

Institut für Pathologie und Rechtsmedizin  
Abteilung Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. P. Möller

**Eine Methode zur quantitativen und  
chromosomenspezifischen Telomermessung  
(Verbesserung der Q-FISH Methode von PM Lansdorp)**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

**Silke Brüderlein**

aus  
Nürnberg

Ulm 2000

**Amtierender Dekan: Prof. Dr. P. Giersch**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Möller**

**2. Berichterstatter: PD Dr. M. Wabitsch**

**Tag der Promotion: 9.2.2001**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
1.1 TELOMERE	3
1.2 PNA-SONDEN	5
1.3 FLUORESZENZMIKROSKOPIE:	7
1.4 FRAGESTELLUNG	8
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>9</b>
2.1 GERÄTE	9
2.2 CHEMIKALIEN UND MEDIEN	10
2.3 LÖSUNGEN	11
2.4 UNTERSUCHUNGSMATERIALIEN	13
2.5 CHROMOSOMENPRÄPARATION	14
2.6 FLUORESZENZ <i>IN-SITU</i> HYBRIDISIERUNG (FISH) MIT PNA-SONDEN	15
2.7 SOFTWARE	17
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>18</b>
3.1 VON EINER METAPHASE ZUM DIAGRAMM	18
3.2 VERGLEICH DER ERGEBNISSE AUS VERSCHIEDENEM UNTERSUCHUNGSMATERIAL:	21
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>25</b>
4.1 VERGLEICH DER METHODEN:	25
4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE:	29
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG:</b>	<b>34</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>36</b>

<b>7 PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>41</b>
----------------------------	-----------

---

<b>8 DANKSAGUNG</b>	<b>45</b>
---------------------	-----------

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Telomere

Telomere allgemein:

Das Wort „Telomer“ leitet sich aus dem Griechischen telos = Ende und meros = Teil ab. Telomere sind repetitive Sequenzen an den Enden von Chromosomen.

Sie sind in der Evolution hoch konserviert (zum Beispiel bei Vertebraten:

(TTAGGG)<sub>n</sub>, bei Pflanzen: (TTTAGGG)<sub>n</sub>), allerdings in ihrer Kopienzahl stark

unterschiedlich. Speziesabhängig kann sie zwischen wenigen hundert bis

mehreren tausend variieren: So ist zum Beispiel die durchschnittliche

Telomerlänge des Menschen 5 – 14 kbp lang, bei anderen Primaten etwa 23 kbp

und bei der Maus etwa 40 kbp (Slijepcevic et al., 1999; Kakuo et al., 1999).

Ebenso variiert die Telomerlänge verschiedener Zellen innerhalb eines

Individuums. Beim Menschen beträgt die Telomerlänge in Gameten 12 – 20 kbp,

in adulten, somatischen Zellen 5 – 15 kbp (de Lange et al., 1990).

Das Hayflick-Phänomen:

Hayflick und Moorehead fanden 1961 heraus, dass sich Fibroblasten, gewonnen aus humaner Vorhaut junger Probanden, *in-vitro* ca. 40-50 x teilen und dann

absterben (Hayflick und Moorehead, 1961). Weitere Arbeiten zeigten, dass die

Teilungsrate von Fibroblasten in Kultur, mit zunehmenden Alter des Menschen,

aus dem sie stammen, geringer wird (Hayflick, 1965; Witkowski, 1985). Es scheint

also so, dass die Anzahl der möglichen Zellteilungen genetisch determiniert und

mit dem Lebensalter direkt korreliert ist.

Das Watson/Crick-Replikationsproblem:

James D. Watson entdeckte 1972, dass sich - bedingt durch eine ausschließliche

5' → 3'-Replikation - die DNA in den Chromosomen mit jeder Zellteilung an den

Enden um ein kleines Stück verkürzen muss (Watson, 1972). Hieraus konnte der

Schluss gezogen werden, dass die, bei der Mitose „verlorenen“ gegangenen

Chromosomen-Endstücke – die heute „Telomere“ genannt werden - keine

essentielle Erbinformationen enthalten können. Die lineare Struktur von eukaryotischen Chromosomen und die Unidirektionalität der DNA-Polymerase sind ein Phänomen, das als End-Replikationsproblem bekannt ist (Olovnikov, 1971; 1973; Watson, 1972).

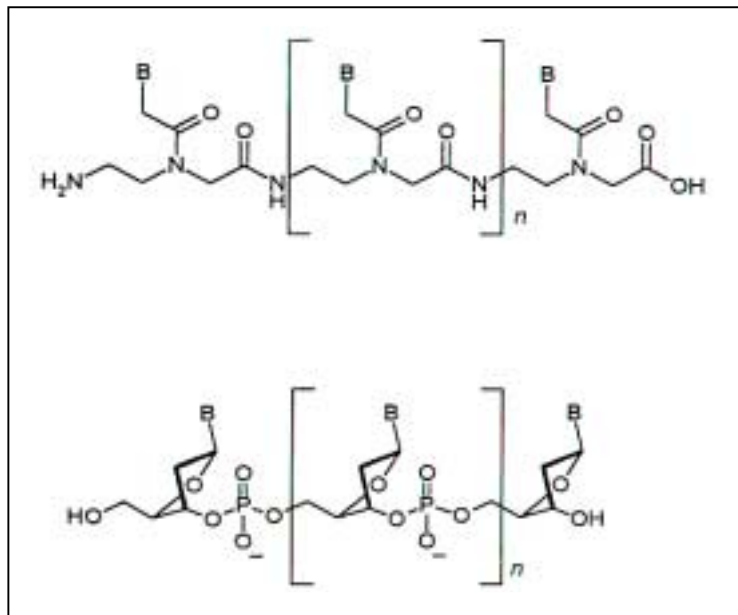
Ohne einen Mechanismus, der für den Erhalt der Telomersequenz sorgt, erodieren diese kritischen Regionen sukzessive durch inkomplette DNA-Replikation. Dabei verkürzen sich die Telomere in vielen humanen somatischen Geweben pro Zellteilung um ungefähr 50 bis 100 Basenpaare. Um eine Telomerverkürzung zu vermeiden, gibt es in vielen eukaryotischen Zellen eine telomerspezifische Polymerase, die sogenannte „Telomerase“ (Greider, 1996). Die Telomerase enthält ein Stück RNA-Sequenz komplementär zur entsprechenden Telomersequenz und benützt dieses als Template und Startpunkt für die de-novo-Synthese telomerischer DNA. Auf diese Weise können Zellen mit Telomeraseaktivität ihre Telomerlänge stabil halten.

Telomerlänge als „mitotische Uhr“:

Die Erhaltung der Telomerlänge scheint der kritische Punkt beim Prozess der Immortalisierung zu sein. Da die meisten somatischen Zellen Telomerase-negativ sind, verkürzen sich bei jeder Zellteilung die Telomerlängen nach und nach (Harley, 1995). Diese Tatsache führte zu der Annahme, dass Telomere als eine Art „mitotische Uhr“ fungieren: Sobald eine kritische Telomerlänge erreicht ist, treffen die Zellen auf eine Proliferationsbarriere: Im Normalfall erreichen sie hier das Stadium der Seneszenz und gehen in Apoptose. In seltenen Fällen kann an dieser Stelle auch, durch die Induktion der Telomeraseaktivität, eine potentielle Tumorzelle entstehen (Aviv u. Aviv, 1998)

## 1.2 PNA-Sonden

Peptidnukleinsäuren wurden zum ersten Mal 1991 von Nielsen und Mitarbeitern (Nielsen et al., 1991) beschrieben: Es sind künstlich hergestellte Moleküle, deren „Rückgrat“ eine N-(2-Aminoethyl)glycin-Polyamidstruktur darstellt, an der – analog zu einer Nukleinsäure – die Basen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin hängen können. Da normalerweise schon geringe strukturelle Änderungen im DNA-Molekül zu einer verringerten Bindungsaffinität führen, ist es erstaunlich, dass im Falle der PNA-Nukleinsäureanaloge eine höhere Affinität zu normaler DNA oder RNA entstand. Diese außergewöhnliche Bindungseigenschaften der PNAs machen sie zu hervorragenden Werkzeugen in Molekularbiologie und Medizin. Eine Übersicht über PNA und ihre Bindungseigenschaften beschreibt Uhlmann und Mitarbeiter 1998 (Uhlmann et al., 1998). Eine Zusammenfassung über deren zukünftige, potentielle Verwendung in der Medizin (auf die hier nicht eingegangen wird) beschreibt Nielsen (Nielsen, 1999).



**Abb. 1: Strukturformeln von PNA (oben) und DNA (unten)  
B = Nucleobase**

Die Hauptunterschiede zwischen DNA- und PNA-Molekülen sind zum einen die extreme Enzymstabilität von PNA und zum anderen, dass sie, im Gegensatz zu DNA, ein flexibles, chemisch ungeladenes Peptid-Rückgrat besitzen.

Nahezu unabhängig von Salzkonzentrationen sind sie in der Lage an eine DNA-Doppelhelix, unter Verdrängung eines DNA-Stranges, an die zu ihr komplementären Sequenz zu hybridisieren.

Dabei ist die Spezifität so hoch, dass bereits die Veränderung einer einzigen Base in der DNA-Matrize zu einem Hybridisierungsabbruch führt.

**Tab. 1: Vergleichende Eigenschaften von DNA und PNA (Uhlmann et al., 1998)**

<b>Desoxyribonukleinsäure</b>	<b>Peptidnukleinsäure</b>
Nomenklatur: „ATGC“	Nomenklatur: „atgc“
negativ geladen	ungeladen, neutral
Schmelzpunkt bei 100 mM NaCl 54°C	Schmelzpunkt bei 100 mM NaCl 69°C
stark ionenabhängig	wenig ionenabhängig
Löslichkeit gut	Löslichkeit beschränkt
säure-instabil	säure-stabil
enzym-instabil	enzym-stabil
Halbwertszeit in Serum wenige Minuten	Halbwertszeit in Serum > 48 Stunden
Bindung nur an einzelsträngige NS	Bindung auch an doppelsträngige NS
Bindung an Serumproteine	keine Bindung an Serumproteine
Hybridisierung an RNA schlecht	Hybridisierung an RNA gut
Hybridisierung in antiparalleler Richtung	Hybridisierung in beide Richtungen
kein Nachweis von Punktmutationen	Nachweis von Punktmutationen möglich



### 1.3 Fluoreszenzmikroskopie:

Fluoreszenzmoleküle absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren dieses bei einer anderen, längeren Wellenlänge. Die verschiedenen Fluorophore zeigen ganz bestimmte Absorptionsspektren, die im Wesentlichen vom inneren Aufbau der Fluoreszenzmoleküle abhängen. Unter Bestrahlung wird ein Photon absorbiert, das dadurch ein Elektron auf eine höhere Energieebene hebt. Beim Zurückfallen auf den ursprünglichen Energiestatus wird die frei werdende Energie in Form von Fluoreszenz wieder abgegeben. Dieses Phänomen macht sich die Fluoreszenzmikroskopie zu nutze. Das Präparat wird mit einem bestimmten Farbstoff angefärbt – zum Beispiel mit Indocarbocyanin (Cy3). In diesem Fall regt man das Molekül mit Licht einer Wellenlänge von 649 nm an, was zu einem Emissionsmaximum von 670 nm führt. Angefärbte Strukturen leuchten dann rot. In der Regel werden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet; einer zum Anfärben der zu untersuchenden, spezifischen Struktur und einer zur Gegenfärbung. Diese beiden Farbstoffe sollten in der Extinktion mindestens 100 nm auseinanderliegen. In unserem Falle wurde DAPI als Gegenfarbstoff verwendet mit einer Extinktion von 350 nm. Eine kurze Übersicht über Fluoreszenzmikroskopie beschreibt Kapitza in „Mikroskopieren von Anfang an“ ( Kapitza,1997).

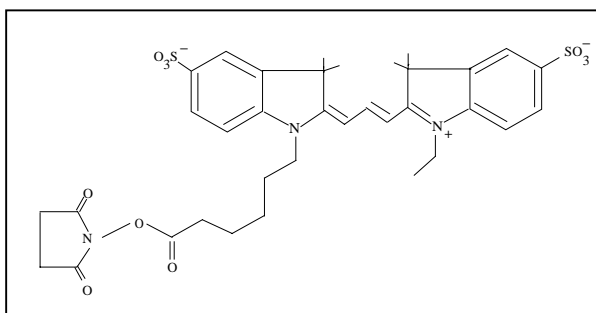


Abb. 2: Indocarbocyanin (Cy3)

## 1.4 Fragestellung

Lansdorp und Mitarbeiter entwickelten 1996 eine Methode, um die individuellen Telomerlängen jedes Chromosoms zu messen: Die in-situ-Hybridisierung mit telomerspezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonden an Metaphase-Chromosomen. Diese „quantitative FISH“ (Q-FISH) benutzt Telomer-spezifische PNA-Sonden und Plasmid-DNA mit verschiedenen großen Cy3-markierten  $(C_3TA_2)_3$ -PNA-Inserts. Diese Plasmid-DNA wird unabhängig von Metaphasen präpariert, vermessen und hinterher mit der normalen Telomermessung an den Chromosomen verglichen (Martens et al., 1998; Lansdorp et al., 1996). Da Plasmid-DNA aber als absolut proteinfrei angesehen werden kann, muß man davon ausgehen, dass diese Fluoreszenzsignale im Verhältnis wesentlich stärker sind als theoretisch entsprechend gleich starke auf Metaphasenpräparationen. Außerdem kann man auf diese Art und Weise nicht die technisch und präparatorisch bedingten Hybridisierungsunterschiede innerhalb einer Chromosomenpräparation ausschließen. Zusätzlich hat jeder Fluoreszenzfarbstoff die Tendenz, im Laufe der Zeit und bei Belichtung in der Fluoreszenzintensität nachzulassen („fading-Effekt“). Dadurch könnte sich die Diskrepanz zwischen Kontroll-DNA und Metaphasen noch verstärken.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu erarbeiten, die die Vorteile der oben erwähnten Q-Fish Methode beinhaltet und gleichzeitig deren Nachteile ausschließt. Gewünscht war eine Methode, bei der schnell, einfach und exakt die Telomerlängen verschiedener Zellen im Durchschnitt und ebenso die Telomerlängen innerhalb einer Zelle auf chromosomenspezifischer Basis gemessen werden können. Die verarbeitende Software soll dabei zusätzlich Vergleiche zwischen individuellen Chromosomen innerhalb eines bestimmten Kollektivs herstellen können. Sämtliche Ergebnisse dieser Methode sollen statistisch auswertbar sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Geräte sind im folgenden alphabetisch aufgelistet.

**A**luminiumfolie 0,03 mm dick (Merck, Darmstadt), **A**nalysenwaage (Sartorius, Göttingen), **B**echergläser 10, 100, 250, 500, 1000 ml (Schott, Zwiesel), **B**ruschrank Napco CO<sub>2</sub> Incubator (Labotect, Göttingen), **C**omputer Opti Plex GX1 (Dell, Round Rock, USA), **D**eckgläser 15x15, 24x40, 60x40 mm (Menzel, Braunschweig), **D**iakästen (Agfa, Köln), **E**ismaschine (Inco-Ziegra, Isernhagen), **E**rlenmeyerkolben 50, 100, 500, 1000 ml (Schott, Zwiesel), **F**ärbegestelle (Schott, Zwiesel), **F**ärbetröge (Schott, Zwiesel), **G**efriertruhe -20°C (Liebherr, Biberach), **G**ewebe-Kulturflaschen 50 cm<sup>2</sup> (Falcon, Heidelberg), **G**lasflaschen 50, 100, 250, 500, 1000 ml (Schott, Zwiesel), **H**eizplatte (Medax Nagel, Kiel), **H**ellendahl-Färbekästen (Schott, Zwiesel), **K**ühlschränke +4°C (Liebherr, Biberach), **K**ühlzentrifuge Minifuge T (Heraeus, Hanau), **L**aminar-flow steril-grade class II, type A/B3 (Labotect, Göttingen), **L**ichtmikroskope Axiolab und Axioskop 2 (Zeiss, Jena), **M**agnetrührer (Heidolph, Kehlheim), **M**egafuge 1.0 (Heraeus, Osterode), **O**bjektträger Superfrost Color (Menzel, Braunschweig), **P**asteur-Pipetten 150, 230 mm (Hirschmann, Eberstadt), **pH**-Meter (WtW, Weilheim), **P**inzetten (Bochem, Weilburg), **P**ipetten (einmal) 1, 5, 10, 25 ml (Bibby Dunn, Asbach), **P**ipetten (nicht verstellbar) 10, 50, 100, 1000 µl (Gilson, Villiers-Le-Bel, Frankreich), **P**ipetten (verstellbar) 10, 100, 1000 µl (Gilson, Villiers-Le-Bel, Frankreich/ Eppendorf, Hamburg), **P**ipettenspitzen mit/ohne Filter (Gilson, Villiers-Le-Bel, Frankreich/ Biozym, Hess. Oldendorf), **P**ipetus-Akku (Hirschmann, Eberstadt), **R**eagenzglas-Schüttelgrät (Vortex) (Heidolph, Kehlheim), **R**eaktionsgefäße 0.5, 1.5 ml (Eppendorf, Hamburg), **S**pritzen steril 10 ml (Becton Dickinson, Heidelberg),

Standzylinder 100, 250, 500, 1000 ml (Brand, Wertheim), Sterilisator (Heraeus, Osterode), Thermomixer (Eppendorf, Hamburg), Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg), Zentrifugenröhrchen (PP) 15, 50 ml (Greiner, Solingen).

## 2.2 Chemikalien und Medien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (Reinheitsgrad p.a.) und Medien sind nachfolgend alphabetisch aufgeführt:

**A**mmoniumchlorid (Fluka, München), Ammoniumsulfat (Merck, Darmstadt), Amphotericin (Biochrom KG, Berlin), **b**locking reagent (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim), **C**entromer2-Cy3-Sonde (Geschenk, Dako, Glostrup, Dänemark), Collagen-R (Serva, Heidelberg), Diaminophenylindolhydrochlorid (DAPI) (Sigma-Aldrich, Steinheim), **D**i-Natriumhydrogenphosphat (J.T. Baker, Deventer, Niederlande), **E**ssigsäure abs. (Roth, Karlsruhe), Ethanol abs. (Merck, Darmstadt), Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)- N;N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA) (Serva, Heidelberg), **F**etales Kälberserum (FCS) (Seromed, Berlin), Fixogum (Marabuwerke, Tamm), Formaldehyd 37% (Merck, Darmstadt), **G**iemsa's Lösung (Merck, Darmstadt), L-Glutamin (BioWhittaker, Walkersville, MD), **H**eparin-Natrium (B. Braun, Melsungen), HEPES-Pufferlösung (Gibco BRL, Gaithersberg, MD), **I**nsulin (Sigma-Aldrich, Steinheim), **K**aliumchlorid (Fluka, München), Kaliumdihydrogenphosphat (Fluka, München), Kaliumhydrogencarbonat (Fluka, München), Kaliumhydroxid (Merck, Darmstadt), **M**ethanol (Merck, Darmstadt), **N**atriumchlorid (Fluka, München), **P**enicillin/Streptomycin (BioWhittaker, Walkersville, MD), Phytohemagglutinin (Biochrom, Berlin), PNA -Oligomer (Cy3-OO-(C<sub>3</sub>TA<sub>2</sub>)<sub>3</sub>) (Applied Biosystems, Framingham, USA), Proteinase K (Merck, Darmstadt), **R**PMI 1640 Medium ohne L-Glutamin (Gibco BRL, Gaithersberg, MD), **T**elomere PNA FISH Kit/Cy3 (DAKO, Glostrup, Dänemark)\*, **T**rysin/EDTA-Lösung (BioWhittaker, Walkersville, MD),

Tween-20 (Merck, Darmstadt), Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA) .

\*Telomere PNA FISH Kit/Cy3:

- TBS (Tris-Buffered Saline, pH 7,5)
- Pre-Treatment-Solution (Proteinase K) (2000x)
- Telomere PNA-Cy3-Sonde
- Spülflüssigkeit (50x)
- Waschflüssigkeit (50x)

## 2.3 Lösungen

**Colcemid-Stammlösung:**

100 µg/ml in a.d., portionsweise bei –20°C einfrieren

**DAPI-Stammlösung:**

100 ng/ml in a.d., portionsweise bei –20°C einfrieren

**Fixativ:**

Essigsäure (25 ml)

Methanol (75 ml)

- Ansatz auf Eis und Lagerung bei –20°C

**Hypotone Lösung für Blutkulturen:**

KCl (20 mM)

EGTA (0.5 mM)

HEPES (20 mM)

NH<sub>4</sub>Cl (20 mM)

mit KOH auf PH 7,0 einstellen

**Hypotone Lösung für Zellkulturen:**

KCL (40 mM)

EGTA (0,5 mM)

HEPES (20 mM)

mit KOH auf pH 7,0 einstellen und im Kühlschrank aufbewahren

**Hybridisierungslösung:**

TRIS (10 mM), pH7,2

1% blocking reagent

70% Formamid

portionsweise bei  $-20^{\circ}\text{C}$  einfrieren

**Kulturmedium für Blutkulturen:**

RPMI-Medium (400 ml)

Fetales Kälberserum (100 ml)

Penicillin/Streptomycin (5 ml)

Glutamin (10 ml)

Phytohemagglutinin (PHA)(7.5 ml)

Heparin (200  $\mu\text{l}$ )

Insulin (250  $\mu\text{l}$ )

Amphotericin (3 ml)

**Kulturmedium für Tumorzellen:**

Iscove-Medium (350 ml)

RPMI-Medium (100 ml)

Fetales Kälberserum (50 ml)

Penicillin/Streptomycin (5 ml)

Glutamin (5 ml)

**Phosphat-Puffer für Giemsa-Färbungen:**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (30 mM)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (30 mM)

**Phosphat-Puffer für PNA-Hybridisierungen:**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (9,55 mM)

NaCl (137 mM)

KCl (2,7 mM)

auf pH 7,4 einstellen

**TBS:**

TRIS/HCl (50 mM)

NaCl (150 mM)

auf pH 7,6 einstellen

## 2.4 Untersuchungsmaterialien

In Zusammenarbeit mit Dr. H. Chopurian wurde aus der Abteilung Gynäkologie der Universität Ulm von neugeborenen Kindern ca. 5 ml Blut aus der Nabelschnurvene entnommen, in Heparin-Röhrchen an die Abteilung Pathologie der Universität Ulm gesandt und dort, wie unter 2.1 beschrieben, sofort weiterverarbeitet. Das Einverständnis der Mütter lag vor. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Universität Ulm genehmigt.

Zusätzlich stellten sich freundlicherweise mehrere Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Pathologie der Universität Ulm zur Verfügung, von denen je ca. 5 ml Heparin-Vollblut gewonnen wurde.

Die Tumorzelllinie EnSa wurde aus einem endometrialen Stromasarkom einer 80-jährigen Frau etabliert. Das Einverständnis der Patientin lag schriftlich vor. Die Linie ist seit etwa 1 Jahr in Kultur.

Die lymphoblastoide Linie SKW6.4 erhielt das Pathologische Institut von Professor P. Krammer, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg.

## **2.5 Chromosomenpräparation**

### **Chromosomenpräparation aus Lymphozyten**

Für insgesamt 72 Stunden wurden 0.5 ml Vollblut zusammen mit 45 ml Kulturmedium (siehe Material) in einem CO<sub>2</sub>-begasbaren Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Kultur alle 24 Stunden geschüttelt, um Zellen, die sich abgesetzt hatten, zu resuspendieren.

Nach Zugabe von 250 µl Colcemid (Endkonzentration = 0,5 µg/ml) und einer weiteren 1-stündigen Inkubation wurden die Zellen präpariert:

Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 1500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in hypotoner Lösung (für Blutkultur) resuspendiert und auf ein Gesamtvolumen von 50 ml ergänzt.

Nach Zentrifugation bei 1200 rpm 5 Minuten wurde der Vorgang wiederholt.

Die Gesamtdauer der hypotonen Behandlung betrug etwa 20 Minuten. Das Pellet wurde dann in 3 ml hypotoner Lösung resuspendiert und in ein 15-ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Die folgenden Fixierungs- und Zentrifugationsschritte fanden bei 4°C statt: Die Zugabe von Fixativ erfolgte am Anfang tropfenweise bis zu einem Volumen von 5 ml, dann wurde auf 15 ml aufgefüllt und 5 Minuten lang bei 1000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wenigstens ein Mal wiederholt, bis das entstandene Pellet homogen weiß aussah.

Pro Objektträger wurden nur 10 – 20 µl Zellsuspension aufgetragen. Nach einer Trocknungszeit von ca. 5 – 10 Sekunden (bis auf dem Objektträger Newton'sche Ringe sichtbar waren) wurde mit etwa 1 ml Fixierungslösung nachgewaschen



und langsam unter einer Abdeckung getrocknet. Der gesamte Präparationsvorgang wurden unter einem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Zur endgültigen Trocknung wurden die Präparate 24-48 Stunden in leeren Diakästen staubfrei bei Raumtemperatur gelagert. Zur Entfernung eventueller Fixativreste wurden die Präparate dann durch eine aufsteigende Ethanolreihe gezogen, nach vollständiger Trocknung in Aluminiumfolie eingewickelt und bis zu weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **Chromosomenpräparation aus Tumorzellen**

Um eine optimal wachsende Tumorzellkultur zu erhalten wurden die Tumorzellen 24 bis 48 Stunden vor Präparation in Collagen-beschichteten Kulturflaschen ausgesät. Nach mindestens 2-stündiger Colcemidbehandlung wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, resuspendiert in Kulturmedium und zentrifugiert bei 1000 rpm für 5 Minuten. Das Zellpellet wurde ein Mal mit hypotoner Lösung (für Zellkulturen) für 20 Minuten inkubiert und danach fixiert analog der Präparation für Lymphozyten.

## **2.6 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) mit PNA-Sonden**

Da Peptidnukleinsäuren noch nicht allgemein bekannt sind, wird im Folgenden ausführlich auf die praktische Anwendung eingegangen.

Die Firma Dako (Glostrup, Dänemark), stellte uns freundlicherweise die Cy3-markierte PNA-Sonde gegen das Zentromer von Chromosom 2 zur Verfügung. Diese Sonde wurde, laut Angaben des Herstellers, mit der bereits fertig angesetzten Telomer-Sonde des DAKO-Telomer-Kits gemischt. Bei Verwendung dieses FISH-Kits wurde laut Gebrauchsanweisung vorgegangen.

Bei Verwendung der Cy3-(C<sub>3</sub>TA<sub>2</sub>)<sub>3</sub> -Telomersonde der Firma Applied Biosystems wurden zuerst 2 µg in 10 µl a.d. gelöst und weiterverdünnt in 1 ml Hybridisierungslösung. Diese Lösung wurde mit der Zentromersonde gemischt. Die eingefrorenen Präparate wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, 2 Minuten in TBS-Lösung gespült und danach 2 Minuten in Formaldehydlösung nachfixiert (Dieser Schritt aus der DAKO-Hybridisierungsvorschrift erwies sich später bei unseren Chromosomenpräparationen als entbehrlich). Nach zwei maligem Waschen mit TBS-Lösung wurden die Objektträger 10 Minuten mit Pre-Treatment-Solution von DAKO oder 10 Minuten mit Proteinase K (verdünnt 1:2000 in TBS) behandelt. Das proteolytische Enzym Proteinase K dient der Permeabilisierung der Zellen. Probeversuche zeigten allerdings, dass bei optimalen Chromosomenpräparationen (und nur diese wurden für diese Arbeit verwendet) auch diese Behandlung nicht notwendig ist. Nach Waschen mit TBS wurden die Präparate in einer aufsteigende Ethanolreihe getrocknet. Die folgenden Arbeitsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt: Insgesamt 7 µl der PNA-Suspension wurden pro Präparat aufgetragen, mit einem 18 x 18 mm Deckglas abgedeckt und mit Fixogum versiegelt. Nachdem der Siegellem abgetrocknet war wurden die Präparate exakt für 3 Minuten auf einer Heizplatte bei 80°C denaturiert und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur hybridisiert. Anschließend wurde das Deckglas in PBS (oder in Rinse-solution; lt. Kit) vorsichtig vom Objektträger gelöst und dieser 5 Minuten bei 65° C in PBS mit 0,1% Tween-20 (oder in Wash-Solution; lt. Kit ) im Schüttelwasserbad gewaschen. Dieser Schritt dient zur Entfernung unspezifisch gebundener PNA. Danach wurde noch einmal mit TBS-Lösung bei Raumtemperatur gewaschen. Zum Schluss wurden die Präparate 5 Minuten mit DAPI-Lösung (Endkonzentration 50 ng/ml) gegengefärbt, zwei mal kurz in a.d. gewaschen und mit ca. 35 µl Vectashield (bei Verwendung eines 40 x 18 mm Deckglas) eingedeckt.

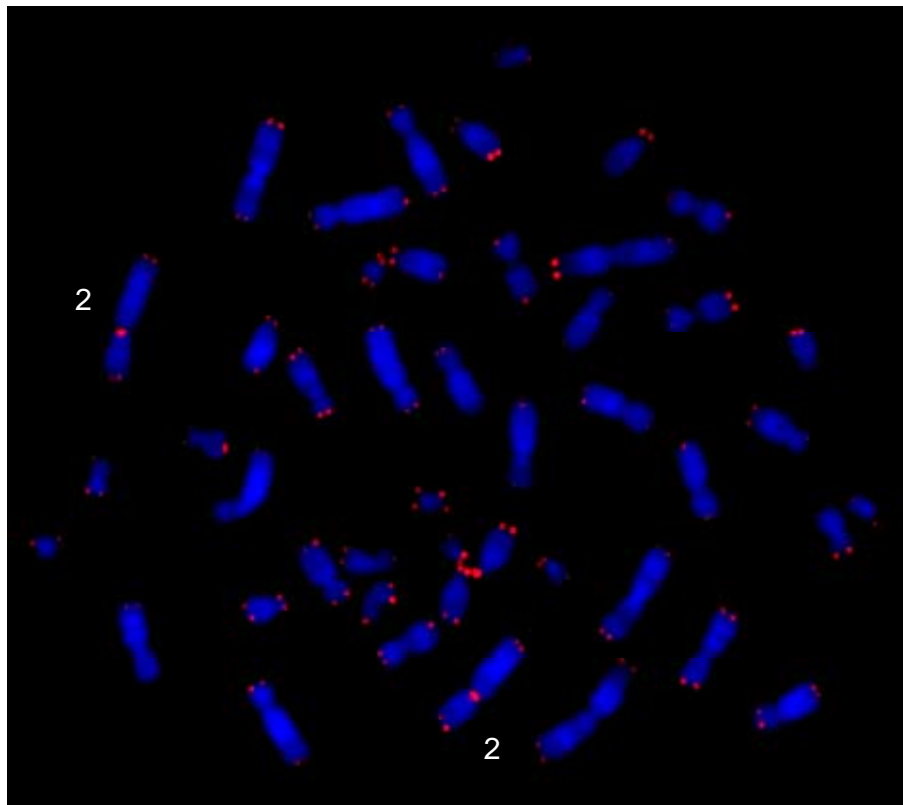
## 2.7 Software

In Zusammenarbeit mit der Firma MetaSystems (Altussheim) wurde eine Software entwickelt und über ein Jahr lang optimiert und auf ihre Funktionsfähigkeit geprüft: Die zu Grunde liegende Idee, sämtliche Versuche, Verarbeitung der anfallenden Daten, deren statistische Auswertung und anschließende grafische Darstellung wurden zuerst von mir in „Excel“ durchgerechnet. Die Programmierung der Software übernahmen Informatiker der Firma MetaSystems. Die Telomermessung ist zur Zeit ein Unterprogramm der Software „ISIS“ und läuft mit dem Betriebssystem „Windows95“.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 von einer Metaphase zum Diagramm

Nach Präparation, Hybridisierung und Gegenfärbung werden geeignete Metaphasen fotografiert:



**Abb. 3: Metaphase aus PHA-stimulierten Lymphocyten nach Hybridisierung mit einer Cy3-markierten Telomer-spezifischen Sonde und einer Cy3-Zentromer 2-spezifischen Sonde. Gegenfärbung mit DAPI.**

Aus solchen Metaphasen werden Karyogramme erstellt und Telomer- und Referenzschwellen gesetzt:

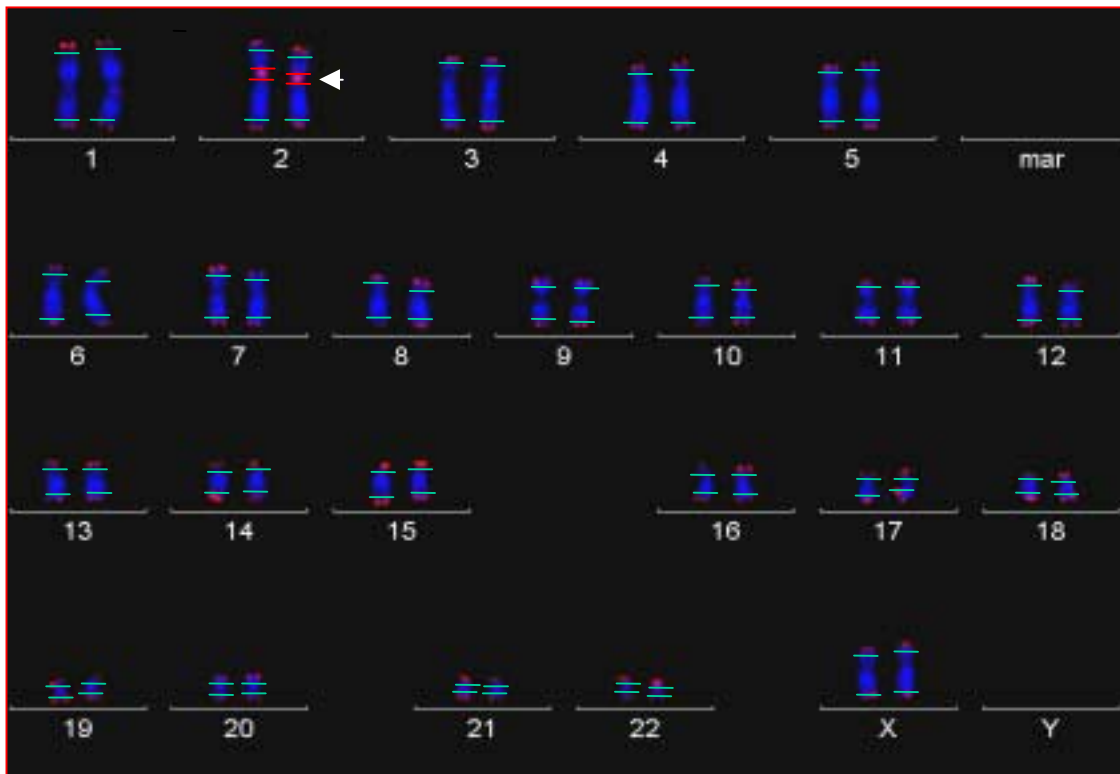
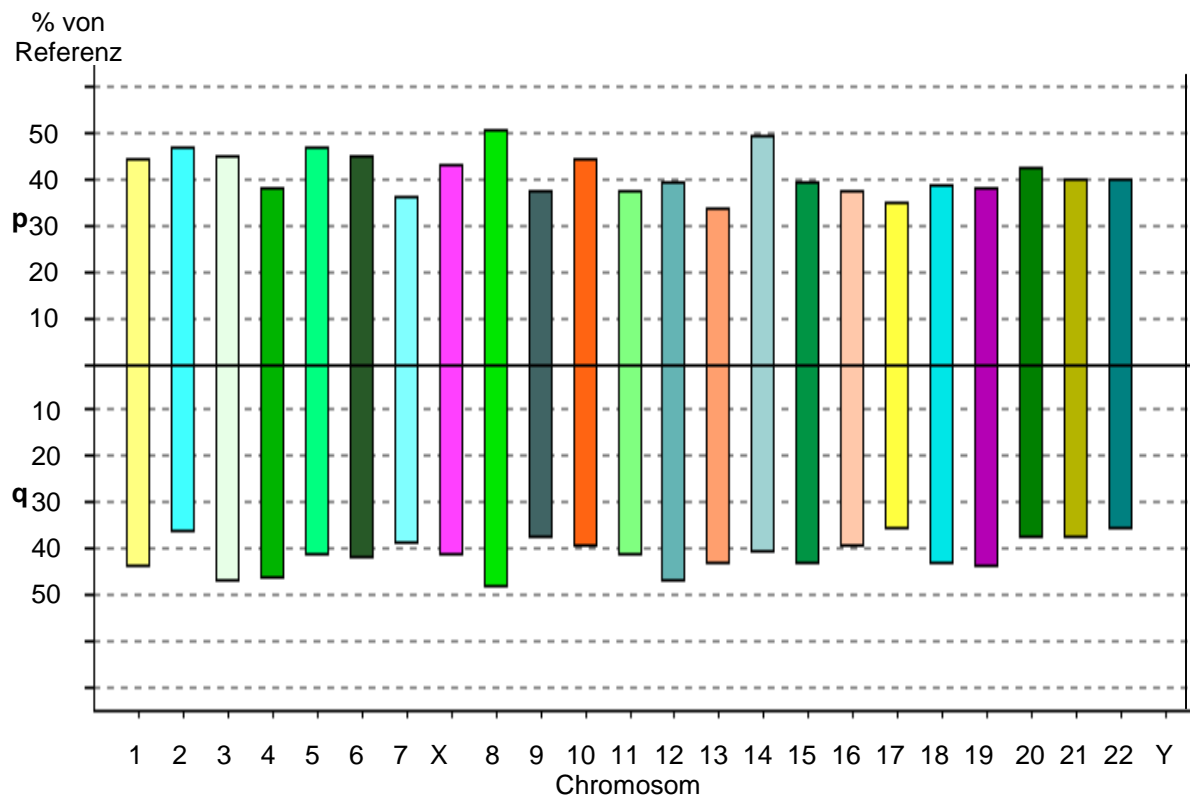


Abb. 4: Karyogramm mit Telomerschwelen (grün) und Referenzschwelen (rot)

Die gemessenen Intensitäten werden abgespeichert, automatisch weiterberechnet und statistisch ausgewertet:

Zuerst werden die absoluten Intensitäten für jedes Chromosomenende und für das Zentromer von Chromosom 2 abgespeichert. Als nächstes werden innerhalb jeder Metaphase die Intensitätswerte homologer Chromosomenabschnitte gemittelt. Dann werden die Referenzintensitäten = 100% gesetzt und die Telomerintensitäten im Verhältnis dazu umgerechnet. Eine grafische Darstellung dieser relativen Telomerintensitäten (im Verhältnis zum Referenzsignal) zeigt Abbildung 5.

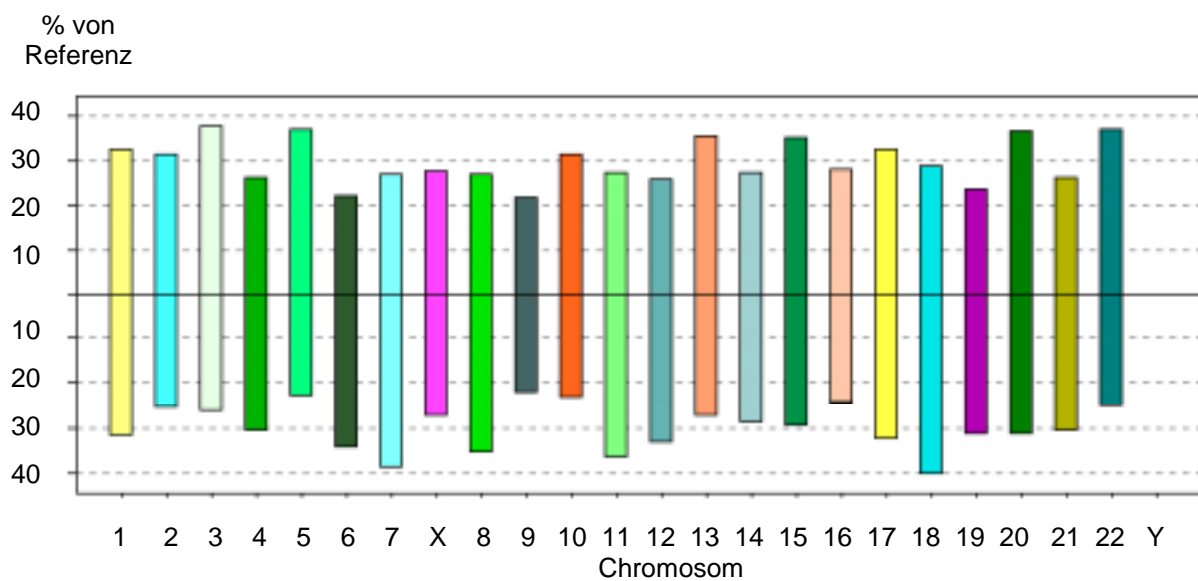
Hier, wie in allen folgenden Diagrammen wurde nach oben die relative Telomerintensität der p-Arme der Chromosomen aufgetragen, nach unten die der q-Arme. Für die Darstellungen wurden Werte aus 10 Karyogrammen verwendet. Um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen besser darzustellen, wurde bei allen Diagrammen die gleiche Skalengröße verwendet.



**Abb. 5: relative Telomerintensitäten aus PHA-stimulierten Lymphozyten eines Neugeborenen (Studiennummer 172); Mittelwert 42,8**

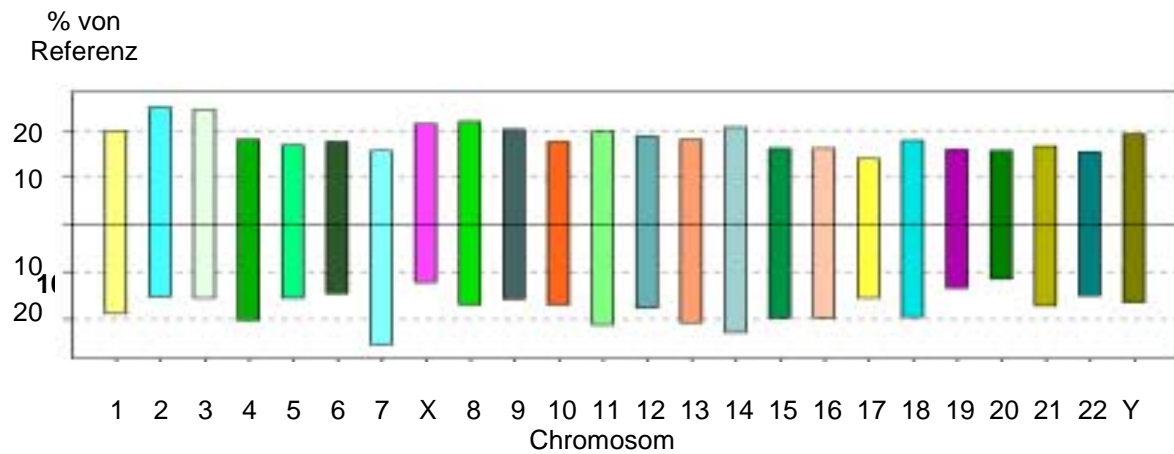
### 3.2 Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenem Untersuchungsmaterial:

Um die allgemeine Verwendbarkeit des Systems zu überprüfen, wurde es an verschiedenen Normalzellen und Tumorzellen getestet. Abbild 6 zeigt die relativen Telomerintensitäten aus PHA-stimulierten Lymphozyten einer 32-jährigen Frau. Der Gesamtmittelwert beträgt in diesem Fall 31,3.



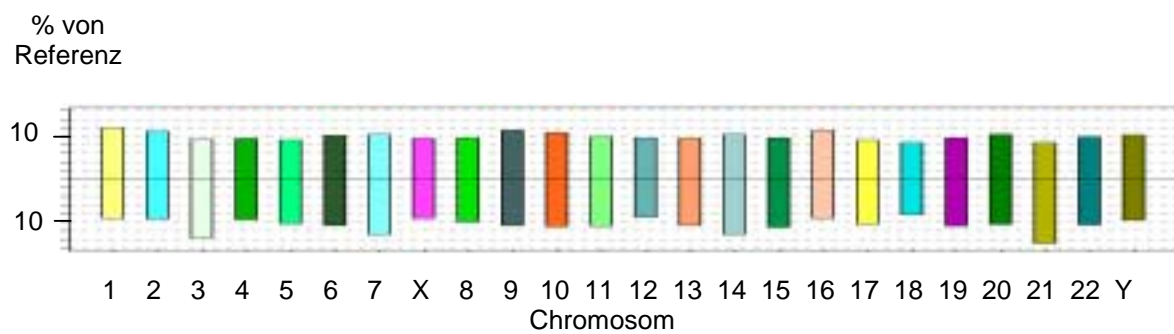
**Abb. 6: relative Telomerintensitäten aus PHA-stimulierten Lymphozyten eines gesunden Probanden (32 Jahre alt); Mittelwert 31,3**

Dagegen zeigt das Diagramm Abbildung 7 der Telomerintensitäten aus 10 Karyogrammen der normalen PHA-stimulierten Lymphozyten eines 27-jährigen Patienten mit Autoimmunerkrankung nur einen Gesamtmittelwert von 19,7. Der Patient hatte zu diesem Zeitpunkt mehrfach Chemo- oder Radiotherapie erhalten.



**Abb. 7: relative Telomerintensitäten aus PHA-stimulierten Lymphozyten eines Patienten mit Autoimmunerkrankung nach Chemo- und Radiotherapie (27 Jahre alt); Mittelwert 19,7**

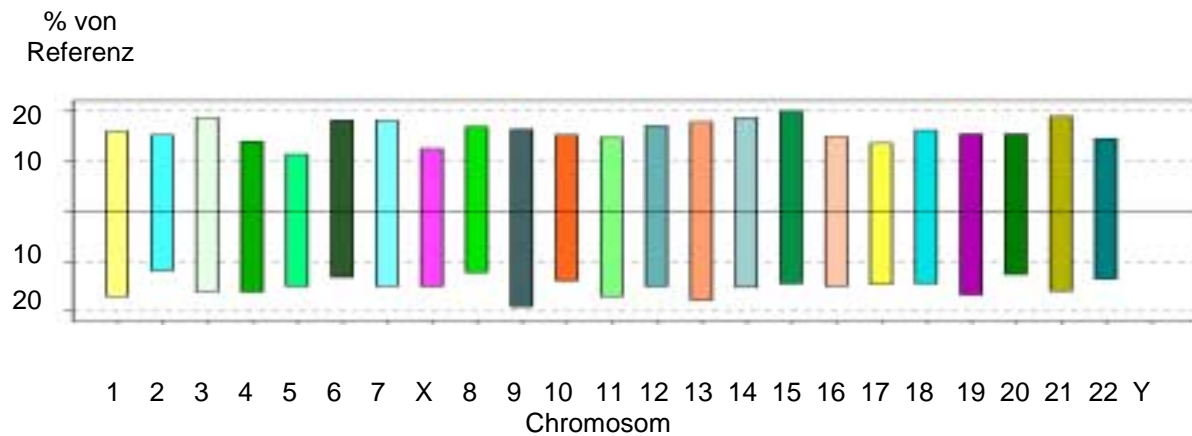
Noch weiter reduzieren sich die Werte in der lymphoblastoiden Linie SKW6.4. Abbildung 8 zeigt wieder die relativen Mittelwerte der Telomere von 10 Karyogrammen.



**Abb. 8: relative Telomerintensitäten aus SKW6.4 (lymphoblastoide Linie); Mittelwert 12,5**

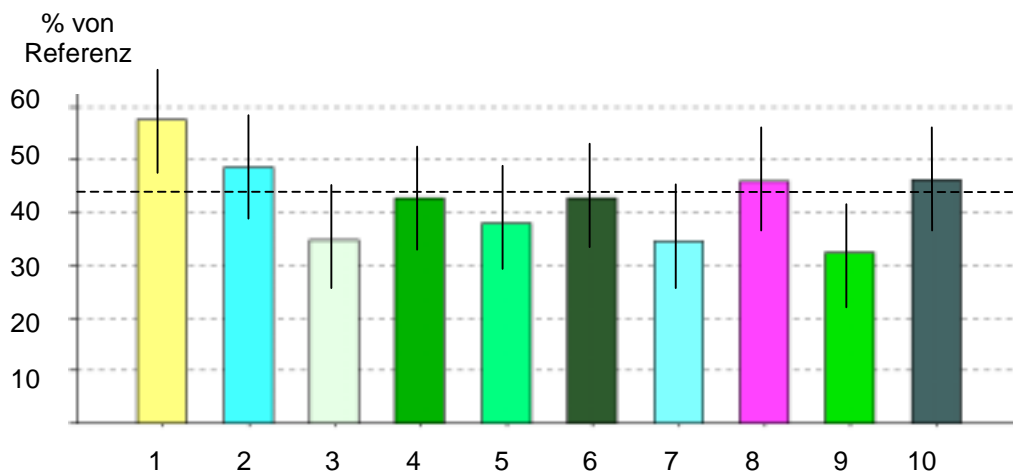


Stellvertretend für Tumorzellen wurde die Zelllinie EnSa untersucht. Diese Linie hat gegenüber den meisten anderen Tumorzelllinien den Vorteil, dass sie einen normalen Karyotyp aufweist, der auch über Monate hin stabil blieb. Abbildung 9 zeigt die relativen Telomerintensitäten mit einem Gesamtmittelwert von 17,5.



**Abb. 9: relative Telomerintensitäten aus der Tumorzelllinie EnSa (endometriale Stromasarkomlinie einer 80-jährigen Patientin); Mittelwert 17,5**

Die Telomere bestimmter Chromosomen sind auch getrennt von den restlichen Chromosomen auswertbar. Das ist eventuell sinnvoll bei der Untersuchung von Tumor-Markerchromosomen. Abbildung 10 zeigt die Intensitätsverteilung der Telomere von Chromosom Xp mit Mittelwert und Standardabweichung. Der Medianwert beträgt 42,5, der Quartilsabstand 13,2.



**Abb. 10: relative Telomerintensitäten von Chromosom Xp von 10 verschiedenen Metaphasen (PHA-stimulierte Lymphozyten des Studienfalles 172); eingezeichnet ist die Standardabweichung (10,5) und der Mittelwert (42,8). Der Medianwert beträgt 42,5, der Quartilsabstand 13,2**

## 4 Diskussion

### 4.1 Vergleich der Methoden:

Die Standardmethode zur Messung der Telomerlängen ist heute die Southern Blot (SB)-Hybridisierung mit telomerspezifischen Sonden. Dabei verwendet man Enzyme mit Restriktionsschnittstellen in der subtelomerischen DNA. Mit dieser Methode wurde auch der Zusammenhang zwischen TRF-Länge und der verbliebenen Lebensspanne von Fibroblasten *in-vitro* gezeigt. Diese Methode hat aber in der Praxis folgende Nachteile:

- Das Tumorgewebe kann einen unbekanntem Anteil an Normalzellen enthalten. Die SB-Hybridisierung zeigt nur den Durchschnitt der Telomerlängen aller Chromosomen aller Zellen.
- Selbst bei einer reinen Tumorzellpopulation erhält man keine Information über die Heterogenität der Zellen oder über das Ausmaß von Verlust oder Verkürzung von Telomeren durch Brüche, Chromosomenfusionen oder Translokationen.
- Die Verteilung von subtelomerischen DNA-Sequenzen kann von Fall zu Fall variieren und die Beurteilung erschweren.

Um letzteres Problem zu umgehen, entwickelten Bryant und Mitarbeiter 1997 einen Slot Blot Assay, der den relativen Gehalt an Telomer-DNA misst (Gegensatz SB: DNA-Länge). Dieser relative Telomer-DNA-Gehalt ist unabhängig von DNA-Fragmentierung bis zu Fragmentlängen von etwa 1 kbp. Der Vorteil dieser Methode ist außerdem, dass sie mit nur 15 ng Gesamt-DNA-Menge auskommt (Bryant et al., 1997). Aber auch hier erhält man im Grunde keine Aussage über eine Verunreinigung mit Normalzellen.

Dragowska und Mitarbeiter sowie Hultdin und Mitarbeiter kombinierten Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit Flow-Zytometrie: Diese Methode hat den Vorteil, dass sie schnell durchzuführen ist und dass sie an individuellen Zellen in Suspension möglich ist (Rufer et al., 1998; Hultdin et al., 1998). Der Nachteil ist,

dass unter Umständen schwierig ist, zwischen Normalzellen und Tumorzellen zu unterscheiden, wenn sich die Tumorzellen im euploiden Bereich befinden. Außerdem ist auch hier nur eine Aussage über den Gesamtfluoreszenzgehalt einer Zelle möglich.

Etwa gleichzeitig entwickelten de Pauw und Mitarbeiter einen Algorithmus zur Messung der Gesamtfluoreszenzintensität eines Kerns: Der Vorteil dieser Interphasenmessung ist, dass man unabhängig ist von proliferierenden Zellen, das heißt, man vermeidet Zellkultur und die daraus eventuell resultierende Selektion (de Pauw, 1998).

Lansdorp und Mitarbeiter entwickelten 1996 eine Methode, um die individuellen Telomerlängen jedes Chromosoms zu messen: Die in-situ-Hybridisierung mit telomerspezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonden an Metaphase-Chromosomen. Diese „quantitative FISH“ (Q-FISH) umgeht oben genannte Probleme, ist aber abhängig von sich teilenden Zellen. Bei diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Telomerlängen chromosomenspezifisch innerhalb einer Metaphase schwanken (Lansdorp et al., 1996). Die kürzesten gemessenen Telomerlängen wurden auf dem p-Arm von Chromosom 17 gefunden. Diese Beobachtung gab Anlaß zur Spekulation, dass das verkürzte Telomer von Chromosom 17 die Funktion der telomernahen Tumorsuppressorgene TP53 bzw. HIC-1 mit beeinträchtigen könnte (Martens et al., 1998).

Um diese Messungen zur Q-FISH zu standardisieren, verwendet diese Arbeitsgruppe Plasmid-DNA mit verschiedenen großen Cy3-markierten  $(C_3TA_2)_3$ -PNA-Inserts. Diese Plasmid-DNA wird unabhängig von Metaphasen präpariert, vermessen und hinterher mit der normalen Telomermessung an den Chromosomen verglichen (Martens et al., 1998; Lansdorp et al., 1996).

Da Plasmid-DNA aber als absolut proteinfrei angesehen werden kann, muß man davon ausgehen, dass diese Fluoreszenzsignale im Verhältnis wesentlich stärker sind als theoretisch entsprechend gleich starke auf Metaphasenpräparationen. Außerdem kann man auf diese Art und Weise nicht die technisch und präparatorisch bedingten Hybridisierungsunterschiede innerhalb einer Chromosomenpräparation ausschließen. Zusätzlich hat jeder Fluoreszenzfarbstoff

die Tendenz, im Laufe der Zeit und bei Belichtung in der Fluoreszenzintensität nachzulassen („fading-Effekt“). Dadurch könnte sich die Diskrepanz zwischen Kontroll-DNA und Metaphasen noch verstärken.

Mit Ausnahme der Southern Blot Hybridisierung sind sämtliche oben genannte Methoden nur mit PNA-Sonden möglich. Eine Übersicht über die verschiedenen Eigenschaften von DNA und PNA geben Uhlmann und Mitarbeiter 1998 (Uhlmann et al., 1998). Im Gegensatz zu DNA bewirkt die extrem leichte Bindung von PNA an DNA eine sichere, quantitative Bindung, d. h. nur mit PNA korreliert die Stärke des gemessenen Fluoreszenzsignals mit der tatsächlich vorhandenen Länge der Telomer-DNA. Außerdem ist auf Grund der leichteren PNA-DNA-Bindung eine schnellere und einfachere Hybridisierungsmethode möglich, sodass die Chromosomenqualität deutlich verbessert ist.

Ein Vergleich beider Methoden ist in nachfolgender Tabelle verdeutlicht:

Tab 2: Vergleich der Hybridisierungsmethoden für DNA- und PNA-Sonden

<b>DNA</b>	<b>PNA</b>
Objektträger vorinkubieren mit Pepsin oder Proteinase K	
5 – 10 Minuten waschen	
Fixierung in Paraformaldehyd	nicht nötig
waschen	nicht nötig
Alkoholreihe	nicht nötig
etwa 2 Minuten 50%-iges Formamid bei 70°C	nicht nötig
waschen	nicht nötig
Alkoholreihe	nicht nötig
Sonde 5 Minuten bei 72°C denaturieren	nicht nötig
Objektträger und Sonde bei 72°C denaturieren	Objektträger und Sonde bei 80°C denaturieren
12 Stunden bei 37°C hybridisieren	mindestens 30 Minuten bei 20°C hybridisieren
waschen	
Gegenfärbung mit DAPI	
eindecken	

Im Gegensatz zu oben genannten Methoden schließt meine Methode zur Telomerlängenmessung alle diese Fehlermöglichkeiten und Nachteile aus. Der zentrale Unterschied ist, dass bei meiner Methode eine Referenzsonde mit gleichem Fluoreszenzfarbstoff zusammen mit der markierten Telomersonde mithybridisiert wird. Die Telomersignale werden im Verhältnis zum Referenzsignal berechnet. Dadurch spielt einmal der erwähnte fading-Effekt keine Rolle mehr, und zum anderen werden technisch bedingte Präparationsartefakte ausgeschlossen. Das Programm ermöglicht außerdem eine vollständige Ausblendung des Hintergrunds und eine ausschließliche Messung der Telomere ohne Beteiligung von eventuell gefärbten, subtelomerischen Regionen oder interstitiellen, telomerischen Sequenzen.

Bei Metaphasenpräparationen kann jedes Chromosom mit seinen Telomeren einzeln untersucht werden. Zusätzlich ist bereits mit der normalen „ISIS“-Software von MetaSystems die Messung der Gesamtfluoreszenz eines jeden ausgewählten Kernes möglich. Bei einer Mischung von Tumorzellen und Normalzellen ist es oft möglich, beide Populationen auf Grund der Kernmorphologie zu unterscheiden. Im Zweifelsfall könnte man eine Tumorzell-spezifische, fluoreszenzmarkierte Sonde (mit anderem Fluoreszenzfarbstoff) mithybridisieren.

Nach der Zuordnung der Chromosomen in ein Karyogramm ist jede nachfolgende statistische Auswertung extrem schnell: Sowohl von sämtlichen ausgewerteten Metaphasen eines Probanden, als auch eines ganzen Kollektivs als auch von bestimmten Chromosomen eines gesamten Kollektivs. Die statistische Auswertung beinhaltet Standardabweichung, Mittelwert, Medianwert und Quartilsabstand. Der Medianwert ist der mittlere Wert einer Datenreihe und berücksichtigt nicht eventuelle „Ausreisser“ nach oben oder unten. Der Quartilsabstand umfasst die mittleren 50% der Daten, ist also ein Maß für die Qualität der Messwerte. Die Ergebnisse können auch in Balkendiagrammen dargestellt werden.

Nachteilig an dieser Methode ist sicher, dass sie deutlich langsamer ist, als die Messung über Flow-Zytometrie.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse:

Verkürzung der Telomere mit steigendem Alter:

Der erste Hinweis, dass Telomere mit steigendem Alter immer kürzer werden, kam von Harley und Mitarbeitern durch Untersuchungen an Fibroblastenkulturen (Harley et al., 1990). Die meisten Autoren sind sich heute einig, dass die Telomerlängen mit steigendem Alter in allen somatischen Zellen exponentiell abnehmen. Allerdings variieren die ermittelten Längenangaben teilweise extrem: Nach Frenck und Mitarbeitern beträgt bei Kindern die Verkürzung der Telomere 1000 bis 3000 bp pro Jahr, bei Erwachsenen 30 bis 60 bp pro Jahr (Frenck et al., 1998), nach Zeichner und Mitarbeitern beträgt sie innerhalb der ersten drei Lebensjahre nur 270 bp pro Jahr (Zeichner et al., 1999). Die Werte für die Gesamtelomerlänge des Menschen wird von de Lange und Mitarbeitern mit 14 kbp für Sperma und 8 kbp für Blut angegeben (de Lange et al., 1990), von Bryant und Mitarbeitern in „somatischen Zellen“ mit 10 bis 12 kbp (Bryant et al., 1997), von Zhang und Mitarbeitern in „Zervixgewebe“ 8 bis 10 kbp (Zhang et al., 1999), von Engelhardt und Mitarbeitern mit 4,8 bei „Kolongewebe“ (Engelhardt et al., 1997). Teilweise sind diese unterschiedlichen Werte bedingt durch unterschiedliche Meßmethoden. Bei allen diesen Publikationen findet man zudem keine Altersangaben.

Auch bei der in dieser Arbeit beschriebenen Methode ist zunächst keine Angabe in kbp möglich, sondern nur eine Angabe der absoluten und relativen Fluoreszenzwerte. Eine Umrechnung in kbp ist theoretisch möglich über eine gleichzeitige Southern Blot Analyse von wenigen Probanden. Da allerdings die Dynamik der Telomerlängen von unterschiedlich alten Probanden oder verschiedene Zelltypen miteinander verglichen werden, ist eigentlich eine Umrechnung in kbp allenfalls von theoretischem Interesse oder um die Werte dieser Arbeit mit denen der aktuellen Literatur vergleichen zu können.

In der Abteilung für Pathologie der Universität Ulm laufen zur Zeit mehrere Studien, die mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode die Lymphozyten von 100 Neugeborenen und die von 100 Erwachsenen verschiedener Lebensdekaden untersuchen. Repräsentativ für diese wurde hier je ein Fall ausgewählt.

Die Durchschnittstelomerintensität eines Neugeborenen beträgt dabei 42,8 und der Wert einer 32-jährigen Erwachsenen 31,3. Das entspricht einer ungefähren Abnahme um 30%. De Lange und Mitarbeiter vergleichen Sperma mit Blut und kommen dabei auf eine Telomerverkürzung von fast 50% (de Lange et al., 1990).

Beim Menschen könnte die Länge der Telomere beim Alterungsprozess eine größere Rolle spielen als bei anderen Tieren, da Menschen im Verhältnis zu ihrer relativ langen Lebensdauer sehr kurze Telomere haben. Mäuse und Hamster haben Telomerlängen von etwa 40 kbp (Slijepcevic et al., 1999), andere Primaten eine Länge von mindestens 23 kbp (Kakuo et al., 1999). Natürliche Selektion favorisiert Genotypen, die das Leben innerhalb der Zeit fertiler Reproduktion erhalten. Eine übermäßige Ausdehnung der Lebensspanne über diesen Punkt hinaus kann nicht von der Evolution determiniert werden und ist beim Menschen ein Zufallsprodukt der Zivilisation.

Im Prinzip sind zwei Wege denkbar, durch die die Telomerverkürzung den Alterungsprozess beschleunigen könnte:

- In Geweben, die sich mehr oder weniger ständig teilen müssen erreichen die Telomere eine kritische Länge, bei der es der Zelle nicht mehr möglich ist, ihre biologische Funktion zu erfüllen. Dieser Zeitpunkt kann sowohl individuell variieren als auch von Umweltfaktoren beeinflusst sein. Insofern spielt die Telomerverkürzung in Geweben mit ständig hoher Zellteilung oder in Geweben, die in erhöhtem Maß mit Umwelteinflüssen in Berührung kommen eine größere Rolle.
- Alterserkrankungen können von genetischen Faktoren (primär unabhängig von Telomerlängen) bestimmt werden. Sind diese Erkrankungen aber einmal eingetreten, bewirken sie eine schnellere Zellteilung in den betreffenden Geweben und in Folge eine schnellere Telomerverkürzung. Diese Art der sekundären Telomerbeeinflussung könnte beim Menschen die wichtigere Rolle spielen (Avis u. Avis, 1998).

Falls man aber jemals mit dem Gedanken spielen würde, das Leben des Menschen zu verlängern, indem man genetisch die Telomere verlängert, würde



man mit diesem Experiment wahrscheinlich das Risiko einer Krebserkrankung deutlich erhöhen.

Untersuchung der Telomerlängen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen:  
Wir untersuchten normale, PHA-stimulierte Lymphozyten eines 27-jährigen Patienten mit einem autoimmunproliferativen Syndrom und vorhergegangener Radio- und Chemotherapie. Das relative Mittel der Telomere betrug 19,7. Das ist signifikant kürzer als der Wert der gesunden etwa gleichaltrigen Probandin. Aus der Literatur ist bekannt, daß Patienten mit Diabetes mellitus Typ I signifikant kürzere Lymphozytentelomere im Vergleich zu den Lymphozyten von Diabetes mellitus Typ II Patienten und von gesunden Kontrollpersonen haben (Jeanclos et al., 1998). Außerdem ist bekannt, dass es in Lymphozyten nach Bestrahlung zu einer Verkürzung beziehungsweise Verlust von Telomerasequenzen kommt (Boei et al., 1998).

Telomerlängen bei Tumorzelllinien:

Tumorzellen haben unter anderem die Eigenschaft, sich nahezu unbegrenzt teilen zu können, d. h. sie müssen die Möglichkeit besitzen, zu verhindern, dass sich ihre Telomere unter eine kritische Länge von 1 bis 2 kbp verkürzen (Chin et al., 1999). Tatsächlich sind beim Menschen fast 90% aller Tumore Telomerase-positiv, wohingegen den meisten normalen Geweben eine Telomeraseaktivität fehlt (Kim et al., 1994; Shay u. Bacchetti, 1997). Trotzdem sind in den meisten Zelllinien die Telomere deutlich kürzer als die entsprechenden Normalzellen desselben Probanden, zum Beispiel SV40-transformierte Fibroblasten im Vergleich zu normalen Fibroblasten (Ducray et al., 1999) oder Zellen aus normaler Kolonmukosa im Vergleich zu Kolonkarzinom-Zellen (Engelhardt et al., 1997). Nicht alle Tumorzellen sind Telomerase-positiv. Bei bis zu 30% aller Tumorzelllinien haben die Telomere auch in Abwesenheit von Telomeraseaktivität eine konstante Länge: Dieser Mechanismus, wird als „alternate telomere maintenance“ (ALT) bezeichnet (Bryan et al., 1995; Reddel et al., 1997). Untersuchungen an menschlichen Tumorzellen zeigten aber, dass zumindest beim Menschen die Reaktivierung der Telomerase der bevorzugte Mechanismus

ist, um den Erhalt der Telomerlängen sicher zu stellen (Autexier u. Greider, 1996; Shay u. Bacchetti, 1997).

Die lymphoblastoiden Linie (LCL) SKW6.4 hat mit 12,5 den relativ geringsten Wert aller gemessenen Zellen. Allgemein verlieren LCL's mit 20 Teilungen über die Hälfte der TTAGGG-Sequenzen und alle subtelomerischen Sequenzen (Guerrini, 1993), sind aber trotzdem vollständig immortalisiert. SKW6.4 wird bevorzugt für Apoptose-Studien herangezogen, weil die Zellen auf der einen Seite problemlos *in-vitro* wachsen, auf der anderen Seite unter entsprechender Stimulation besonders leicht in Apoptose gehen. Vielleicht ist letztere Eigenschaft auf ihre extrem kurzen Telomere zurückzuführen.

Die Tumorzelllinie EnSa wurde aus einem endometrialen Stromasarkom einer 80-jährigen Frau etabliert. Der relative Mittelwert der Telomere beträgt 17,5. Das ist einerseits signifikant länger als bei SKW6.4, andererseits aber auch deutlich länger als der zu erwartende Wert normaler Zellen dieser Altersgruppe. Deshalb könnte man davon ausgehen, daß bei diesen Tumorzellen die Telomere durch einen der obengenannten Signalwege verlängert wurden.

Es gibt viele Hinweise in der Literatur, dass Tumorzellen meist deutlich kürzere Telomere haben als entsprechendes normales Gewebe: dies wurde für Kolonkarzinome (Engelhardt et al., 1997), Riesenzelltumore, Glioblastome und Wilms-Tumore (Butler et al., 1996; de Lange et al., 1990) beschrieben. Mit Hepatitis-Viren infizierte Leberkarzinomzellen haben kürzere Telomere als virusinfizierte Hepatozyten und diese sind ihrerseits wieder kürzer als normale Hepatozyten (Ohashi et al., 1996). Zhang und Mitarbeiter ermittelten für normales Zervix-Gewebe Werte zwischen 8 und 10 kbp, für Zervix-Karzinome Werte zwischen 3,5 und 16 kbp (Zhang et al., 1999). Hier wird also die Variation insgesamt größer. Ausnahmen sind auch zum Beispiel Chordome, sie sollen längere Telomere haben (Butler, 1996) oder die Zelllinie HeLa, die mit 28 kbp die längsten je für Menschen beschriebenen Telomere hat (de Lange et al., 1990).

Schlussfolgerung:

Die beschriebene Methode zur Telomermessung bereitet technisch keine Schwierigkeiten, die Software ist einfach zu bedienen und die statistischen

Auswertungen problemlos. Die Methode liefert Ergebnisse, die denen der Literatur vergleichbar sind. Weiterführende umfangreiche Untersuchungen werden den Wert dieser Messmethode sichern müssen.

## 5 Zusammenfassung:

Telomere sind seit einigen Jahren zunehmend in den Vordergrund wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt: Telomere funktionieren in normalen Zellen als eine Art „mitotische Uhr“, die die Lebenserwartung des betroffenen Organismus beschränkt. Man kann also aus der Telomerlänge Rückschlüsse auf die theoretisch noch zu erwartende Lebensdauer schließen.

Gleichzeitig ist die Telomerverkürzung ein Kontrollmechanismus, der die Entstehung von Tumorzellen meist in einem frühen Stadium verhindert. Beim Menschen sind deshalb Tumorerkrankungen sehr selten. Entstehen sie trotzdem, werden in diesen Zellen die Telomerlängen über verschiedene Mechanismen stabilisiert. Die Länge der Telomere in den Tumorzellen ist oft ein Hinweis auf Malignität.

Aus diesen beiden Aspekten kann man erkennen, wie wichtig es ist, eine Methode zu haben, Telomere einfach und exakt zu vermessen. In dieser Arbeit wird eine Methode dazu dargestellt:

Nach Metaphasenpräparation wird mit zwei verschiedenen Cy3-markierten PNA-Sonden gleichzeitig hybridisiert: eine bindet an die Telomersequenzen, die andere an das Zentromer von Chromosom 2. Letztere dient bei der Auswertung als Referenz. Mit einer von MetaSystems speziell dafür entwickelten Software werden die einzelnen Telomerintensitäten innerhalb einer Zelle auf chromosomenspezifischer Basis gemessen und im Verhältnis zum Referenzsignal umgerechnet. Auf diese Weise werden technisch bedingte Unterschiede in Präparation und Hybridisierung genauso nivelliert wie der so genannte „fading effect“, dem jeder Fluoreszenzfarbstoff unterworfen ist. Das System mißt also keine „Telomerlängen“ im eigentlichen Sinn, sondern primär Fluoreszenzintensitäten, die sekundär in relative Fluoreszenzwerte umgerechnet werden.

Das System erlaubt außerdem die getrennte Auswertung von nur einem spezifischen Chromosom innerhalb eines Falles, die Berechnung von

Durchschnittswerten auch innerhalb eines ganzen Kollektivs und deren anschließende statistische Aufarbeitung.

Mit dieser in dieser Arbeit beschriebenen Methode wird es möglich sein, die Dynamik von Telomerveränderungen schneller und gleichzeitig exakter zu untersuchen, als das in der Vergangenheit der Fall war. In Anbetracht der Brisanz des Telomerproblems ist eine weite Verbreitung des Systems wünschenswert.

## 6 Literaturverzeichnis

**Autexier C**, Greider CW: Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. *Trends Biochem Sci* 21: 387-91 (1996)

**Aviv A**, Aviv H: Telomeres, hidden mosaicism, loss of heterozygosity, and complex genetic traits. *Hum Genet* 103: 2-4 (1998)

**Boei JJ**, Vermeulen S, Fomina J, Natarajan AT: Detection of incomplete exchanges and interstitial fragments in X-irradiated human lymphocytes using a telomeric PNA probe. *Int J Radiat Biol* 73: 599-603 (1998)

**Bryan TM**, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR: Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 14: 4240-8 (1995)

**Bryant JE**, Hutchings KG, Moyzis RK, Griffith JK: Measurement of telomeric DNA content in human tissues. *Biotechniques* 23: 476-8 (1997)

**Butler MG**, Sciadini M, Hedges LK, Schwartz HS: Chromosome telomere integrity of human solid neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet* 86: 50-3 (1996)

**Chin L**, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee SL, Gottlieb GJ, Greider CW, DePinho RA: p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 97: 527-38 (1999)

**Ducray C**, Pommier JP, Martins L, Boussin FD, Sabatier L: Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process. *Oncogene* 18: 4211-23 (1999)

**Engelhardt M**, Drullinsky P, Guillem J, Moore MAS: Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 3: 1931-1941 (1997)

**Frenck RW**, Blackburn EH, Shannon KM: The rate of telomere sequence loss in human leucocytes varies with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5607-5610 (1998)

**Greider CW**: Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 65: 337-65 (1996)

**Guerrini AM**, Camponeschi B, Ascenzioni F, Piccolella E, Donini P: Subtelomeric as well as telomeric sequences are lost from chromosomes in proliferating B lymphocytes. *Hum Mol Genet* 2: 455-60 (1993)

**Harley CB**: Telomeres and aging. In: Blackburn EH, Greider CW (Hrsg) *Telomeres*, Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press, S.247-263 (1995)

**Harley CB**, Futcher AB, Greider CW: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature Genetics* 345: 458-60 (1990)

**Hayflick L**, Moorhead PS: The serial cultivation of human diploid strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621 (1961)

**Hayflick L**: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636 (1965)

**Hultdin M**, Gronlund E, Norrback K, Eriksson-Lindstrom E, Just T, Roos G: Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 26: 3651-6 (1998)

**Jeanclos E**, Krolewski A, Skurnick J, Kimura M, Aviv H, Warram JH, Aviv A: Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM. *Diabetes* 47: 482-6 (1998)

**Kakuo S**, Asaoka K, Ide T: Human is a unique species among primates in term of telomere length. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 308-14 (1999)

**Kapitza HG**: Mikroskopieren von Anfang an. Carl Zeiss Jena GmbH (1997)

**Kim NW**, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-5 (1994)

**de Lange T**, Shiue L, Myers MR, Cox DR, Naylor SL, Killery Am, Varmus HE: Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10: 518-527 (1990)

**Lansdorp PM**, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ: Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5: 685-91 (1996)

**Martens UW**, Zijlmans JMJM, Poon SSS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, Ward RK, Lansdorp PM: Short telomeres on human chromosome 17p. *Nature Genetics* 18: 76-80 (1998)

**Nielsen PE**, Egholm M, Berg RH, Buchardt O: Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254: 1497-500 (1991)

**Nielsen PE**: Applications of peptide nucleic acid. *Curr Opin Biotechnol* 10: 71-5 (1999)



**Ohashi K**, Tsutsumi M, Nakajima Y, Kobitsu K, Nakano H, Konishi Y: Telomere changes in human hepatocellular carcinomas and hepatitis virus infected noncancerous livers. *Cancer* 77: 1747-51 (1996)

**Olovnikov AM**: Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* 201: 1496-9 (1971)

**Olovnikov AM**: 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: 181-90 (1973)

**de Pauw ES**, Verwoerd NP, Duinkerken N, Willemze R, Raap AK, Fibbe WE, Tanke HJ: Assessment of telomere length in hematopoietic interphase cells using in situ hybridization and digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 32: 163-9 (1998)

**Reddel RR**, Bryan TM, Murnane JP: Immortalized cells with no detectable telomerase activity. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62: 1254-62 (1997)

**Rufer N**, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM: Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol* 16: 743-7 (1998)

**Shay JW**, Bacchetti S: A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33: 787-91 (1997)

**Slijepcevic P**, Hande MP: Chinese hamster telomeres are comparable in size to mouse telomeres. *Cytogenet Cell Genet* 85: 196-199 (1999)

**Uhlmann E**, Peyman A, Breipohl G, Will DW: PNAs: synthetische Polyamidnucleinsäuren mit außergewöhnlichen Bindungseigenschaften. *Angew Chem* 110: 2954-83 (1998)

**Watson JD:** Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239: 197-201 (1972)

**Zeichner SL,** Palumbo P, Feng Y, Gee D, Sleasman J, Goodenov M, Biggar R, Dimitrov D. Rapid telomere shortening in children. *Blood* 93: 2824-30 (1999)

**Zhang DK,** Ngan HYS, Cheng RYS, Cheung ANY, Liu SS, Tsao SW: Clinical significance of telomerase activation and telomeric restriction fragment (TRF) in cervical cancer. *Eur J Cancer* 35: 154-60 (1999)

## 7 Publikationsliste

Scheil S, Brüderlein S, Eicker M, Herms J, Herold-Mende C, Steiner H-H, Barth TFE, Möller P: Low frequency of chromosomal imbalances in anaplastic ependymomas as detected by comparative genomic hybridization. *Brain Pathol* (2001) in press

Möller P, Brüderlein S, Sträter J, Leithäuser F, Hasel C, Bataille F, Moldenhauer G, Pawlita M, Barth TFE: MedB1, a human tumor cell line derived from a primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Int J Cancer* (2001) in press

Jäckle T, Hasel C, Brüderlein S, Melzner I, Jehle PH, Möller P: Sustained hypo-osmotic stress induced cell death – apoptosis by defeat. *Am J Physiol* (submitted)

Wabitsch M, Brüderlein S, Melzner I, Braun M, Mechttersheimer G, Möller P: LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation. *Int J Cancer* 88(6): 889-94 (2000)

Bruch J, Schulz WA, Haussler J, Melzner I, Brüderlein S, Möller P, Kemmerling R, Vogel W, Hameister H: Delineation of the 6p22 amplification unit in urinary bladder carcinoma cell lines. *Cancer Res* 60(16): 4526-30 (2000)

Bruch J, Wöhr G, Brüderlein S, Barbi G, Wolter H, Dixkens C, Mattfeldt T, Möller P, Paiss T, Hautmann R, Vogel W, Hameister H: Detailed marker chromosome analysis in cell line U-BLC1, established from transitional-cell carcinoma of the bladder. *Int J Cancer* 80(6): 903-10 (1999)

Bruch J, Wöhr G, Hautmann R, Mattfeldt T, Brüderlein S, Möller P, Sauter S, Hameister H, Vogel W, Paiss T: Chromosomal changes during progression of transitional cell carcinoma of the bladder and delineation of the amplified interval on chromosome arm 8q. *Genes Chromosome Cancer* 23(2): 167-74 (1998)

Barth TF, Brüderlein S, Rinaldi N, Mechtersheimer G, Möller P: Pleural mesothelioma mimics the integrin profile of activated, sessile rather than detached mesothelial cells. *Int J Cancer* 72(1): 77-86 (1997)

Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S, Brüderlein S, du Manoir S, Bentz M, Möller P, Lichter P: Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Bood* 87(4): 1571-8 (1996)

Sträter J, Günthert AR, Brüderlein S, Möller P: Microwave irradiation of paraffin-embedded tissue sensitizes the TUNEL method for in situ detection of apoptotic cells. *Histochem Cell Biol* 103(2): 157-60 (1995)

Möller P, Koretz K, Leithäuser F, Brüderlein S, Henne C, Quentmeier A, Krammer PH: Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* 57(3): 371-7 (1994)

Koretz K, Brüderlein S, Henne C, Fietz T, Laque M, Möller P: Comparative evaluation of integrin alpha- and beta-chain expression in colorectal carcinoma cell lines and in their tumours of origin. *Virchows Arch* 425(3): 229-36 (1994)

Koretz K, Brüderlein S, Henne C, Möller P: Expression of CD59, a complement regulator protein and a second ligand of the CD2 molecule, and CD46 in normal and neoplastic colorectal epithelium. *Br J Cancer* 68(5): 926-31 (1993)

Leithäuser F, Dhein J, Mechtersheimer G, Koretz K, Brüderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin KM, Krammer PH, Möller P: Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest.* 69(4): 415-29 (1993)

Möller P, Henne C, Leithäuser F, Eichelmann A, Schmidt A, Brüderlein S, Dhein J, Krammer PH: Coregulation of the APO-1 antigen with intercellular adhesion molecule-1 (CD54) in tonsillar B cells and coordinate expression in follicular center B cells and in follicle center and mediastinal B-cell lymphomas. *Blood* 81(8): 2067–75 (1993)

Koretz K, Brüderlein S, Henne C, Möller P: Decay-accelerating factor (DAF, CD55) in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. *Br J Cancer* 66(5): 810-4 (1992)

van der Bosch K, Becker I, Savelyeva L, Brüderlein S, Schlag P, Schwab M: Deletions in the short arm of chromosome 8 are present in up to 90% of human colorectal cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 5(1): 91-5 (1992)

Möller P, Henne C, Schmidt A, Eichelmann A, Leithäuser F, Brüderlein S, Dhein J, Krammer PH: [Expression of APO-1, a cell surface molecule mediating apoptosis, during normal B cell ontogeny and in B cell tumors. Co-expression and coregulation of APO-1 and ICAM-1 (CD54) in germinal central cells]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 76: 237-42 (1992). Review. German.

Liebrich W, Gonser S, Brüderlein S, Schlag P: A new human colon carcinoma line. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A(5): 345-6 (1991)

Leister I, Weith A, Brüderlein S, Cziepluch C, Kangwanpong D, Schlag P, Schwab M: Human colorectal cancer: high frequency of deletions at chromosome 1p35. *Cancer Res* 50(22): 7232-5 (1990)

Brüderlein S, van der Bosch K, Schlag P, Schwab M: Cytogenetics and DNA amplification in colorectal cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2(1): 63-70 (1990)

Weith A, Martinsson T, Cziepluch C, Brüderlein S, Amler LC, Berthold F, Schwab M: Neuroblastoma consensus deletion maps to 1p36.1-2. *Genes Chromosomes Cancer* 1(2): 159-66 (1989)

Schwab M, Oehlmann R, Brüderlein S, Wakamatsu Y: Amplified DNA in cells of genetic melanoma of Xiphophorus. *Oncogene* 4(2): 139-44 (1989)

Tittelbach H, Brüderlein S, Gebhart E: The activity of bleomycin and modifiers of its clastogenic effect on the interphase chromatin of Indian muntjak fibroblasts. *Cell Biol Toxicol* 5(1): 39-50 (1989)

Brüderlein S, Gebhart E, Siebert E, Augustus M: Premature chromosome condensation – studies on human metastatic carcinoma cells. *Hum Genet* 73(1): 44-52 (1986)

Augustus M, Brüderlein S, Gebhart E: Cytogenetic and cell cycle studies in metastatic cells from ovarian carcinomas. *Anticancer Res* 6(2): 283-9 (1986)

Hosari E, Brüderlein S, Gebhart E: Microcell-mediated chromosome transfer from human tumor cells to human recipient cells evidenced by premature condensation of the transferred chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* 20(1-2): 63-71 (1986)

Gebhart E, Brüderlein S, Augustus M, Siebert E, Feldner J, Schmidt W: Cytogenetic studies on human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 8(2): 125-38 (1986)

Brüderlein S, Gebhart E: Double minutes in prematurely condensed chromatin of human tumor cells. *Cancer Genet Cytogenet* 16(2): 145-52 (1985)

Gebhart E, Brüderlein S, Tulusan AH, von Maillot K, Birkmann J: Incidence of double minutes, cytogenetic equivalents of gene amplification, in human carcinoma cells. *Int J Cancer* 34(3): 369-73 (1984)

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Möller dafür, dass er mir die Zeit einräumte, das Programm zu entwickeln und die nötigen Mittel aus dem Forschungsetat des Instituts zur Verfügung stellte. Er hatte die Idee dieses Thema auch in eine Doktorarbeit umzusetzen.

Weiter möchte ich der Firma MetaSystems ganz herzlich danken für die wirklich exzellente Zusammenarbeit und die prompte Umsetzung meiner Ideen in funktionsfähige Software. Ich wünsche Ihr viel Erfolg bei der Vermarktung dieses Programms.

Mein Dank gilt auch der Firma DAKO für die vielen kostenlosen PNA-Sonden und für die praktischen Hinweise für deren Gebrauch.

Des weiteren bedanke ich mich bei Sven Perner, Cornelia Hasel und Werner Kugler für Hilfe in Softwarekrisen und bei der Formatierung der Arbeit sowie bei Simone Westenfelder für extensive Literaturrecherche und mehrfaches Korrekturlesen.

Und *last not least* möchte ich die Personalabteilung des Universitätsklinikums Ulm dankend erwähnen, die mich nötigte, innerhalb von zwei Wochen meine Doktorarbeit zu schreiben.