

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie
Leitung Prof. Dr. E. Dikomey

Einfluss einer Telomerverkürzung auf die Strahlensensibilität von Tumorzellen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Daniel Bali, geb. Rößler,
aus Jena

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

Datum der Disputation: 06.05.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: der Vorsitzende: Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. med. Tim Brümmendorf

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. med. Jochen Dahm-Daphi

Für
Dr. med. Marwan Bali
1940 - 2008

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	7
2.	EINLEITUNG	9
2.1.	Telomere – spezialisierte Endstrukturen der Chromosomen	10
2.1.1.	<i>Historie der Telomerforschung</i>	12
2.1.2.	<i>Aufbau und Schutzfunktion der Telomerregion</i>	12
2.1.3.	<i>„Hayflick-Limit“ und „mitotische Uhr“</i>	14
2.2.	Telomerase – die Synthese telomerischer DNA	15
2.2.1.	<i>Historie der Telomeraseforschung</i>	15
2.2.2.	<i>Aufbau der Telomerase</i>	15
2.2.3.	<i>Telomerunterhalt durch Telomeraseaktivität</i>	16
2.2.4.	<i>Natürliche Aktivität der Telomerase</i>	17
2.2.5.	<i>Die zentrale Bedeutung der Telomerase in der Tumorentstehung</i>	18
2.3.	Telomerassozierte Proteine und DNA damage response	19
2.3.1.	<i>ATM</i>	21
2.3.2.	<i>TRF2</i>	21
2.3.3.	<i>Ku und DNA-PKcs</i>	22
2.3.4.	<i>MRN-Komplex</i>	22
2.4.	Der strahlensensible Phänotyp im mTERC^{-/-}-Mausmodell	23
2.4.1.	<i>Strahlensensibilität im mTERC^{-/-}-Mausmodell</i>	23
2.5.	Telomere und Telomerase als Angriffspunkte einer Tumorthherapie	24
2.5.1.	<i>Angriffsmöglichkeiten an der Telomerase und den Telomeren</i>	24
2.5.2.	<i>Selektive Hemmung der Telomerase durch BIBR 1532</i>	25
2.6.	Telomere und Telomerase in der Entwicklung von Leukämien	27
2.6.1.	<i>Chronisch Myeloische Leukämie</i>	27
3.	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1.	Telomerverkürzung in der chronisch myeloischen Leukämiezelllinie K-562	29
3.1.1.	<i>Die Tumorzelllinie K-562</i>	29
3.1.2.	<i>Telomerverkürzung in der Tumorzelllinie K-562 unter Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532</i>	29
3.1.3.	<i>Die Zelllinien A, B, C und D</i>	30
3.2.	Zellkultur	30
3.3.	Bestrahlung	31
3.4.	Trypan-Blau Assay: Bestimmung der Zellvitalität	31
3.5.	Proliferationsassay: Bestimmung der Wachstumskinetik	32
3.6.	Durchflusszytometrie: Bestimmung der Zellzyklusverteilung und des DNA-Gehaltes	33
3.6.1.	<i>Prinzip der Durchflusszytometrie</i>	33
3.6.2.	<i>Messung von Zellzyklusverteilung und DNA-Gehalt</i>	34

3.6.3.	<i>Zellfixierung und Messung am FACScan</i>	34
3.6.4.	<i>Herstellung des Leukozytenstandards für die DNA-Gehaltsbestimmung</i>	35
3.7.	DAPI Assay: Bestimmung des Anteils irreversibel geschädigter Zellen nach Röntgenbestrahlung mittels DNA Färbung durch DAPI	36
3.7.1.	<i>Bestrahlungsinduzierter Zelltod</i>	36
3.7.2.	<i>Versuchsablauf und Auswertung des DAPI-Assays</i>	36
3.8.	Immunhistochemie: Bestimmung der quantitativen Reparaturleistung für DNA-Doppelstrangbrüche nach Röntgenbestrahlung durch Nachweis von γ-H2AX Foci	37
3.8.1.	<i>Prinzip der γ-H2AX Foci Entstehung</i>	37
3.8.2.	<i>Zellpräparation und immunhistochemische Markierung des Histons γ-H2AX</i>	38
3.8.3.	<i>Auswertung der γ-H2AX Foci</i>	39
3.9.	Metaphasepräparation nach Röntgenbestrahlung in der G1-Phase: Bestimmung der instabilen Chromosomentypaberrationen	40
3.9.1.	<i>Allgemeine Einleitung zur Methode der Bestimmung von Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen nach Bestrahlung</i>	40
3.9.2.	<i>Metaphasepräparation und Metaphasen-Präparate</i>	41
3.9.3.	<i>Instabile Chromosomentypaberrationen: Präparation, Messung und Auswertung</i>	42
3.10.	Metaphasepräparation nach Röntgenbestrahlung in der G1-Phase: Bestimmung der stabilen Chromosomentypaberrationen	43
3.10.1.	<i>Prinzip der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)</i>	44
3.10.2.	<i>Stabile Chromosomentypaberrationen: Präparation, Messung und Auswertung</i>	44
3.11.	Metaphasepräparation nach Röntgenbestrahlung in der G2-Phase: Bestimmung der Chromatidentypaberrationen	46
3.11.1.	<i>Chromatidentypaberrationen: Präparation, Messung und Auswertung</i>	47
3.12.	Proliferationsassay: Bestimmung des Zellüberlebens nach Röntgenbestrahlung	48
3.13.	Materialien	49
3.13.1.	<i>Chemikalien und Fertiglösungen</i>	49
3.13.2.	<i>Geräte, Computersoftware</i>	50
3.13.3.	<i>Antikörper, Sonden-DNA</i>	51
3.13.4.	<i>Puffer- und Waschlösungen</i>	51
4.	ERGEBNISSE	54
4.1.	Wachstumskinetik	54
4.2.	Zellzyklusverteilung und DNA-Gehalt	56
4.3.	Induzierter Zelltod nach Röntgenbestrahlung	59
4.4.	γ-H2AX Foci-Formation nach Röntgenbestrahlung	60
4.5.	Instabile Chromosomentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung	64
4.6.	Stabile Chromosomentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung	72
4.7.	Chromatidentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung	74

4.8.	Zellüberleben nach Röntgenbestrahlung	78
5.	DISKUSSION	81
5.1.	Wachstum und Zellzyklusverteilung	81
5.2.	Induzierter Zelltod nach Bestrahlung	84
5.3.	γ-H2AX Foci: Markierung von dysfunktionalen Telomeren und Bestimmung der quantitativen Reparaturleistung nach Bestrahlung	84
5.3.1.	<i>γ-H2AX Foci an dysfunktionalen Telomeren</i>	85
5.3.2.	<i>Quantitative Reparaturleistung nach Röntgenbestrahlung</i>	86
5.4.	Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen: Bestimmung der qualitativen Reparaturleistung nach Bestrahlung	87
5.4.1.	<i>Instabile und stabile Chromosomentypaberrationen</i>	87
5.4.2.	<i>Chromatidentypaberrationen</i>	89
5.4.3.	<i>Zusammenfassende Beurteilung der qualitativen Reparaturleistung nach Röntgenbestrahlung</i>	89
5.5.	Überleben nach Röntgenbestrahlung	92
5.6.	Schlussfolgerungen	93
6.	ZUSAMMENFASSUNG	96
7.	LITERATURVERZEICHNIS	98
8.	LEBENS LAUF	107
9.	DANKSAGUNG	109
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	111

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Die Radioonkologie spielt eine wichtige Rolle in der kurativen und palliativen Behandlung bestrahlungsempfindlicher Malignome. Ein besonderer Forschungsschwerpunkt liegt in der Entwicklung von Methoden zur möglichst selektiven Verstärkung der Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung, wobei sich der therapeutisch relevante Effekt ionisierender Strahlung durch die direkte und indirekte Induktion von DNA-Schäden mit nachfolgender Proliferationshemmung oder Apoptose der Zellen äußert. Dabei determiniert die Reparaturleistungsfähigkeit einer Zelle für induzierte DNA-Schäden deren generelle Strahlenempfindlichkeit. Die Fähigkeit zur Erkennung und zur raschen Reparatur solcher induzierter DNA-Schäden wird über ein komplexes System an Proteinen vermittelt, die sich gegenseitig kaskadenartig in ihrer Aktivität beeinflussen und die man unter dem Begriff des *DNA damage reponse* zusammenfasst.

Die DNA eukaryonter Zellen ist auf eine speziesabhängige Anzahl linearer Chromosomen aufgeteilt. Die Chromosomen verfügen über hochspezialisierte Endstrukturen, die sogenannten Telomere, deren Funktion unter anderem im Schutz der kodierenden DNA-Abschnitte vor degradierenden Prozessen und der Vermeidung einer ungewollten Aktivierung des *DNA damage response* besteht.

Forschungen der vergangenen Jahren haben überzeugend Zusammenhänge zwischen den zellbiologischen Systemen der Reaktion auf DNA-Strahlenschädigungen auf der einen Seite und der Regulation des Status der Telomerregion der Chromosomen auf der anderen Seite herstellen können. So ließen sich bestimmte Proteine, die zentrale Funktionen im *DNA damage response* wahrnehmen, in fester Assoziation innerhalb der DNA-Protein-Komplexe der Telomerregion nachweisen. Des Weiteren zeigte sich im Knock-out-Mausmodell mit stark verkürzten Telomeren eine deutliche Zunahme der Strahlensensibilität bei genereller Beeinträchtigung der genomischen Stabilität.

Unter der Prämisse einer engen Verknüpfung der zellinternen Systeme des *DNA damage response* auf der einen und der Telomerregulation auf der anderen Seite entwickelt sich damit die Arbeitshypothese, dass eine artifizielle Verkürzung der Telomerlänge zu einer nachweisbaren Änderung der Strahlensensibilität in einem Zellsystem führen müsste. Die Bestätigung dieser Hypothese könnte dann klinische Relevanz in der Strahlentherapie erreichen, wenn durch eine praktikable Administration eines Pharmakons im Tumorgewebe eine Telomerlängenreduktion hervorgerufen werden könnte, die zu einer messbaren Zunahme der Bestrahlungswirkung führen

würde.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an der humanen Tumorzelllinie K-562, einer chronisch myeloischen Leukämiezelllinie, durchgeführt. Durch Vorbehandlung von Subpopulationen dieser Tumorzelllinie mit dem pharmakologischen Wirkstoff BIBR 1532, einem Telomeraseinhibitor, konnte bereits eine messbare Reduktion der durchschnittlichen Telomerlänge erzielt werden. Experimentell wurden nun das Verhalten von unbehandelten Kontrollsubpopulationen mit unbeeinflusster Telomerlänge mit dem der Subpopulationen mit artifiziell verkürzten Telomeren unter folgenden Fragestellungen verglichen:

1. Führt die pharmakologische Verkürzung der durchschnittlichen Telomerlänge in den Tumorzellen zu einer primären, messbaren Veränderung der Proliferation?
2. Zeigen die Tumorzellen mit reduzierter durchschnittlicher Telomerlänge eine Veränderung in der quantitativen und qualitativen Reparaturleistungsfähigkeit für strahleninduzierte DNA-Schäden, gemessen durch
 - a. die Kapazität zur DNA-Doppelstrangbruchreparatur mittels der γ -H2AX-Foci-Methode,
 - b. die Bildung von instabilen Chromosomentypaberrationen nachgewiesen an Metaphasenpräparationen,
 - c. die Bildung von stabilen Chromosomentypaberrationen nachgewiesen durch FISH-Experimente an Metaphasenpräparationen und
 - d. die Bildung von Chromatidentypaberrationen mittels G2-Assay?
3. Führt die pharmakologische Verkürzung der durchschnittlichen Telomerlänge in den Tumorzellen zu einer Veränderung der generellen Strahlenempfindlichkeit, gemessen im DAPI-Assay und im Proliferationsassay nach Röntgenbestrahlung?

2. EINLEITUNG

Krebsleiden sind mit einem Anteil von 26.6 % die zweithäufigste Todesursache in Deutschland nach den Herz-Kreislaufkrankungen mit einem Anteil von 47,4 % (WHO Global Infobase: Main causes of death in Germany, projected 2005). Die Neuerkrankungsrate (Inzidenz) lag 2004 für Männer bei 453,6 Fällen und für Frauen bei 330,8 Fällen pro 100.000 Einwohnern (Robert-Koch-Institut (Hrsg.), 2008). Doch während einerseits die Inzidenz der Krebserkrankungen in den vergangenen Jahrzehnten stetig angestiegen ist und damit ein Drittel der Menschen im Laufe ihres Lebens von einer solchen Erkrankung betroffen ist, sinkt andererseits die Krebssterblichkeit (Mortalität) kontinuierlich. Dieser Rückgang der Krebsmortalität ist im Wesentlichen auf die frühzeitigere Erkennung und die (bei bestimmten Krebsarten) verbesserten Behandlungsmöglichkeiten zurückzuführen.

Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie (Radioonkologie) bilden die drei Säulen der modernen Krebsbehandlung. Abhängig von der Tumorentität, dem Tumorstadium, der individuellen Situation des Erkrankten und dem primären Therapieziel werden sie im Therapieverlauf als alleinige Maßnahme oder kombiniert eingesetzt. Über die Hälfte aller Krebspatienten erhält im Laufe ihrer Behandlung eine Bestrahlung, sei es unter der kurativen Zielsetzung der Tumorvernichtung oder unter palliativen Gesichtspunkten, zum Beispiel bei der schmerzlindernden Bestrahlung von Knochenmetastasen. In der Summe werden ca. 90-95 % aller Krebsheilungen allein durch lokoregionäre Behandlungsverfahren, also chirurgisch und strahlentherapeutisch, erzielt.

Das Hauptwirkprinzip der Strahlentherapie beruht auf der durch Energieübertragung in das durchstrahlte (Tumor)Gewebe hervorgerufenen Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNA), des Trägers der genetischen Information. Tumorzellen haben im Vergleich zu Zellen gesunder Gewebe oftmals reduzierte Fähigkeiten, solche DNA-Schädigungen zu erkennen und rechtzeitig zu reparieren. Auf der Basis von Bestrahlungsexperimenten an Zellkulturen ergibt sich rechnerisch pro Gray Röntgenbestrahlung pro Zelle eine Anzahl von 3.000 bis 4.000 Basenschäden, 1.000 Einzelstrangbrüchen und 40 Doppelstrangbrüchen der DNA. 99 % dieser Schäden werden innerhalb kürzester Zeit repariert (Dikomey *et al.*, 2001). Gelingt die Reparatur jedoch nicht, oder läuft sie fehlerhaft ab, so droht das direkte Absterben oder der Verlust der weiteren Teilungsfähigkeit der Zelle. In der Behandlung von Tumoren mit ionisierender Strahlung wird genau dieser Effekt genutzt. Theoretisch ist die vollständige Vernichtung eines Tumors durch Bestrahlung

lediglich eine Frage der eingesetzten Strahlenmenge, der Dosis. Leider trifft bei der Bestrahlung eines lebenden Organismus die Strahlung bis zu einem gewissen Umfang auch stets gesundes, zu schonendes Gewebe, wodurch die applizierbare Bestrahlungsdosis limitiert wird. Ein wesentliches Ziel der medizinischen Forschung auf dem Gebiet der Radioonkologie ist daher die Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten, die zu einer spezifischen Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit von Tumorgeweben führen und gesundes Normalgewebe möglichst unbeeinflusst lassen. Ein denkbarer Weg in diese Richtung ist die Beeinflussung der zellulären Reparatursysteme für DNA-Schäden. An der Reparatur eines strahleninduzierten DNA-Schadens sind über die Prozesse des Erkennens des Schadens, der Vorbereitung des betroffenen DNA-Abschnittes für den Reparaturprozess und die folgende eigentliche Reparatur eine Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichsten Funktionen beteiligt. In den vergangenen Jahren konnte nachgewiesen werden, dass ein Teil dieser DNA-Reparaturproteine zugleich eng mit den Endabschnitten an den Chromosomen, den sogenannten Telomeren, assoziiert ist. Des Weiteren hatten Veränderungen in der Struktur der Telomere Auswirkungen auf die genomische Stabilität von (Tumor)Zellen. Inwieweit eine Beeinflussung der Telomere zu einer Veränderung der zellulären Reparaturleistung für strahleninduzierte DNA-Schäden führt, war Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

2.1. Telomere – spezialisierte Endstrukturen der Chromosomen

In den meisten kernlosen Prokaryonten ist das gesamte Genom in einem ringförmigen DNA-Molekül kodiert. Die evolutionär höherstehenden Eukaryonten dagegen verteilen die genetische Information auf eine artspezifisch variable Anzahl linearer Abschnitte von DNA-Protein-Komplexen, die Chromosomen. Diese Abkehr von der Ringstruktur im Laufe der evolutionären Entwicklung birgt aus zweierlei Gründen Gefahren für die Integrität der DNA:

Erstens wäre ein freiliegender DNA-Protein-Komplex an den Chromosomenenden beständig degradierenden Prozessen ausgesetzt. Dazu gehören Angriffe verdauender Enzyme (DNAsen, Proteasen) ebenso wie (ungerichtete) Aktivitäten von Reparatur- und Rekombinationsprozessen gegen den vermeintlichen „Bruch“ des DNA-Doppelstrangs, als der freie Enden einzel- und doppelsträngiger DNA von der zellinternen DNA-Schadenskontrolle angesehen werden.

Zweitens verkürzt sich mit jedem Zellteilungszyklus der in die Tochterzelle weitergegebene DNA-Strang jedes Chromosoms. Dieses Phänomen ist als „Problem des Replikationsendes“ bekannt und beruht zum einen auf der Unfähigkeit der DNA-Polymerasen zur Replikation des ä-

ßersten Endes des in 3'-5' Richtung abgelesenen linearen DNA-Stranges (Watson, 1972; Olovnikov, 1973, Harley *et al.*, 1990) und zum anderen auf bestimmten Prozessierungen des frisch replizierten DNA-Doppelstranges, die mit einem Verlust an Basen einhergehen (Wellinger *et al.*, 1996).

Als Folge droht stets der Verlust von kodierenden DNA-Abschnitten und damit von möglicherweise zellüberlebensnotwendigen genetischen Informationen. Aus diesem Grunde bilden eine spezifische DNA-Sequenz und spezialisierte Proteine an den Chromosomenenden eine Struktur aus, die wie eine Kappe den zu schützenden nachgeordneten Chromosomenabschnitten aufliegt und die man als Telomer(region) bezeichnet (siehe Abb. 1).

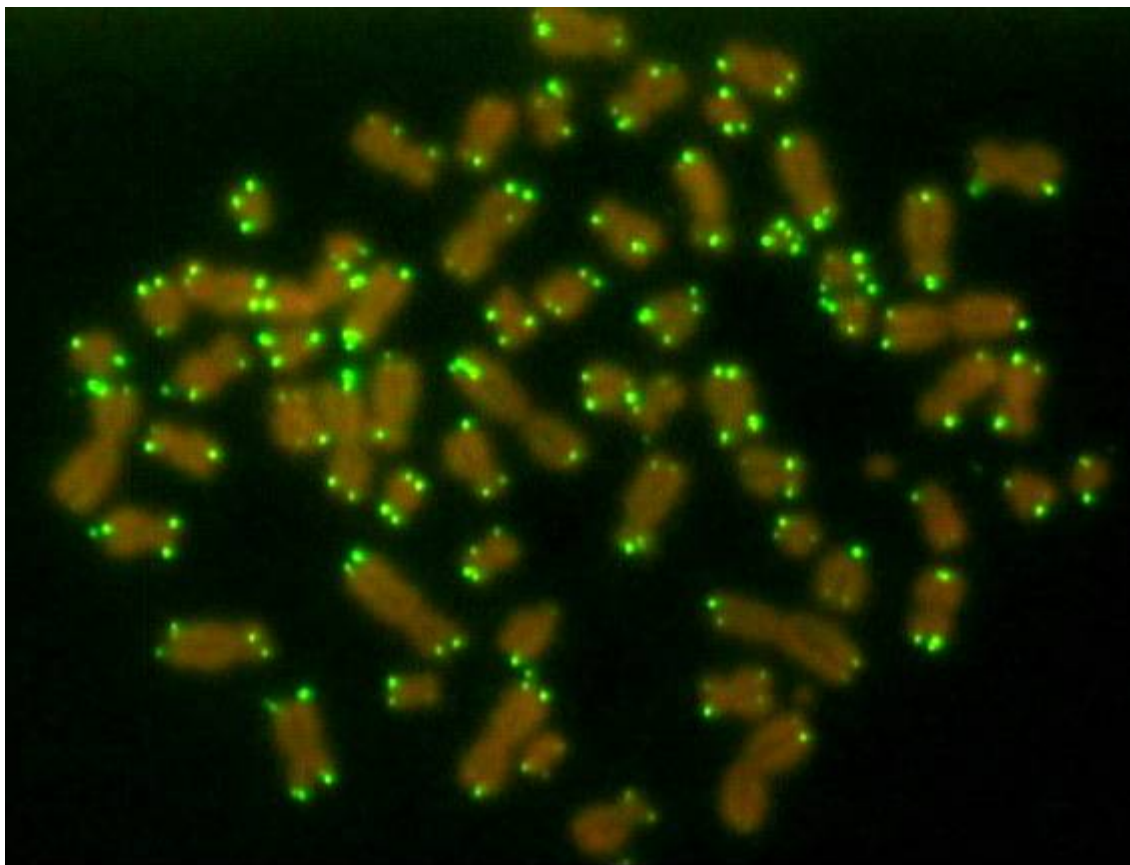


Abb. 1: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Telomerregion in der Tumorzelllinie K-562. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eines Metaphasen-Präparates (siehe 3.9.2) der Tumorzelllinie K-562 mit einer Sonden-DNA gegen die Telomersequenz 5'-TTAGGG-3'. Das grünfluoreszierende Hybridisierungsprodukt repräsentiert an den mit Propidiumjodid rot gefärbten Chromosomen die Regionen mit telomerischer DNA.

2.1.1. *Historie der Telomerforschung*

Dass natürliche Chromosomenenden andere Eigenschaften aufweisen, als die Enden, die an (herbeigeführten) Chromosomenbrüchen entstehen, wurde ungefähr zeitgleich von H.J. Müller und B. McClintock gezeigt, die beide entscheidende Forschungen zur chromosomalen Stabilität betrieben. McClintock arbeitete mit Maispflanzen und untersuchte die Prozessierung von Chromosomenbrüchen, die im Rahmen der Meiose und Mitose auftreten (McClintock, 1941), während Müller sich mit röntgenstrahleninduzierten Doppelstrangbrüchen der DNA am Modell der Fruchtfliege beschäftigte (Müller, 1938). Im Gegensatz zur DNA an den Chromosomenbrüchen schien die DNA an den Chromsomenenden vor den Reparatur- und Rekombinationsprozessen geschützt zu sein. Wegen dieser offensichtlichen Andersartigkeit benannte Müller die Chromosomenenden als *Telomere* (nach dem griechischen Worten für „End“ und „Teil“). Die DNA-Sequenz eines Telomers wurde 1978 zuerst beim Wimperntierchen Tetrahymena durch E.H. Blackburn *et al.* (1978) entschlüsselt, die des Menschen noch einmal 10 Jahre später durch R.K. Moyzis *et al.* (1988).

2.1.2. *Aufbau und Schutzfunktion der Telomerregion*

Die Telomerregion ist, wie andere Chromosomenregionen auch, ein Komplex aus DNA und Proteinen. Die telomerische DNA, in der keine genetische Information kodiert ist, besteht dabei aus kurzen Wiederholungen der immergleichen Sequenz, den *telomeric repeats*. Der DNA-Strang, welcher das 3'-Ende enthält, ist bei den meisten Eukaryonten reich an Guanin und wird daher „G-Strang“ genannt. Entsprechend enthält der komplementäre Strang mit dem 5'-Ende viel Cytosin und wird als „C-Strang“ bezeichnet. In humanen Zellen, und wahrscheinlich denen der meisten Vertebraten (Meyne *et al.*, 1989), hat die wiederholte Sequenz im G-Strang die Basenabfolge 5'-TTAGGG-3' und die Gesamtlänge der telomerischen DNA, auf die man sich auch bezieht, wenn man von der „Telomerlänge“ im allgemeinen spricht, beträgt ca. 10-15 kb (Moyzis *et al.*, 1988). Der guaninreiche Strang mit dem 3'-Ende überragt den Komplementärstrang an dessen 5'-Ende noch einmal um 30-110 Nukleotide und bildet den sogenannten 3'-Überhang (Chai *et al.*, 2006a). Sowohl die Zusammensetzung der Basenabfolge der *telomeric repeats* als auch die Länge der telomerischen DNA und des 3'-Überhangs ist spezieabhängig verschieden; der Grund hierfür ist nicht bekannt. An der unmittelbaren Bildung des DNA-Protein-Komplexes der Telomerregion sind beim Menschen, soweit bisher identifiziert, die folgenden Proteine beteiligt: TRF1 und TRF2, TIN2, POT1, TANK1 und TANK2 sowie hRap1 (siehe 2.3, Tab.1). Sie agieren

und binden in unterschiedlichem Ausmaß sowohl an doppel- und einzelsträngiger telomerischer DNA als auch untereinander und bilden den sogenannten „Shelterin“-Komplex (*Übersicht in de Lange, 2005; Ye et al., 2004*). Zahlreiche weitere Proteine, insbesondere solche, die dem Bereich des *DNA damage response* und DNA-Reparatur zuzuordnen sind, nehmen Funktionen an der Telomerregion wahr (ausführliche Darstellung der Thematik in Kapitel 2.3). Unter der Regulation durch Komponenten des Shelterinkomplexes formt die telomerische DNA eine lassoförmige Struktur aus, die man als *t-loop* bezeichnet (siehe Abb. 2). Hierbei schlägt das äußerste Ende des DNA-Stranges bis dicht vor die subtelomerische Chromosomenregion schleifenförmig zurück. Anschließend wird der einzelsträngige 3'-Überhang in den dort vorliegenden DNA-Doppelstrang integriert und komplettiert damit die Lasso-Struktur, welche sich elektronenmikroskopisch darstellen lässt (Griffith *et al.*, 1999; Yoshimura *et al.*, 2004). Hauptaufgabe des *t-loop* ist wahrscheinlich das „Verstecken“ des freien DNA-Endes, sodass dieses nicht den Angriffen degradierender Prozesse ausgesetzt ist. Somit sind durch die spezielle Architektur der Telomerregion die kodierenden Abschnitte an den Enden der linearen Chromosomen vor Degradation und ungewollter Prozessierung geschützt, womit eines der beiden eingangs in diesem Kapitel dargestellten Probleme auf elegante Weise gelöst erscheint.

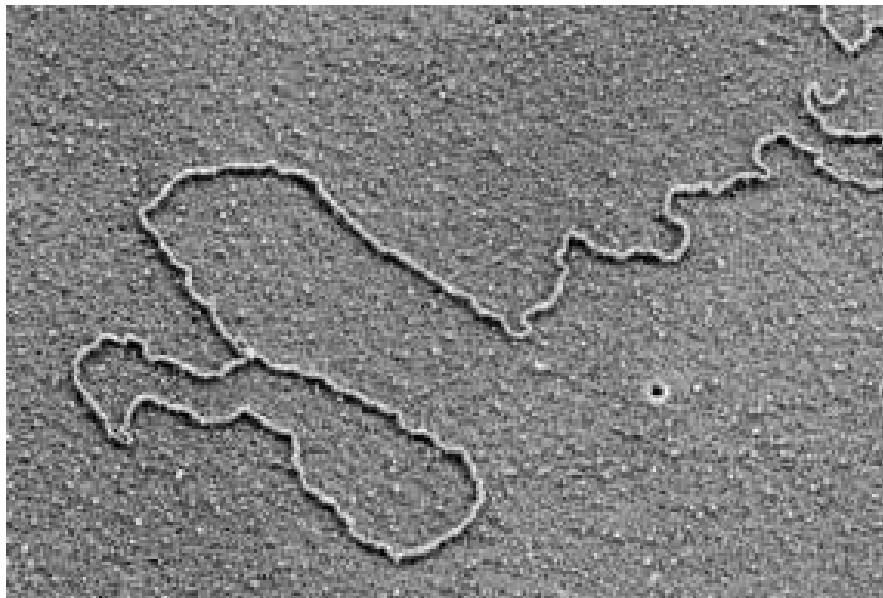


Abb. 2: Visualisierung des T-Loops.
(aus Griffith *et al.*, 1999; elektronenmikroskopische Aufnahme telomerischer DNA aus Mäuseleberzellen)

2.1.3. „Hayflick-Limit“ und „mitotische Uhr“

Mit jeder Replikationsrunde verkürzen sich die linearen Chromosomen in eukaryonten Zellen. Ursache dieses als „Problem des Replikationsendes“ bekannten Phänomens ist, wie eingangs in diesem Kapitel beschrieben, zum einen das Unvermögen der DNA-Polymerasen zur vollständigen Replikation des in 3'-5' Richtung abgelesenen DNA-Stranges und zum anderen postreplikative Prozessierungen der DNA. Der dadurch bei jeder Mitose somatischer Zellen auftretende DNA-Verlust beträgt zwischen 50 bis 200 Basenpaare (Harley *et al.*, 1990; Levy *et al.*, 1992). Grundsätzlich besteht durch diese replikationsbedingten, stetigen Verkürzungen des DNA-Stranges über die Zellgenerationen hinweg die Gefahr des Verlustes von essentieller genetischer Information. Auch für dieses Problem bietet die spezielle Struktur der Telomere eine für den Organismus komfortable Lösung. Da in der telomerischen DNA keine genetische Information kodiert ist, stellt auch eine Verkürzung der Telomere zunächst einmal keinen für das Zellüberleben relevanten Verlust dar. Erst nach vollständigem „Verbrauch“ der Telomerregion würden die kodierenden DNA-Abschnitte angegriffen werden. Zu diesem Zeitpunkt tritt dann ein anderer Schutzmechanismus, der im Folgenden beschrieben wird, in Kraft:

Bereits in den frühen 60er Jahren konnte L. Hayflick zeigen, dass das Wachstum somatischer Zellen in Kultur strikt begrenzt ist (*Übersicht in* Hayflick, 1979; *siehe auch Übersicht in* Shay und Wright, 2000). Bei seinen Untersuchungen an humanen embryonalen Fibroblastenzelllinien erreichten die kultivierten Zellen nach 50 ± 10 Populationsverdoppelungen einen „Seneszenz“ genannten Ruhezustand, in dem zwar die meisten Zellfunktionen erhalten blieben, aber keine weiteren Zellteilungen auftraten. Bei der Kultivierung von Zellen von älteren Spendern trat der Zustand der Seneszenz sogar nach deutlich weniger Populationsverdoppelungen ein. Die daraus resultierende These des „Hayflick Limit“ besagt nun, dass somatische Zellen generell ein festgelegtes replikatives Potential besitzen und über eine bestimmte Anzahl an mitotischen Teilungen hinaus nicht weiter proliferieren können und stattdessen in einen postmitotischen Ruhezustand übergehen. Die Arbeitsgruppe um C. B. Harley konnte zeigen, dass bei humanen Fibroblasten in Kultur mit zunehmender Anzahl der Populationsverdoppelungen die mittlere Telomerlänge abnimmt. Der Übergang von langzeitkultivierten Fibroblasten in die Seneszenz, also das Erreichen des „Hayflick Limits“, ging mit der Reduktion der mittleren Telomerlänge auf ein kritisches Maß vom 5-7 kb einher. Ausgehend von der mittleren Telomerlänge einer Zellkultur, so ihre Hypothese, lassen sich daher Rückschlüsse auf die replikative Historie ziehen (Harley *et al.*, 1990; Levy *et al.*, 1992). Die Telomerregion stellt somit eine Art „mitotischer Uhr“ dar, die, wenn sie abge-

laufen ist, respektive die Telomere „verbraucht“ sind, das weitere Wachstum stoppt und so einen Verlust genetischer Information verhindert.

So schlüssig „Hayflick Limit“ und „mitotische Uhr“ das Verhalten und die Wachstumsregulation von somatischen Zellen in Kultur (und im Organismus) erklären können, so widersprüchlich erscheint dazu die Fähigkeit von Keimbahn- und Tumorzellen zum unbegrenzten Wachstum. Diese Zellen müssen offensichtlich über eine Möglichkeit verfügen, die Grenzen des „Hayflick Limits“ zu überschreiten, und dies, zumindest im Falle der Keimbahnzellen, auch ohne in einen Zustand der genetischen Instabilität durch den Verlust kodierender DNA-Abschnitte zu geraten.

2.2. Telomerase – die Synthese telomerischer DNA

Die Wichtigkeit der Telomerregion als spezialisierte Endstruktur der linearen Chromosomen zum Schutz vor Verlust an kodierender DNA verbunden mit der Erkenntnis über die beständige replikationsbedingte Verkürzung derselben führt fast zwangsläufig zur Frage, wie die Zellen für einen suffizienten Telomerunterhalt sorgen können. In vielen Organismen gelingt dies durch die Neosynthese telomerischer DNA mithilfe einer zellulären reversen Transkriptase, der sogenannten Telomerase.

2.2.1. *Historie der Telomeraseforschung*

Im Labor von E. H. Blackburn, die ihrerseits im Wimperntierchen *Tetrahymena* erstmals die telomerische DNA-Sequenz entschlüsselt hatte, konnte C. Greider 1985 die Aktivität eines zellulären Enzymes nachweisen, welches das Anfügen von *telomeric repeats* an synthetische Telomerprimer katalysierte (Greider und Blackburn, 1985). Das Enzym wurde zunächst Telomerterminaltransferase genannt und der Name dann später zu „Telomerase“ verkürzt (Blackburn *et al.*, 2006). Es folgte die Entdeckung, dass es sich bei dem Enzym um einen Komplex aus Proteinen und einer RNA-Untereinheit handelt, wobei ein Anteil der letzteren als Matrize für die Synthese der *telomeric repeats* dient (Greider und Blackburn, 1989). 1989 wurde durch G. B. Morin Telomeraseaktivität erstmals in einer humanen Tumorzelllinie nachgewiesen (Morin, 1989).

2.2.2. *Aufbau der Telomerase*

Die Telomerase ist ein Enzymkomplex aus Ribonukleinsäure und Proteinen. Das Enzym gehört grundsätzlich zur Klasse der reversen Transkriptasen, die das Umschreiben von RNA in DNA katalysieren und daher auch RNA-abhängige DNA-Polymerasen genannt werden. Die Besonderheit der Telomerase innerhalb dieser Gruppe ist zum einen die Verwendung eines Abschnittes der integrierten RNA-Untereinheit als Matrize für die DNA-Synthese und zum anderen

die Fähigkeit mehrere Transkriptionszyklen nacheinander am selben DNA-Substrat ablaufen zu lassen (*Übersicht in* Autexier und Lue, 2006). Der über 1.000 kDA große Enzymkomplex besteht aus der katalytischen reversen Transkriptaseuntereinheit (TERT, *telomerase reverse transcriptase*), der Ribonukleinsäureuntereinheit (TERC, *telomerase RNA component*), nicht katalytisch aktiven Strukturuntereinheiten der reversen Transkriptase (EST1 A und B, *ever shorter telomeres I*) sowie verschiedenen assoziierten Proteinen, z.B. p23, Hsp90 und Dyskerin (*Übersicht in* Smogorzewska und de Lange, 2004; Feng *et al.*, 1995; Harrington *et al.*, 1997; Holt *et al.*, 1999; Lundblad, 2003). *In vivo* bilden von den genannten Komponenten der Telomerase mindestens die TERT und die TERC funktionell kooperierende Dimere oder Multimere aus (Beattie *et al.*, 2001; Wenz *et al.*, 2001).

2.2.3. *Telomerunterhalt durch Telomeraseaktivität*

Die Neosynthese von telomerischer DNA durch Telomerase umfasst eine feste Abfolge von Einzelschritten (*Übersicht in* Autexier und Lue, 2006) und findet sehr wahrscheinlich in der S-Phase des Zellzyklus statt (Tomlinson *et al.*, 2006): Der 3'-Überhang des guaninreichen Strangs der Telomer-DNA wird an die elf Nukleotide große Matrizenregion der TERC (5'-CUAACCCUAAC) sowie an verschiedene Domänen der reversen Transkriptaseuntereinheiten gebunden/assoziiert. Danach werden sukzessive am 3'-Ende der Telomer-DNA entsprechend der Vorgabe der RNA-Matrize Nucleotide in der Abfolge 5'-TTAGGG-3' angefügt, bis das 5'-Ende der Matrize erreicht ist. Nun löst sich die DNA mit dem neu replizierten *telomeric repeat* und das 3'-Ende wird erneut am Beginn der Matrizenregion positioniert, sodass eine neue Replikationsrunde beginnen kann. Während oder kurz nach der Verlängerung des guaninreichen Stranges durch die Telomerase wird der cytosinreiche Strang durch die konventionellen DNA-Polymerasen repliziert, sodass letztendlich doppelsträngige Telomer-DNA entsteht.

Die Neosynthese von telomerischer DNA durch Telomerase wird von verschiedenen Regulationsmechanismen gesteuert (*Übersichten in* Mergny *et al.*, 2002; Smogorzewska und de Lange, 2004; Cong *et al.*, 2002). Neben der klassischen Regulationsmöglichkeit der Enzymaktivität über den Weg der Genexpression, auf den hier nicht eingegangen werden soll, ist es vor allem die Telomerregion selbst, die die Telomeraseaktivität beeinflusst. So kann sich zum Beispiel der 3'-Überhang des guaninreichen Stranges der Telomer-DNA unter bestimmten Bedingungen in eine 4-strängige DNA-Struktur (*G-quadruplex*) falten, wodurch die Bindung an die Matrizenregion der Telomerase verhindert wird. Des Weiteren üben die an einzel- und doppelsträngige telomerische DNA gebundenen Proteine TRF1+2 sowie POT1 direkt und indirekt einen starken Feed-

back-Mechanismus auf die Telomeraseaktivität aus (Smogorzewska *et al.*, 2000; Loayza und de Lange, 2003; Kelleher *et al.*, 2004).

In einigen immortalisierten Säugerzelllinien und in unter 10% der Tumorzelllinien lässt sich suffizienter Telomerunterhalt auch ohne Telomeraseaktivität nachweisen (Bryan *et al.*, 1995). Der zugrundeliegende, noch immer nicht vollständig aufgeklärte Mechanismus wird als *alternative lengthening of telomeres (ALT)* bezeichnet. Charakteristisch für diejenigen humanen Zelllinien, die ALT zum Telomerunterhalt nutzen, ist eine große Heterogenität in der Größe der Telomere, die sowohl abnormal lang, als auch bis an die Nachweisbarkeitsgrenze kurz sein können (Henson *et al.*, 2002). Einen wichtigen Anteil am ALT-Mechanismus scheinen intertelomerische Rekombinationsprozesse zu haben (*Übersicht in* Muntoni und Reddel, 2005).

2.2.4. *Natürliche Aktivität der Telomerase*

In den meisten einzelligen Eukaryonten hat die Telomerase eine haushaltende Funktion für die Telomerregion. Die Kernkomponenten des Enzymkomplexes werden beständig exprimiert und es herrscht ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen replikationsbedingtem Telomerverlust und Telomerneosynthese. Im Gegensatz dazu ist die Telomeraseaktivität in humanen somatischen Zellen stark unterdrückt. Nachweisbare Telomeraseaktivität fand sich lange Zeit bei höheren Organismen nur in den Keimbahnzellen sowie in hochproliferativen Geweben, wie zum Beispiel Blutstammzellen. Die Regulation erfolgt dabei fast ausschließlich auf der Ebene der Transkription des TERT-Genes, denn die RNA-Komponente der Telomerase, die TERC, war fast ubiquitär über alle Gewebe nachweisbar (Feng *et al.*, 1995). Erst in den letzten Jahren setzte sich die Erkenntnis durch, dass auch in somatischen Zellen ein Basislevel an Telomeraseaktivität vorhanden ist (Masutomi *et al.*, 2003), das aber offensichtlich nicht ausreicht, die stetige Verkürzung der Telomerregion aufzuhalten.

Experimentell jedoch ist in humanen Fibroblasten eine zusätzlich exogen induzierte, also artifizielle Expression von TERT ausreichend, um eine suffiziente Telomeraseaktivität zu rekonstituieren und den replikationsbedingten Verlust an telomerischer DNA auszugleichen (Bodnar *et al.*, 1998; Swiggers *et al.*, 2004). Die Wiederherstellung eines ausreichenden Telomerunterhalts über diesen Weg ist geeignet, die meisten humanen Zelltypen zu immortalisieren (Ramirez *et al.*, 2001; siehe Abb. 3).

2.2.5. Die zentrale Bedeutung der Telomerase in der Tumorentstehung

In der Theorie muss eine primär gesunde Zelle auf dem Weg der Entwicklung zur Tumorzelle zwei Mortalitätsstadien durchlaufen. Aufgrund der beständigen Zellteilungen während dieser Entwicklung zur Tumorzelle kommt es zwangsläufig zur stetigen Verkürzung der Telomerlänge (siehe Abb. 3).

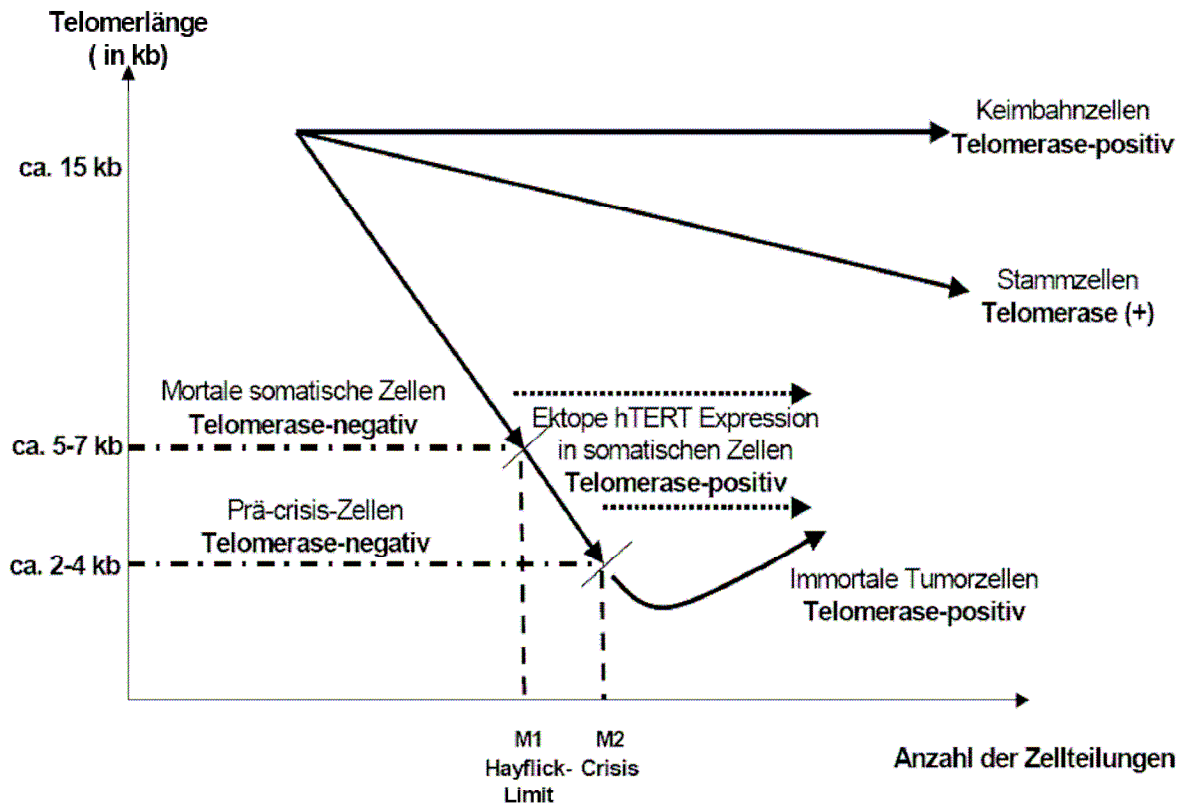


Abb. 3: Die Hypothese der zweistufigen zellulären Seneszenz und Immortalisierung. (aus Hartmann und Brümmendorf, 2003)

Zunächst wird mit Erschöpfung des replikativen Potentials das Mortalitätsstadium M1 erreicht. Dieses entspricht der als „Hayflick Limit“ bekannten, durch die kurzen Telomere ausgelösten Grenze, an der die Zellen natürlicherweise in das postreplikative Ruhestadium der Seneszenz übergehen (siehe 2.1.3.). Durch Inaktivierung kritischer Zellzykluskontrollpunkte (*cell cycle checkpoints*), wie zum Beispiel das die Proliferation steuernde Protein p53, können die Zellen das Mortalitätsstadium M1 überwinden und fortsetzen, sich zu teilen. Dabei kommt es zu weiterem Telomerverlust, bis die Telomere eine kritische Länge unterschreiten und ihrer schützenden Funktion an den Chromosomenenden nicht mehr gerecht werden können (siehe 2.1.2.). An die-

sem, Mortalitätsstadium M2 oder auch *crisis* genannten Punkt, tritt eine weiterer Proliferationsstop ein. Die Zellen sind genetisch instabil und sterben in aller Regel ab (Counter *et al.*, 1992). Die wenigen überlebenden Zellen, die dem Mortalitätsstadium M2 entkommen, haben die Fähigkeit erworben, für einen ausreichenden Telomerunterhalt zu sorgen, was in über 90% der Fälle durch die Aktivierung der Telomerase geschieht. Die so entstanden Zellen stabilisieren die Telomerlänge ihrer Chromosomen auf einem zumeist niedrigen Niveau und besitzen dadurch praktisch eine unbegrenzte Proliferationsfähigkeit, die Grundvoraussetzung für tumoröses Wachstum. Die Idee, durch Hemmung der Telomeraseaktivität, Einfluss auf die Tumorentwicklung bzw. das Tumorwachstum zu nehmen, drängt sich praktisch auf, auch wenn die Telomeraseaktivität per se keine tumorspezifische Eigenschaft darstellt und das TERT-kodierende Gen keineswegs als Oncogen zu betrachten ist (*Übersicht in Harley, 2002*).

2.3. Telomerassoziierte Proteine und *DNA damage response*

Die Exposition von Zellen gegenüber genotoxischem Stress wie zum Beispiel ionisierender Strahlung aktiviert ein komplexes Netzwerk an Mechanismen, die man unter dem Begriff *DNA damage response* zusammenfasst. Diese Mechanismen umfassen sowohl Zellaktivitäten, die für die Erkennung, Weiterverarbeitung und Reparatur der Schäden verantwortlich sind, als auch solche, die gegebenenfalls Kontrollpunkte des Zellzyklus und/oder Apoptose aktivieren. Fehlregulationen in irgendeiner der Komponenten des *DNA damage response* durch Veränderungen in den beteiligten Proteinen beeinträchtigen einerseits in aller Regel die chromosomale Stabilität der Zellen, was sich zum Beispiel in einem strahlensensiblen Phänotyp äußert, und führen andererseits häufig zu dysfunktionalen Telomeren und/oder einem gestörten Telomerunterhalt. Passend zu dieser Verbindung zwischen Telomerunterhalt und *DNA damage response* lassen sich eine Reihe von DNA-Reparaturproteinen in den DNA-Protein-Komplexen der Telomerregion nachweisen. Die Telomerregion selbst trägt ihrerseits durch die Interaktion der einzelnen Proteine des „Shelterin“-Komplexes (siehe 2.1.2.) mit der telomerischen DNA entscheidend zur chromosomalen Stabilität der Zellen bei. In Tabelle 1 sind die Proteine des „Shelterin“-Komplexes sowie DNA-Reparaturproteine mit enger Assoziation zur Telomerregion aufgelistet (*Übersicht in Blasco, 2005b*).

Tab. 1: Telomerbindende Proteine des „Shelterin“-Komplexes und des DNA damage response

Proteine des Shelterin-Komplexes	
TRF1	<i>telomeric repeat binding factor 1</i>
TRF2	<i>telomeric repeat binding factor 2</i>
TIN2	<i>TRF1 interacting nuclear protein 2</i>
POT1	<i>protection of telomeres 1</i>
TANK1	<i>tankyrase1</i>
TANK2	<i>tankyrase 2</i>
hRap1	<i>human repressor/activator protein 1</i>
Telomerassoziierte Proteine des DNA damage response	
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
Ku 70/86	Ku-Antigen Proteine 70 und 86
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
Mre11	<i>meiotic recombination 11</i>
Rad50	<i>DNA repair protein 50</i>
Nbs1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>
PARP2	<i>poly(ADP-ribose)polymerase family 2</i>
XRCC3	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3</i>
WRN/BLM	<i>Werner syndrome, Bloom syndrome</i>
ERCC1/XPF	<i>excision repair cross-complementing 1</i>

Es finden sich zunehmend Hinweise für eine extensive funktionale Abhängigkeit und gegenseitige Beeinflussung der Proteine des *DNA damage response* mit denen am Telomer(unterhalt)-assoziierten Proteinen (Übersicht in d'Adda di Fagagna *et al.*, 2004; Hande, 2004; Slijepcevic, 2006). Nachfolgend wird dies anhand von vier wichtigen Proteinen bzw. Proteinkomplexen beispielhaft erläutert:

2.3.1. ATM

Strahleninduzierte Doppelstrangbrüche (DSBs) in der DNA gelten als grundsätzlich potentiell „tödliche“ Läsionen und führen zur maximalen Aktivierung des *DNA damage response* Systems. Ganz zu Beginn steht dabei die Aktivierung der Proteinkinase ATM, die ihrerseits über eine Phosphorylierung wichtiger Schlüsselproteine den gesamten Ablauf der Schadenserkenkung, -prozessierung und möglichst raschen Reparatur initiiert (*Übersicht in Shiloh, 2003*). Im Rahmen der Erforschung dieses Schlüsselenzyms des *DNA damage response* fanden sich erstmals Hinweise auf eine starke Verbindung zwischen dem Telomerunterhalt und der DNA-Schadenkontrolle. Die Untersuchungen an Lymphozyten im peripheren Blut von Patienten, die aufgrund des homozygoten Trägerstatus für das mutierte ATM-Gen an Ataxia teleangiectatica erkrankt waren, zeigten mit zunehmenden Patientenalter eine stark fortgeschrittene Telomerverkürzung sowie Telomerfusionen (Metcalf *et al.*, 1996). Im dominant negativen Mausmodell ließ sich ein strahlensensibler Phänotyp verbunden mit einem gestörten Telomerunterhalt nachweisen (verbunden mit anderen Defekten) (Lavin und Khanna, 1999; Hande *et al.*, 2001).

2.3.2. TRF2

TRF2 ist als eine Komponente des “Shelterin”-Komplexes fest mit der telomerischen DNA assoziiert und wohl das entscheidende Protein für die Ausbildung der *t-loop* Formation (siehe 2.1.2.) und damit verantwortlich für das „Verstecken“ des freien DNA-Endes der Telomerregion (Yoshimura *et al.*, 2004). Die Überexpression von TRF2 in primären Fibroblasten führt zu einer Hemmung der Autophosphorylierung von ATM nach Bestrahlung und damit zur Aufhebung des ATM-vermittelten Zellzyklusarrests (Karlseder *et al.*, 2004). Es ist zu vermuten, dass die Verhinderung der ATM-Aktivierung an Telomeren zu den natürlichen Aufgaben des TRF2 gehört, womit sich schlüssig erklären ließe, warum die Telomerenden offensichtlich vom *DNA damage response* System nicht als die DSBs wahrgenommen werden.

In Bestrahlungsexperimenten an humanen Fibroblasten sowie HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass innerhalb von 2 sec nach Induktion eines DSB phosphoryliertes TRF2 an der geschädigten DNA nachweisbar ist (Bradshaw *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2005). In unmittelbarer zeitlicher Nähe findet die Autophosphorylierung von ATM am DSB statt, die den Beginn der Signalkaskade des *DNA damage response* markiert. In welcher Art sich TRF2 und ATM an diesem Punkt beeinflussen, ist noch nicht geklärt, aber erneut ist ein enger Zusammenhang zwischen den zellulären Systemen des Telomerunterhalts und des *DNA damage response* hergestellt.

2.3.3. *Ku und DNA-PKcs*

Ku ist ein heterodimeres Protein aus je einer 70 kDa und 86 kDa Untereinheit (Ku70 und Ku86). Ku bindet sequenzunabhängig an alle Enden doppelsträngiger DNA, einschließlich 3'- und 5'-Überhänge und Telomerenden. Das heterodimere Ku-Protein bildet zusammen mit der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) einen Komplex, die sogenannte DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), die eine wesentliche Rolle im *Nonhomologous end joining* (NHEJ) spielt. Über den Weg des NHEJ werden in Säugetierzellen praktisch sämtliche strahleninduzierte DSBs repariert, so dass Mutationen in Ku oder DNA-PKcs in deutlichen Defekten für die DNA-DSB Reparatur mit einem entsprechenden strahlensensiblen Phänotyp resultieren.

Die beiden Untereinheiten des Ku Proteins, Ku70 und Ku86, lassen sich beide in Assoziation mit TRF2 in der Telomerregion nachweisen. Experimentell konnte nun in einer kolorektalen Karzinomzelllinie in der Folge einer Inaktivierung nur eines der beiden für Ku86 kodierenden Allele eine dramatische Reduktion der Telomerlänge demonstriert werden (Myung *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte durch Untersuchungen an embryonalen Mausfibroblasten gezeigt werden, dass die Assoziation von TRF2 mit Ku70 wahrscheinlich die Telomerenden vor unerwünschten Rekombinationsprozessen schützt (Celli *et al.*, 2006).

Im Doppel-Knock-out Mausmodell für DNA-PKcs und TERC ließ sich im Vergleich zum einfachen Knock-out der TERC eine deutlich beschleunigte Degradation der Telomere verbunden mit einer Ausschaltung des normalerweise durch kurze Telomere getriggerten Zellzyklusarrestes/Apoptoseweges nachweisen (Espejel *et al.*, 2002).

2.3.4. *MRN-Komplex*

Der Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex (MRN-Komplex) ist im sehr frühen Stadium der DNA-Reparatur an - beispielsweise strahleninduzierten - DSBs nachweisbar und initiiert eine Reihe von nachgeschalteten Reparaturprozessen. *In vitro* zeigt Mre11 3'-5'-Exo- und Endonukleaseaktivitäten und fördert die Formation von 3'-Überhängen an DSBs. Parallel zu diesen Funktionen lässt sich der MRN-Komplex eng assoziiert mit TRF2 in der Telomerregion nachweisen. Untersuchungen an telomerase-positiven HeLa-Zellen konnten im Zusammenhang mit der Reduktion der Mre11-Expression eine transiente Reduktion der Länge des 3'-Überhangs am G-Strang nachweisen (Chai *et al.*, 2006b). Da derselbe Effekt in humanen Fibroblasten, die temporär eine exogene TERT exprimierten, nachweisbar war, kann auf eine Involvierung des MRN-Komplexes in die telomeraseabhängige Generation des 3'-Überhangs am G-Strang geschlossen werden.

2.4. Der strahlensensible Phänotyp im mTERC^{-/-}-Mausmodell

In der Maus, analog zu den meisten humanen Geweben, ist die Tumorentwicklung mit einer erhöhten Telomeraseaktivität assoziiert (Broccoli *et al.*, 1996; Blasco *et al.*, 1996). Eine Veränderung der Telomerlänge während der Tumorentstehung konnte jedoch in den bei den Untersuchungen eingesetzten transgenen Mausmodellen nicht nachgewiesen werden. Um die Abhängigkeit von Telomerlänge und Zellüberleben von der Telomeraseaktivität näher untersuchen zu können, wurde ein Telomerase-Knock-out Mausmodell entwickelt, indem das für die RNA-Komponente des Telomeraseenzymkomplex (mTERC) verantwortliche Gen ausgeschaltet wurde (Blasco *et al.*, 1997). Die absolut telomerasedefizienten Mäuse waren bis einschließlich der 6. Generation (Nomenklatur: G6-Mäuse) lebens- und bis zur 5. Generation zeugungsfähig. Infolge der Telomerasedefizienz verkürzten sich die Telomere aller Chromosomen und Geweben pro Generation um 4-5 kb. Der mit dieser Telomerdysfunktion assoziierte Phänotypus beinhaltete in den späten Mausgenerationen folgende Defekte (*Übersicht in* Blasco, 2005a): männliche und weibliche Infertilität mit embryonaler Mortalität, Wachstumsstörungen, intestinale Atrophie, reduziertes proliferatives Potential der Knochenmarkstammzellen, Herzfehler u.v.m. Auf intranukleärer Ebene zeigten sich neben dem Verlust an telomerischer DNA insbesondere Aneuploidie und chromosomale Fusionen (Rudolph *et al.*, 1999).

2.4.1. Strahlensensibilität im mTERC^{-/-}-Mausmodell

Zu den Auswirkungen der Telomerasedefizienz und konsekutiven Telomerverkürzung auf die Strahlensensibilität im mTERC^{-/-}-Mausmodell liegen mit den Studien von Goytisolo *et al.* (2000) und Wong *et al.* (2000) zwei umfangreiche Untersuchungen vor. Im Einzelnen wiesen die Arbeitsgruppen nach:

- Eine Gammabestrahlung von Wildtyp-, G2- und G5-Mäusen über 6 Wochen hinweg mit einer kumulativen Dosis von 10,5 Gy überlebten in der Gruppe der G5-Mäuse nur 40% (in den anderen Gruppen und unbestrahlten Kontrollen jeweils 100%). Auch die einmalige Bestrahlung mit einer letalen Dosis von 7 Gy führte bei G6-Mäusen zu einem deutlich früheren Absterben im Vergleich zu Wildtyp- und G2-Mäusen.
- Splenozyten von bestrahlten G5-Mäusen zeigten eine signifikant höhere Apoptoserate im Vergleich zu denen von bestrahlten Wildtyp- und G2-Mäusen, ohne dass es zu Unterschieden in der Zellzyklusverteilung gekommen wäre. Ein ähnliches Er-

gebnis zeigte sich nach der Bestrahlung vom embryonalen Fibroblasten im Vergleich zwischen G6- und G2- bzw. Wildtypmäusen.

- In Knochenmarkspräparationen von gammabestrahlten G5-Mäusen ließen sich vergleichsweise mehr chromosomale Aberrationen nachweisen. In Metaphasepräparationen von mit 5 Gy bestrahlten embryonalen Fibroblasten von G6-Mäusen zeigten sich mehr chromosomale Defekte als in den Präparationen von G2- und Wildtypmäusen.
- Es ließ sich keine Beeinträchtigung der Wege der DNA-DSB-Reparatur per se feststellen (Messung der V(D)J Rekombination für das NHEJ und des Schwesterchromosomenaustausches für die HR).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für die späten Generationen im $mTERC^{-/-}$ -Mausmodell, also für die Situation einer fortgeschrittenen Telomerverkürzung im Umfeld einer völligen Telomerase-defizienz, eine starke Zunahme der Strahlensensibilität nachweisbar war.

2.5. Telomere und Telomerase als Angriffspunkte einer Tumorthherapie

Eine Grundvoraussetzung für malignes Wachstum ist ein uneingeschränktes replikatives Potential der Zellen. Die Zellreplikation sollte assoziiert sein mit einem suffizienten Telomerunterhalt, was in der Mehrzahl der Tumoren über eine Reaktivierung der Telomerase gewährleistet wird. Telomere und Telomerase sind daher im Grunde ideale Ziele einer Antitumorthherapie: Die Telomerase wird spezifisch in Tumoren in hohem Maße exprimiert, während im gesunden Gewebe Telomeraseaktivität kaum nachweisbar ist. Ausnahmen bilden insbesondere die Keimbahnzellen und die hämatopoetischen Stammzellen. Diese Zellen jedoch verfügen in aller Regel über eine deutlich größere mittlere Telomerlänge als die Zellen des Tumorgewebes (siehe 2.2.5.), so dass man berechtigt hoffen darf, dass sie einer gegen die Telomere und Telomerase gerichteten Therapie länger widerstehen bzw. sich nach Therapieende rascher erholen sollten.

2.5.1. Angriffsmöglichkeiten an der Telomerase und den Telomeren

Als wirkungsvoll auf molekulargenetischer Ebene konnte an Tumorzelllinien der Angriff mittels Transfektion dominant-negativer Mutanten für die TERT und die TERC demonstriert werden (*Übersicht in Kelland, 2005; Hahn et al., 1999; Kim et al., 2001*). Der Beginn einer messbaren Inhibition des Tumorwachstums korrelierte mit der initialen Telomerlänge der jeweiligen Zelllinie. Die Schwierigkeit liegt hier in der Umsetzung der *in vitro* Experimente in ein *in vivo* System.

Erfolgversprechender bezüglich des möglichen klinischen Einsatzes erscheint die direkte

pharmakologische Beeinflussung der Telomeraseaktivität. Eine wichtige Strategie ist hier die Verwendung von *antisense*-basierenden Molekülen. Dabei werden Oligonukleotide, die an Peptide oder RNA gekoppelt und strukturell antagonistisch zur Matrizenregion der TERC aufgebaut sind, in die Zellen eingeschleust. Es resultiert eine direkte Inhibition der Telomeraseaktivität (Herbert *et al.*, 1999; Asai *et al.*, 2003), aber auch hier ist eine antiproliferative Wirkung um so später nachweisbar, je größer die initiale Telomerlänge war. GRN 163, ein 13-mer Oligonucleotid, sei als Vertreter dieser Stoffklasse genannt, für die neben umfangreichen *in vitro* Experimenten auch schon *in vivo* Studien vorliegen: So zeigte sich für GRN 163 dosisabhängig in Zelllinien und Tumorxenografts eines humanen Multiplen Myeloms, eines Non-Hodgkin Lymphoms, eines humanen Lungenkarzinoms sowie von Mammakarzinomen eine Reduktion der Telomeraseaktivität, der Telomerlänge mit Fortschreiten der Proliferation und schließlich eine Wachstumshemmung bis zum letztlichen Wachstumsstopp, Apoptose und Zelltod (Wang *et al.*, 2004; Dikmen *et al.*, 2005; Gellert *et al.*, 2006). Aktuell laufen mindestens zwei Phase I Studien zur klinischen Anwendung von GRN 163L; die Ergebnisse stehen noch aus (*Übersicht in* Shay und Keith, 2008).

Ein indirekter Angriff auf die Telomeraseaktivität ist durch eine sterische Beeinflussung der Telomerregion möglich. Dabei stabilisieren sogenannte *telomere targeting agents* (TTAs) eine natürlicherweise auftretende Faltung des 3'-Überhangs der Telomer-DNA in eine 4-strängige DNA-Struktur (*G-quadruplex*), wodurch die korrekte Positionierung des 3'-Überhangs an die Matrizenregion der Telomerase unterbunden wird. Bei Studien mit der Substanzen BRACO 19 und RHPS 4, zwei vielversprechenden Vertretern der Gruppe der TTAs, zeigte sich eine Wachstumshemmung und Ausbildung von Seneszenz in humanen Prostatakarzinomzellen (Incles *et al.*, 2004) bzw. in humanen Brustkrebszellen (Cookson *et al.*, 2005).

2.5.2. *Selektive Hemmung der Telomerase durch BIBR 1532*

Eine besondere Bedeutung in der Erforschung neuer Tumorthapeutika auf Grundlage der Beeinflussung der Telomeraseaktivität kommt den sogenannten *small molecule* Substanzen zu. Sie hemmen die Telomeraseaktivität und führen zuverlässig zu einer replikationsabhängigen progressiven Telomerverkürzung. Initial ist ein Einfluss auf das Zellwachstum nicht nachzuweisen, unter Langzeitbehandlung jedoch tritt mit zunehmendem Telomerverlust ein Wachstumsarrest der Tumorzellen ein. Sie sind dem Zellkulturmedium einfach zuzusetzen bzw. eignen sich bei *in vivo* Experimenten und klinischen Studien für eine orale Administration. Eine der bestuntersuchten Substanzen aus der Gruppe der *small molecule* Inhibitoren ist BIBR 1532 der Boehringer

Ingelheim Pharma KG. Es handelt sich um eine nicht-peptidische, nicht-nukleosidische aromatische Verbindung (2-[E]-3-naphtalen-2-yl-but-2-enoylamino]-benzoesäure, (siehe Abb. 4), die hochselektiv die Aktivität der humanen Telomerase hemmt (Damm *et al.*, 2001).

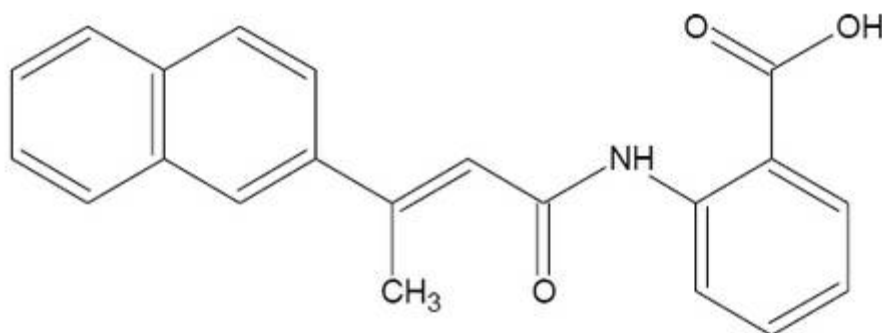


Abb. 4: Chemische Struktur von BIBR 1532.

In vitro Studien wiesen eine Hemmung der Enzymaktivität vom gemischt, nicht-kompetitiven Typ nach. D.h., BIBR 1532 bindet nicht an der Matrizenregion des Telomeraseenzymkomplexes und behindert dadurch wahrscheinlich auch nicht die korrekte Bindung der telomeren DNA an dieser Position. Lediglich die eigentliche katalysierte Reaktion, das wiederholte Anfügen der *telomeric repeats*, wird gehemmt (Pascolo *et al.*, 2002). Bei der Kultivierung von telomerase-positiven Lungen-, Mamma- und Prostatakarzinomzellen in Gegenwart von 10 μM BIBR 1532 ließ sich ein replikationsabhängiger Telomerlängenverlust, gefolgt von einer Wachstumshemmung und letztendlich ein Wachstumsstopp nachweisen (Damm *et al.*, 2001). Bei der Kultivierung mit einer telomerase-negativen Osteosarkomzelllinie, in der der Telomerunterhalt durch ALT gewährleistet wird, ließ sich ein solcher Effekt nicht nachweisen (Damm *et al.*, 2001). Ab Konzentrationen von 30 μM BIBR 1532 im Zellkulturmedium ließ sich für maligne Zellen des hämatopoetischen Systems überwiegend ein direkter zytotoxischer Effekt nachweisen, ohne dass die proliferative Kapazität von hämatopoetischen, nicht-malignen Vorläuferzellen unter diesen Bedingungen beeinträchtigt worden wäre (El-Daly *et al.*, 2005). Im Tiermodell konnte unter speziellen Bedingungen das Tumorstadium nach oraler Administration von BIBR 1532 reduziert werden (Damm *et al.*, 2001). Widersprüchlich sind die Studienergebnisse zu einer Kombinationstherapie aus BIBR 1532 und klassischen Chemotherapeutika. Während in einer promyelozytären Leukämiezelllinie (HL 60) unter der Behandlung mit 2,5 μM BIBR 1532 die

bekannte Abnahme der mittleren Telomerlänge verbunden mit einer Reduktion der Zellproliferationsrate zu einer Zunahme des toxischen Effektes von Etoposid führte (Ward und Autexier, 2005), erbrachte die Kombination aus BIBR 1532 in 10 μM Konzentration und Cisplatin in einem testikulären Keimzelltumor trotz nachweisbarer Telomerlängenverkürzung weder eine Proliferationsbeeinträchtigung noch einen synergistischen zytotoxischen Effekt (Müller *et al.*, 2007).

2.6. Telomere und Telomerase in der Entwicklung von Leukämien

Zu Beginn der Entwicklung einer Leukämie (aus dem Griechischen für „weißes Blut“) steht die maligne Transformation einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle in eine immortalisierte leukämische Stammzelle. Diese in der Leukämieforschung akzeptierte Theorie der Stammzelltransformation gilt wahrscheinlich im Prinzip auch für die soliden Tumoren. Ein entscheidender Faktor für die Immortalisierung der Stammzelle ist dabei die Fähigkeit zum suffizienten Telomerunterhalt (siehe 2.2.5.), was in der Mehrzahl der Tumoren durch (Re-)Aktivierung bzw. Aktivitätssteigerung der Telomerase erfolgt. Ein Forschungsschwerpunkt liegt daher seit Jahren auf der Telomerbiologie im Allgemeinen und der Regulation des Telomerunterhalts in Tumoren im Besonderen. Ein unschätzbare Vorteil der Leukämieforschung ist hier sicherlich die Möglichkeit zu detaillierten *in vitro* Untersuchungen der maligne transformierten Stammzellen, da man diese aufgrund spezifischer Oberflächenantigene (hauptsächlich das CD34) aus einer Blut- oder Knochenmarkspalte isolieren kann. Aufgrund dessen zählen die (malignen) Erkrankungen des hämatopoetischen Systems bezüglich der Biologie der Telomere und der Telomerase zu den am besten erforschten menschlichen Tumorerkrankungen (*umfassende Übersichten in* Ohyashiki *et al.*, 2002; Drummond *et al.*, 2007). So konnte beispielsweise durch vergleichende Untersuchungen an humanen CD34⁺-Zellen aus fetalem Lebervenenblut, Umbilikalvenenblut sowie aus Knochenmarkspunkten erwachsener Spender (19 und 58 Jahre alt) gezeigt werden, dass auch in den telomerase-positiven Stammzellen eine kontinuierliche, proliferationsbedingte Telomerverkürzung auftritt (Vaziri *et al.*, 1994).

2.6.1. Chronisch Myeloische Leukämie

Grundsätzlich unterscheidet man bei den Leukämien nach dem Typ der leukämischen Stammzelle eine myeloische und eine lymphatische Form sowie nach dem klinischen Bild eine chronische oder akute Verlaufsform. Die chronisch myeloische Leukämie (CML) wird zu den chronischen myeloproliferativen Erkrankungen gezählt und zeichnet sich durch die klonale Expansion einer maligne transformierten Vorläuferzelle aus. Im peripheren Blut und im Knochen-

mark sind Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstufen meist der myeloischen, seltener der lymphatischen Reihe nachweisbar. Bei mehr als 95% der Erkrankten lässt sich in den Leukämiezellen das sogenannte Philadelphia-Chromosom nachweisen. Dabei handelt es sich um ein verkürztes Chromosom 22, welches aus einer reziproken Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 entstanden ist. Durch diese Translokation fusionieren auf dem Chromosom 22 zwei Genloki zu einem Hybridgen, dessen Produkt, das Bcr-Abl-Protein (**break-point cluster region, Abelson-Maus-Leukämie**), in den Zellen als eine Tyrosinkinase mit verstärkter Aktivität wirkt (Konopka *et al.* 1984, Ben-Neriah *et al.* 1986).

Eine Reihe von Faktoren prädestiniert die CML für Untersuchungen zur Telomer- und Telomerasebiologie (Drummond *et al.*, 2007): (1.) Die maligne(n) hämatopoetische(n) Stammzelle(n) sind durch einen erhöhten zellulären Umsatz charakterisiert. (2.) Die Erkrankung verläuft unter Umständen über viele Jahre in einer relativ stabilen chronischen Phase. (3.) Der Übergang in eine akzelerierte Phase oder einen sogenannten Blastenschub ist mit einer zunehmenden genomischen Instabilität verbunden, die sich durch Akquirierung zusätzlicher Aberrationen und Mutationen auszeichnet, die für das veränderte, aggressivere Wachstum verantwortlich sind. Um einen Einfluss der Telomere auf die Krankheitsprogression (und umgekehrt) nachweisen zu können, wurde die Telomerlänge in Bcr-Abl-Protein positiven Lymphozyten (= monoklonale Leukämiezellen) des peripheren Blutes mit der in Bcr-Abl-Protein negativen Lymphozyten (= polyklonale gesunde Blutzellen) verglichen. Dabei fand sich in den malignen Zellen eine signifikante Telomerverkürzung (Brümmendorf *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen Telomerverkürzung und Krankheitsstadium hergestellt werden. Eigentlich hätte man, ausgehend von der Prämisse einer Hochregulation der Telomeraseaktivität in den monoklonalen Leukämiezellen eine stabile Telomerlänge erwartet, jedoch ließ sich in den Zellen eine Dysregulation der Hauptkomponenten des Telomeraseenzymkomplexes nachweisen, und damit erklärt sich das Phänomen (Drummond *et al.*, 2005; Campbell *et al.*, 2006).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Telomerverkürzung in der chronisch myeloischen Leukämiezelllinie K-562

Alle in dieser Dissertationsschrift beschriebenen Untersuchungen wurden an der Tumorzelllinie K-562 durchgeführt. Subpopulationen von dieser Tumorzelllinie mit verkürzten Telomeren sowie Kontrollzelllinien mit unbeeinflusster Telomerlänge wurden unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Tim Brümmendorf, Leiter der Arbeitsgruppe „Telomer- und Stammzellbiologie“ der II. Medizinischen Klinik des Zentrums für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, in der im Folgenden beschriebenen Weise hergestellt und dem Institut für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie für die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

3.1.1. Die Tumorzelllinie K-562

Die Tumorzelllinie K-562 wurde 1970 aus Zellen eines Pleuraergusses einer Patientin im Blastenschub einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) etabliert (Lozzio und Lozzio, 1975). Alle Zellen besitzen das sogenannte Philadelphia Chromosom (siehe 2.6.1.).

Die Zelllinie K-562 ist p53-negativ, d.h. der Tumorsuppressor p53 wird nicht exprimiert. Die zytogenetische Charakterisierung der Zelllinie zeigt einen hypotriploiden Karyotyp mit einer variablen Chromosomenzahl von 61 bis 68 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; Cell line: K-562, DSMZ no.: ACC 10).

3.1.2. Telomerverkürzung in der Tumorzelllinie K-562 unter Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532

Zellen der Tumorzelllinie K-562 wurden in Suspensionskultur gehalten. Dem Zellkulturmedium wurde der Telomeraseinhibitor BIBR 1532 in einer 10 μ M Konzentration zugesetzt. In der Folge verkürzten sich in einer Langzeitkultur der Zellen mit jeder Populationsverdopplung die Telomere. Regelmäßig wurde mittels Flow-FISH die aktuelle durchschnittliche Telomerlänge in den behandelten Zellen bestimmt. Zur Kontrolle BIBR-unabhängiger Effekte auf die Telomerlänge wurden parallel unbehandelte Zellen kultiviert und analysiert. Regelmäßig wurden zudem mit BIBR 1532 behandelte Zellen sowie unbehandelte Kontrollzellen bei -80°C tiefgefroren und anschließend in Flüssigstickstoff bei -196°C bis zur weiteren Analyse kryokonserviert (Hartmann, 2005).

3.1.3. Die Zelllinien A, B, C und D

Im Ergebnis der Telomerlängenmessung zeigte sich bei den mit BIBR 1532 behandelten Zellen eine stetige Abnahme der Telomerlänge im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (Hartmann, 2005). Für die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wurden Zellen verwendet, die über ca. 300 bzw. 400 Populationsverdoppelungen mit BIBR 1532 behandelt worden waren (Zelllinien A bzw. B, siehe Abb. 5), sowie unbehandelte Kontrollzellen mit einer Historie von ca. 30 bzw. 300 Populationsverdoppelungen (Zelllinie C bzw. D, siehe Abb. 5). Während in den unbehandelten Zellen eine weitgehend konstante durchschnittliche Telomerlänge von ca. 12 kb gemessen werden konnte, ergab sich für die behandelten Zellen nach 300 Populationsverdoppelungen eine Reduktion auf ca. 5 kb und nach 400 Populationsverdoppelungen auf ca. 3 kb.

Abbildung 5 zeigt schematisch den Verlauf der Entwicklung der durchschnittlichen Telomerlänge mit fortschreitender Anzahl an Populationsverdoppelungen. Die in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien A, B, C und D (alle sind Subpopulationen der ursprünglichen Tumorzelllinie K-562) sind bezüglich ihrer Populationshistorie und ihrer Zugehörigkeit zu den mit BIBR 1532 behandelten bzw. unbehandelten Zellen graphisch in die schematische Darstellung in Abb. 5 eingeordnet.

3.2. Zellkultur

Zellen der Tumorzelllinie K-562 wurden in RPMI-Medium mit 2 mM L-Glutamin-Anteil und Zusatz von 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Natriumpyruvat und 1% nichtessentielle Aminosäuren in Suspensionszellkulturflaschen bei 37°C in mit 5% CO₂ angereicherter und 95%ig feuchtigkeitsgesättigter Raumluft kultiviert. Im Falle der mit BIBR 1532 behandelten Zellen war dem Kulturmedium zusätzlich BIBR 1532 in 10 µM Konzentration zugesetzt.

In regelmäßigen zweitägigen Abständen wurden die Zellen passagiert. Dafür wurden die Zellsuspensionskulturen in je ein Falcon-Röhrchen überführt, für 5 min mit 1.200 rpm bei 21°C zentrifugiert, anschließend der Mediumüberstand abgesaugt, das verbliebene Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellkonzentration unter Verwendung einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. 0,2-0,3x10⁶ Zellen/ml Medium wurden dann erneut ausgesät. Sämtliche Arbeiten an den Zellkulturen wurden an Sterilarbeitsplätzen durchgeführt.

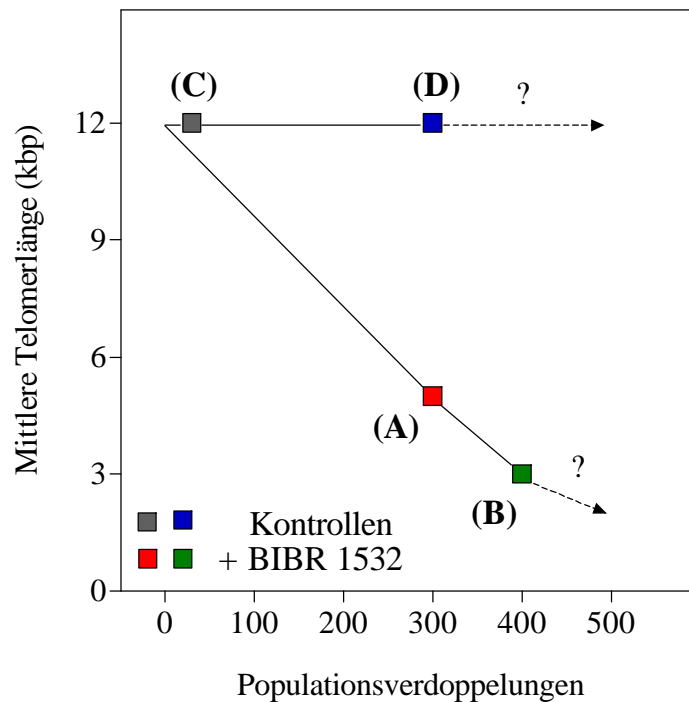


Abb. 5: Schematische Darstellung der Verkürzung der Telomere in der Tumorzelllinie K-562 unter Langzeitbehandlung mit BIBR 1532.

Für weitere Analysezwecke sind nach ca. 300 bzw. 400 Populationsverdoppelungen Zellen geerntet und kryokonserviert worden (Zelllinien A bzw. B). Aus den unbehandelten, parallel kultivierten Kontrollen stehen Zellen nach ca. 30 bzw. 300 Populationsverdoppelungen zur Verfügung (Zelllinien C bzw. D).

3.3. Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte mit einer Röntgenröhre bei einem Röhrenstrom von 20 mA und einer Spannung von 200 kV sowie einem 0.5 mm starken Kupfer-Filter im Stahlgang. Vor jedem Bestrahlungsexperiment wurde die Röntgenröhre mit einem Duplexdosimeter geeicht. Die Kalibrierung des Dosimeters erfolgte unter Verwendung einer Strontium-Radium-Ionisationskammer. Die Zellkulturen wurden stets im exponentiellen Wachstum der Zellen bei Raumtemperatur mit einer Dosisleistung von 2 Gy/min bestrahlt.

3.4. Trypan-Blau Assay: Bestimmung der Zellvitalität

Ein Problem im Umgang mit Suspensionszellkulturen stellt die Bestimmung der Konzentration lebender Zellen im Kulturmedium dar. Die automatisierte Zellzählung nach der Partikelgröße im Impedanzmessverfahren (nach W. Coulter) diskriminiert unter bestimmten Umständen nur unzureichend zwischen den vitalen und den bereits irreversibel geschädigten Zellen (Killemann

und Schneider, 2004).

In allen Untersuchungen wurde daher die Bestimmung (über)lebender Zellen manuell unter dem Durchlichtmikroskop unter Verwendung einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer und nach Färbung der Zellen mit Trypan-Blau durchgeführt. Dafür wurde eine Mischung aus einem Volumenanteil Zellsuspension und vier Volumenanteilen einer 0,1 %igen Trypan-Blau-Lösung für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in die vorbereitete Fuchs-Rosenthal-Zählkammer pipettiert. Trypan-Blau diffundiert nur dann durch die Zellmembranen, wenn das von vitalen Zellen aktiv aufrechterhaltene innere negative Membranpotential zusammengebrochen ist. Der Farbstoff eignet sich daher sehr gut zur Markierung bereits avitaler Zellen, die sich nach rein morphologischen Kriterien (z.B. Größe, Form) noch nicht von den ungeschädigten Nachbarzellen unterscheiden (Abb. 22).

Die Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer und der Trypan-Blau-Färbung erfolgte stets als Doppelbestimmung.

3.5. Proliferationsassay: Bestimmung der Wachstumskinetik

Ein entscheidendes Merkmal von Tumorzellen ist ihre hohe Proliferationsfähigkeit, ihre Klonogenität. In verschiedenen Tumorzelllinien führte eine Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 als Ausdruck der exzessiven Telomerverkürzung zu einem reversiblen Proliferationsstopp. Daher ergab sich zunächst die Notwendigkeit, für die Subpopulationen der Tumorzelllinie K-562 mit verkürzten Telomeren und unter aktueller BIBR 1532-Behandlung die Proliferationsfähigkeit im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen mit unbeeinflusster Telomerlänge zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien A, B, C und D jeweils 9 Tage lang parallel kultiviert. Initial wurden je $1,5 \times 10^6$ Zellen in 5 ml Medium ausgesät. Nach 2, 4, 7 und 9 Tagen wurde jeweils die Anzahl der lebenden Zellen im Trypan-Blau-Assay bestimmt, die Zellen wurden passagiert und ein Anteil von genau $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Zelllinie erneut ausgesät. Die theoretische Gesamtzellzahl (ausgehend von den initial ausgesäten $1,5 \times 10^6$ Zellen) zu jedem Messzeitpunkt konnte dann aus den aktuellen Messwerten des Trypan-Blau-Assay und der Proportion zwischen verbliebenem und erneut ausgesättem Anteil der Zellen kalkuliert werden.

Um eine relevante direkt zytotoxische Wirkung von BIBR 1532 ausschließen zu können, wurde eine Versuchsreihe für die Zelllinien A und B doppelt angelegt und nur in einem der beiden Ansätze dem Zellkulturmedium die Substanz BIBR 1532 in $10 \mu\text{M}$ Konzentration zugege-

ben.

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte softwaregestützt (GraphPad Prism® 4.03). Für die Wachstumskinetik aller Zelllinien wurde eine Exponentialfunktion der Form $y=a \cdot e^{(k \cdot x)}$ angenommen (mit der Zellzahl y , der Startzellzahl a , der Wachstumskonstante k und der Anzahl x der Tage nach Beginn des Experiments).

3.6. Durchflusszytometrie: Bestimmung der Zellzyklusverteilung und des DNA-Gehaltes

Die Unterschiede in der Telomerlänge zwischen den Subpopulationen der Tumorzelllinie K-562 unter der Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen könnten sich in einer unterschiedlichen Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus bemerkbar machen. Des Weiteren ist es ein bekanntes Phänomen von Tumorzelllinien in Langzeitkultur der Zugewinn oder der Verlust von Chromosomen infolge unvollständig oder fehlerhaft ablaufender mitotischer Teilungen. Ein messbarer Unterschied im durchschnittlichen DNA-Gehalt der Zellen wäre dann nachweisbar. Sowohl die Verteilung der Zellen im Zellzyklus als auch die DNA-Gehaltsmessung wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.6.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Zellen aus der zu untersuchenden Probe werden im Durchflusszytometer zunächst durch einen „hydrodynamische Fokussierung“ genannten Prozess dergestalt in einem sehr feinen Flüssigkeitsstrahl angeordnet, dass sie einzeln die eigentliche Messvorrichtung des Gerätes passieren müssen. Beim Passieren der Messvorrichtung unterbrechen sie einen Laserstrahl. Die resultierende Streuung des Laserlichtes wird von Detektoren registriert und quantifiziert. Die Streuung in Flussrichtung, die man als FSC („*forward scatter*“) bezeichnet, wird dabei durch die Zellgröße beeinflusst; die rechtwinkelig zur Flussrichtung entstehende Streuung dagegen, die man als SSC („*sideward scatter*“) bezeichnet, gibt Auskunft über die Granularität der Zellen. Werden die Zellen vor der Messung zusätzlich mit Fluoreszenzfarbstoffen behandelt, kann außerdem die durch das Laserlicht angeregte Fluoreszenz gemessen werden. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt dabei üblicherweise in drei typischen Emissionsspektren (FL-1, FL-2 und FL-3).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen an einem FACScan Durchflusszytometer durchgeführt. Propidiumjodid kam als Fluoreszenzfarbstoff zum Einsatz. Das nach Anregung durch den geräteinternen Argonlaser von Propidiumjodid emittierte Licht kann hauptsächlich im Bereich FL-2 gemessen werden. Die Auswertung der Messdaten erfolgte computergestützt mit

Hilfe der Software ModFit 3.0.

3.6.2. Messung von Zellzyklusverteilung und DNA-Gehalt

Bei der Bestimmung der anteilmäßigen Verteilung der Zellen einer Zelllinie in einer gegebenen Probe auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus macht man sich die physiologischen Veränderungen im DNA-Gehalt der Zellkerne während des Durchlaufens des Zellzyklus zunutze. Geht man für eine einzelne Zelle in der G1-Phase (bzw. G0-Phase) von einem einfachen DNA-Gehalt aus, der als $2n$ bezeichnet wird, so kann man für die G2/M-Phase einen genau verdoppelten DNA-Gehalt von $4n$ erwarten. In der zeitlich zwischen G1/G0 und G2/M liegenden S-Phase sollte der DNA-Gehalt von $2n$ auf $4n$ stetig zunehmen. In der Tat kommen diese theoretisch zu erwartenden Werte des DNA-Gehalts proliferierender Zellen denen in der Realität messbaren sehr nahe (Gray, 1974).

Die Zellen der zu untersuchenden Probe werden in Ethanol fixiert und RNA-Moleküle durch Zugabe von RNase degradiert. Vor der Messung im Durchflusszytometer werden dann die DNA-Moleküle mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid markiert. Die im Fluoreszenzbereich FL-2 gemessene Emission pro Zelle korreliert dann direkt mit deren DNA-Gehalt (Crissman *et al.*, 1976).

Der normale $2n$ -DNA-Gehalt von menschlichen Zellen in der G1/G0-Phase verteilt sich auf 46 Chromosomen (22 Autosomenpaare und 2 Gonosomen). Die Zellen besitzen damit einen sogenannten diploiden Chromosomensatz. Die Tumorzelllinie K-562 besitzt mit einer durchschnittlichen Chromosomenzahl von 61-68 einen hypotriploiden Chromosomensatz und damit einen erhöhten DNA-Gehalt ($> 2n$). Misst man nun in der Durchflusszytometrie eine Mischung aus Zellen mit bekanntem DNA-Gehalt gemeinsam mit einer Probe der Tumorzellen, so lässt sich aus der Proportion der durchschnittlichen Fluoreszenz der jeweiligen G1/G0-Phase-Zellen direkt auf den DNA-Gehalt der Tumorzellen schließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinien A, B, C und D bezüglich der Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus sowie bezüglich ihres DNA-Gehaltes durchflusszytometrisch untersucht.

3.6.3. Zellfixierung und Messung am FACScan

Zur Messung verwendet wurden je 1×10^6 Zellen der Zelllinien A, B, C und D im exponentiellen Wachstum 48 h nach der letzten Passagierung der Zellen. Die Zellen wurden im Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (5 min mit 1.200 rpm) und anschließend zweimal in PBS gewaschen.

Nach erneuter Zentrifugation der Zell-PBS-Lösung wurde das resultierende Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Unter vorsichtigem Vortexen wurden dann nacheinander 1 ml 70 %ige und 4,5 ml 96 %ige Ethanollösung (4°C) tropfenweise hinzugegeben. Die nach dieser Prozedur fixierten Zellen konnten über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

Unmittelbar vor der Messung am FACScan wurden die fixierten Zellen abzentrifugiert, einmal in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und das resultierende Pellet in 500 µl einer RNase-Propidiumjodid-PBS-Lösung (siehe 3.13.4.) aufgenommen und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Probe direkt im FACScan analysiert. Für die DNA-Gehaltsmessung wurde die Probe danach noch im Volumenverhältnis 4:1 mit einem Leukozytenstandard gemischt (siehe 3.6.4.) und erneut analysiert. In die Analyse gingen stets mindestens 50.000 Zellen ein. Die Auswertung, Interpretation und graphische Darstellung der Messwerte erfolgte softwaregestützt (ModFit LT 3.0).

3.6.4. Herstellung des Leukozytenstandards für die DNA-Gehaltsbestimmung

Die kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes, die Leukozyten, verfügen über einen diploiden Chromosomensatz und befinden sich in aller Regel in der G₀-Phase des Zellzyklus, d.h. sie proliferieren aktuell nicht und haben einen konstanten DNA-Gehalt von $2n$. Eine Lösung dieser Zellen eignet sich daher als Standard bei der durchflusszytometrischen Analyse von Zellen unbekanntem DNA-Gehalt. Der bei den Messungen der vorliegenden Arbeit verwendete Standard wurde in folgender Weise hergestellt: 5 ml EDTA-antikoagulierte humanes Vollblut wurde zusammen mit 40 ml Erythrozytenlyse-Puffer (siehe 3.13.4.) in einem Falcon-Röhrchen bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Danach wurde für 10 min mit 3.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und das Pellet in 15 ml des Erythrozytenlyse-Puffers wieder aufgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 min mit 3.000 rpm und Abschütten des Überstandes verblieb nun ein nur noch aus Leukozyten bestehendes Zellpellet. Diese wurde in PBS resuspendiert und anschließend Aliquots von je 1×10^6 Zellen in der unter 3.6.3. erläuterten Weise in Ethanol fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte unmittelbar vor der FACScan-Analyse mit Propidiumjodid in der ebenso unter 3.6.3. erläuterten Weise.

3.7. DAPI Assay: Bestimmung des Anteils irreversibel geschädigter Zellen nach Röntgenbestrahlung mittels DNA Färbung durch DAPI

3.7.1. Bestrahlungsinduzierter Zelltod

Durch Strahlung induzierte irreversible Zellschädigung führt zum Zelltod. In Tumorzellkulturen kann dies prinzipiell über die Prozesse der Apoptose, der Nekrose, der Autophagie oder der mitotischen Katastrophe ablaufen, die jeweils mit spezifischen morphologischen und biochemischen Veränderungen in den Zellen einhergehen (*Übersicht in Okada und Mak, 2004*). Welcher der Prozesse des Zelltods vorzugsweise abläuft, ist abhängig vom Tumorzelltyp und dem Agens, welches den Schaden induziert. In Zelllinien, wie die in der vorliegenden Arbeit untersuchte chronisch myeloische Leukämiezelllinie K-562, die aufgrund spezifischer molekulargenetischer Eigenschaften eine hohe Resistenz gegenüber Apoptose aufweisen (Bedi *et al.*, 1994; McGahon *et al.*, 1997), wird nach Bestrahlung bevorzugt der Weg der mitotischen Katastrophe eingeschlagen (Jo *et al.*, 2005). Dieser Prozess des induzierten Zelltodes ist morphologisch durch die Ausbildung multipler Mikronuklei und nukleäre Fragmentation gekennzeichnet und beginnt nach Bestrahlung zeitverzögert im Zellzyklusabschnitt der Mitose (*Übersicht in Okada und Mak, 2004; Castedo et al., 2004*). Diese morphologischen Veränderungen sind einer mikroskopischen Untersuchung nach Färbung des Zellkerns mit einem geeigneten Fluorochrom zugänglich (siehe Abb. 9). In der vorliegenden Arbeit wurde nach Zellkernfärbung mit dem DNA-interkalierenden Fluorochrom DAPI der Anteil irreversibel geschädigter Zellen 48 h nach Bestrahlung nach morphologischen Kriterien bestimmt. Untersucht wurde die BIBR-behandelte Zelllinie A mit verkürzten Telomeren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollzelllinie D mit unbeeinflusster Telomerlänge.

3.7.2. Versuchsablauf und Auswertung des DAPI-Assays

Je 1×10^6 Zellen der Zelllinien A und D im exponentiellen Wachstum wurden mit 3 oder 6 Gy bestrahlt und anschließend gemeinsam mit unbestrahlten Kontrollen für weitere 48 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellsuspensionen in je ein Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min mit 1.200 rpm abzentrifugiert. Das weitere Procedere der Zellkernfärbung mit DAPI ist im Folgenden dargestellt:

1. 2x Waschen in PBS.
2. Einstellung der Zellkonzentration auf 1×10^6 Zellen / ml PBS.
3. Zentrifugation von 170 μ l der Zellsuspension im Cytospin. Mit dieser speziellen Zentri-

fuge können Zellen einer Zellsuspension auf einen Objektträger in Form eines Sediments aufgebracht werden. Das Sediment enthielt unter den gegebenen Bedingungen mindestens $0,1 \times 10^6$ Zellen.

4. Fixierung der Zellen in 2 %iger Formaldehydlösung für 15 min.
5. 3x10 min Waschen in PBS unter leichtem Schütteln.
6. 5 min in 4°C-kalter Permeabilisierungslösung. Dies diente der Vorbereitung der Zellkernmembran auf die intranukleäre DNA-Färbung.
7. 3x10 min Waschen in Tween-20-PBS Lösung unter leichtem Schütteln.
8. Auftragen von 15 µl DAPI-Antifade Lösung (Konzentration: 0,1 µg DAPI / ml Antifade) pro Objektträger.
9. Eindecken und Versiegelung der Objektträger. Die Proben konnten über mehrere Wochen bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch unter Ölimmersion bei 1.000facher Vergrößerung unter Verwendung eines passenden Filters. Pro Objektträger, d.h. pro Bestrahlungspunkt, wurden 1.000 Zellen bewertet. Als irreversibel geschädigt galten alle Zellen, deren DAPIgefärbte Kerne multiple Mikronuklei oder eine deutliche Fragmentation zeigten (siehe Abb. 9). Die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil an irreversibel geschädigten Zellen von 1.000 gezählten Zellen angegeben. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte softwaregestützt (GraphPad Prism® 4.03).

3.8. Immunhistochemie: Bestimmung der quantitativen Reparaturleistung für DNA-Doppelstrangbrüche nach Röntgenbestrahlung durch Nachweis von γ -H2AX Foci

3.8.1. Prinzip der γ -H2AX Foci Entstehung

Durch Röntgenbestrahlung induzierte DNA-Doppelstrangbrüche führen zu einer Aktivierung einer Signalkaskade, deren Aufgabe die Steuerung des zelleigenen DNA-Reparatursystems ist. Ein wichtiger Schritt innerhalb dieser Signalkaskade ist die Phosphorylierung und damit Modifizierung des Histons H2AX. Histone der H2A-Gruppe sind Bestandteile der Nukleosomen, der Grundbausteine des Chromatins. Die Phosphorylierung der H2AX-Histone, welche man dann als γ -H2AX bezeichnet, findet innerhalb weniger Minuten nach Induktion eines Doppelstrangbruchs statt und erstreckt sich im Chromatin auf einer Länge von mehreren Megabasenpaare um diesen herum (Rogakou *et al.*, 1998; *Übersicht in* Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004). Dabei ist der Ursprung des einen Doppelstrangbruch induzierenden Schadens unerheblich. Die Phosphorylie-

rung des Histons H2AX findet auch an Doppelstrangbrüchen, die durch Replikationsgabelkollision oder im Rahmen der Apoptose entstanden sind, statt. Ebenso gelang der Nachweis von phosphoryliertem H2AX an dysfunktionalen Telomeren (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003; Takai *et al.*, 2003). Mit Hilfe spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper ist *in vitro* die Darstellung intranukleärer Bereiche möglich, die Chromatin mit phosphoryliertem H2AX enthalten. Diese Bereiche imponieren in der Fluoreszenzmikroskopie als sogenannte „ γ -H2AX Foci“. Die Anzahl der Foci entspricht dabei der Anzahl der induzierten Doppelstrangbrüche (Rogakou *et al.*, 1999). Mit Abschluss der Reparatur eines Doppelstrangbruchs wird das γ -H2AX wieder dephosphoryliert, sodass man eine enge Korrelation zwischen der γ -H2AX-Elimination und erfolgter DNA-Doppelstrangbruchreparatur postulieren kann (Nazarov *et al.*, 2003). Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis persistierender intranukleärer γ -H2AX Foci in einer Zelle spricht also für das Vorliegen von zu diesem Zeitpunkt noch nicht reparierten DNA-Doppelstrangbrüchen in dieser Zelle. Die Anzahl der nach einer festgelegten Reparaturzeit noch nachzuweisenden γ -H2AX Foci nach einem definierten, DNA-Doppelstrangbruch induzierenden Schaden ist somit ein Maß für die quantitative Reparaturleistung einer Zelle bzw. eines Zellsystems.

In der vorliegenden Arbeit ist die durchschnittliche Anzahl an γ -H2AX Foci pro Zelle nach Röntgenbestrahlung mit 0-4 Gy und 24 Stunden Reparaturzeit in den Zelllinien A, B, C und D untersucht worden, um den Einfluss der Telomerverkürzung durch den Telomeraseinhibitor BIBR 1532 auf die quantitative Reparaturleistung für DNA-Doppelstrangbrüche zu bestimmen. Des Weiteren wurde evaluiert, ob in den Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren schon im unbestrahlten Zustand γ -H2AX Foci im Sinne einer Telomerdysfunktion nachweisbar waren.

3.8.2. Zellpräparation und immunhistochemische Markierung des Histons γ -H2AX

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde das phosphorylierte Histon H2AX mittels indirekter immunhistochemischer Markierung nachgewiesen, d.h. die Markierung des gesuchten Proteins erfolgte über die Inkubation der Zellen mit einem spezifischen Primärantikörper und die nachfolgende Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war. Zur Anwendung kamen ein monoklonaler Antikörper aus der Spezies Maus gegen das γ -H2AX Protein als Primärantikörper sowie ein mit dem Fluorochrom Alexa Fluor 594 markierter Antikörper gegen Mausimmunglobulin aus der Spezies Ziege als Sekundärantikörper.

Je $1,5 \times 10^6$ Zellen der Zelllinien A, B, C und D im exponentiellen Wachstum wurden mit Do-

sen von 0 bis 4 Gy bestrahlt und anschließend für 24 h bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Zellsuspensionen in je ein Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min mit 1.200 rpm abzentrifugiert. Der weitere Versuchsablauf ist im Folgenden dargestellt:

1. 2x Waschen in PBS.
2. Einstellung der Zellkonzentration auf 1×10^6 Zellen / ml PBS.
3. Zentrifugation von 170 μ l der Zellsuspension im Cytospin. Mit dieser speziellen Zentrifuge können Zellen einer Zellsuspension auf einen Objektträger in Form eines Sediments aufgebracht werden. Das Sediment enthielt unter den gegebenen Bedingungen mindestens $0,1 \times 10^6$ Zellen.
4. Fixierung der Zellen in 2 %iger Formaldehydlösung für 15 min.
5. 3x10 min Waschen in PBS unter leichtem Schütteln.
6. 5 min in 4°C-kalter Permeabilisierungslösung. Dies diente der Vorbereitung der Zellkernmembran auf die intranukleäre Proteinmarkierung.
7. Inkubation in 3 %iger BSA Lösung für 1 h. Das Ziel war die Reduktion unspezifischer Proteinmarkierungen.
8. Auftragen von 60 μ l pro Objektträger des Anti- γ -H2AX Antikörpers (= Primärantikörper) in 1:100facher Verdünnung. Die Objektträger wurden anschließend in einer feuchten Kammer für 1 h inkubiert.
9. 3x10 min Waschen in Tween-20-BSA Lösung unter leichtem Schütteln.
10. Auftragen von 60 μ l pro Objektträger des fluoreszenzmarkierten Anti-Maus Antikörpers (= Sekundärantikörper) in 1:600facher Verdünnung. Die Objektträger wurden anschließend in einer feuchten Kammer für 1 h inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde im Dunkeln gearbeitet.
11. 4x10 min Waschen in Tween-20-PBS Lösung unter leichtem Schütteln.
12. Auftragen von 15 μ l DAPI-Antifade Lösung (Konzentration: 0,1 μ g DAPI / ml Antifade) pro Objektträger. DAPI färbt DNA blaufluoreszierend und diente in diesem Experiment als Zellkerngegenfärbung.
13. Eindecken und Versiegelung der Objektträger. Die Proben konnten über mehrere Wochen bei 4°C im Dunklen gelagert werden.

3.8.3. Auswertung der γ -H2AX Foci

Die Auswertung der immunhistochemischen Markierung des phosphorylierten Histons H2AX erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 1.000facher Vergrößerung unter Verwendung pas-

sender Kombinationsfilter für die simultane Darstellung der rotfluoreszierenden γ -H2AX Foci bei blaufluoreszierender Zellkerngegenfärbung (siehe Abb. 11). Pro Blickfeld wurden die Foci in den fünf am zentralsten gelegenen Zellkernen gezählt. Pro Zelllinie und Bestrahlungspunkt wurden insgesamt 100 Zellkerne bewertet. Die Ergebnisse wurden als durchschnittliche γ -H2AX Foci pro Zelle angegeben. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte softwaregestützt (GraphPad Prism® 4.03). Für die Dosisabhängigkeit der strahleninduzierten γ -H2AX Fociformation wurde eine lineare Funktion der Form $y=a*x+b$ angenommen (mit der Foci-Anzahl y , der Dosis x , der Kurvensteigung a und der Foci-Anzahl in unbestrahlten Kontrollen b).

3.9. Metaphasepräparation nach Röntgenbestrahlung in der G1-Phase: Bestimmung der instabilen Chromosomentypaberrationen

3.9.1. Allgemeine Einleitung zur Methode der Bestimmung von Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen nach Bestrahlung

Strahlungsinduzierte DNA-Doppelstrangbrüche führen über fehlerhafte oder nicht erfolgte Reparatur zu Chromosomentyp- oder Chromatidentypaberrationen (Übersicht in Bryant, 2004b). In welcher Phase des Zellzyklus sich eine Zelle zum Zeitpunkt der Schadensinduktion befindet, bestimmt dabei wesentlich, welcher Typ von Aberration entstehen kann (Sax, 1940). In der vorliegenden Arbeit ist das Auftreten von stabilen und instabilen Chromosomentypaberrationen sowie von Chromatidentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung in den Zelllinien A, B, C und D der Tumorzelllinie K-562 untersucht worden. Ziel der Untersuchungen war es, festzustellen, ob in den mit BIBR 1532 behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren die Aberrationen mit einer höheren Frequenz auftreten als in den unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge.

Alle Untersuchungen zu Aberrationen, gleich welchen Typs, finden stets an sogenannten Metaphasepräparationen, benannt nach der Metaphase der Mitose, statt. Nur in der Mitose des Zellzyklus sind die einzelnen Chromosomen so stark kondensiert, dass sie nach speziellen Färbungen einer differenzierten licht- oder fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zugänglich werden. Um sicherzustellen, dass sich in einer zu untersuchenden Probe eine ausreichend große Anzahl an Zellen in der Mitose befindet, wird der Zellkultur über einen bestimmten Zeitraum (der sich wiederum nach der Art des zu untersuchenden Aberrationstyps richtet) Colcemid, ein synthetisches Analogon des Spindelfasergiftes Colchicin, zugesetzt. Die Ausbildung des Spindelapparats, ohne den in der Metaphase der Mitose letztlich das Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden

der einzelnen Chromosomen unmöglich ist, wird gehemmt und dadurch werden die Chromosomen praktisch in der Äquatorialebene des Metaphasezellkerns blockiert.

3.9.2. *Metaphasepräparation und Metaphasen-Präparate*

Unterschiede in den Untersuchungen der Aberrationstypen ergeben sich nur in der Vorbehandlung der Zellkulturproben und in der Chromosomenfärbung der Metaphasen-Präparate und werden in den jeweiligen Unterkapiteln beschrieben. Die Metaphasepräparation selbst jedoch ist stets die gleiche und wird im Folgenden beschrieben:

1. Überführung der Zellsuspension aus der Zellkulturflasche in ein Falcon-Röhrchen.
2. Zentrifugieren für 5 min mit 1.200 rpm.
3. Zellen 2x in PBS waschen und zum Abschluss erneut zentrifugieren.
4. Resuspension des Zellsediments in 1 ml PBS.
5. Tropfenweise und unter vorsichtigem Vortexen werden dann 9 ml einer 0,075 molaren KCl-Lösung hinzugefügt. Diese hypotone Lösung lässt die Zellen anschwellen und letztendlich aufplatzen, sodass die Zellkerne übrig bleiben.
6. Zentrifugieren für 5 min mit 1.200 Rpm. Das Sediment wird anschließend zügig erneut in 1 ml der KCl-Lösung resuspendiert.
7. Tropfenweise und unter vorsichtigem Vortexen werden dann 9 ml Carnoy's Fixativ hinzugefügt. Diese Lösung dient der Dehydratation und Fixierung der Zellkerne.
8. Zentrifugieren für 5 min mit 1.200 rpm. Das Zellkernsediment wird danach erneut in 1 ml Carnoy's Fixativ resuspendiert.
9. Titrierung der Zellkernkonzentration in der Lösung auf 1×10^6 Kerne / ml Fixativlösung. Die so fixierten Zellkerne können über Monate hinweg bei -20°C gelagert werden. Zum Untersuchungszeitpunkt werden dann auf Objektträgern sogenannte Metaphasen-Präparate (oder auch Metaphase-Spreads, nach „*spread*“ = engl. für „ausbreiten“) in folgender Weise hergestellt:
10. Mit Hilfe eines Schwämmchens o.ä. wird ein dünner Film aus destilliertem Wasser auf dem Objektträger produziert.
11. Jetzt werden in einer zügigen Bewegung ca. 30 μl der Zellkernsuspension auf den Objektträger aufgetropft. Durch die Sogkraft des an der Grenze zwischen Wasser und Fixativlösung reißenden Wasserfilmes werden die Zellkerne über den Objektträger ausgebreitet, wobei die empfindlicheren Kernmembranen der Metaphasekerne rupturieren und dadurch idealerweise die einzelnen, zu einer Metaphase gehörenden Chromosomen in einem jeweils engen Bereich gut ausgebreitet werden.

nem jeweils engen Bereich gut ausgebreitet werden.

12. Die Objektträger werden luftgetrocknet und sind dann sofort für die anschließenden Untersuchungen verwendbar.

3.9.3. *Instabile Chromosomentypaberrationen: Präparation, Messung und Auswertung*

Strahleninduzierte, nicht reparierte DNA-Doppelstrangbrüche führen zu strukturellen Veränderungen (= Aberrationen) in den Chromosomen. Bei einer Bestrahlung in der präreplikativen G1-Phase betreffen diese – nach erfolgreicher DNA-Replikation in der S-Phase - stets beide Chromatiden der in der Metaphasepräparation sichtbaren Chromosomen. Des Weiteren können die strukturellen Veränderungen innerhalb einzelner Chromosomen (intrachromosomal) auftreten oder mehrere Chromosomen (interchromosomal) involvieren (Savage, 1975). Aberrationen, die in der (ersten) Mitose verloren gehen, sich also nicht in beiden Tochterzellen wiederfinden, bezeichnet man als instabil. Zu den instabilen intrachromosomalen Aberrationen zählen die terminale und die interstitielle Deletion, die beide mit der Bildung azentrischer Fragmente einhergehen. Zu den instabilen interchromosomalen Aberrationen gehören dizentrische Chromosomen, die ebenfalls mit (mindestens) einem azentrischen Fragment assoziiert sind. In der sich nach der G1-Phasen-Bestrahlung anschließenden S-Phase des Zellzyklus werden die azentrischen Fragmente und die dizentrischen Chromosomen mitrepliziert, sodass man in der ersten folgenden Mitose typischer Weise aus zwei Chromatiden bestehende azentrische Fragmente und dizentrische Chromosomen findet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frequenz des Auftretens zusätzlicher azentrischer Fragmente und dizentrischer Chromosomen nach Röntgenbestrahlung bestimmt, da diese zusammen die sogenannten letalen Chromosomenaberrationen bilden. Untersucht wurden die mit BIBR 1532 behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzelllinien C und D.

Dafür wurden aus jeder Zelllinie jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen im exponentiellen Wachstum mit jeweils 0 bis 6 Gy bestrahlt und anschließend für 48 h bei 37°C inkubiert. 32 h nach Bestrahlung, dem mindestens notwendigen Zeitraum für die Zellen die G1-Phase, die S- und die G2-Phase des Zellzyklus zu durchlaufen, wurde den Zellkulturen 0,06 µg Colcemid pro ml Medium zugesetzt, sodass über einen Zeitraum von 16 h die mitotischen Zellen in der Metaphase akkumulierten. Die Metaphasepräparation erfolgte dann in der unter 3.9.2. beschriebenen Weise.

Die Metaphasen-Präparate wurden anschließend für 15 min in 4,5 %iger Giemsa-PBS-Lösung gefärbt, die überschüssige Farblösung in drei kurzen Waschschrritten entfernt, die Objekt-

träger luftgetrocknet und anschließend für die Lichtmikroskopie eingedeckt. Die in der Giemsa-lösung enthaltenen Farbstoffe bilden mit DNA einen purpurroten Komplex. Die Auswertung der mit Giemsa gefärbten Präparate erfolgte lichtmikroskopisch unter Ölimmersion bei einer 1.000fachen Vergrößerung. Zur Verbesserung der Auswertung wurde eine computergestützte Bildauswertung (Optimas 6.51) hinzugezogen. Pro Bestrahlungswert wurden zwei Objektträger angefertigt und pro Objektträger mindestens 25 Metaphasen ausgezählt. Die Auszählung erfolgte verblindet. Bei der Zählung wurde die Anzahl aller Chromosomen einschließlich aller Fragmente pro Metaphase bestimmt (= Chromosomenfragmente). Die pro Bestrahlungswert aufgetretenen zusätzlichen azentrischen Fragmente ergaben sich aus der jeweiligen Differenz dieser Anzahl zu der Anzahl der Chromosomenfragmente in den unbestrahlten Kontrollen. Dizentrische Chromosomen wurden extra gezählt. Die letalen Chromosomenaberrationen pro Metaphase ergaben sich aus der Summe der zusätzlichen azentrischen Fragmente und der dizentrischen Chromosomen pro Metaphase.

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte softwaregestützt (GraphPad Prism® 4.03). Für die Dosisabhängigkeit der strahleninduzierten Aberrationen wurde eine linear-quadratische Funktion der Form $y=a+b*x+c*x^2$ angenommen (mit der Aberrationshäufigkeit y und der Bestrahlungsdosis x).

3.10. Metaphasepräparation nach Röntgenbestrahlung in der G1-Phase: Bestimmung der stabilen Chromosomentypaberrationen

Die stabilen Chromosomentypaberrationen zählen ebenso wie die instabilen zur Gruppe derjenigen Aberrationen, die nach der Bestrahlung von Zellen entstehen, die sich in der präreplikativen G1-Phase befinden (siehe 3.9.3.). Stabile Chromosomentypaberrationen entstehen immer durch fehlerhafte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen im Sinne einer Wiedervereinigung von ursprünglich nicht miteinander korrespondierenden Bruchenden. Die strukturellen Veränderungen führen also zu einer Umlagerung bzw. einem Austausch von DNA, wobei wiederum nur ein Chromosom (intrachromosomal) oder mehrere Chromosomen (interchromosomal) involviert sein können (Savage, 1975). Im Unterschied zu den instabilen Chromosomentypaberrationen gehen die strukturellen Veränderungen der stabilen Chromosomentypaberrationen nicht grundsätzlich in der ersten, der Bestrahlung folgenden Mitose verloren, sondern der Verlust ist zeitabhängig und folgt einem exponentiellen Verlauf, sodass über zahlreiche Zellteilungen hinweg zumindest noch ein Anteil der ursprünglichen Aberrationen nachweisbar ist (Puerto *et al.*, 1999).

Die häufigsten und einer systematischen Untersuchung am leichtesten zugänglichen stabilen Chromosomentypaberrationen sind die kompletten und inkompletten Translokationen.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Nutzung der Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung die Frequenz des Auftretens von kompletten und inkompletten interchromosomalen Translokationen nach Röntgenbestrahlung von Zellen in der G1-Phase bestimmt, die das Chromosom 7 involvierten. Untersucht wurden die BIBR-behandelte Zelllinie A mit verkürzten Telomeren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollzelllinie D mit unbeeinflusster Telomerlänge.

3.10.1. Prinzip der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Einzelsträngige DNA hat die Eigenschaft, sich unter geeigneten Umgebungsbedingungen an einen DNA-Strang mit komplementärer Basensequenz spezifisch anzulagern. Dieses Prinzip nutzt man bei der zytogenetischen Untersuchungstechnik der *in situ* Hybridisierung. Dabei wird *in vitro* eine Sonden-DNA mit bekannter Basensequenz mit einer zu untersuchenden Probe an Ziel-DNA unbekannter Basensequenz hybridisiert. Bei der „Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung“ genannten Technik wird die Sonden-DNA zuvor mit einem Fluorochrom markiert. Das Hybrid, also die spezifische Anlagerung der Sonden-DNA an die genau komplementären Abschnitte der Ziel-DNA, ist dann direkt oder nach einer geeigneten Methode zur Signalamplifikation fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar. So gelingt der Nachweis von strukturellen Chromosomenveränderungen, wie beispielsweise interchromosomalen DNA-Austausch, die methodenbedingt bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von Giemsa-gefärbten Metaphasen-Präparaten nicht sichtbar werden.

In der vorliegenden Arbeit sind die Untersuchungen an Metaphasepräparationen durchgeführt worden; Ziel-DNA war also die auf die einzelnen Chromosomen verteilte Gesamt-DNA der Tumorzellen. Als Sonden-DNA kam eine mit dem Fluorochrom Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) markierte sogenannte „total chromosome probe“ zum Einsatz, die spezifisch und (theoretisch) ausschließlich die zum menschlichen Chromosom 7 gehörige DNA markiert. Durch Verwendung solcher, spezifisch ein ganzes Chromosom markierender Sonden ist es möglich, strahleninduzierte Translokationen (interchromosomaler DNA-Austausch) zu visualisieren (Pinkel *et al.*, 1986).

3.10.2. Stabile Chromosomentypaberrationen: Präparation, Messung und Auswertung

Verwendet wurden Proben von Metaphasepräparationen der Zelllinien A und D, die mit 6 Gy in der G1-Phase des Zellzyklus bestrahlt worden waren, sowie jeweils unbestrahlte Kontrollen. Die Herstellung dieser Proben und der Metaphasen-Präparate auf Objektträgern (jeweils 18 µl

Probe wurde verwendet) ist unter 3.9.3. und 3.9.2. detailliert dargestellt. Anschließend erfolgte die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nach dem folgenden Protokoll:

1. Vorbehandlung der Metaphasen-Präparate auf den Objektträgern durch Inkubation in NP-40 / zweifache SSC Lösung für 30 min im 37°C Wasserbad. Anschließend wird in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 % und 96 % Ethanol für je 2 min) bei Raumtemperatur dehydriert und die Objektträger werden gut luftgetrocknet.
2. Denaturierung der Ziel-DNA (= Metaphasen-Präparate auf Objektträgern) durch Erhitzen in 70 % Formamid / 2fach SSC Lösung für 2 min im 72°C Wasserbad. Anschließend wird in einer eiskalten aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 % und 96 % Ethanol für je 2 min) dehydriert und die Objektträger werden gut luftgetrocknet.
3. Sonden-DNA und Sonden-DNA-Verdünnungspuffer werden im 37°C Wasserbad vorgewärmt und anschließend 1:1 vermischt (pro Objektträger 5 µl der gebrauchsfertigen Sonden-DNA).
4. Denaturierung der Sonden-DNA durch Erhitzen der verdünnten Sonden-DNA-Lösung für 10 min im 72°C Wasserbad.
5. Inkubation der denaturierten, verdünnten Sonden-DNA-Lösung für 30 min im 37°C Wasserbad. Durch diese „Preannealing“ genannte Prozedur verringert sich im Hybridisierungsschritt (siehe 6.) die Markierung von hochrepetitiven Sequenzen an der Ziel-DNA, die oft nicht chromosomenspezifisch sind.
6. Pro Objektträger werden 10 µl der denaturierten, verdünnten Sonden-DNA-Lösung aufgetragen. Anschließend wird der gesamte Bereich auf dem Objektträger mit einem Deckgläschen abgedeckt und wasserdicht versiegelt. Bei 37°C in dunkler und feuchtigkeitsgesättigter Umgebung findet dann über 16 h hinweg der eigentliche Hybridisierungsprozess statt.
7. Nach Entfernung der Versiegelung und des Deckgläschens folgt in 50 % Formamid / 2fach SSC Lösung für 15 min im 43°C Wasserbad das erste Posthybridisierungswaschen zum Entfernen nichthybridisierter Sonden-DNA. Anschließend wird in reiner zweifacher SSC Lösung für 15 min im 60°C Wasserbad erneut gewaschen.
8. Zur Verstärkung der Fluoreszenzsignale folgt anschließend eine jeweils einstündige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur mit zunächst einem Anti-Fluorescein Antikörper aus der Spezies Ziege (1:100 verdünnt; 60 µl pro Objektträger), gefolgt von einem fluoreszeinmarkierten Anti-Ziege-IgG Antikörper (1:100 verdünnt; 60 µl pro Objektträger).

ger). Nach jeder Inkubation wird 3mal jeweils 5 min in PBS zwischengewaschen.

9. Die gesamte Ziel-DNA wird zum Abschluss mit dem interkalierenden Fluorochrom Propidiumjodid (PI; Konzentration: 0,4 µg/ml in Antifade) gegengefärbt. Die Objektträger sind nach Abdeckung mit einem Deckgläschen und wasserdichter Versiegelung bei 4°C im Dunkeln für mehrere Wochen lagerbar.

Die Auswertung der Präparate erfolgte fluoreszenzmikroskopisch unter Ölimmersion und Verwendung passender Kombinationsfilter bei einer 1.000fachen Vergrößerung. Zur Verbesserung der Auswertung wurde eine computergestützte Bildauswertung (Optimas 6.51) hinzugezogen. Sowohl von den mit 6 Gy bestrahlten Metaphasepräparationen als auch von den unbestrahlten Kontrollen wurden pro Objektträger mindestens 50 Metaphasen ausgezählt. Die Auszählung erfolgte verblindet. Der Nachweis von FITC-markiertem Material endständig an einem sonst unmarkierten Chromosom, ohne dass in derselben Metaphase an einem Chromosom 7 ein unmarkiertes (nur PI gefärbtes) Areal nachweisbar gewesen wäre, wurde als inkomplette interchromosomale Translokation gewertet und als einfaches Ereignis gezählt. Gleiches galt für den Nachweis eines endständigen unmarkierten Areals an einem Chromosom 7, wenn in derselben Metaphase ein FITC-markiertes azentrisches Fragment nachweisbar war (siehe Abb. 18). Waren innerhalb einer Metaphase sowohl ein endständiges unmarkiertes Areal an einem Chromosom 7 als auch ein endständiges FITC-markiertes Areal an einem sonst unmarkierten Chromosom nachweisbar, lag eine komplette interchromosomale Translokation vor, die als zweifaches Ereignis gezählt wurde.

Die statistische Auswertung der so gewonnenen Daten erfolgte softwaregestützt (GraphPad Prism® 4.03).

3.11. Metaphasepräparation nach Röntgenbestrahlung in der G2-Phase: Bestimmung der Chromatidentypaberrationen

Nach Exposition von proliferierenden Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus mit ionisierender Strahlung lassen sich lichtmikroskopisch sichtbare strukturelle Veränderungen des Chromatins nachweisen, die man als Chromatidentypaberrationen bezeichnet. Dabei handelt es sich um Diskontinuitäten, sogenannte „gaps“ (= engl. für „Lücke“) und „breaks“ (= engl. für „Bruch“), und – wesentlich seltener – um komplexe Aberrationen, wie zum Beispiel sogenannte triradiale Chromosomen. Direkt oder indirekt ursächlich für diese Veränderungen sind die strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüche (*Übersicht in Bryant, 2004b*). Da in der G2-Phase des Zellzyk-

lus die DNA-Replikation abgeschlossen ist, betreffen die durch DNA-Doppelstrangbrüche ausgelösten strukturellen Chromosomenveränderungen in der Regel nur eines der beiden Schwesterchromatiden eines Chromosoms. In der folgenden Mitose erhält eine der beiden entstehenden Tochterzellen das geschädigte und eine das unversehrte Chromatid, sodass dieser Aberrationstyp in späteren Generationen einer Zellkultur nicht durchgängig nachweisbar ist. Die Untersuchung von Zellen auf das Vorliegen von Chromatidentypaberrationen erfolgte daher in der ersten Mitose nach Bestrahlung.

3.11.1. Chromatidentypaberrationen: Präparation, Messung und Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurden Giemsa-gefärbte Metaphasen-Präparate der BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren sowie der unbehandelten Zelllinien C und D untersucht, die jeweils mit 0,5 Gy bestrahlt worden waren. Metaphasen-Präparate unbestrahlter Zellen jeder Linie dienten als Kontrolle. Der Versuchsaufbau bezüglich Bestrahlungszeitpunkt, Colcemidbehandlungsdauer und Weiterverarbeitung der Zellen orientierte sich eng an dem für T-Lymphozyten des peripheren Blutes etablierten sogenannten „G2 assay“ (Bryant *et al.*, 2002). Der genaue Versuchsablauf gestaltete sich wie folgt: Jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen jeder Zelllinie wurden im exponentiellen Wachstum mit 0,5 Gy bestrahlt und anschließend sofort bei 37°C weiterinkubiert. Unbestrahlte Kontrollen gleicher Zellzahl und unter gleichen Bedingungen wurden mitgeführt. Nach 30 min Inkubation wurde allen Zellkulturen 0,2 µg Colcemid pro Milliliter Medium zugesetzt und diese dann für weitere 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Metaphasepräparation in der unter 3.9.2. beschriebenen Weise mit dem wichtigen Unterschied, dass sämtliche verwendete Lösungen und die Betriebskammer der Zentrifuge auf 4°C gekühlt gehalten wurden. Die niedrige Temperatur verhindert eine Veränderung der Chromatidentypaberrationen durch DNA-Reparaturprozesse über den Versuchsablauf hinweg und garantiert so eine bessere Vergleichbarkeit der untersuchten Proben untereinander. Analog zu den Untersuchungen der instabilen Chromosomenaberrationen (siehe 3.9.2. und 3.9.3.) wurden auch hier von den Metaphasepräparationen auf Objektträgern Metaphasen-Präparate hergestellt, mit Giemsa-Lösung gefärbt und eingedeckt.

Die Auswertung der mit Giemsa gefärbten Präparate erfolgte lichtmikroskopisch unter Ölimmersion bei einer 1.000fachen Vergrößerung. Zur Verbesserung der Auswertung wurde eine computergestützte Bildauswertung (Optimas 6.51) hinzugezogen. Pro Bestrahlungswert wurden je zwei, von den unbestrahlten Kontrollen je ein Objektträger angefertigt und pro Objektträger mindestens 35 Metaphasen ausgezählt. Die Auszählung erfolgte verblindet. Als jeweils ein Er-

ereignis einer Chromatidentypaberration wurde gewertet: (1.) alle Diskontinuitäten der Chromatiden, wenn sie entweder zu einer klaren Unterbrechung in der Richtung des betroffenen Chromatiden führten bzw. das distal der Unterbrechung liegende Fragment disloziert war (= „breaks“) oder wenn sie in ihrer Weite die Breite des betroffenen Chromatiden übertrafen (= „gaps“), sowie (2.) alle komplexen strukturellen Veränderungen unter Einbeziehung mehrerer Chromatiden, beispielsweise triradiale Chromosomen (siehe Abb. 20). Alle Ereignisse wurden aufsummiert und die durchschnittliche Anzahl an Chromatidentypaberrationen pro Metaphase berechnet. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte softwaregestützt (GraphPad Prism® 4.03).

3.12. Proliferationsassay: Bestimmung des Zellüberlebens nach Röntgenbestrahlung

Die Röntgenbestrahlung von Zellen kann über die Induktion von DNA-Schäden zum Verlust der Proliferationsfähigkeit oder zum Absterben der Zellen - auch über mehrere Populationsverdopplungen hinweg - führen. Dieser Mechanismus ist die Rationale für die Anwendung von Strahlung in der Therapie von Tumoren.

Im mTERC^{-/-}-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Verlust funktionsfähiger Telomere zu einer Zunahme der Strahlenempfindlichkeit von Zellen führt (siehe 2.4.1.). Es war daher zu untersuchen, ob für die mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 behandelten Subpopulationen der Tumorzelllinie K-562 mit verkürzten Telomeren eine solche Zunahme der Strahlenempfindlichkeit im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen mit unbeeinflusster Telomerlänge nachzuweisen war.

Zu diesem Zweck wurden je $1,5 \times 10^6$ Zellen der Zelllinien A, B, C und D mit Dosen von 2, 4, 6 und 8 Gy bestrahlt und über 9 Tage parallel mit unbestrahlten Kontrollen aus jeder Zelllinie kultiviert. An den Tagen 2, 4, 7 und 9 nach Bestrahlung wurde jeweils für jede Zelllinie und jeden Bestrahlungswert getrennt die Anzahl lebender Zellen mit Hilfe des Trypan-Blau-Assays bestimmt, die Zellen wurden passagiert und ein Anteil von $1,5 \times 10^6$ Zellen neu ausgesät. Die theoretische Gesamtzellzahl (ausgehend von den initial ausgesäten $1,5 \times 10^6$ Zellen) zu jedem Messzeitpunkt und zu jedem Bestrahlungswert konnte dann aus den aktuellen Messwerten des Trypan-Blau-Assays und der Proportion zwischen verbliebenem und erneut ausgesätem Anteil der Zellen kalkuliert werden. Im Vergleich zu der gemessenen Zellzahl in den unbestrahlten Kontrollen ergab sich für jeden Bestrahlungswert eine bestimmte, als direkte Strahlenwirkung zu wertende Differenz. Der Anteil trotz Bestrahlung überlebender und gegebenenfalls noch proliferationsfähiger Zellen entsprach dem Quotienten aus der Gesamtzellzahl je Bestrahlungswert und der Ge-

samtzellzahl in den korrespondierenden unbestrahlten Kontrollen.

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte softwaregestützt (GraphPad Prism® 4.03). Für das dosisabhängige Überleben wurde eine Exponentialfunktion der Form $y=S_0 * e^{(-a*x-b*x^2)}$ angenommen (mit der Anzahl überlebender Zellen y , der absoluten Zellanzahl S_0 zu Beginn des Experiments und der Bestrahlungsdosis x) (Hall, 1987).

3.13. Materialien

3.13.1. Chemikalien und Fertiglösungen

Chemikalie / Lösung	Herstellerfirma, Hauptsitz
Ammoniumhydrogencarbonat	Fluka, St. Gallen (CH)
BIBR 1532	Boehringer Ingelheim, Biberach
Colcemid (Demecolcine)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dextransulfat 500	Serva, Heidelberg
Diamidinophenylindoldihydrochlorid (DAPI)	MP Biomedicals, Illkirch (F)
Di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat	Merck, Darmstadt
EDTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure	J.T.Baker, Deventer (NL)
Ethanol	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	Biochrom, Berlin
Formamid	MP Biomedicals, Illkirch (F)
Giemsa-Farbstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T.Baker, Deventer (NL)
Natriumchlorid	J.T.Baker, Deventer (NL)
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
Nichtessentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
NP-40 (Nonidet P-40 Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Amresco, Solon (USA)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Propidiumjodid (PI)	MP Biomedicals, Illkirch (F)

RNAse (Ribonuclease A from Bovine Pancreas)	Sigma-Aldrich, Steinheim
RPMI-Medium+L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Triton X-100 (Octylphenolpolyethyleneglycolether)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypan-Blau-Lösung	Biochrom, Berlin
Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.13.2. Geräte, Computersoftware

Gerät / Software	Herstellerfirma, Hauptsitz
<i>Röntgenanlage</i>	
Isovolt 320	Rich. Seifert & Co, Ahrensburg
Dosimentor SN 4 (integrierender Dosimeter)	PTW, Freiburg
<i>Zentrifugen</i>	
Megafuge 1.0 R	Heraeus/Thermo, Waltham (USA)
Cytospin	Shandon Southern, Astmoore (GB)
<i>PH-Meter</i>	
Phi 300 pH-Meter	Beckman, Fullerton (USA)
<i>Durchflußzytometer</i>	
FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg
<i>Mikroskop</i>	
Axioplan 2 imaging mit CF 15/4 MCC	Carl Zeiss, Göttingen
<i>Software</i>	
GraphPad Prism 4.03	GraphPad Software, San Diego (USA)
Optimas 6.51	Media Cybernetics, Silver Spring (USA)
ModFit LT 3.0	Verity Software House, Topsham (USA)

3.13.3. Antikörper, Sonden-DNA

Antikörper / Sonden-DNA	Herstellerfirma, Hauptsitz
<i>γ-H2AX Foci</i>	
Anti-phospho-Histone H2AX (Ser 139) (200 μ g/ 200 μ l)	Upstate, Lake Placid (USA)
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes, Leiden (NL)
<i>FISH Chromosom 7</i>	
PAINT Total Chromosome 7 Probe	MP Biomedicals, Illkirch (F)
Anti-Fluorescein (made in goat)	Vector, Burlingame (USA)
Fluorescein Anti-goat IgG (made in rabbit)	Vector, Burlingame (USA)

3.13.4. Puffer- und Waschlösungen

Puffer- / Waschlösung	Zusammensetzung und Anwendungshinweise
Antikörperverdünnungspuffer <i>γ-H2AX Foci Versuch</i>	Es wird die Tween-20-BSA Lösung (s.u.) verwendet.
Antikörperverdünnungspuffer <i>FISH Chromosom 7 Versuch</i>	Zur Herstellung der 0,1 % Tween-20 / 1,0 % BSA / 2fach SSC Lösung werden in PBS gelöst (Gesamtvolumen 100 ml): 1,0 g BSA, 0,1 ml Tween-20, 10 ml SSC-Stammlösung (20fach). 500 μ l Aliquots des Puffers können über mehrere Monate bei -20°C gelagert werden.
Carnoy's Fixativ	Die Lösung besteht zu einem Volumenanteil aus Essigsäure und drei Volumenanteilen aus Methanol.
Colcemidlösung	1 mg Demecolcine wird in 5 ml PBS gelöst. Diese Arbeitslösung der Konzentration 0,2 mg Colcemid / ml PBS kann bei 4°C über mehrere Monate gelagert werden.

Erythrozytenlysepuffer	<p>Zur Herstellung einer 10fach Stammlösung werden in Aqua dest. (Endvolumen 1.000 ml) gelöst:</p> <p>82,91 g Ammoniumchlorid, 7,91 g Ammoniumhydrogenkarbonat, 0,37 g EDTA.</p> <p>Die Stammlösung kann bei 4°C über mehrere Monate gelagert werden. Unmittelbar vor Gebrauch wird eine 1:9 verdünnte Arbeitslösung mit Aqua dest. hergestellt.</p>
Formamid / 2fach SSC Lösung	<p>Zur Herstellung der 70 % Formamid / 2fach SSC Lösung werden 70 ml Formamid in 30 ml 2fach SSC gelöst. Die Herstellung der 50 % Formamid / 2fach SSC Lösung erfolgt analog mit 50 ml Formamid in 50 ml 2fach SSC.</p> <p>Unmittelbar vor Gebrauch muss die fertige Lösung auf einen pH-Wert von 7,0 (\pm 0,1) eingestellt werden!</p>
NP-40 / 2fach SSC Lösung	<p>Zur Herstellung der 0,5% NP-40 / 2fach SSC Lösung werden 0,5 ml NP-40 in 99,5 ml 2fach SSC gelöst.</p> <p>Unmittelbar vor Gebrauch muss die fertige Lösung auf einen pH-Wert von 7,0 (\pm 0,1) eingestellt werden!</p>
PBS - Phosphate Buffered Saline	<p>In 1.000 ml Aqua dest. werden gelöst:</p> <p>8,0 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1,78 g Di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat.</p>
Permeabilisierungslösung	<p>Zur Herstellung der 0,2 % Triton X-100 / 1,0 % BSA Lösung werden in PBS gelöst (Gesamtvolumen 300 ml):</p> <p>3,0 g BSA, 0,6 ml Triton X-100.</p>
RNase-Propidiumjodid-PBS Lösung	<p>Propidiumjodid-Stammlösung (Lagerung bei 4°C):</p> <p>11,1 µg Propidiumjodid / ml PBS Lösung.</p> <p>RNase-PBS-Lösung (Lagerung bei -20°C):</p> <p>10 mg RNase / ml PBS Lösung (50 µl Aliquots).</p> <p>Unmittelbar vor Gebrauch werden 450 µl der Propidiumjodid-Stammlösung mit 50 µl der RNase-PBS-Lösung im Dunkeln gemischt, sodass die Endkonzentration 10 µg PI / 1 mg RNase / ml PBS beträgt.</p>

Sonden-DNA Verdünnungspuffer	Zur Herstellung der 40 % Formamid / 10 % Dextran / 1fach SSC Lösung werden zunächst 10 g Dextransulfat sorgfältig in Aqua dest. (Gesamtvolumen 55 ml) gelöst. Anschließend werden die 55 ml Dextransulfatlösung mit 40 ml Formamid und 5 ml SSC-Stammlösung (20fach) vermischt. Aliquots des nun gebrauchsfertigen Puffers können bei -20°C für mehrere Monate gelagert werden.
SSC - Saline Sodium Citrate	Zur Herstellung der 20fach Stammlösung werden in Aqua dest. gelöst (Gesamtvolumen 1.000 ml): 175,3 g Natriumchlorid, 88,2 g Natriumzitat. Die Stammlösung kann über mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden. Als Arbeitslösung dient stets eine 1:9 Verdünnung in Aqua dest. (= 2fach SSC Lösung).
Tween-20-BSA Lösung	Zur Herstellung der 0,5 % Tween-20 / 1,0 % BSA Lösung werden in PBS gelöst (Gesamtvolumen 900 ml): 9,0 g BSA, 4,5 ml Tween-20.
Tween-20-PBS Lösung	Zur Herstellung der 0,5 % Tween-20-PBS Lösung werden 6 ml Tween-20 in PBS gelöst (Gesamtvolumen 1.200 ml).

4. ERGEBNISSE

Im Mausmodell führte das Knock-out des Gens für die Telomerase zu einer von Mausgeneration zu Mausgeneration abnehmenden Telomerlänge. Für die telomerasedefizienten Mäuse mit stark verkürzten Telomeren konnte eine erhöhte Strahlensensibilität nachgewiesen werden (siehe 2.4.1). Es stellte sich daher die Frage, ob eine beispielsweise pharmakologisch herbeigeführte Verkürzung der Telomere in menschlichen Tumorzellen einen ähnlichen Effekt erzielen würde. Im klinischen Alltag wäre dann bei der Behandlung von Malignomen eine Kombination von Strahlentherapie mit einem Telomeraseinhibitor denkbar.

Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen wurde zunächst in der humanen chronisch myeloischen Leukämiezelllinie K-562 durch Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 eine Reduktion der durchschnittlichen Telomerlänge erzielt. Die vorliegende Arbeit präsentiert nun die Untersuchungen zur Strahlensensibilität in diesem Zellmodell. Dabei wurden die Auswirkungen der Telomerverkürzung auf das Wachstumsverhalten, die Zellzyklusverteilung, den induzierten Zelltod nach Bestrahlung, die qualitative und quantitative Reparaturleistungsfähigkeit für strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche und auf das zelluläre Überleben nach Bestrahlung untersucht.

4.1. Wachstumskinetik

Die Langzeitbehandlung verschiedener Tumorzelllinien mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 führt als Ausdruck der resultierenden Telomerverkürzung zu einer reversiblen, ausgeprägten Proliferationshemmung und zu Seneszenz (Damm *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Strahlensensibilität von Subpopulationen der Tumorzelllinie K-562 untersucht. Dabei wurden mit BIBR 1532 behandelte Zelllinien mit verkürzten Telomeren (Zelllinien A und B) unbehandelten Kontrollzelllinien (Zelllinien C und D) gegenübergestellt (siehe 3.1.3.). Zur Darstellung der Auswirkung der Telomerverkürzung und der Behandlung mit BIBR 1532 auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien wurde deren Wachstum unter gleichen Bedingungen über einen Zeitraum von neun Tagen untersucht. Nach 2, 4, 7 und 9 Tagen erfolgte jeweils die Bestimmung der Zellzahl im Trypan-Blau-Assay. Abb. 6 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche für die Zelllinien A, C und D bzw. zweier unabhängiger Versuche für die Zelllinie B. Die Berechnung der resultierenden Wachstumskurven erfolgte unter der Annahme einer über die Zeit exponentiellen Zunahme der Zellzahl.

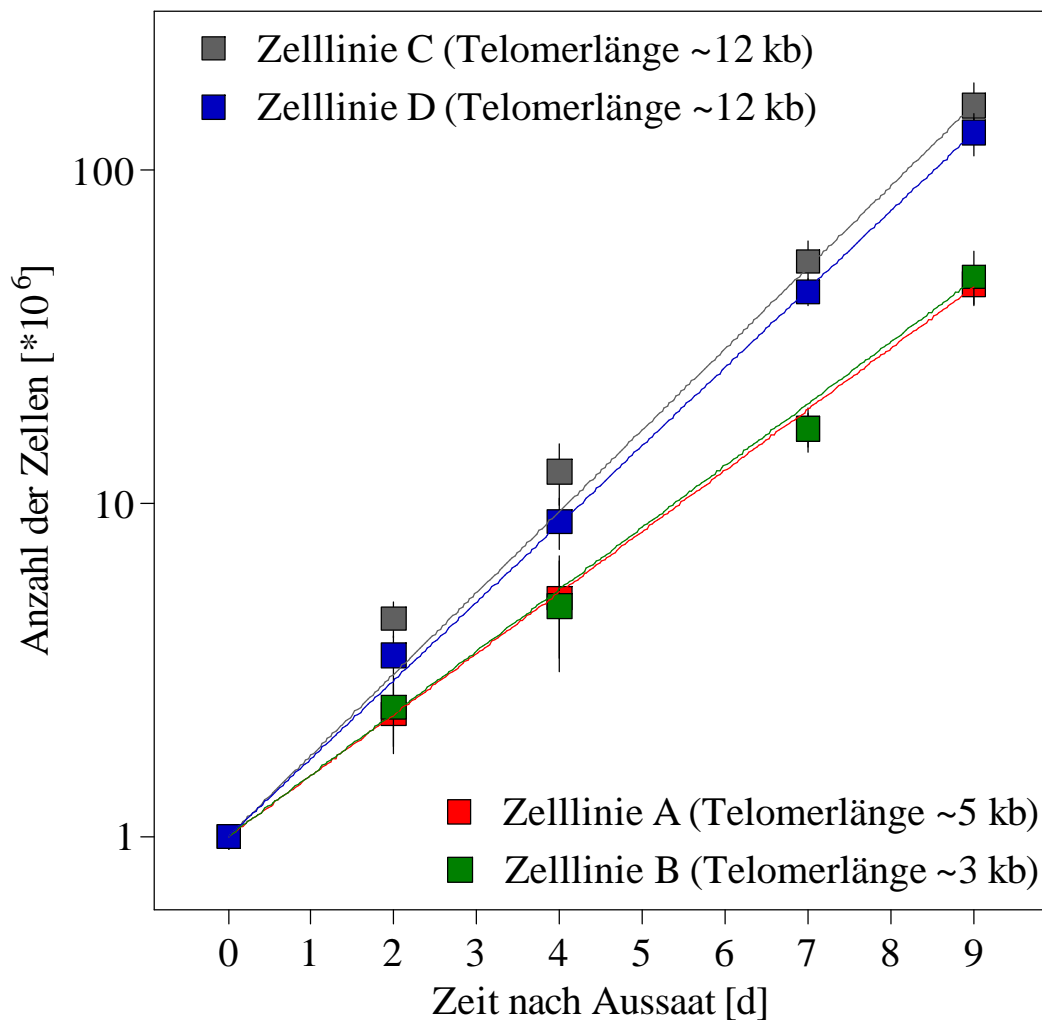


Abb. 6: Wachstumskurven der BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren und der unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge. Die Zellzahl ist logarithmisch gegen die Zeit in Tagen aufgetragen. Fehlerbalken entsprechen den Abweichungen vom Mittelwert.

Im Vergleich ergab sich ein signifikant reduziertes Wachstum der Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren gegenüber den Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge (Zelllinie A vs. D, B vs. D, A vs. C, B vs. C: $p < 0,0001$). Dagegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Zelllinien mit verkürzten Telomeren untereinander (Zelllinie A vs. B: $p = 0,5590$) bzw. der Kontrollzelllinien untereinander (Zelllinie C vs. D: $p = 0,0331$).

Um eine direkt zytotoxische Wirkung der Substanz BIBR 1532 als Ursache der Wachstumsverzögerung ausschließen zu können, wurden für die Zelllinien A und B eine Versuchsreihe zum

Wachstum in BIBR-freiem Medium versus Wachstum in Medium mit Zusatz von BIBR 1532 in 10 μM Konzentration durchgeführt. Es ergab sich weder für die Zelllinie A ($p=0,0461$) noch für die Zelllinie B ($p=0,2983$) ein signifikanter Unterschied im Wachstum, sodass eine zytotoxische oder unmittelbar wachstumshemmende Wirkung durch die Substanz BIBR 1532 selbst in der angegebenen Konzentration unwahrscheinlich ist (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ließ sich eine signifikante, BIBR-unabhängige Wachstumsverzögerung in den BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge feststellen.

4.2. Zellzyklusverteilung und DNA-Gehalt

Zum Nachweis der Auswirkungen der Telomerverkürzung bezüglich der Zellzyklusverteilung der kultivierten Zellen wurden durchflusszytometrische Untersuchungen an Zellen der Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren sowie der Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge durchgeführt. Zur Messung wurden stets Zellen im exponentiellen Wachstum 48 Stunden nach der letzten Passagierung verwendet. Zum Ausschluss von relevantem Zugewinn oder Verlust an Chromosomenmaterial über den langen Kultivierungszeitraum hinweg (siehe 3.1.3.) wurde bei jeder Messung ein Leukozytenstandard mitgeführt und der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt (siehe Abb. 7). Für die Zelllinien A und D wurden vier und für die Zelllinien B und C drei unabhängige Experimente durchgeführt.

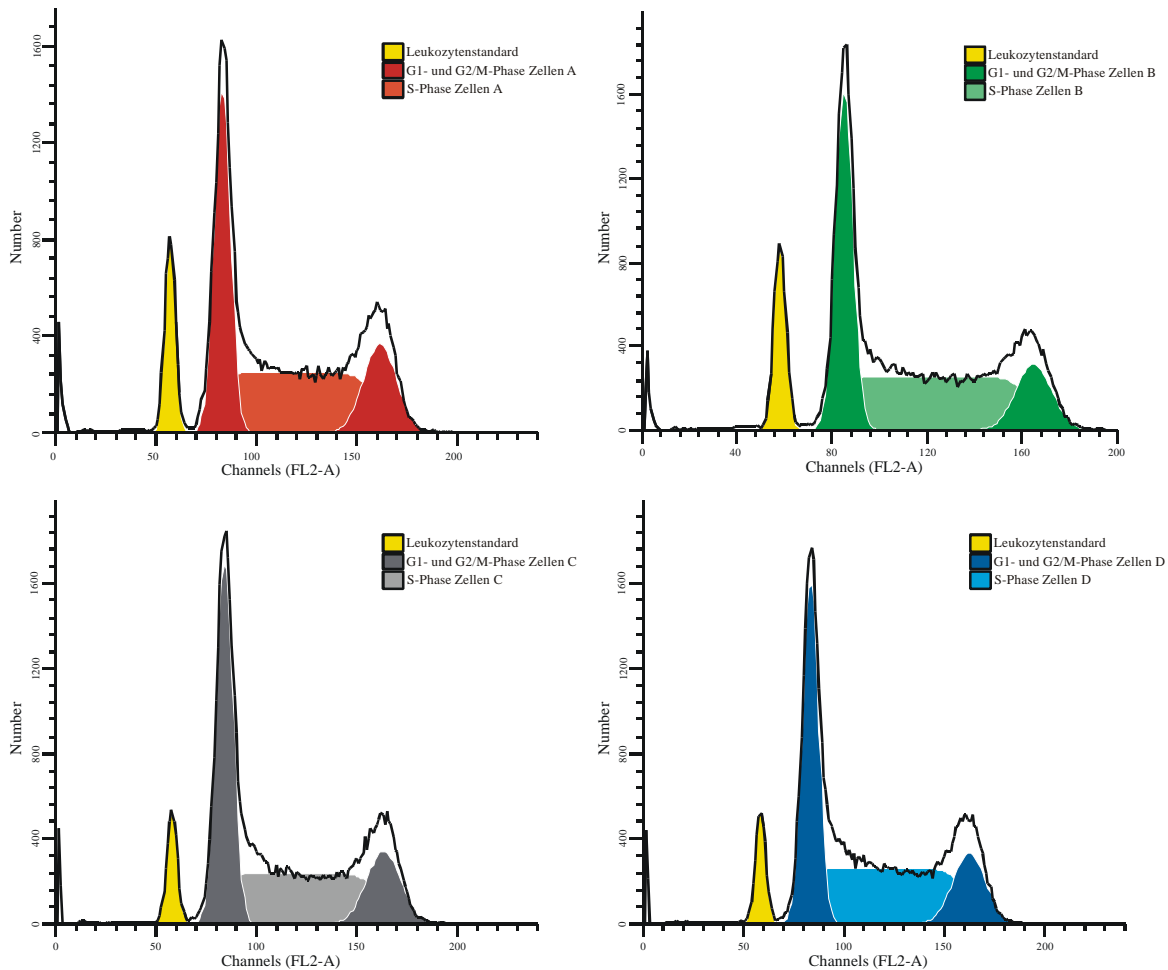


Abb. 7: Zellzyklusverteilung der exponentiell wachsenden Zelllinien A (links oben), B (rechts oben), C (links unten) und D (rechts unten) mittels FACScan.

Die Zellen wurden ethanolfixiert und propidiumjodidgefärbt. Es wurde ein Leukozytenstandard mitgeführt. Die Messereignishäufigkeit ist gegen die Emission im Spektrum FL2-A aufgetragen. Die farbigen Integrale zeigen die anteilmäßige Zuordnung der Messereignisse zu den jeweiligen Phasen des Zellzyklus bzw. des Leukozytenstandards (Auswertung mit der Software ModFit 3.0).

In Tabelle 2 sind die Mittelwerte der Messungen zur Zellzyklusanalyse sowie der zugehörige jeweilige Standardfehler aufgeführt. Abbildung 8 (A) stellt dieselben Ergebnisse graphisch dar. In der G1-Phase befinden sich im Mittel 29 % bis 34 % der Zellen ohne signifikanten Unterschied zwischen den Zelllinien ($p=0,2124$). In der S-Phase befinden sich 49 % bis 56% der Zellen ohne signifikanten Unterschied zwischen den Zelllinien ($p=0,1576$). Einzig für den Anteil der Zellen, die sich in der G2/M-Phase des Zellzyklus befinden, ergab sich mit Mittelwerten von 12 % bis 17 % ein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien ($p=0,0021$).

Der DNA-Gehalt der Zellen, ausgedrückt als Vielfaches von n (siehe 3.6.2.), beträgt im Mittel $2,90n$ für Zelllinie A, $2,93n$ für Zelllinie B, $2,89n$ für Zelllinie C und $2,86n$ für Zelllinie D

(siehe Abb. 8 (B)). Zwischen den einzelnen Zelllinien ergab sich damit kein signifikanter Unterschied im DNA-Gehalt ($p=0,5928$; statistischer Test: 1way ANOVA).

Tab. 2: Prozentuale Verteilung exponentiell wachsender Zellen im Zellzyklus

Zelllinie	Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase: (mit Standardfehler vom Mittelwert)					
	G1-Phase		S-Phase		G2/M-Phase	
A	29 %	$\pm 2,19$	54 %	$\pm 3,27$	17 %	$\pm 1,46$
B	32 %	$\pm 4,03$	56 %	$\pm 4,43$	12 %	$\pm 1,21$
C	34 %	$\pm 4,11$	49 %	$\pm 3,77$	17 %	$\pm 0,56$
D	30 %	$\pm 2,92$	55 %	$\pm 3,66$	14 %	$\pm 1,26$
1way ANOVA ^(a)	p=0,2124		p=0,1576		p=0,0021	

^(a) statistischer Test auf signifikante Verteilungsunterschiede

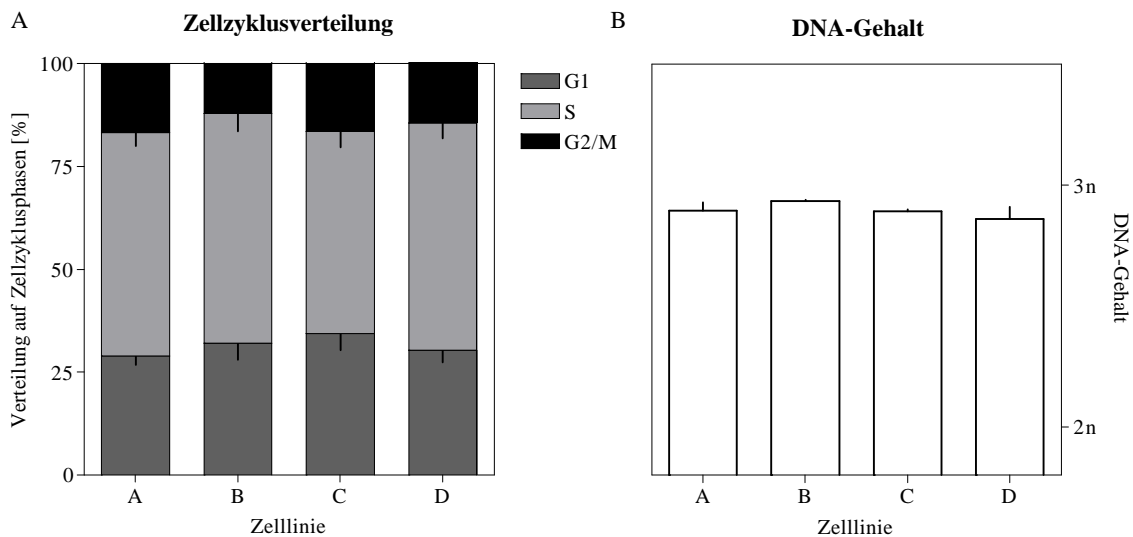


Abb. 8: Verteilung der Zelllinien A, B, C und D auf die Phasen des Zellzyklus.

(A) Zellzyklusverteilung, (B) DNA-Gehalt der Zellen. Dargestellt sind Daten aus 3 unabhängigen Experimenten mit den Fehlerbalken der Abweichungen vom Mittelwert.

Zusammenfassend lässt sich weder für die Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus noch für den durchschnittlichen DNA-Gehalt der Zellen eine biologisch relevante Änderung in den BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren im Vergleich zu den un-behandelten Kontrollzelllinien C und D mit normaler Telomerlänge feststellen.

4.3. Induzierter Zelltod nach Röntgenbestrahlung

Röntgenbestrahlung kann zur irreversiblen Schädigung von Zellen und damit zeitverzögert zum Absterben der Zellen führen. Die spezifischen morphologischen Veränderungen, die mit einer solchen Schädigung verbunden sind, können nach entsprechender Vorbehandlung der Zellen einer mikroskopischen Beobachtung zugänglich gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die das Absterben der Zellen begleitende Ausbildung von multiplen Mikronuklei und von nukleärer Fragmentation durch DNA-Färbung mit DAPI für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht (siehe Abb. 9).

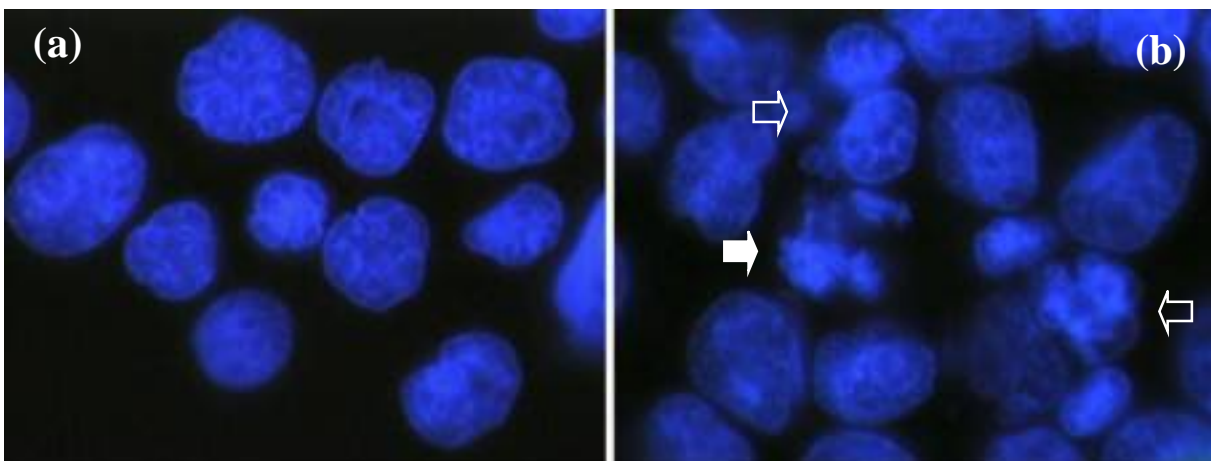


Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (1.000fache Vergrößerung) von DAPI-gefärbten Zellen der Zelllinie A.

In der unbestrahlten Kontrolle (a) sind ungeschädigte Zellkerne sichtbar. 48 Stunden nach Bestrahlung (b) zeigen sich irreversibel geschädigte Zellen mit multiplen Mikronuklei (offene Pfeile) oder Kernfragmentation (solider Pfeil).

Untersucht wurden die BIBR-behandelte Zelllinie A mit verkürzten Telomeren und die un-behandelte Kontrollzelllinie D mit unbeeinflusster Telomerlänge jeweils 48 Stunden nach Bestrahlung mit 3 Gy oder 6 Gy sowie entsprechende unbestrahlte Kontrollen. Der prozentuale Anteil an Zellen, die die o.g. morphologischen Veränderungen zeigten, wurde bestimmt. In Abb. 10 sind die gemittelten Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten graphisch dargestellt.

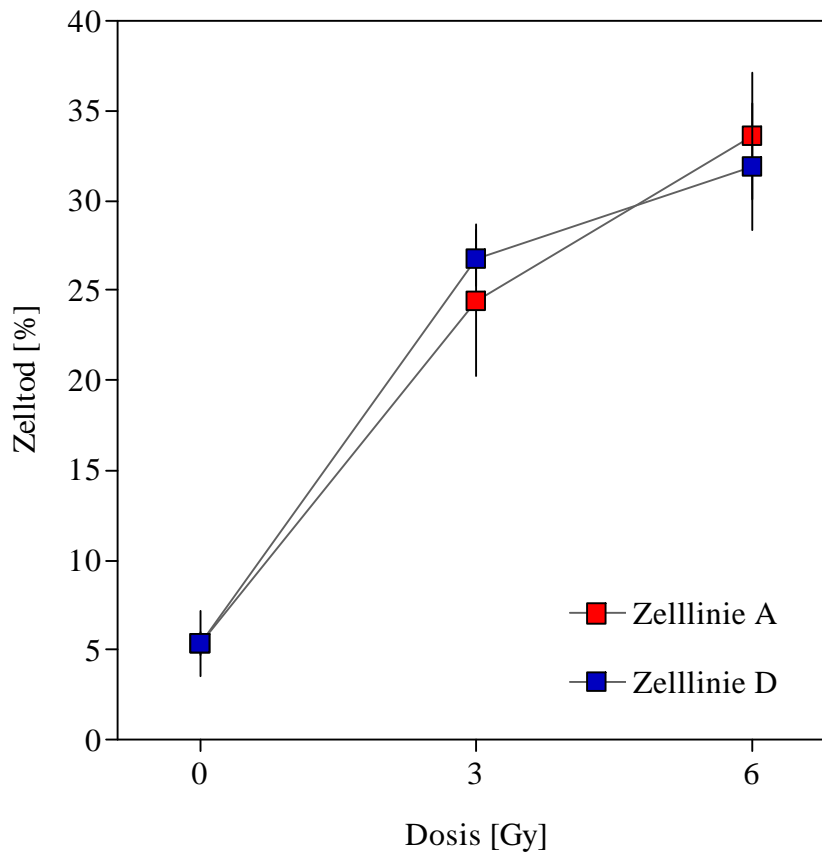


Abb. 10: Induzierter Zelltod nach Bestrahlung.

Prozentualer Anteil an irreversibel geschädigten Zellen 48 h nach Röntgenbestrahlung mit 3 Gy oder 6 Gy sowie in unbestrahlten Kontrollen jeweils in der BIBR-behandelten Zelllinie A mit verkürzten Telomeren und der unbehandelten Kontrollzelllinie D mit unbeeinflusster Telomerlänge. Fehlerbalken entsprechen Abweichungen vom Mittelwert.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Anteil an irreversibel geschädigten Zellen, weder für eine Bestrahlung mit 3 Gy mit 24,4% im Vergleich zu 26,7% ($p=0,6302$; α -Wert: 0,01), noch mit 6 Gy mit 33,6% im Vergleich zu 31,9% ($p=0,7488$; α -Wert: 0,01), zwischen der BIBR-behandelten Zelllinie A mit verkürzten Telomeren und der unbehandelten Kontrollzelllinie D 48 Stunden nach Bestrahlung.

4.4. γ -H2AX Foci-Formation nach Röntgenbestrahlung

Röntgenbestrahlung von Zellen verursacht DNA-Doppelstrangbrüche, deren Anzahl mit der applizierten Dosis korreliert. Innerhalb des die DNA-Doppelstrangbrüche umgebenden Chromatins kommt es neben vielen anderen spezifischen Veränderungen zur Phosphorylierung des Histons H2AX. Die phosphorylierte Form dieses Histons (= γ -H2AX) wird beibehalten, solange

der Doppelstrangbruch nicht repariert wurde. Durch direkte Fluoreszenzmarkierung der phosphorylierten H2AX-Proteinkomplexe lassen sich mikroskopisch intranukleäre Foci nachweisen, die den unreparierten DNA-Doppelstrangbrüchen entsprechen (siehe Abb. 11). Die Anzahl an sogenannten γ -H2AX Foci pro Zelle nach Bestrahlung und einer anschließend gewährten Reparaturzeit korreliert direkt mit der quantitativen Reparaturleistung der untersuchten Zelllinie (siehe 3.8.1.).

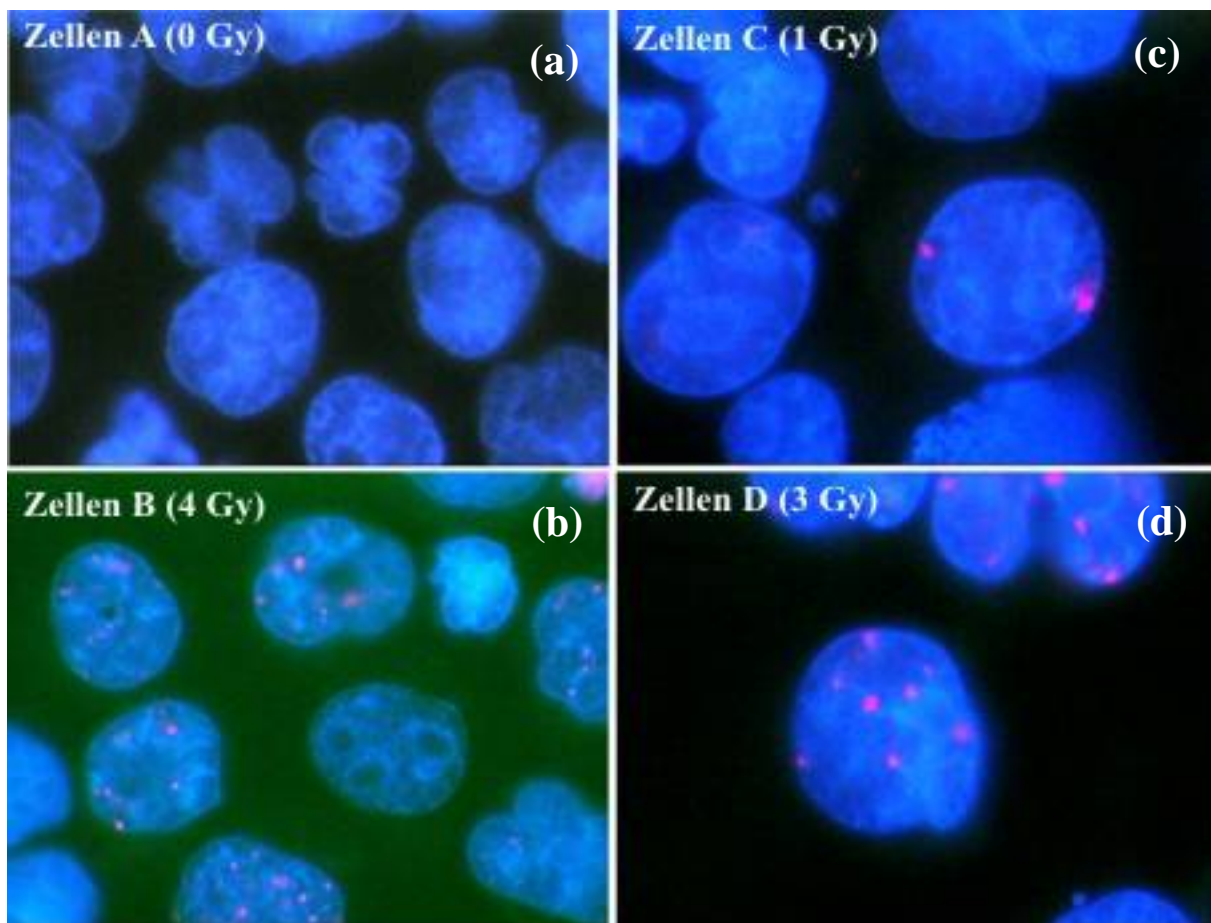


Abb. 11: Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels γ -H2AX Fociformation in unbestrahlten (a) und bestrahlten (b,c,d) Zellen.

Das γ -H2AX-Protein wurde mittels fluoreszierendem Antikörper (Alexa Fluor 594) rot, die DNA mit DAPI blau gegengefärbt. Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Bilder bei 1.000facher Vergrößerung. Beispielhaft ausgewählt sind unbestrahlte Zellen der Zelllinie A (a) ohne sichtbare Foci im Vergleich zu bestrahlten Zellen der Zelllinie B (b), der Zelllinie C (c) und der Zelllinie D (d) mit deutlich sichtbaren intranukleären Foci.

In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Reparaturleistung der BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren mit denen der unbehandelten Kontrollzelllinien C

und D mit unbeeinflusster Telomerlänge verglichen. Zu diesem Zweck wurde die mittlere Anzahl an γ -H2AX Foci pro Zelle 24 Stunden nach Röntgenbestrahlung mit 0-4 Gy fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Für die Zelllinien A, C und D wurden drei und für die Zelllinie B zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

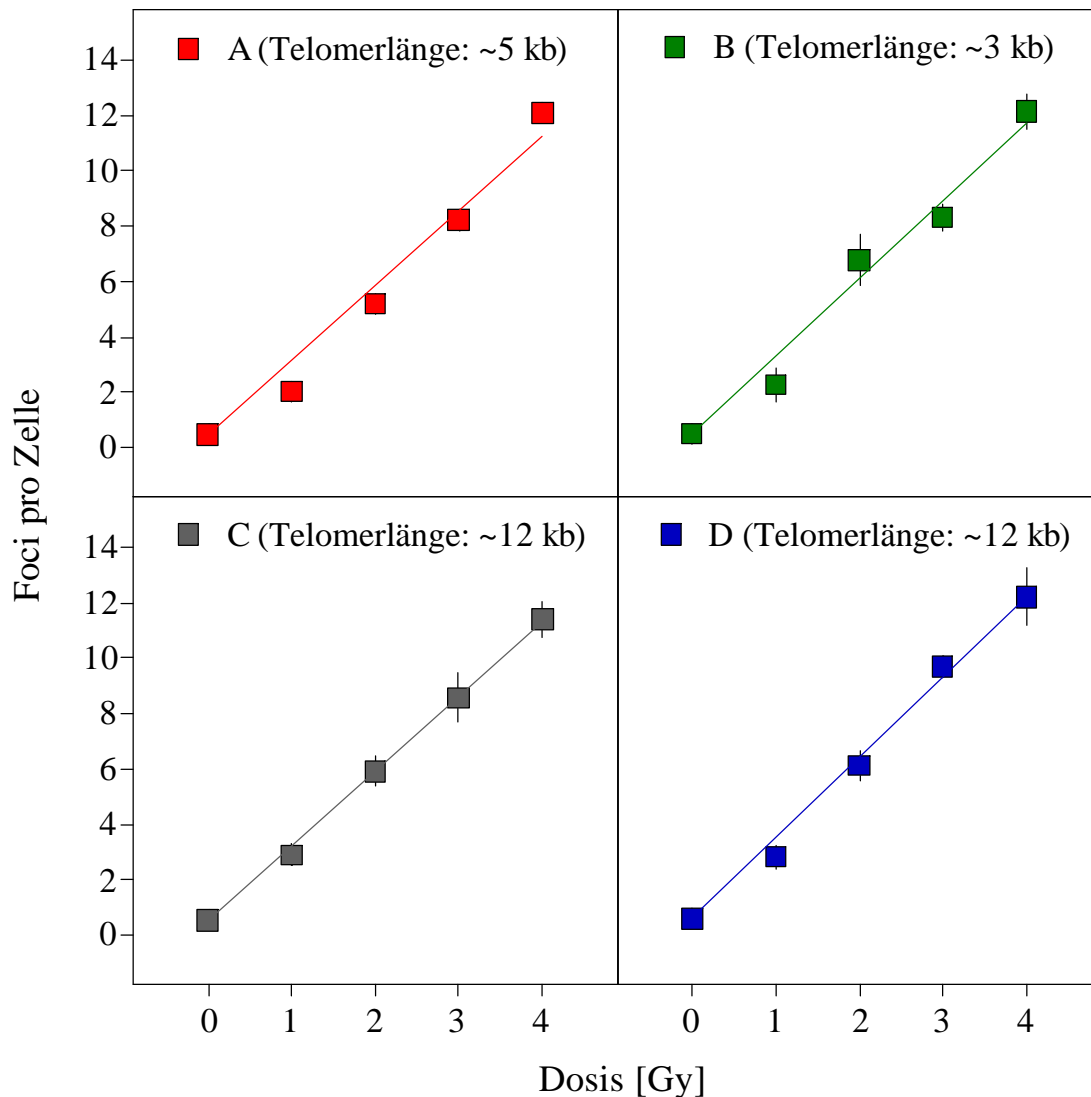


Abb. 12: Dosisabhängige Anzahl der γ -H2AX Foci pro Zelle nach Bestrahlung.

Darstellung der dosisabhängigen γ -H2AX Fociformation in den BIBC-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren sowie in den unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge jeweils 24 h nach Bestrahlung mit 0-4 Gy. Die mittlere Anzahl an γ -H2AX Foci pro Zelle ist gegen die Bestrahlungsdosis aufgetragen.

In den unbestrahlten Kontrollen ließ sich für die einzelnen Zelllinien folgende Anzahl an γ -H2AX Foci pro Zelle nachweisen: 0,46 für die Zelllinie A, 0,50 für die Zelllinie B, 0,53 für die

Zelllinie C und 0,60 für die Zelllinie D. Es zeigte sich für alle Zelllinien eine dosisabhängige lineare Zunahme der mittleren Anzahl an γ -H2AX Foci pro Zelle 24 Stunden nach Bestrahlung. Im Mittel waren dies 2,43 γ -H2AX Foci pro Zelle pro Gy für die Zelllinie A, 2,93 für die Zelllinie B, 2,63 für die Zelllinie C und 2,58 für die Zelllinie D. Es ergab sich damit auf Basis der berechneten Regressionsgeraden kein signifikanter Unterschied ($p=0,7581$; α -Wert: 0,01) im Vergleich der Zelllinien untereinander (Abb. 13).

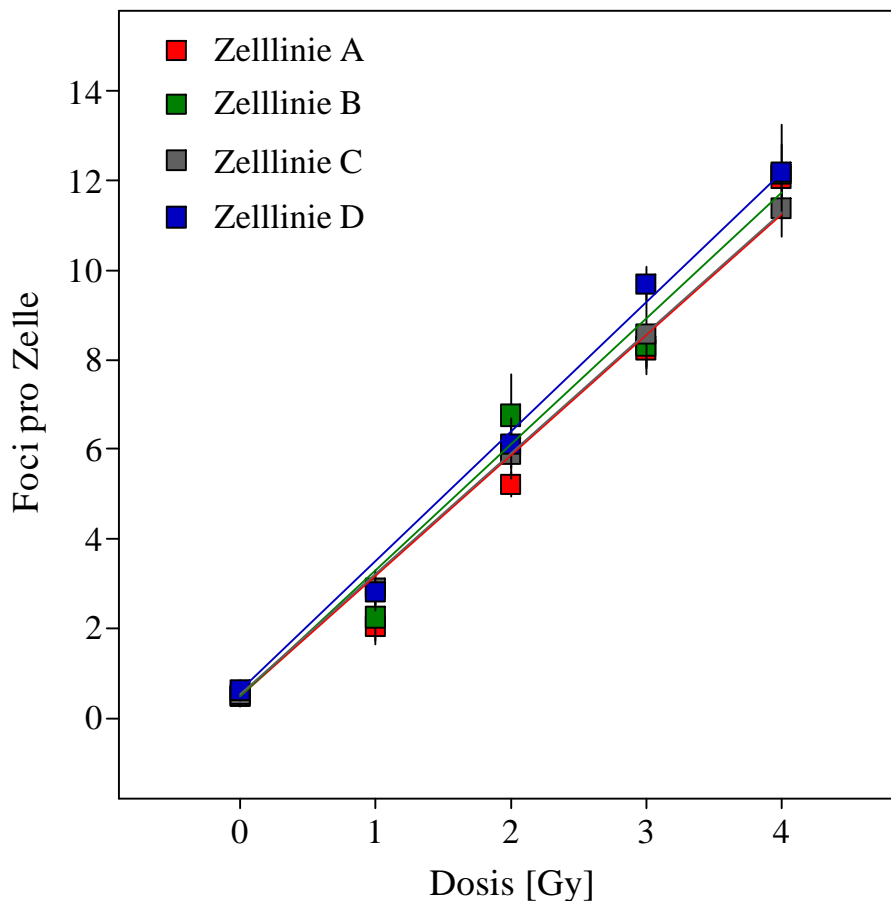


Abb. 13: Vergleich der dosisabhängigen γ -H2AX Foci pro Zelle nach Bestrahlung.

Dosisabhängige Zunahme der γ -H2AX Foci pro Zelle 24 h nach Bestrahlung in den BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren sowie den unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge. Fehlerbalken entsprechen Abweichungen vom Mittelwert.

Zusammenfassend ließ sich keine Änderung der quantitativen Reparaturleistung für strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche in den BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollzelllinien C und D nachweisen. Es

fand sich zudem kein Unterschied in der Anzahl an γ -H2AX Foci in den unbestrahlten Kontrollen der Zelllinien mit verkürzten Telomeren im Vergleich zu den Zelllinien mit unbeeinflusster Telomerlänge.

4.5. Instabile Chromosomentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung

Nicht reparierte, strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche führen in Zellen zu Chromosomenaberrationen. Befinden sich die betroffenen Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G1- bzw. G0-Phase des Zellzyklus, entstehen sogenannte instabile Chromosomentypaberrationen (siehe 3.9.3.). Dies sind anteilmäßig hauptsächlich die zusätzlichen azentrischen Fragmente und die dizentrischen Chromosomen; zusammengenommen bilden sie die Gruppe der sogenannten letalen Chromosomenaberrationen. Die Anzahl der nach Bestrahlung auftretenden letalen Chromosomenaberrationen gilt als Maß für die Strahlenempfindlichkeit von Zellen.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss einer Telomerverkürzung auf die Strahlensensibilität von Tumorzellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen nach Röntgenbestrahlung mit 0-6 Gy in den mit BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren verglichen mit denen in den unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge.

Zellen aus den Zelllinien A, B, C und D wurden mit Röntgendosen von 0-6 Gy bestrahlt und anschließend vor der weiteren Prozessierung (siehe 3.9.2.) für 48 Stunden inkubiert. In den letzten 16 Stunden wurde den Zellsuspensionskulturen Colcemid, ein Analogon des Spindelfasergiftes Colchicin, zugesetzt, sodass sich die proliferierenden Zellen in der Metaphase der Mitose akkumulierten (siehe 3.9.1.). Auf diese Weise gingen hauptsächlich diejenigen Zellen in die Untersuchung ein, die in der G1-Phase des Zellzyklus bestrahlt worden waren und gerade ihre erste mitotische Teilung durchliefen. Die Bestimmung der instabilen Chromosomentypaberrationen erfolgte dann lichtmikroskopisch an Giemsa-gefärbten Metaphasen-Präparaten der einzelnen Zelllinien. Abbildung 14 zeigt je ein Beispiel von Metaphasen-Präparaten von unbestrahlten und bestrahlten Zellen der Zelllinien A und D. Im Karyogramm von unbestrahlten Zellen der Zelllinie A (Bild oben links) sind 65 Chromosomen sehr unterschiedlicher Größe sichtbar, entsprechend einem hypotriploiden Chromosomensatz der Tumorzellen (siehe 3.1.1.). Im Karyogramm nach Röntgenbestrahlung mit 2 Gy (Bild oben rechts) mit insgesamt 67 Chromosomenfragmenten kommt ein dizentrisches Chromosom (solider Pfeil im Bild) sowie mindestens ein zusätzliches azentrisches Fragment (offener Pfeil im Bild) zur Darstellung. In analoger Weise sind die Dar-

stellungen der Karyogramme für die Zelllinie D (Bilder unten links und rechts) zu verstehen. Auf diese Weise wurden für jede Zelllinie und jeden Bestrahlungsdosis Metaphasen-Präparate ausgewertet.

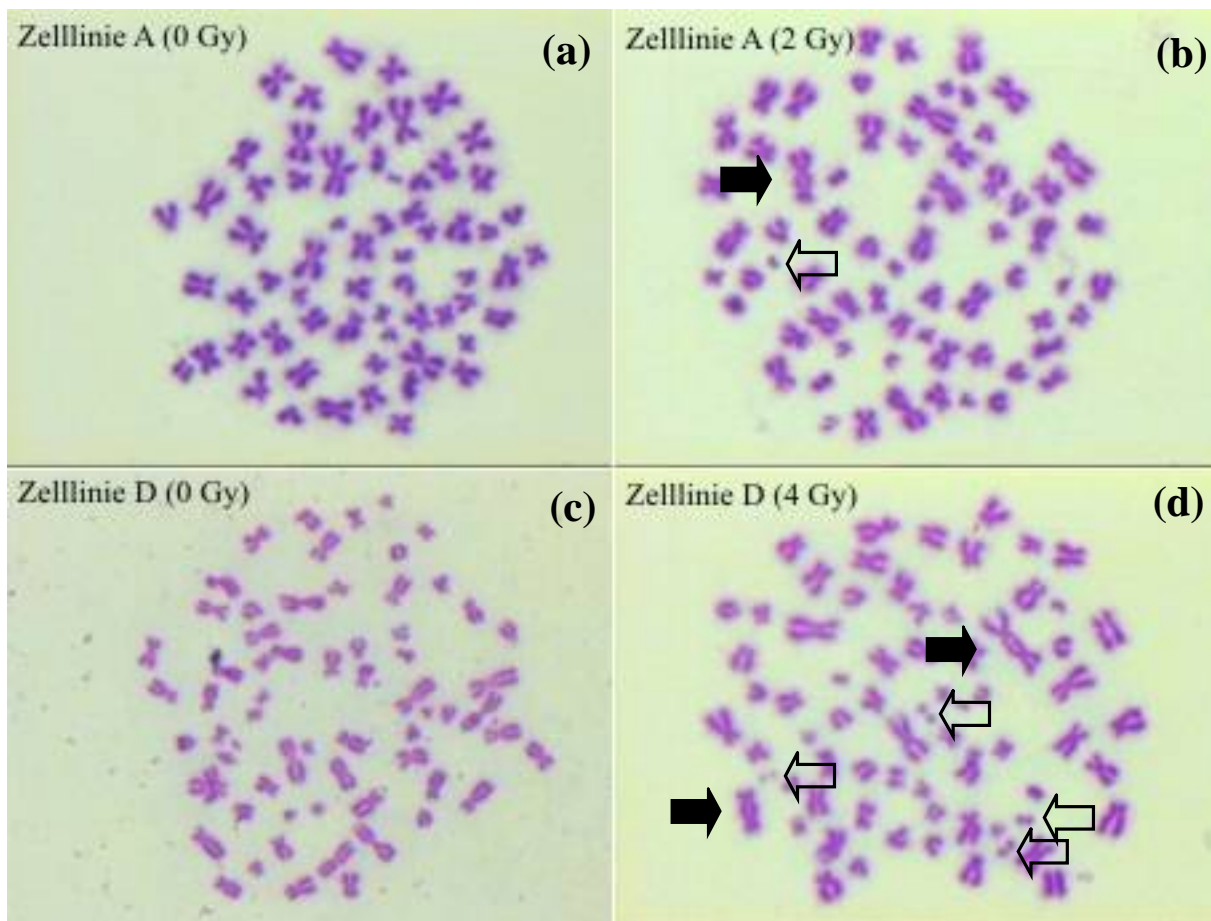


Abb. 14: Instabile Chromosomentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung.

Strahleninduzierte Chromosomentypaberrationen der G1-Phase der Zelllinie A mit verkürzten Telomeren (a,b) und der Zelllinie D mit unbeeinflusster Telomerlänge (c,d). Nach Röntgenbestrahlung (b,d) zeigen sich instabile Chromosomentypaberrationen, wie azentrische Fragmente (offene Pfeile) und dizentrische Chromosomen (solide Pfeile).

Für die Zelllinien A, B und D wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, für die Zelllinie C zwei unabhängige Experimente. Pro Experiment gingen zirka 50 Metaphasen in die Auswertung ein. Gezählt wurden alle Chromosomenfragmente (CF), also die Summe aller vollständigen Chromosomen und Fragmente, sowie die dizentrischen Chromosomen. Hieraus ergaben sich die zusätzlichen azentrischen Fragmente pro Metaphase und die letalen Chromosomenaberrationen pro Metaphase (siehe 3.9.3.). In den Tabellen 3-6 sind die erhobenen Daten separat für jede der untersuchten Zelllinien aufgeführt.

Tab. 3: Instabile Chromosomentypaberrationen für die Zelllinie A mit verkürzten Telomeren.

Zelllinie A (Telomerlänge: ~5 kb)

Dosis [Gy]	Anzahl der Metaphasen	Verteilungsbreite der CF ^a	Mittlere Anzahl an CF ^a ± SF ^b	Zusätzliche azentrische Fragmente	Dizentrische Chromosomen	Letale Aberrationen
			pro Metaphase			
0	150	63 bis 69	65,03 ± 0,108	0	0,007	0,007
1	143	63 bis 69	65,71 ± 0,124	0,68	0,067	0,747
2	147	63 bis 71	66,05 ± 0,159	1,02	0,027	1,047
3	140	63 bis 73	66,57 ± 0,196	1,54	0,107	1,647
4	145	64 bis 75	67,22 ± 0,209	2,19	0,060	2,250
5	144	63 bis 76	68,13 ± 0,267	3,10	0,127	3,227
6	143	63 bis 78	69,08 ± 0,301	4,05	0,147	4,197

^(a) Chromosomenfragmente, CF^(b) Standardfehler, SF**Tab. 4: Instabile Chromosomentypaberrationen für die Zelllinie B mit verkürzten Telomeren.**

Zelllinie B (Telomerlänge: ~3 kb)

Dosis [Gy]	Anzahl der Metaphasen	Verteilungsbreite der CF ^a	Mittlere Anzahl an CF ^a ± SF ^b	Zusätzliche azentrische Fragmente	Dizentrische Chromosomen	Letale Aberrationen
			pro Metaphase			
0	150	64 bis 70	65,95 ± 0,083	0	0,007	0,007
1	150	64 bis 72	66,75 ± 0,128	0,80	0,020	0,820
2	148	64 bis 77	67,72 ± 0,212	1,77	0,047	1,817
3	138	64 bis 75	68,05 ± 0,223	2,10	0,060	2,160
4	146	64 bis 79	68,88 ± 0,278	2,93	0,100	3,030
5	147	64 bis 81	69,57 ± 0,332	3,62	0,140	3,760
6	144	64 bis 83	70,56 ± 0,350	4,61	0,140	4,750

^(a) Chromosomenfragmente, CF^(b) Standardfehler, SF

Tab. 5: Instabile Chromosomentypaberrationen für die Zelllinie C mit unbeeinflusster Telomerlänge.

Zelllinie C (Telomerlänge: ~12 kb)

Dosis [Gy]	Anzahl der Metaphasen	Verteilungsbreite der CF ^a	Mittlere Anzahl an CF ^a ± SF ^b	Zusätzliche azentrische Fragmente	Dizentrische Chromosomen	Letale Aberrationen
			pro Metaphase			
0	100	64 bis 68	66,48 ± 0,093	0	0,020	0,020
1	99	64 bis 73	66,91 ± 0,154	0,43	0,040	0,470
2	91	64 bis 73	67,74 ± 0,218	1,26	0,060	1,320
3	97	64 bis 74	68,20 ± 0,221	1,72	0,080	1,800
4	97	64 bis 78	69,07 ± 0,307	2,59	0,120	2,710
5	89	64 bis 80	69,84 ± 0,355	3,36	0,140	3,500
6	83	65 bis 80	71,28 ± 0,411	4,80	0,180	4,980

^(a) Chromosomenfragmente, CF

^(b) Standardfehler, SF

Tab. 6: Instabile Chromosomentypaberrationen für die Zelllinie D mit unbeeinflusster Telomerlänge.

Zelllinie D (Telomerlänge: ~12 kb)

Dosis [Gy]	Anzahl der Metaphasen	Verteilungsbreite der CF ^a	Mittlere Anzahl an CF ^a ± SF ^b	Zusätzliche azentrische Fragmente	Dizentrische Chromosomen	Letale Aberrationen
			pro Metaphase			
0	149	64 bis 68	66,53 ± 0,065	0	0,020	0,020
1	146	64 bis 72	67,21 ± 0,126	0,68	0,033	0,713
2	150	64 bis 76	68,15 ± 0,205	1,62	0,040	1,660
3	135	64 bis 74	68,32 ± 0,180	1,79	0,113	1,903
4	142	64 bis 77	69,44 ± 0,251	2,91	0,107	3,017
5	138	64 bis 77	69,43 ± 0,257	2,90	0,147	3,047
6	143	64 bis 82	70,81 ± 0,371	4,28	0,153	4,433

^(a) Chromosomenfragmente, CF

^(b) Standardfehler, SF

Für jede Bestrahlungsdosis ergab sich eine spezifische Verteilungsbreite der Anzahl der Chromosomenfragmente mit einem entsprechenden Mittelwert (siehe Spalten 3+4 in Tabellen 3-6). Im Idealfall, d.h. nach Auswertung einer sehr großen Anzahl an Metaphasen, sollte die Häufigkeitsverteilung der Chromosomenfragmente einer Gauß'schen Normalverteilung (Borgmann, 1999) entsprechen. In der Abbildung 15 ist beispielhaft für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die Häufigkeitsverteilung der Chromosomenfragmente pro Bestrahlungsdosis für die mit BIBR-behandelte Zelllinie A mit verkürzten Telomeren für eine Bestrahlungsdosis von 0-5 Gy graphisch dargestellt. Es zeigt sich eine einer Normalverteilung nur angenäherte Verteilung der Chromosomenfragmente, die umso breiter ist, je höher die Bestrahlungsdosis war: mit 63-70 Chromosomenfragmenten bei einer Dosis von 0 und 1 Gy, 63-72 bei 2 Gy, 63-74 bei 3 Gy, 65-76 bei 4 Gy und 63-78 bei einer Dosis von 5 Gy.

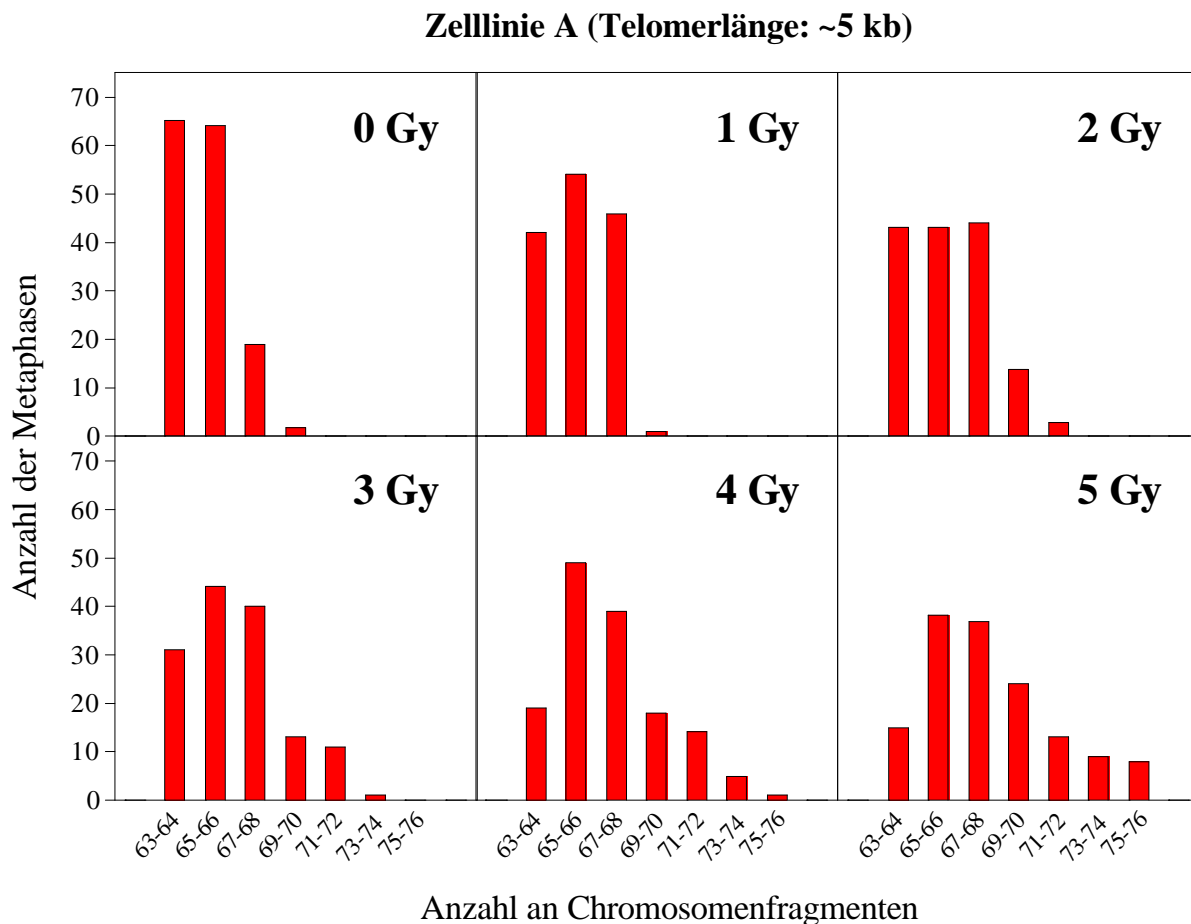
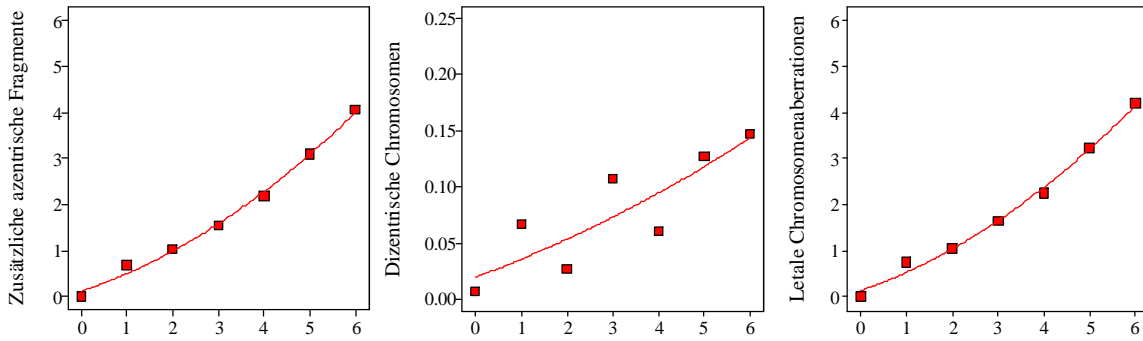


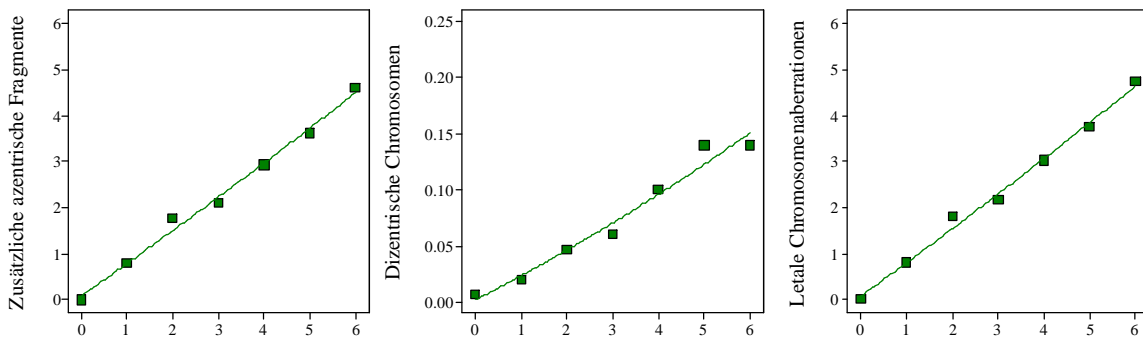
Abb. 15: Häufigkeitsverteilung der Chromosomenfragmente nach Röntgenbestrahlung. Häufigkeitsverteilung der Chromosomenfragmente in der BIBR-behandelten Zelllinie A mit verkürzten Telomeren nach Röntgenbestrahlung mit 0-5 Gy. Aufgetragen ist die Anzahl der Metaphasen gegen die Anzahl der Chromosomenfragmente (die der Übersichtlichkeit wegen in Gruppen von je zwei Häufigkeiten zusammengefasst sind).

In der Abbildung 16 ist für jede untersuchte Zelllinie jeweils die Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente, dizentrischer Chromosomen und resultierender letaler Chromosomenaberrationen dosisabhängig graphisch dargestellt. Mittels nicht-linearer Regressionsanalyse ließ sich sowohl für die Häufigkeit zusätzlicher azentrischer Fragmente nach Röntgenbestrahlung als auch für die dizentrischen Chromosomen und die letalen Chromosomenaberrationen, für jede Zelllinie ein dosisabhängiger linear-quadratischer Anstieg beschreiben.

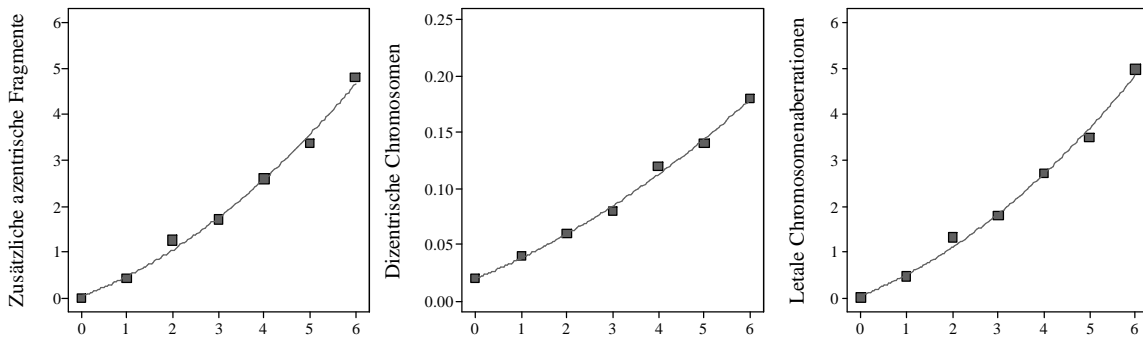
Zelllinie A (Telomerlänge: ~5 kb)



Zelllinie B (Telomerlänge: ~3 kb)



Zelllinie C (Telomerlänge: ~12 kb)



Zelllinie D (Telomerlänge: ~12 kb)

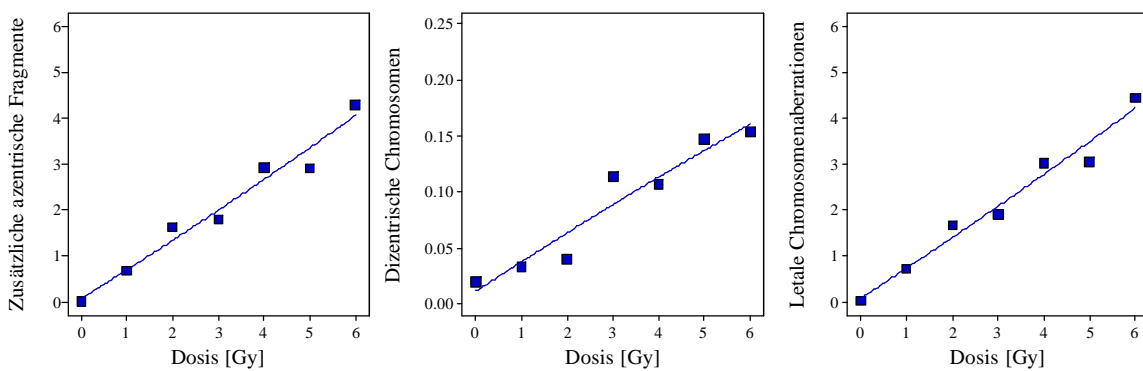


Abb. 16: Häufigkeiten instabiler Chromosomentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung. Für alle untersuchten Zelllinien sind jeweils die Häufigkeiten des Auftretens von azentrischen Fragmenten (linke Kolumne), dizentrischen Chromosomen (mittlere Kolumne) und die resultierenden letalen Chromosomenaberrationen (rechte Kolumne) pro Metaphase in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis aufgetragen.

In Abbildung 17 sind vergleichend für alle Zelllinien die Anzahl an letalen Chromosomenaberrationen pro Metaphase nach Röntgenbestrahlung mit 0-6 Gy sowie die entsprechend errechneten Regressionskurven dargestellt. In der statistischen Auswertung ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,0195$; α -Wert: 0,01) zwischen den Zelllinien.

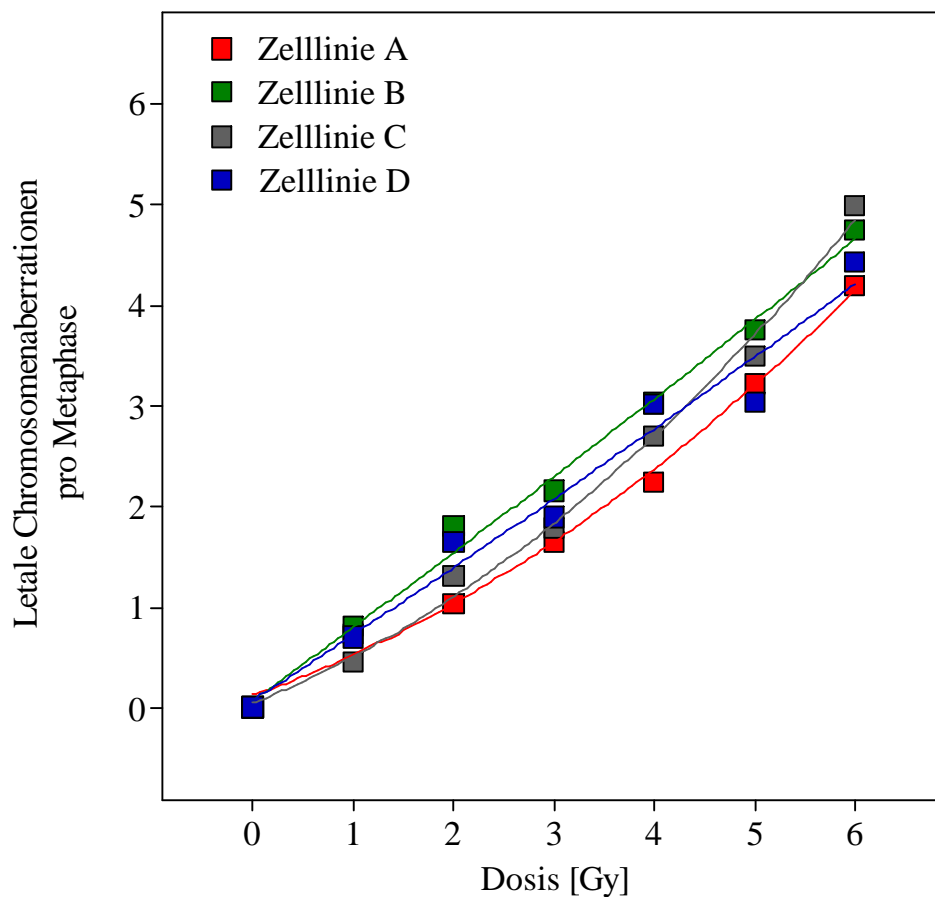


Abb. 17: Letale Chromosomenaberrationen nach Röntgenbestrahlung. Vergleich der Häufigkeit des Auftretens letaler Chromosomenaberrationen nach Röntgenbestrahlung mit 0-6 Gy in den BIBC-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren sowie den unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge. Die Aberrationshäufigkeit pro Metaphase nimmt linear-quadratisch mit steigender Bestrahlungsdosis zu.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Vergleich zwischen den BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren und den unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens instabiler Chromosomentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung nachweisbar waren.

4.6. Stabile Chromosomentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung

Fehlerhafte Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen führt in lebenden Zellen zu Chromosomenaberrationen. Befinden sich die Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G1- bzw. G0-Phase des Zellzyklus, entstehen neben den instabilen auch sogenannte stabile Chromosomentypaberrationen. Die häufigsten dieser Aberrationen sind die kompletten und inkompletten Translokationen, also der Austausch von DNA zwischen verschiedenen Chromosomen (= interchromosomale Aberration) oder innerhalb eines Chromosoms (= intrachromosomale Aberration). In der vorliegenden Arbeit wurden die BIBR-behandelte Zelllinie A mit verkürzten Telomeren und die unbehandelte Kontrollzelllinie D mit unbeeinflusster Telomerlänge bezüglich des Auftretens interchromosomaler Translokationen nach Röntgenbestrahlung miteinander verglichen. Metaphasen-Präparate von mit 6 Gy bestrahlten Zellen wurden hergestellt und mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung die Häufigkeit von kompletten und inkompletten Translokationsereignissen, die das Chromosom 7 betrafen, bestimmt (siehe 3.10.2.). Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt und pro Experiment jeweils 50 Metaphasen der bestrahlten und der unbestrahlten Zellen ausgewertet.

Abbildung 18 zeigt fluoreszenzmikroskopische Bilder der BIBR-behandelten Zelllinie A mit verkürzten Telomeren und der unbehandelten Kontrollzelllinie D mit unbeeinflusster Telomerlänge nach Hybridisierung mit einer Chromosom 7-spezifischen, FITC-gekoppelten DNA-Sonde. Unbestrahlte Kontrollen sind jeweils den mit 6 Gy bestrahlten Zellen gegenübergestellt.

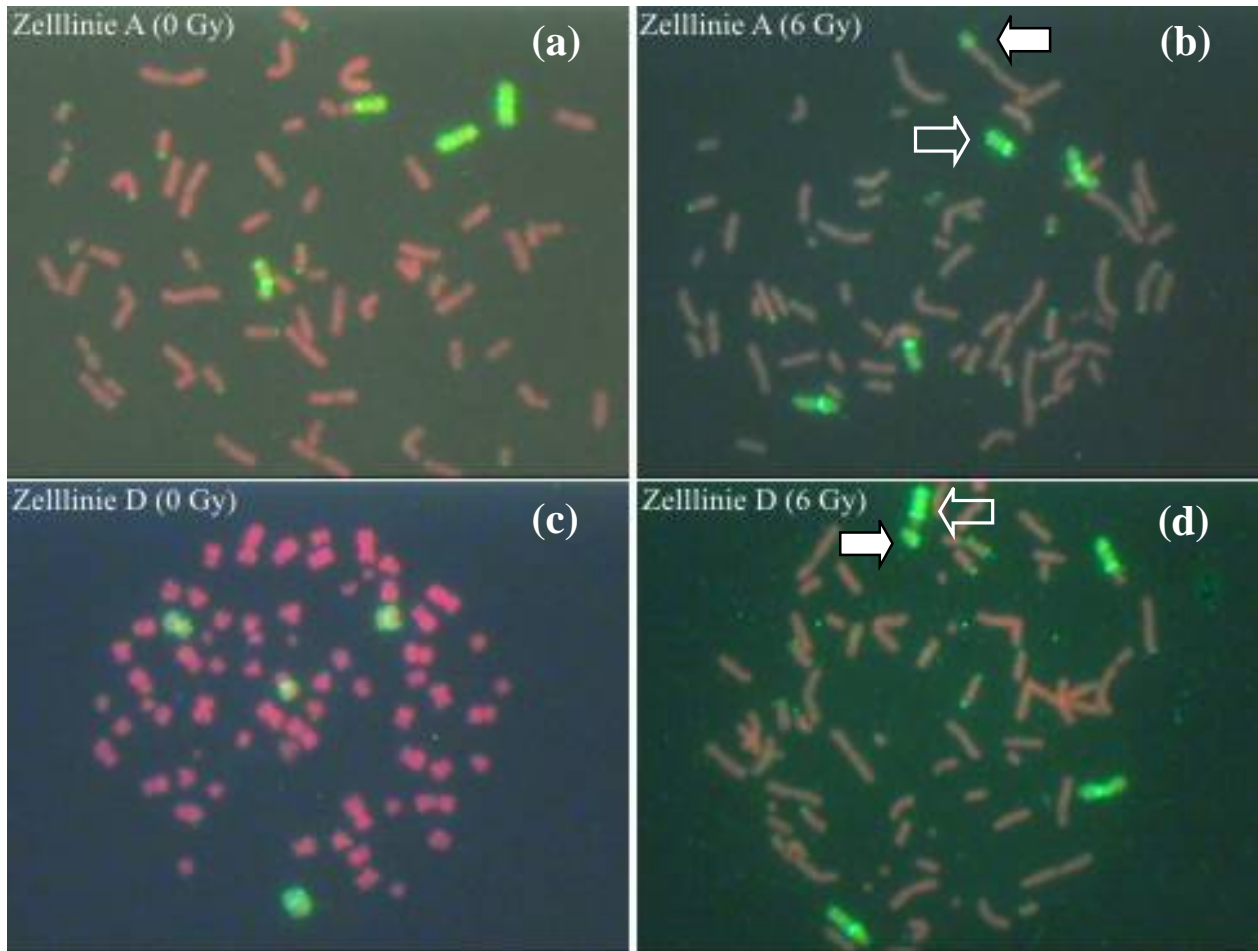


Abb. 18: Translokationen nach Röntgenbestrahlung.

Nachweis von Translokationen des Chromosoms 7 in der Zelllinie A mit verkürzten Telomeren und der Kontrollzelllinie D mit unbeeinflusster Telomerlänge mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung. Das Chromosom 7 wurde mit einer FITC-markierten DNA-Sonde angefärbt und die Gesamt-DNA mit Propidiumjodid gegengefärbt. Bild (a) und (c) zeigen für unbestrahlte Zellen jeweils 3 vollständige und 1 partiell gefärbtes Chromosom. Bild (b) und (d) zeigen Beispiele für inkomplette Translokation nach Bestrahlung: (b) mit einem endständig translozierten Anteil des Chromosoms 7 (solider Pfeil) und einem unverknüpften Chromosomenfragment (offener Pfeil), (d) mit einem FITC-markierten Chromosomenfragment (solider Pfeil) und am ursprünglichen Chromosom 7 (offener Pfeil) ist ein endständiges Areal unmarkiert. 630fache Vergrößerung.

Abb. 19 zeigt die graphische Darstellung der Häufigkeiten von Translokationen des Chromosoms 7 nach einer Bestrahlung von 6 Gy. Es zeigte sich eine Translokationsereignishäufigkeit von $0,112 \pm 0,025$ pro Metaphase für die mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 behandelte Zelllinie A mit verkürzten Telomeren im Vergleich zu $0,093 \pm 0,007$ für die unbehandelte Kontrollzelllinie D mit unbeeinflusster Telomerlänge. Damit ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien ($p=0,5209$; t-test with two-tailed p-value).

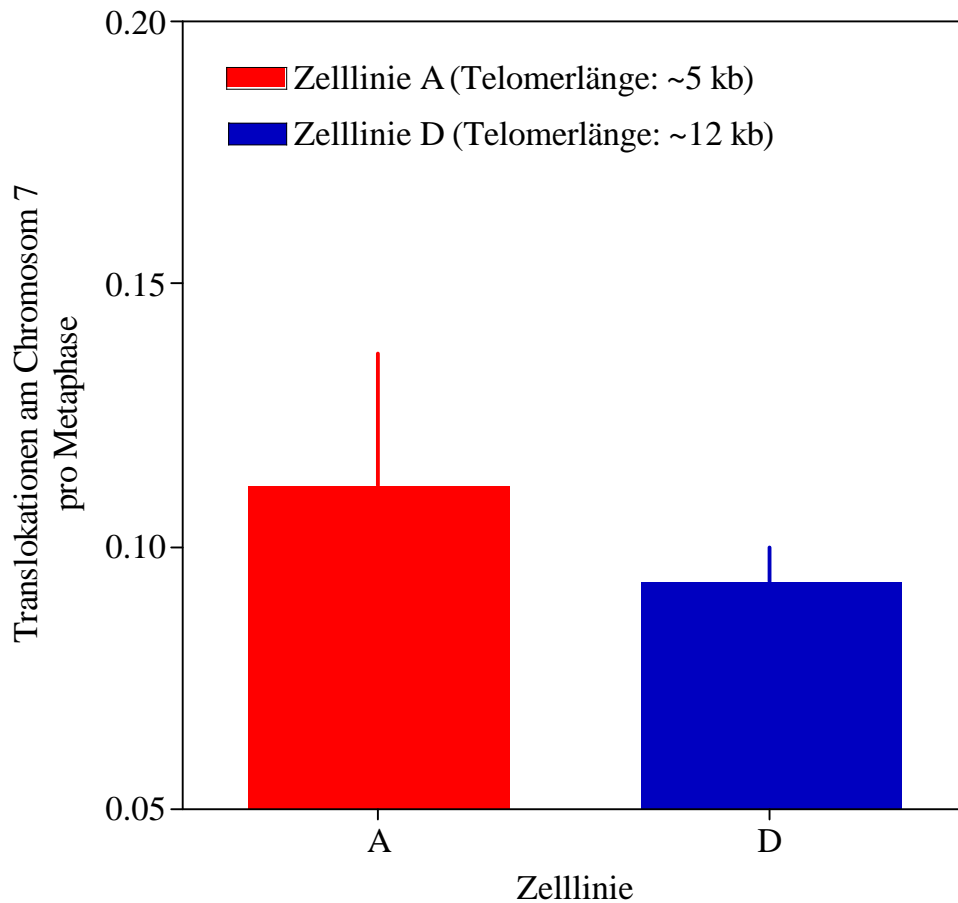


Abb. 19: Häufigkeit an Translokationsereignissen nach Röntgenbestrahlung.

Aufgetragen ist die Häufigkeit von Translokationen am Chromosom 7 pro Metaphase jeweils für die BIBR-behandelte Zelllinie A mit verkürzten Telomeren und die unbehandelte Kontrollzelllinie D mit unbeeinflusster Telomerlänge. Fehlerbalken entsprechen den Abweichungen vom Mittelwert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens an stabilen Chromosomentypaberrationen im Vergleich zwischen der BIBR-behandelten Zelllinie A mit verkürzten Telomeren und der unbehandelten Kontrollzelllinie D mit unbeeinflusster Telomerlänge nach Röntgenbestrahlung nachweisen ließ.

4.7. Chromatidentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung

Röntgenbestrahlung von Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus führt über Chromatinveränderungen, die durch strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche ausgelöst werden, zu lichtmikroskopisch nachweisbaren Chromosomenveränderungen, welche als Chromatidentypaberrationen bezeichnet werden. Dabei handelt es sich um Brüche in der Kontinuität der Chromatiden,

die wahrscheinlich auch mit Umlagerungen von DNA-Abschnitten innerhalb des Chromosoms verbunden sind. In aller Regel ist nur eines der beiden Chromatiden der in der postreplikativen G2-Phase des Zellzyklus bestrahlten Chromosomen von den Veränderungen betroffen. Eine hohe Frequenz an Chromatidentypaberrationen nach Bestrahlung wird als Ausdruck genetischer Instabilität einer Zelllinie angesehen.

In der vorliegenden Arbeit ist die Frequenz von Chromatidentypaberrationen nach Bestrahlung zwischen den BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren und den unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit normaler Telomerlänge verglichen worden. Es wurden Metaphasen-Präparate von allen Zelllinien 2 Stunden nach Röntgenbestrahlung mit 0,5 Gy sowie von unbestrahlten Kontrollen hergestellt und die Chromosomen mit Giemsa gefärbt (siehe 3.11.1.). In der lichtmikroskopischen Auswertung der Präparate wurden Diskontinuitäten in den Chromatiden („gaps“ und „breaks“) sowie komplexe Aberrationen, wie triradiale Chromosomen, bestimmt. In Abbildung 20 ist dies beispielhaft für alle Zelllinien dargestellt. Unter Einschluss aller Zelllinien wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Pro Experiment wurden für die bestrahlten Zellen insgesamt 70 Metaphasen ausgezählt, für die unbestrahlten Kontrollen jeweils 35 Metaphasen. Mit einer mittleren Anzahl an Chromatidentypaberrationen pro Metaphase von $1,793 \pm 0,1538$ für die Zelllinie A und $1,729 \pm 0,1172$ für die Zelllinie B wiesen die mit BIBR-1532 behandelten Zelllinien mit verkürzten Telomeren signifikant weniger Aberrationen auf als die unbehandelten Kontrollzelllinien C mit $2,543 \pm 0,1582$ und D mit $3,086 \pm 0,2381$.

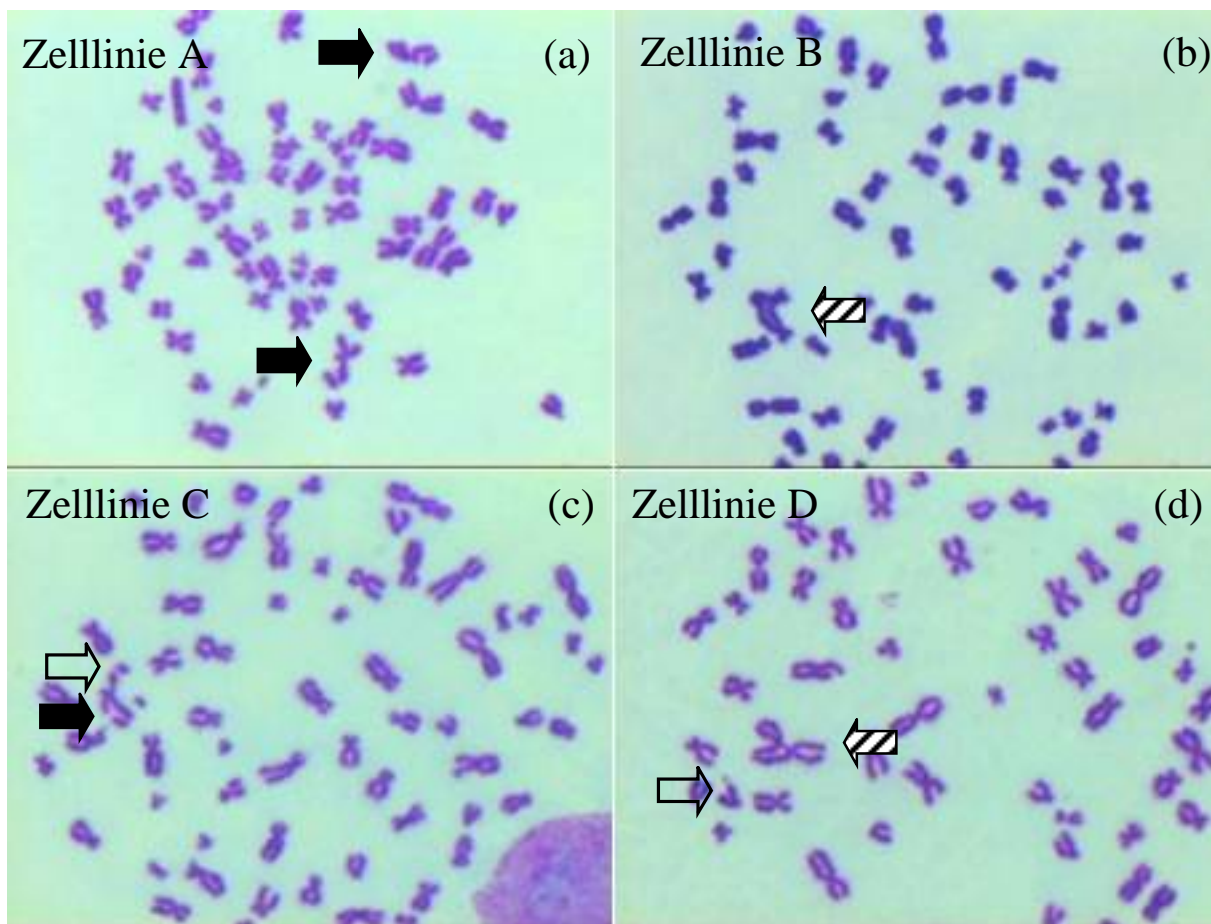


Abb. 20: Chromatidentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung.

Chromatidentypaberrationen in den Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren (a,b) im Vergleich zu den Zelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge (c,d). Die Zellen wurden in der G₂-Phase bestrahlt, in der 1. Metaphase nach Bestrahlung präpariert und mit Giemsa gefärbt. Dargestellt sind lichtmikroskopische Bilder bei 630facher Vergrößerung unter Ölimmersion mit den Chromatidentypaberrationen: Gaps (solide Pfeile), Breaks (offene Pfeile) und triradiale Chromosomen (schraffierte Pfeile).

Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abbildung 21 graphisch dargestellt. In den unbestrahlten Kontrollen traten keine Chromatidentypaberrationen auf (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der statistischen Auswertung des Vergleichs aller Zelllinien miteinander (t-test with two-tailed p-value; α -Wert: 0,01) bezüglich signifikanter Unterschiede in der Frequenz an Chromatidentypaberrationen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

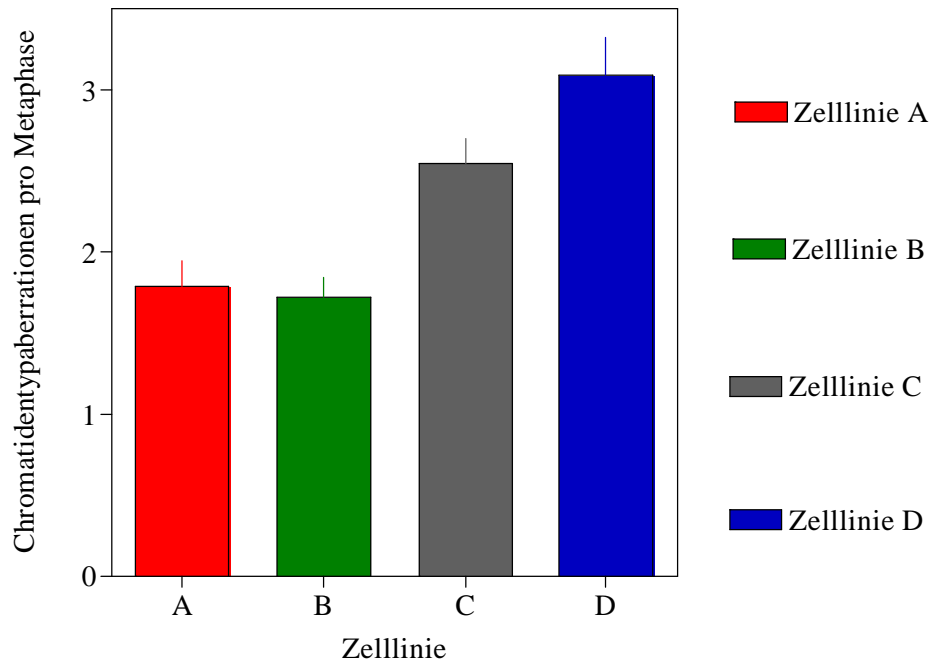


Abb. 21: Chromatidentypaberrationen pro Metaphase.

Graphische Darstellung der Anzahl an Chromatidentypaberrationen pro Metaphase in den Zelllinien A, B, C und D nach Röntgenbestrahlung mit 0,5 Gy.

Tab. 7: Chromatidentypaberrationen pro Metaphase

T-Test auf signifikante Unterschiede in der mittleren Anzahl an Chromatidentypaberrationen zwischen je zwei Zelllinien. Angegeben ist jeweils der p-Wert.

Statistische Auswertung des Vergleichs der Anzahl an Chromatidentypaberrationen (t-test with two-tailed p-value)

	Zelllinie A	Zelllinie B	Zelllinie C	Zelllinie D
Zelllinie A	-	0,74	0,0009	<0,0001
Zelllinie B	-	-	<0,0001	<0,0001
Zelllinie C	-	-	-	0,0595

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in den BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge nach Röntgenbestrahlung mit 0,5 Gy signifikant weniger Chromatidentypaberrationen auftraten.

4.8. Zellüberleben nach Röntgenbestrahlung

Röntgenbestrahlung von Zellen in Kultur führt dosisabhängig zum Absterben eines Teiles der Zellen. Der Anteil an überlebenden Zellen nach Bestrahlung ist damit ein direkter Indikator für die Strahlensensibilität der untersuchten Zelllinie. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss einer Telomerverkürzung auf die Strahlensensibilität von Tumorzellen untersucht werden. Nach einer Röntgenbestrahlung mit 0-8 Gy wurde das Zellüberleben der BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren mit dem der unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge verglichen (siehe 3.12.). Der Anteil an überlebenden Zellen wurde am 2., 4., 7. und 9. Tag nach Bestrahlung im Trypan-Blau-Assay bestimmt (siehe Abb. 22). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

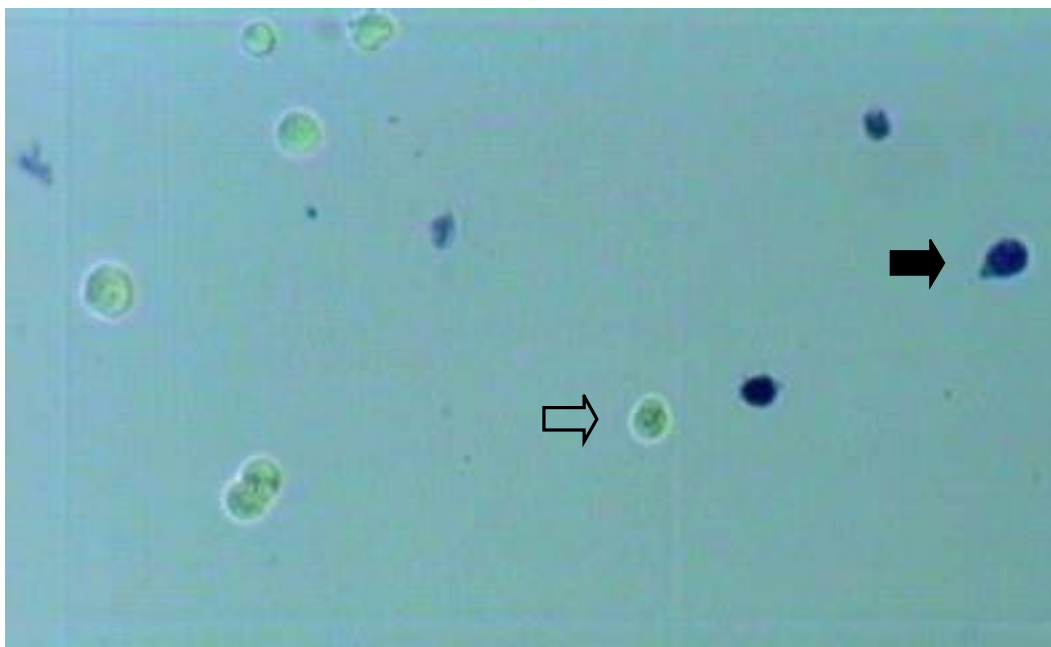


Abb. 22: Zellvitalitätsbestimmung durch Trypan-Blau Färbung.

Lichtmikroskopische Darstellung von Zellen der Linie A nach Bestrahlung und Trypan-Blau Färbung bei 200facher Vergrößerung in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. 4 Tage nach Bestrahlung mit 6 Gy lassen sich überlebende (offener Pfeil) deutlich von irreversibel geschädigten Zellen (solider Pfeil) unterscheiden.

In den Graphiken der Abbildung 23 ist für jede Zelllinie separat und für jede Bestrahlungsdosis der Anteil überlebender Zellen gegenüber der Zeit aufgetragen. Erwartungsgemäß war das Zellüberleben umso niedriger, je höher die Bestrahlungsdosis war.

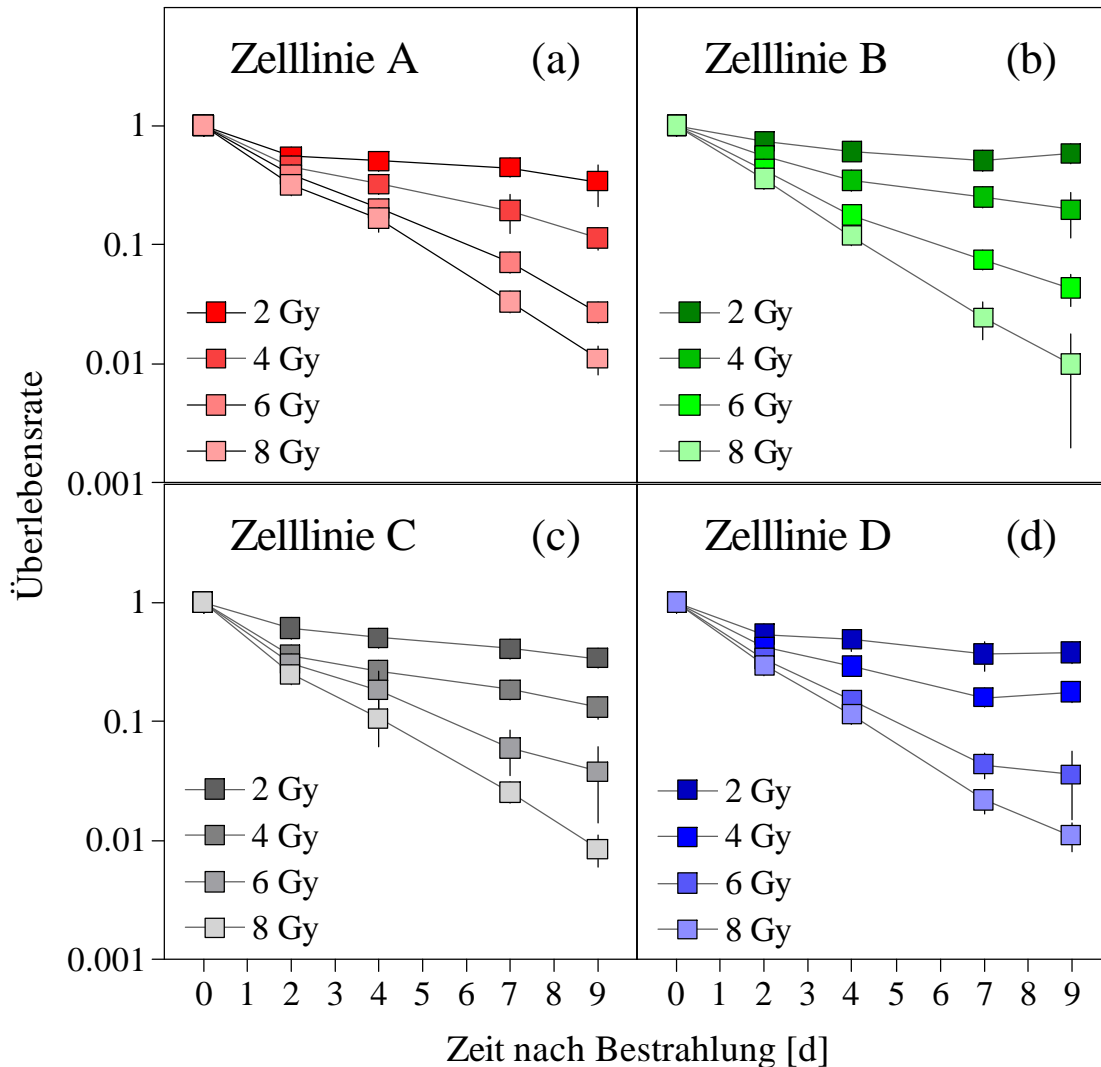


Abb. 23: Überleben nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Zeit.

Zellüberleben nach Röntgenbestrahlung für die BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren (a,b) und die unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge (c,d). Aufgetragen ist der Anteil überlebender Zellen logarithmisch gegen die Zeit in Tagen.

In Abbildung 24 ist der Anteil überlebender Zellen 9 Tage nach Röntgenbestrahlung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis gezeigt. Mittels nicht-linearer Regression konnte für jede Zelllinie individuell eine exponentielle, dosisabhängige Abnahme an überlebenden Zellen berechnet werden. Es ergab sich für jede Zelllinie eine sogenannte Schulterkurve. In der statistischen Auswertung ist der Unterschied zwischen den Zelllinien jedoch nicht signifikant ($p=0,1192$; α -Wert: 0,01).

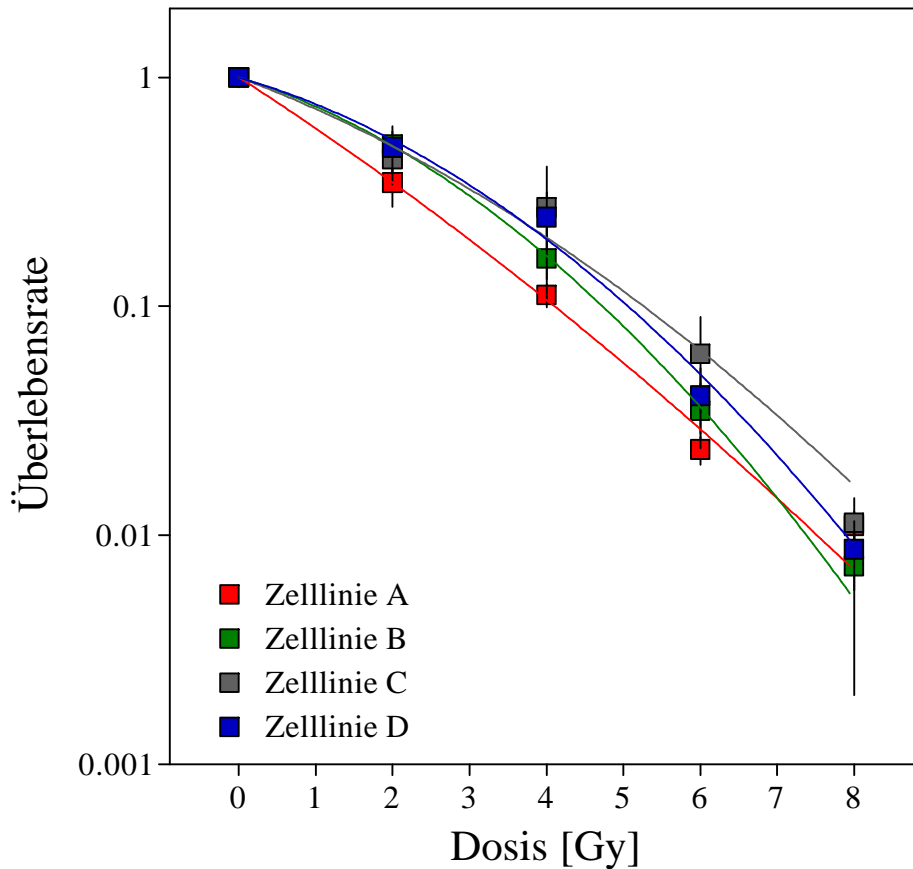


Abb. 24: Überleben nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Dosis.

Überlebensrate 9 Tage nach Röntgenbestrahlung für die BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren und für die unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge. Der Anteil überlebender Zellen ist logarithmisch gegen die Dosis in Gy aufgetragen. Die resultierenden Überlebenskurven sind mittels nicht-linearer Regression berechnet. Fehlerbalken entsprechen Abweichungen vom Mittelwert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich im Vergleich des Zellüberlebens nach Röntgenbestrahlung zwischen den BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren und den unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge kein signifikanter Unterschied zeigte.

5. DISKUSSION

Der Nachweis einer erhöhten Strahlensensibilität von Telomerase-defizienten Mäusen mit verkürzten dysfunktionalen Telomeren führte zu der Fragestellung, ob sich durch eine Telomeraseinhibition in menschlichen Tumoren ein ähnlicher Effekt erzielen lassen würde. Eine erfolgreiche Inhibition der Telomerase könnte damit zu einer effizienteren Therapie bei Tumorerkrankungen führen, die generell auf eine Strahlentherapie ansprechen würden.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen einer Telomerverkürzung auf die Strahlensensibilität in der menschlichen chronischen Leukämiezelllinie K-562 bestimmt werden. Dafür wurden Ergebnisse von Untersuchungen zum Zellwachstum, zur Zellzyklusverteilung, zur qualitativen und quantitativen Reparaturleistungsfähigkeit für strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche sowie zum relativen Zellüberleben nach Röntgenbestrahlung in Subpopulationen der Leukämiezelllinie K-562 mit artifiziell verkürzten Telomeren mit den Ergebnissen der Untersuchungen von unbeeinflussten Kontrollsubpopulationen derselben Zelllinie verglichen.

5.1. Wachstum und Zellzyklusverteilung

Der Erhalt einer Mindestlänge der Telomerregion an den Chromosomen ist eine wichtige Grundlage bzw. Voraussetzung für tumoröses Wachstum. In über 90% aller Tumoren wird dies durch die Hochregulierung der Aktivität des Enzyms Telomerase gewährleistet (Kim *et al.*, 1994). Ist diese unzureichend, resultiert proliferationsbedingt eine stetige Verkürzung und letztendlich eine Dysfunktion der Telomerregion mit zunächst Wachstumshemmung und später konsekutiver Induktion von Seneszenz und Zelltod (siehe 2.1. und 2.2.). Diese Abhängigkeit des Tumorwachstums von einer intakten Telomerregion machen das benötigte Enzym Telomerase und die Telomere selbst zu vielversprechenden Angriffspunkten einer antitumorösen Therapie. In den vergangenen Jahren sind daher zahlreiche Substanzen entwickelt worden, die hemmend in den Telomerunterhalt der Tumorzellen eingreifen (*Übersicht in Kelland, 2005*).

In den Untersuchungen der aktuell vorliegenden Arbeit wurde die katalytische Aktivität der Telomerase der Tumorzelllinie K-562 durch Kultivierung mit dem *small-molecule* Inhibitor BIBR 1532 in der Konzentration von 10 μM im Kulturmedium gehemmt (Hartmann, 2005). In dieser Konzentration des BIBR 1532 konnten bereits mit anderen Tumorzelllinien eine reduzierte Telomeraseaktivität sowie eine konsekutive progrediente Telomerverkürzung und Wachstums-

hemmung nachgewiesen werden (Damm *et al.*, 2001; Ward und Autexier, 2005), ohne dass die bei höheren Konzentrationen auftretende Zytotoxizität der Substanz (El-Daly *et al.*, 2005) beobachtet wurde. Es konnte in mindestens einer Arbeit jedoch auch trotz erfolgreicher Telomerlängenreduktion durch BIBR 1532 kein Einfluss auf das Wachstumsverhalten von kultivierten Tumorzellen nachgewiesen werden (Müller *et al.*, 2007). In den Untersuchungen, die eine Wachstumshemmung nachweisen konnten, trat diese stets verzögert, d.h. erst in der Langzeitkultivierung von Zellen, und mit deutlichen Unterschieden zwischen den Zelllinien ein.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde das Wachstum von Subpopulationen der Tumorzelllinie K-562, die über einen Zeitraum von 300 (Zelllinie A) bzw. 400 (Zelllinie B) Populationsverdoppelungen mit BIBR 1532 kultiviert worden waren und infolgedessen deutlich verkürzte Telomere aufwiesen, verglichen mit unbehandelten Subpopulationen mit einer Historie von 30 (Zelllinie C) bzw. 300 (Zelllinie D) Populationsverdoppelungen und weitgehend konstanter Telomerlänge. Es ließ sich dabei über einen Untersuchungszeitraum von 9 Tagen eine signifikante Reduktion des Wachstums der mit BIBR behandelten Zellen mit verkürzten Telomeren nachweisen (Abb. 6). Eine biologisch relevante Änderung der Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus, beispielsweise im Sinne eines Arrestes in der G1- oder G2-Phase, oder eine Veränderung im DNA-Gehalt der Zellen fand sich dabei nicht (Abb. 8).

Die Hemmung der Aktivität des Telomeraseenzymkomplexes durch den *small molecule* Inhibitor BIBR 1532 erfolgt pharmakologisch durch den Mechanismus einer nicht-kompetitiven Hemmung, wobei die Bindungsstelle der Substanz außerhalb des katalytischen Zentrums liegt. Dadurch ist die regelrechte Bindung des Enzymkomplexes an telomerische DNA selbst in Anwesenheit des BIBR 1532 nicht gestört. Wahrscheinlich ist pro Zellreplikationszyklus sogar ein einmaliger Kopiervorgang der Telomerase-RNA Matrize möglich (also das Anfügen eines einzelnen „*telomeric repeat*“ an das Chromosomenende) und nur die zum suffizienten Telomerunterhalt notwendige ständige Wiederholung des Kopiervorganges wird gehemmt (Pascolo *et al.*, 2002). Dadurch erklärt sich möglicherweise der im Vergleich zu anderen Prinzipien der Telomeraseinhibition langsamere Telomerlängenverlust. Bezogen auf die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit deutet der Nachweis einer signifikanten Wachstumshemmung in den BIBR-behandelten Zellen darauf hin, dass die Verkürzung der Telomerregion ein kritisches Maß erreicht hat, ohne dass eine akute Gefährdung der Zellvitalität, die sich im Proliferationsstopp und in Zellzyklusveränderungen äußern müsste, nachweisbar wäre. Genau in dieser Modellkonstellation, also kritische Telomerlänge der Chromosomen der untersuchten Zelllinie bei sonst intakter

Zellfunktion, sollten durch die nachfolgend diskutierten Untersuchungen die Auswirkungen von Röntgenbestrahlung auf die Tumorzellen untersucht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich Zellwachstum und Zellzyklusverteilung beim pharmakologischen Eingreifen in den Telomerunterhalt stimmen sehr gut überein mit den Daten aus bereits veröffentlichten Arbeiten. Trotz unterschiedlichster Prinzipien des Eingreifens in den Telomerunterhalt trat stets dasselbe Phänomen auf: Die Störung des Telomerunterhaltes in Tumorzellen *in vitro* bewirkte eine proliferationsbedingte Verkürzung der Telomerlänge mit nachfolgender Wachstumshemmung. So zeigte die Behandlung mit GRN 163, einem 13-mer Oligonucleotid mit Komplementärstruktur zur Matrizen-Region der RNA-Komponente des Telomeraseenzymkomplexes, eine Reduktion der Telomeraseaktivität, eine Reduktion der Telomerlänge mit Fortschreiten der Proliferation und schließlich eine Wachstumshemmung bis zum letzten Wachstumsstopp, Apoptose und Zelltod in Zelllinien eines humanen Multiplen Myeloms sowie eines Non-Hodgkin Lymphoms (Wang *et al.*, 2004). Auch die Hemmung des Telomeraseenzymkomplexes durch Azidothymidin, eines unspezifischen Hemmers reverser Transkriptasen, führte zu einer Verkürzung der Telomerlänge mit einer nachfolgenden Proliferationsverzögerung in einer humanen Kolonkarzinomzelllinie (Brown *et al.*, 2003). Die Behandlung mit Substanzen, die zu einer Unterbrechung des Telomerunterhalts durch die Stabilisierung der natürlicherweise auftretenden Faltung des 3'-Überhangs der Telomer-DNA in eine 4-strängige DNA-Struktur (*G-quadruplex*) führen, zeigte ebenfalls eine Wachstumshemmung und Ausbildung von Seneszenz in humanen Prostatakarzinomzellen (Incles *et al.*, 2004) bzw. in humanen Brustkrebszellen (Cookson *et al.*, 2005). Die Inkubation mit synthetischen Derivaten von Catechinen des grünen Tees, die zu einer direkten Telomeraseaktivitätshemmung führen, demonstrierten eine Telomerverkürzung und Proliferationshemmung an einer monoblastischen Leukämiezelllinie (Seimiya *et al.*, 2002), und das Unterdrücken der zelleigenen reversen Transkriptasekomponente (TERT) der Telomerase durch die stabile Expression einer spezifischen Short Hairpin RNA (shRNA) zeigte ebenfalls eine deutliche Hemmung der Proliferation in immortalen humanen Fibroblasten (Masutomi *et al.*, 2005).

Auch Untersuchungen im telomerasedefizienten Mausmodell (siehe 2.4.) zeigten bei embryonalen Fibroblastenkulturen einen Einfluss auf die Anzahl der kumulativen Populationsverdopplungen durch Inhibition der Telomeraseaktivität (Hao und Greider, 2004), so dass im Allgemeinen zusammenfassend gesagt werden kann, dass die Inhibition der Telomerase unabhängig von der eingesetzten Strategie zu einer reduzierten Proliferation in kultivierten Zellen führt.

5.2. Induzierter Zelltod nach Bestrahlung

Röntgenbestrahlung kann in Zellen irreversible Schäden induzieren und damit zu deren Absterben führen. Als relativ einfach zu erhebender, wenn auch undifferenzierter Indikator zur Strahlensensibilität von Zellen eignet sich daher die Ermittlung der Proportion toter zu lebender Zellen in Kultur nach Bestrahlung mit einer definierten Dosis.

In der vorliegenden Arbeit wurden BIBR-behandelte Zellen der Leukämiezelllinie K-562 mit verkürzten Telomeren sowie eine unbehandelte Kontrollzelllinie mit 3 und 6 Gy röntgenbestrahlt. Nach 48 h Inkubationsintervall wurde der Anteil an toten Zellen fluoreszenzmikroskopisch nach morphologischen Kriterien bestimmt; den Vergleichswert lieferten die Untersuchungen an unbestrahlten Kontrollen (Abb. 10). Es fand sich kein erhöhter Anteil an toten Zellen in der Zelllinie mit verkürzten Telomeren. Diesem Ergebnis stehen die Beobachtungen im mTERC^{-/-}-Mausmodell entgegen, indem sich nach γ -Bestrahlung eine Zunahme der Apoptoserate in den späten Mausgenerationen mit entsprechend stark verkürzten Telomeren nachweisen ließ (Goytisoló *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000). Dies galt sowohl für Untersuchungen an weißen Blutkörperchen nach Ganztierbestrahlung als auch für Untersuchungen nach Bestrahlung von Zellkulturen embryonaler Mausfibroblasten. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte in der hohen Apoptoseresistenz der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinie K-562 liegen, die durch die Expression des Bcr-Abl-Proteins und die erworbene Defizienz für den Zellzyklusregulator TP53 bedingt ist.

5.3. γ -H2AX Foci: Markierung von dysfunktionalen Telomeren und Bestimmung der quantitativen Reparaturleistung nach Bestrahlung

Ionisierende Strahlung induziert DNA-Doppelstrangbrüche, und phänotypisch strahlensensible Organismen oder Zelllinien weisen nicht selten einen Defekt für die DNA-Doppelstrangbruchreparatur auf. Die Messung der Reparaturkapazität für strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche kann daher Hinweise auf die generelle Strahlensensibilität eines untersuchten Modells geben. Die intranukleäre Phosphorylierung des Histons H2AX, welches dann als γ -H2AX bezeichnet wird, tritt zuverlässig in der Umgebung eines induzierten DNA-Doppelstrangbruches auf und persistiert für den Zeitraum des Reparaturgeschehens desselben. Die Art der Schadensinduktion ist dabei unerheblich und selbst dysfunktionale Telomere können ein solches Schadensereignis darstellen. Immunhistochemisch können die intranukleären Orte einer aktuellen Ansammlung von γ -H2AX markiert und fluoreszenzmikroskopisch als sogenannt-

te „ γ -H2AX Foci“ visualisiert werden. Das Ausmaß der Eliminierung an γ -H2AX Foci in einer bestimmten Reparaturzeit nach Bestrahlung mit einer definierten Dosis korreliert mit der Reparaturleistungsfähigkeit des untersuchten Systems (siehe 3.8.1.). In der vorliegenden Arbeit wurden Tumorzellen der Leukämiezelllinie K-562 mit artifiziell verkürzten Telomeren untersucht. Die Fragestellung war erstens, ob sich aufgrund der verkürzten Telomere per se γ -H2AX Foci würden nachweisen lassen, und zweitens, ob die Elimination von bestrahlungsinduzierten γ -H2AX Foci beeinträchtigt sein würde.

5.3.1. γ -H2AX Foci an dysfunktionalen Telomeren

In der Leukämiezelllinie K-562 war durch Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 eine Telomerverkürzung in den Zellen verursacht worden, deren Ausmaß auf Grundlage des Proliferationsassays als kritisch zu bewerten war (siehe 5.1). In der Untersuchung der beiden Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren (Telomerlänge ~ 5 kb bzw. ~ 3 kb) im Vergleich zu den Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge (~ 12 kb) ließen sich jedoch keine vermehrten γ -H2AX Foci nachweisen (Abb. 12 und 13). Das spricht dafür, dass im untersuchten Zellsystem durch die Behandlung mit BIBR 1532 eine wirklich exzessive Verkürzung einzelner Telomerregionen nicht oder nicht ausreichend stattgefunden hat, um als DNA-Schaden wahrgenommen zu werden.

In seneszenten humanen Fibroblasten konnten dagegen phosphoryliertes H2AX sowie weitere aktivierte Proteine mit Assoziation zur DNA-Schadenskontrolle an verkürzten Telomere nachgewiesen werden (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003). Auch in Zellen mit artifiziell dysfunktionalen Telomeren gelang der Nachweis von γ -H2AX Foci in der (Sub)Telomerregion: In immortalisierten humanen Fibroblasten bei denen via Infektion mit einem viralen Vektor ein dysfunktionales TRF2-Protein gebildet wird, was wiederum zu dysfunktionalen Telomeren (Störung der Chromatinstruktur) führt, kolokalisieren γ -H2AX Foci mit einem Markerfocus der Telomerregion (Takai *et al.*, 2003). Und auch im mTERC^{-/-}-Mausmodell fanden sich in der Untersuchung von Metaphase-Präparaten von embryonalen G6-Mausfibroblastenkulturen γ -H2AX Foci an ~ 2 % der Chromosomenenden im Vergleich zu $\sim 0,25$ % bei Wildtypzellen (Hao *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass (einzelne) dysfunktionale Telomere, seien sie durch Schädigung der Chromatinstruktur der Telomerregion oder durch exzessive Verkürzung der Telomere (bei gleichzeitiger Telomeraseinaktivität) entstanden, von der zellulären DNA-Schadenskontrolle als akute DNA-Schädigung, respektive Doppelstrangbrüche, wahrgenommen werden und die entsprechen-

de Signalkaskade initiiert wird (*siehe auch Übersicht in Reaper et al., 2004*).

Der fehlende Anstieg von γ -H2AX Foci an den Telomerenden im in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellsystem ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die kritische Kürze, bei der die Telomerenden als Doppelstrangbrüche erkannt und markiert werden, nicht erreicht wurde.

5.3.2. *Quantitative Reparaturleistung nach Röntgenbestrahlung*

In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Reparaturleistung der BIBR-behandelten Zelllinien A und B mit verkürzten Telomeren mit denen der unbehandelten Kontrollzelllinien C und D mit unbeeinflusster Telomerlänge verglichen. Zu diesem Zweck wurde die mittlere Anzahl an γ -H2AX Foci pro Zelle 24 Stunden nach Röntgenbestrahlung mit 0-4 Gy fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit BIBR-behandelten und den Kontrollzellen ($p=0,7581$; α -Wert: 0,01).

Dies steht im Widerspruch zu Studien im mTERC^{-/-}-Mausmodell, die eine reduzierte Reparaturkapazität für DNA-Schäden nach Bestrahlung nachweisen konnten (Wong et al., 2000, Goytisoló et al. 2000).

Eine mögliche Erklärung zur Lösung dieses Widerspruches geben die Untersuchungen von Masutomi et al. (2005): In einem Modell immortaler humaner Fibroblasten, in denen die Expression der zelleigenen reversen Transkriptasekomponente der Telomerase (TERT) durch RNA-Interferenz unterdrückt wurde, war auch die Reparaturkapazität für DNA-Doppelstrangbrüche stark reduziert und die Zellen entsprechend strahlenempfindlich. Wurden in die Zellen jedoch verschiedene mutierte Formen der TERT exprimiert, die zwar die katalytische Aktivität der TERT, jedoch nicht die Fähigkeit zur Telomerverlängerung besaßen, kam es nach Bestrahlung zu einer adäquaten Phosphorylierung des Histons H2AX und zur kompetenten DNA-Doppelstrangbruchreparatur. Die wachstumshemmende Auswirkung des Verlustes des Telomerunterhalts war dabei aber nachweisbar, insofern ist dieses Zellmodell bezüglich der Art und Auswirkung der Telomeraseinhibition gut mit der der BIBR 1532-Behandlung vergleichbar. Für die zelluläre Kapazität zur Reparatur von DNA-Schäden, so die Schlussfolgerung von Masutomi et al., sei eine katalytisch aktive Telomerase notwendig; deren Fähigkeit und Funktion zur Telomerverlängerung bzw. -unterhalt ist davon jedoch klar zu unterscheiden, respektive nicht notwendig. Hier liegt der entscheidende Unterschied zum mTERC^{-/-}-Mausmodell, in dem ein generell dysfunktionaler Telomeraseenzymkomplex vorliegt.

5.4. Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen: Bestimmung der qualitativen Reparaturleistung nach Bestrahlung

Eine fehlerhafte oder nicht erfolgte Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen kann zu strukturellen Chromosomenaberrationen führen. In Abhängigkeit von der Phase des Zellzyklus, in welchem sich die Zellen zum Bestrahlungszeitpunkt befanden, entstehen dabei Chromosomentyp- oder Chromatidentypaberrationen. In unsynchronisierten Zellkulturen im exponentiellen Wachstum ist nach Bestrahlung daher potentiell ein Mix der verschiedenen Aberrationstypen nachweisbar. Mit geeigneten Methoden des Versuchsaufbaus und der Zellpräparation lässt sich jedoch gezielt die Frequenz der einzelnen Aberrationstypen untersuchen (siehe 3.9.-3.11.). Das gehäufte Auftreten von strukturellen Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung ist ein Indiz für eine höhere Strahlenempfindlichkeit und/oder für eine genomische Instabilität von Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Telomerverkürzung in Tumorzellen für die Entstehung von stabilen und instabilen Chromosomentypaberrationen sowie von Chromatidentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung untersucht. Als Modell wurden Subpopulationen der Leukämiezelllinie K-562 verwendet, in denen durch Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 eine ausgeprägte Telomerverkürzung herbeigeführt worden war.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Untersuchungen der aktuell vorliegenden Arbeit nach Aberrationstypen getrennt diskutiert werden und dabei auf das jeweilige Teilergebnis der veröffentlichten Daten zu den Untersuchungen im mTERC^{-/-}-Mausmodell sowie anderen Modellen Bezug genommen werden.

5.4.1. Instabile und stabile Chromosomentypaberrationen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Telomerverkürzung in der humanen Leukämiezelllinie K-562 auf die Frequenz des Auftretens von Chromosomentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung untersucht. In den Experimenten wurden Subpopulationen der Tumorzelllinie K-562, die unter Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 eine starke Telomerverkürzung zeigten, unbehandelten Zelllinien mit unbeeinflusster Telomerlänge gegenübergestellt. An instabilen Chromosomentypaberrationen wurde die Anzahl der letalen Chromosomenaberrationen nach Röntgenbestrahlung mit 0-6 Gy bestimmt. Eine linear-quadratische Zunahme der Aberrationen mit steigender Röntgendosis zeigte sich sowohl für die Zelllinien mit verkürzten Telomeren als auch die Kontrollzelllinien. Es zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied in der Aberrationsmenge (Abb. 17). Es zeigten sich ebenfalls keine End-zu-End-

zu-End-Fusionen als Zeichen erodierender Telomere in den Zelllinien mit verkürzten Telomeren im Vergleich zu den Kontrollen, wie sie im mTERC^{-/-}-Mausmodell regelmäßig nachweisbar waren. An stabilen Chromosomentypaberrationen wurde die Translokationshäufigkeit am Chromosom 7 nach Röntgenbestrahlung mit 6 Gy bestimmt. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied bezüglich dieses Aberrationstyps im Vergleich zwischen der untersuchten BIBR-behandelten Zelllinie mit verkürzten Telomeren und der unbehandelten Kontrollzelllinie feststellen (Abb. 19).

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von McIlrath *et al.* (2001) überein, die im Vergleich zwischen Zelllinien mit stark verkürzten und mit normalen Telomeren bei insgesamt unbeeinflusster Telomeraseaktivität ebenfalls keine Unterschiede im Auftreten von dizentrischen Chromosomen und Translokationen nach γ -Bestrahlung nachweisen konnten. Auch im Mausmodell (siehe 2.4.) konnten Goytisolo *et al.* (2000) nach γ -Bestrahlung mittels FISH-Untersuchungen an Chromosomen zunächst keine signifikanten Änderungen in der Aberrationshäufigkeit und -verteilung feststellen, wenn sie Mäuse der zweiten Generation verwendeten. In Untersuchungen an Mäusen der fünften Generation mit entsprechend wesentlich stärker verkürzten Telomeren zeigte sich dann allerdings eine signifikante Zunahme des Auftretens von fusionierten Chromosomenenden und Deletionen. Diese erst in späteren Generationen sichtbare Zunahme der Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung wurde ebenfalls von Wong *et al.* (2000) beobachtet, die beim Vergleich von Wildtypmäusen und Mäusen der dritten und sechsten Generation mit defizienter Telomerase (mTERC^{-/-}) erst bei den Mäusen der sechsten Generation eine deutliche Zunahme der Frequenz an Fragmenten und Ringchromosomen ermittelten. Dagegen wurde von Latre *et al.* (2003) eine deutlich höhere Frequenz an Aberrationen bereits in bestrahlten embryonalen Fibroblasten von Mäusen der dritten Generation festgestellt, allerdings nur aufgrund einer überproportionalen Häufung der Beteiligung von Chromosomen mit extrem verkürzten Telomeren an den Chromosomenaberrationen.

Masutomi *et al.* (2005) konnten in immortalisierten humanen Fibroblasten durch Ausschaltung der TERT-Expression und damit des Telomeraseenzymkomplexes eine Zunahme an Chromosomenfragmenten nach γ -Bestrahlung in Untersuchungen an Metaphase-Präparationen nachweisen.

Fasst man die Daten zusammen, so scheint sich ein Effekt auf die Bildung von Chromosomentypaberrationen nach Bestrahlung in Zellen mit verkürzten Telomeren nur zu manifestieren, wenn der Telomerverkürzung eine funktionelle Ausschaltung/Inhibierung des gesamten Telomeraseenzymkomplexes zugrunde liegt, wie es zum Beispiel im mTERC^{-/-}-Mausmodell der Fall ist.

5.4.2. Chromatidentypaberrationen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Telomerverkürzung in der humanen Leukämiezelllinie K-562 auf die Frequenz des Auftretens von Chromatidentypaberrationen nach Röntgenbestrahlung mit 0,5 Gy untersucht. In den Experimenten wurden Subpopulationen der Tumorzelllinie K-562, die unter Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 eine starke Telomerverkürzung zeigten, unbehandelten Kontrollen gegenübergestellt. Es wurde die Anzahl der G2-Aberrationen pro Metaphase bestimmt. Insgesamt ließen sich in den BIBR-behandelten Zelllinien mit verkürzten Telomeren signifikant weniger Chromatidentypaberrationen nachweisen als in den Kontrollzelllinien.

Kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der G2-Aberrationen in Knochenmark-Ausstrichpräparaten nach fraktionierter Bestrahlung von Wildtyp-, G2- und G5-Mäusen mit einer Kumulativdosis von 10,50 Gy wurde von Goytisoló *et al.* (2000) beobachtet. Ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Chromatidentypaberrationen konnte von McIlrath *et al.* (2001) beim Vergleich von Mauszelllinien mit verkürzten Telomeren und den als Kontrolle dienenden Splenozytenkulturen nach γ -Bestrahlung mit 1,0 Gy nachgewiesen werden; der beobachtete Trend jedoch zeigte ebenfalls eine Reduktion der G2-Aberrationen in Zellen mit verkürzten Telomeren! Eine deutlich höhere Anzahl an Chromatinbrüchen nach γ -Bestrahlung mit 5 Gy wurde dagegen in embryonalen Fibroblasten von G6-Mäusen im Unterschied zu Wildtyp- und G2-Mäusen von Wong *et al.* (2000) beobachtet.

5.4.3. Zusammenfassende Beurteilung der qualitativen Reparaturleistung nach Röntgenbestrahlung

Die Telomerverkürzung durch Telomeraseinhibition in Subpopulationen der Leukämiezelllinie K-562 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Frequenz von strukturellen Chromosomenaberrationen nach Röntgenbestrahlung. Die qualitative Reparaturleistung von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen scheint daher unbeeinträchtigt. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der bereits nachgewiesenen vergleichbaren Zelltodrate nach Bestrahlung und der unveränderten quantitativen Reparaturleistung von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen in diesen Zellen. Damit besteht ein klarer Widerspruch zu den Ergebnissen der Untersuchungen im mTERC^{-/-}-Mausmodell, in denen ein scheinbar deutlicher Zusammenhang zwischen Telomerverkürzung und Zunahme an strahleninduzierten chromosomalen Aberrationen nachgewiesen werden konnte. Zwei Erklärungsmodelle für diesen Widerspruch sollen im Folgenden dargelegt werden:

(1) Zieht man in Betracht, dass Latre *et al.* zeigen konnten, dass jeweils einige wenige Chromosomen mit extrem verkürzten, also sehr wahrscheinlich dysfunktionalen Telomeren zu einem erheblichen Anteil in die chromosomalen Aberrationen involviert waren, könnte hier durchaus die Erklärung für die Diskrepanz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liegen. Im Modell der Leukämiezelllinie K-562 hat die Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 (noch) keine extrem verkürzten, dysfunktionalen Telomere produziert, die dann als vermeintliche DNA-Doppelstrangbrüche prozessiert werden könnten und zu einer höheren Anzahl an Aberrationen führen müssten! Unterstützung erfährt diese Theorie durch die Arbeit von Hemann *et al.* (2001). Diese haben im mTERC^{-/-}-Mausmodell Kreuzungen zwischen mTERC^{-/-}-Mäusen der 6. Generation mit stark verkürzten Telomeren und heterozygoten mTERC^{+/-}-Mäusen mit normaler Telomerlänge durchgeführt. In der ersten Folgegeneration besaßen die Mäuse daher für jedes Chromosompaar ein Chromosom mit stark verkürzten und eines mit normal langen Telomeren. In diesen als iF1-Generation bezeichneten Mäusen gab es vererbungsbedingt telomerasekompetente (mTERC^{+/-}) und telomerasedefiziente (mTERC^{-/-}) Tiere. Hemann *et al.* konnten nun an embryonalen Fibroblastenkulturen dieser Tiere zeigen, dass einerseits die telomerasedefizienten iF1- mTERC^{-/-}-Mäuse genauso strahlensensibel sind wie die G6- mTERC^{-/-}-Mäuse, und dass andererseits die telomerasekompetenten iF1- mTERC^{+/-}-Mäuse eine den Wildtypmäusen vergleichbare Strahlensensibilität besitzen. Gleichzeitig waren schon nach sehr wenigen Populationsverdoppelungen in Kultur die typischen End-zu-End-Fusionen und Chromosomenenden ohne Telomersignal in den telomerasekompetenten iF1-Mäusen nicht mehr nachweisbar, während beide Phänomene in den telomerasedefizienten iF1-Mäusen ähnlich häufig vorkamen wie in den telomerasedefizienten G6-Mäusen. Die Autoren schlussfolgerten, dass der strahlensensible Phänotyp in den späten Generationen des mTERC^{-/-}-Mausmodells ebenso von dem Vorhandensein einiger weniger extrem verkürzter Telomere abhängt wie von der absoluten Telomeraseinaktivierung zum Untersuchungszeitpunkt.

(2) Eine andere, ebenso plausible Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte in der unterschiedlichen Art der Telomeraseinhibition in den beiden Modellen liegen. Im mTERC^{-/-}-Mausmodell fehlt aufgrund des Knock-outs des Gens für die Telomerase-RNA-Komponente der gesamte Telomerasekomplex. Im Modell der Telomerverkürzung durch Telomeraseinhibition mit BIBR 1532 ist der Telomerasekomplex dagegen vorhanden und kann unbehindert an DNA binden, lediglich die katalytische Funktion des wiederholten Anfügens der *telomeric repeats* wird gehemmt. Sollte ein funktionierender Telomerasekomplex regulierende Funktionen in der zellei-

genen DNA-Schadenskontrolle wahrnehmen, könnten diese trotz aktueller Kultivierung der Zellen mit BIBR 1532 durchaus unbeeinträchtigt sein und damit zwanglos die unbehinderte qualitative Reparaturleistung erklären. Gestützt wird dieser Erklärungsansatz durch die Ergebnisse der Arbeit von McIlrath *et al.* In verschiedenen Mauszelllinien, die sich lediglich hinsichtlich ihrer Telomerlänge bei sonst unbeeinflusster Telomeraseaktivität unterscheiden, konnte keine signifikante Änderung der Frequenz an Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen festgestellt werden. Auch die Untersuchungen von Masutomi *et al.* stützen dieses Erklärungsmodell, da demonstriert werden konnte, dass die Ausschaltung der Telomeraseaktivität durch Unterdrückung der Expression der reversen Transkriptasekomponente für die Zunahme von instabilen Chromosomenaberrationen ausreicht, auch wenn noch keine Telomerverkürzung aufgetreten ist.

Einer gesonderter, kritischen Würdigung bedarf das Ergebnis des Auftretens von Chromatidentypaberrationen nach Bestrahlung. Die erhöhte Frequenz an Chromatinbrüchen („breaks“), wie von Wong *et al.* beschrieben, ist schwierig zu bewerten, da der experimentelle Aufbau stark von den üblichen Standards eines G2-Assays abweicht (vergleiche 3.11.1. und 5.4.1.). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ebenso wie die Untersuchungen von McIlrath *et al.* zeigen eher eine Tendenz zur Reduktion der Chromatidentypaberrationen in den Zelllinien mit verkürzten Telomeren, wenngleich bei McIlrath *et al.* ohne Nachweis einer Signifikanz. Wie sind solche gegensätzliche Ergebnisse verstehbar? Möglicherweise bietet die unterschiedliche Beeinflussung der Telomeraseaktivität in den Experimenten eine Erklärung: Die aktuell akzeptierte Hypothese zur Entstehung von Chromatidbrüchen ist die „Signal-Hypothese“ von Peter E. Bryant, nach der (induzierte) DNA-Doppelstrangbrüche durch Signale über die Chromatinstruktur zu Rearrangements und letztlich zu temporären Chromatinbrüchen, den Chromatidentypaberrationen, führen (Bryant *et al.*, 2004a). Nun nimmt die Telomerase selbst sehr wahrscheinlich weitreichende Funktionen zur Regulierung des Chromatinstatus und der DNA-Schadenkontrolle wahr (Masutomi *et al.*, 2005), so dass eine Beeinflussung dieser Funktionen durch Ausschaltung des Enzymkomplexes, wie im mTERC^{-/-}-Mausmodell, oder durch spezifische Inhibition, wie zum Beispiel durch BIBR 1532, auch Auswirkungen auf die Ausbildung von Chromatidentypaberrationen haben sollte. Der genaue Mechanismus und die Frage, weshalb sich so unterschiedliche Schadensmuster ausbilden, bleiben aber ungelöst und sollten das Ziel weiterführender Untersuchungen sein.

5.5. Überleben nach Röntgenbestrahlung

Die Rationale für den Einsatz von Bestrahlung in der klinischen Tumorthherapie ist die Eigenschaft von energiereichen Strahlen über die Induktion von DNA-Schäden zum Verlust der Klonogenität der Tumorzellen zu führen, d.h. diese verlieren ihre Teilungsfähigkeit. Eine Verstärkung des therapeutischen Erfolges versprechen alle Behandlungen, die die Sensibilität der Tumorzellen gegenüber dem beschriebenen Strahleneffekt verstärken. Ziel der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer Verkürzung der Telomere in Subpopulationen der Leukämiezelllinie K-562 durch Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 auf die Strahlensensibilität der Tumorzellen zu bestimmen. Das letztendlich entscheidende Experiment zum Nachweis einer veränderten Sensibilität von Zellen gegenüber Strahlung ist ein sogenannter Klonogenitäts- oder Überlebenstest, wobei sich der Aufbau eines solchen Experimentes an den Gegebenheiten des untersuchten Modells orientieren muss.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer Telomerverkürzung in der Leukämiezelllinie K-562 durch Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 auf das Überleben nach Röntgenbestrahlung bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Subpopulationen der Tumorzelllinie K-562 mit verkürzten Telomeren sowie Kontrollzelllinien mit normaler Telomerlänge mit 0, 2, 4, 6 und 8 Gy bestrahlt und das relative Zellüberleben über die Dauer von 9 Tagen hinweg untersucht. Es ließ sich für jede Zelllinie eine Reduktion der überlebenden Zellfraktion über die Zeit nachweisen, die umso ausgeprägter war, je höher die initiale Bestrahlungsdosis gewesen war. Im Vergleich der Zelllinien untereinander bezüglich der dosisabhängigen Überlebensrate 9 Tage nach Bestrahlung zeigte sich kein signifikanter Unterschied (siehe 4.8.).

Dagegen konnte eine erhöhte Strahlensensibilität in Mäusen beobachtet werden, deren Telomeraseaktivität ausgeschaltet wurde und die entsprechend stark verkürzte Telomere aufwiesen (Goytisolo *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000). Es konnte ebenfalls eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit an embryonalen Fibroblasten, die von mTERC^{-/-}-Mäusen isoliert wurden, bestimmt werden (Wong *et al.*, 2000; Hemann *et al.*, 2001). Dabei konnte gezeigt werden, dass insbesondere das Vorliegen (weniger) extrem verkürzter Telomere im Umfeld einer Telomeraseinaktivierung durch Ausschalten des Gens der Telomerase-RNA-Komponente tatsächlich die Ursache für den beobachteten strahlensensiblen Phänotyp darstellt (Hemann *et al.*, 2001). Auch Hao und Greider (2004) kamen zu vergleichbaren Resultaten. Ebenfalls eine deutliche, dosisabhängige Reduktion des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung nach Inhibition der Expression der reversen

Transkriptasekomponente der Telomerase mittels RNA-Interferenz konnte von Masutomi *et al.* (2005) beobachtet werden. Der Effekt war reversibel und konnte durch zusätzliche Expression einer Wildtyp-TERT in den Zellen via viraler Transfektion mit einem entsprechenden Vektor aufgehoben werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Telomerverkürzung in Subpopulationen der Leukämiezelllinie durch den Telomeraseinhibitor BIBR 1532 keinen signifikanten Einfluss auf das relative Überleben nach Röntgenbestrahlung hat. Das Ergebnis ist damit konsistent mit den bereits erfolgten Nachweisen eines fehlenden Einflusses auf den induzierten Zelltod 48 h nach Bestrahlung und die qualitative und quantitative Reparaturleistung. Es besteht allerdings ein deutlicher Widerspruch zu den Ergebnissen der Untersuchungen am mTERC^{-/-}-Mausmodell, die bei fortgeschrittener Telomerverkürzung ein deutlich reduziertes Überleben nach Bestrahlung sowohl für den Gesamtorganismus als auch für die autonome Zelle zeigen konnten. Dieser Widerspruch und die Konsequenzen daraus für die dieser Arbeit zugrundeliegende Fragestellung sollen im folgenden Unterkapitel abschließend besprochen werden.

5.6. Schlussfolgerungen

Die in den vorangegangenen Unterkapiteln diskutierten Ergebnisse der Untersuchungen der Auswirkungen einer Telomerverkürzung in der chronisch-myeloischen Leukämiezelllinie K-562 und die Einordnung dieser Ergebnisse in den aktuellen Wissenstand auf Grundlage der verfügbaren Daten anderer Arbeitsgruppen sollen im Folgenden noch einmal zusammengefasst und abschließend bewertet werden.

Durch Langzeitbehandlung von Subpopulationen der humanen chronisch-myeloischen Leukämiezelllinie K-562 mit dem *small molecule* Telomeraseinhibitor BIBR 1532 in einer 10 µM Konzentration wurde eine Verkürzung der durchschnittlichen Telomerlänge in diesen Zellen von ursprünglich ~12 kb auf ~5 kb bzw. ~3 kb erzielt. Als Ausdruck einer Verkürzung der Telomere in einen kritischen Bereich hinein und des damit verbundenen Stresssignals für die Zellen ließ sich in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine Wachstumshemmung in den BIBR-behandelten Subpopulationen nachweisen. Dieses Phänomen ist in verschiedensten (Tumor-) Zelllinien mit unterschiedlichen Methoden der Telomerasehemmung und Telomerverkürzung nachgewiesen worden.

Dysfunktionale Telomerregionen, wie sie typisch sind für Chromosomenenden, an denen ein exzessiver Verlust an telomerischer DNA oder eine (Zer-) Störung des Heterochromatins stattge-

funden hat, sind durch die Behandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 jedoch nicht entstanden. Gesicherte Befunde für das Vorliegen von dysfunktionalen Telomerregionen wären die Aktivierung/Phosphorylierung von Proteinen der DNA-Schadenskontrolle (z.B. des Histons H2AX) oder der Nachweis von End-zu-End-Fusionen von Chromosomen in Metaphasen-Präparaten. Beides ließ sich in den BIBR-behandelten Subpopulationen der Leukämiezelllinie K-562 nicht finden. Ursache ist wahrscheinlich der pharmakologische Mechanismus der Telomerasefunktionshemmung durch BIBR 1532, der hauptsächlich eine Verlängerung der Telomere unterbindet, ohne (in der verwendeten Konzentration von 10 μM) die Enzymaktivität zu 100% zu inhibieren (Pascolo *et al.*, 2002), wodurch möglicherweise eine für die Untersuchungsergebnisse relevante Restaktivität verblieben sein könnte.

Trotz der deutlichen Verkürzung der durchschnittlichen Telomerlänge in der Leukämiezelllinie K-562 traten keine signifikanten Veränderungen der quantitativen und qualitativen Reparaturleistung für strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche auf. Ebenso wenig ließ sich eine Auswirkung auf das relative Zellüberleben nach Röntgenbestrahlung nachweisen. In der Summe gesehen bedeutet dies, dass die BIBR-behandelten Subpopulationen der Leukämiezelllinie K-562 nicht strahlensensibler sind als die unbehandelten Kontrollen mit unbeeinflusster Telomerlänge. Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist damit beantwortet (siehe 1.). Das Ergebnis scheint im Widerspruch zu Erkenntnissen zu stehen, die man aus Untersuchungen im Mausmodell mit Telomeraseaktivitätshemmung gewonnen hat. Im Mausmodell führte das Ausschalten des Genes für die Telomerase-RNA Komponente ($m\text{TERC}^{-/-}$) zu einer progredienten Telomerverkürzung, die wiederum nachweisbar mit einer Strahlensensibilisierung verknüpft war. Die möglichen Ursachen für die Diskrepanz wurden in den verschiedenen Abschnitten dieses Hauptkapitels diskutiert und sollen nun noch einmal kurz zusammengefasst werden: Wie bereits dargelegt, führte die Behandlung mit BIBR 1532 erstens unter den gegebenen Bedingungen wahrscheinlich nicht zu extrem verkürzten, dysfunktionalen Telomeren und zweitens nicht zu einem Verlust eines aktiven Telomeraseenzymkomplexes. Die Kombination aus beiden Zuständen, dysfunktionale Telomere einerseits und Telomerasedefizienz andererseits, bedingen jedoch sehr wahrscheinlich den strahlensensiblen Phänotyp im $m\text{TERC}^{-/-}$ -Mausmodell. Es ist anzunehmen, dass eine Änderung des experimentellen Aufbaus mit Herbeiführung ebendieser Situation auch zu einer Strahlensensibilisierung in der Zelllinie K-562 führen würde. Durch stabile Expression einer mutierten Form der reversen Transkriptasekomponente der Telomerase konnte in der Zelllinie K-562 bereits eine (sub-)totale Telomeraseaktivitätshemmung verbunden mit einer zügigen

Telomerverkürzung, die zu Wachstumsstopp und Apoptose führte, demonstriert werden (Tauchi *et al.*, 2002). Berichte über eine Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit in diesem Modell sind noch nicht veröffentlicht worden. Die Ergebnisse der Untersuchungen von Masutomi *et al.* (2005) lassen zudem vermuten, dass möglicherweise bereits die Hemmung der Fähigkeit der Telomerase zur Verlängerung der Telomere ausreichen würde, die Strahlenempfindlichkeit zu erhöhen. Der Nachteil eines Modells, welches auf einer Expressionsinduktion zellfremder (oder Expressionshemmung zelleigener) Proteine durch virale Transfektion beruht, ist die zurzeit noch schwierige Übertragbarkeit in die klinische Anwendung. Gerade hierin hätte ein Vorteil des *small molecule* Inhibitors BIBR 1532 gelegen, dessen Wirkung nach oraler Administration zumindest in Tierversuchen gezeigt werden konnte (Damm *et al.*, 2001).

In jedem Fall sollten weitere Experimente zur Strahlensensibilisierung durch Telomeraseinhibition und Telomerverkürzung mit humanen Zellmodellen geplant werden. Auch wenn die grundsätzlichen Aussagen der Untersuchungen im mTERC^{-/-}-Mausmodell sehr wahrscheinlich auch für humane Zellmodelle gelten, unterscheidet sich die Telomerbiologie in beiden Spezies doch in wesentlichen Punkten: So verfügen Mauszellen über eine mittlere Telomerlänge von 40-100 kb und humane Zellen gewebeabhängig über nur 9-13 kb (Kipling und Cooke, 1990; Moyzis *et al.*, 1988; Vaziri *et al.*, 1994). Im mTERC^{-/-}-Mausmodell betrug die mittlere Telomerverkürzung bei Mäusen der 6. Generation ca. 40 % der ursprünglichen Länge. Damit sind diese Telomere immer noch deutlich länger als in den unbehandelten Kontrollen der Leukämiezelllinie K-562, und die relative mittlere Verkürzung erreichte im mTERC^{-/-}-Mausmodell nicht das gleiche Ausmaß wie im Modell der K-562 Zellen mit Telomeraseinhibition durch BIBR 1532. Trotzdem kam es an einigen wenigen Chromosomen im mTERC^{-/-}-Mausmodell zum vollständigen Verlust der telomerischen DNA und in den BIBR-behandelten Subpopulationen der Zelllinie K-562 sehr wahrscheinlich nicht. Die besondere akrozentrische Form der Mauschromosomen bedingt zudem mit zunehmender Telomerverkürzung die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von End-zu-End-Fusionen, wodurch schon im unbestrahlten Zustand eine höhere genomische Instabilität und Rate an strukturellen Chromosomenaberrationen nachweisbar ist (Hande *et al.*, 1999; Rudolph *et al.*, 1999; Hao und Greider, 2004). Auch die durch Telomerdysfunktion aktivierten Signalkaskaden unterscheiden sich im System humaner Zellen verglichen mit Mauszellen (Smogorzewska und de Lange, 2002), sodass ein ähnlicher Schaden nicht zwangsläufig den gleichen Effekt hervorrufen muss. Die Ergebnisse von weiterführenden Experimenten in humanen Zellmodellen sollten daher noch interessante neue Erkenntnisse bringen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Mausmodell wurde beobachtet, dass eine gezielte Telomerverkürzung mittels Knockout des Gens für die RNA-Komponente des Telomeraseenzymkomplexes eine Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit bewirkt. Dieser Befund impliziert die Möglichkeit, dass in menschlichen Tumorzellen durch eine pharmakologisch herbeigeführte Verkürzung der Telomere ein ähnlicher Effekt erzielt werden könnte und somit durch eine kombinierte Behandlung von Tumoren mit Bestrahlung und Telomeraseinhibitoren eine Steigerung der Tumorkontrolle möglich würde.

In der vorliegenden Arbeit sollte diese Kombinationswirkung im Modell der humanen chronisch-myeloischen Leukämiezelllinie K-562 untersucht werden. Es war zuvor gezeigt worden, dass in dieser Linie durch Langzeitbehandlung mit dem Telomeraseinhibitor BIBR 1532 eine Reduktion der durchschnittlichen Telomerlänge von ursprünglich ~12 kb auf ~5 kb bzw. ~3 kb erreicht werden kann. Es wurde untersucht, welche Auswirkungen diese Telomerverkürzung auf das Wachstumsverhalten, die Zellzyklusverteilung, den induzierten Zelltod nach Bestrahlung, die qualitative und quantitative Reparaturleistungsfähigkeit für strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche und das zelluläre Überleben nach Bestrahlung hat.

Hinsichtlich des Wachstums konnte eine Verlangsamung als Ausdruck der Verkürzung der Telomere in einen kritischen Bereich hinein in den mit BIBR-behandelten Subpopulationen nachgewiesen werden. Dies wirkte sich nicht auf die Zellzyklusverteilung aus.

Die Bestimmung des Anteils irreversibel geschädigter Zellen nach Bestrahlung erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen den BIBR-behandelten Zellen mit verkürzten Telomeren und den unbehandelten Kontrollzellen, weder für eine Bestrahlung mit 3 Gy mit 24,4% im Vergleich zu 26,7% ($p=0,6302$; α -Wert: 0,01), noch mit 6 Gy mit 33,6% zu 31,9% ($p=0,7488$; α -Wert: 0,01).

Bezüglich der Reparaturleistungsfähigkeit für strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche zeigte sich ebenfalls kein Unterschied. Dies wurde zunächst überprüft durch die Bestimmung der γ -H2AX Foci pro Zelle 24 Stunden nach Bestrahlung mit 0-4 Gy ($p=0,7581$; α -Wert: 0,01). Im Folgenden zeigte die Untersuchung von Chromosomentypaberrationen nach Bestrahlung mit 0-6 Gy ebenfalls keinen Unterschied, weder in der Anzahl der letalen Chromosomenaberrationen ($p=0,0195$; α -Wert: 0,01), noch in der Anzahl der das Chromosom 7 involvierenden Translokationen ($p=0,5209$; α -Wert: 0,01). Die Bestimmung der Chromatidentypaberrationen nach Bestrahlung erbrachte sogar den Nachweis einer Reduktion dieses Aberrationstyps in den BIBR-

behandelten Zellen mit verkürzten Telomeren.

Daran anschließend zeigte sich auch beim Vergleich des Zellüberlebens nach Röntgenbestrahlung zwischen den BIBR-behandelten Zelllinien mit verkürzten Telomeren und den unbehandelten Kontrollzelllinien mit unbeeinflusster Telomerlänge kein signifikanter Unterschied.

Diese Ergebnisse scheinen im Widerspruch zu den Erkenntnissen zu stehen, wonach im Mausmodell durch eine Ausschaltung der Telomeraseaktivität eine deutliche Strahlensensibilisierung erreicht werden konnte. Allerdings sind hier unterschiedliche Effekte zu berücksichtigen: Die Behandlung mit BIBR 1532 führt möglicherweise nicht zu extrem verkürzten, dysfunktionalen Telomeren wie nach dem Knockout der Telomerase im Mausmodell, vor allem aber bewirkt sie keinen Verlust des aktiven Telomeraseenzymkomplexes. Gerade die Kombination dieser beiden Bedingungen, dysfunktionale Telomere einerseits und absolute Telomerasedefizienz andererseits, scheinen jedoch den strahlensensiblen Phänotyp im mTERC^{-/-}-Mausmodell zu bewirken. Dem Ziel, solche Bedingungen in einem humanen Zellmodell herzustellen, ist man durch die stabile Expression mutierter Formen der reversen Transkriptasekomponente der Telomerase in immortalisierten Fibroblasten bereits nähergekommen. Detaillierte Untersuchungen zur Strahlensensibilität eines solchen Modells liegen noch nicht vor. Der Nachteil dieses Modells, welches auf der Expressionsinduktion zellfremder (oder Expressionshemmung zelleigener) Proteine durch virale Transfektion beruht, ist außerdem die zurzeit noch schwierige Übertragbarkeit in die klinische Anwendung. Gerade hierin hätte der besondere Vorteil des *small molecule* Inhibitors BIBR 1532 gelegen, dessen Wirkung nach oraler Administration zumindest schon in Tierversuchen gezeigt werden konnte.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Asai A, Oshima Y, Yamamoto Y, Uochi T, Kusaka H, Akinaga S, Yamashita Y, Pongracz K, Pruzan R, Wunder E, Piatyszek M, Li S, Chin AC, Harley CB, Gryaznov S (2003) A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent. *Cancer Res* 63: 3931-3939
- Autexier C, Lue NF (2006) The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu Rev Biochem* 75: 493-517
- Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L (2001) Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* 21(18): 6151-6160
- Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ (1994) Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukaemia. *Blood* 83(9): 2038-2044
- Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D (1986) The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 233: 212-214
- Blackburn EH, Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol* 120: 33-53
- Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW (2006) Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena, and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 12(10): VII-XII
- Blasco MA (2005a) Mice with bad ends: Mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging. *EMBO* 24(6): 1095-1103
- Blasco MA (2005b) Telomeres and human disease: ageing, cancer, and beyond. *Nature reviews genetics* 6: 611-622
- Blasco MA, Lee H-W, Hande MP, Samper E, Lansdorp M, DePinho RA, Greider CW (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91: 25-34
- Blasco MA, Rizen M, Greider CW, Hanahan D (1996) Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nat Genet* 12(2): 200-204
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu C-P, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352
- Borgmann K (1999) Untersuchung strahleninduzierter Chromosomenschäden in Säugertierzellen. Dissertation der Fakultät für Biologie der Universität Hamburg
- Bradshaw PS, Stavropoulos DJ, Meyn MS (2005) Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nat Genet* 37(2): 193-197

- Broccoli D, Godley LA, Donehower LA, Varmus HE, de Lange T (1996) Telomerase activation in mouse mammary tumors: Lack of detectable telomere shortening and evidence for regulation of telomerase RNA with cell proliferation. *Mol Cell Biol* 16(7): 3765-3772
- Brown T, Sigurdson E, Rogatko A, Broccoli D (2003) Telomerase inhibition using azidothymidine in the HT-29 colon cancer cell line. *Ann Surg Oncol* 10(8): 910-915
- Brümmendorf TH, Holyoake TL, Rufer N, Barnett MJ, Schulzer M, Eaves CJ, Eaves AC, Lansdorp PM (2000) Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukaemia measured by flow cytometry. *Blood* 95(6): 1883-1890
- Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR (1995) Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO* 14(17): 4240-4248
- Bryant PE (2004b) Repair and chromosomal damage. *Radiother Oncol (Ireland)* 72(3): 251-256
- Bryant PE, Gray L, Riches AC, Steel CM, Finnon P, Howes O, Kesterton I, Vral A, Curwen GB, Smart V, Twan EJ, Whitehouse CA (2002) The G2 chromosomal radiosensitivity assay. *Int J Radiat Biol* 78(9): 863-866
- Bryant PE, Gray LJ, Peresse N (2004a) Progress towards understanding the nature of chromatid breakage. *Cytogenet Genome Res* 104: 65-71
- Campbell LJ, Fidler C, Eagleton H, Peniket A, Kusec R, Gal S, Littlewood TJ, Wainscoat JS, Boulton J (2006) hTERT, the catalytic component of telomerase, is downregulated in the haematopoietic stem cells of patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 20(4): 671-679
- Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23: 2825-2837
- Celli GB, Denchi EL, de Lange T (2006) Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nat Cell Biol* 8(8): 885-890
- Chai W, Du Q, Shay JW, Wright WE (2006a) Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. *Mol Cell* 21: 427-435
- Chai W, Sfeir AJ, Hoshiyama H, Shay JW, Wright WE (2006b) The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. *EMBO Rep* 7(2): 225-230
- Cong Y-S, Wright WE, Shay JW (2002) Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(3): 407-425
- Cookson JC, Dai F, Smith V, Heald RA, Loughton CA, Stevens MFG, Burger AM (2005) Pharmacodynamics of the G-quadruplex-stabilizing telomerase inhibitor 3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8H-quino[4,3,2-kl]acridinum methosulfate (RHPS4) in vitro: activity in human tumor cells correlates with telomere length and can be enhanced, or antagonized, with cytotoxic agents. *Mol Pharmacol* 66(6): 1551-1558

- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre E, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO* 11(5): 1921-1929
- Crissman HA, Oka MS, Steinkamp JA (1976) Rapid staining methods for analysis of deoxyribonucleic acid and protein in mammalian cells. *J Histochem Cytochem* 24(1): 64-71
- D'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson St (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426: 194-198
- D'Adda di Fagagna F, Teo S-H, Jackson SP (2004) Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* 18: 1781-1799
- Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Huel N, Kauffmann I, Priepke H, Niestroj C, Daiber C, Enekel B, Guilliard B, Lauritsch I, Müller E, Pascolo E, Sauter G, Pantic M, Martens UM, Wenz C, Lingner J, Kraut N, Rettig WJ, Schnapp A (2001) A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J* 20(24): 6958-6968
- De Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19: 2100-2110
- Dikmen ZG, Gellert GC, Jackson S, Gryaznov S, Tressler R, Dogan P, Wright WE, Shay JW (2005) *In vivo* inhibition of lung cancer by GRN163L: A novel human telomerase inhibitor. *Cancer Res* 65: 7866-7873
- Dikomey E, Dahm-Daphi J, Kasten U (2001) DNA-Schäden und ihre Reparatur. In: Freyschmidt J (Hrsg). *Handbuch Diagnostische Radiologie*. Springer-Verlag, Berlin
- Drummond MW, Balabanov S, Holyoake TL, Brümmendorf TH (2007) Concise Review: Telomere biology in normal and leukemic hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 25: 1853-1861
- Drummond MW, Hoare SF, Monaghan A, Graham SM, Alcorn MJ, Keith WN, Holyoake TL (2005) Dysregulated expression of the major telomerase components in leukaemic stem cells. *Leukemia* 19(3): 381-389
- E-Daly H, Kull M, Zimmermann St, Pantic M, Waller CF, Martens UM (2005) Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR 1532. *Blood* 105(4): 1742-1749
- Espejel S, Franco S, Sgura A, Gae D, Bailey SM, Taccioli GE, Blasco MA (2002) Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. *EMBO* 21(22): 6275-6287
- Feng J, Funk WD, Wang S-S, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu C-P, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, Le S, West MD, Harley CB, Andrews WH, Greider CW, Villeponteau B (1995) The RNA component of human telomerase. *Science* 269: 1236-1241
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004) H2AX: the histone guardian of the genome (Review). *DNA Repair* 3: 959-967

- Gellert GC, Dikmen ZG, Wright WE, Gryaznov S, Shay JW (2006) Effects of novel telomerase inhibitor, GRN163L, in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 96: 73-81
- Goytisolo FA, Samper E, Martin-Caballero J, Finnon P, Herrera E, Flores JM, Bouffler SD, Blasco MA (2000) Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *J Exp Med* 192(11): 1625-1636
- Gray JW (1974) Cell cycle analysis from computer synthesis of deoxyribonucleic acid histograms. *J Histochem Cytochem* 22(7): 642-650
- Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405-413
- Greider CW, Blackburn EH (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337: 331-337
- Griffith JD, Corneau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97: 503-514
- Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JHM, Meyerson M, Weinberg RA (1999) Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 5(10): 1164-1170
- Hall EJ (1987) *Radiobiology for the Radiologist*, 3Rev Ed, J.B. Lippincott Company, Philadelphia
- Hande MP (2004) DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Res* 104: 116-122
- Hande MP, Balajee AS, Tchirkov A, Wynshaw-Boris A, Lansdorp PM (2001) Extrachromosomal telomeric DNA in cells from ATM(-/-) mice and patients with ataxia-teleangiectasia. *Hum Mol Genet* 10: 519-528
- Hande MP, Samper E, Lansdorp P, Blasco MA (1999) Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J Cell Biol* 144(4): 589-601
- Hao L-Y, Greider CW (2004) Genomic instability in both wild-type and telomerase null MEFs. *Chromosoma* 113: 62-68
- Hao L-Y, Strong MA, Greider CW (2004) Phosphorylation of H2AX at short telomeres in T cells and fibroblasts. *J Biol Chem* 279(43): 45148-45154
- Harley CB (2002) Telomerase is not an oncogen. *Oncogen* 21: 494-502
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460
- Harrington L, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Yeung DSK, Mar V, Bass MB, Robinson MO (1997) Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev* 11: 3109-3115

- Hartmann U (2005) Telomerlänge und Telomeraseaktivität, sowie deren pharmakologische Modulation in myeloischen Leukämien. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Hartmann U, Brümmendorf TH (2003) Telomerase-Hemmstoffe: Ein neuer Ansatz für die Behandlung maligner Tumoren. *Arzneimitteltherapie* 21: 176-185
- Hayflick L (1979) The cell biology of aging. *The journal of investigative dermatology* 73: 8-14
- Hemann MT, Strong MA, Hao L-Y, Greider CW (2001) The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107: 67-77
- Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR (2002) Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 21: 598-610
- Herbert B-S, Pitts AE, Baker SI, Hamilton SE, Wright WE, Shay JW, Corey DR (1999) Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *PNAS* 96(25): 14276-14281
- Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DG, Shay JW, Wright WE, White MA (1999) Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* 13: 817-826
- Incles CM, Schultes CM, Kempinski H, Koehler H, Kelland LR, Neidle S (2004) A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 3(10): 1201-1206
- Jo W-S, Jeong Y-H, Jang J-Y, Nam B-H, Son S-H, Choi S-S, Yoo Y-H, Kang C-D, Lee J-D, Jeong S-J (2005) Loss of mitochondrial membrane potential and caspase activation enhance apoptosis in irradiated K-562 cells treated with herbimycin A. *Int J Radiat Biol* 81(7): 531-543
- Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist Ch, Kastan MB, Petrini JH, de Lange T (2004) The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLOS Biol* 2: 1150-1156
- Kelland LR (2005) Overcoming the immortality of tumour cells by telomere and telomerase based cancer therapeutics – current status and future prospects. *Eur J Cancer* 41: 971-979
- Kelleher C, Kurth I, Lingner J (2004) Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro. *Mol Cell Biol* 25(2): 808-818
- Killemann U, Schneider E (2004) Vergleich verschiedenster Methoden zur Bestimmung von Zellzahlen und Zellvitalitäten bei der Optimierung der Formulierung von Kulturmedien mit Hybridoma-Zellen. *BIOspektrum* 1(10): 112-114
- Kim MM, Rivera MA, Botchkina IL, Shalaby R, Thor AD, Blackburn HH (2001) A low threshold level of expression of mutant-template telomerase RNA inhibits human tumor cell proliferation. *PNAS* 98(14): 7982-7987
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015

- Kipling D, Cooke HJ (1990) Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347: 400-402
- Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON (1984) An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37(3): 1035-1042
- Latre L, Tusell L, Martin M, Miro R, Egozcue J, Blasco MA, Genesca A (2003) Shortened telomeres join to DNA breaks interfering with their correct repair. *Exp Cell Res* 287: 282-288
- Lavin MF, Khanna KK (1999) ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol* 75(10): 1201-1214
- Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 225(4): 951-960
- Loayza D, de Lange T (2003) POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 423: 1013-1018
- Lozzio CB, Lozzio BB (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. *Blood* 45(3): 321-334
- Lundblad V (2003) Telomere replication: An EST fest. *Curr Biol* 13: R439-R441
- Masutomi K, Possemato R, Wong JMY, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, Ganesan S, Lansdorp PM, Collins K, Hahn WC (2005) The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *PNAS* 102(23): 8222-8227
- Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC (2003) Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114: 241-253
- McClintock B (1941) The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26: 234-282
- McGahon AJ, Brown DJ, Martin SJ, Amarante-Mendes GP, Cotter TG, Cohen GM, Green DR (1997) Downregulation of BCR-ABL in K-562 cells restores susceptibility to apoptosis: characterization of the apoptotic death. *Cell Death and Differentiation* 4: 95-104
- McIlrath J, Bouffler SD, Samper E, Cuthbert A, Wojcik A, Szumiel I, Bryant PE, Riches AC, Thompson A, Blasco MA, Newbold RF, Slijepcevic P (2001) Telomere length abnormalities in mammalian radiosensitive cells. *Cancer Res* 61: 912-915
- Mergny J-L, Riou J-F, Mailliet P, Teulade-Fichou M-P, Gilson E (2002) Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res* 30(4): 839-865
- Metcalf JA, Parkhill J, Campbell L, Stacey M, Biggs P, Byrd PJ, Taylor AM (1996) Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia. *Nat Genet* 13(3): 350-353
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7049-7053
- Morin GB (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59: 521-529

- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu J-L (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* 85: 6622-6626
- Müller HJ (1938) The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* 13: 181-198 zitiert nach: Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW (2006) Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena, and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 12(10): VII-XII
- Müller S, Hartmann U, Mayer F, Balabanov S, Hartmann JT, Brümmendorf TH, Bokemeyer C (2007) Targeting telomerase activity by BIBR 1532 as a therapeutic approach in germ cell tumors. *Invest New Drugs* 25: 519-524
- Muntoni A, Reddel RR (2005) The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet* 14: R191-R196
- Myung K, Ghosh G, Fattah FJ, Li G, Kim H, Dutia A, Pak E, Smith S, Hendrickson EA (2004) Regulation of telomere length and suppression of genomic instability in human somatic cells by Ku86. *Mol Cell Biol* 24(11): 5050-5059
- Nazarov IB, Smirnova AN, Krutilina RI, Svetlova MP, Solovjeva LV, Nikiforov AA, Oei S-L, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM, Tomilin NV (2003) Dephosphorylation of histone γ -H2AX during repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells and its inhibition by calyculin A. *Radiat Res* 160: 309-317
- Ohyashiki JH, Sashida G, Tauchi T, Ohyashiki K (2002) Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene* 21: 680-687
- Okada H, Mak TW (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4: 592-603
- Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41(1): 181-190
- Pascolo E, Wenz C, Lingner J, Huel N, Priepke H, Kauffmann I, Garin-Chesa P, Rettig WJ, Damm K, Schnapp A (2002) Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR 1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *J Biol Chem* 277(18): 15566-15572
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridisation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934-2938
- Puerto S, Surrallés J, Ramírez MJ, Creus A, Marcos R (1999) Equal induction and persistence of chromosome aberrations involving chromosomes with heterogeneous lengths and gene densities. *Cytogenet Cell Genet* 87: 62-68
- Ramirez RD, Morales CP, Herbert B-S, Rohde JM, Passons C, Shay JW, Wright WE (2001) Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* 15: 398-403
- Reaper PM, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP (2004) Activation of DNA damage response by telomere attrition. *Cell Cycle* 3(5): 543-546

- Robert-Koch-Institut (Hrsg) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2008) Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner W (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146(5): 905-915
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner W (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273(10): 5858-5868
- Rudolph KL, Chang S, Lee H-W, Blasco MA, Gottlieb GJ, Greider CW, DePinho RA (1999) Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96: 701-712
- Savage JR (1975) Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet* 12: 103-122
- Sax K (1940) An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. *Genetics* 25: 41-68
- Scott D, Spreadborough AR, Jones L, Roberts SA, Moore CJ (1996) Chromosomal radiosensitivity in G2-phase lymphocytes as an indicator of cancer predisposition. *Radiat Res* 145: 3-16
- Seimiya H, Oh-hara T, Suzuki T, Naasani I, Shimazaki T, Tsuchiya K, Tsuruo T (2002) Telomere shortening and growth inhibition of human cancer cells by novel synthetic telomerase inhibitors MST-312, MST-295, and MST-199. *Mol Cancer Ther* 1: 657-665
- Shay JW, Keith WN (2008) Targeting telomerase for cancer therapeutics. *Br J Cancer* 98(4): 677-683
- Shay JW, Wright WE (2000) Hayflick, his limit, and cellular aging. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 72-76
- Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: Safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3: 155-168
- Slijepcevic P (2006) The role of DNA damage response proteins at telomeres – an „integrative“ model. *DNA Repair* 5(11): 1299-1306
- Smogorzewska A, de Lange T (2002) Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO* 21(16): 4338-4348
- Smogorzewska A, de Lange T (2004) Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 73: 177-208
- Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 20(5): 1659-1668
- Swiggers SJJ, Nibbeling HAJ, Zeilemaker A, Kuijpers MA, Mattern KA, Zijlmans JM (2004) Telomerase activity level, but not hTERT mRNA and hTR level, regulates telomere length in telomerase-reconstituted primary fibroblasts. *Exp Cell Res* 297: 434-443
- Takai H, Smogorzewska A, de Lange T (2003) DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 13: 1549-1556

- Tanaka H, Mendonca MS, Bradshaw PS, Hoelz DJ, Malkas LH, Meyn MS, Gilley D (2005) DNA damage-induced phosphorylation of the human telomere-associated protein TRF2. *PNAS* 102(43): 15539-15544
- Tauchi T, Nakajima A, Sashida G, Shimamoto T, Ohyashiki JH, Abe K, Yamamoto K, Ohyashiki K (2002) Inhibition of human telomerase enhances the effect of the tyrosine kinase inhibitor, Imatinib, in BCR-ABL positive leukemia cells. *Clin Cancer Res* 8: 3341-3347
- Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP (2006) Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* 17: 955-965
- Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM (1994) Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9857-9860
- Wang ES, Wu K, Chin AC, Chen-Kiang S, Pongracz K, Gryaznov S, Moore MA (2004) Telomerase inhibition with an oligonucleotide telomerase template antagonist: in vitro and in vivo studies in multiple myeloma and lymphoma. *Blood* 103(1): 258-266
- Ward RJ, Autexier C (2005) Pharmacological telomerase inhibition can sensitize drug-resistant and drug-sensitive cells to chemotherapeutic treatment. *Mol Pharmacol* 68(3): 779-786
- Watson JD (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239(94): 197-201 zitiert nach: Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460
- Wellinger RJ, Ethier K, Labrecque P, Zakian VA (1996) Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* 85: 423-433
- Wenz C, Enenkel B, Amacker M, Kelleher C, Damm K, Lingner J (2001) Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO* 20(13): 3526-3534
- Wong K-K, Chang S, Weiler SR, Ganesan S, Chaudhuri J, Zhu C, Artandi SE, Rudolph KL, Gottlieb GJ, Chin L, Alt FW, DePinho RA (2000) Telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Nat Genet* 26: 85-88
- Ye JZ, Donigian JR, van Ovenbeek M, Loayza D, Luo Y, Krutschinsky AN, Chait BT, de Lange T (2004) TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem* 279(45): 47264-47271
- Yoshimura SH, Maruyama H, Ishikawa F, Ohki R, Takeyasu K (2004) Molecular mechanisms of DNA end-loop formation by TRF2. *Genes Cells* 9: 205-218

8. LEBENS LAUF

Persönliche Angaben:

Name: Bali, geb. Rößler
Vorname: Daniel
Geburtsdatum: 04.12.1973
Geburtsort: Jena
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

bis 1993 Besuch des Elisabeth-Gymnasium in Marburg bis zur Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst:

1993-1994 Krankenpflege auf einer unfallchirurgischen Station am Universitätsklinikum Marburg

Studium:

1994-2002 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
Sep. 1996 Physikum
Aug. 1997 1. Staatsexamen
Sep. 2001 2. Staatsexamen
Nov. 2002 3. Staatsexamen
2001-2002 Praktisches Jahr am Klinikum Kassel

Berufliche Laufbahn:

2003-2005 Arzt im Praktikum und Assistenzarzt in der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie im Elbe-Klinikum Stade unter der Leitung von Prof. Dr. med. Benno Stinner
2006 Promotionsarbeit im Institut für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey
seit 2007 Assistenzarzt in der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie im Elbe-Klinikum Stade unter der Leitung von Dr. med. Jörg Franke

Publikationen:

- Bali D** (2007) Antibakterieller Wundverband Cutisorb[®] Sorbact[®] in der primären Behandlung traumatisch bedingter Wunden zur Prophylaxe von Wundinfektionen. Praxis aktuell. Verlag für Medizinische Publikationen. Bernd v. Hallern (Hrsg.)
- Kulaksiz H, Eissele R, **Rössler D**, Schulz S, Höllt V, Cetin Y, Arnold R (2002) Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. Gut 50: 52-60

Präsentationen:

- Bali D**, Brassat U, Wrona A, Borgmann K, Brümmendorf T, Dikomey E (2006) Telomer shortening does not alter radiosensitivity in the chronic myeloid leukaemia cell line K-562 treated with the telomerase inhibitor BIBR 1532. Poster Session IV: Nonhomologous end joining & Carcinogenesis. DNA Repair 2006: 9th Biennial Meeting of the DGDR (German Society of Research on DNA Repair), Hamburg
- Rößler D**, Stinner B, Nekarda H, Gehring C (2004) Die Spitze des Eisbergs – Seltene Ursache eines Flankenabszesses. Poster: Klinische Fallvorstellungen. 174. Tagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen, Hamburg
- Rößler D**, Stinner B (2003) Worst case scenario: Vollständige Kolonnekrose nach Lyse und Stent-Therapie einer Beckenarterie bei AVK Stadium IIb. Klinische Falldemonstrationen. 172. Tagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen, Hamburg
- Rößler D**, Stinner B (2003) Ungewöhnlicher Ileus in der Tumornachsorge: Digitale Untersuchung lohnt sich auch nach Rektumamputation. Klinische Falldemonstrationen. 171. Tagung der Vereinigung Nordwestdeutscher Chirurgen, Bremen

9. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit ist durch eine Kooperation des Labors für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie und des Hämatologisch-Zytologischen Labors der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entstanden. Viele haben zum Gelingen beigetragen und ich danke allen herzlich dafür.

Dr. Kerstin Borgmann gilt mein allergrößter Dank. Sie hat die vorliegende Arbeit initiiert und betreut. Durch ihre Hilfe und stetigen Antrieb habe ich einen Einblick in das weite wissenschaftliche Feld der Strahlenbiologie und Radioonkologie erlangen und mir das Wissen für die Durchführung der Experimente erarbeiten können. Ihr mitreißender Tatendrang und ihr Optimismus haben mich immer wieder neu motiviert und mir geholfen, schwierige Situationen zu meistern. So wichtig ihre Hilfe für den experimentellen Teil der Arbeit war, so unschätzbar war ihre Unterstützung während der Erstellung der Dissertationsschrift. Ihre Ratschläge, kritischen Anmerkungen und das stets richtige Maß an „Leistungsdruck“ waren sehr wertvoll und letztlich für den erfolgreichen Abschluss der Arbeit ausschlaggebend.

Prof. Dr. Ekkehard Dikomey danke ich für die Gewährung der Möglichkeit, im Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie zu promovieren. Die gesammelten Erfahrungen des einen Forschungsjahres und die Eröffnung neuer beruflicher Perspektiven daraus bedeuten mir viel. Speziellen Dank möchte ich ihm für die Möglichkeit der Teilnahme, Mitgestaltung und Datenpräsentation auf dem „DNA Repair 2006“-Meeting aussprechen.

Prof. Dr. Tim Brümmendorf, Dr. Dr. Stefan Balabanov und Ute Brassat der Arbeitsgruppe „Telomer- und Stammzellbiologie“ des Hämatologisch-Zytologischen Labors der II. Medizinischen Klinik danke ich für die hervorragende Kooperation, das kollegiale Miteinander und die fruchtbaren Diskussionen. Prof. Brümmendorf danke ich zudem für die Übernahme des Zweitgutachtens. Auf Ute war absolut Verlass bei der „Lieferung“ von neuen Zellkulturen, vielen Dank dafür!

Großen Dank schulde ich allen Kolleginnen von Kerstins Arbeitsgruppe für die tatkräftige und stets geduldige Hilfe sowie für die freundliche Aufnahme in ihr Labor. Insbesondere von Agnieszka Wrona und Alexandra Zielinski bin ich hervorragend betreut worden. Agnieszka hat mich nicht nur in den überwiegenden Teil der Experimente eingeführt, sondern stand mir bei allen Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite und hatte stets ein offenes Ohr für meine vielen

Fragen, trotz ihrer eigenen Promotionsarbeit mit immer übervollem Labortermplan.

Dr. Ulla Kasten-Pisula, Dr. Ingo Brammer, Dr. Oliver Zschenker und PD Dr. Jochen Dahm-Daphi danke ich für die vielen anregenden Gespräche, die wissenschaftliche Unterstützung und die fundierte Hilfestellung bei Problemen. Dr. Dahm-Daphi danke ich zudem für die Übernahme des Drittgutachtens und für die gemeinsame Zeit der Medizinstudentenbetreuung.

Für ihre Geduld, für ihren Rat, für ihren Zweifel, für ihre eingebrachte Zeit, für ihren Ansporn, für ihre besondere Expertise und für ihre Zuneigung danke ich meiner Frau.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(Eigennamen von Proteinen, Proteinkomplexen o.ä. in Kursivschrift)

ALT	<i>alternative lengthening of telomeres</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
Bcr-Abl-Protein	<i>Breakpoint cluster region</i> Abelson-Maus-Leukämie Protein
BSA	Rinderserumalbumin
CML	Chronisch myeloische Leukämie
DAPI	Diamidinophenylindoldihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DSB	Doppelstrangbruch
EST1 A+B	<i>ever shorter telomeres 1 A+B</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
hRap1	<i>human repressor/activator protein 1</i>
kb	Kilobasenpaare
Ku	<i>Ku antigene protein</i>
MRN-Komplex	Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex
NHEJ	Nichthomologes "End joining"
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PI	Propidiumjodid
POT1	<i>protection of telomeres 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
SSC	Kochsalzzitratlösung
TANK1+2	<i>tankyrase 1+2</i>
TERC	<i>telomerase RNA component</i>
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
TIN2	<i>TRF1 interacting nuclear protein 2</i>
TRF1+2	<i>telomeric repeat binding factor 1+2</i>

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.



Daniel Böhler