellreihen, die sich nur in ihrem TP53 Status unterschieden (TP53-Wildtyp TK6-Zellen und WTK1-Zellen mit einem mutiertem TP53), sollten in dieser Arbeit eine TP53 abhängige Induktion der Telomeraseaktivität durch Bestrahlung mit niedrigen Dosen festgestellt werden. Außerdem sollten für weitere Experimente Zellen hinzugezogen werden, die mit dem E6 Gen des Humanen Papilloma Virus transfiziert worden waren (TK6 E6, TP53-negativ). Zusätzlich sollten die Telomerlängen dieser Zellen vor und nach Bestrahlung gemessen werden, um die möglichen Auswirkungen der Telomeraseinduktion zu erkennen.

Die Telomeraseaktivität in den TK6-, WTK1- und TK6 E6-Zellen (unbestrahlt und nach Bestrahlung mit einem Linearbeschleuniger) wurde durch PCR ELISA mit internen Standards zur Quantifizierung untersucht. Um die Ergebnisse der unterschiedlichen Versuchsreihen vergleichen zu können, wurde ein Zelläquivalent errechnet, das sich aus den Titrationsreihen der unbestrahlten Zellen ergab und dann der relativen Induktion durch Bestrahlung gegenübergestellt werden konnte. Die verschiedenen Zellreihen wurden regelmäßig auf deren spezifisches Apoptoseverhalten und klonogenes Überleben überprüft.

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit zeigten, dass die Telomeraseaktivität der TK6- und WTK1-Zellen unbestrahlt wesentlich geringer war (optische Dichte: 0.21, bzw. 0.17) als bei den E6-transfizierten Zellen (WTK1 E6: 0.49, TK6 E6: 0.81). Bei Dosen >1 Gy wurde die Aktivität bei den nicht-transfizierten Zellen ungefähr gleich stark induziert (2.5fach 1h nach Bestrahlung mit 4 Gy, 4-5fach 24h nach Bestrahlung mit 1 Gy). Bei der niedrigen Dosis von 0.5 Gy wurde nur bei TK6-Zellen eine Induktion nachgewiesen (2fach nach 1h). Im Gegensatz dazu zeigten die mit dem E6-Gen transfizierten Zellen eine nur geringe Induktion der Telomeraseaktivität durch Bestrahlung (von 1.25 bis max. 1.5fach bei allen applizierten Dosen von 0.5 bis 10 Gy). Diese Ergebnisse können möglicherweise darauf zurückgeführt

werden, dass in diesen Zellen bereits ohne Bestrahlung eine hohe messbare Telomeraseaktivität besteht.

Die strahleninduzierte Telomeraseaktivität in humanen Lymphoblasten lässt sich daher offensichtlich sowohl auf TP53-abhängige als auch auf TP53-unabhängige Induktionswege zurückführen. Vor allem bei niedrigen Bestrahlungsdosen spielt wohl die TP53-abhängige Induktion eine wichtige Rolle. Die Transfektion der Lymphoblasten mit dem E6-Onkoprotein führt schon ohne Bestrahlung zu einer Induktion der Telomerase. Diese Rolle von dem E6-Gen entspricht der allerersten Beobachtung einer onkogenen Telomeraseaktivierung in den Keratozyten. Vermutlich wird dieser E6-Effekt durch die Aktivierung des c-MYC-Protoonkogens vermittelt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Auswirkung der bestrahlungsbedingten Telomeraseaktivitätsinduktion auf die Telomerlängen untersucht. Zur Bestimmung dieser Längen, die sich als terminale Restriktionsfragmente (TRF) darstellen lassen, wurde eine Southern-Plot-Hybridisierung mit einer biotinylierten Telomerprobe angewandt.

Die Telomerlängen der TK6- (6.3 kb  $\pm$  0.57) und WTK1-Zellen (3.34 kb  $\pm$  0.37) verlängerten sich um ca. 1.3 kb 2 Wochen nach der Bestrahlung mit 1 Gy. Nach einer Woche war noch keine statistisch signifikante Verlängerung der Telomerlängen nachweisbar. Dieses weist darauf hin, dass die bestrahlungsbedingte Induktion der Telomeraseaktivität zu einer Telomerverlängerung führt, die durch Persistenz und/oder Transmission über mehrere Zellgeneration weitergegeben werden kann.

Die biologische Rolle der Telomeraseaktivierung durch ionisierende Strahlen ist auch weiterhin unklar. Allerdings zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass neben den durch den Tumorsuppressor TP53 induzierten Signalketten noch einige andere Signalwege beteiligt sind. Dies kann als Ausgangspunkt für weitergehende Untersuchungen und Charakterisierungen dieses strahleninduzierbaren Prozesses angesehen werden.