

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Identifizierung von Kandidatengen
für einen „Telomer-Positions-Effekt“ beim
Hutchinson-Gilford-Progerie Syndrom**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Vera Schulz
aus Eisenhüttenstadt

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT	4
1. EINLEITUNG	8
1.1 Die Seneszenz.....	8
1.2 Replikative Seneszenz – eine „biologische Uhr“	8
1.3 Stress induzierte Seneszenz.....	13
1.4 Signalwege in die Seneszenz.....	14
1.5 Der „Telomer-Positions-Effekt“.....	17
1.6 Das „Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom“	24
1.7 Ableitung der Fragestellung	25
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 Materialien und Reagenzien	27
2.2 Geräte	28
2.3 Methoden.....	29
2.3.1 Microarray Analyse	29
2.3.2 UV-Bestrahlung der Zellen.....	31
2.3.3 Die Immortalisierung der Zellen.....	31
2.3.4 Die Zellkultur.....	31
2.3.5 Die Zellen	34
2.3.6 Isolierung der Gesamt-RNA	36
2.3.7 Relative Quantifizierung der mRNA mittels Real-Time RT-PCR.....	38
2.3.8 Telomerlängenmessung mittels Real-Time PCR.....	41
2.3.9 Statistische Methoden	44
2.3.10 Richtlinien.....	45

3. ERGEBNISSE	46
3.1 Vergleich primärer und hTERT immortalisierter Kontroll- und Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten	46
3.1.1 Charakterisierung bezüglich der Wachstumskinetik	46
3.1.2 Charakterisierung bezüglich der Telomerlänge	54
3.2 Identifizierung potentieller TPE-Kandidatengene	57
3.3 Charakterisierung der potentiellen Kandidatengene mittels Real-Time PCR	61
4. DISKUSSION	75
4.1 Diskussion der Methodik	75
4.2 Ist Apolipoprotein D ein mögliches TPE-Gen?	81
4.3 Ausblick: Warum ist es schwierig, einen TPE zu entdecken?	84
5. LITERATURVERZEICHNIS	87
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	95
7. TABELLENVERZEICHNIS	97
8. ANHANG	98

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie
Charité-Universitätsmedizin Berlin
CC5: Diagnostische und präventive Labormedizin

ABSTRACT

(deutsch)

Identifizierung von Kandidatengenen für einen „Telomer-Positions-Effekt“
beim Hutchinson-Gilford-Progerie Syndrom

Vera Schulz

In den meisten menschlichen Zellen ist das Enzym Telomerase, welches für die Aufrechterhaltung der Telomerlänge und Telomerfunktion zuständig ist, nur sehr gering aktiv. Als Folge kommt es mit jedem Zellzyklus zu einer progressiven Verkürzung unserer Telomere. Über die p53 Aktivierung führen sowohl die Telomerverkürzung als auch telomer-unabhängige Stresssignale zur Induktion der Seneszenz. Eine Unterdrückung der Genexpression telomernaher Gene, genannt „Telomer-Positions-Effekt“ (TPE), könnte möglicherweise ein weiterer alternativer Mechanismus sein, durch den Telomerverkürzung bzw. Telomerdysfunktion die replikative Seneszenz in menschlichen Zellen triggert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Genexpression des Apolipoprotein D (APOD) in Abhängigkeit von der Telomerlänge reguliert werden kann. Dabei dienten Fibroblasten mit Hutchinson-Gilford-Progerie (HGP) aufgrund ihrer verkürzten Telomere als Modell für telomer-abhängiges Altern. Durch Transfektion der Fibroblasten mittels humaner Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) ist es möglich, die unter physiologischen Bedingungen auftretende progressive Telomerverkürzung zu umgehen und somit die Lebensspanne von Zellen zu verlängern. Durch Real-Time PCR Messungen konnte gezeigt werden, dass es dabei zu einer telomerase-abhängigen Unterdrückung der Genexpression von APOD kommt. Aufgrund der bekannten protektiven Funktion des APOD während der Zellalterung könnte dies ein Hinweis auf die Existenz einer telomerlängen-abhängigen Unterdrückung der Genexpression beim Menschen sein [75, 94-95, 103].

ABSTRACT

(english)

Identification of candidate genes for a “Telomere-position-effect”
in Hutchinson-Gilford-Progeria syndrome

Vera Schulz

In most normal human cells the enzyme human reverse transcriptase telomerase (hTERT), which maintains telomere length and function, is expressed at very low cellular levels. As a consequence, progressive telomere shortening occurs with each cell division. Both telomere shortening/dysfunction and telomere-independent stress signals are funneled down to p53 activation and may lead to induction of senescence. Much controversy exists as to whether transcriptional silencing of genes adjacent to telomeres, called “telomere-position-effect” (TPE), is an alternative mechanism by which telomere shortening/dysfunction may trigger and/or modulate replicative senescence in human cells.

This work shows that the expression of apolipoprotein D (APOD) can be regulated in a telomere length dependent manner. Thus, HGP-fibroblasts may serve as a model for telomere-dependent aging. The transfection of hTERT in HGP-fibroblasts prevents telomere shortening and is able to extend lifespan of these cells. Using Real-Time PCR it is shown that in most but not all investigated fibroblasts, expression of APOD decreases after transfection with hTERT. Because of the protective function of APOD during cell aging, which has been described in other studies, telomere length dependent suppression of APOD could play a physiological role in cell aging [75, 94-95, 103].

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetylierung
APOD	Apolipoprotein D
ATM	Ataxia Teleangiektasia Mutated (Proteinkinase)
ATR	Ataxia Teleangiektasia and Rad3-related (Proteinkinase)
CDK	Cyclin-dependant kinase
cDNA	Komplementäre DNA
cRNA	Komplementäre RNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbrüche
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FOA	Fluororotsäure
GCOS	GeneChip Operating Software
HGP	Hutchinson Gilford Progerie
HGPS	Hutchinson Gilford Progerie Syndrom
HP	Heterochromatin Protein
hTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase
LMNA	Laminin A
Me	Methylierung
MMQPCR	Monochrome multiplex quantitative PCR
mRNA	messenger RNA
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NTC	Negativkontrolle
p16 ^{INK4A}	Cyclin-dependant kinase inhibitor 2A
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
p53	Tumorsupressor Protein

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Population Doubling
PE	Phycoerythrin
PEV	Positionseffekt-Variegation
POT	Protection of telomere (Protein)
PPIA	Peptidyl-Prolyl-Isomerase A (Cyclophilin A)
RAP	Repressor activator protein
RAS	Rat sarcoma (Proto-Onkogen)
RB	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseH	Ribonuklease H
rRNA	Ribosomale RNA
S	Sequenzlänge eines Referenzgens (Albumin)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SIPS	Stress induced premature senescence
STAR	Steroidogenic acute regulatory protein
T	Sequenzlänge der Telomere
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TERC	Telomerase RNA
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TIN	TRF1 interacting nuclear protein
TPE	Telomer Positions Effekt
TPP	Tripeptidyl-Peptidase
TRF	Telomeric repeat binding factor (Protein)
UNG	Uracil-N-Glycosylase
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 *Die Seneszenz*

Der Begriff der Seneszenz (lat. Senescere „altern“) ist definiert als irreversibler Wachstumsarrest von Zellen, der am Ende von Alterungsprozessen steht [1-2].

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts begannen Wissenschaftler sich mit der Lebensdauer und Teilungsfähigkeit unserer Zellen zu beschäftigen. Nach ersten Zellkultivierungen *in vitro* ging man davon aus, dass diese unbegrenzt teilungsfähig seien. Diese Annahme wurde Anfang der 60er Jahre von LEONARD HAYFLICK und PAUL MOORHEAD widerlegt. Es kam zur Definition des Hayflick- Limits, das besagt, dass normale Zellen nur eine begrenzte Teilungsfähigkeit besitzen und sich damit wesentlich von Krebszellen unterscheiden.

Der Grund für die begrenzte Teilungsfähigkeit sind zelluläre Prozesse, ausgelöst durch mehrere mögliche Ursachen: z. B. genetische Faktoren, Einfluss freier Radikale, Defekte in den Reparaturmechanismen der DNA und die Verkürzung der Chromosomenenden, der Telomere [3].

1.2 *Replikative Seneszenz – eine „biologische Uhr“*

Die Telomere

Telomere sind spezifische DNA- Sequenzen am Ende der Chromosomen, die keine spezifische genetische Information besitzen. Sie dienen dem Schutz der Chromosomen und weisen im Gegensatz zu niederen Lebewesen wie *Sachharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) mit einer Länge von 300 bp beim menschlichen Neugeborenen eine Länge von etwa 5-30 kbp auf [4-6]. Die Eigenschaft intakter Telomere, die Enden der Chromosomen vor End-zu-End-Fusionen zu schützen, wurde erstmals durch HERMANN J. MÜLLER im Jahre 1938 beschrieben. 1941 erweiterte McCLINTOCK diese Erkenntnisse und schrieb den Telomeren eine Funktion bei der DNA-Replikation zu [7-9]. Die Sequenz der Telomere kann zwischen Individuen unterschiedlicher Arten variieren und besteht beim Menschen aus der repetitiven hexameren Sequenz (TTAGGG)_n [10-11]. Diese Sequenz besitzt am 3'-Ende der Chromosomen einen

guaninreichen Einzelstrang-Überhang aus ca. 150 Nucleotiden, welcher zur Bildung der speziellen Struktur der Telomere, des so genannten t-loop, notwendig ist [12-14].

Das konventionelle Modell der Telomerverkürzung wird erklärt durch die Unfähigkeit der DNA-Polymerase- α , die Enden linearer DNA nach Entfernung der RNA-Primer vollständig zu replizieren. Damit könnte eine Verkürzung um 3-5 bp pro Zellzyklus erklärt werden. Dies trifft jedoch nur auf niedere Lebewesen zu, wie z. B. die Hefe. Beim Menschen verkürzen sich die Telomere mit jeder Zellteilung um ca. 30-200 bp. Des Weiteren erklärt dieses Modell nur eine Verkürzung der Hälfte der Telomere, nämlich der des Verzögerungsstranges. Tatsächlich weisen jedoch 80-100% der Telomere guaninreiche 3'-Einzelstrangüberhänge auf. Diese Tatsachen führten zur Entwicklung eines überarbeiteten Modells. Demnach werden zusätzlich zur Primerentfernung die 5'-Enden des Führungs- und des Verzögerungsstranges durch eine Nuklease degradiert [10, 12, 15]. Die dadurch bedingte ständige Telomerverkürzung führt zu einer Limitierung der Zellteilung, bezeichnet als replikative Seneszenz (End-replications problem) [4].

Die Länge der Telomere stellt somit einen Indikator für das biologische Alter einer Zelle sowie für die verbleibende Fähigkeit zur mitotischen Teilung dar [15]. Humane Fibroblasten haben keine unbegrenzte Teilungsfähigkeit, sondern teilen sich nur ca. 50-80 mal, bis sie in die Seneszenz eintreten [4]. Nach HARLEY et al. (1990) spricht man auch von einer Art „biologischen Uhr“ [9-11, 13].

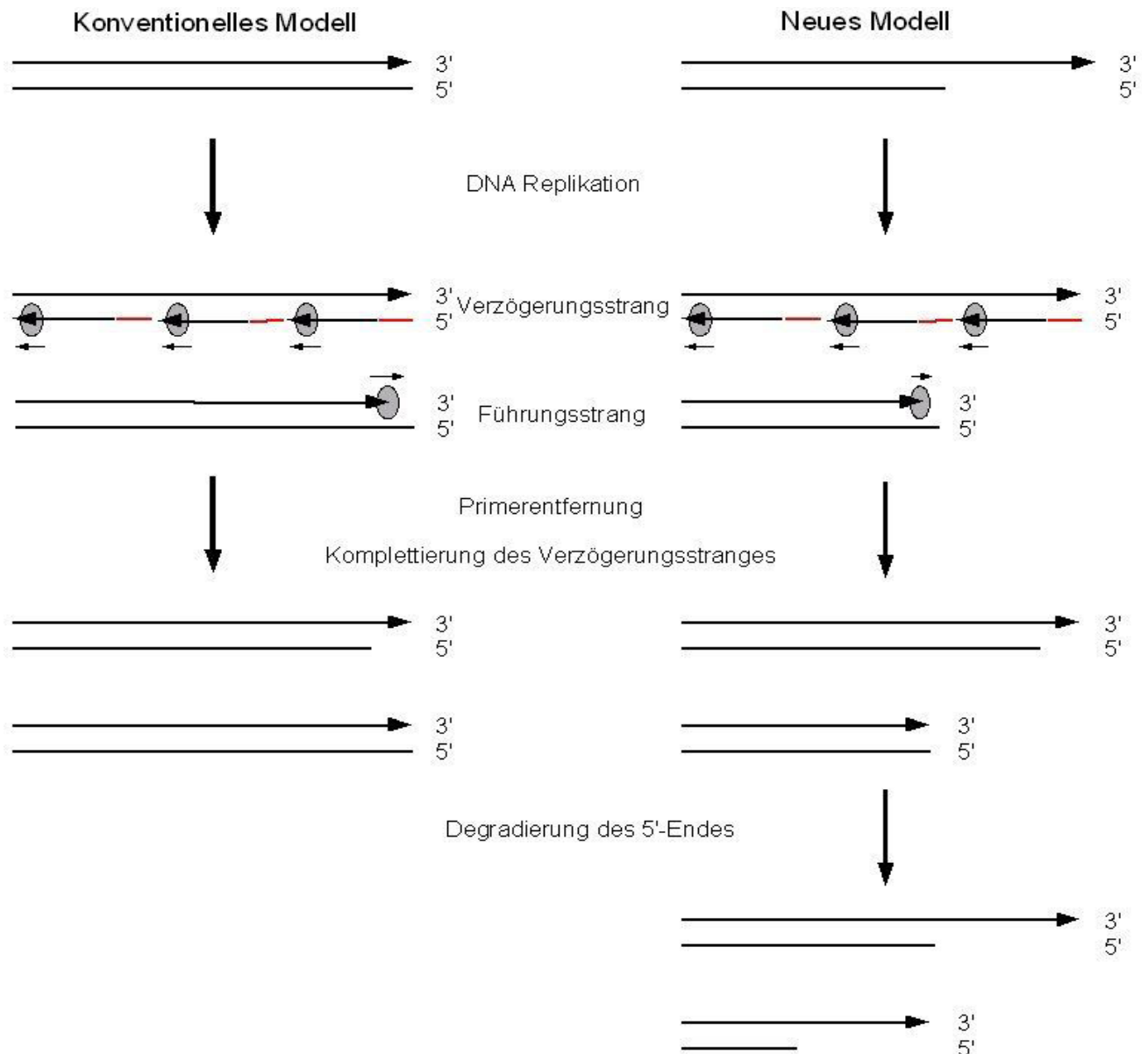


Abbildung 1: Schematische Darstellung des konventionellen und des überarbeiteten Modells der Telomerverkürzung.

Nach dem konventionellen Modell ist die Telomerverkürzung nur durch die Entfernung des Primers nach der Replikation des Verzögerungsstranges verursacht. Das neue Modell geht heute von einer Nukleaseaktivität aus, die das 5'-Ende sowohl des Führungsstranges als auch des Verzögerungsstranges aktiv verkürzt. Nach [10, 16]

Man nimmt an, dass der Verlust der Telomere antiproliferative Signale auslöst, die zur Einleitung der Seneszenz in der Zelle führen. Intakte Telomere werden durch die Bindung von spezifischen Telomer-Bindungsproteinen, dem sogenannten Shelterin-Komplex, geschützt [17-18]. Dieser Komplex besteht beim Menschen aus sechs Hauptproteinen (TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, POT1, TPP1) und einer Vielzahl weiterer assoziierter Proteine. Durch Verkürzung der

Telomere und Verlust dieser Proteine kommt es zur Erkennung von Doppelstrangbrüchen (DSB) und End-zu-End-Fusion der Chromosomen und schließlich zum Verlust der genomischen Stabilität, zur Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten und zum Wachstumsarrest [1, 15, 19].

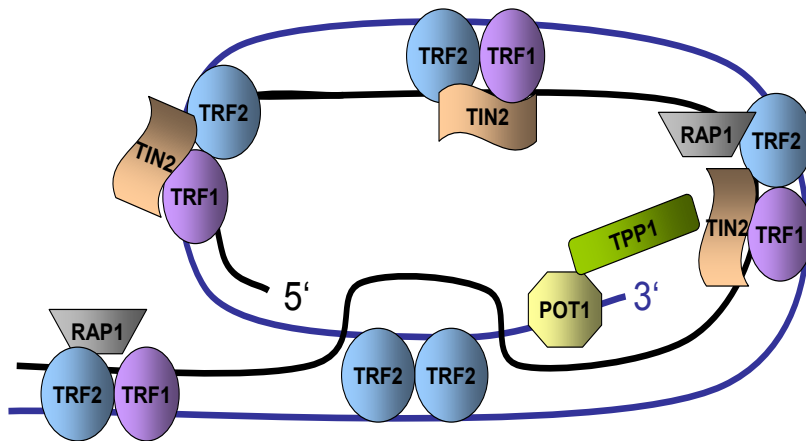


Abbildung 2: Telomer-Bindungsproteine: Der Shelterin-Komplex. Nach [20]

Es wird vermutet, dass der Eintritt in die Seneszenz einen Schutzmechanismus gegenüber der Entstehung maligner Tumore darstellt. Könnten sich Zellen ungehindert teilen, würde die Anzahl der Chromosomenaberrationen und Mutationen mit zunehmendem Alter der Zellen steigen [21]. Als Folge der Telomerverkürzung ist auch ein Zusammenhang mit dem Auftreten altersbedingter Krankheiten wie Herzinfarkt, Atherosklerose oder Morbus Alzheimer beschrieben [4].

Die Telomerase

Stammzellen, Keimbahnzellen und auch Krebszellen haben die Möglichkeit, sich der Seneszenz zu entziehen. Im Gegensatz zu normalen somatischen Zellen besitzen sie das Enzym Telomerase [12]. Sie ist eine reverse Transkriptase, die die guaninreichen Telomersequenzen am 3'-Ende von Chromosomen durch das Anfügen der repetitiven (TTAGGG)_n-Sequenz verlängert. Sie besteht aus zwei Untereinheiten: einer katalytischen Untereinheit (hTERT) und einem RNA-Template (TERC). Während hTERT nur in spezifischen Zellen, wie Krebs- oder Stammzellen, vorkommt, finden sich RNA-Templates in nahezu allen Zellen. So könnte die Höhe der Expression von hTERT als wesentlicher Marker zur Krebsfrüherkennung dienen [4, 22].

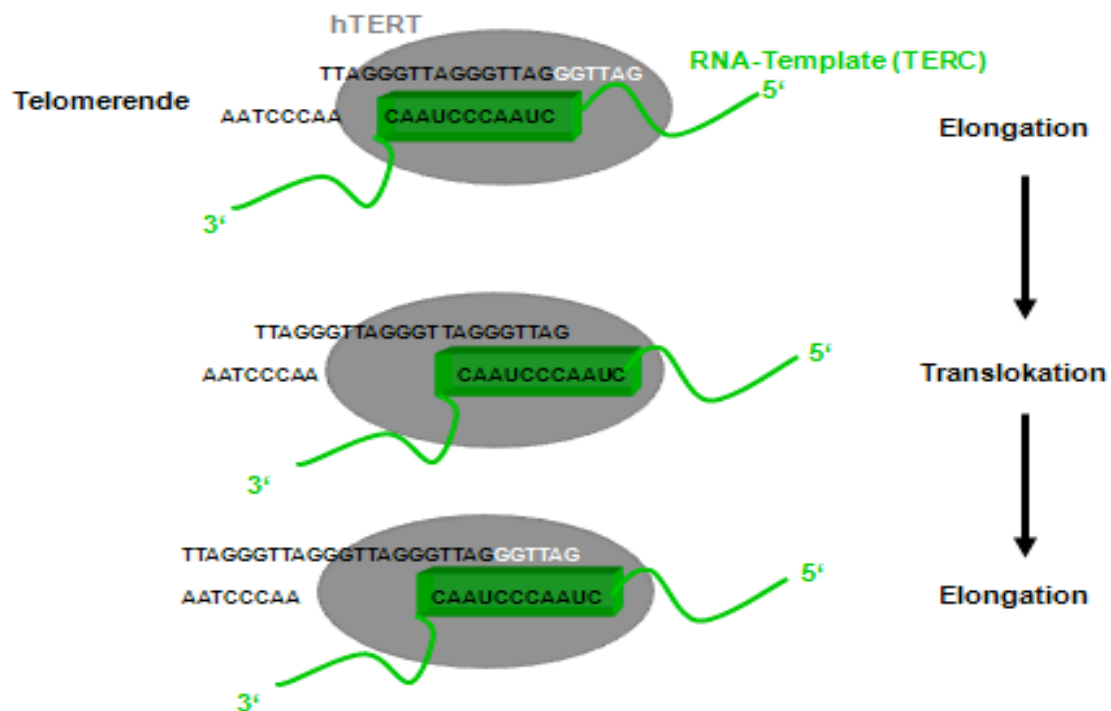


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktion der Telomerase.

Das Einbringen von hTERT in Zellen, die diese normalerweise nicht besitzen, spielt heute eine wesentliche Rolle bei der Immortalisierung von Zellen, in der Erforschung von Krankheiten und dem dauerhaften Anlegen von Zellkulturen zu Forschungszwecken [23]. Im Jahre 1981 transformierten HAYFLICK und seine Kollegen erstmals eine humane Zellkultur in eine immortalisierte Zelllinie mittels chemischen Karzinogenen und Strahlung [3]. Heute gibt es unterschiedliche Möglichkeiten zur Immortalisierung von Zellen.

Die Immortalisierung von Zellen *in vitro* ist unter anderem möglich durch die Fusion gesunder Zellen mit Tumorzellen und durch Transfektion mit viralen Onkogenen. Bei diesen Methoden ist aber zu beachten, dass Tumorzellen u. a. die Fähigkeit zur Kontaktinhibition verloren haben. Ihr ungehindertes Wachstum wird außerdem durch den Verlust normaler Zellzykluskontrollpunkte verdeutlicht. Dadurch kommt es bei Tumorzellen vermehrt zu Chromosomenaberrationen und damit zu einem veränderten Karyotyp. Deshalb hat die Immortalisierung mit hTERT viele Vorteile, da ein juveniler, physiologisch eher dem *in vivo* phänotypisch entsprechenden Zelltyp erzeugt wird. Bei diesen Zellen bleiben im Gegensatz zu jenen, die mit Onkogenen transformiert bzw. mit Stammzellen fusioniert wurden, die Fähigkeit

zur Kontaktinhibition, die Zellzykluskontrolle, die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und ein normaler Karyotyp erhalten [21, 24]. Es konnte bereits in mehreren Publikationen gezeigt werden, dass die exogene Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase zu einer Verzögerung der Seneszenzeinleitung in der Zelle führen kann [23, 25-26]. Fibroblastenzellen, Pigmentepithelzellen der Retina und auch Gefäßendothelzellen wiesen nach Immortalisierung mittels hTERT eine deutliche Steigerung der Zellverdopplung (PD = Population Doubling) von 50-80 auf mindestens 100-200 bis zum Eintritt in die Seneszenz auf [21]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die hTERT-Immortalisierung verwendet, um das Hutchinson-Gilford-Progerie Syndrom (HGPS), eine bisher nur wenig erforschte Krankheit, bei der Zellen genomische Instabilität und frühzeitige Alterungsprozesse aufweisen, näher zu betrachten. Messungen der Telomerlängen von Fibroblasten dieses Syndroms zeigten, dass diese gegenüber gesunden Fibroblasten verkürzt sind [24].

1.3 Stress induzierte Seneszenz

Ob das Modell der replikativen Seneszenz neben zahlreichen gut etablierten Ergebnissen unter *in vitro* Bedingungen auch *in vivo* eine Rolle bei der Alterung unserer Zellen spielt, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt [27].

Man geht davon aus, dass auch weitere Faktoren neben der Telomerverkürzung die Lebensspanne von Zellen beeinflussen. Ein Hinweis darauf ist das unterschiedliche Wachstum von Fibroblasten unter veränderten Kulturbedingungen: Der physiologische Sauerstoffanteil, dem die Zellen in den meisten Geweben ausgesetzt sind, beträgt 2-5% und ist damit wesentlich geringer als ein Anteil von 21% unter Kulturbedingungen. Es wurde gezeigt, dass Fibroblasten unter normalen Kulturbedingungen eine wesentlich höhere Geschwindigkeit der Telomerverkürzung aufweisen als unter veränderten Bedingungen mit einem geringeren Sauerstoffanteil [25].

Mit steigendem Alter unserer Zellen *in vivo* kommt es aufgrund verschiedener Effekte (vermehrter Anfall von Sauerstoffradikalen, verminderte Wirkung anti-oxidativer Prozesse) zu einer Zunahme des oxidativen Stresses in den Geweben. Diese Tatsache könnte auf eine zunehmende Telomerverkürzung, bedingt durch oxidativen Stress, auch unter *in vivo* Bedingungen hinweisen [27].

Oxidativer Stress durch UV-Bestrahlung, defekte Reparaturmechanismen, genetische Faktoren oder eine Aktivierung onkogener Signalwege (RAS) können einen unmittelbaren Wachstumsarrest bedingen [25, 28-29]. Diese Art der Seneszenz bezeichnet man als Stress induzierte Seneszenz („Stress Induced Premature Senescence“ (SIPS)). Die Ursache wird in der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen gesehen und ist unabhängig von der Länge der Telomere [30]. Eine Immortalisierung mittels hTERT ist lediglich in der Lage die replikative Seneszenz hinauszögern. Jedoch vermag sie nicht, den durch Stress induzierten Wachstumsarrest zu verhindern [31].

Sowohl replikative Seneszenz als auch Stress induzierte Seneszenz setzen ähnliche Signalkaskaden in Gang. Vermutlich üben sowohl progressive Telomerverkürzung als auch durch Stress bedingte DNA-Schäden einen gemeinsamen Einfluss auf den Alterungsprozess aus [20].

1.4 Signalwege in die Seneszenz

Das Eintreten einer Zelle in die Seneszenz kann durch eine Reihe unterschiedlicher Faktoren beeinflusst werden. Die Signalwege, welche die Seneszenz einleiten, können sich dabei jedoch unterscheiden.

Nach SHAY et al. führt eine Aktivierung der p53-p21-pRB Kaskade zur zellulären Seneszenz. Man geht davon aus, dass verkürzte Telomere als DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) erkannt werden. Diese DSB lösen in der Zelle eine Reaktion auf den DNA-Schaden aus, woraufhin es zu einer Aktivierung der Kinasen ATM (Ataxia Teleangiektasia Mutated) und ATR (ATM and Rad3 related) kommt. Diese Kinasen sind in der Lage zahlreiche andere in die DNA-Schadensantwort involvierte Proteine zu regulieren. Eines dieser Proteine, dem eine bedeutende Rolle bei der Seneszenzeinleitung zugeschrieben wird, ist das Tumorsuppressor-Protein p53. Durch Aktivierung von p21 kommt es zu einer Inhibierung von CDK2/Cyklin E. Dadurch wird die Phosphorylierung des Tumorsuppressor-Proteins pRb verhindert und eine Zellzyklusarretierung ausgelöst.

Ein anderer Weg, der ebenfalls im Zellzyklusarrest endet, geht über das Protein p16^{INK4A}. Durch eine Hemmung von CDK4 u. 6 bzw. Cyklin D kommt es auch hier zu einer Hypophosphorylierung des pRb [28, 32-36].

Man nimmt an, dass p16^{INK4A} im Gegensatz zum universellen p53 nur in einigen Zellpopulationen aktiv ist. So scheint p53 der primäre Faktor in der Seneszeinleitung zu sein. Bei einem Defekt der p53/pRB Kaskade reagieren Zellen refraktär gegenüber der Seneszenz und wachsen trotz kurzer Telomere weiter. So stellt der Eintritt in die Seneszenz vermutlich auch einen wichtigen Schutz gegenüber der Entstehung maligner Tumore dar [37-38].

Neben den indirekten Alterungsmechanismen wird seit einigen Jahren ein weiterer direkter Mechanismus diskutiert. Es gibt Hinweise, dass die Telomere nicht nur zum Schutz der Chromosomenenden dienen, sondern durch ihre komplexe Struktur sowie heterochromatine Eigenschaften die Expression subtelomer gelegener Gene inhibieren können. Dies wird als „Telomer-Positions-Effekt“ (TPE) definiert [39]. Mit der Verkürzung der Telomere könnte dieser Effekt verloren gehen und die Expression von Genen, welche den Zellzyklusarrest einleiten, auslösen.

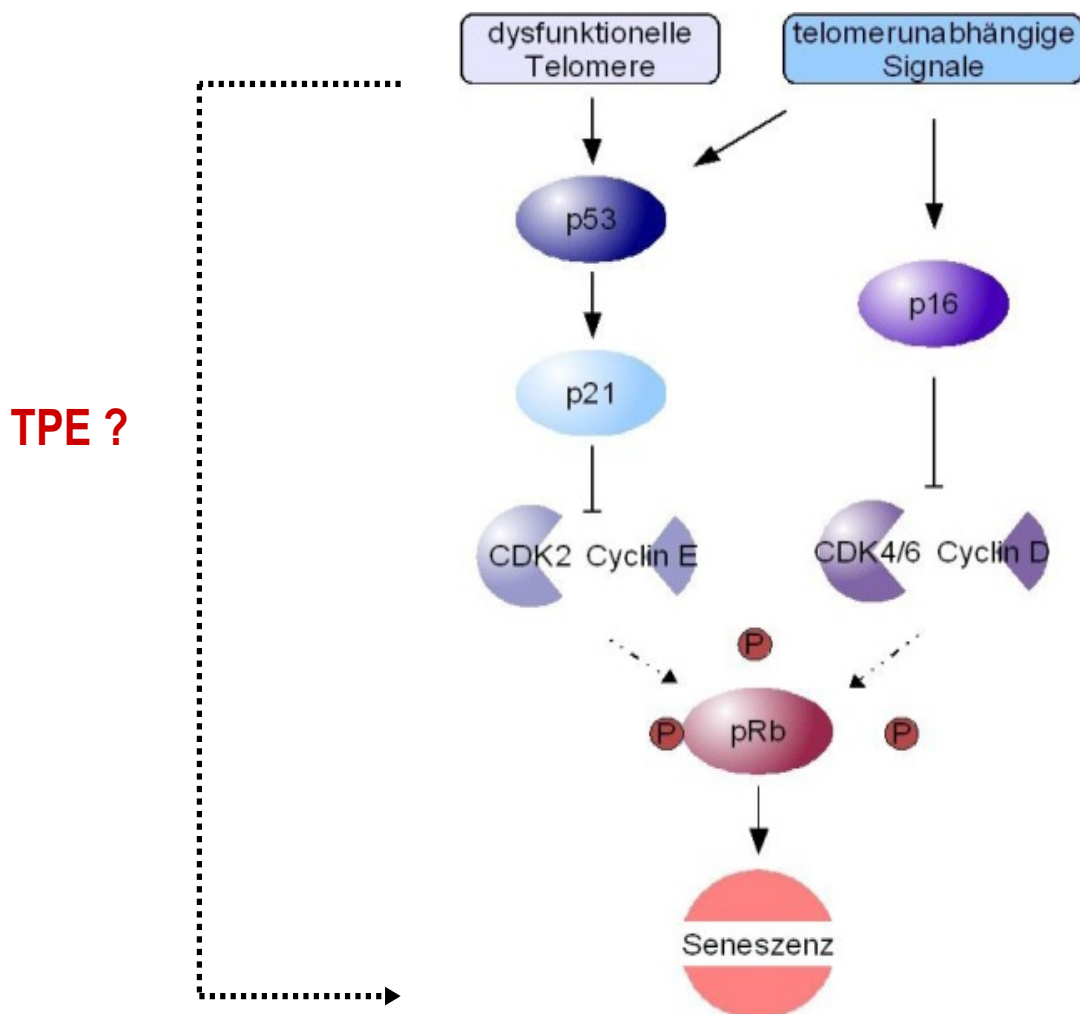


Abbildung 4: Signalwege in die Seneszenz.

Dysfunktionelle Telomere und/oder telomer-unabhängige Signale lösen über die p53/p21-Kaskade bzw. p16 eine Hypophosphorylierung von pRb aus und leiten die Zelle damit in die Seneszenz [16].

Möglicherweise stellt der „Telomer-Positions-Effekt“ (TPE) einen weiteren Mechanismus dar, wonach es durch progressive Telomerverkürzung und Verlust der schützenden „Capping-Struktur“ der Telomere sowie dadurch bedingte Veränderungen der Chromatinstruktur zu einer Expression vorher stillgelegter seneszenzeinleitender Gene kommt.

1.5 Der „Telomer-Positions-Effekt“

Der „Telomer-Positions-Effekt“ (TPE) ist definiert als eine Unterdrückung der Genexpression in subtelomeren Regionen. Er bedingt eine Veränderung der Genexpression im Zusammenhang mit progressiver Telomerverkürzung [1].

Den ersten Hinweis auf einen TPE fanden HAZELRIGG et al. (1984) bei Untersuchungen der Telomerstruktur von *Drosophila melanogaster* [40-41]. Das sogenannte „white gene“ ist als eines der meist untersuchten Gene bekannt. Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des Gens führen, bedingen weiße Augen bei *Drosophila melanogaster*. Der Wildtyp dieser Fliege besitzt rot-braune Augen, wobei das „white gene“ telomerfern lokalisiert ist. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Mutationen, durch die dieses Gen in eine heterochromatinreiche Region verschoben wird, Fliegen mit weißen Augen bedingen. Diese Art der Stilllegung von Genen bezeichnet man als „Positions Variegation Effekt (PEV)“. Sie ist in euchromatinreichen Regionen reversibel.

Das Chromatin der Telomere und subtelomeren Regionen unterscheidet sich vom Heterochromatin auf anderen Bereichen der Chromosomen durch die spezifische Architektur der Telomere, wie die repetitiven Sequenzen, die spezifische Struktur und die Bindungsproteine. Trotzdem fand man eine Stilllegung der Genexpression ähnlich der des PEV auch nach Integration des „white gene“ in die Nähe der Telomere. Diese Fliegen besaßen ebenfalls weiße Augen. Die Ergebnisse gaben Anlass für die weitere Suche nach einem möglichen TPE [39, 41-44].

Ungefähr fünf Jahre später begann man den TPE an *Saccharomyces cerevisiae* zu studieren. Die Telomere dieser Bäckerhefe besitzen im Gegensatz zu *Drosophila melanogaster* repetitive Telomersequenzen und ähneln daher den meisten eukaryotischen Telomeren [39]. Sie bestehen bei dieser Hefe aus ca. 350 bp der repetitiven Sequenz $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ sowie einer mehrere kbp langen subtelomeren Sequenz. Diese Sequenz ist hinsichtlich ihrer Länge und der repetitiven Einheiten zwischen den 32 Chromosomen der Hefe sehr variabel. Sie besteht aus zwei Elementen: dem 0.3-3.8 kbp umfassenden „X-Element“, welches die Funktion besitzt, das „gene silencing“ zu verstärken, und dem „Y-Element“, das eine Länge von 5.2-6.7 kbp haben

kann, jedoch nur bei 50-70% aller Telomere zu finden ist. Außerdem ist das „Y-Element“ oft mit STAR gekoppelt, einer sog. „Anti-Silencing-Region“. Um die Untersuchungen hinsichtlich des TPE zu erleichtern, modifizierten GOTTSCHLING et al. erstmals die Chromosomenenden der *S. cerevisiae*. Mit Hilfe von Plasmiden integrierten sie das URA3 Gen sowie die 81 bp lange Sequenz TG₁₋₃ derart in den subtelomeren ADH4 Locus des linken Armes von Chromosom VII, dass die subtelomeren Sequenzen verloren gingen. Das ADH4 Gen ist das am weitesten distal gelegene Gen auf Chromosom VII. Dadurch entstand ein neues, nur noch 1.1 kbp langes Telomerende, bestehend aus einem Teil des ADH4 Gens, URA3 und 81 bp TG₁₋₃.

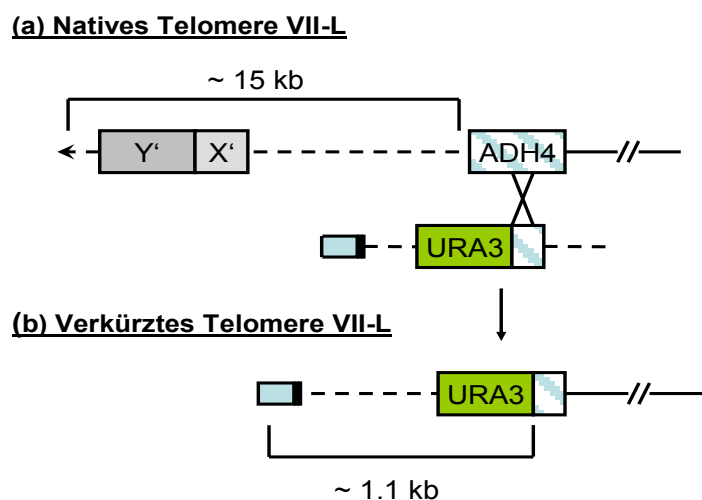


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Struktur (a) natürlicher und (b) verkürzter Telomere von *S. cerevisiae*.

Das URA3 Gen wurde so in das linke Ende des Chromosom VII integriert, dass ein Teil des ca. 15 kbp vom Telomerende entfernten ADH4 Gens sowie die subtelomeren Elemente X' und Y' verloren gingen. Dadurch entsteht ein vereinfachtes, verkürztes Telomerende von nur 1.1 kbp. Nach [45]

Es ist bekannt, dass Zellen die das Gen URA3 exprimieren, nicht in der Lage sind in Gegenwart des Zytostatikums 5-Fluoroorot-säure (5-FOA) zu wachsen. GOTTSCHLING et al. konnten jedoch zeigen, dass 20-60 % der Zellen, die das telomere URA3 Gen integriert hatten, trotzdem unter 5-FOA wachsen konnten. Dass diese FOA-Resistenz nicht durch eine Mutation des URA3 Gens zu begründen war, zeigte die Reversibilität der Transkriptionsunterdrückung bei nicht-telomeren URA3 Genen.

Diese Ergebnisse gaben die ersten Erklärungen für einen TPE bei *S. cerevisiae*. Dabei ist der TPE nicht nur auf das URA3 Gen beschränkt, sondern konnte auch bereits bei anderen Genen wie dem TRP1, ADE2 oder HIS3 nachgewiesen werden [45-47].

RENAULD et al. (1993) beschrieben, dass diese Stilllegung von Genen von der Länge der Telomere und vom Abstand der Gene zu den Telomeren abhängig sei. Sie gingen davon aus, dass sich die Unterdrückung der Genexpression indirekt proportional zur Entfernung des jeweiligen Gens zum Telomer verhält [48].

Zu erwähnen ist jedoch, dass all diese Experimente bisher nur an modifizierten Telomeren durchgeführt wurden. Es gilt daher zu beachten, dass die Telomere *in vivo* eine sehr viel komplexere Architektur aufweisen und diese damit neben dem Abstand des Gens zum Telomer und der Telomerlänge als weiteres Kriterium für einen möglichen TPE hinzugezogen werden müsste. So zeigte sich eine sehr variable Expression des URA3 Gens nach Integration in die natürliche subtelomere DNA der *S. cerevisiae*, je nach dem an welche Stelle der Elemente X oder Y das Gen eingebracht wurde [45].

Der Einfluss von Strukturbindungsproteinen auf den TPE stellt einen weiteren wichtigen Faktor dar, den es näher zu betrachten gilt. Es ist bereits bekannt, dass in *S. cerevisiae* eine Vielzahl solcher DNA-Bindungsfaktoren koordiniert wird, um das „Gene Silencing“ aufrecht zu erhalten. Zu ihnen zählen der Sir-Komplex (Sir2p, Sir3p, Sir4p), der yKu-Komplex und Rap1p. Sowohl Rap1p als auch yKU sind in der Lage die DNA der Telomere zu binden, wodurch wiederum die Bindung weiterer Sir-Proteine erfolgt. Sir2p ist eine NAD abhängige Deacetylase die den Sir-Proteinen 3 und 4 die Bindung an Rap1p ermöglicht [48-49]. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass längere Telomere auch mehr Rap1p zu binden vermögen und damit mehr Sir-Komplexe rekrutiert werden können. Diese komplexe Organisation der Proteine bedingt die stabile Heterochromatin-Formation der Telomere. Es besteht jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen der Menge der Bindungsproteine und der Ausprägung des TPE [39].

Die bis hierhin genannten Hinweise auf einen TPE beziehen sich nur auf niedere Lebewesen wie *Drosophila melanogaster* oder *Saccharomyces cerevisiae*.

Inhalt dieser Arbeit ist die Untersuchung ob solch ein TPE auch beim Menschen existieren kann und falls ja, ob er dann auch die Induktion der Seneszenz beeinflusst. Wie in Kapitel 1.1 beschrieben verkürzen sich die Telomere mit jedem Zellzyklus und verlieren damit ihre Stabilität. Man könnte daher davon ausgehen, dass es dadurch zu einem Verlust des TPE und zur Expression von zellzyklusregulierenden Genen kommt, die schließlich die Seneszenz einleiten.

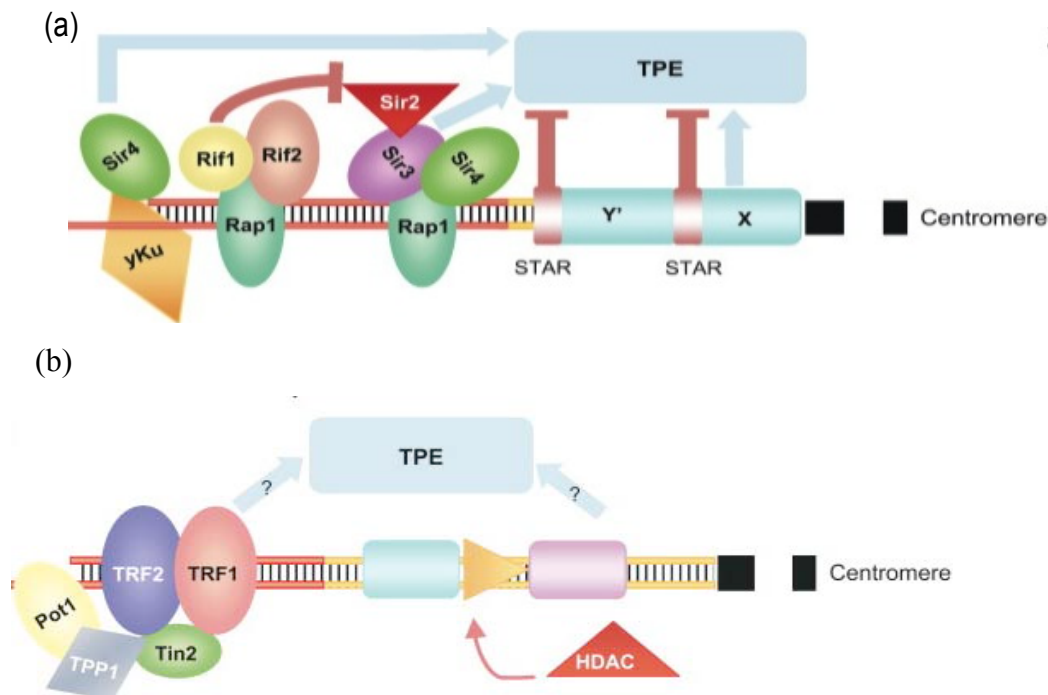


Abbildung 6: Telomerbindungsproteine und deren Einfluss auf einen möglichen TPE bei intakten Telomeren.

(a) Bei *Saccharomyces cerevisiae* besteht ein Zusammenspiel zwischen den telomeren und subtelomeren Bindungsproteinen, welche einen Telomer Positions Effekt (TPE) hervorrufen können. (b) Möglicherweise hat der Shelterin-Komplex des Menschen einen ähnlichen Effekt. Nach [39]

Erste Studien zum TPE beim Menschen orientierten sich sehr an denen der Hefe, konnten diesen bei humanen Fibroblasten unter *in vitro* Bedingungen aber nicht bestätigen [50-51]. Erst mehr als 10 Jahre nach der Entdeckung des TPE bei der Hefe konnten Hinweise auf einen TPE beim Menschen beschrieben werden. Diese Experimente zeigten ebenfalls große Ähnlichkeiten zu denen des TPE bei *S. cerevisiae*, konnten diesmal aber durch die *in vitro* Integration von Genen in telomernahe Regionen Hinweise auf eine Unterdrückung der Genexpression durch den Einfluss der Telomere beim Menschen liefern [52-53]. BAUR et. al (2001) zeigten, dass HeLa Zellen, die einen Luciferase Reporter in der Nähe eines unter *in vitro* Bedingungen neu geformten Telomeres integriert hatten, eine zehnfach geringere Luciferase-Expression aufwiesen

als die Kontrollzellen. Ähnlich der Beschreibung eines TPE bei *S. cerevisiae* konnte diese Studie ebenfalls einen Anstieg des TPE mit steigender Telomerlänge beschreiben. Durch Immortalisierung der Zellen mit der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) kam es somit zu einer Abnahme der Genexpression telomernaher Gene [52-53].

Zu beachten ist, dass BAUR et al. in der Studie von einer stark vereinfachten Struktur der Telomere ausgingen. Tatsächlich weisen diese aber eine sehr komplexe Struktur sowie Architektur auf und sind durch eine Reihe telomer-spezifischer Proteine geschützt, dem sog. „Shelterin-Komplex“ (TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1, Rap1). Man geht davon aus, dass es mit der Verkürzung der Telomere zu einem Verlust dieses schützenden Protein-Komplexes, zu einer Abnahme des TPE und letztendlich zur DNA-Schadensantwort kommt. So führt z. B. der Verlust des TRF2 zur Aktivierung der ATM Kinase und damit zum p53 abhängigen G1/S-Arrest. Die Zelle leitet dann abhängig vom Grad der Schädigung die Seneszenz oder (bei stärkerem Signal) Apoptose ein [17, 54]. Andererseits könnte es mit steigender Anzahl dieser Proteine zu einer zunehmenden Ausbreitung des TPE auf telomernahe Gene kommen. Man geht von einem direkten Zusammenhang zwischen der Telomerlänge und der Anzahl der rekrutierten Bindungsproteine aus [42].

Auch Modifizierungen der Chromatinstruktur scheinen bei menschlichen Zellen einen Einfluss auf den TPE zu haben. Die DNA der Telomere weist einige Charakteristika des Heterochromatins auf. Dazu zählen: das Heterochromatin Bindungsprotein HP1, Deacetylierungen sowie dreifach Methylierungen der Histone 3 Lysin 9 (H3K9) und des Histons 4 Lysin 20 (H4k20) und die Methylierung subtelomerer CpG Dinukleotide. Zusammen mit dem Shelterin-Komplex könnte diese Chromatinstruktur die Stilllegung telomernah lokalisierter Gene hervorrufen. Einige Studien dazu beschreiben, dass es durch Modifizierungen der Chromatinstruktur, wie der Behandlung der Zellen mit dem Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A, möglich sei, den TPE zu beeinflussen. Des Weiteren bedinge Trichostatin A eine Delokalisation des Heterochromatin Bindungsproteins HP1, welches damit ebenfalls eine Rolle beim TPE spielen könnte. Durch die progressive Telomerverkürzung im Rahmen der replikativen Seneszenz geht der schützende „Capping“-Komplex verloren und kurze Telomere weisen zunehmend Charakteristika aktiven Chromatins, wie z. B. vermehrte Acetylierungen der Histone, auf.

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass sowohl die Telomerlänge als auch die spezifische Chromatinstruktur und DNA-Bindungproteine der Telomere einen TPE beeinflussen [53, 55].

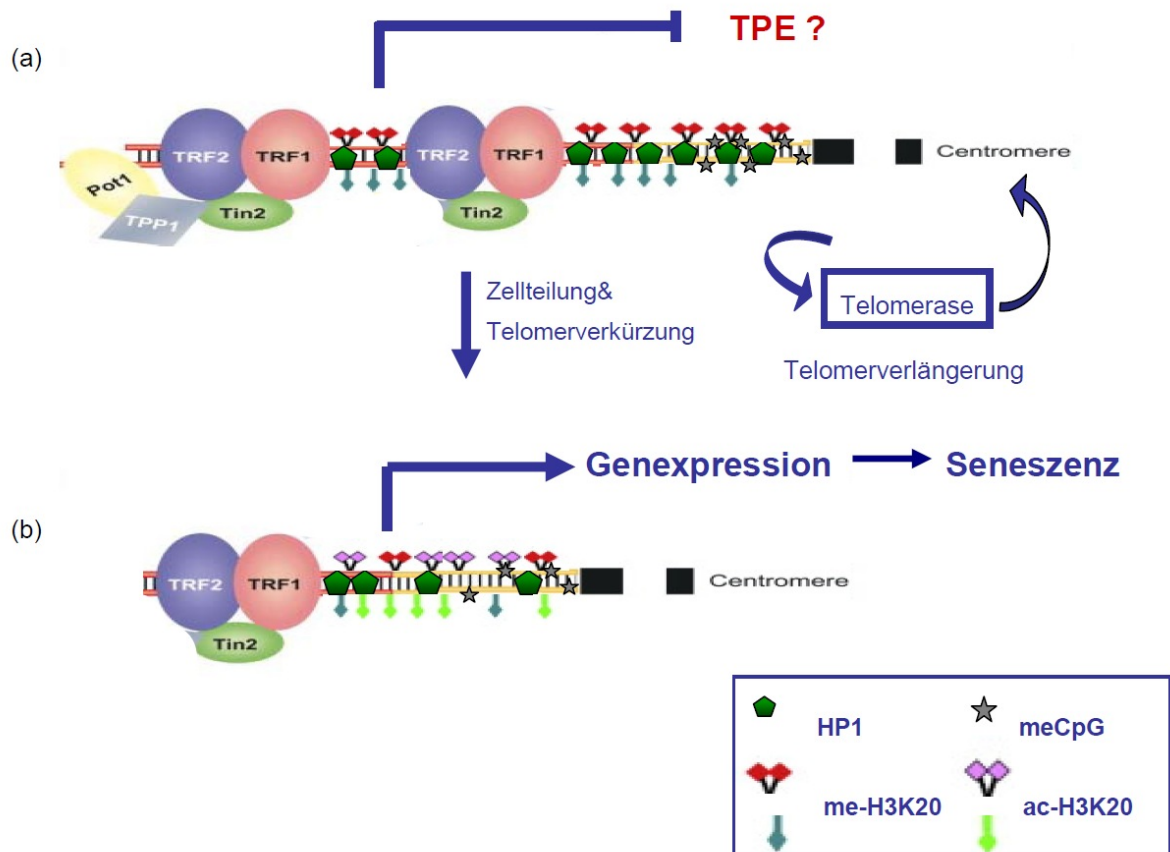


Abbildung 7: Der Mechanismus eines möglichen Telomer Positions Effektes (TPE) beim Menschen.

(a) Intakte Telomere junger Zellen werden durch Telomerbindungsproteine, den sog. Shelterin-Komplex (TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1), sowie Heterochromatin-Modifikationen (Heterochromatin Protein HP1, 3me-H3H9, 3me-H4K20, meCpG Dinukleotide) in einer komplexen Struktur organisiert, welche wahrscheinlich die Expression telomernaher Gene unterdrückt.

(b) Durch progressive Telomerverkürzung mit zunehmendem Alter der Zellen geht der stabilisierende Shelterin-Komplex verloren. Die Heterochromatin-Modifikationen werden durch Marker aktiven Chromatins ersetzt (ac-H3K9, ac-H4K20). Die Veränderungen der Chromatinstruktur könnten zu einer Aktivierung der Genexpression und zur Einleitung der Seneszenz führen. Eine Aktivierung der Telomerase mit folgender Verhinderung der Telomerverkürzung würde den TPE möglicherweise aufrechterhalten [39, 42]. me=Methylierung, ac=Acetylierung

Es soll die Frage beantwortet werden, ob der TPE beim Menschen einen Mechanismus darstellt, der durch die Beeinflussung der Genexpression in Abhängigkeit von der Telomerlänge in der Lage ist, Zellen in die Seneszenz zu führen. Dazu bedarf es weiterer Experimente unter *in vivo* Bedingungen. Sowohl in der Hefe als auch beim Menschen konnte jedoch unter *in vitro* Bedingungen bereits gezeigt werden, dass lange Telomere die Genexpression effektiver unterdrücken als kürzere. Wenn der TPE also eine Rolle bei der altersabhängigen Genexpression

spielt, müsste man davon ausgehen, dass ältere Zellen mit kurzen Telomeren höhere Expressionsraten telomernaher Gene aufweisen als junge Zellen mit längeren Telomeren. Dies galt es in dieser Arbeit näher zu untersuchen.

1.6 Das „Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom“

Beim Hutchinson-Gilford-Progerie Syndrom (HGPS) handelt es sich um ein sehr seltenes genetisch bedingtes Syndrom. Auffälligstes Kriterium ist die frühzeitige Alterung. Weitere Merkmale sind Kleinwuchs, geringes Körpergewicht, Alopezie, Mikrognathie, Osteolysen, Gelenkkontrakturen, frühzeitige Arteriosklerose, eine Reihe von Herzerkrankungen und das Fehlen von subkutanem Fett sowie sklerodermieartige Haut. In ihrer Kognition sind diese Patienten meist uneingeschränkt [24, 56-57]. Die mittlere Lebenserwartung beträgt Studien zufolge nur 13 Jahre, wobei die häufigsten Todesursachen Herzinfarkt und Schlaganfall sind. Das HGPS kann in der beschriebenen klassischen Form oder auch in einer nicht-klassischen milderer Form auftreten [56]. Als Ursache des HGPS gilt abnormes Lamin A. Wobei der Defekt durch eine Mutation im Lamin A Gen direkt oder durch eine Störung auf posttranskriptioneller Ebene (Mutation im ZMPSTE24 Gen) ausgelöst sein kann [56]. Viele verschiedene Mutationen wurden bisher beschrieben. Als häufigste wurde dabei die p.G608G LMNA Mutation identifiziert [58-59]. Dadurch entsteht eine veränderte Splice Stelle am Exon 11 [60]. Defektes Lamin A kann nicht abgebaut werden und akkumuliert in der Zelle als farnyliertes Lamin A, das sog. Progerin [61]. Man nimmt an, dass dieses Progerin Abnormalitäten des Zellkerns, mitotische Defekte sowie eine beschleunigte Telomerverkürzung auslöst, wodurch die Zelle frühzeitig die replikative Seneszenz einleitet [62]. HGP-Hautfibroblasten zeigen wenig zelluläre Unterschiede zu gesunden Zellen, jedoch besitzen sie kürzere Telomere und haben dadurch eine verkürzte Lebensspanne. Studien haben belegt, dass es durch Immortalisierung von HGP-Fibroblasten möglich ist, deren Lebensspanne zu verlängern [24].

1.7 Ableitung der Fragestellung

Bei den meisten Zellen geht im Laufe ihres Differenzierungsprozesses die Expression des Enzyms Telomerase und damit die Fähigkeit zur Verlängerung und Aufrechterhaltung der Telomerstruktur weitgehend verloren. Als Folge kommt es mit jeder Zellteilung zu einer Telomerverkürzung und letztendlich zum Eintritt der Zelle in die replikative Seneszenz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fibroblasten von Patienten mit Hutchinson-Gilford-Progerie (HGP) als Modell für die beschleunigte replikative Seneszenz untersucht.

An gesunden Fibroblasten war bereits gezeigt worden, dass durch Immortalisierung mittels humaner Telomerase (hTERT) die progressive Telomerverkürzung inhibiert und somit vermutlich die Lebensspanne *in vitro* verlängert werden kann.

Diese Methodik wurde in dieser Arbeit an kultivierten HGP-Zellen angewandt. Die erfolgreiche Immortalisierung sollte durch den Vergleich der Wachstumskurven mit den primären (nicht immortalisierten) Zellen und durch Telomerlängenmessung verifiziert werden.

Neben der Telomerverkürzung gibt es jedoch auch telomer-unabhängige Faktoren, welche die Lebensspanne von Zellen, durch sog. Stress induziertes Altern, beeinflussen können. Obwohl der Mechanismus der Schädigung ein anderer ist, aktivieren sowohl telomer-abhängige als auch telomer-unabhängige Signale ähnliche Signalwege wie p53 und können die Zelle in die Seneszenz (oder bei stärkerem Stimulus in die Apoptose) führen.

In dieser Arbeit sollte die Hypothese untersucht werden, dass ein bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bereits bekannter „Telomer-Positions-Effekt“ auch beim Menschen existiert und einen weiteren möglichen Mechanismus darstellt, durch den die replikative Seneszenz getriggert werden kann.

Als Grundlage sollten dienen:

1. Fibroblasten von HGP-Patienten als Modell für replikative Seneszenz.
2. Fibroblasten gleichaltriger, gesunder Kinder, welche mit UV-B-Licht bestrahlt wurden als Beispiel für Stress induzierte Seneszenz.
3. Fibroblasten von HGP-Patienten, welche mittels hTERT immortalisiert wurden, um die Effekte der replikativen Seneszenz zu revertieren.

Es sollte gezielt nach Hinweisen gesucht werden, die auf die Existenz eines TPE beim Menschen hinweisen.

Hierzu sollten die Genexpressionsprofile der drei Alterungsmodelle mit Hilfe von Affymetrix cDNA Chips verglichen werden, um mögliche Kandidatengene für einen TPE zu finden.

Folgende Kriterien eines TPE-Gens sollten dabei erfüllt werden:

1. Die Genexpression sollte spezifisch in HGP-Fibroblasten, aber nicht in gleicher Weise in UV-B-Licht bestrahlten Kontrollzellen, zu finden sein.
2. Durch hTERT-Immortalisierung sollte eine in HGP-Fibroblasten gezeigte Expressionsveränderung ganz oder partiell reversibel sein.
3. Die Genlokalisierung relativ zum Telomerende sollte <100.000 bp betragen.

Die Bestätigung der cDNA-Genchip-Ergebnisse sollte mittels Real-Time PCR erfolgen.

Um die Arbeitshypothese näher zu untersuchen, sollten alle verwendeten Zelltypen zusätzlich zu unterschiedlichen Zellverdopplungszahlen (PD = Population Doubling) hinsichtlich der Genexpression der gefundenen Kandidatengene miteinander verglichen werden. Mit höheren PD-Zahlen wurde eine Zunahme des postulierten Effektes, d. h. des Einflusses der Telomerlänge auf die Genexpression, angenommen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Reagenzien

Materialien/Reagenzien	Firma
Agarose ultraPURE	Invitrogen # 15510-027
dNTP-Mix (10 mM)	Fermentas #R0191
Ethanol	Merck #1.11727.1000
Ethidiumbromid (10 mg / ml)	Roth #2218.1
Fötales Kälberserum	Biochrom # SO115
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA #D2650
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) (high Glucose, L-Glutamin)	PAA #E15-810
Dulbecco`s PBS with Ca ²⁺ + Mg ²⁺	PAA #H15-002
Dulbecco`s PBS without Ca ²⁺ + Mg ²⁺	PAA #H15-001
EDTA (Versen) 1%	Biochrom #L2113
Loading Dye Solution	Fermentas #R0611
2- Mercaptoethanol, puriss. p. a.	Fluka AG
MMLV Superscript III (200 U / µl)	Invitrogen #18080-044
Modified TAE Buffer Concentrate (50 x)	Millipore
Oligo dT-Primer (100 µM)	Fermentas #S0132
Penicillin / Streptomycin (100 x)	PAA #P11-010
RNase-Free DNase Set	Qiagen #79254
RNaseH (1,5 U / µl)	Promega #M4281
Ribolock RNase-Inhibitor (40 U / µl)	Fermentas #EO 0328
RNeasy Mini Kit (Spin-Protokoll für Animal Cells)	Qiagen #74107
TaqMan Genexpression Assays ZNF 268 (Hs00612325_s1) PRMT2 (Hs00181759_m1)	AppliedBiosystems #4331182 (250 rxn, FAM, 20x) #4331182 (250 rxn, FAM, 20x)

APOD (Hs00155794_m1)	#4331182 (250 rxn, FAM, 20x)
MZF 1 (Hs00854900_m1)	#4331182 (360 rxn, FAM, 20x)
TRIM 28 (Hs00232212_m1)	#4448892 (75 rxn, FAM, 20x)
ZNF 828 (Hs00403196_m1)	#4448892 (75 rxn, FAM, 20x)
UPF3A (Hs01589834_m1)	#4448892 (75 rxn, FAM, 20x)
TaqMan Pre-Developed Assay Reagent, human PPIA, 20x	Applied Biosystems #4333763F
Taqman Universal Mastermix II, no UNG	Applied Biosystems #44400040
TrypLE™ Express	Invitrogen / Gibco #12605-010

2.2 Geräte

Gerät	Firma
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
CFX 384 Real-Time PCR Detection System	Bio-RAD
Fireboy plus	INTEGRA Biosciences
Freezing Container "Mr. Frosty"	Nalgene #5100-0001,
MS1 Minishaker	IKA
Microflow Biological Safety Cabinet	Nunc GmbH
Mikroskop "IDO3"	Zeiss
NanoDrop	PEQLAB
PCR Plates (96- und 386-Well)	Applied Biosystems
Pipetboy	INTEGRA Biosciences
Pipetten serol. (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Falcon
Pipettenspitzen "Safe Seal Prof. Filtertips"	Biozym
Pipettenspitzen "TipOne"	STARLAB
QIAshredder	Qiagen #79654
Stickstofftank "MVExc 34/18"	MVE
Wasserbad	Memmert
Zellschaber	Biochrom/TTP #99002
Zentrifuge "Sepatech Varifuge 3.0"	Hereaus
Zentrifuge "Biofuge fresco"	Hereaus
Zentrifuge "Micro Centrifuge"	Carl Roth GmbH & Co. KG

2.3 Methoden

2.3.1 Microarray Analyse

16 Microarrays mit einer Gesamtzahl von ca. 54.600 Probe Sets (HGU133-A2.0 Array, Affymetrix®) wurden mit Hilfe der GCOS Software von der ehemaligen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Walter (Zentrum für Laboratoriumsmedizin der Universität Münster) analysiert. Die Auswertung der GenChips erfolgte durch Dr. Rheinhard Voss (Integrated Functional Genomics Universität Münster).

Affymetrix cDNA Chips funktionieren nach dem Prinzip der Hybridisierung. Dabei werden definierte Oligonukleotide (25-mer) als Spots auf eine Glasmatrix synthetisiert. Die aus den Zellen gewonnene RNA wird zunächst in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss daran erfolgt eine *in vitro* Transkription, bei der die erzeugte cRNA biotinyliert wird. Nach Zugabe der biotinylierten cRNAs binden diese an ihre komplementären Basen auf dem Affymetrix Chip. Nach dem Abwaschen der nicht gebundenen Nukleinsäuren erfolgt die Detektion mit Streptavidin-PE (PE= Phycoerythrin, rot) [63-64].

Für diese Arbeit wurden von folgenden Gruppen Microarrays angefertigt und mit dem Genexpressionsprofil der Kontrollfibroblasten verglichen:

1. HGP Fibroblasten, als ein Modell für replikative Seneszenz.
2. TERT-immortalisierte HGP Fibroblasten, als ein Modell für die Reversibilität der Telomerverkürzung.
3. UV-B-Licht behandelte Kontrollfibroblasten, als Modell für telomer-unabhängige Seneszenz.

Für jede Gruppe wurden drei Zelllinien in Doppelbestimmung gemessen (s. Tabelle 1). Von den rund 54.600 Probe Sets wurden die als „present“ gewertet, bei denen in 80% der Fälle das Signal über das Hintergrundrauschen hinausging. Mit diesem Subset aus 19.984 Probe Sets

wurden die einzelnen Gruppenvergleiche durchgeführt. Die Signifikanz der veränderten Genexpression wurde mittels t-Test berechnet (Cutoff $p \leq 0,05$). Die Ergebnisse wurden in Form von Excel Tabellen von Dr. Reinhard Voss zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese u. a. hinsichtlich potentieller TPE-Gene ausgewertet.

Gruppe	Zelllinie	PD auf Genchips	PD bei Immortalisierung
Kontrolle	707	19,8	
	778	17,8	
	731	19,8	
Kontrolle-TERT	707TERT	35	25,1
	778TERT	26,8	16,8
	731TERT	28	17,8
Kontrolle-UV	707 UV	19,8	
	731 UV	18,2	
	778 UV	17,8	
HGP	FN178	15,5	
	FN167	15,2	
	FN003	18,2	
HGP-TERT	FN178TERT	23,3	12,3
	FN167TERT	25	14,1
	FN003TERT	30	18,1

Tabelle 1: Auf den Genchips untersuchte Zelllinien.

Die Population Doubling (PD) beschreibt wie oft sich die Zellen seit der Isolierung in vitro bereits verdoppelt haben.

2.3.2 UV-Bestrahlung der Zellen

Die bereits in Vorarbeiten durchgeführte UV-B-Licht Bestrahlung humaner Hautfibroblasten zur Einleitung der Stress induzierten Seneszenz erfolgte nach Kultivierung der Zellen in DMEM bei 80 % Konfluenz mit vier Philips 20 W TL/12 Gasentladungsröhren. Dazu wurde das Medium bis auf einen dünnen Film abgetragen und die Fibroblasten an drei aufeinanderfolgenden Tagen je morgens und abends bestrahlt. Die Gesamtdosis der Bestrahlung betrug 528 J/m^2 . 24 Stunden nach der letzten Bestrahlung konnten die seneszenten Zellen mit Hilfe der SA- β -Galactosidasefärbung lichtmikroskopisch identifiziert werden, wobei ein Anteil an seneszenten Zellen von ca. 40-50 % als signifikant galt [16].

2.3.3 Die Immortalisierung der Zellen

Die Immortalisierung der verwendeten Zellen erfolgte durch Janine Reunert (Arbeitsgruppe Walter) in Münster. Der Vorgang der hTERT-Immortalisierung lässt sich in Kürze folgendermaßen beschreiben: Fibroblasten wurden mit retroviralen Überständen einer Verpackungszelllinie (PA317-TERT) infiziert, welche die humane, in einen pBabePuro Vektor klonierte Telomerase stabil exprimieren [65]. Nach zweiwöchiger Selektionsphase mit Puromycin erfolgte die Überprüfung von Infektion und Selektion durch die Messung der Telomerase-Aktivität mittels TRAP-Assay und die Bestimmung der hTERT-Expression mittels Real-Time PCR [26].

2.3.4 Die Zellkultur

Gearbeitet wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und bei einem CO_2 -Gehalt von 5%. Die Kultivierung der Fibroblasten erfolgte in DMEM (high Glucose, L-Glutamin).

Das Medium wurde folgendermaßen supplementiert:

DMEM	500ml
Streptomycin	100 µg/ml
Penicillin	100 Units/ml
fötale Kälberserum	10%

Auftauen der Fibroblasten

Die zur dauerhaften Aufbewahrung in Flüssigstickstoff eingefrorenen Fibroblasten wurden in den Kryoröhrchen zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, bis keine Eiskristalle mehr sichtbar waren.

Anschließend wurde die Zellsuspension (1 ml) sofort in 9 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt. Das Auftauen und der Transfer der Zellen sollten dabei so schnell wie möglich erfolgen, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO zelltoxisch ist. Danach wurde die Zellsuspension bei 1200 x g und Raumtemperatur 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen durch auf- und absaugen mit einer Pipette in 7 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 25 cm² (T25) Zellkulturflasche gegeben und in den Brutschrank überführt. Am nächsten Tag ist überprüft worden, ob sich viele nicht angewachsene, tote Zellen im Medium befinden und gegebenenfalls ist ein Medienwechsel erfolgt. Nach ca. sieben Tagen oder spätestens wenn das Medium in eine orange Farbe umschlug, erfolgte ein Medienwechsel.

Subkultivierung der Fibroblasten

Sobald die Fibroblasten 100% Konfluenz erreicht hatten, wurden Subkulturen nach folgendem Schema angelegt:

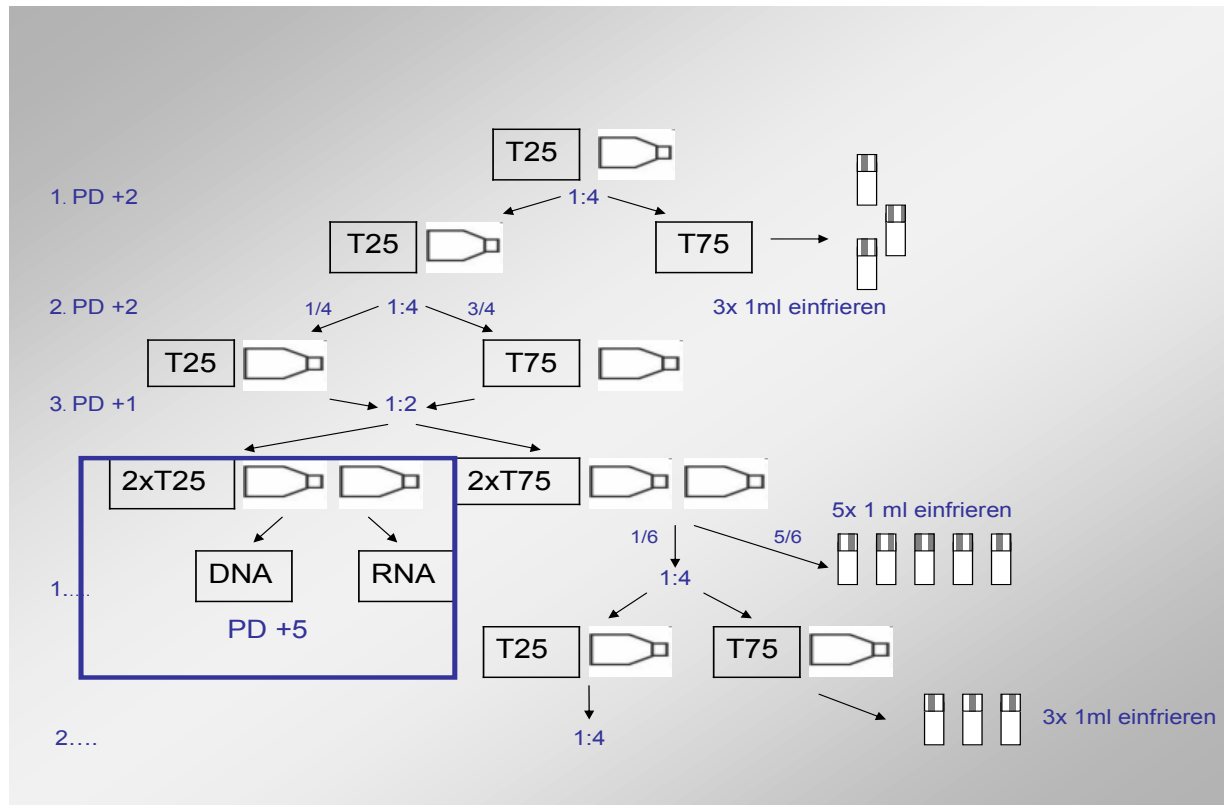


Abbildung 8: Arbeitsschema der Zellkultur. T25 (25 cm²) T75 (75 cm²)

Nach dem Ausplattieren eines 1 ml Aliquots in einer T25-Flasche und dem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 gesplittet. Dies entspricht bei Erreichen der Konfluenz einem Anstieg der Population Doubling (PD) um zwei. Die Zellen der 75 cm² (T75) Flasche wurden für weitere Experimente in 3 x 1 ml Aliquots tiefgefroren (je 1 ml für eine T25 Zellkulturflasche). Die Zellen der T25 Flasche wurden nach Erreichen der Konfluenz erneut im Verhältnis 1:4 gesplittet (PD +2). Bei Konfluenz erfolgte ein weiteres Splitten der Zellen im Verhältnis 1:2. Der Anstieg der PD betrug hierbei +1. Nach diesen drei Schritten ergab sich jeweils ein Anstieg der PD um fünf. Nach jeder fünften PD wurde RNA (1 x T25) für Genexpressionsanalysen sowie DNA (1 x T25) für geplante Telomerlängenmessungen isoliert. Außerdem wurden von den 2 x T75 Flaschen 5 x 1 ml Aliquots eingefroren (entspricht 5/6 der Zellen) sowie die verbleibenden 1/6 der Zellen 1:4 gesplittet (1x T25; 1x T75).

Dieses Schema der Kultivierung wurde bis zu einem Anstieg der PD um 30 bzw. bis zum Erreichen der Seneszenz wiederholt.

Zur Subkultivierung wurden die Fibroblasten nach Absaugen des Mediums mit PBS/EDTA (0,05%) gewaschen und danach mit 0,35 ml/25 m² bzw. 0,5 ml/75 m² TrypLE Express/EDTA versetzt. Nachdem die Zellen durch mehrmaliges Schwenken der Zellkulturflasche vollständig benetzt waren, wurde die Trypsin-Lösung wieder abgesaugt und die Zellen für ca. 10 min im Brutschrank inkubiert, bis sie sich durch leichtes Klopfen vom Gefäßboden ablösen ließen. Es folgte die Aufnahme der abgelösten Zellen in frisches Medium und das Zentrifugieren (s.o.). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in Medium resuspendiert und in die entsprechende Kulturflasche überführt.

Einfrieren von Fibroblasten

Zur dauerhaften Aufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196°C) wurden die Zellen ebenfalls mit PBS/EDTA (0,05%) gewaschen, für ca. 10 min in TrypLE Express/EDTA kultiviert und danach in Medium resuspendiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt, in einer Einfrierlösung, bestehend aus dem Medium mit 10% DMSO aufgenommen und in 1 ml Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt. Es folgte eine langsame Abkühlung auf -80°C mit Hilfe der Einfrierbox und nach 24 Stunden die Überführung in den Stickstofftank.

2.3.5 Die Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden Fibroblastenzelllinien (Tabelle 2 A-C) von gesunden Spendern und von Patienten mit dem Hutchinson-Gilford-Progerie Syndrom sowie die jeweiligen TERT-immortalisierten Zelllinien verwendet.

Um die Ergebnisse der Genchip-Analysen mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Real-Time PCR vergleichen zu können, sollten, soweit dies möglich war, die entsprechenden Zelllinien der Genchips verwendet werden. Da FN 167 und FN167-TERT jedoch nicht mehr zur Verfügung standen, wurden diese durch FN 127 und FN127-TERT ersetzt.

A: Kontrolle Kinder

Nr.	Geschlecht	Alter bei Biopsie	Grund der Biopsie/Erkrankung
707	w	5 Monate, 8 Tage	Plötzlicher Kindstod; Stoffwechseldefekt ausgeschlossen
731	m	5 Monate, 6 Tage	Stoffwechseldefekt ausgeschlossen
778	m	8 Monate, 9 Tage	Ursprünglich V.a. Natriumdiarrhö; Stoffwechseldefekt ausgeschlossen

B: Kontrolle Erwachsene

Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Erkrankung
168	m	1961	Stoffwechseldefekt ausgeschlossen

C: Hutchinson-Gilford-Progerie Fibroblasten (HGP)

Nr.	Geschlecht	Alter bei Biopsie	Erkrankung
FN 127	w	3 Jahre, 9 Monate	Lamin A, Exon 11 Mutation C → T
FN 003	m	2 Jahre, 0 Monate	Lamin A, Exon 11 Mutation C → T
FN 178	w	6 Jahre, 11 Monate	Lamin A, Exon 11 Mutation C → T

Tabelle 2: Für die Real-Time PCR verwendete Zelllinien.

- (A) Hautfibroblasten gesunder Kinder (B) Hautfibroblasten eines gesunden Erwachsenen
(C) Hautfibroblasten von Kindern mit Hutchinson-Gilford-Progerie Syndrom (HGPS)

2.3.6 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mittels RNeasy Mini Kit. Mit diesem Verfahren können bis zu 100µg RNA (>200 bp) unter Verwendung von Puffern mit hohem Salzgehalt und Ethanol reversibel an die Silicagel-Membran der Zentrifugationssäulen gebunden und nach dem Entfernen aller übrigen Zellbestandteile wieder eluiert werden.

Die RNA-Isolation aus Fibroblastenkulturen wurde nach dem leicht modifizierten Herstellerprotokoll für tierische Zellen durchgeführt. Hierfür musste das Medium aus der T25 Zellkulturflasche vollständig abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen werden. Durch Zugabe von 600 µl Lysepuffer, welcher zuvor mit β -Mercapthoethanol versetzt wurde (10 µl/ml RLT-Puffer), konnten die Zellen lysiert werden. Den Puffer pipettiert man dazu mehrfach über die Zellen, bis die Viskosität durch die freigesetzte genomische DNA abnimmt. Danach erfolgt das Abschaben des Zelllysats mit einem Zellschaber und die Überführung in ein 1,5 ml- Reaktionsgefäß, um es bis zur späteren Fortsetzung der RNA-Isolierung bei -80°C tiefzufrieren.

Um die RNA-Isolierung zu einem späteren Zeitpunkt fortführen zu können, mussten die gefrorenen Lysate zunächst bei 37°C im Wasserbad aufgetaut werden. Die Homogenisierung des Zelllysats erfolgte durch die Zerkleinerung der genomischen DNA und anderer Makromoleküle mit Hilfe des QiaShredders. Anschließend wurde das Filtrat im Verhältnis 1:1 mit 600 µl 70%igem Ethanol gemischt, wodurch die Bedingungen für eine selektive Bindung der RNA an die Silicamembran entstanden. Die nächsten Schritte bestanden im Auftragen des Gemisches in 600 µl Schritten auf die RNeasy Mini-Säule, dem Zentrifugieren für 15 sec bei 11.000 rpm (Heraeus Biofuge freco, 24-Platz Rotor) und dem Verwerfen des Durchflusses.

In einem ersten Waschschrift erfolgte die Zugabe von 350 µl RW 1-Puffer auf die Säule sowie die nachfolgende Zentrifugation (s.o.). Dann wurden 10 µl RNase freie DNase stock solution mit 70 µl RDD Puffer gemischt, direkt auf die Membran der Säule gegeben und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Durch den DNase-Verdau soll verhindert werden, dass mögliche DNA Kontaminationen in der PCR mit amplifiziert werden. Daran schloss sich zunächst ein Waschschrift mit weiteren 350 µl RW 1-Puffer sowie zwei weitere Wasch- und

Zentrifugationsschritte mit je 500 µl RPE-Puffer an. Die letzte Zentrifugation erfolgte 2 min bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 rpm), um die Silicatmembran vollständig zu trocknen, da Ethanolreste des Waschpuffers die anschließende Elution der RNA in Wasser verschlechtern würden.

Zur Elution der RNA von der Säule wurden 40 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran gegeben und nach ca. 1 min Einwirkzeit für 1 min zentrifugiert (11000 rpm). Nach Abnahme eines 10 µl-Aliquots für Konzentrationsbestimmungen und Kontrolle der RNA-Integrität wurde die isolierte RNA bei -80°C eingefroren.

Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte unter Verwendung von 1,5 µl unverdünnter RNA-Lösung mit dem NanoDrop photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Durch die Bestimmung der Quotienten 260 nm / 280 nm sowie 260 nm / 230 nm wurde die Reinheit der RNA ermittelt.

Kontrolle der RNA-Integrität

Zur Qualitätskontrolle der RNA-Extraktion diente die Gelelektrophorese. Dazu wurden 0,75 g Agarose (ultra pur) mit 50 ml 1 x TAE Puffer versetzt und bis zur vollständigen Lösung der Agarose langsam in der Mikrowelle erhitzt. Danach musste die Agarose-Lösung zunächst auf ca. 60°C abkühlen. Nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (Stock-Konzentration 10 µg/ml) konnte das Gel in die vorbereitete Elektrophoresekammer gegeben und, um die einzelnen Proben später einfüllen zu können, der Kamm eingesetzt werden. Luftblasen wurden ggf. mit einer Pipettenspitze entfernt. Sobald das Agarose-Gel fest geworden war, konnten Kamm und Spacer entfernt und die Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer (1xTAE) gefüllt werden, bis das Gel ca. 2 mm mit Puffer bedeckt war. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel mussten diese entsprechend vorbereitet werden. Dazu wurden 1µg RNA mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt, weitere 2µl des 6 x Ladepuffers (Loading Dye Solution) hinzugegeben und das Gemisch vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Dann liefen die Proben bei 50 V ein, bis der blaue Farbstoff des Ladepuffers in das Gel gelangt war. Danach wurde die Spannung auf 65 V

erhöht. Nach ca. 30 min Laufzeit wurde das Gel anschließend unter UV-Licht fotografiert. Dabei war darauf zu achten, dass die 18 S und die 28 S rRNA Banden gut und scharf zu sehen sind, wobei die 28 S etwa doppelt so stark sein sollte. Ein Schmier zwischen den Banden und vor allem unterhalb der 18 S-Bande würde auf eine RNA-Degradation hinweisen.

2.3.7 Relative Quantifizierung der mRNA mittels Real-Time RT-PCR

cDNA Synthese

Um die mRNA-Expression eines Gens mittels Real-Time PCR quantifizieren zu können, muss die isolierte RNA zuvor in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mittels einer rekombinant hergestellten und modifizierten Reversen Transkriptase, der sogenannten Superscript III. Dazu wurden zuerst 0,5-1 µg RNA der gereinigten RNA mit je 1 µl Oligo dT-Primern und 1 µl dNTP Mix sowie der entsprechenden Menge an RNase freiem Wasser (ad 13 µl) versetzt. Man denaturiert die Lösung bei 65°C für 5 min und kühlt sie anschließend sofort 1 min auf Eis ab. Danach folgt die Zugabe von 4 µl RT-Puffer (5x) sowie je 1 µl RNase-Inhibitor, DTT (0,1M) und Reverse Transkriptase. Die reverse Transkription erfolgte für 50 min bei 50°C. Durch das Erhitzen auf 70°C für weitere 15 min wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert. Nach 5 min Abkühlung auf Eis erfolgte der Verdau der RNA mittels RNaseH für 20 min bei 37°C gefolgt von einer 10-minütigen Enzymdeaktivierung bei 65°C. Die so gewonnene cDNA wurde durch Zugabe von RNase freiem Wasser auf eine Endkonzentration von 10 ng/µl (RNA konvertiert in cDNA) eingestellt und bis zur Weiterverwendung in der Real-Time-PCR bei -20°C gelagert.

Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ermöglicht es, die entstehenden PCR-Produkte bereits während der PCR Amplifikation quantitativ zu erfassen. Dadurch ist es möglich, die Menge der verwendeten cDNA und damit die Menge der Gentranskripte abschätzen zu können. Die Quantifizierung wurde in dieser Arbeit unter Verwendung von TaqMan Gene Expression Assays (Invitrogen/Applied Biosystems) durchgeführt, welche jeweils ein genspezifisches Primer/Sonden-Set enthalten. Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid mit einem fluoreszierenden Reporter am 5'-Ende sowie einem Quencher am 3'-Ende, der die Emission des Reporters absorbiert. Während der Amplifikation wird der Reporter durch die

5'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase vom Quencher getrennt und es entsteht ein fluoreszierendes Signal [66].

Durchgeführt wurde die Real-Time PCR für die potentiellen TPE-Gene (ZNF268, MZF1, PRMT2, APOD) sowie die endogene Kontrolle Cyclophilin A auf einem 7500 Fast Real-Time PCR System (Fa. Applied Biosystems). Dazu wurden für die potentiellen TPE-Gene 10 ng und für die Kontrolle Cyclophilin A 20 ng RNA (konvertiert in cDNA) in 10 µl Ansätzen in Dreifachbestimmung verwendet (*). Der TaqMan PCR Universal Master Mix (2x) ohne UNG (AmpErase Uracil N-Glycosylase) enthielt die AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, eine Passive Referenz I (zur Signalnormierung aller PCR-Ansätze auf einer Platte) und Pufferkomponenten. Das TaqMan Gene Expression Assay (20x) beinhaltete die jeweiligen Primer sowie die Sonde.

Ein 10 µl PCR-Ansatz bestand aus:

cDNA	0,5 µl, 1 µl bzw. 2 µl *
TaqMan PCR Mastermix (2x) bzw.	
TaqMan Pre-Developed Assay Reagent, human PPIA (20x)	5 µl
TaqMan Genexpression Assay (20x)	0,5 µl
dH ₂ O (DNase, RNase frei)	ad 10 µl
* Angaben siehe Text	

Der Nachweis der potentiellen TPE-Gene (TRIM 28, UPF3A, ZNF 828) erfolgte auf dem CFX 384 Real-Time Detection System (BioRad) im 384-Well-Format. Hierbei wurden für die Proben (potentielles TPE-Gens) sowie für die Kontrolle Cyclophilin A je 5 ng RNA konvertiert in cDNA pro 10 µl Ansatz eingesetzt (entsprechend 0,5 µl pro Ansatz *).

Gen Symb.	Taqman Assay Nr.	GenBank Nr.	Exon	Position	Amplifikationslänge
ZNF 268	Hs00612325_s1	NM_001165881.2	6 - 6	3621	142
		NM_001165882.2	6 - 6	3628	142
		NM_001165883.1	4 - 4	3522	142
		NM_001165884.2	3 - 3	3321	142
		NM_001165885.1	5 - 5	3618	142
		NM_001165886.1	4 - 4	3417	142
		NM_001165887.1	6 - 6	3650	142
		NM_003415.2	6 - 6	3745	142
		NM_152943.2	7 - 7	3851	142
MZF1	Hs01051952_g1	NM_003422.2	2 - 3	644	106
		NM_198055.1	2-3	962	106
PRMT2	Hs00181759_m1	NM_001535.2	2-3	242	102
		NM_206962.1	3-4	351	102
ZNF 828	Hs00403196_m1	NM_001164145.1	2-3	239	108
		NM_032436.2	2-3	278	108
TRIM28	Hs00232212_m1	NM_005762.2	3-4	877	117
UPF3A	Hs01589834_m1	NM_023011.2	8-9	1043	138
		NM_080687.1	7-8	944	138
APOD	Hs00155794_m1*	NM_001647.3	3-4	605	66

Tabelle 3: TaqMan Assays der untersuchten potentiellen TPE-Gene.

(Hs = Homosapiens, _s1= Sequenz in einem Exon, detektiert genomische DNA; _g1= Sequenz über mehrere Exons, aber auch Detektion genomischer DNA möglich; _m1 = cDNA spezifisch, keine Detektion genomischer DNA)

Es wurde eine 2-Schritt-PCR nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

1 x	10 min	95°C	Aktivierung der DNA-Polymerase
40 Zyklen:	15 sec	95°C	Denaturierung
	1 min	60°C	Primer Annealing und Extension

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode.

2.3.8 Telomerlängenmessung mittels Real-Time PCR

Die Messungen der relativen Telomerlängen wurden von Dr. Pim van der Harst vom University Medical Center Groningen mit der Monochrome Multiplex Quantitative PCR-Methode (MMQPCR) durchgeführt. Die Bestimmung der relativen Telomerlänge jeder Probe erfolgte hierbei durch die parallele Amplifikation von zwei DNA-Sequenzen. Die relative Sequenzlänge der Telomere (T) und die relative Sequenzlänge eines Referenzgens (Albumin) werden dann in Relation gesetzt (T/S-Ratio), wobei sich diese Ratio proportional zur durchschnittlichen Telomerlänge (S) verhält [67-68].

Je länger die Telomere sind, desto höher ist die Kopienzahl, die durch die Telomerprimer amplifiziert wird, da diese mehrfach an lange Telomere binden können und aufgrund der Primerspezifikaion dennoch Amplifikate definierter Länge bilden.

Zur Auswertung der Ergebnisse war außerdem eine interne Kontrolle (Standard-DNA) nötig, mit der sowohl für Albumin als auch für die Telomere Standardkurven gemessen wurden. Diese ermöglichen die Bestimmung der Ausgangskonzentration der einzelnen Proben. Da die exakte Basenpaarlänge der internen Kontrolle nicht bekannt ist, liefert das Verhältnis (T/S-Ratio) aus Telomerprodukt und Single Copy Gene (S=Referenzgen Albumin) eine relative Längenangabe der Telomere bezogen auf die interne Kontrolle. Eine T/S Ratio >1 bedeutet, dass die DNA-Probe längere Telomere aufweist als die interne Kontrolle. Bei einer T/S-Ratio bzw. <1 finden sich hingegen kürzere Telomere.

Dr. Pim van der Harst verwendete eine leicht modifizierte Variante der 2009 von Cawthon etablierten MMQPCR. Hierbei erfolgte im Gegensatz zur Singleplex Methode die Amplifikation des Referenzgens und der Telomere in einem Ansatz .

Die Monochrome Multiplex Q-PCR wurde mit dem Bio Rad CFX384 Real-Time PCR System auf einem C1000 Thermal Cycler durchgeführt. Tabelle 4 zeigt das Temperaturprofil der PCR.

Schritt 1	1x	95°C	5 min
Schritt 2	2x	94°C	15 sec
		49°C	15 sec
Schritt 3	5x	94°C	15 sec
		66°C	15 sec
Schritt 4	32x	94°C	15 sec
		60°C	10 sec
		72°C	15 sec
		85°C	10 sec
		89°C	15 sec
Schmelzkurve	1x	60°C => 95°C (in 0,5°C Schritten)	je 0,05 sec

Tabelle 4: PCR-Thermalprofil.

Für die PCR-Reaktionen wurde jedes Well der 384-Well Platte mit einem Reaktionsvolumen von 10 µl, zusammengesetzt aus je 8 µl Mastermix-Ansatz und 2 µl DNA (ca. 20 ng), gefüllt.

Der Mastermix-Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

- 1 U Titanium Taq DNA Polymerase mit dem bereitgestellten Titanium Taq PCR Puffer
- 0,75 x SYBR Green I (Sigma)
- 0,2 mM dNTP
- 1 mM DTT
- 1M Betain
- 900 nM je Telomerprimers (Telg und Telc)
- 900 nM je Albumins (Albu und Albd)

Tabelle 5 zeigt die Primersequenzen und deren Konzentration.

	Sequenz
Telomerprimer	
Telg	ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT
Telc	TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA
Albuminprimer	
Albugcr1	CGGCGGCGGGCGGCGCGGGCTGGGCGGAAACGCTGCGCAGAATCCTTG
Albdgcr1	GCCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGCTGAAAAGtACGGTCGCCTG

Table 5: Primersequenzen

Die relative Quantifizierung der Telomerlänge, die T/S Ratio, erfolgte mittels Standardkurven für die Telomer- bzw. Albuminamplifikation. Zur Erstellung von Standardkurven diente eine Verdünnungsreihe mit insgesamt sieben unterschiedlichen Konzentrationen (60 ng bis 20 ng) einer internen Kontroll-DNA, welche auf jeder Platte mitlief [69]. Die Berechnung der Standardkurven wurde mit Hilfe einer Software durchgeführt, welche dem BioRad-Thermal-Cycler zugehörig ist (iQ 2.0 Standard Edition Optical System Software). Außerdem enthielten zwei Wells eine Leukämie Zelllinie (1301) als Positivkontrolle (bereitgestellt durch Dr. Cesaro, Italien, Genua) und zwei Wells Wasser als Negativkontrolle. Zur Quantifizierung wurde der interkalierende Farbstoff SYBR Green I verwendet.

Wichtig ist, dass das Fluoreszenzsignal der Telomer- bzw. der Albuminprodukte aufgrund der unterschiedlichen Schmelzpunkte zu verschiedenen Zeitpunkten der Amplifikation erfasst wird. Im vierten Schritt der PCR kommt es bei 72°C lediglich zu einer Signalerfassung der Telomerprodukte, während die Albuminprodukte bei diesen Temperaturen noch komplett doppelsträngig vorliegen und daher nicht amplifiziert werden. Mit steigenden Temperaturen kommt es zu einer Denaturierung der Telomerprodukte und zur Signalerfassung der Albuminprodukte bei 89°C.

Eine wichtige Voraussetzung für die Bestimmung der relativen Telomerlänge mittels MMQPCR ist, dass die Telomerprodukte eine definierte Länge aufweisen. Da es sich bei den Telomersequenzen um repetitive Sequenzen handelt, können Telomerprimer an mehreren Stellen binden, wodurch eine Vielzahl an Produkten unterschiedlicher Länge und Schmelztemperatur entstehen würden.

Aus diesem Grund wurden die Primer Telg und Telc etabliert (s. Tabelle 5), durch die es möglich ist, Produkte mit einer definierten Länge herzustellen [68]. Im ersten PCR Zyklus bindet nur Telg an die humane DNA und es entstehen Amplifikate unterschiedlicher Länge. Im zweiten Zyklus bindet der Primer Telc an die Amplifikate von Primer Telg. Folglich entsteht ein Produkt definierter Länge.

Die Albuminprimer produzieren Amplifikate, welche bei einer höheren Temperatur schmelzen als die Amplifikate der Telomere. Das Fluoreszenzsignal kann dann bei einer Temperatur detektiert werden, die hoch genug ist, dass die Telomeramplifikate komplett aufgeschmolzen (einzelnsträngig) sind, so dass nur das Fluoreszenzsignal des Referenzgens (Albumin) detektiert wird.

2.3.9 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Microarray Experimente erfolgte mit Hilfe der GCOS Software durch Dr. Rheinhard Voss (Integrated Functional Genomics Universität Münster) und wurde in Form von Excel Tabellen zur Verfügung gestellt. Die Signifikanz der veränderten Genexpression wurde mittels t-Test berechnet (Cutoff $p \leq 0,05$).

Die Auswertung der Real-Time PCR Ergebnisse erfolgte mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode unter Zuhilfenahme der Excel Software. Die grafische Darstellung der Ergebnisse mit Angabe der Fehlerbalken (positiver Range) erfolgte mittels der Software Origin 7.5.

2.3.10 Richtlinien

Die Versuche zu dieser Dissertation wurden in einem Sicherheitslabor der Stufe 1 durchgeführt. Bei der Arbeit im Labor sowie beim Erstellen dieser Dissertation lagen die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ zu Grunde.

3. Ergebnisse

3.1 *Vergleich primärer und hTERT immortalisierter Kontroll- und Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten*

Den meisten menschlichen Zellen geht im Laufe ihres Differenzierungsprozesses das Enzym Telomerase verloren, wodurch es zu einer progressivem Verkürzung der Telomere und letztendlich zum Eintritt der Zelle in die replikative Seneszenz kommt. In Studien gelang es, durch Immortalisierung gesunder Fibroblasten mittels hTERT die Seneszenzinduktion zu verzögern und dadurch das Wachstum der Zellen zu verlängern [21, 23, 25-26]. Dieser Effekt der hTERT-Immortalisierung auf die Wachstumskinetik und die Telomerlänge wurde im Rahmen dieser Arbeit an gesunden Kontrollfibroblasten sowie an Hutchinson-Gilford-Progerie (HGP)-Fibroblasten untersucht, da bei diesen verkürzte Telomere gegenüber gesunden Fibroblasten beschrieben worden sind [24, 62].

3.1.1 *Charakterisierung bezüglich der Wachstumskinetik*

Zunächst wurde der Effekt der hTERT-Immortalisierung auf die Lebensspanne von Fibroblasten an gesunden gleichaltrigen Kontrollfibroblasten nachgewiesen.

Die Proliferationsrate wurde definiert als die zur Verdopplung der Zellzahl benötigte Zeit. Bei allen primären Kontrollfibroblasten zeigte sich zunächst eine Abnahme der Proliferationsrate bei steigenden Zellverdopplungs (PD = Population Doubling)-Zahlen. Nach Subkultivierung der Zellen (1:4) erreichten die Kontrollzellen der gesunden Kinder bei niedrigeren PD-Zahlen nach durchschnittlich vier Tagen Konfluenz. Mit steigenden PD-Zahlen sank die Proliferationsrate aller primären Fibroblasten, wobei ein Zeitraum von bis zu 25 Tagen bis zum Erreichen der Konfluenz nötig war. Nur eine Zelllinie erreichte im Laufe der Zellkulturbeobachtung nach einer Steigerung der PD-Zahl um 25 das Stadium der Seneszenz.

Neben den gleichaltrigen Kontrollen wurde auch eine Zelllinie eines gesunden Erwachsenen untersucht. Bei dieser wurde davon ausgegangen, dass sie, bedingt durch die altersabhängige Telomerverkürzung, eher als die Kontrollfibroblasten der Kinder die Seneszenz

einleitet. Diese wies eine niedrigere Proliferationsrate als die Fibroblasten der Kinder auf und es war lediglich eine Steigerung um 17 PD-Zahlen bis zum Eintritt in die Seneszenz möglich.

Primäre Zelllinien	PD bei Beginn der Zellkultur	PD bei Seneszenz	Δ PD	Tage/PD
778	17,8	42,8	+ 25	2,5
731	24,9		+ 30 *	2,1
707	22		+ 30 *	3
168	21,5	38,5	+ 17	3,9
Immortalisierte Zelllinien				
778-TERT	21,8		+ 30 *	6,1
731-TERT	23		+ 30 *	3,6
707-TERT	34,5		+ 30 *	5,4
168-TERT	25,1		+ 30 *	4,3

Tabelle 6: Angabe der Zellverdopplungszahlen (PD = Population Doubling) der nicht-immortalisierten und der immortalisierten gesunden humanen Hautfibroblasten zu Beginn der Zellkultur und bei Eintritt in die Seneszenz.

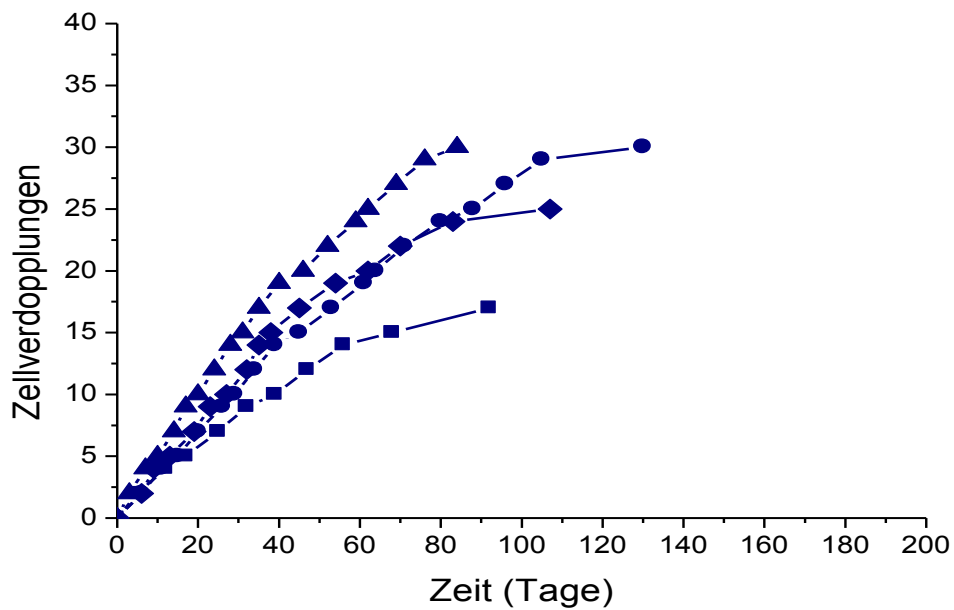
Außerdem dargestellt ist die mittlere Anzahl der Tage für eine Verdopplung (PD+1) im linearen Wachstumsbereich.

* Die Zellen teilten sich auch noch nach einer Steigerung der PD-Zahl um 30

Nach hTERT-Immortalisierung war sowohl bei den Kontrollzellen der gesunden Kinder als auch den Kontrollzellen des gesunden Erwachsenen eine Steigerung der PD-Zahl um 30 möglich.

Es stellte sich bei allen Kontrollfibroblasten mit noch niedrigen PD-Zahlen zu Beginn der Zellkultur (nach einer Steigerung der PD um fünf) eine Abnahme der Proliferationsrate nach hTERT-Immortalisierung dar. Dabei benötigten immortalisierte Kontrollfibroblasten mit durchschnittlich neun Tagen relativ lang um die Zellzahl zu verdoppeln. Gegen Ende der Zellkultur, also mit steigender PD-Zahl, sank diese Zahl auf ca. fünf Tage ab. Während sich bei allen primären Fibroblasten eine abnehmende Wachstumskinetik bei steigender PD-Zahl darstellte, zeigte das Wachstumsverhalten der immortalisierten Fibroblasten einen Anstieg der Proliferationsrate bei höheren PD-Zahlen.

A



B

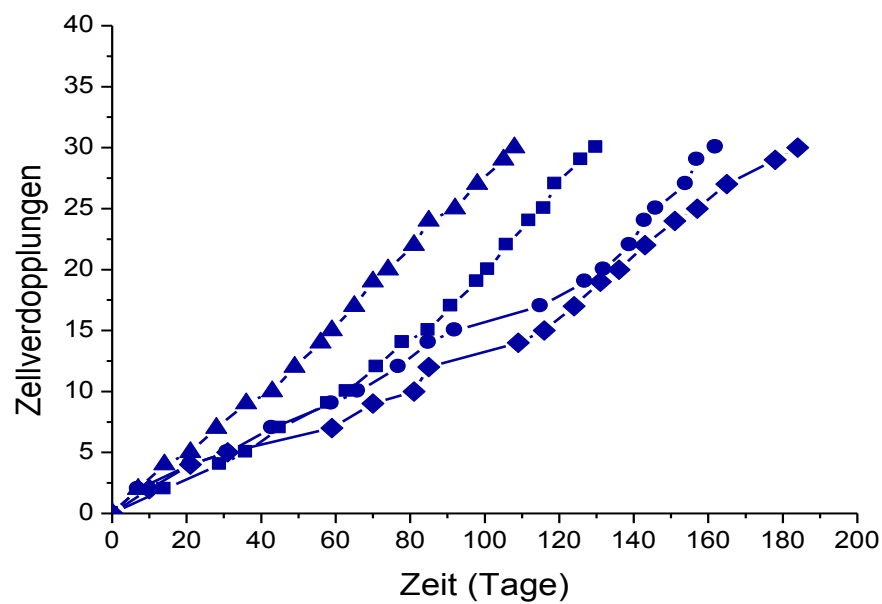


Abbildung 9: Darstellung der Wachstumskurven der (A) primären gesunden humanen Hautfibroblasten sowie der (B) immortalisierten gesunden humanen Hautfibroblasten.

Zum besseren Vergleich der einzelnen Zelllinien wurde bei dieser Darstellung jeweils bei PD-Zahl 0 begonnen. Tatsächlich unterscheiden sich die Zelllinien aber in ihrer Ausgangs-PD-Zahl (707: 22; 731: 24,9; 778: 17,8; 168: 21,5; 707-TERT: 34,5; 731-TERT: 23; 778-TERT: 21,8; 168-TERT: 25,1) (■168, ◆778, ▲731, ●707)

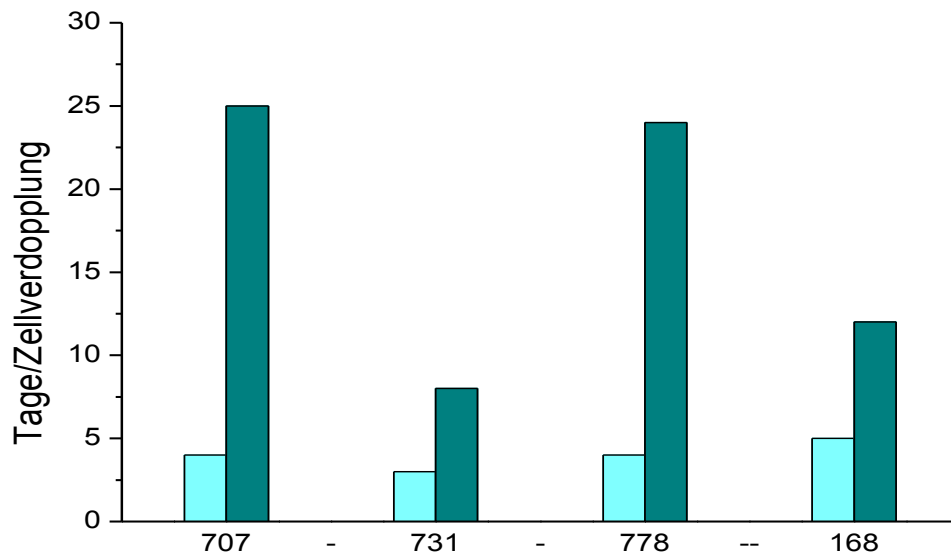
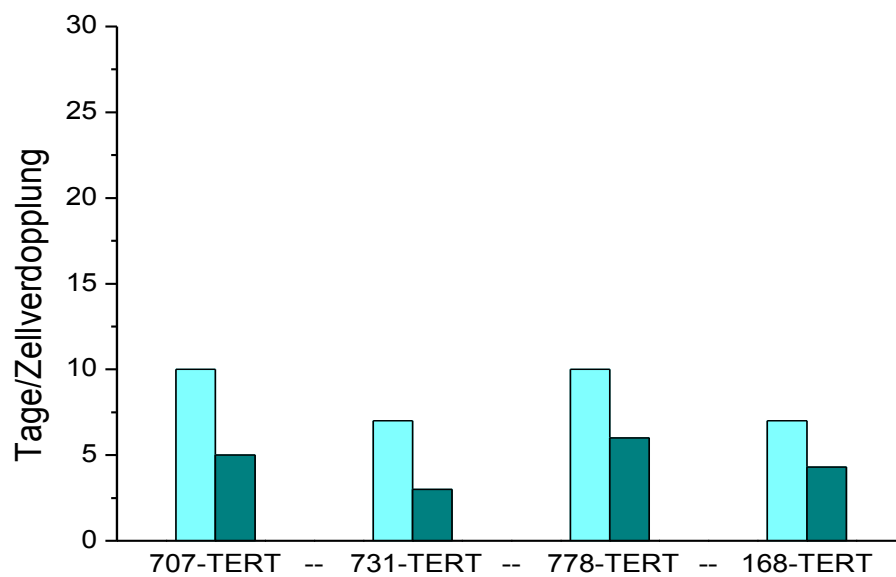
A**B**

Abbildung 10: Darstellung der Anzahl der zur Zellverdopplung benötigten Tage bei (A) nicht-immortalisierten und (B) immortalisierten Kontroll-Fibroblasten zu unterschiedlichen Zellverdopplungszahlen (PD = Population Doubling).

Abgebildet ist jeweils die Anzahl der zur Zellverdopplung (PD +1) benötigten Tage zu Beginn der Zellkultur (nach einer Steigerung der PD-Zahl um fünf) (hell) sowie nach einer Steigerung der PD-Zahl um 30 bzw. beim Eintritt in die Seneszenz (dunkel). (siehe auch Tabelle 6 und Abbildung 9)

Der an gesunden gleichaltrigen Fibroblasten gezeigte Effekt der Verlängerung der Lebensspanne von Zellen durch hTERT-Immortalisierung wurde auch an HGP-Fibroblasten untersucht. Diese wiesen den klassischen molekularen genetischen Defekt auf (Lamin A; Exon 11 Mutation C→T). Die Zellen sind durch eine beschleunigte Telomerverkürzung gekennzeichnet und leiten frühzeitig die replikative Seneszenz ein [70].

Wie bereits in der Literatur beschrieben, zeigte sich eine verkürzte Lebensspanne der primären HGP-Fibroblasten [71-72]. Bereits zu Beginn der Zellkultur hatten diese eine relativ geringe Proliferationsrate. Nach einer Subkultivierung der Zellen (1:4) erreichten diese im Gegensatz zu den gesunden Kontrollfibroblasten erst nach durchschnittlich neun Tagen Konfluenz. Die Wachstumskurven der HGP-Fibroblasten hatten dabei anfangs einen steilen Verlauf und flachten (vergleichbar mit den Kontrollen) im Laufe der Kultivierung zunehmend ab. Zellen, die ca. vier Wochen nach Subkultivierung keine Konfluenz erreicht hatten, wurden als seneszent (d. h. nicht mehr teilungsfähig) betrachtet. Dieser Zustand wurde bei allen primären HGP-Fibroblasten-Zelllinien erreicht (s. Tabelle 7).

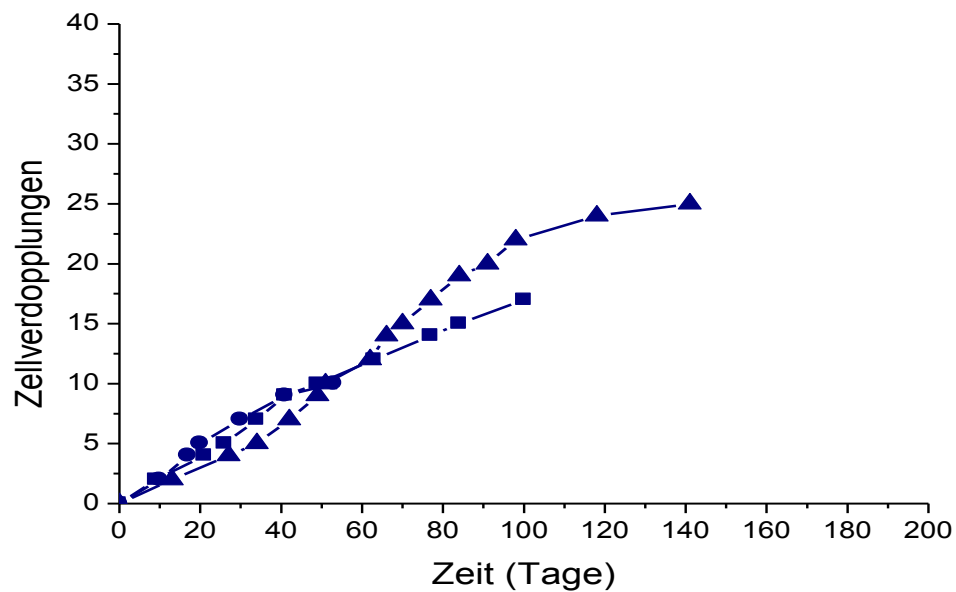
Primäre Zelllinien	PD bei Beginn der Zellkultur	PD bei Seneszenz	Δ PD	Tage/PD
FN 178	12,3	22,3	+ 10	4,4
FN 003	18,5	35,5	+ 17	4,5
FN 127	15,7	40,7	+ 25	4,5
Immortalisierte Zelllinien				
FN 178-TERT	19,5		+ 30 *	4,5
FN 003-TERT	27,9		+ 30 *	4,2
FN 127-TERT	23,1		+ 30 *	5,4

Tabelle 7: Angabe der Zellverdopplungszahlen (PD = Population Doubling) der nicht-immortalisierten und der immortalisierten HGP-Fibroblasten zu Beginn der Zellkultur und bei Eintritt in die Seneszenz. Außerdem dargestellt ist die mittlere Anzahl der Tage für eine Verdopplung (PD+1) im linearen Wachstumsbereich.

* Die Zellen teilten sich auch noch bei PD-Zahlen > 30.

Nach hTERT-Immortalisierung verlängerte sich die Lebensspanne aller verwendeten HGP-Fibroblasten deutlich. Bei allen drei Zelllinien konnte eine Steigerung der Ausgangs-PD-Zahl um 30 erreicht werden, wobei auch bei höheren PD-Zahlen keine Abschwächung der Wachstumskinetik zu erkennen war. Abbildung 11 stellt die Wachstumskurven der primären HGP-Fibroblasten im Vergleich zu hTERT-immortalisierten Fibroblasten dar.

A



B

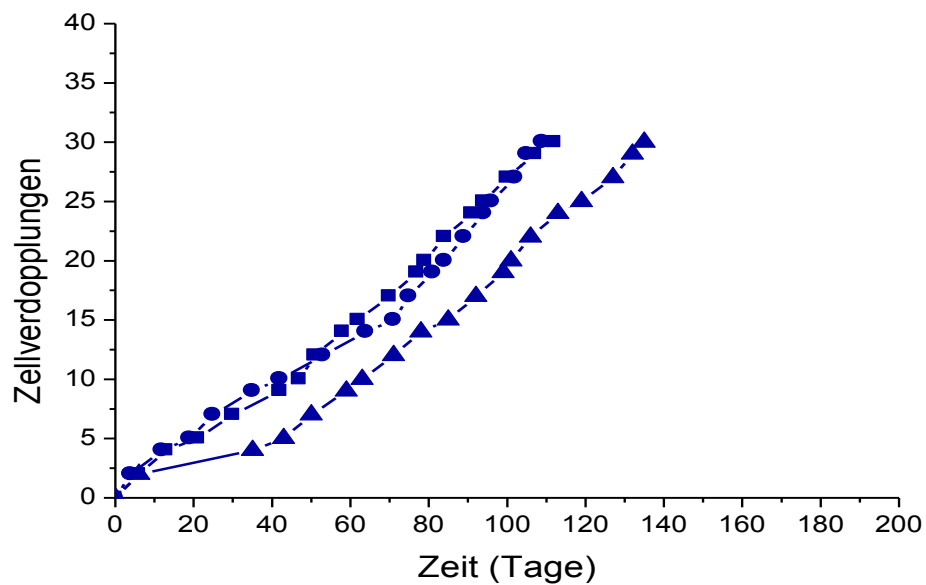


Abbildung 11: Darstellung der Wachstumskurven der (A) primären HGP-Fibroblasten sowie der (B) immortalisierten HGP-Fibroblasten.

Zum besseren Vergleich der einzelnen Zelllinien wurde bei dieser Darstellung jeweils bei PD-Zahl 0 begonnen. Tatsächlich unterscheiden sich die Zelllinien aber in ihren Ausgangs-PD-Zahlen (FN003: 18,5; FN178: 12,3; FN127: 15,7; FN003-TERT: 27,9; FN178-TERT: 19,5; FN127-TERT: 21,1) (●FN 178, ▲FN127, ■FN003)

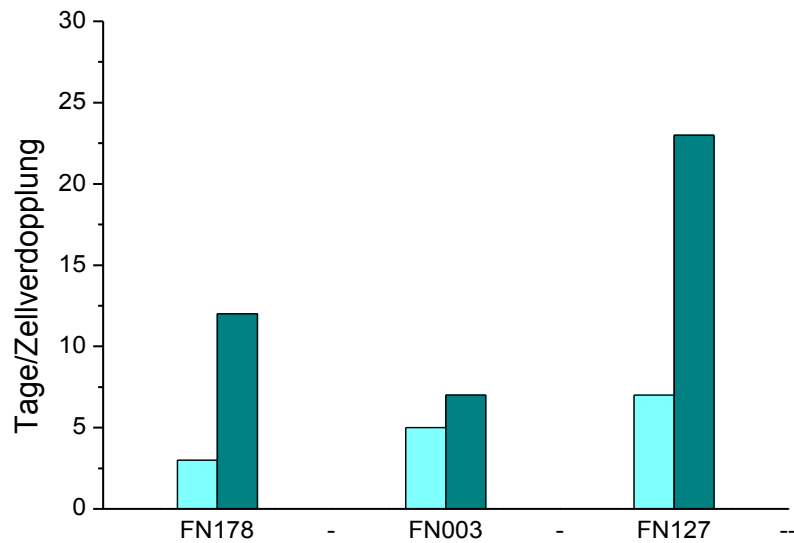
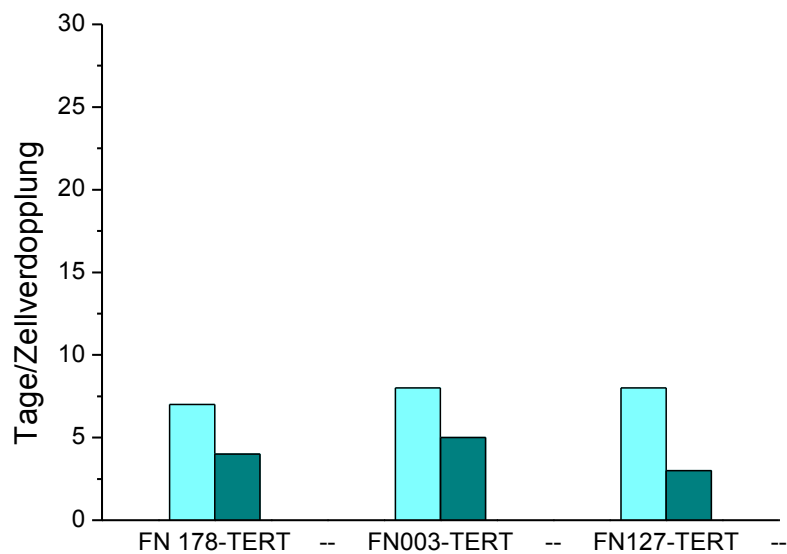
A**B**

Abbildung 12: Darstellung der Anzahl der zur Zellverdopplung benötigten Tage bei (A) nicht-immortalisierten und (B) immortalisierten HGP-Fibroblasten zu unterschiedlichen Zellverdopplungszahlen (PD = Population Doubling).

Abgebildet ist jeweils die Anzahl der zur Zellverdopplung (PD +1) benötigten Tage zu Beginn der Zellkultur (nach einer Steigerung der PD um fünf) (hell) sowie nach einer Steigerung der PD-Zahl um 30 bzw. beim Eintritt in die Seneszenz (dunkel) (siehe auch Tabelle 7 und Abbildung 11)

Bei der Betrachtung der Anzahl der Tage, die für eine Verdopplung der Zellen notwendig waren, benötigten die nicht-immortalisierten HGP-Fibroblasten nach einer Steigerung der PD-Zahl um fünf durchschnittlich ca. fünf Tage zur Zellverdopplung. Nach Immortalisierung war wie bei den primären Fibroblasten zunächst eine Abnahme der Proliferationsrate mit ca. 8 Tagen pro Zellverdopplung zu erkennen, welche aber am Ende der Zellkultur auf durchschnittlich vier Tage stieg. Bei allen immortalisierten HGP-Fibroblasten konnte, wie bereits bei den Primärzellen gezeigt, eine Steigerung der PD-Zahl >30 erreicht werden. Im Gegensatz dazu erreichten alle nicht-immortalisierten HGP-Fibroblasten im Laufe der Zellkultur die Seneszenz (s. Abbildung 12).

3.1.2 Charakterisierung bezüglich der Telomerlänge

Um den Erfolg der hTERT-Immortalisierung und damit eine Verlängerung der Telomere zu bestätigen, wurden Telomerlängenmessungen durchgeführt, welche in Kooperation mit Dr. Pim van der Harst vom University Medical Center Groningen in Holland erfolgten.

Die relative Telomerlängenangabe erfolgte mittels der T/S-Ratio, welche das Verhältnis aus Telomerprodukt und einem Referenzgen (Albumin) beschreibt. Eine T/S-Ratio >1 bedeutete, dass die gemessenen Telomere länger waren als die interne Kontrolle.

Es zeigte sich wie erwartet bei allen gesunden Kontrollzellen eine Abnahme der Telomerlänge mit zunehmenden Zellverdopplungszahlen (Ratio <1) (Abbildung 13(A)). Bei den HGP-Fibroblasten war nur bei zwei von drei Zelllinien eine leichte Abnahme der Telomerlänge bei steigender PD-Zahl zu erkennen. (Abbildung 14(A)).

Nach hTERT-Immortalisierung konnte eine Zunahme der relativen Telomerlänge sowohl bei den Kontrollzellen (Abbildung 13 (B)) als auch bei den HGP-Fibroblasten (Abbildung 14 (B)) bestätigt werden. Alle hTERT-immortalisierten Fibroblasten hatten eine Ratio >1 und damit signifikant längere Telomere als die Primärfibroblasten.

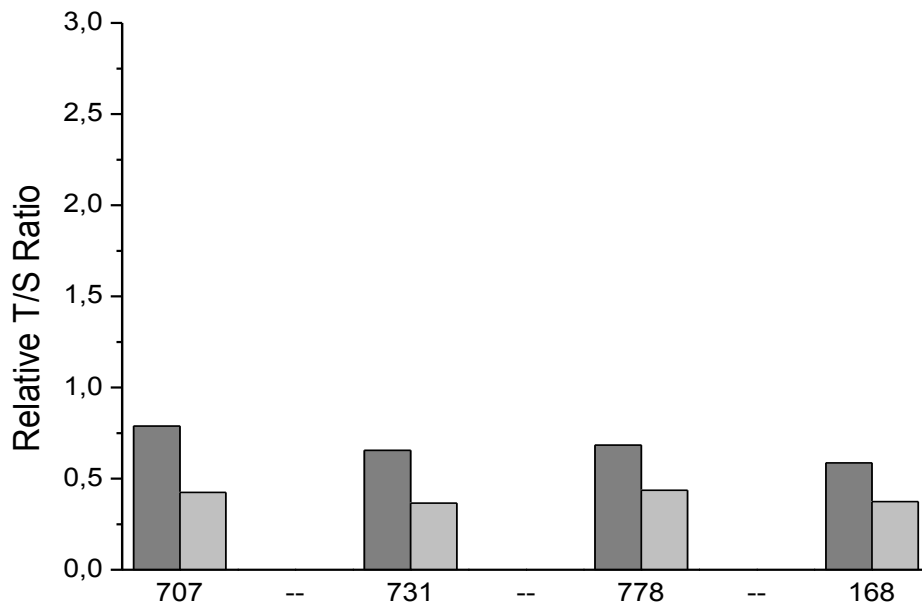
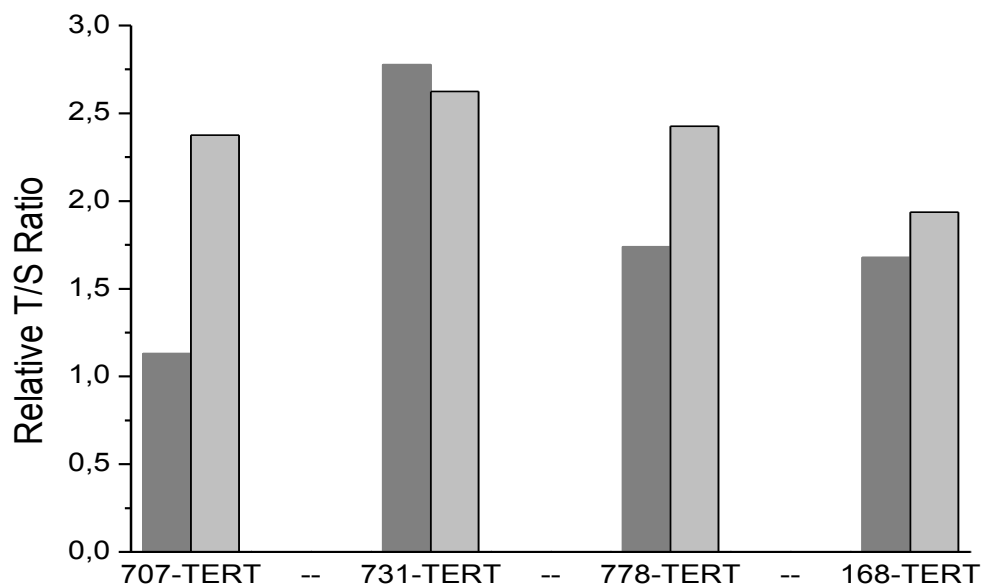
A**B**

Abbildung 13: Darstellung der relativen Telomerlänge in Abhängigkeit von der Zellverdopplungszahl (PD = Population Doubling) bei (A) nicht-immortalisierten und (B) immortalisierten Kontrollfibroblasten.

Dargestellt sind jeweils die Telomerlängen der niedrigsten (dunkel) und der höchsten (hell) gemessenen PD-Zahl.

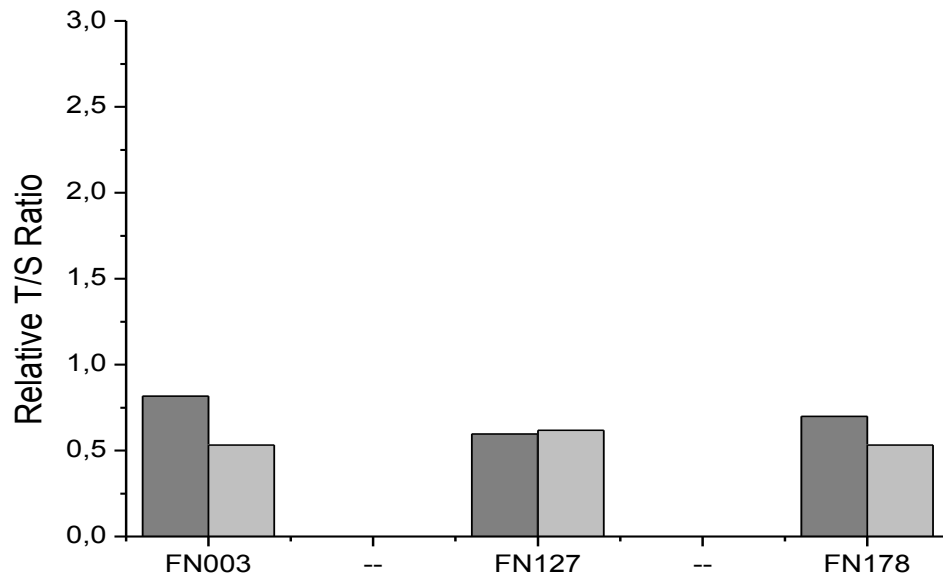
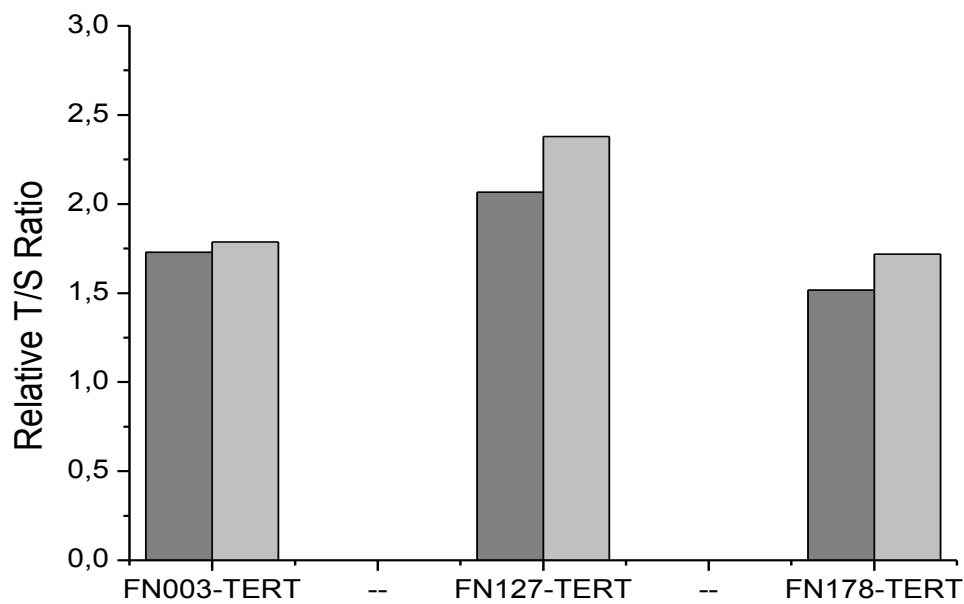
A**B**

Abbildung 14: Darstellung der relativen Telomerlänge in Abhängigkeit von der Zellverdopplungszahl (PD = Population Doubling) bei (A) nicht-immortalisierten und (B) immortalisierten HGP-Fibroblasten. Dargestellt sind jeweils die Telomerlängen der niedrigsten (dunkel) und der höchsten (hell) gemessenen PD-Zahl.

Weiterhin wurde gezeigt, dass sich anders als erwartet die Telomerlängen der HGP-Fibroblasten im Mittel nur sehr wenig von denen der Primärfibroblasten unterscheiden. Daher sieht es so aus, als ob die maximal erreichbare Telomerlänge nach hTERT-Immortalisierung bei HGP-Fibroblasten geringer ist als bei den Primärfibroblasten.

3.2 Identifizierung potentieller TPE-Kandidatengene

Der „Telomer-Positions-Effekt“(TPE) ist definiert als eine Unterdrückung der Genexpression telomernaher Gene [1]. Man geht davon aus, dass durch die progressive Telomerverkürzung im Rahmen der replikativen Seneszenz diese Unterdrückung verloren geht und es zu einem Anstieg der Expression von Genen kommt, welche in der Lage sind den Zellzyklusarrest einzuleiten. Somit könnte der TPE einen möglichen Mechanismus darstellen, durch den die replikative Seneszenz getriggert werden kann.

Um mögliche Kandidatengene für einen TPE zu finden, wurden die Genexpressionsprofile von primären Hutchinson-Gilford-Progerie (HGP)-Fibroblasten (als Modell für replikative Seneszenz), primären UV-B-Licht bestrahlten Kontroll-Fibroblasten (als Modell für telomer-unabhängige Induktion der Seneszenz) und hTERT-immortalisierten HGP-Fibroblasten (als Modell für die Reversibilität der Telomerverkürzung) mit Hilfe von Affymetrix cDNA Microarrays verglichen.

Die Auswertung dieser Microarrays erfolgte in Kooperation mit Dr. R. Voss von der Universität Münster mit der GCOS-Software von Affymetrix. Dabei wurden von den anfänglich 54.600 Probe Sets 19.984 als „present“ gewertet. Das heißt, sie zeigten auf dem Chip innerhalb der Gruppe zu 80 % ein Signal, welches über ein Hintergrundrauschen hinausging. Für die Vergleiche von HGP vs. gesunde Kontrolle, UV-B-Licht bestrahlte Zellen vs. gesunde Kontrolle und HGP vs. HGP-TERT wurde der Student t-Test (Stichprobenumfang n=6 in jeder Gruppe) angewendet.

Von den 19.984 als „present“ gewerteten Probe Sets zeigten 14.998 Probe Sets mit einem p-Wert <0,05 eine signifikante Veränderung. Manche Gene wurden durch ein Probe Set von mehreren sich überlappenden Primern detektiert [73-74]. Insgesamt 14.998 signifikant veränderte Probe Sets entsprechen somit insgesamt 9.327 Genen.

Bei der Analyse der Genchip-Ergebnisse wurden zuerst die Genexpressionsdaten des telomer-abhängigen (HGP-Fibroblasten) mit dem telomer-unabhängigen (UV-B-Licht bestrahlte Fibroblasten) Seneszenzmodell verglichen. Dabei ergaben sich deutliche Überlappungen in der Genexpression dieser beiden Modelle. Von den insgesamt 9.327 signifikant veränderten Genen ergaben sich bei 8.106 Genen von HGP-Fibroblasten und bei 6.807 Genen, die zuvor durch UV-B Bestrahlung behandelt wurden, signifikante Veränderungen in der Genexpression im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen. Davon hatten 4.985 exprimierte HGP-Gene und nur 3.286 UV-bestrahlte Gene eine verminderte Expression, wobei sich eine relativ hohe Schnittmenge von 1.715 Genen ergab. Bei den vermehrt auf mRNA-Ebene exprimierten Genen ergaben sich 3.121 bei HGP und eine etwas höhere Anzahl von 3.521 Genen bei den UV-B-Licht bestrahlten Zellen. Auch hier war die Schnittmenge mit 1.452 Genen relativ hoch.

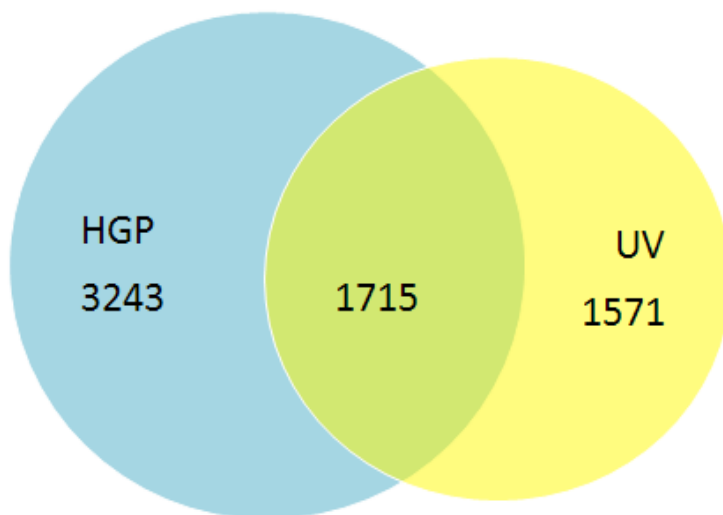


Abbildung 15: Auf mRNA-Ebene vermindert exprimierte Gene bei Hutchinson-Gilford Progeria-Fibroblasten und UV-B-Licht bestrahlten Fibroblasten.

Insgesamt waren 4.985 Gene bei HGP-Fibroblasten und 3.286 Gene bei UV-B-Licht bestrahlten Fibroblasten vermindert exprimiert.

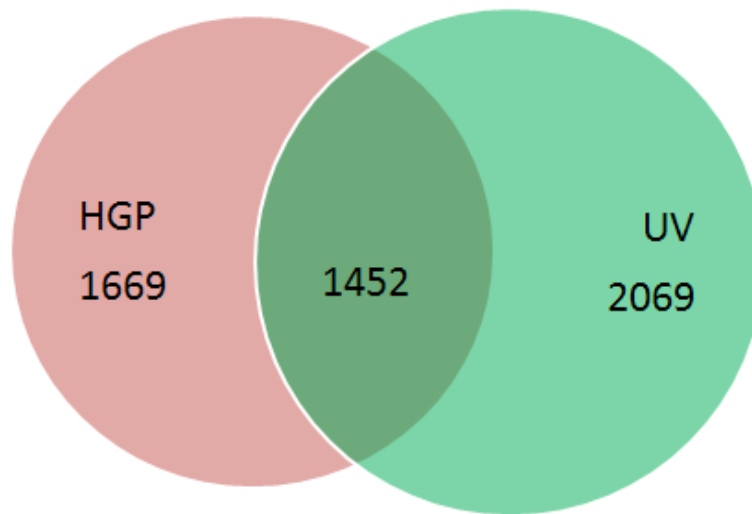


Abbildung 16: Auf mRNA-Ebene vermehrt exprimierte Gene bei Hutchinson-Gilford Progeria-Fibroblasten und UV-B-Licht bestrahlten Fibroblasten.

Insgesamt waren 3.121 Gene bei HGP-Fibroblasten und 3.521 Gene bei UV-B-Licht bestrahlten Fibroblasten vermehrt exprimiert.

Um trotz dieser Überlappungen in der Genexpression der beiden Seneszenz-Modelle potentielle Gene für einen TPE zu identifizieren, wurde eine sukzessive Eingrenzung der Gene nach den folgenden Kriterien durchgeführt: Von den insgesamt 9.327 Genen wurden zunächst nur jene betrachtet, die bei HGP-Fibroblasten reguliert waren (Modell für replikative Seneszenz), jedoch nicht oder gegensätzlich reguliert bei UV-B-Licht bestrahlten Zellen (Modell für telomer-unabhängige Stress induzierte Seneszenz). Daraus ergaben sich 6.599 Gene. Weiterhin sollte die Genexpression durch hTERT-Immortalisierung (und damit längeren Telomeren) ganz oder teilweise reversibel sein. Voraussetzung dafür war eine Abnahme der Genexpression nach Immortalisierung. Dies führte zu einer Eingrenzung auf 3.340 Gene. Als drittes Kriterium sollten die potentiellen TPE-Gene nicht weiter als 100.000 bp vom Chromosomenende entfernt lokalisiert sein. Daraus resultierte eine Anzahl von lediglich vier potentiellen Kandidatengen.

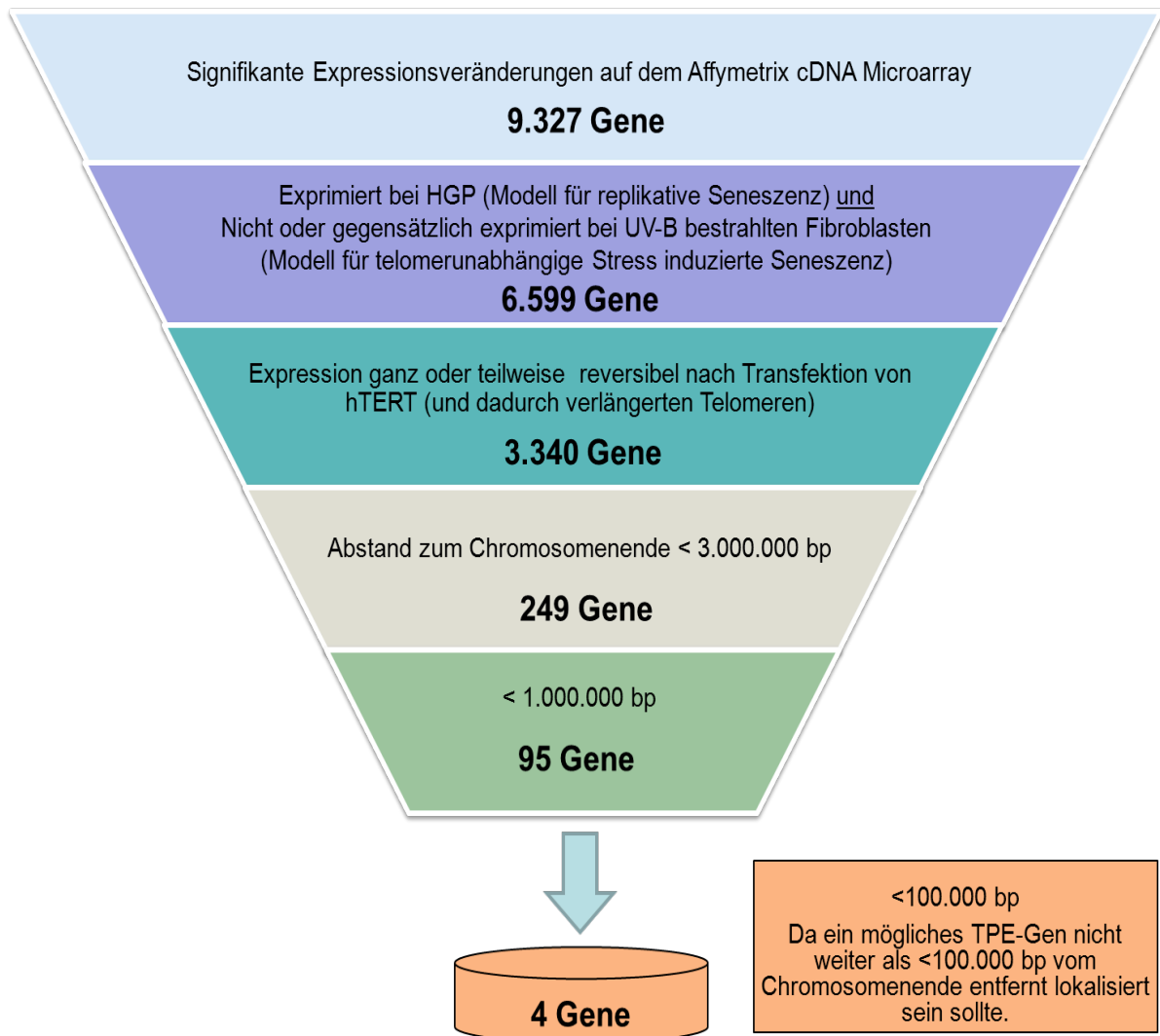


Abbildung 17: Sukzessive Eingrenzung der auf dem Microarray signifikant exprimierten Gene zur Identifikation von TPE-Kandidatengen.

Gensymbol/ Genname	Chromosom	Fold change			Abstand vom Chr.ende (bp)
		TERT	HGP	UV	
ZNF 268 (Zinc finger protein 268)	12q24.33	-1,15 n	-1,50**	-1,09 n	69.698
ZNF 828 (Chromosom 13 open reading frame 8)	13q34	1,34**	1,51****	-1,32****	79.054
PRMT2 (Protein arginine methyltransferase 2)	21q22.3	1,27*	1,57**	1,04n	74.291
		1,29n	1,50 **	-1,16n	74.329
		1,01n	1,25****	-1,05n	74.290
RPL23AP7 (Ribosomal protein L23a pseudogene 7)	2q14	-1,59**	-2,89****	1,32n	19.843

Tabelle 8: Darstellung der potentiellen Kandidatengene, die nach sukzessiver Eingrenzung die festgelegten Kriterien für einen potentiellen TPE erfüllen, und der mit dem Genchip ermittelten Veränderung der relativen Genexpression gegenüber der Kontrolle (fold change).

Positive Werte (orange) bedeuten eine erhöhte Expression und negative Werte (grün) eine verringerte Expression gegenüber der Kontrolle.

Eine Signifikanz der Werte war nach Anwendung des Student t-Test bei einem p-Wert <0,05 gegeben

(* <0,05; ** <0,01; *** <0,001; **** <0,0001; n keine Signifikanz).

3.3 Charakterisierung der potentiellen Kandidatengene mittels Real-Time PCR

Da bei den verwendeten Affymetrix cDNA Chips aufgrund der Kürze der verwendeten Oligonukleotide das Risiko für falsch positive Ergebnisse relativ hoch ist oder manche Gene nicht eindeutig zugeordnet werden können, wurden zur Bestätigung der cDNA-Genchip-Ergebnisse die Genexpressionsanalysen mit HGP-Fibroblasten und hTERT-immortalisierten HGP-Fibroblasten sowie mit gesunden Hautfibroblasten mit Hilfe der Real-Time PCR wiederholt [63]. Diese gilt aufgrund ihrer höheren Sensitivität und Spezifität als Goldstandard zur Validierung von Microarray Daten [98-92].

Außerdem wurden von allen verwendeten Zelllinien Messungen bei unterschiedlichen Zellverdopplungszahlen (PD = Population Doubling) (bei angenommen abnehmender Telomerlänge mit steigender PD-Zahl) durchgeführt.

Von denen durch die sukzessive Eingrenzung der Genchip-Ergebnisse ausgewählten potentiellen Kandidatengenen für einen „Telomer-Positions-Effekt“ (TPE) wurde zuerst eine Auswahl von drei Genen (ZNF268, ZNF828, PRMT2) getroffen. Diese entsprachen dabei den im Rahmen dieser Arbeit festgelegten Kriterien für einen TPE vollständig (s. Abbildung 17).

Aufgrund der in der Literatur bereits beschriebenen möglichen weiteren Faktoren wie der komplexen Heterochromatinstruktur der Telomere, den Telomerbindungsproteinen oder dem Einfluss von Umweltfaktoren, welche neben der Telomerlänge und dem Abstand der Gene vom Chromosomenende einen Einfluss auf einen TPE haben können, wurde außerdem eine Auswahl weiterer telomernaher Gene getroffen [105, 107, 110, 119-120]. Sie wichen in jeweils einem Punkt von den zuvor festgelegten Kriterien ab. Dazu zählte das Gen UPF3A, das mit einem Abstand von 122.690 bp weiter als 100.000 bp vom Chromosomenende entfernt liegt. Des Weiteren das Gen TRIM28, welches keine Reversibilität durch hTERT-Immortalisierung zeigte, sowie MZF1, welches zwar eine Reversibilität der Expression nach Immortalisierung aufwies, jedoch sowohl bei HGP-Fibroblasten als auch bei UV-B-Licht bestrahlten Fibroblasten hoch reguliert war (s. Tabelle 9)

Gensymbol/ Genname	Chromosom	Fold change			Abstand vom Chr.ende (bp)
		TERT	HGP	UV	
ZNF 268 (Zinc finger protein 268)	12q24.33	-1,15 n	-1,50**	-1,09 n	69.698
ZNF 828 (Chromosom 13 open reading frame 8)	13q34	1,34**	1,51****	-1,32****	79.054
PRMT2 (Protein arginine methyltransferase 2)	21q22.3	1,27*	1,57**	1,04n	74.291
		1,29n	1,50**	-1,16n	74.329
		1,01n	1,25****	-1,05n	74.290
UPF3A (UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog A)	13q34	1,33****	1,37**	1,17n	122.690
TRIM28 (tripartite motifcontaining 28)	19q13.4	1,68****	1,46***	-1,11*	73.115
MZF1 (myeloid zinc finger 1)	19q13.2- q13.4	1,18n	1,46**	1,22**	44.058

Tabelle 9: Erweiterte Auswahl potentieller Kandidatengene zur Identifizierung eines „Telomer-Positionseffektes“ (TPE). und Darstellung der mit dem Genchip ermittelten Veränderung der relativen Genexpression gegenüber der Kontrolle (fold change).

Positive Werte (orange) bedeuten eine erhöhte Expression und negative Werte (grün) eine verringerte Expression gegenüber der Kontrolle. Da möglicherweise andere Faktoren (wie die komplexe Heterochromatinstruktur der Telomere, Telomerbindungsproteine oder Umweltfaktoren) neben der Telomerlänge und dem Abstand der Gene vom Chromosomenende einen Einfluss auf einen TPE haben können, wurde die Auswahl möglicher TPE-Gene um drei Gene erweitert (UPF3A, TRIM28, MZF1), da diese nur gering von den zuvor festgelegten Kriterien abwichen.

Eine Signifikanz der Werte war nach Anwendung des Student t-Test bei einem p-Wert < 0,05 gegeben (* < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001; n keine Signifikanz).

Real-Time PCR Ergebnisse der potentiellen TPE-Kandidatengene

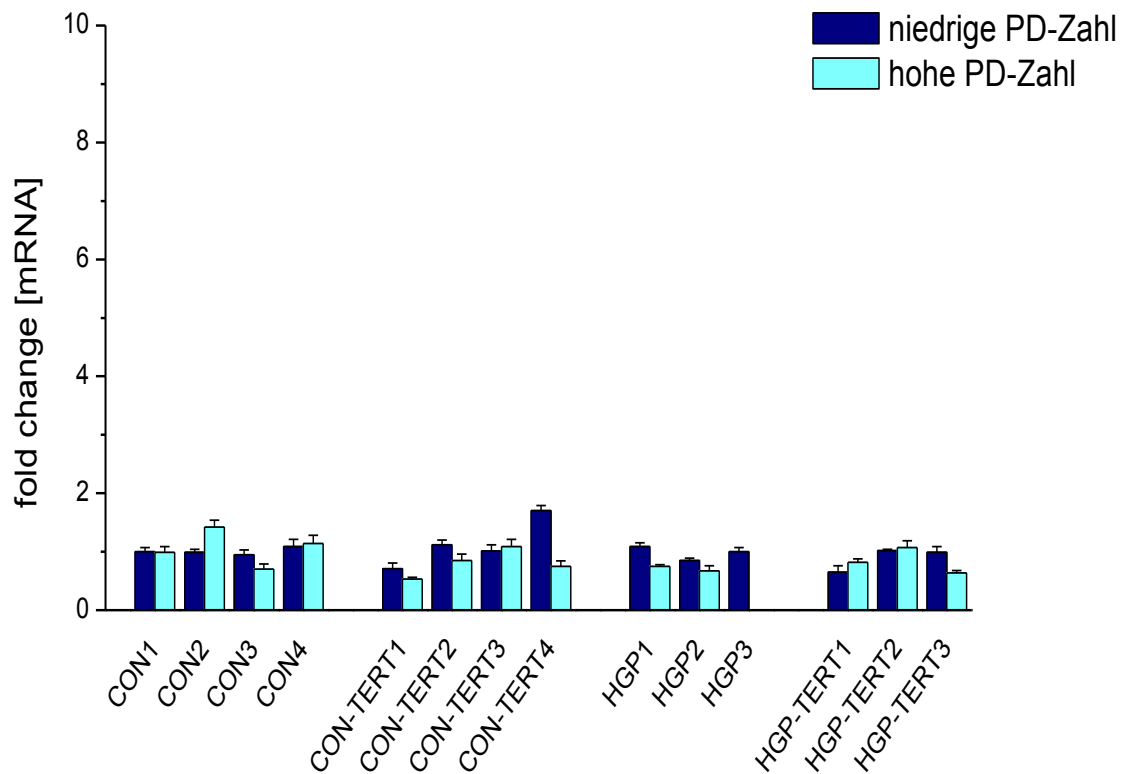


Abbildung 18: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen PRMT2.

Abgebildet sind die relativen Expressionsraten von vier gesunden Kontrollzelllinien, drei Zelllinien von Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten sowie jeweils die der immortalisierten Zelllinien bezogen auf die niedrigste PD-Zahl von CON1. Außerdem wurde von jeder Zelllinie je eine niedrige PD-Zahl (dunkel) sowie eine hohe PD-Zahl (hell) gemessen. (PD = Population Doubling)

Die Fehlerbalken geben den positiven Range an.

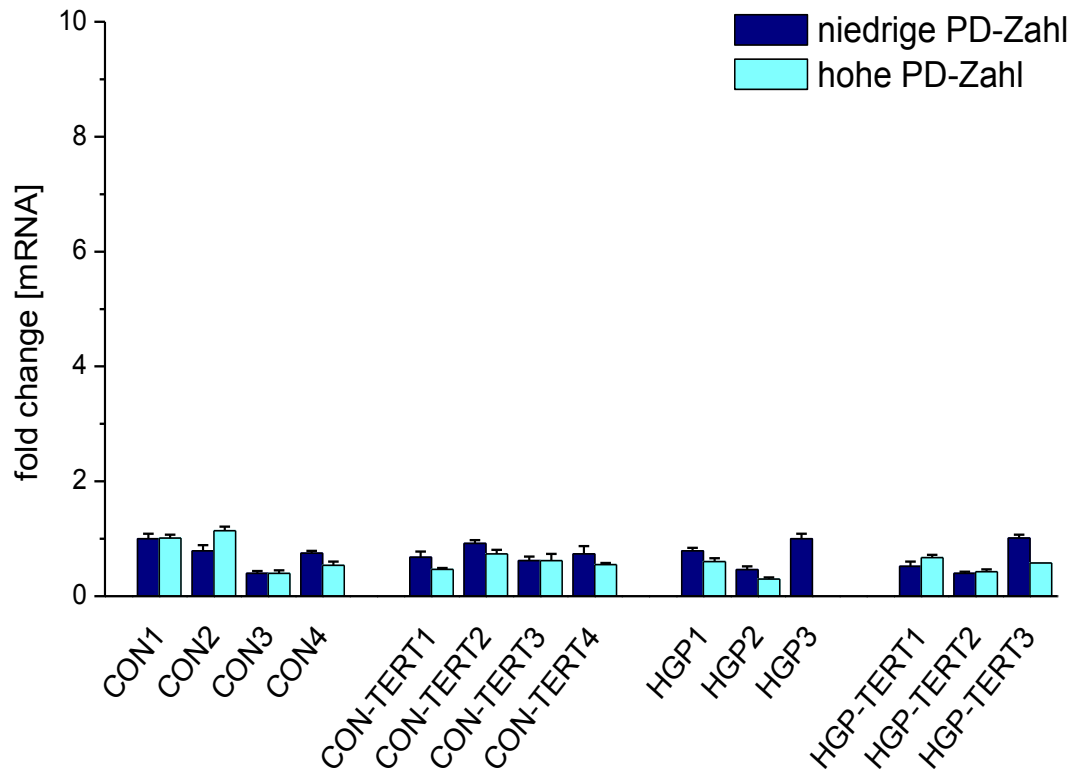


Abbildung 19: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen ZNF268.

Abgebildet sind die relativen Expressionsraten von vier gesunden Kontrollzelllinien, drei Zelllinien von Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten sowie jeweils die der immortalisierten Zelllinien bezogen auf die niedrigste PD-Zahl von CON1. Außerdem wurde von jeder Zelllinie je eine niedrige PD-Zahl (dunkel) sowie eine hohe PD-Zahl (hell) gemessen. (PD = Population Doubling)

Die Fehlerbalken geben den positiven Range an.

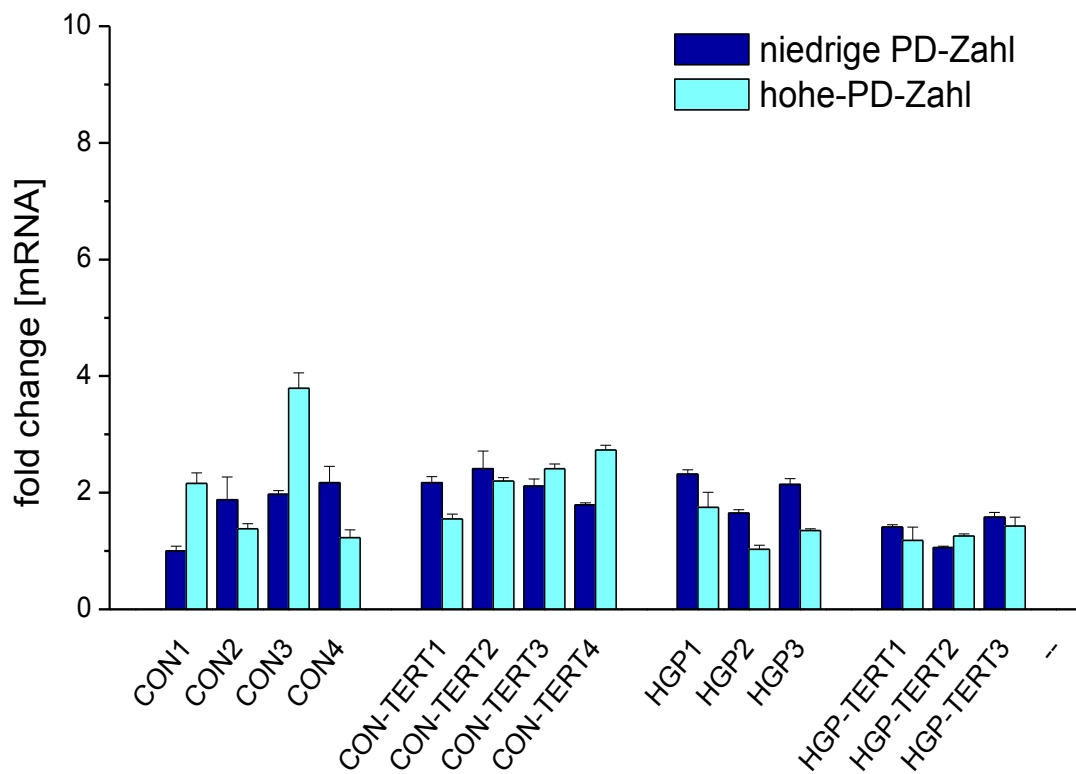


Abbildung 20: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen ZNF828.

Abgebildet sind die relativen Expressionsraten von vier gesunde Kontrollzelllinien, drei Zelllinien von Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten sowie jeweils die der immortalisierten Zelllinien bezogen auf die niedrigste PD-Zahl von CON1. Außerdem wurde von jeder Zelllinie je eine niedrige PD-Zahl (dunkel) sowie eine hohe PD-Zahl (hell) gemessen. (PD = Population Doubling)

Die Fehlerbalken geben den positiven Range an.

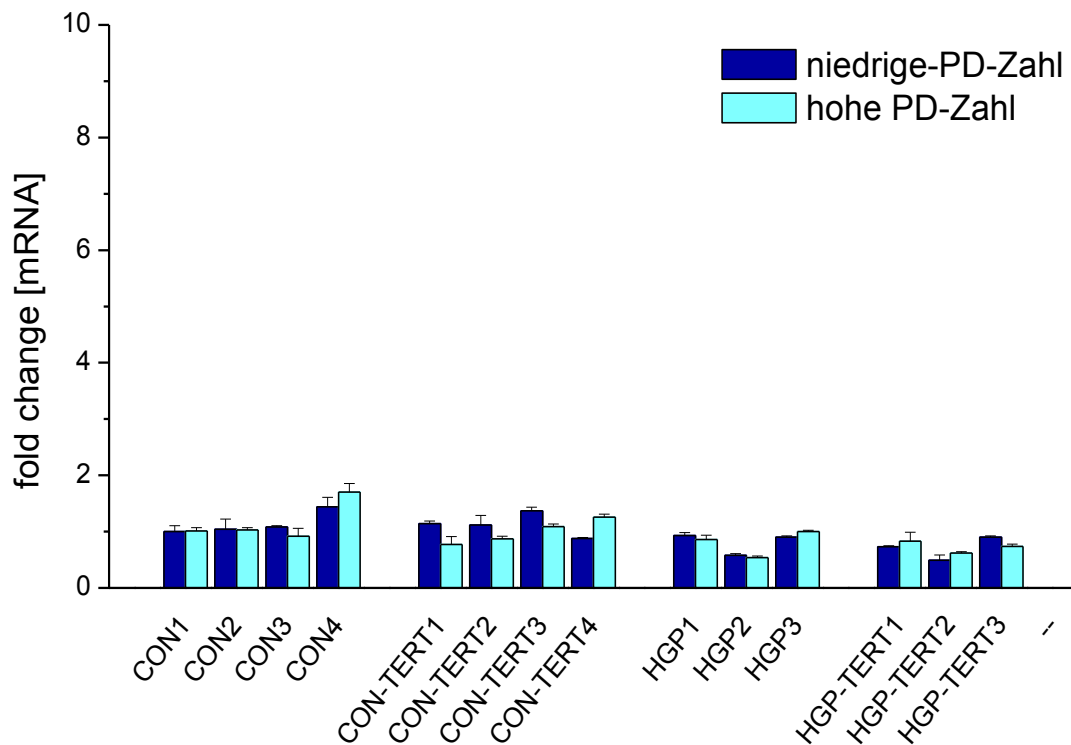


Abbildung 21: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen UPF3A.

Abgebildet sind relativen Expressionsraten von vier gesunden Kontrollzelllinien, drei Zelllinien von Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten sowie jeweils die der immortalisierten Zelllinien bezogen auf die niedrigste PD-Zahl von CON1. Außerdem wurde von jeder Zelllinie je eine niedrige PD-Zahl (dunkel) sowie eine hohe PD-Zahl (hell) gemessen. (PD = Population Doubling)

Die Fehlerbalken geben den positiven Range an.

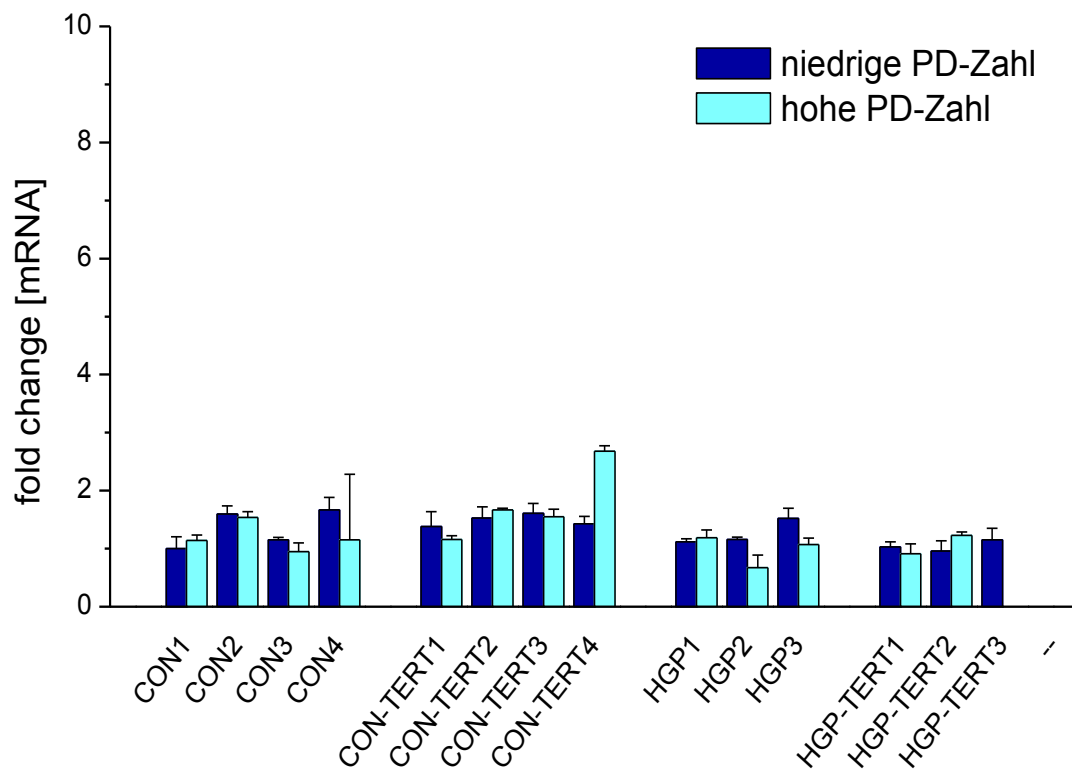


Abbildung 22: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen *TRIM28*.

Abgebildet sind die relativen Expressionsraten von vier gesunden Kontrollzelllinien, drei Zelllinien von Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten sowie jeweils die der immortalisierten Zelllinien bezogen auf die niedrigste PD-Zahl von CON1. Außerdem wurde von jeder Zelllinie je eine niedrige PD-Zahl (dunkel) sowie eine hohe PD-Zahl (hell) gemessen. (PD = Population Doubling)

Die Fehlerbalken geben den positiven Range an.

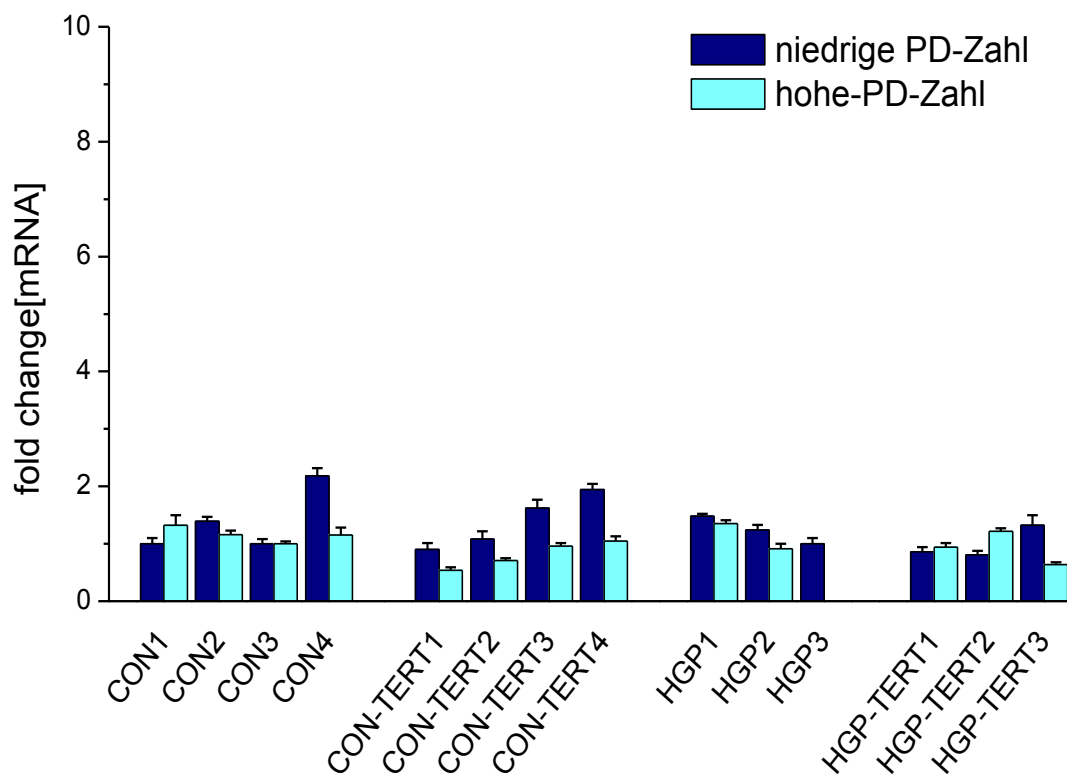


Abbildung 23: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen MZF1.

Abgebildet sind die relativen Expressionsraten von vier gesunden Kontrollzelllinien, drei Zelllinien von Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten sowie jeweils die der immortalisierten Zelllinien bezogen auf die niedrigste PD-Zahl von CON1. Außerdem wurde von jeder Zelllinie je eine niedrige PD-Zahl (dunkel) sowie eine hohe PD-Zahl (hell) gemessen. (PD = Population Doubling)

Die Fehlerbalken geben den positiven Range an.

Mit den ausgewählten Kandidatengen konnten die Expressionsveränderungen der Genchips nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse der Real-Time PCR ergaben keine steigenden Expressionsraten bei HGP-Fibroblasten gegenüber gesunden Kontrollen. Außerdem zeigte sich sowohl bei gesunden Kontrollfibroblasten als auch bei HGP-Fibroblasten keine Reversibilität der Genexpression nach hTERT-Immortalisierung. Auch ein Anstieg der Genexpression in höheren PD-Zahlen, was ein Indikator für einen TPE sein könnte, konnte nicht bestätigt werden.

Da mit den ausgewählten telomernahen Genen sowohl bei den festgelegten Kriterien für einen TPE als auch bei Erweiterung der Kriterien kein TPE identifiziert werden konnte, wurde außerdem ein weiteres Gen betrachtet. Diesem wurde in der Literatur bereits eine Rolle beim

Alterungsprozess zugeschrieben. Es ist jedoch in größerer Entfernung vom Telomere lokalisiert. Hierbei handelt es sich um das Apolipoprotein D (APOD). Frühere Studien an *Drosophila melanogaster* haben bereits gezeigt, dass dieses Gen die Lebensspanne von Zellen verlängern und die Zellen möglicherweise vor oxidativem Stress schützen kann [75]. Auch bei den Genchip-Analysen zeigte APOD den Kriterien entsprechend eine Hochregulation bei dem telomer-abhängigen Alterungsmodell (HGP-Fibroblasten) und war beim telomer-unabhängigen Alterungsmodell (UV-B-Licht bestrahlten Fibroblasten) nicht reguliert.

Auch eine partielle Reversibilität der Genexpression durch hTERT-Immortalisierung war gegeben. Entgegen der Annahme für ein potentielles TPE-Gen ist dieses Gen mit einem Abstand von 2,7 Millionen bp vom Chromosomenende jedoch im Gegensatz zu den zuvor gemessenen Genen telomerfern lokalisiert.

Gensymbol/ Genname	Chromosom	Fold change			Abstand vom Chr.ende (bp)
		TERT	HGP	UV	
APOD (Apolipoprotein D)	3q26.2-qter	2.06*	4,17**	1,70n	2,7 Mio.

Tabelle 10. Apolipoprotein D (APOD) als potentielles Kandidatengen für einen „Telomer-Positionseffektes“ (TPE).

Darstellung der mit dem Genchip ermittelten Veränderung der relativen Genexpression gegenüber der Kontrolle (fold change). Positive Werte (orange) bedeuten eine erhöhte Expression und negative Werte (grün) eine verringerte Expression gegenüber der Kontrolle.

Eine Signifikanz der Werte war nach Anwendung des Student t-Test bei einem p-Wert $< 0,05$ gegeben (* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$; **** $< 0,0001$; n keine Signifikanz).

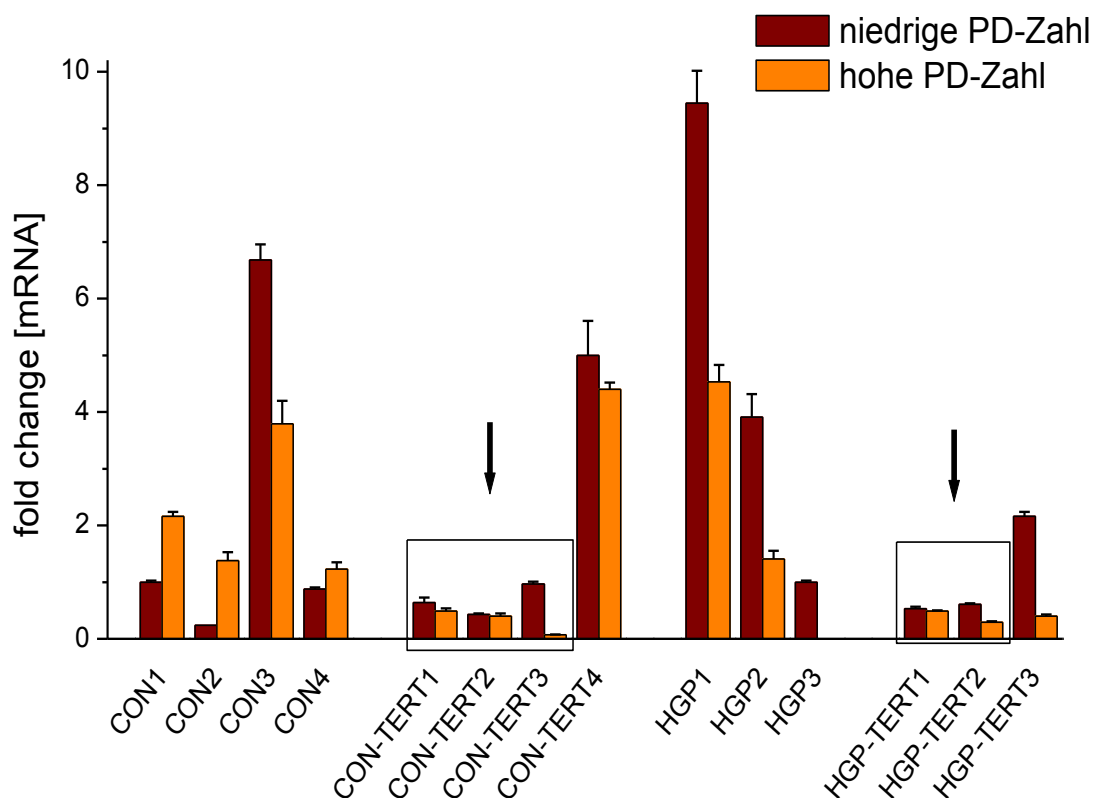


Abbildung 24: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen APOD.

Abgebildet sind die relativen Expressionsraten von vier gesunden Kontrollzelllinien, drei Zelllinien von Hutchinson-Gilford-Progerie-Fibroblasten sowie jeweils die der immortalisierten Zelllinien bezogen auf die niedrigste PD-Zahl von CON1. Außerdem wurde von jeder Zelllinie je eine niedrige PD-Zahl (dunkel) sowie eine hohe PD-Zahl (hell) gemessen. (PD = Population Doubling)

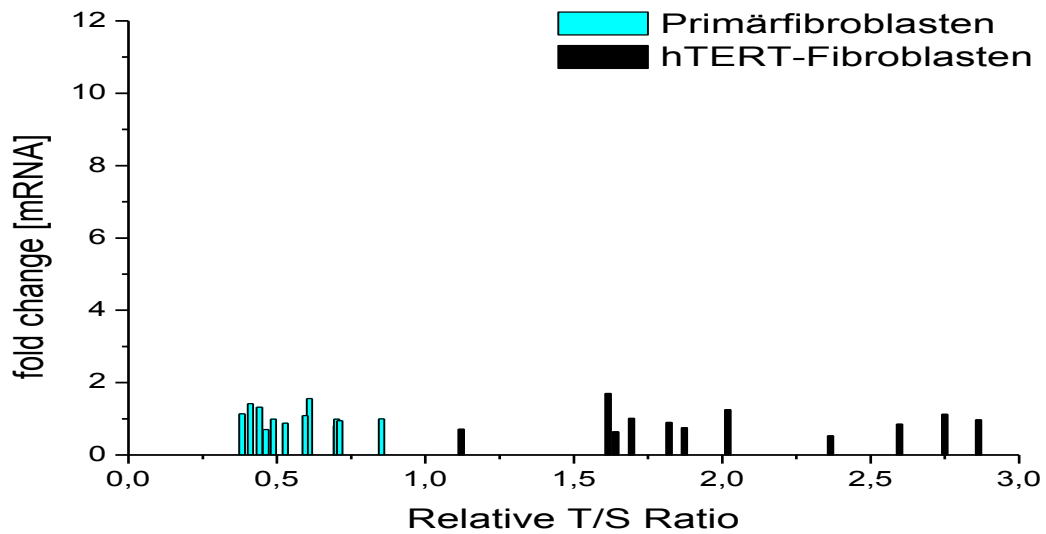
Die Fehlerbalken geben den positiven Range an.

Im Gegensatz zu den zuvor gemessenen Genen ließ sich beim APOD bei drei von vier Kontrollfibroblasten sowie bei zwei von drei HGP-Fibroblasten eine starke Verringerung der relativen Genexpression nach hTERT-Immortalisierung nachweisen. Eine Verringerung der Genexpression bei gesunden Kontrollen gegenüber HGP-Fibroblasten sowie eine signifikante Steigerung der Genexpression mit steigender PD-Zahl konnte jedoch auch hier nicht bestätigt werden.

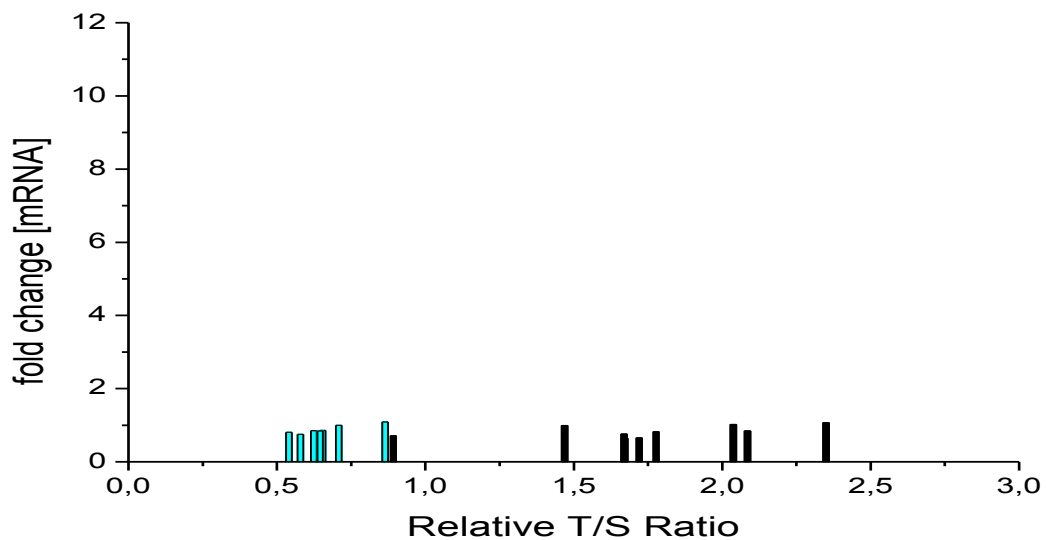
Das Verhältnis der Genexpression zur Telomerlänge der potentiellen TPE-Kandidatengene

A

PRMT2: Kontrolle

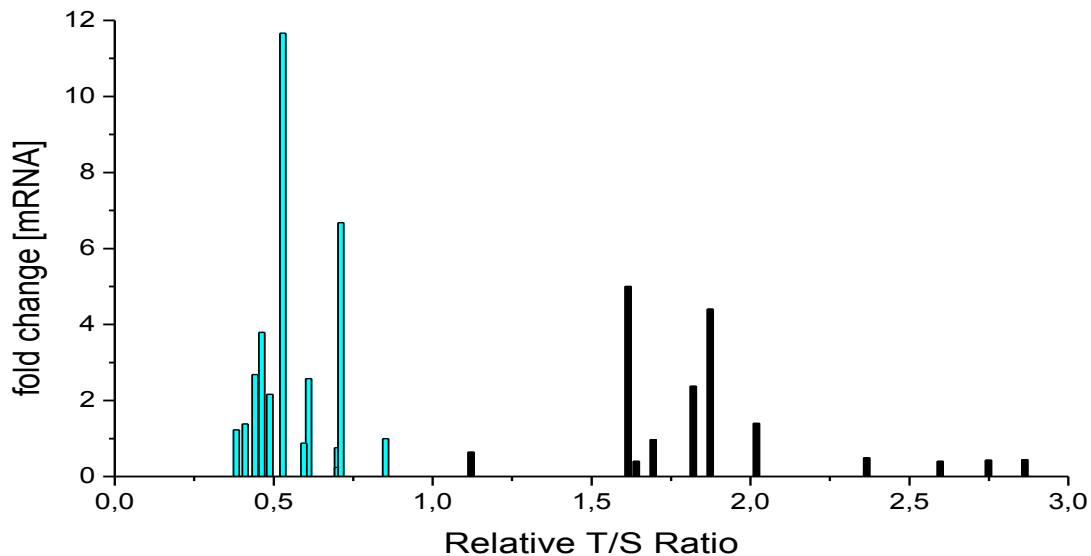


PRMT2: HGP



B

APOD: Kontrolle



APOD: HGP

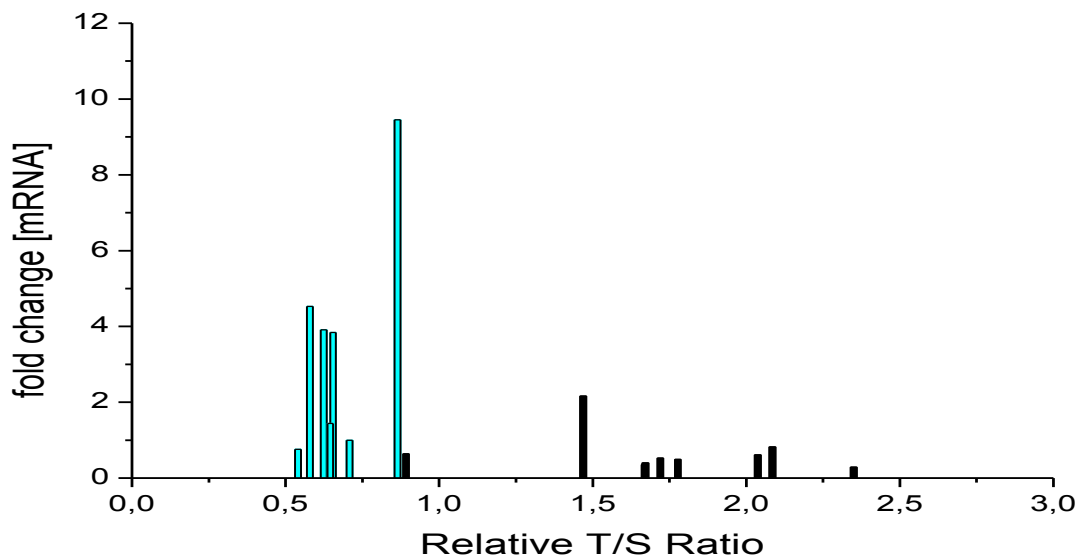


Abbildung 25: Verhältnis der Genexpression zur Telomerlänge potentieller TPE-Gene.

Dargestellt ist eines der Gene (PRMT2), welches den im Rahmen dieser Arbeit festgelegten TPE-Kriterien vollständig entsprach (A) und das APOD Gen, welches mit ca. 2,7 Mio. bp weiter als 100.000 bp vom Chromosomenende entfernt lag (B) und damit von den TPE-Kriterien abwich. Die anderen gemessenen TPE-Kandidatengene (ZNF268, ZNF828, RABL2B, UPF3A, TRIM28) zeigten ähnlich dem PRMT2 keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression bei unterschiedlichen Telomerlängen. (hell: Primärfibroblasten; dunkel: hTERT-Fibroblasten)

Bei der Betrachtung der Genexpression in Abhängigkeit von der Telomerlänge ergaben sich bei den zuerst gemessenen potentiellen TPE-Genen sowohl bei den HGP-Fibroblasten als auch bei den Kontrollzellen keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression bei unterschiedlichen Telomerlängen. Obwohl HGP-Fibroblasten und Kontrollzellen nach der Immortalisierung mittels hTERT wie angenommen längere Telomere aufwiesen, kam es zu keiner signifikanten Unterdrückung der Genexpression durch die längeren Telomere, was einem TPE entsprechen würde. Beim Apolipoprotein D, welches mit einem Abstand von ca. 2,7 Mio bp vom Chromosomenende nicht vollständig den zuvor festgelegten TPE-Kriterien entsprach, konnte bei der Mehrzahl der Kontroll- sowie der HGP-Fibroblasten eine Abnahme der Genexpression nach hTERT-Immortalisierung (und damit längere Telomere) gezeigt werden.

4. *Diskussion*

4.1 *Diskussion der Methodik*

Immortalisierung menschlicher Fibroblasten durch Telomerase

Mit jedem Zellzyklus kommt es zu einer progressiven Verkürzung unserer Telomere [11, 50, 55]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass kurze Telomere das Risiko für altersabhängige Krankheiten wie Arteriosklerose aber auch für Tumorerkrankungen erhöhen. Dies wird unter anderem dadurch erklärt, dass mit zunehmender Verkürzung der Telomere diese ihre Funktion als schützende „Capping-Struktur“ der Chromosomenenden verlieren. Kurze Telomere werden dann als Doppelstrangbrüche (DSB) erkannt und es kommt zur Chromosomeninstabilität. Um sich vor einem unkontrollierten Zellwachstum zu schützen, leiten Zellen, deren Telomere eine kritische Länge erreicht haben, deshalb einen irreversiblen Wachstumsarrest, genannt replikative Seneszenz, ein [4, 76-78].

Nur wenige Zellen sind in der Lage, sich dieser replikativen Seneszenz zu entziehen. Zu diesen Zellen gehören Reproduktionszellen, Stammzellen und auch Krebszellen. Sie enthalten das Enzym Telomerase, welches in der Lage ist, die Telomerverkürzung zu verhindern und die Telomerlänge aufrechtzuerhalten. Normalen, differenzierten somatischen Zellen geht diese Fähigkeit im Laufe ihres Differenzierungsprozesses jedoch verloren [79].

In dieser Arbeit wurden sowohl gesunde Kontrollfibroblasten, als auch Fibroblasten von Patienten des Hutchinson-Gilford-Progerie Syndroms (HGPS) kultiviert. Fibroblasten von Patienten des HGP-Syndroms, die unter anderem durch beschleunigte Telomerverkürzung und vorzeitiges Altern gekennzeichnet sind, wurden als Modell für replikative Seneszenz herangezogen. Es konnte durch Kultivierung der Zellen gezeigt werden, dass Fibroblasten des HGP-Syndroms nur eine begrenzte Teilungsfähigkeit besitzen und eher in die (replikative) Seneszenz übergehen als gesunde Kontrollfibroblasten mit längeren Telomeren.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass es auch bei HGP-Fibroblasten (als Modell für replikative Seneszenz) möglich ist, die Lebensspanne durch hTERT-Immortalisierung zu verlängern. Dabei zeigte sich in der Telomerlängenmessung eine signifikante Zunahme der Telomerlänge nach Immortalisierung.

Es sind derzeit unterschiedliche Methoden zur Immortalisierung von Zellen bekannt. Dazu zählen unter anderem: die Transfektion der Zellen mit viralen Onkogenen, die Fusion mit Tumorzellen sowie die Transfektion der Telomerase [21, 24, 80].

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es mittels viraler Transfektion das Enzym Telomerase in Zellen einzubringen, die dieses normalerweise nur gering exprimieren. Dabei ist es lediglich notwendig die katalytische Untereinheit hTERT zu transferieren, da die RNA Komponente in fast allen Zellen vorkommt und nicht während des Differenzierungsprozesses verloren geht. Diese Art der Immortalisierung von Zellen stellt einen bereits gut etablierten Prozess zur Überbrückung der replikativen Seneszenz dar und hat gegenüber den anderen erwähnten Methoden den Vorteil, dass (z.B. im Gegensatz zur Immortalisierung mit Onkogenen oder Transfusion mit Tumorzellen) die Fähigkeit zur Kontaktinhibition, die Zellzykluskontrolle, die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und ein normaler Karyotyp erhalten bleiben [21, 24, 26]. Dieser Erhalt der Genomstabilität hat besonders beim HGP-Syndrom mit kurzen Telomeren und Chromosomeninstabilität viele Vorteile. Ein möglicher Nachteil könnte sein, dass gerade die genomische Instabilität zum Phänotyp der HGP-Fibroblasten gehört und somit bestimmte für HGP typische Merkmale verloren gehen. Andererseits kann gerade dieser Effekt für bestimmte Fragestellungen genutzt werden. So zum Beispiel für die Frage, wie replikative Alterungsprozesse in HGP-Zellen den Phänotyp bestimmen und dann möglicherweise in HGP-TERT reversibel sind.

Durch die Immortalisierung war es möglich, die Lebensspanne von HGP-Fibroblasten um mindestens zehn PD-Zahlen zu verlängern und für biochemische Experimente in ausreichender Menge verfügbar zu machen. Die Länge der Telomere nach hTERT-Immortalisierung nahm im Vergleich zu nicht immortalisierten HGP-Fibroblasten signifikant zu [24].

Obwohl der Effekt der hTERT-Immortalisierung hier als sehr erfolgreich beschrieben werden kann und die Ergebnisse mit denen vorheriger Studien übereinstimmen, gibt es noch andere Faktoren, welche bei der Immortalisierung betrachtet werden müssen. Es konnte eine Verlängerung der Telomere nach Immortalisierung bestätigt werden, jedoch wurde die Aktivität der Telomerase in dieser Arbeit nicht untersucht. Man geht davon aus, dass die hTERT-Aktivität nicht nur von der katalytischen Untereinheit hTERT bestimmt wird, sondern durch viele weitere Faktoren, wie unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, Hormone und epigenetische Mechanismen (Methylierung, Acetylierung), beeinflusst werden kann [79, 81-83]. Weiterhin

können auch die Kulturbedingungen den Erfolg der Immortalisierung beeinflussen. So konnte man zum Beispiel bereits nachweisen, dass der Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft die Länge der Telomere beeinflusst, da Zellen, welche einem höheren oxidativen Stress ausgesetzt waren, auch kürzere Telomere aufwiesen [21, 25, 80].

Es fiel auf, dass immortalisierte Kontrollzellen gleich nach der Immortalisierung eine größere Verdopplungszeit aufwiesen als vor der Immortalisierung. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Immortalisierung mittels retroviraler Faktoren neben der Telomerverlängerung auch noch Effekte auf zellzyklusregulierende Prozesse hat (z.B. p53 oder p16/Rb). Mit steigenden Zellverdopplungszahlen der immortalisierten Kontrollzellen nahm die Teilungsrate wieder zu.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Immortalisierung von Zellen mittels viraler Transfektion der Telomerase einen Mechanismus darstellt, mit dem man die Lebensspanne sowohl von Kontrollfibroblasten als auch von HGP-Fibroblasten verlängern und somit die replikative Seneszenz umgehen kann. Damit war diese Methode hilfreich, um genügend Zellmaterial für biochemische Untersuchungen zur Verfügung zu stellen und die Prozesse des replikativen Alterns (durch den Vergleich von HGP und HGP-TERT-Zellen) zu untersuchen.

Diskrepanz der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit Affymetrix Microarrays und der Real-Time PCR

Microarrays gehören zu den am häufigsten verwendeten Technologien, mit denen ein genomweites Expressions-Profilierung möglich ist. Aufgrund des zunehmend hohen Nutzens von Genchips für die Medizin zur Analyse von Krankheiten und zur Generierung neuer therapeutischer Ansätze gibt es mittlerweile viele verschiedene Anbieter, welche eine Vielzahl von Technologien bereitstellen [84-85]. Um eine möglichst hohe Qualität der Expressionsergebnisse zur Identifikation von potentiellen Kandidatengen für einen „Telomer-Positions-Effekt“ (TPE) zu gewährleisten, wurden im Rahmen dieser Arbeit Genchips von Affymetrix (ausgewertet durch Dr. Reinhard Voss, Integrated Functional Genomics Universität Münster) eingesetzt, welche als meist verwendete und etablierteste Chips bekannt sind [86-88].

Durch den Vergleich der Genexpressionsprofile von HGP-Fibroblasten (als Modell für replikative Seneszenz), UV-B-Licht bestrahlten Fibroblasten (als Modell für telomer-unabhängige Seneszenz) und hTERT-Fibroblasten (als Modell für die Reversibilität der Telomerverkürzung) und durch die nach den festgelegten TPE-Kriterien durchgeführte schrittweise Eingrenzung der großen Menge von signifikant veränderten Genexpressionsmustern auf dem Affymetrix Chip ergaben sich vier potentielle TPE-Kandidatengene.

Eine exakte und gut etablierte Methode zur Validierung von Microarray Ergebnissen ist die Real-Time PCR. Sie besitzt eine höhere Sensitivität und Spezifität als die Microarrays und gilt daher als „Gold-Standard“ zur Validierung von Microarray Ergebnissen [89-92].

Deshalb wurde für die ausgewählten potentiellen TPE-Gene der Microarray Chips in einem nächsten Schritt die Real-Time PCR durchgeführt.

Analysiert wurden dabei insgesamt sieben Gene, um den Einfluss der Telomerlänge auf deren Expression näher zu untersuchen. Dabei erfüllten drei Gene die Kriterien zu 100%. Da der TPE durch die sehr komplexe Architektur der Telomere möglicherweise nicht allein von der Telomerlänge und dem Abstand der Gene zum Chromosomenende sondern auch von weiteren Faktoren (u.a. Bindungsproteine, heterochromatine Eigenschaften) beeinflusst wird, wurde die Real-Time PCR außerdem bei vier weiteren Genen durchgeführt. Diese entsprachen nicht

vollständig den festgelegten Kriterien, sondern wichen in jeweils einem Kriterium davon ab. Zu diesen Genen zählten: TRIM28 mit fehlender Reversibilität der Expression nach hTERT-Immortalisierung, MZF1 mit nicht gegensätzlicher Regulation bei den telomer-abhängigen und telomer-unabhängigen Seneszenzmodellen (HGP und UV-B bestrahlten Fibroblasten), UPF3A mit einem Abstand von 122.690 bp vom Chromosomenende sowie APOD mit einem Abstand von sogar ca. 2,7 Millionen bp vom Chromosomenende. Ein TPE wird nach gegenwärtigem Kenntnisstand (Untersuchungen an Hefen) nur telomernah erwartet (< 100.000 bp) [45-47]. Da APOD den anderen beiden Kriterien jedoch entsprach und in der Literatur bereits eine Rolle bei Alterungsprozessen nachgewiesen werden konnte, wurde APOD in dieser Arbeit trotz des weiten Abstandes vom Chromosomenende als potentielles TPE-Gen für die Real-Time PCR mit ausgewählt [93-95]. Alle gemessenen Kandidatengene spielen eine Rolle im Transkriptionszyklus, womit auch inhaltlich ein Zusammenhang mit TPE-Regulationsprozessen bestehen könnte.

Bei den Ergebnissen der Real-Time PCR wurden nicht nur immortalisierte und nicht-immortalisierte HGP- und Kontrollfibroblasten betrachtet, wie das bei den Microarrays der Fall war. Durch Kultivieren der Zellen über einen längeren Zeitraum konnten außerdem die Expressionswerte von jungen Zellen (niedrige Zellverdopplungszahlen und längere Telomere) und älteren Zellen (höhere Zellverdopplungszahlen und kürzere Telomere) verglichen werden.

Obwohl viele Studien hinsichtlich der Vergleichbarkeit von Microarray Ergebnissen mit Real-Time PCR Ergebnissen eine positive Korrelation zeigen und nur wenige auf Unstimmigkeiten zwischen beiden Methoden hinweisen [92, 96-99], konnten im Rahmen dieser Arbeit die Ergebnisse der Microarray Analysen mit Hilfe der Real-Time PCR nur für APOD bestätigt werden. Bei diesem zeigte sich eine signifikante Abnahme der Genexpression nach hTERT-Immortalisierung (und damit bei längeren Telomeren). Somit könnte APOD als eines der ersten Gene einen Hinweis auf die Abhängigkeit der Genregulation von der Telomerlänge beim Menschen unter *in vivo* Bedingungen geben. Bei allen anderen Genen konnte dieser aufgrund der Microarray Daten vermutete Effekt nicht bestätigt werden.

Da sich anders als erwartet die Microarray Ergebnisse bei der Mehrzahl der Gene nicht bestätigten, wurden mögliche Ursachen betrachtet. Diese sind im Folgenden zusammengefasst.

Aufgrund der Komplexität des Microarray Prozesses und der Vielzahl an parallel zu

messenden Genen ist die Gefahr von technischen sowie biologischen Störvariablen groß. Zu den biologischen Variablen gehören unter anderem die verwendeten Zellen und die Heterogenität der Gewebe unterschiedlicher Patienten sowie das Geschlecht der Zellen oder Temperaturunterschiede der verwendeten Inkubatoren. Die technischen Variablen können durch die Probenaufbereitung entstehen [84-85, 87-88, 91].

Zur Qualitätskontrolle verwendete Dr. R. Voss daher die Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS) und führte den Compound-Test durch, wobei sich eine hohe Qualität der Microarray Ergebnisse ergab. Daher ist dieser mögliche Bias für die Diskrepanz der Ergebnisse unwahrscheinlich [100].

Ein anderes Problem bei der Genexpressionsanalyse mittels Microarrays stellt die ständige Überarbeitung der NCBI Gendatenbanken dar. Während die Proben der Microarrays über Jahre die gleichen bleiben, entwickeln sich die Datenbanken durch das rasch zunehmende biologische Wissen enorm. Dies könnte bedeuten, dass aufgrund der Vielzahl der bereits bekannten Genvarianten der einzelnen Gene, die auf dem Microarray vorhandene Variante bei der Real-Time PCR möglicherweise durch die ausgewählten Primer nicht mehr erkannt und damit als falsch-negativ bewertet wurde [101].

Auch das Auftreten von Tagesschwankungen und biologischer Variabilität bei der Expression der untersuchten Gene, welche unter anderem durch Veränderungen im Zellstoffwechsel, Gewebs- oder Temperaturunterschiede auftreten, könnten als Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse betrachtet werden [102]. Zum Beispiel spielt die Zellkonfluenz gerade bei der Regulation von Wachstumsprozessen oft eine große Rolle und relativ geringe Unterschiede können zu deutlichen Änderungen in der Genexpression führen.

Aufgrund der in der Literatur mehrfach beschriebenen höheren Spezifität und Sensitivität sowie der guten Etablierung der Real-Time PCR zur Validierung von Microarray Ergebnissen wurden im Rahmen dieser Arbeit die Real-Time PCR Ergebnisse als die relevanteren betrachtet und für die weitere Auswertung zur Identifikation potentieller Kandidatengene herangezogen. Dabei muss jedoch auch auf eine oft fehlende Publizierung negativer Ergebnisse hingewiesen werden.

4.2 *Ist Apolipoprotein D ein mögliches TPE-Gen?*

Bei dem Apolipoprotein D (APOD) handelt es sich um ein Apolipoprotein, das vermutlich eine Rolle bei der Arterioskleroseentstehung und bei kardiovaskulären Erkrankungen spielt. Man geht davon aus, dass es durch posttranslationale N-Glykosylierungen zu einer Strukturänderung des APOD kommt, wodurch es in der Lage ist eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden zu binden [75]. Es ist eine Funktion bei antioxidativen sowie Antistress-Mechanismen beschrieben. Ein erhöhtes APOD wurde bei neurologischen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Schizophrenie beschrieben, und scheint einen neuroprotektiven Effekt auf Alterungsprozesse im ZNS von Mäusen zu haben [94-95,103]. Auch während des Alterungsprozesses des ZNS und bei der Alzheimer Demenz des Menschen wurde ein erhöhtes APOD nachgewiesen und es scheint im ZNS eine Rolle im Alterungsprozess zu spielen [104]. Bei Fruchtfliegen kam es durch eine Überexpression des humanen APOD zu einer vermehrten Resistenz gegenüber oxidativem Stress und sogar zu einer signifikanten Verlängerung der Lebensspanne von *Drosophila* [75].

APOD entsprach auf dem Microarray nur teilweise den im Rahmen dieser Arbeit festgelegten Kriterien eines potentiellen TPE-Gens: Es war in der Expression verändert (verstärkt exprimiert) bei HGP-Fibroblasten (als Modell für replikative Seneszenz), nicht jedoch in der Expression vermindert bei UV-B-Licht bestrahlten Fibroblasten (als Modell für telomer-unabhängiges Altern). Die Expressionserhöhung war teilweise reversibel nach hTERT-Immortalisierung und damit längeren Telomeren. Jedoch ist es mit ca. 2,7 Millionen bp deutlich weiter als 100.000 bp vom Chromosomenende entfernt und entspricht in diesem Punkt nicht dem nach Untersuchungen an Hefen bisher angenommenen Kriterium, nachdem nur sehr telomernah gelegene Gene (<100.000 bp) für einen TPE in Frage kommen [45-47,115].

Trotz des Abstandes von ca. 2,7 Millionen. bp vom Chromosomenende ließ sich beim APOD in vielen unabhängigen Experimenten eine telomerase-abhängige Unterdrückung der Genexpression nachweisen. Es kam nach Immortalisierung der Zellen mittels hTERT zu einer signifikanten Abnahme der Genexpression sowohl bei den HGP- als auch bei den Kontrollfibroblasten.

Diese Arbeit unterscheidet sich von den zuvor durchgeführten Studien zum TPE beim Menschen insofern, dass sie ein beim Menschen real existierendes Gen als mögliches TPE-Gen identifiziert hat.

BAUR et al. konnten als erste mit Hilfe eines artifiziell inserierten Gens Hinweise auf einen TPE beim Menschen liefern. Sie transfizierten Plasmide, welche einen Luciferase Reporter neben einer 1,6 kbp langen Telomersequenz enthielten, in Telomerase positive HeLa Adenokarzinomzellen. Dadurch kam es zu einer 2-10 fachen Abnahme der Luciferase Expression dieser Klone im Gegensatz zu jenen, welche den Luciferase Reporter telomerfern integriert hatten [52, 106]. Circa ein Jahr später zeigten KOERING et al. den nächsten Hinweis auf einen TPE beim Menschen, indem sie auf gleiche Art und Weise einen EGFP-Reporter in Cercixkarzinomzellen integrierten [53]. Damit wurde ein Grundstein in der Erforschung eines TPE als mögliches Seneszenzmodell beim Menschen gelegt und an vorherige Studien zum TPE bei *Saccharomyces cerevisiae* angeknüpft [39, 45, 107-108]. Somit könnte APOD hier eines der ersten real existierenden Gene mit einer Abhängigkeit der Genexpression von der Telomerlänge beim Menschen sein.

Parallel zu dieser Arbeit konnten LOU et al. für das interferon stimulated Gen 15 (ISG15) einen Hinweis auf einen TPE beim Menschen zeigen. Dabei handelt es sich um ein Ubiquitin-ähnliches Protein, welches in der Lage ist andere Proteine zu binden und dadurch deren Funktion zu beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Zunahme der Expression von ISG 15 proinflammatorische Zellprozesse fördert, was durch eine Aktivierung von $IFN\gamma$ bedingt ist. Es ist bekannt, dass inflammatorische Prozesse eine Rolle bei unterschiedlichen Stadien des physiologischen Alterungsprozesses spielen. Wie beim APOD liegt dieses Gen mit ca. 1 Millionen bp relativ weit vom Telomerende entfernt. Durch Immortalisierung von BJ-Fibroblasten konnte jedoch auch bei diesem Gen eine telomerlängen-abhängige Unterdrückung der Genexpression beschrieben werden [105].

Sowohl APOD als auch ISG15 zeigen nicht die klassische Definition eines TPE, wonach es zur Unterdrückung der Genexpression sehr telomernaher Gene kommt. Im Gegensatz dazu findet sich bei diesen eine isolierte Unterdrückung von Genen etwas weiter vom Telomerende entfernt, wobei weiter telomernah gelegene Gene, anders als erwartet, bei längeren Telomeren nicht verringert exprimiert werden.

Mögliche Gründe, warum auch ein etwas weiter vom Telomerende entferntes Gen wie APOD als mögliches TPE-Gen in Frage kommt, könnten durch die sehr komplexe und in sich verdrehte Struktur der Telomere in Form einer t-loop und die Vielzahl an DNA-Bindungsproteinen bedingt sein. Durch diese besondere Architektur könnte der die Expression unterdrückende Effekt der Telomere auch auf weiter vom Chromosomenende entfernt lokalisierte Gene wirken, wohingegen telomernaher gelegene Gene unbeeinflusst blieben. Weiterhin ist auch eine indirekte Regulation des APOD Gens durch andere telomernah gelegene Gene möglich. Dadurch unterscheiden sich diese Studien erheblich von anderen Studien, bei denen künstlich erzeugte und stark verkürzte Telomere verwendet wurden.

Auch Co-Variablen wie z. B. Zellkulturbedingungen (u.a. Schwankungen im Stoffwechsel der einzelnen Zellen) oder der Einfluss von DNA Damage Signalen (z. B. p53) sollten beim Nachweis der Telomerlänge auf die Unterdrückung der APOD Expression nach hTERT-Immortalisierung näher analysiert werden.

Im Zusammenhang mit ISG15 als mögliches TPE Gen beschrieben LOU et al. interessante Experimente, um einen TPE wahrscheinlicher zu machen. Sie demonstrierten anhand des Gens ISG15 die telomerlängen-abhängige Veränderung der Genexpression unabhängig von „DNA Damage Signalen“ wie p53 [105]. Ähnliche Experimente könnten auch zur Bestätigung des APOD als mögliches TPE Gen durchgeführt werden.

4.3 Ausblick: Warum ist es schwierig, einen TPE zu entdecken?

ROBERTSON G. et al. verdeutlichten bereits 1996 mit Hilfe von DNA Arrays, dass es während des Alterns von Zellen zu einer Vielzahl von Veränderungen in der Genexpression kommt [118]. Die Mehrzahl dieser Veränderungen entsteht dabei unabhängig von einem „Telomer-Positions-Effekt“ (TPE). Neben der Telomerlänge sollten dabei auch der Abstand der zu untersuchenden Gene vom Chromosomenende, die Heterochromatinstruktur, Telomerbindungsproteine oder Umweltfaktoren (z. B. Altern, Stress, Ernährung oder virale Infektionen) betrachtet werden [107,110].

Um weitere TPE-Kandidatengene zu identifizieren, könnten Cluster-Analysen signifikanter Expressionsveränderungen durchgeführt werden (HGP vs. HGP-TERT). Dabei handelt es sich um eine Gruppierung von ähnlichen Expressionsprofilen auf unterschiedlichen Chromosomenabständen. Demnach könnte ein TPE durch die spezielle Struktur der Telomere in Form einer t-loop einerseits und die sekundäre Verdrehung des gesamten Chromosoms in Form eines Knäuels andererseits dazu führen, dass die Telomere nicht nur einen Einfluss auf telomernahe sondern gegebenenfalls auch auf etwas weiter entfernte Gene in spezifischen Domänen haben [119-120].

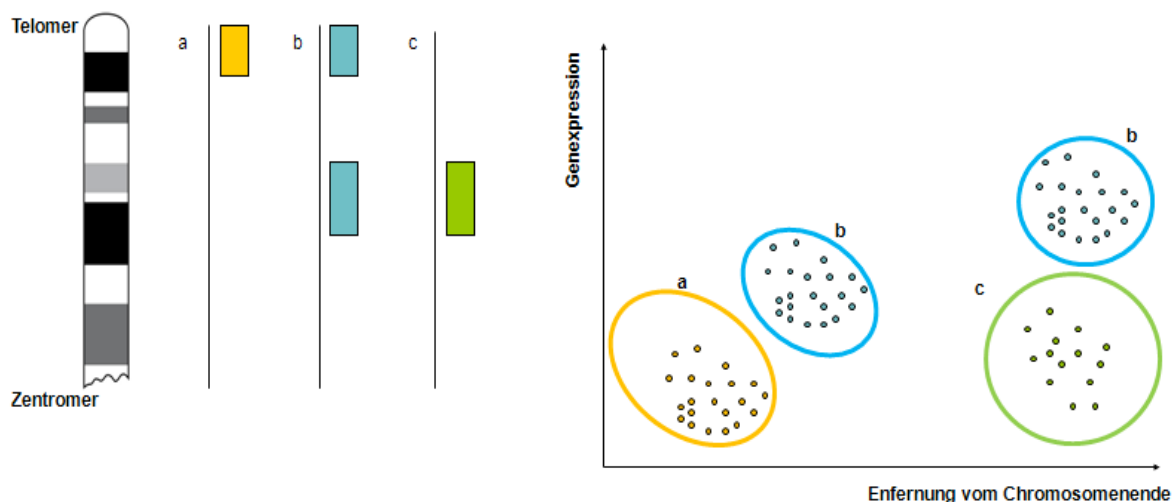


Abbildung 26: Schematische Darstellung einer Cluster-Analyse.

Möglicherweise können die Telomere durch ihre komplexe Struktur die Genexpression nicht nur (a) telomernah sondern auch auf (b) unterschiedlichen Abständen der Chromosomen oder (c) weiter vom Chromosomenende entfernt beeinflussen.

Der Einfluss epigenetischer Regulationen wie Methylierungen oder Deacetylierungen scheint die Unterdrückung der Genexpression telomernaher Gene zu beeinflussen [53, 55, 107]. So verhindert die Methylierung des Histon 3 an der Aminosäure Lysin 9 die Genexpression. Man geht dabei davon aus, dass Transkriptionsfaktoren aufgrund der Methylierungen nicht mehr in der Lage sind, an ihre DNA-Bindungsstellen anzudocken. Es gibt Hinweise darauf, dass DNA-Methylierungen nicht direkt die Genexpression unterdrücken, sondern eher im Zusammenhang mit diesen auftreten [109]. Außerdem ist eine Abnahme von Methylierungsmustern während der *in vitro* Kultivierung von Fibroblasten beschrieben [110-111].

Aufgrund der Annahme, dass Veränderungen in der Heterochromatinstruktur einen Einfluss auf den TPE beim Menschen haben, könnte weiterhin der Einfluss DNA interferierender Substanzen näher untersucht werden. Als mögliche Substanzen dienen dabei jene, die bei *S. cerevisiae* aber auch Säugetierzellen bereits einen Effekt auf den TPE gezeigt haben (z. B. Trichostatin A – Deacetylase Inhibitor, Sirtinol– Deacetylase Inhibitor, 5-AzaCyd – Methylase Inhibitor) [53, 106, 110-114].

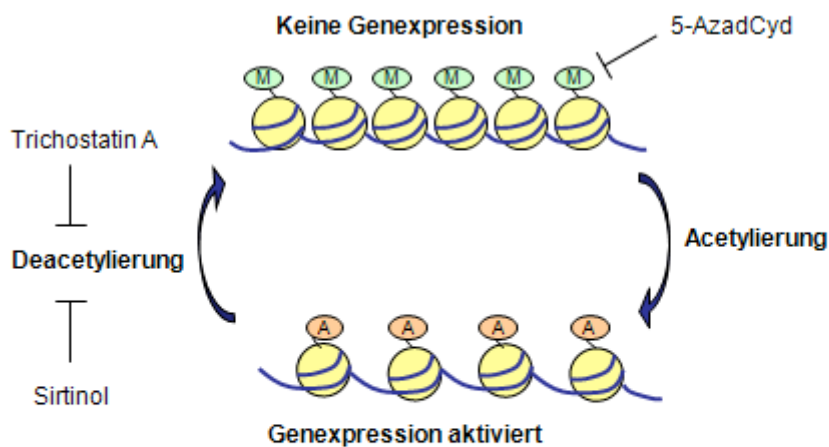


Abbildung 27: Die Beeinflussung der Genexpression durch Änderungen der Heterochromatinstruktur. M=Methylierung, A= Acetylierung

Weiterhin könnten telomerlängen-abhängige Funktionsanalysen jener Gene durchgeführt werden, denen bereits eine Rolle beim TPE zugeschrieben wird. Dazu wäre das im Rahmen dieser Arbeit als mögliches TPE Gen identifizierte Apolipoprotein D geeignet, bei dem sich eine telomerase-abhängige Unterdrückung der Genexpression zeigte.

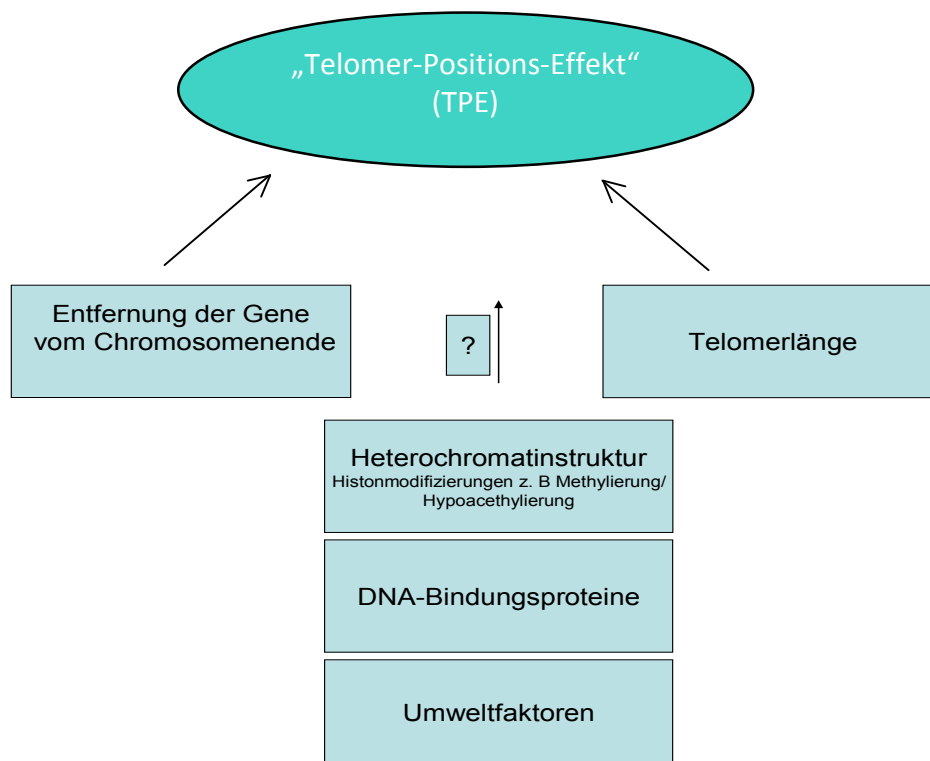


Abbildung 28: Der ‚Telomer-Positions-Effekt‘ (TPE) als komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Neben den in dieser Arbeit untersuchten Faktoren wie der Telomerlänge und der Entfernung der potentiellen TPE-Gene vom Chromosomenende spielen wahrscheinlich auch viele weitere Faktoren eine Rolle bei der Ausprägung des TPE.

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass neben den bereits untersuchten Faktoren wie der Telomerlänge und der Entfernung der potentiellen TPE-Gene vom Chromosomenende wahrscheinlich noch weitere Faktoren eine Rolle bei der Ausprägung des TPE spielen. Jedoch konnte ein erster Hinweis auf die Existenz einer telomerlängen-abhängigen Unterdrückung der Genexpression und somit auf einen möglichen TPE beim Menschen gefunden werden. Es ist davon auszugehen, dass der TPE zur Analyse weiterer genetischer Krankheiten in der Forschung auch in Zukunft eine Rolle spielen wird [113, 116-117].

5. Literaturverzeichnis

1. Shay, J.W. and W.E. Wright, *Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase*. Carcinogenesis, 2005. **26**(5): p. 867-74.
2. Baudisch, A., *Hamilton's indicators of the force of selection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8263-8.
3. Schmitz, S. and *Der Experimentator: Zellkultur*. Akademischer Verlag Heidelberg Vol. 2. 2009: Akademischer Verlag Heidelberg
4. Shay, J.W. and W.E. Wright, *Hallmarks of telomeres in ageing research*. J Pathol, 2007. **211**(2): p. 114-23.
5. Ishikawa, N., et al., *Accelerated in vivo epidermal telomere loss in Werner syndrome*. Aging (Albany NY), 2011. **3**(4): p. 417-29.
6. van Steensel, B., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions*. Cell, 1998. **92**(3): p. 401-13.
7. Hackett, J.A. and C.W. Greider, *Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis*. Oncogene, 2002. **21**(4): p. 619-26.
8. McClintock, B., *The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays*. Genetics, 1941. **26**(2): p. 234-82.
9. Pardue, M.L. and P.G. DeBaryshe, *Telomeres and telomerase: more than the end of the line*. Chromosoma, 1999. **108**(2): p. 73-82.
10. Makarov, V.L., Y. Hirose, and J.P. Langmore, *Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening*. Cell, 1997. **88**(5): p. 657-66.
11. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
12. Heinrich, L.P., *Biochemie und Pathobiochemie*. Vol. 8. 2007: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
13. Rahman, R., N.R. Forsyth, and W. Cui, *Telomeric 3'-overhang length is associated with the size of telomeres*. Exp Gerontol, 2008. **43**(4): p. 258-65.
14. Karlseder, J., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2446-9.
15. Moores, C.J., M. Fenech, and N.J. O'Callaghan, *Telomere dynamics: the influence of folate and DNA methylation*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1229**(1): p. 76-88.

16. Scheel, M., *Veränderungen des zellulären HDLStoffwechsels bei Stress-induzierter Seneszenz*. 2009, Universitätsklinikum Münster Zentrum für Laboratoriumsmedizin: Münster.
17. Palm, W. and T. de Lange, *How shelterin protects mammalian telomeres*. *Annu Rev Genet*, 2008. **42**: p. 301-34.
18. Iwano, T., et al., *Importance of TRF1 for functional telomere structure*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(2): p. 1442-8.
19. Zou, Y., et al., *Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence?* *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(8): p. 3709-18.
20. Savage, S., *Gene Discovery And Diagnostic Tools*. *Linkage*, 2008. **32**(March 2008).
21. Yang, J., et al., *Human endothelial cell life extension by telomerase expression*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(37): p. 26141-8.
22. Bieche, I., et al., *Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(2): p. 452-9.
23. Shay, J.W. and W.E. Wright, *The use of telomerized cells for tissue engineering*. *Nat Biotechnol*, 2000. **18**(1): p. 22-3.
24. Ouellette, M.M., et al., *The establishment of telomerase-immortalized cell lines representing human chromosome instability syndromes*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(3): p. 403-11.
25. Forsyth, N.R., et al., *Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase*. *Aging Cell*, 2003. **2**(5): p. 235-43.
26. Zou, Y., et al., *Human telomerase can immortalize Indian muntjac cells*. *Exp Cell Res*, 2002. **281**(1): p. 63-76.
27. Herbig, U., et al., *Cellular senescence in aging primates*. *Science*, 2006. **311**(5765): p. 1257.
28. Lloyd, A.C., *Limits to lifespan*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(2): p. E25-7.
29. Ramirez, R.D., et al., *Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions*. *Genes Dev*, 2001. **15**(4): p. 398-403.
30. Volonte, D. and F. Galbiati, *Polymerase I and Transcript Release Factor (PTRF)/Cavin-1 Is a Novel Regulator of Stress-induced Premature Senescence*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(33): p. 28657-61.
31. Gorbunova, V., A. Seluanov, and O.M. Pereira-Smith, *Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but*

- protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis.* J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38540-9.
32. Rodier, F. and J. Campisi, *Four faces of cellular senescence.* J Cell Biol, 2011. **192**(4): p. 547-56.
33. d'Adda di Fagagna, F., et al., *A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence.* Nature, 2003. **426**(6963): p. 194-8.
34. Dimri, G.P., *What has senescence got to do with cancer?* Cancer Cell, 2005. **7**(6): p. 505-12.
35. Feng, Z., M. Lin, and R. Wu, *The Regulation of Aging and Longevity: A New and Complex Role of p53.* Genes Cancer, 2011. **2**(4): p. 443-52.
36. Nyberg, K.A., et al., *Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints.* Annu Rev Genet, 2002. **36**: p. 617-56.
37. Beausejour, C.M., et al., *Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways.* EMBO J, 2003. **22**(16): p. 4212-22.
38. Campisi, J., *Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act!* Mech Ageing Dev, 2005. **126**(1): p. 51-8.
39. Ottaviani, A., E. Gilson, and F. Magdinier, *Telomeric position effect: from the yeast paradigm to human pathologies?* Biochimie, 2008. **90**(1): p. 93-107.
40. Gehring, W.J., et al., *Functional analysis of the white gene of Drosophila by P-factor-mediated transformation.* EMBO J, 1984. **3**(9): p. 2077-85.
41. Hazelrigg, T., R. Levis, and G.M. Rubin, *Transformation of white locus DNA in drosophila: dosage compensation, zeste interaction, and position effects.* Cell, 1984. **36**(2): p. 469-81.
42. McCord, R.A. and D. Broccoli, *Telomeric chromatin: roles in aging, cancer and hereditary disease.* Mutat Res, 2008. **647**(1-2): p. 86-93.
43. Mason, J.M., et al., *Control of telomere elongation and telomeric silencing in Drosophila melanogaster.* Genetica, 2000. **109**(1-2): p. 61-70.
44. Mason, J.M., et al., *Cis- and trans-acting influences on telomeric position effect in Drosophila melanogaster detected with a subterminal transgene.* Genetics, 2003. **163**(3): p. 917-30.
45. Tham, W.H. and V.A. Zakian, *Transcriptional silencing at Saccharomyces telomeres: implications for other organisms.* Oncogene, 2002. **21**(4): p. 512-21.
46. Gottschling, D.E., et al., *Position effect at S. cerevisiae telomeres: reversible repression of Pol II transcription.* Cell, 1990. **63**(4): p. 751-62.

47. Sandell, L.L., D.E. Gottschling, and V.A. Zakian, *Transcription of a yeast telomere alleviates telomere position effect without affecting chromosome stability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 12061-5.
48. Renauld, H., et al., *Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and by SIR3 dosage*. Genes Dev, 1993. **7**(7A): p. 1133-45.
49. Hoppe, G.J., et al., *Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(12): p. 4167-80.
50. Sprung, C.N., L. Sabatier, and J.P. Murnane, *Effect of telomere length on telomeric gene expression*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(21): p. 4336-40.
51. Bayne, R.A., et al., *Sandwiching of a gene within 12 kb of a functional telomere and alpha satellite does not result in silencing*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(4): p. 539-46.
52. Baur, J.A., et al., *Telomere position effect in human cells*. Science, 2001. **292**(5524): p. 2075-7.
53. Koering, C.E., et al., *Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity*. EMBO Rep, 2002. **3**(11): p. 1055-61.
54. de Lange, T., *Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres*. Genes Dev, 2005. **19**(18): p. 2100-10.
55. Ning, Y., et al., *Telomere length and the expression of natural telomeric genes in human fibroblasts*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(11): p. 1329-36.
56. Hennekam, R.C., *Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(23): p. 2603-24.
57. Harten, I.A., et al., *Age-Dependent Loss of MMP-3 in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2011.
58. Mazereeuw-Hautier, J., et al., *Hutchinson-Gilford progeria syndrome: clinical findings in three patients carrying the G608G mutation in LMNA and review of the literature*. Br J Dermatol, 2007. **156**(6): p. 1308-14.
59. Mehta, I.S., et al., *Farnesyltransferase inhibitor treatment restores chromosome territory positions and active chromosome dynamics in Hutchinson-Gilford Progeria syndrome cells*. Genome Biol, 2011. **12**(8): p. R74.
60. Pollex, R.L. and R.A. Hegele, *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. Clin Genet, 2004. **66**(5): p. 375-81.
61. Reddy, S. and L. Comai, *Lamin A, farnesylation and aging*. Exp Cell Res, 2011.

62. Blagosklonny, M.V., *Progeria, rapamycin and normal aging: recent breakthrough*. Aging (Albany NY), 2011.
63. Bilitewski, U., *DNA microarrays: an introduction to the technology*. Methods Mol Biol, 2009. **509**: p. 1-14.
64. Staal, F.J., et al., *DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers*. Leukemia, 2003. **17**(7): p. 1324-32.
65. Lührs, P., *Konstruktion und Charakterisierung eines neuartigen retroviralen Vektors für die Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen*. 2000, Universität Hamburg.
66. Treichel, U., *Analyse isolierter, individueller Tumorzellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms auf Mutationen im mdm2-Gen-Lokus*. Dissertation, in Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie. 2004, Freie Universität Berlin: Berlin. p. 98.
67. Cawthon, R.M., *Telomere measurement by quantitative PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(10): p. e47.
68. Cawthon, R.M., *Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(3): p. e21.
69. Anna, *Doktorarbeit*.
70. Zhao, Y., et al., *Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells*. Cell, 2009. **138**(3): p. 463-75.
71. Dominguez-Gerpe, L. and D. Araujo-Vilar, *Prematurely aged children: molecular alterations leading to Hutchinson-Gilford progeria and Werner syndromes*. Curr Aging Sci, 2008. **1**(3): p. 202-12.
72. Ding, S.L. and C.Y. Shen, *Model of human aging: recent findings on Werner's and Hutchinson-Gilford progeria syndromes*. Clin Interv Aging, 2008. **3**(3): p. 431-44.
73. Li, Q., et al., *Jetset: selecting the optimal microarray probe set to represent a gene*. BMC Bioinformatics, 2011. **12**: p. 474.
74. Carter, S.L., et al., *Redefinition of Affymetrix probe sets by sequence overlap with cDNA microarray probes reduces cross-platform inconsistencies in cancer-associated gene expression measurements*. BMC Bioinformatics, 2005. **6**: p. 107.
75. Perdomo, G. and H. Henry Dong, *Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(1): p. 17-27.
76. Meeker, A.K., et al., *Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3317-26.

77. Farazi, P.A., et al., *Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res*, 2003. **63**(16): p. 5021-7.
78. Rudolph, K.L., et al., *Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans*. *Nat Genet*, 2001. **28**(2): p. 155-9.
79. Daniel, M., G.W. Peek, and T.O. Tollefsbol, *Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT)*. *Gene*, 2012.
80. Fu, B., J. Quintero, and C.C. Baker, *Keratinocyte growth conditions modulate telomerase expression, senescence, and immortalization by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes*. *Cancer Res*, 2003. **63**(22): p. 7815-24.
81. Horikawa, I. and J.C. Barrett, *Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms*. *Carcinogenesis*, 2003. **24**(7): p. 1167-76.
82. Kyo, S., et al., *Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers*. *Cancer Sci*, 2008. **99**(8): p. 1528-38.
83. Nicholls, C., et al., *Molecular regulation of telomerase activity in aging*. *Protein Cell*, 2011. **2**(9): p. 726-38.
84. Barrett, J.C. and E.S. Kawasaki, *Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression*. *Drug Discov Today*, 2003. **8**(3): p. 134-41.
85. Chen, J.J., et al., *Reproducibility of microarray data: a further analysis of microarray quality control (MAQC) data*. *BMC Bioinformatics*, 2007. **8**: p. 412.
86. Auer, H., D.L. Newsom, and K. Kornacker, *Expression Profiling Using Affymetrix GeneChip Microarrays*. *Methods Mol Biol*, 2009. **509**: p. 35-46.
87. Lockhart, D.J., et al., *Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays*. *Nat Biotechnol*, 1996. **14**(13): p. 1675-80.
88. Walker, S.J., et al., *Long versus short oligonucleotide microarrays for the study of gene expression in nonhuman primates*. *J Neurosci Methods*, 2006. **152**(1-2): p. 179-89.
89. Kurrasch, D.M., et al., *Quantitative real-time polymerase chain reaction measurement of regulators of G-protein signaling mRNA levels in mouse tissues*. *Methods Enzymol*, 2004. **389**: p. 3-15.
90. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, and W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. *Biotechniques*, 2008. **44**(5): p. 619-26.
91. Git, A., et al., *Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression*. *RNA*, 2010. **16**(5): p. 991-1006.

92. Chen, Y., et al., *Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 407.
93. Bajo-Graneras, R., et al., *Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum*. J Neurochem, 2011. **117**(6): p. 949-60.
94. Do Carmo, S., et al., *Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice*. J Neurosci, 2008. **28**(41): p. 10330-8.
95. Martinez, E., et al., *Amyloid-beta25-35 Induces Apolipoprotein D Synthesis and Growth Arrest in HT22 Hippocampal Cells*. J Alzheimers Dis, 2012.
96. Ach, R.A., H. Wang, and B. Curry, *Measuring microRNAs: comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods*. BMC Biotechnol, 2008. **8**: p. 69.
97. Arikawa, E., et al., *Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 328.
98. Morey, J.S., J.C. Ryan, and F.M. Van Dolah, *Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR*. Biol Proced Online, 2006. **8**: p. 175-93.
99. Lopes, A.M., et al., *Transcriptional changes in response to X chromosome dosage in the mouse: implications for X inactivation and the molecular basis of Turner Syndrome*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 82.
100. Heber, S. and B. Sick, *Quality assessment of Affymetrix GeneChip data*. OMICS, 2006. **10**(3): p. 358-68.
101. Gautier, L., et al., *Alternative mapping of probes to genes for Affymetrix chips*. BMC Bioinformatics, 2004. **5**: p. 111.
102. Larkin, J.E., et al., *Independence and reproducibility across microarray platforms*. Nat Methods, 2005. **2**(5): p. 337-44.
103. Perez, C., et al., *Age-related changes of apolipoprotein D expression in female rat central nervous system with chronic estradiol treatment*. Age (Dordr), 2011.
104. Ordonez, C., et al., *Gender differences in apolipoprotein D expression during aging and in Alzheimer disease*. Neurobiol Aging, 2012. **33**(2): p. 433 e11-20.
105. Lou, Z., et al., *Telomere length regulates ISG15 expression in human cells*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(7): p. 608-21.
106. Wood, J.G. and D.A. Sinclair, *TPE or not TPE? It's no longer a question*. Trends

- Pharmacol Sci, 2002. **23**(1): p. 1-4.
107. Mazor, Y. and M. Kupiec, *Developmentally regulated MAPK pathways modulate heterochromatin in Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(14): p. 4839-49.
108. Rossmann, M.P., et al., *A common telomeric gene silencing assay is affected by nucleotide metabolism*. Mol Cell, 2011. **42**(1): p. 127-36.
109. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
110. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet, 2003. **33 Suppl**: p. 245-54.
111. Marks, P.A., et al., *Histone deacetylase inhibitors*. Adv Cancer Res, 2004. **91**: p. 137-68.
112. Juttermann, R., E. Li, and R. Jaenisch, *Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 11797-801.
113. Pedram, M., et al., *Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(5): p. 1865-78.
114. Gao, Q., et al., *Telomeric transgenes are silenced in adult mouse tissues and embryo fibroblasts but are expressed in embryonic stem cells*. Stem Cells, 2007. **25**(12): p. 3085-92.
115. Kulkarni, A., et al., *Effect of telomere proximity on telomere position effect, chromosome healing, and sensitivity to DNA double-strand breaks in a human tumor cell line*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(3): p. 578-89.
116. Jalal, S.M., et al., *Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients*. Genet Med, 2003. **5**(1): p. 28-34.
117. von Figura, G., et al., *Role of telomere dysfunction in aging and its detection by biomarkers*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(12): p. 1165-71.
118. Robertson, G., et al., *Age-dependent silencing of globin transgenes in the mouse*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(8): p. 1465-71.
119. Eisen, M.B., et al., *Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14863-8.
120. Datta, S., *Evaluation of clustering algorithms for gene expression data*. BMC Bioinformatics, 2006. **7 Suppl 4**: p. S17.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des konventionellen und des überarbeiteten Modells der Telomerverkürzung.	10
Abbildung 2: Telomer-Bindungsproteine: Der Shelterin-Komplex. Nach [20]	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktion der Telomerase.....	12
Abbildung 4: Signalwege in die Seneszenz.	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Struktur (a) natürlicher und (b) verkürzter Telomere von <i>S. cerevisiae</i>	18
Abbildung 6: Telomerbindungsproteine und deren Einfluss auf einen möglichen TPE bei intakten Telomeren.	20
Abbildung 7: Der Mechanismus eines möglichen Telomer Positions Effektes (TPE) beim Menschen.....	23
Abbildung 8: Arbeitsschema der Zellkultur. T25 (25 cm ²) T75 (75c m ²)	33
Abbildung 9: Darstellung der Wachstumskurven der (A) primären gesunden humanen Hautfibroblasten) sowie der (B) immortalisierten gesunden humanen Hautfibroblasten.	48
Abbildung 10: Darstellung der Anzahl der zur Zellverdopplung benötigten Tage bei (A) nicht-immortalisierten und (B) immortalisierten Kontroll-Fibroblasten zu unterschiedlichen Zellverdopplungszahlen (PD = Population Doubling).....	49
Abbildung 11: Darstellung der Wachstumskurven der (A) primären HGP-Fibroblasten sowie der (B) immortalisierten HGP-Fibroblasten.	52
Abbildung 12: Darstellung der Anzahl der zur Zellverdopplung benötigten Tage bei (A) nicht-immortalisierten und (B) immortalisierten HGP-Fibroblasten zu unterschiedlichen Zellverdopplungszahlen (PD = Population Doubling).....	53
Abbildung 13: Darstellung der relativen Telomerlänge in Abhängigkeit von der Zellverdopplungszahl	55
Abbildung 14: Darstellung der relativen Telomerlänge in Abhängigkeit von der Zellverdopplungszahl (PD = Population Doubling) bei (A) nicht-immortalisierten und (B) immortalisierten HGP-Fibroblasten.	56
Abbildung 15: Auf mRNA-Ebene vermindert exprimierte Gene bei Hutchinson-Gilford Progeria- Fibroblasten und UV-B-Licht bestrahlten Fibroblasten.	58
Abbildung 16: Auf mRNA-Ebene vermehrt exprimierte Gene bei Hutchinson-Gilford Progeria- Fibroblasten und UV-B-Licht bestrahlten Fibroblasten.	59

Abbildung 17: Sukzessive Eingrenzung der auf dem Microarray signifikant expremierten Gene zur Identifikation von TPE-Kandidatengenem.	60
Abbildung 18: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen <u>PRMT2</u>	64
Abbildung 19: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen <u>ZNF268</u>	65
Abbildung 20: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen <u>ZNF828</u>	66
Abbildung 21: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen <u>UPF3A</u>	67
Abbildung 22: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen <u>TRIM28</u>	68
Abbildung 23: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen <u>MZF1</u>	69
Abbildung 24: Darstellung der relativen Expressionsraten für das Gen <u>APOD</u>	71
Abbildung 25: Verhältnis der Genexpression zur Telomerlänge potentieller TPE-Gene.	73
Abbildung 26: Schematische Darstellung einer Cluster-Analyse.	84
Abbildung 27: Die Beeinflussung der Genexpression durch Änderungen der Heterochromatinstruktur.	85
Abbildung 28: Der „Telomer-Positions-Effekt“ (TPE) als komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren.	86

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auf den Genchips untersuchte Zelllinien.....	30
Tabelle 2: Für die Real-Time PCR verwendete Zelllinien.....	35
Tabelle 3: TaqMan Assays der untersuchten potentiellen TPE-Gene.....	40
Tabelle 4: PCR-Thermalprofil.....	42
Tabelle 5: Primersequenzen.....	43
Tabelle 6: Angabe der Zellverdopplungszahlen (PD = Population Doubling) der nicht-immortalisierten und der immortalisierten gesunden humanen Hautfibroblasten zu Beginn der Zellkultur und bei Eintritt in die Seneszenz.....	47
Tabelle 7: Angabe der Zellverdopplungszahlen (PD = Population Doubling) der nicht-immortalisierten und der immortalisierten HGP-Fibroblasten zu Beginn der Zellkultur und bei Eintritt in die Seneszenz.....	50
Tabelle 8: Darstellung der potentiellen Kandidatengene, die nach sukzessiver Eingrenzung die festgelegten Kriterien für einen potentiellen TPE erfüllten, und der mit dem Genchip ermittelten Veränderung der relativen Genexpression gegenüber der Kontrolle (fold change).....	61
Tabelle 9: Erweiterte Auswahl potentieller Kandidatengene zur Identifizierung eines „Telomer-Positions-Effektes“ (TPE). und Darstellung der mit dem Genchip ermittelten Veränderung der relativen Genexpression gegenüber der Kontrolle (fold change).....	63
Tabelle 10: Apolipoprotein D (APOD) als potentielles Kandidatengen für einen „Telomer-Positions-Effektes“(TPE).	70

8. Anhang

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Vera Schulz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Identifizierung von Kandidatengeneten für einen „Telomer-Positions-Effekt“ beim Hutchinson-Gilford-Progerie Syndrom“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum:

Unterschrift:

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Michael Walter angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Michael Walter für die Vergabe des interessanten Themas und die wertvolle Unterstützung, die er mir bei der Fertigstellung meiner Arbeit zuteil werden ließ. Insbesondere danke ich ihm für die ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen konstruktiven Ratschläge.

Dr. rer. medic. Kerstin Gorzelniak danke ich für die stetige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, die den fortwährenden regen Gedankenaustausch sowie die Bereitschaft zum Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. med. Rudolf Tauber bedanke ich mich für die Aufnahme an das Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der medizinischen Fakultät der Charité.

Ich danke Dr. rer. nat. Reinhard Voss vom Institut für Laboratoriumsmedizin der Universität Münster, der die Auswertungen der Microarray GenChips zur Verfügung stellte.

Dr. Pim van der Harst vom University Medical Center Groningen und Janine Reunert danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Telomerlängenmessungen und der Immortalisierung.

Prof. Dr. Woody Wright von der UTSW Medical School Dallas danke ich für die Bereitstellung der Viruskonstrukte für die Immortalisierung der Zellen.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Kollegen und Kolleginnen des Instituts für die Aufnahme in das Team, das gute Arbeitsklima sowie die ständige Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden, die mir die gesamte Zeit über mit ihrer Liebe und ihrem Verständnis zur Seite standen. Dabei danke ich besonders meiner Schwester Maria, die mir mit ihren wertvollen Ratschlägen jederzeit zur Seite stand.