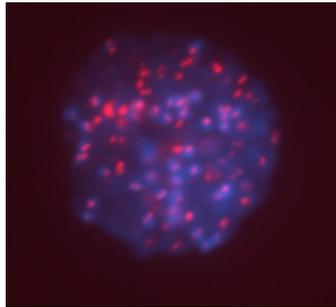


Telomerlängenregulation während der Embryogenese



Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover

Zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. biol. Sonja Schätzlein

geboren am 03. April 1977 in Mainz

2004

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Koreferent: PD Dr. med. KL Rudolph

Tag der Promotion: 10. Dezember 2004

Meinen Eltern

**When you have eliminated the impossible, whatever remains, however improbable,
must be the truth.**

Sherlock Holmes

ZUSAMMENFASSUNG

Telomere erfüllen als Nukleo-Protein Komplexe an den Enden eukaryotischer Chromosomen die Aufgabe Fusionen und Chromosomale Instabilität zu verhindern, und damit die Proliferationsfähigkeit und das Überleben von Zellen zu erhalten. Aufgrund des Endreplikationsproblems der DNA-Polymerase kommt es während jeder Zellteilung zu Telomerverkürzung.

Das Holo-Enzym Telomerase kann Telomerenden *de novo* synthetisieren, ist aber im Menschen nur während der Embryogenese, in unreifen Keimzellen und einigen Stamm- bzw. Progenitorzellen exprimiert. Der Prozess der Telomerverlängerung wird von einer Vielzahl verschiedener Proteine reguliert, die die Bindung und Aktivität der Telomerase am Telomer beeinflussen. Während der Embryogenese kommt es zu einer starken Aktivierung der Telomerase am Morula-Blastozysten-Übergang.

Mit Hilfe von quantitativer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (Q-FISH) wurden Telomerlängen geklonter und natürlich gezeugter boviner und muriner Embryonen am Morula-Blastozysten-Übergang untersucht. Telomerlängen adulter geklonter und natürlich fertilisierter Rinder wurden mittels Southern Blot analysiert. Die Untersuchungen zeigten, dass Telomere am Morula-Blastozysten-Übergang in Rindern und Mäusen verlängert werden. Bovine Embryonen, die mittels fetaler oder adulter Fibroblasten geklont wurden, weisen am Morula-Stadium kürzere Telomere auf als *in vitro* bzw. *in vivo* fertilisierte Embryonen. Dieser Unterschied wird in geklonten Embryonen unabhängig von der Telomerlänge der Donorzellen am Morula-Blastozysten-Übergang kompensiert, resultierend in normaler Telomerlänge im Blastozysten-Stadium und in adulten Tieren. Unsere Studien zeigen, dass die embryonale Telomerverlängerung Telomerase-abhängig ist, da es in mTERC^{-/-}-Mäusen zu keiner Telomerverlängerung während der Embryogenese kam. Zusätzliche mRNA-Expressionsstudien zeigten eine Regulation Telomer-bindender Proteine in der frühen Embryogenese in Mäusen, was eine Beteiligung dieser Proteine am embryonalen Telomerverlängerungs-Programm vermuten lässt.

Zusammengefasst zeigten unsere Studien erstmals, dass es während der frühen Säugerembryogenese zu einer Telomerase-abhängigen Telomerverlängerung kommt. Dieses Programm könnte von Bedeutung sein, um ausreichend Telomer-Reserven für nachfolgende Entwicklung und postnatale Regenerationsprozesse zu gewährleisten. Die weitere molekulare und funktionelle Analyse dieses identifizierten embryonalen Telomerverlängerungs-Programms könnte neue Ziele für regenerative Therapien, Zelltransplantation und therapeutisches Klonen identifizieren.

Schlagworte: Telomerlänge, Regulation, Embryogenese

SUMMARY

Telomeres are nucleo-protein complexes at the end of eukaryotic chromosomes that protect against chromosomal fusions and chromosomal instability, thereby maintaining the regenerative capacity of cells. Due to the end-replication problem of DNA-polymerase, telomeres shorten during each cell division.

The holo-enzyme telomerase synthesizes telomere ends *de novo*, but in humans its activity is restricted to embryogenesis, immature germ cells and a subset of stem/progenitor cells. This process appears to be regulated by a variety of telomere binding proteins that control telomerase recruitment and telomerase activity at the telomeres. During embryogenesis telomerase is strongly activated at the morula/blastocyste transition.

Using quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH) telomere length was analyzed at the morula and blastocyste stage of bovine and murine embryogenesis. In addition, telomeres were measured by Southern blotting in blood cells and earbiopsies of born cattle derived from natural breeding, *in vitro* fertilization or cloning, by the use of embryonic and somatic nuclear transfer. Our studies demonstrate that telomeres are elongated at the transition from morula to blastocyst in mice and cattle. Bovine embryos derived from cloning by the use of fetal or adult fibroblasts showed significantly shorter telomeres early during embryogenesis, at the morula stage, compared to embryos derived from natural breeding or *in vitro* fertilization. This difference was restored in cloned bovine embryos, regardless of the telomere length of donor nuclei, resulting in normal telomere length at the blastocyste stage in adult cattle. Our studies show that telomere elongation during embryogenesis is telomerase dependent, since it was abrogated in telomerase deficient mice. Additional studies on mRNA expression of different telomere binding proteins show a tight regulation of these proteins during early embryogenesis indicating that these factors might participate in regulatory telomere elongation at the morula-blastocyste transition.

Together these data give first experimental evidence that early mammalian embryos have a telomerase dependent genetic program that elongates telomeres to a defined length at the morula-blastocyste transition. This program could have a possible role in ensuring sufficient telomere reserves for species integrity. The further molecular analysis of this telomere elongation program could identify new targets for regenerative medicine, cell therapies and therapeutic cloning.

Keywords: telomere length, regulation, embryogenesis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1. EINLEITUNG	3
1.1 TELOMERE	3
1.2 TELOMER-BINDENDE PROTEINE	4
1.3 TELOMERASE	6
1.4 DAS DNA-END-REPLIKATIONS PROBLEM	8
1.5 TELOMERLÄNGE WÄHREND DER ALTERUNG	9
1.6 TELOMERLÄNGEN IN GEKLONTEN TIEREN	10
1.7 TELOMERASE- UND TELOMERLÄNGEN-REGULATION WÄHREND DER EMBRYOGENESE	13
1.8 ZIEL DER ARBEIT	15
2. MATERIAL & METHODEN	16
2.1 ALLGEMEINE MATERIALIEN	16
2.1.1 CHEMIKALIEN UND GERÄTE	16
2.1.2 ENZYME	19
2.1.3 ANTIKÖRPER	19
2.1.4 MOLEKULARGEWICHTSTANDARDS	19
2.1.5 PLASMIDE	20
2.1.6 KITS	20
2.1.7 OLIGONUKLEOTIDE	21
2.1.8 PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN	21
2.1.9 HUMANE ZELLEN	22
2.1.10 VERSUCHSTIERE	23
2.2 MOLEKULARGENETISCHE METHODEN	24
2.2.1 KOMPETENTE BAKTERIEN UND TRANSFORMATION	24
2.2.2 VERMEHRUNG TRANSFORMIERTER BAKTERIEN	24
2.2.3 PLASMIDISOLIERUNG MITTELS MINIPRÄP	25
2.2.4 MAXI-PLASMIDPRÄPARATION	25
2.2.5 KONSERVIERUNG VON BAKTERIENSTÄMMEN	26
2.2.6 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	26
2.2.7 DNA-GELELEKTROPHORESE	27
2.2.8 RESTRIKTIONSVERDAU	27
2.2.9 HERSTELLEN DES GELS UND GELLAUF	28
2.2.10 POLY-ACRYLAMID GEL ELEKTROPHORESE (PAGE)	28
2.2.11 EXTRAKTION DER DNA AUS DEM GEL	29

2.2.12	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	29
2.2.13	PHENOL/CHLOROFORM-EXTRAKTION VON NUKLEINSÄUREN	30
2.2.14	NUKLEINSÄUREPRÄZIPITATION MIT ETHANOL	31
2.2.15	AUFREINIGUNG VON DNA	31
2.2.16	GENOTYPISIERUNG MITTELS PCR	31
2.2.17	PCR MIT RNA (RT-PCR)	32
2.2.18	QUANTITATIVE RT-PCR	32
2.2.19	HERSTELLUNG DER DOT BLOTS	34
2.2.20	RADIOAKTIVE MARKIERUNG DER CDNA-SONDEN	34
2.2.21	HYBRIDISIERUNG DER DOT BLOTS MIT RADIO MARKIERTEN CDNA-SONDEN	35
2.2.22	DNA-SEQUENZIERUNG	36
2.2.23	SEQUENZAUSWERTUNG AM COMPUTER	36
2.3	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	37
2.3.1	GEWINNUNG VON MAUSEMBRYONEN	37
2.3.2	<i>IN VIVO</i> PRODUKTION (IVP) BOVINER EMBRYONEN	37
2.3.3	<i>IN VIVO</i> PRODUKTION (IVP) BOVINER EMBRYONEN	38
2.3.4	GEWINNUNG VON EMBRYONEN MITTELS NUKLEÄR-TRANSFER (NT)	38
2.4	HISTOLOGISCHE METHODEN	39
2.4.1	DAPI-FÄRBUNG	39
2.4.2	IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON TRF1 UND EST1A	39
2.5	SONDENMARKIERUNG	39
2.6	TELOMERLÄNGENBESTIMMUNG	40
2.6.1	QUANTITATIVE FLUORESCENZ <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG (Q-FISH)	40
2.6.2	SOUTHERN BLOT	41
2.7	BESTIMMUNG DER TELOMERASEAKTIVITÄT MITTELS TRAP-ASSAY	42
2.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG	44
3.	<u>ERGEBNISSE</u>	45
3.1	TELOMERLÄNGENANALYSE DER SPENDERZELLEN:	45
3.2	TELOMERLÄNGENANALYSE VON BOVINEN MORULAE	47
3.3	TELOMERLÄNGENANALYSE VON BOVINEN BLASTOZYSTEN	49
3.4	TELOMERLÄNGEN IN ADULTEN GEKLONTEN UND NICHT GEKLONTEN RINDERN	53
3.5	TELOMERLÄNGEN IN WILDTYP-MAUSEMBRYONEN AM MORULA-BLASTOZYSTEN- ÜBERGANG	57
3.6	TELOMERLÄNGEN IN WILDTYP-MAUSEMBRYONEN ZU SPÄTEREN ZEITPUNKTEN DER EMBRYOGENESE	60

3.7	ANALYSE DER EXPRESSION TELOMER-BINDENDER PROTEINE IN DER MAUSEMBRYOGENESE	61
4.	<u>DISKUSSION</u>	65
5.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	74
6.	<u>LEBENS LAUF</u>	84
7.	<u>DANKSAGUNG</u>	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

β-gal	β-Galaktosidase
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
Cpm	counts per minute
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
FCS	Fetal Calf Serum
Fibrobl.	Fibroblasten
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HZ	Hepatozyten
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
LB	Luria Broth
MCS	Multiple Cloning Site
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NEB	New England Biolabs

O.D.	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline = phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Rotations per Minute = Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfate = Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SZ	Stellatzellen
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TERC	Telomerase RNA Komponente
TERT	Telomerase reverse Transkriptase
TFI	Telomer Fluoreszenz Intensität
TRF	Telomere Restriction Fragment
TRF1 und TRF2	TTAGGG repeat binding factor 1 und 2
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units = Mengenangabe bei Enzymen
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Weight/Volume = Masse/Volumen
X-gal	5-Bromo 4-chloro 3-indolyl-Galactosid

1. EINLEITUNG

1.1 Telomere

Telomere bestehen aus sich wiederholenden DNA-Elementen und speziellen DNA-bindenden Proteinen. Diese formen zusammen einen Nukleo-Protein-Komplex an den Enden eukaryotischer Chromosomen (Blackburn 1991; McEachern *et al.* 2000; Blackburn 2001; Smogorzewska *et al.* 2004) (Abb. 1). Dass die Enden der Chromosomen spezielle Strukturen darstellen und sich anders als Doppelstrangbrüche verhalten, wurde bereits im Jahre 1941 durch Arbeiten von McClintock an Mais erkannt (McClintock 1941; McClintock 1942). Heute weiß man, dass diese terminalen DNA-Strukturen aus hochkonservierten, repetitiven Guanin-reichen Sequenzen bestehen und beim Menschen als $(5'\text{-TTAGGG-}3')_n$ vorliegen (Moyzis *et al.* 1988; Meyne *et al.* 1989).

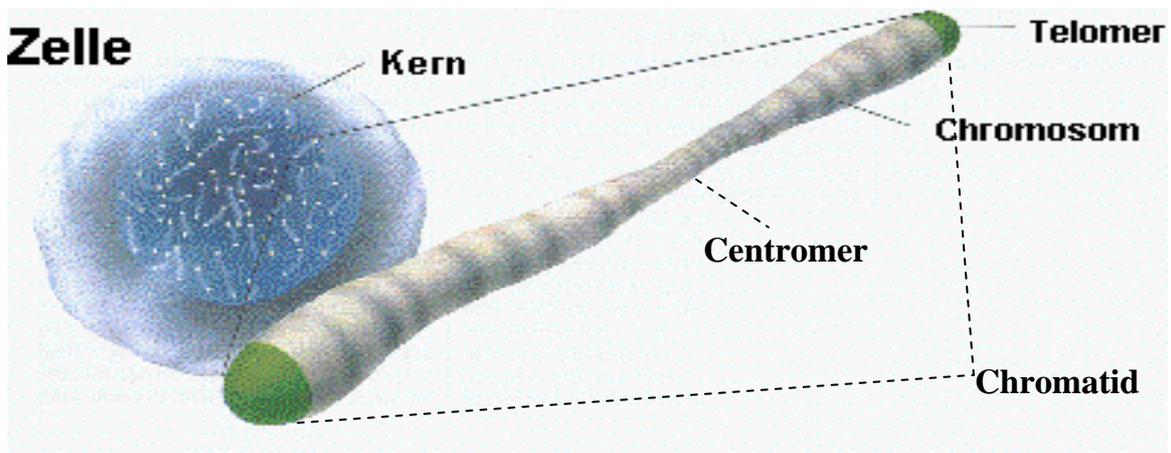


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Chromosoms bestehend aus Zentromer, Chromatiden und den Telomeren.

Die Hauptfunktion von Telomeren besteht darin, die offenen DNA-Enden zu schützen und von Doppelstrangbrüchen innerhalb der Chromosomen zu unterscheiden. Dadurch verhindern die Telomere die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen, die Bildung chromosomaler Fusionen sowie die Entstehung von chromosomaler Instabilität (Counter *et al.* 1992; Blasco *et al.* 1997a; Hande *et al.* 1999). Neben doppelsträngiger DNA bilden Telomere einen G-reichen, etwa 200 Basenpaare (bp) langen 3'-Überhang (Henderson *et al.* 1989; Makarov *et al.* 1997; McElligott *et al.* 1997; Wright *et al.* 1997). Telomere

werden nicht wie die restliche chromosomale DNA in Nukleosomen verpackt (Tommerup *et al.* 1994), sondern liegen zusammen mit sequenzspezifischen Telomer-bindenden Proteinen vor, die die Telomere stabilisieren (van Steensel *et al.* 1997; van Steensel *et al.* 1998). Das T-Loop Model indiziert, dass Telomersequenz sich zurückfaltet, eine Lasso-ähnliche Struktur bildet und dass der Einzelstrangüberhang in weiter proximal gelegene Abschnitten doppelsträngiger Telomersequenz inseriert (Abb. 2) (Griffith *et al.* 1999; Munoz-Jordan *et al.* 2001)

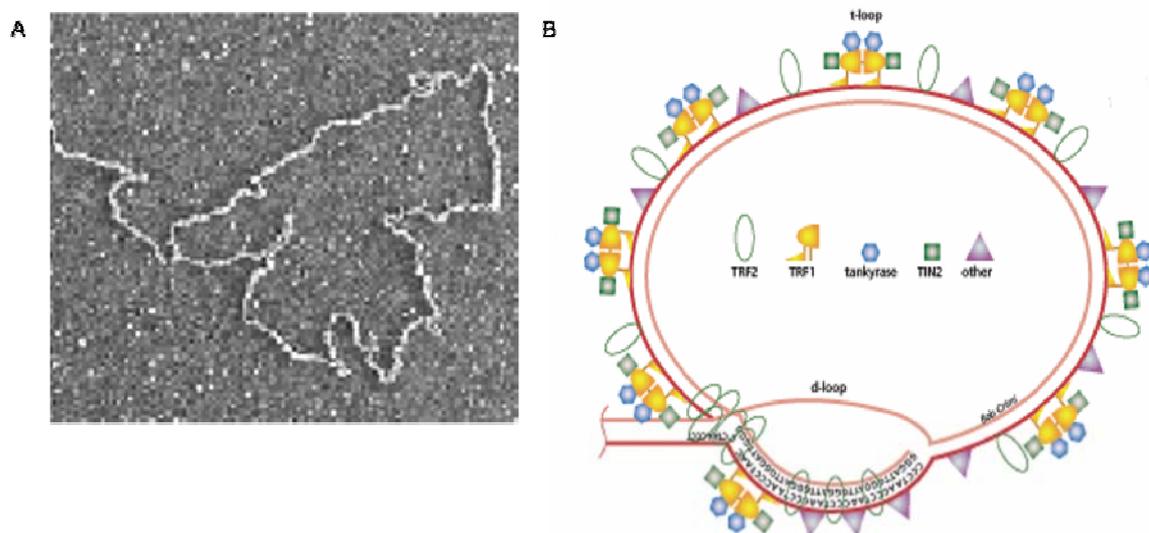


Abb. 2: Darstellung des Telomer-Loops (T-Loop). (A) Elektronenmikroskopische Darstellung des T-Loops. In dieser geschlossenen, dreidimensionalen Form erfüllen die Telomere in der Zelle ihre abschirmende Funktion am Chromosomenende (Griffith *et al.* 1999). (B) Schematische Darstellung des T-Loops. Der 3'-Überhang des Telomerendes wird, vermittelt durch TRF2, zur T-Loop/D-Loop Struktur in die doppelsträngige Telomersequenz eingefädelt und verankert (Griffith *et al.* 1999; Stansel *et al.* 2001)

1.2 Telomer-bindende Proteine

Eine Reihe Telomer-bindender Proteine übernehmen eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Telomerstruktur (de Lange 2002). TRF1 und TRF2 (Telomeric repeat binding factor 1 und 2) binden über Myb-DNA-Erkennungsmotive sequenzspezifisch an doppelsträngige Telomer-DNA und spielen eine essentielle Rolle in der Regulation der Telomerlänge und Telomerfunktion (Chong *et al.* 1995; Billaud *et al.* 1997; Broccoli *et al.* 1997). Überexpressionsstudien mit einer dominant-negativen Variante von TRF1, welches die Bindung endogenen TRF1 an das Telomer inhibiert, zeigten dass TRF1 als negativer Regulator der Telomerlänge fungiert (van Steensel *et al.* 1997). TRF2 scheint das Telomer zu stabilisieren (van Steensel *et al.* 1997), eventuell über die Stabilisierung

des T-Loops (Stansel *et al.* 2001). Der Verlust von TRF2 führt zu Telomer-Dysfunktion, Zellzyklus-Arrest und Aktivierung von ATM-p53 (ataxia telangiectasia mutated) DNA-Schädigungssignalwegen (van Steensel *et al.* 1998; Karlseder *et al.* 1999; de Lange 2002). Dem gegenüber führt eine Überexpression von TRF2 in humanen Fibroblasten zu Telomer-Stabilisierung und einem späteren Eintritt in die replikative Seneszenz (Abb. 3) (Karlseder *et al.* 2002).

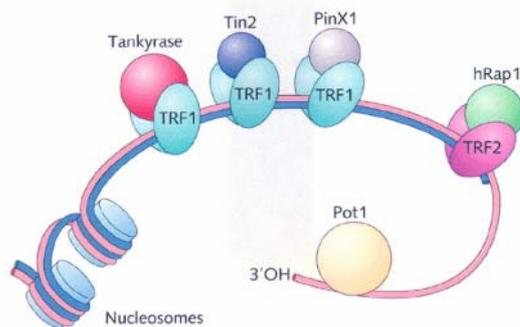


Abb. 3: Schematische Darstellung des Nukleo-Protein-Komplexes an den Enden der Chromosomen. Neben TRF1 und TRF2 (Telomere Repeat binding Factor 1 und 2) binden noch weitere Proteine an den Telomeren. Entweder durch direkte Bindung an einzel- oder doppelsträngige telomerische DNA, wie z.B. POT1 (Protection of Telomere 1), oder über Interaktion mit anderen Proteinen (Tankyrase, Tin2, Pinx1) (Rhodes *et al.* 2002).

Neben den Proteinen, die an doppelsträngigen Sequenzen des Telomers binden, existieren weitere Proteine, die lediglich mit dem einzelsträngigen G-Überhang assoziiert sind (Smogorzewska *et al.* 2004). Auch diese Proteine sind an der Regulation der Telomerlänge und Funktion beteiligt. Der N-Terminus des humanen POT1-Proteins (Protection of Telomere 1) verfügt über eine DNA-bindende Domäne, die es dem Protein ermöglicht, mit hoher Sequenzspezifität an TAGGGTTAG-Sequenzen zu binden (Baumann *et al.* 2001; Loayza *et al.* 2004). Durch Inhibierung von TRF2 kommt es zur Dissoziation von POT1, was die Degradierung des 3'-Überhangs zur Folge hat (Loayza *et al.* 2003a). Darüber hinaus scheint humanes POT1 die Bindung von Telomerase an das Telomer zu begünstigen (Colgin *et al.* 2003).

Zusätzlich zu Telomer-spezifischen DNA-bindenden Proteinen aggregieren einige Proteine am Telomer durch Assoziation mit TRF1 und TRF2. Die Bindung von TRF1 an Telomere kann über zwei verwandte Enzyme, Tankyrase 1 und 2, inhibiert werden (Smith *et al.* 1998; Kaminker *et al.* 2001; Cook *et al.* 2002; Sbodio *et al.* 2002a; Sbodio *et al.* 2002b; Seimiya *et al.* 2002). Tankyrase 1 und 2 (ankyrin-related ADP-ribose polymerase) sind poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARP). Überexprimierung von Tankyrase 1 *in vivo* führt zur Dissoziation von TRF1 vom Telomer (Smith *et al.* 2000; Cook *et al.* 2002; Loayza *et al.* 2003a), wodurch es, ähnlich wie bei TRF1-Inhibierung, zur Telomerverlängerung kommt (van Steensel *et al.* 1997; Smith *et al.* 2000; Cook *et al.* 2002; Loayza *et al.* 2003b).

TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2) hingegen stabilisiert die Bindung von TRF1 an die Telomere und schützt TRF1 vor Modifikation durch Tankyrase (Kim *et al.* 1999).

Desweiteren sind eine Vielzahl an Proteinen der DNA-Schädigungs-Signalwege mit dem Telomer assoziiert und haben eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Telomerlängen und -funktion (Reaper *et al.* 2004). Dazu gehören der Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex, RPA (replication protein A) und die beiden PI3 kinase like kinases (PIKK): ATM (ataxia telangiectasia mutated) und ATR (ataxia-telangiectasia- and rad3-related). Ein gegenwärtiges Modell besagt, dass diese Proteine essentiell für die Aktivierung und Bindungsfähigkeit von Telomerase am exponierten Telomer während der S-Phase sind. Darüber hinaus sind einige Proteine des DNA-Reparatur-Mechanismus am Telomer gebunden (Ding *et al.* 2004; Lieber *et al.* 2004).

1.3 Telomerase

Die Telomerase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche für die Aufrechterhaltung telomerischer DNA verantwortlich ist. Dieses Ribonukleoprotein-Enzym besteht aus zwei essentiellen Untereinheiten: der Telomerase RNA-Komponente (Telomerase RNA-Component, TERC), die als Matritze der zu synthetisierenden Telomerasequenz dient (Greider *et al.* 1989), sowie der Telomerase Reversen Transkriptase (Telomerase Reverse Transcriptase, TERT) (Nakayama *et al.* 1998; Meyerson 2000), die die katalytische Untereinheit des Enzyms bildet (Abb. 4) (Greider *et al.* 1985; Morin 1989; Feng *et al.* 1995; Meyerson *et al.* 1997; Nugent *et al.* 1998).

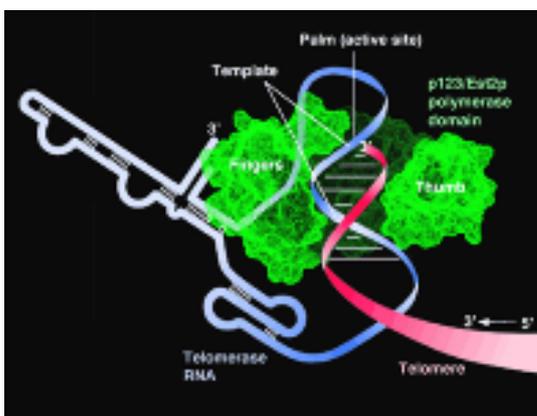


Abb. 4: Modell des RNA-Reverse-Transkriptase Komplexes der Telomerase. Die Form der Reversen Transkriptase-Untereinheit ist vergleichbar mit der der rechten Hand. Daumen (thumb) und Finger (fingers) sind einander zugewandt. Die RNA-Komponente befindet sich an Stelle der Handfläche (palm) (Lingner *et al.* 1997).

Die TERT-Untereinheit ist verwandt mit reversen Transkriptasen (RT) von „non-LTR-Retroposons“ (LTR = long terminal repeat) und Gruppe II Introns (Greider *et al.* 1989). Ähnlich wie diese RTs, verlängert Telomerase das 3'-Ende der DNA, direkt ohne an einen

RNA-Primer binden zu müssen (Nakamura *et al.* 1998). Der G-reiche 3'-Überhang des Telomer-Endes wird von dem Telomerasekomplex erkannt und von ihm ausgehend wird durch die reverse Transkriptase in 5'→3' Richtung mit der RNA-Komponente als Matrix einzelsträngige Telomerasequenz neu synthetisiert (Greider *et al.* 1985; Morin 1989; Feng *et al.* 1995; Meyerson *et al.* 1997; Nugent *et al.* 1998).

Nach Elongation des 3'-Endes, wird der C-Strang mittels DNA-Polymerase vervollständigt (Abb. 5).

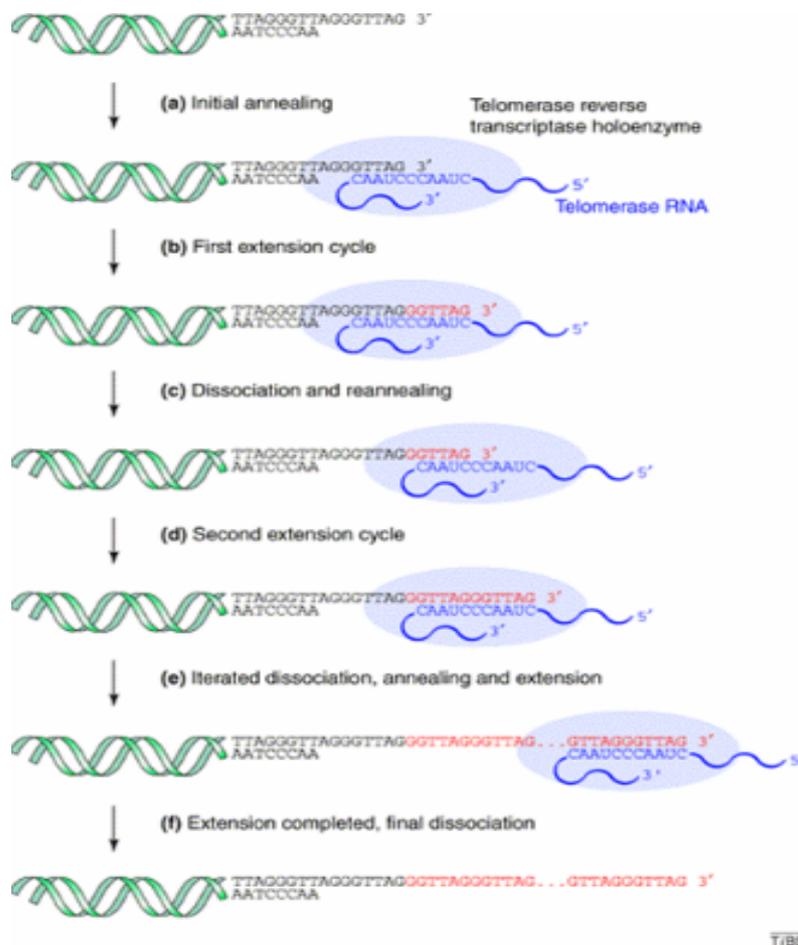


Abb. 5: Telomerase-vermittelte Telomerverlängerung. (A) Telomerase bindet am 3'-OH-Ende des Telomeres und (B) synthetisiert komplementär zur RNA-Matrize neue Telomerasequenz. (C) Die Telomerase dissoziiert um am neu entstandenen Ende wieder zu binden und (D) den DNA-Strang erneut zu verlängern. Dieser Prozess der Dissoziation, Translokation und Elongation wird solange wiederholt (E), bis die Telomerase vom Telomer dissoziiert (F).

Neben den beiden essentiellen Komponenten der Telomerase interagiert eine Vielzahl weiterer Proteine mit dem Enzym-Komplex, um die Aktivierung und Bindung der Telomerase am Telomer positiv und negativ zu regulieren (Smogorzewska *et al.* 2004). EST1 (Ever shorter Telomere) ist als ein solches Protein identifiziert worden und Mutationen im Gen führen zu verkürzten Telomeren in Hefezellen. Im Menschen wurden drei Homologe des EST1 identifiziert. EST1A assoziiert mit Telomerase und begünstigt die Demaskierung der Chromosomenenden, ein Mechanismus, der vermutlich für die Verlängerung von Telomeren durch Telomerase notwendig ist (Reichenbach *et al.* 2003).

In den meisten einzelligen Organismen wird Telomerase konstitutiv exprimiert. In humanen Zellen dagegen ist die Aktivität der Telomerase streng reguliert (Meyerson *et al.* 1997; Nakamura *et al.* 1997; Kim *et al.* 1999) und Telomerase ist nur während der Embryogenese, (Wright *et al.* 1996; Greenberg *et al.* 1998; Martin-Rivera *et al.* 1998), in Keimzellen und Stamm- bzw. Progenitorzellen aktiv (Counter *et al.* 1995; Hiyama *et al.* 1995; Harle-Bachor *et al.* 1996; Wright *et al.* 1996; Hiyama *et al.* 2001). In den meisten somatischen Geweben wird Telomeraseaktivität postnatal unterdrückt (Wright *et al.* 1996; Burger *et al.* 1997; Shay *et al.* 1997; Kim *et al.* 1999).

An der Hemmung von TERT sind zahlreiche Tumor-suppressor-Gene beteiligt, während Aktivatoren der TERT-Transkription, wie c-myc (Greenberg *et al.* 1999; Wu *et al.* 1999), Sp1 (Kyo *et al.* 1999), HIF1 (hypoxia-inducible transcription factor) (Yatabe *et al.* 2004) und EGFR (epidermal growth factor receptor) (Budiyanto *et al.* 2003) oft mit Tumorgenese in Verbindung gebracht werden.

1.4 Das DNA-End-Replikations Problem

Hayflick und Moorhead beschrieben bereits 1961, dass sich humane Fibroblasten, im Gegensatz zu Tumorzellen, nur begrenzt teilen (Hayflick *et al.* 1961). Olovnikov postulierte auf Grund theoretischer Überlegungen 10 Jahre später, dass sich die Chromosomenenden bei jeder Zellteilung verkürzen müssten (Olovnikov 1971).

Die DNA-Polymerase kann nur an das freie 3'-OH-Ende eines DNA-Strangs Nukleotide anhängen, nicht aber an das 5'-Ende. Daher wird während der Replikation der neue DNA-Strang in 5'→3'-Richtung synthetisiert. Der Leitstrang (5'-Strang) wird dabei in Laufrichtung der Replikationsgabel (5'→3') bis zum Erreichen einer neuen Replikationsgabel oder bis zum Ende des Chromosoms synthetisiert, wohingegen der Folgestrang (3'-Strang) diskontinuierlich in Gegenrichtung des Fortschreitens der Replikationsgabel gebildet werden muss. Immer wieder beginnend bei RNA-Primern werden kleine Segmente des neuen 5'-Stranges, so genannte Okazaki-Fragmente, synthetisiert. Abschließend werden, nach Entfernen der RNA-Primer, die Okazaki-Fragmente durch DNA-Ligase miteinander verbunden (Abb. 6). Am Ende des 3'-Stranges kann kein RNA-Primer mehr gesetzt werden. Zusätzlich führt Prozessierung der Telomerenden bei jeder Zellteilung zur Verkürzung der Telomere. Zusammengenommen

führen diese Mechanismen dazu, dass während jeder Zellteilung 50-100 bp am chromosomalen Ende humaner Zellen verloren gehen.

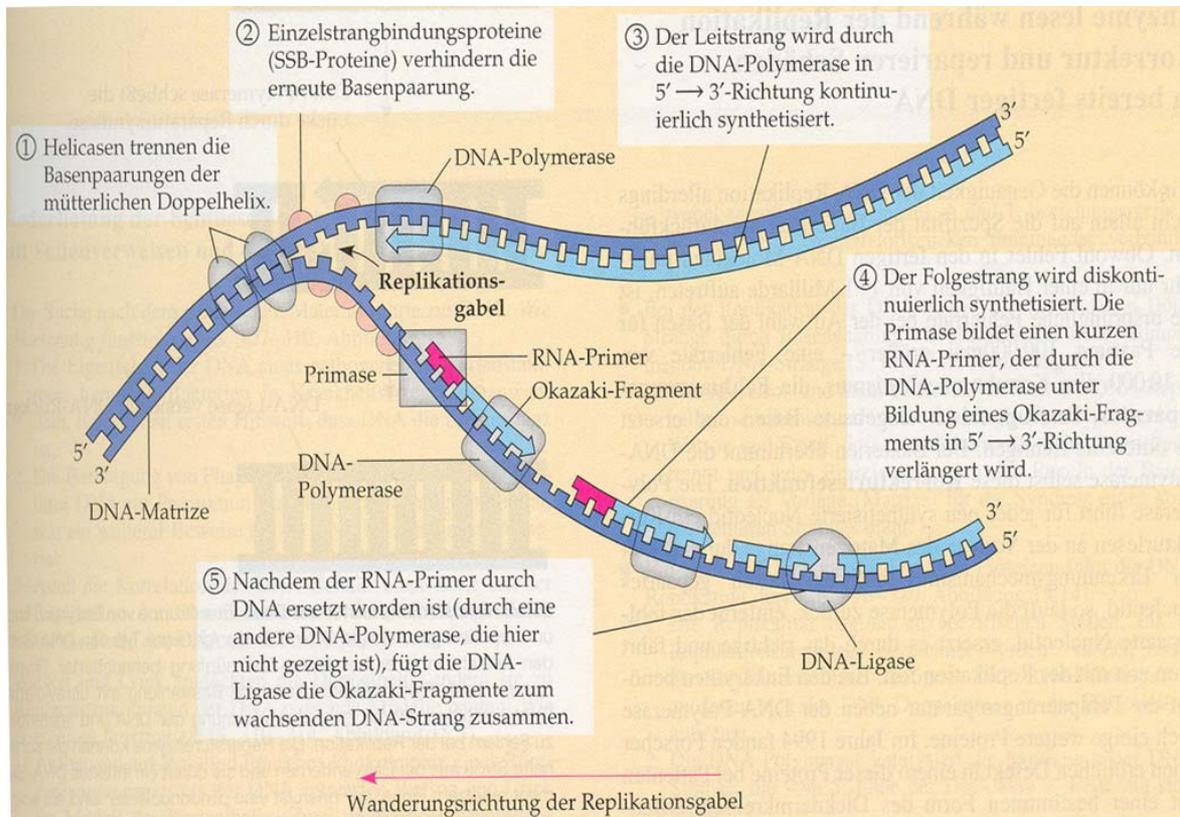


Abb. 6: Modell der DNA-Replikationsgabel (Campbell 1997).

Durch die Inhibierung der Telomerase ist die proliferative Kapazität von Zellen der meisten somatischen Gewebe im Menschen auf 50-70 Zellteilungen limitiert (Harley *et al.* 1990), bevor sie aufgrund kritisch verkürzter Telomere in das Stadium der zellulären Seneszenz übergehen. Die Inhibierung der TERT spielt daher eine ambivalente Rolle während des Alterns. Zum einen fungiert die Hemmung der Telomerase als Tumorsuppressor-Mechanismus in transformierten Tumorzellen (Wright *et al.* 2001). Zum anderen limitiert Telomerase-Suppression aber die regenerative Kapazität von Geweben und Organen während des Alterns (Djojosebroto *et al.* 2003).

1.5 Telomerlänge während der Alterung

Durch die kontinuierliche Verkürzung der Telomere auf Grund des Endreplikations-Problems der DNA-Polymerase und fehlender Telomerase-Aktivität, ist die Lebensdauer somatischer Zellen beschränkt (Allsopp *et al.* 1992). Sind die Telomere kritisch verkürzt,

kommt es zur Seneszenz, welche durch permanenten Proliferationsverlust und morphologische Veränderungen charakterisiert ist (Allsopp *et al.* 1992; Wright *et al.* 1992). Kritisch kurze Telomere verlieren ihre Schutzfunktion, was zur Aktivierung von DNA-Schädigungssignalwegen führt. (Vaziri *et al.* 1993; d'Adda di Fagagna *et al.* 2003; Takai *et al.* 2003; Satyanarayana *et al.* 2004a; Satyanarayana *et al.* 2004b; Satyanarayana *et al.* 2004 in press).

Telomerverkürzung scheint postnatal nicht linear zu verlaufen. So kommt es während der ersten beiden Lebensjahre in peripheren Blutzellen zu einer schnelleren Verkürzung der Telomere im Vergleich zu späteren Lebensabschnitten (Frenck *et al.* 1998). Da Blutzellen Telomerase-positiven Ursprungs sind (Stamm- und Progenitorzellen), lässt dies darauf schließen, dass Telomerase-Aktivität allein nicht immer in der Lage ist, der Telomerverkürzung vollständig entgegen zu wirken.

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

1.6 Telomerlängen in geklonten Tieren

Da Telomerlängen Einfluss auf Regeneration, Alterung und Krebs haben, besteht ein mögliches Problem des Klonens in der Telomerverkürzung, da für das Klonen somatische Zellkerne verwendet werden, die in der Regel kürzere Telomere aufweisen als Keimzellen (de Lange *et al.* 1990; Allsopp *et al.* 1992). Dieses Problem könnte ein Limit für den

zukünftigen Einsatz von therapeutischem Klonen und darauf basierenden Zelltherapien darstellen.

Die Gewinnung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) ist für die Forschung deshalb interessant, weil sie über die Fähigkeit verfügen, sich unter den entsprechenden Bedingungen in nahezu alle verschiedenen Typen von Körperzellen entwickeln zu können. Diese Fähigkeit wird meist als Pluripotenz bezeichnet. Die Erkenntnisse aus der Stammzellenforschung hofft man in der Zukunft für die Herstellung von Geweben oder ganzen Organen zu Transplantationszwecken nutzen zu können. Um eine Abstoßung der transplantierten Gewebe durch das Immunsystem des Empfängers von vornherein auszuschließen, will man über das Klonverfahren Stammzellen herstellen, die mit den Zellkernen des Transplantatempfängers genetisch identisch sind und daher als Ausgangsmaterial für die Herstellung genetisch identischen Gewebes verwendet werden können.

Telomerlängenbestimmungen geklonter Tiere ergaben bislang unterschiedliche Ergebnisse. So wies das Klonschaf Dolly, welches mit adulten epithelialen Zellen geklont wurde, kürzere Telomere als gleichaltrige, natürlich geborene Schafe auf (Shiels *et al.* 1999). Demgegenüber zeigten mit Cumulus-Zellen geklonte Mäuse keine Telomerverkürzung (Wakayama *et al.* 2000). Die Telomerlängen mittels fetaler oder adulter Fibroblasten geklonter Rinder waren vergleichbar mit natürlich geborenen Tieren (Tian *et al.* 2000; Betts *et al.* 2001) oder sogar verlängert, wenn seneszente Fibroblasten für das Klonen eingesetzt wurden (Lanza *et al.* 2000). Mit späten Passagen pre-seneszenter Fibroblasten geklonte bovine (Lanza *et al.* 2000) als auch ovine (Clark *et al.* 2003) Feten konnten eine Wiederherstellung der Telomere in den geklonten Feten als auch in Zelllinien dieser Feten aufweisen. Allerdings entsprach die gemessene Telomerlänge nicht der Länge, die für frühe Passagen der Donorzellen gemessen wurde (Lanza *et al.* 2000; Clark *et al.* 2003) (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht der Telomerlängen in geklonten Säugetieren. Donor = Donorzellen, die zur Klonierung benutzt wurden. Kontrolle = gleichaltrige Kontrolltiere, die natürlich gezeugt wurden. Cumulus-Zellen = die beim Eisprung die Eizelle umgebende Zellschicht

Spezies	Donor-Zelltyp	Embryonaler Ursprung	Telomerlänge der Klone	Referenz
Schaf	Epithelzellen der Brustdrüse	ektoderm	Donor = Klone (< Kontrolle)	Shiels et al 1999
Maus	Cumulus Zellen	mesoderm	Donor < Klone	Wakayama et al 2000
Rind	adulte Fibroblasten	mesoderm	Donor < Klone (= Kontrolle)	Tian et al 2000
Rind	Cumulus Zellen	mesoderm	Donor < Klone (= Kontrolle)	
Rind	seneszente Fibroblasten	mesoderm	Donor < Klone (>Kontrolle)	Lanza et al 2000
Rind	adulte Fibroblasten	mesoderm	Donor < Klone (= Kontrolle)	Betts et al 2001
Rind	adulte Fibroblasten	mesoderm	Donor < Klone (= Kontrolle)	
Rind	Granulosa Zellen	mesoderm	Donor < Klone (= Kontrolle)	
Rind	Epithelzellen des Oviducts	mesoderm	Donor > Klone (< Kontrolle)	Miyashita et al 2002
Rind	Epithelzellen der Brustdrüse	ektoderm	Donor > Klone (< Kontrolle)	
Rind	Muskelzellen	mesoderm	Donor = Klone (< Kontrolle)	
Rind	Hautfibroblasten	mesoderm	Donor = Klone (< Kontrolle)	
Rind	blastomere Zellen		Donor > Klone	
Schaf	fetale Fibroblasten	mesoderm	Donor < Klone (< Kontrolle)	Clark et al 2003

Man geht heute davon aus, dass die unterschiedlichen Ergebnisse aus der Verwendung verschiedener Donor-Zell-Typen für das Klonen resultieren (Miyashita *et al.* 2002). So zeigten aus Muskelzellen oder Fibroblasten geklonte Rinder eine Normalisierung der Telomerlänge, selbst bei Verwendung „alter“ Donorzellen (Miyashita *et al.* 2002). Wohingegen Klonen mit Epithelzellen zu keiner Normalisierung der Telomerlänge führt. Ähnlich wie bei Dolly, kam es bei Rindern, die mit epithelialen Zellen geklont wurden, zu keiner Rekonstruktion der Telomere (Miyashita *et al.* 2002). Zusammenfassend lässt sich heute sagen, dass Klonen nicht zwangsläufig zu Telomerverkürzung führen muss, wie dies nach den Ergebnissen von Dolly zunächst vermutet wurde. Vielmehr können Telomere unter Verwendung geeigneter Donorzellen durchaus wieder verlängert werden (Tab. 1). Bislang ist nicht klar, ob die verkürzten Telomere, der mit Epithelzellen geklonten Tieren, einen Phänotypen in alternden Tieren bewirkt, wie dies bei Telomerase-knockout-Mäusen (mTERC^{-/-}) beobachtet worden ist (Blasco *et al.* 1997a; Rudolph *et al.* 1999).

Die Lebensspanne der aus geklonten Feten etablierten Zelllinien korrelieren weitestgehend mit der Lebensspanne der Donorzellen, die zum Klonen benutzt werden. Die zum Teil recht unterschiedlichen Prolifertationsraten der parentalen Zelllinien beruhen auf unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Telomerverkürzung. Die ähnlichen Lebensspannen der Zelllinien aus geklonten Feten, verglichen mit den Donorzellen lässt vermuten, dass die genetisch programmierte Lebensspanne eines Zelltyps auch nach dem Klonierungsprozess erhalten bleibt, sofern eine Rekonstruktion der Telomere während des Klonens erfolgt (Clark *et al.* 2003). Es ist natürlich nicht auszuschließen, dass bei Verwendung seneszenten Zellen zum Klonen, Zellen mit langen Telomerreserven selektioniert werden.

1.7 Telomerase- und Telomerlängen-Regulation während der Embryogenese

In humanen Geweben ist die Aktivität der Telomerase streng reguliert. Die Expression beschränkt sich weitestgehend auf Stamm- und Progenitorzellen und unreife Keimzellen (Harle-Bachor *et al.* 1996; Wright *et al.* 1996; Kim *et al.* 1999). In Mäusen bleibt Telomerase auch postnatal in somatischen Geweben aktiv (Prowse *et al.* 1995). Es wird vermutet, dass Telomerase-Expression in Keimzellen ausreichende Telomer-Reserven für nachfolgende Generationen sicherstellen soll. Einhergehend mit dieser Hypothese konnte bereits gezeigt werden, dass Keimzellen längere Telomere besitzen als somatische Zellen (de Lange *et al.* 1990) und diese auch während der Alterung stabil bleiben (Allsopp *et al.* 1992).

Die Daten der Telomer-Rekonstruktion in geklonten Tieren legen nahe, dass es neben der Aufrechterhaltung der Telomere in Keimzellen einen zweiten embryonalen Mechanismus geben könnte, der ausreichend Telomer-Reserven für die nächste Generation sichert.

Bislang ist wenig bekannt über die Telomerlängen-Regulation während der Embryogenese. Im Menschen konnte *in utero* gezeigt werden, dass Telomere in verschiedenen Geweben eines Fetus gleich lang waren, während unterschiedliche Feten erhebliche Unterschiede der Telomerlänge zeigten (Youngren *et al.* 1998). Diese Daten indizieren, dass genetische Faktoren die individuelle Telomerlänge beeinflussen, was in Übereinstimmung mit Studien zu Telomerlängen in Zwillingen steht (Slagboom *et al.* 1994). Ob es in den humanen Embryonen zwischen unterschiedlichen Stadien der Entwicklung zu einer Telomerverlängerung oder –verkürzung kommt, ist allerdings nicht bekannt. Im Gegensatz

zu humanen Daten weisen Rinderfeten, die mit derselben Donorzelllinie geklont wurden, deutliche Unterschiede der mittleren Telomerlänge verschiedener Organe eines Klons, als auch der Klone untereinander auf (Betts *et al.* 2001). Dagegen zeigen Telomerlängenvergleiche geklonter Feten (Tag 40-50 der bovinen embryonalen Entwicklung) und gleichaltriger Kontroll-Feten keine signifikanten Unterschiede auf (Betts *et al.* 2001). Erste Hinweise auf ein Telomerverlängerungs-Programm während der Embryogenese stammen aus Zuchtstudien zwei verschiedener Mausstränge mit langen bzw. kurzen Telomeren (Zhu *et al.* 1998). Die an Tag 14 nach der Befruchtung untersuchten Embryonen wiesen eine Verlängerung der kurzen Telomere auf. Dieser Prozess wurde durch Haplo-Insuffizienz der Telomerase in mTERC^{+/-}-Mäusen beeinflusst (Chiang *et al.* 2004). Wann es jedoch zu einer Telomerverlängerung während der Embryogenese kommt wurde bislang noch nicht untersucht.

Detaillierte Informationen gibt es über Telomerase-Expression während der Embryogenese. In unreifen Gameten wird Telomerase exprimiert, aber während des Reifungsprozess aber wieder runterreguliert (Wright *et al.* 1996; Betts *et al.* 1999; Achi *et al.* 2000). Bis zum Morula-Blastozysten-Übergang wird Telomerase gar nicht, oder nur sehr wenig, in bovinen (Betts *et al.* 1999) bzw. humane Embryonen (Wright *et al.* 1996) exprimiert. Dies konnte auch durch Arbeiten von Xu und Young bestätigt werden, die nur eine schwache Telomerase-Aktivität in Oozyten, Zygoten, den ersten Teilungsstadien bis hin zur Morula nachwiesen, welche aber im Blastozysten-Stadium signifikant anstieg. Das selbe Expressionsmuster konnte auch für geklonte Embryonen nachgewiesen werden, was auf eine normale Reprogrammierung von Telomeraseexpression in geklonten Embryonen schliessen lässt (Xu *et al.* 2001).

Der Morula-Blastozysten-Übergang stellt einen kritischen Schritt in der Entwicklung dar, der zur Ausbildung zweier unterschiedlicher Zellkompartimente führt: der inneren Zellmasse (inner cell mass, ICM), aus der später der eigentliche Embryo hervorgeht und dem Trophoblasten, dem Embryoumgebenden und -versorgenden Gewebe. Dies geht einher mit dramatischen Veränderungen der Morphologie, von der kompakten Morula, einem kugelförmigen Zellhaufen von ca. 16 Zellen, zu der Hohlraum gefüllten Blastozyste, bestehend aus 80 – 100 Zellen, sowie massiven Veränderungen der embryonalen Genexpression (Niemann *et al.* 2002).

1.8 Ziel der Arbeit

Trotz zahlreicher Analysen zu Telomerlängen in geklonten und nicht geklonten Embryonen, sowie der dazu gehörigen Telomerase-Aktivitätsstudien, konnte bislang noch immer nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob es und wenn ja zu welchem Zeitpunkt während der Embryogenese, es zur Telomer-Rekonstitution kommt. Aufgrund der bekannten Daten zur Telomerase-Regulation am Morula-Blastozysten-Übergang erschien dieses Entwicklungsstadium dabei von besonderem Interesse. In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation der Telomerlänge in der frühen Embryogenese in geklonten und natürlich befruchteten Tieren untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Telomere geklonter und natürlich gezeugter Rinder- sowie Mausembryonen des Morula- und Blastozysten-Stadiums bestimmt. Zusätzliche Untersuchungen an Telomerase-Knockout-Mäusen ($mTERC^{-/-}$) sollten zeigen, ob eine eventuelle Telomerlängen-Regulation während der frühen Embryogenese Telomerase-abhängig ist. Desweiteren sollte die Expression verschiedener Telomer-bindender Proteine in der frühen Mausembryogenese untersucht werden, um erste Hinweise zu erarbeiten, ob die Proteine eventuell an der Telomerlängen-Regulation während der frühen Embryogenese beteiligt sind.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 allgemeine Materialien

2.1.1 Chemikalien und Geräte

Tab. 2 : Übersicht der für die Arbeit verwendeten Chemikalien. Alle in der Arbeit verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen oder entstammen einem der verwendeten Kits.

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

Glycin	AppliChem
Glutaraldehyd	Sigma
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure)	ICN
Isopropanol	J.T. Baker
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Roth
Mayer's Haematoxylin solution	Sigma
Methanol	J.T.Baker
Mounting Medium für Fluoreszenz	Vectashield
Mounting Medium mit DAPI	Vectashield
Natriumacetat	AppliChem
PBS (Phosphate buffered saline)	Gibco
PCR Nucleotid Mix	Roche
Resin	Biorad
Ribonuclease Inhibitor	Sigma
RNA Clean	Hybaid
RNase Away	Roth
Roti-phenol/Chloroform	Roth
Sodium dodecylsulphate (SDS)	Sigma
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem
Triton-X-100	Sigma
Tryptose phosphate broth	Gibco
Tween-20 und -100	Sigma
ABI prism 7700 Sequence Detection System	PE applied Biosystems
Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Bakterien Kulturplatten	Greiner
Bakterienschüttler	Bühler
Cryoröhrchen	Nunc
Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (steril)	Greiner
Elektrophorese-Kammer	Labtech, Pharmacia Biotech
Fluoreszenz Mikroskop BX 60	Olympus
Gel doc	Biorad
Heizblock	Eppendorf

High density oligonucleotide chips	Affymetrix
Mikroskopkamera, digital	Sony
Mikroskop	Olympus
PCR Master Cycler	Eppendorf
PCR soft tubes	Biozym
Polypropylenröhrchen (Reagiergefäß, 15 ml und 50 ml)	Greiner
Power-Supply	Biometra
Reaktionsgefäß (0,2; 0,5; 1,5 ml)	Eppendorf
Spektrophotometer	Contron
Telomere Analysis Program TFL-TELO V1.0a	Steven S.S. Poon, Peter M. Lansdop
Ti-70-Rotor und SW 28.1-Swinging-Bucket-Rotor	Beckman
Tischzentrifuge	Eppendorf
Vortexer	Omnilab
Zellkultur Laminar Flow Bench	Heraeus
Zellkulturflaschen (250 ml)	Cell star
Zellkulturinkubator	Heraeus
Zellkulturplatten (6 well)	Cell star
Zellkulturplatten (Ø10 cm)	Greiner
Zentrifugenröhrchen, steril (10 ml)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen, steril (50 ml)	Sarstedt

2.1.2 Enzyme

Collagenase	Sigma
DNase I, RNase-free	Boehringer, Mannheim
HotStarTaq TM Polymerase	Qiagen
Pepsin	Sigma
Proteinase K	Invitrogen
Restriktions-Endonukleasen	New England Biolabs
RNase A	Sigma
Superscript II-RT	Invitrogen
T4-Kinase (Polynucleotid-Kinase)	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	Qiagen

2.1.3 Antikörper

Human EST1A	(Prof. Lingner, Schweiz)
Mouse TRF1	(Prof. Blasco, Madrid)
Cy-3-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG	Zymed

2.1.4 Molekulargewichtstandards

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

100 bp-Leiter	New EnglandBiolabs/Invitrogen
1 kb-Leiter	New EnglandBiolabs/Invitrogen
1 kb Plus-Leiter	New EnglandBiolabs/Invitrogen
High molecular weight marker	New EnglandBiolabs/Invitrogen

2.1.5 Plasmide

Tab. 3: cDNA-Klone. RNA aus Mausleber wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben, geeignete Fragmente mit spezifischen Primern amplifiziert und in pGEM®-T Easy-Vektoren kloniert.

Gen	Größe [bp]	Vektor	Klonbezeichnung
mouse TRF1	648	pGEM-T Easy	pGEM-T Easy TRF1-44
mouse TRF2	697	pGEM-T Easy	pGEM-T Easy TRF2- 63
mouse Tankyrase	669	pGEM-T Easy	pGEM-T Easy Tankyrase-54
mouse POT1	684	pGEM-T Easy	pGEM-T Easy POT1-9

2.1.6 Kits

Gel Extraction Kit	Qiagen
Nucleotide Removal Kit	Qiagen
pGEM-T-Easy Vector Kit	Promega
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Qiagen
TRAPeze Telomerase Detection Kit	Chemicon

2.1.7 Oligonukleotide

Tab. 4 :Übersicht der für die Arbeit verwendeten Primer. Alle Primer wurden über das Chemikalienzentrum der Medizinischen Hochschule bei der Firma MWG bestellt. Die Oligonukleotide wurden in Wasser gelöst [100 pM].

Zweck	Primerbezeichnung	Sequenz (5-->3)
Genotypisierung	mTRR	TTC TGA CCA CCA CCT ACT TCA AT
	5ppgK	GGG GCT GCT AAA GCG CAT
	mTRwtF	CTA AGC CGG CAC TCC TTA CAA G
Reverse Transkription (RT)	polyT	TTT TTT TTT TTT TTT TTT
	PSP9 3	TGA CGT TGG CGG ATG AGC ACA
	PSP9 5	CTG GAC GAG GGC AAG ATG AAG C
Sondenherstellung	TRF1 left	GAG AAA GCG AGG ACA CAA GC
	TRF1 right	TCT TTC TCT TCC CCC TCC TC
	TRF2 left	GGA AGA GGA CCA GCT GTT TG
	TRF2 right	GAT TCC ACA GGG ACG AAA AA
	Tankyrase left	GGT ACC CTG GGA CTG TCA GA
	Tankyrase right	GGG AAG AGA CTG AGG GAA GG
	POT1 left	GAT CCC AGA ATC TGA AGT CC
	POT1 right	CAT CAG TAC AGC CAG GCT CA

2.1.8 Puffer, Lösungen und Medien

Nährmedien für die Zellkultur:

Alle adhärenenten Zelllinien wurden in DMEM mit Glutamax, versetzt mit 10% FCS (v/v) und 1% Penicillin/Streptomycin (v/v), kultiviert.

Nährmedien für die Bakterienkultur:

Alle Medien wurden sofort nach der Herstellung autoklaviert (121°C; 1,0 bar; 30 min)

LB-Medium:

10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl wurden auf 1 l mit dest. Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika zur plasmidspezifischen Selektion erfolgte unmittelbar vor Inkulturnahme (100 mg Antibiotikum/L LB-Medium)

LB-Agarplatte:

Zur Herstellung von Agarplatten wurde ein geeignetes Medium für die spezifischen Bakterienstämme angesetzt, 1,5% Agar Agar beigefügt, autoklaviert und gegebenenfalls Antibiotikum zugegeben. Nach Erstarren und Trocknen der Platten, wurden die Bakterien entweder mittels ausgeglühter Platin-Impföse ausgestrichen oder mit einem abgeflamten Glasspatel, insbesondere bei Flüssigkulturen, ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Die so erhaltenen Plattenkulturen ließen sich kurzfristig (3-4 Wochen) im Kältelabor bei 4°C lagern.

Flüssigkulturen:

Mittels ausgeglühter Platin-Impföse oder eines sterilen Zahnstochers wurden die zuvor auf einer Agarplatte ausgestrichenen Einzelkolonien in ein geeignetes Medium überführt. Die Inkubation erfolgte meist über Nacht bei 37°C und 250 Upm im Schüttelinkubator.

Glycerinkulturen:

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden Flüssigkulturen mit Glycerin im Verhältnis 1:2 gemischt und umgehend bei -70°C eingefroren.

Denhardt Lösung 100x:

10 g Ficoll 400, 10 g Polyvinylpyrrolidon, 10 g Bovines Serum Albumin (BSA) auf 500 ml mit Wasser auffüllen und bei -20°C lagern.

2.1.9 Humane Zellen

Die in der Arbeit verwendeten Phoenix-Zellen sind Derivate von HEK 293 Zellen (Human Embryonal Kidney), welches mittels adenoviraler Behandlung (Adenovirus 5, Ad 5) transformiert und damit immortalisiert wurden. Aufgrund der einfachen Kultivierung und der konstanten Telomerlänge solcher Tumor-Zelllinien, dienten Phoenix-Zellen bei Q-FISH-Analysen (Kapitel 2.6.1) als Kontrolle. Daher wurde die Telomerlänge mit Southern Blot (Kapitel 2.6.2) absolut bestimmt um dem Fluoreszenz-Signal (Telomer Fluoreszenz Units, TFU) später eine reale Telomerlänge zuordnen zu können.

2.1.10 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Telomerase knock-out Mäuse (mTERC^{-/-}, C57BL6-Hintergrund) von Blasco (Blasco et al 1997) und die C57BL6 Mäuse (Wildtyp) Kontrolltiere wurden über The Jackson Laboratory, USA bezogen. Der Telomerase knock-out Maus (mTERC^{-/-}) fehlt durch eine homozygote Deletion der mTERC-Komponente Telomerase Aktivität (Blasco *et al.* 1997b). Auf Grund der bei Maus-Inzuchtstämmen relativ langen Telomere (40 kb), zeigten Mäuse der ersten mTERC^{-/-} Generation keinen pathologischen Phänotyp, was darauf hindeutete, dass bei ausreichend langen Telomeren Telomerase Aktivität selbst nicht für die Entwicklung und Organ-Homeostase notwendig war. Dagegen hatten rückgekreuzte, späte Generationen G3-G6 mTERC^{-/-} Mäuse kritisch kurze Telomere und damit einhergehend Verlust der Telomerfunktion sowie chromosomale Fusionen (Blasco *et al.* 1997a). Die Entwicklung war so beeinträchtigt, dass Mäuse mit kritisch kurzen Telomeren zu hohem Anteil schon in der Embryogenese verstarben (Herrera *et al.* 1999). Postnatal zeigten mTERC^{-/-} Mäuse gestörte Organ-Homeostase, besonders der hochproliferativen Organe wie des haematopoetischen Systems, der männlichen Fortpflanzungsorgane sowie der intestinalen Epithelien. Zudem zeigten sie eine erhöhte Apoptose- und eine verminderte Proliferationsrate (Lee *et al.* 1998; Rudolph *et al.* 1999). Alternde mTERC^{-/-} Mäuse zeigten eine verminderte regenerative Stressantwort, sowie vermindertes Überleben (Rudolph *et al.* 1999).

Die spezifisch pathogenfreien Tiere wurden in den zentral klimatisierten Tierräumen des Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover mit einem Temperaturbereich von 20-24°C und einer Luftfeuchte von 50-60% in Makrolonkäfigen gehalten und verpaart. Es herrschte ein 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Den Tieren stand Futter (Fa. Altromin) und Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung. Die Genotypisierung erfolgte wie unter 2.2.16 beschrieben.

Die untersuchten adulten Rinder und Embryonen wurden im Labor von Prof. Niemann, Institut für Tierzucht, Mariensee, Neustadt, kloniert und aufgezogen. Die für die Klonierung verwendeten Fibroblasten stammten von Rindern aus dem Schlachthof zu denen keine näherern Angaben bekannt sind.

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Kompetente Bakterien und Transformation

Um Plasmide klonieren zu können, müssen sie in geeignete Bakterien transformiert werden. Um die Transformationsrate zu erhöhen, werden die Bakterien einer Calcium-Chlorid-Behandlung unterzogen, wodurch diese aufquellen und die Permeabilität der Zellmembran erhöht wird. Dadurch ist ein gewisser Prozentsatz der Zellen befähigt, das zu klonierende Plasmid aufzunehmen.

Die Bakterien einer Übernachtskultur werden in einem 1:100 Verhältnis mit Kulturmedium verdünnt und anschließend bei 37°C/250 Upm bis zu einer Extinktion bei 600 nm (OD_{600}) von 0,2 inkubiert. Somit ist gewährleistet, dass sich die Bakterien in einer logarithmischen Wachstumsphase befinden, in der sie besonders aufnahmefähig gemacht werden konnten. Anschließend werden sie abzentrifugiert (Sorvall RC 5B Kühlzentrifuge 4°C), 10 min 5000 Upm, SS34 Rotor), in eiskaltem 0,1 M $MgCl_2$ resuspendiert und nach nochmaliger Zentrifugation, unter gleichen Bedingungen, schließlich in 2 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ aufgenommen. Die anschließende Quellung der Bakterien erfolgt für mindestens 30 min auf Eis. Danach können sie für die Transformation eingesetzt werden.

Für die Transformation werden 100 μ l kompetenter Zellen mit 10 ng Plasmid-DNA versetzt, 40 min auf Eis inkubiert und danach einem kurzem Hitzeschock von 1 min bei 42°C ausgesetzt. Zur Erholung der Zellen werden diese mit 0,5 ml LB-Medium versetzt und mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen 5 min bei 1000 g abzentrifugiert, der Überstand bis auf 100 μ l abgenommen und das Pellet schließlich in den verbliebenen 100 μ l resuspendiert und mittels eines Glasspatels auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert.

2.2.2 Vermehrung transformierter Bakterien

Zur Vermehrung plasmidtragender *E. coli*-Klone werde zunächst eine Vorkultur (etwa 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) bei 37°C über Nacht im Schüttler bei 225 rpm inkubiert. Aus 1,5 ml der erhaltenen Bakteriensuspension kann eine Mini-Plasmidpräparation durchgeführt werden. Zur Isolierung großer DNA-Mengen (Maxi-

Plasmidpräparation) wird die Vorkultur auf ein Volumen von 250 ml mit Medium aufgefüllt und weitere 12 h kultiviert. Antibiotikakonzentration: Ampicillin 100 µg/ml.

2.2.3 Plasmidisolierung mittels Minipröp

Kleinere Mengen Plasmid-DNA können mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ (Qiagen, Hilden) aus 1,5 ml einer Übernachtskultur gewonnen (LB-Medium inkl. 50 µg/ml Antibiotikum) werden.

Basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim *et al.* 1979) wird die Plasmidpräparation gemäß Herstellerangabe durchgeführt. Wichtig hierbei ist die vorherige Verdauung der RNA durch Hinzufügen von RNase A zu Beginn der Präparation.

Nach der alkalischen Lyse wird neutralisiert und mit 3 M Kaliumacetat (pH 5,5) an Hochsalzbedingungen angeglichen. Das hat zur Folge, dass denaturierte Proteine, membrangebundene chromosomale DNA, sowie Zelltrümmer präzipitieren und abzentrifugiert werden können (10 min), während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt.

Anschließend wird der Überstand auf eine QIAprep-Spin Säule gegeben. Sie fungiert als Anionenaustauscher, der mittels Silikagel-Membran für eine selektive Adsorption der Plasmid-DNA sorgt. Nach den Aufreinigungsschritten kann die Plasmid-DNA von der Säule eluiert werden.

Die Ausbeute an Plasmid-DNA liegt bei etwa 10 µg pro Ansatz. Gelöst wird die DNA durch direkte Elution von der QIAprep Säule in 50 µl Puffer oder H₂O. Aufbewahrt wird sie bei –20°C (Konzentration = 0,2 µg/µl).

2.2.4 Maxi-Plasmidpräparation

Um Plasmid-DNA in größeren Mengen zu isolieren werden ebenfalls Ionenauschersäulen (Qiagen) benutzt.

Zunächst wird eine Vorkultur (5 ml LB-Medium mit Antibiotikum) mit entsprechenden plasmidtragenden Bakterien angeimpft und 8 h bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Die darin angewachsene Bakterienkultur wird in einem Verhältnis von 1/100 bis 1/1000 frischem LB-Medium (mit Antibiotikum) zugesetzt und 16 h über Nacht bei gleichen Bedingungen geschüttelt.

10 µl RNase A (10mg/ml) und 1 µl RNase T1 (0.3 U/µl) pro ml P1-Puffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0) wurden frisch zugeben. Zellen aus der Übernachtskultur werden abzentrifugiert und in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Danach werden 10 ml P2-Puffer (200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS) und 10 ml P3-Puffer (2.55 M Kalium-Acetat, pH 4.8) zugeben, sofort sechsmal invertiert und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird für 30 min bei 3700 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Säule wird inzwischen für mindestens 10 min mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert und dann der Zentrifugationsüberstand auf die Säule gegeben. Es folgt zweimaliges Waschen der Säule mit 20 ml QC-Puffer und anschließend die Elution der DNA mit 15 ml QF-Puffer. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wird die DNA gefällt und dann für 30 min bei 3200 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nach Abziehen des Überstands wird das DNA-Pellet mit 5 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen und für 2 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird quantitativ abgenommen, das DNA-Pellet 5 min bei RT getrocknet und danach in 500 µl 0,1 mM TrisCl pH 8,0 resuspendiert. Zum Lösen der DNA wird diese für 5 min auf 70°C erhitzt und danach kurz abzentrifugiert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wird mittels Photometer bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.5 Konservierung von Bakterienstämmen

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

2.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

2.2.7 DNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt in 0,8 bis 2,5%igen horizontalen Agarosegelen, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid [10 mg/ml]. Hierbei wandert die negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. DNA-Fragmente werden so durch die Molekularsiebwirkung der Agarose entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Ethidiumbromid ist ein fluoreszierendes, interkalierendes Molekül, welches sich zwischen die Basenpaarstapel der DNA einlagert und so das Molekül im UV-Durchlicht sichtbar macht (UV-Transilluminatoren der Wellenlängen 366 nm und 254 nm, Bachofer, Reutlingen).

Für Gele und Laufpuffer werden sowohl TBE (10xTBE: 0,9 M Tris/Cl, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,3) als auch TAE (10xTAE: 0,4 M Tris Acetat, 0,02 M Na₂EDTA x 2H₂O) eingesetzt. Für das Auftragen der DNA wird 10x DNA-Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau (w/v), 30% Glycerin) benutzt.

2.2.8 Restriktionsverdau

Um DNA-Inserts gezielt aus Vektoren zu isolieren wird mit Restriktionsenzymen der Firma NEB verdaut, die entsprechende Schnittstellen in der „multiple cloning site“ (MCS) des Vektors erkennen, welche das Insert auf beiden Seiten flankieren.

Für einen Restriktionsverdau werden die vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen, unter Verwendung der mitgelieferten Reaktionspuffer (NEB 1-4, ggf. Spezialpuffer sowie BSA) eingehalten. Als Standardansatz galt folgendes Schema:

0,5 µg DNA
2 µl 10 × Puffer
1 U/µg DNA Restriktionsenzym/Schnittstelle/Stunde
H₂O ad 20 µl

Inkubation: 2 Stunden, 37°C

Das Enzym soll in 3- bis 4-fachem Überschuss vorliegen und das Volumen der Enzymlösung maximal ein Zehntel des Gesamtvolumens betragen. Nach Beendigung der

Reaktion wird das Restriktionsenzym, falls notwendig, nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert.

2.2.9 Herstellen des Gels und Gellauf

Die Agarose wird durch Aufkochen in 1xTBE/1xTAE gelöst, nach Abkühlen auf ca. 60°C mit EtBr (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt und anschließend in einen abgedichteten Gelschlitten mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach Verfestigung der Agarose wird der Kamm entfernt, der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer gegeben und die Kammer soweit mit entsprechendem Puffer befüllt, bis das Gel mit Puffer bedeckt ist. Die aufzutrennenden Proben, versetzt mit 10 × Probenpuffer (Endkonz. 1 ×), werden in die Taschen pipettiert und mit einer konstanten Spannung von 10 V pro cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Die aufgetrennten Fragmente werden mit einer Kamera fotografiert und zur Dokumentation auf einem Videoausdruck festgehalten. Es können so Banden sichtbar gemacht werden, die nur 20-50 ng DNA enthalten. Um die jeweilige Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente abzuschätzen werden bei der Elektrophorese zum Größenvergleich verschiedene DNA Größenmarker (1 kb, 1 kb Plus, 100 bp ladder, High Molecular Weight, HMW-Marker, Firma Invitrogen), versetzt mit Probenpuffer, mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei ausreichender Auftrennung beendet.

2.2.10 Poly-Acrylamid Gel Elektrophorese (PAGE)

Zur Trennung besonders kleiner DNA-Fragmente werden statt der horizontalen Agarosegele, vertikale Poly Acrylamid Gele benutzt.

Das Gel wurde wie folgt angesetzt:

2,5 ml 10xTBE

0,5 ml APS 10%

50 µl Temed

27 ml H₂O

20 ml Acryamid:Bis (37,5:1)

Die Gelmischung wird zügig zwischen zwei Glasplatten (20x16 cm), durch Abstandhalter (1 mm) voneinander getrennt, bis knapp unter die Glasplattenkante gegossen und der Probenkamm unverzüglich eingesetzt. Nach Auspolymerisierung des Gels (mind. 30 min) werden die Gelplatten in die Elektrophoresekammer gespannt und oberer und unterer Puffertank mit TBE-Puffer befüllt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 300 V für 3-4 Stunden.

2.2.11 Extraktion der DNA aus dem Gel

DNA aus Gelelektrophoresen wird mit Hilfe des „Qiagen Gel Extraction Kit“ aus dem Agarosegel extrahiert und weiterbehandelt.

Die entsprechende Bande wird unter der UV-Lampe mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel (Kapitel 2.2.9) ausgeschnitten und die Agarose durch Pufferzugabe und Erwärmen auf 50°C wieder verflüssigt. Dabei ist es essentiell, dass der pH-Wert nicht über 7,5 ansteigt, was mittels Indikator kontrolliert wird.

Im weiteren Verlauf funktioniert die Extraktion nach dem gleichen Prinzip wie die Minipräp (Kapitel 2.2.3). Die verflüssigte Agarose mit der darin enthaltenen DNA wird an eine Silikagelmembran gebunden, mehrmals aufgereinigt und mit 30 µl H₂O oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) eluiert. Durch Auftragen von 1/10 Volumen des Gelextraktionsansatzes auf einem DNA-Gel wird der Erfolg der Gelextraktion sowie die Konzentration des Fragments überprüft. Die erhaltene DNA wird direkt im Anschluss weiter verwendet oder bei –20°C gelagert.

2.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden homolog-kohäsive (sticky ends) bzw. stumpfe Enden (blunt ends) von DNA-Fragmenten miteinander verknüpft. Die hierzu notwendige DNA-Ligase ist in eukaryontischen Zellen ein wichtiges Reparaturenzym für aufgebrochene Phosphodiesterbindungen in der DNA. Bei Klonierungsexperimenten kann diese Eigenschaft des Enzyms dazu genutzt werden, DNA-Moleküle *in vitro* miteinander zu verknüpfen. Die hierbei am häufigsten eingesetzte Ligase ist die T4-DNA-Ligase, die sich aus mit dem Bakteriophagen T4 infizierten *E. coli*-Bakterien isolieren lässt.

Die gewünschten PCR-Fragmente können nach elektrophoretischer Auftrennung (Kapitel 2.2.7) und anschließender Gelextraktion (Kapitel 2.2.11) in Plasmidvektoren ligiert werden. Dafür wurde zuerst die Konzentration der extrahierten DNA bestimmt, um

ein optimales Mengenverhältnis von Vektor:Insert von 1:3 einstellen zu können. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wird der Vektor pGEM®-T Easy (Promega, Mannheim) verwendet. Der Plasmidvektor liegt linearisiert vor und trägt an beiden Enden ein 5'-überhängendes dTTP-Nukleosidtriphosphat. Damit ist er kompatibel zur Klonierung von PCR-Produkten, die ein 3'-überhängendes Adenosintriphosphat an beiden Seiten tragen. Alle Ligationen werden in mitgelieferten Rapid Ligation Buffer, T4-DNA-Ligase unter Zusatz von T4-DNA-Ligase (3 Weiss units/ μl) und einem Reaktionsvolumen von 10 μl angesetzt. Die Ligation erfolgt entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht.

Der Vektor und das zu ligierende Insert werden in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:6 eingesetzt. Diese Ligationsansätze werden vollständig in kompetente Bakterien (Kapitel 2.2.1) des *E.coli* Stammes TOP10 oder JM109 (Fa. Promega) transformiert und auf IPTG/X-Gal-haltigen LB-Agarplatten (Kapitel 2.1.8) mit Ampizillin ausplattiert. Über Blau-Weiß-Selektion können solche Bakterienklone identifiziert werden, die erfolgreich transformiert sind. Diese Bakterienkolonien werden als Flüssigkulturen (Kapitel 2.2.2) vermehrt, die Plasmide präpariert (Kapitel 2.2.3) und über Restriktionsverdau (Kapitel 2.2.8) und Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.7) der Erfolg der Ligation getestet.

2.2.13 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Um Proteine oder einzelne Nukleotide aus einer DNA-Lösung zu entfernen (beispielsweise genomische DNA aus Mausschwänzen), wird eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Proteine werden durch Phenol gefällt und bilden nach Zentrifugation eine weißliche Interphase. Nukleinsäuren verbleiben in der wässrigen Phase.

Die auszuschüttelnde Lösung wird je zweimal mit 1 Volumen Phenol/Chloroform-Gemisch 1 Minute gevortext und zur Phasentrennung kurz zentrifugiert (5 Minuten, 10000 g). Die wässrige Phase wird in ein neues Gefäß überführt und mit je 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Anschließend wird die wässrige Phase erneut in ein sauberes Gefäß überführt und die DNA mit Isopropanol oder Ethanol gefällt (Kapitel 2.2.14).

2.2.14 Nukleinsäurepräzipitation mit Ethanol

Nukleinsäuren bilden in Anwesenheit von niedrigen Konzentrationen einwertiger Kationen bereits innerhalb weniger Minuten ein Präzipitat, das leicht durch Zentrifugation (10 Minuten) gewonnen werden kann.

Die entsprechenden Proben werden mit 2 Volumina Ethanol oder Isopropanol und einer Lösung von einwertigen Kationen gemischt, kurz invertiert und 10 Minuten bei 10000 g abzentrifugiert. Anschließend wird das Pellet bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und in geeignetem Puffer und Volumen aufgenommen.

2.2.15 Aufreinigung von DNA

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

2.2.16 Genotypisierung mittels PCR

Die Genotypisierung der mTERC^{+/+}, mTERC^{+/-} und mTERC^{-/-} Mäuse erfolgt in folgendem 25 µl Ansatz: 1 µg DNA, 1x PCR Puffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, je 0,4 pmol mTRR-Primer, 5ppgK-Primer und TRwtF-Primer, sowie 0,01 U Taq DNA-Polymerase. Nach einer initialen Denaturierung für 2 min bei 94°C folgen 30 Zyklen aus Denaturierung für 30 sec bei 94°C, Annealing für 30 sec bei 55°C und Verlängerung für 30 sec bei 72°C. Abschließend folgen 4°C bis zum Auftragen der PCR-Produkte auf einem 2% Agarosegel, versetzt mit 25 µl Ethidiumbromid [1 mg/ml] auf 100 ml Agarosegel. Für mTERC^{+/+} Wildtyp Mäuse wird ein 250 bp Produkt erwartet, für mTERC^{-/-} Mäuse eine 180 bp Bande und beide Produkte für heterozygote mTERC^{+/-} Mäuse (Abb. 7).

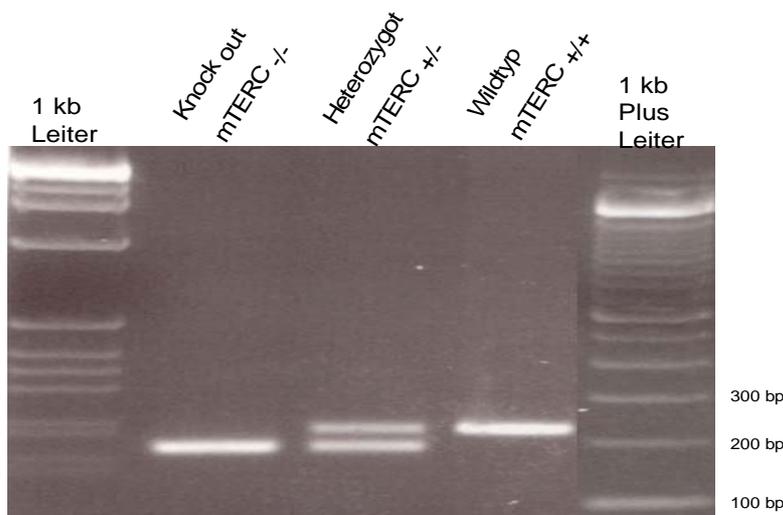


Abb. 7: Darstellung der PCR Produkte nach Genotypisierung von mTERC Mäusen. Die erste Reihe zeigt die 180 bp Bande eines Telomerase knockout ($mTERC^{-/-}$) Tieres, die zweite Reihe die beiden Fragmente einer heterozygoten $mTERC^{+/-}$ Maus. Die letzte Reihe die 250bp Bande einer Wildtyp Maus ($mTERC^{+/+}$). Flankiert werden die PCR-Produkte von einer 1 kb-Leiter zur Linken und der 1 kb Plus Leiter zur Rechten.

2.2.17 PCR mit RNA (RT-PCR)

Um RNA als Template für PCR-Reaktionen zu verwenden, muss sie anfänglich über das Enzym Reverse Transkriptase (RT) in cDNA überschrieben werden. Daher die Bezeichnung RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR). Anschließend kann mit der einzelsträngigen cDNA eine PCR durchgeführt werden. Dazu werden jeweils 2 μg RNA (auf 10,5 μl mit ddH₂O) RNase blocking Enzym gemischt und einem Mastermix (10 pM Oligo(dT)₁₅-Primer, 1xPuffer, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP) zugefügt und für 10 min bei 70°C denaturiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Der Ansatz wird kurz auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 1 μl SuperScript™ II-RT (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) für 1-2 h bei 42°C inkubiert (cDNA-Synthese). Die RT-Reaktionen werden durch Inkubation bei 70°C abgestoppt und anschließend die RNA durch Zugabe von RNase H degradiert. Der Erfolg der RT-Reaktion wird mittels spezifischer Primer (RPS) getestet und die Konzentration photometrisch bestimmt (2.2.6). Anschliessend können variable Mengen einzelsträngiger cDNA mittels spezifischer Primer in folgenden PCR-Reaktionen amplifiziert werden.

2.2.18 Quantitative RT-PCR

Mittels dieser Technik wird die RNA aus Mausembryonen (Einzeller bis Blastozystenstadium) in cDNA umgeschrieben, amplifiziert und zur weiteren Analyse auf Dot Blots

fixiert. Die Präparationen der Embryonen, RT-PCR und alle weiteren Analysen der Dot Blots erfolgten im Labor von Keith E. Latham, Ph. D., Temple University School of Medicine, Philadelphia, USA.

Diese Methode ermöglicht die Amplifizierung von cDNA mittels PCR, ohne selektiven Einfluss auf bestimmte RNAs, aufgrund ihrer Größe auszuüben, indem die Länge der transkribierten Produkte limitiert wird. Die reverse Transkription erfolgt ohne vorherige mRNA-Aufreinigung direkt im Lysis-Puffer, der bereits Teil der RT-PCR Reaktion ist. (Rambhatla *et al.* 1995). Alle Reagenzien und Lösungen werden auf RNase-Kontamination getestet und ggf. neu angesetzt. Pipetten, Pipettenspitzen und Reagenzgefäße werden mit UV-Licht (UV-Stratalinker, Stratagene) behandelt.

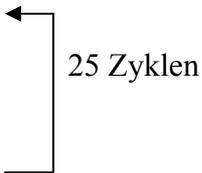
Nach erfolgreicher reverser Transkription wird die cDNA wie folgt mittels PCR amplifiziert:

Pro PCR-Ansatz:

5 μ l 10 x PCR buffer (0.1 M Tris-HCl , pH 8.3, 0.5 M KCl, 0.025 M MgCl₂)
 2.5 μ l 1 % Triton X-100
 1 μ l XT-EcoRI primer [3.3 μ g/ μ l]
 0.5 μ l BSA [10 mg/ml]
 2 μ l dNTPs [jeweils pre-mixed 25 mM each]
 34 μ l steriles Wasser
 1 μ l Taq DNA Polymerase
 4 μ l RT-PCR reaction

PCR-Programm:

94 °C 5 min
 94 °C 1 min
 42 °C 2 min
 72 °C 6 min plus 10 sec pro Zyklus



25 Zyklen

1/20 Volumen des PCR-Ansatzes wird gelektrophoretisch getestet, um die Amplifizierung der cDNA mit der erwarteten Fragmentgrößenverteilung nachzuweisen.

2.2.19 Herstellung der Dot Blots

Die mittels quantitativer RT-PCR gewonnene cDNA wird auf einer Nylonmembran fixiert (crosslink). Die Dot Blots können mit radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert werden. Dabei korreliert die Intensität der Signale mit der Expression der Gene.

10 µl des re-amplifizierten oder 5 µl des originalen PCR-Produkts werden mit 300 µl 0,3 M NaOH versetzt, gemischt und für 30 min bei 65°C inkubiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird jedem Ansatz 125 µl 20xSSC (3 M NaCl, 0,3 M Tri-Natrium Citrat) hinzugefügt und gevortext.

10 µl des re-amplifizierten PCR-Produkts oder 5 µl des originalen PCR-Ansatzes werden mit 300 µl 0,3 M NaOH versetzt und gemischt. Die Reaktionsansätze werden 30 min bei 65°C und anschließend weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wird jedem Ansatz 125 µl 20xSSC zugegeben und bei 4°C zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Eine zuvor mit 10xSSC äquilibrierte Nytran Membran wird auf Whatman Papier in die Blot-Apparatur eingespannt und an ein Vakuum angeschlossen. Nach vorherigem Waschen der Wells wurden diese mit der cDNA beladen und erneut gewaschen. Auf diese Weise können pro Blot 96 Proben auf der Membran fixiert werden. Die cDNA wird mittels Crosslink-Verfahren und anschließendem Backen im Vakuumofen auf der Membran immobilisiert.

Die Membran wird zusammen mit einem Standard (1 µl einer 100.000 fachen Verdünnung von [α -³²P]dCTP, welches unverdünnt eine Aktivität von 10 µCi/µl hat) über Nacht auf einem Fuji phospho-imaging screen exponiert und die Signale mit Image Gauge 4.0 software quantifiziert und dient als Hintergrundabgleich bei weiteren Analysen. Die Aktivität des Standards wird in counts per minute (cpm) gemessen und dient später zur Quantifizierung des Hintergrunds.

Diese Arbeiten erfolgten im Labor von Keith E. Latham, Ph. D., Temple University School of Medicine, Philadelphia, USA.

2.2.20 Radioaktive Markierung der cDNA-Sonden

Das Markieren der Proben erfolgt mit Hilfe des Prime-It[®] II Random Primer Labelling Kit (Stratagene[®]). 25 ng DNA werden zusammen mit "of random oligonucleotide" Primern bei 100°C für 5 min denaturiert und auf Eis gekühlt. Nach Zugabe des CTP-Puffers, [α -

^{32}P dCTP (3000 Ci/mmol) und Exo(-)Klenow-Enzyme (5 units/ μl) wird der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert.

Um die Aktivität der inkorporierten Radionuklide zu bestimmen wird ein aliquotärer Teil des Reaktionsansatzes auf einem Glas-Fiber-Filter fixiert. Die Aktivität, die für die Hybridisierung für einen Dot Blot in einem Volumen von 20 ml Church Puffer benötigt wird, wird nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\frac{\text{Gebrauchte Aktivität (gewöhnlich } 1 \times 10^6 \text{ pro ml) x Volumen Hybridisierungspuffers (20 ml)}}{\text{Gemessene Aktivität (pro } \mu\text{l)}}$$

Nach erneuter Denaturierung und Abkühlung der Sonde ist diese bereit zur Verwendung auf Dot Blots.

Beispiel:

Probenaktivität von 599157 cpm auf dem Glas Fiber Filter mit einer Aktivität von 299578.5 cpm pro μl : $1.000.000 \text{ ml}^{-1} \times 20 \text{ ml} : 299578.5 \text{ } \mu\text{l}^{-1} = 66.8 \text{ } \mu\text{l}$ Sonde für Hybridisierung.

Diese Arbeiten erfolgten im Labor von Keith E. Latham, Ph. D., Temple University School of Medicine, Philadelphia, USA.

2.2.21 Hybridisierung der Dot Blots mit radio markierten cDNA-Sonden

Die Dot Blots werden in geeigneten Hybridisierungsflaschen für 2 h bei 65°C in Church Puffer (0,5 M NaH_2PO_4 , 0,5 M Na_2HPO_4 , 7% SDS, 1 mM EDTA pH 8) inkubiert. Anschließend wird der Church Puffer durch frischen Church Puffer mit angemessener Menge radioaktiv markierter Sonde ersetzt und die Membran über Nacht bei 65°C hybridisiert.

Nach mehrmaligem Waschen mit "High wash" (40 mM NaH_2PO_4 , 40 mM Na_2HPO_4 , 1%SDS) werden die Blots in Folie eingeschweißt und zusammen mit demselben Standart, der bereits zur Hintergrundmessung benutzt wurde, in einer Photokassette einer Fuji Phospho-Imager Membran exponiert. Dabei ist die Belichtungszeit abhängig von der Stärke des radioaktiven Signals. Schließlich wird die Fuji Membran gescant und die Menge der Hybridisierung mit der Image Gauge 4.0 Software gemessen. Die Aktivität des Standarts wird auf dieselbe Weise gemessen und bei der anschließenden Quantifizierung

der Dot Blots berücksichtigt. Die engültige Auswertung erfolgte wie in Rambhatla *et al.* (1995) beschrieben.

Diese Arbeiten erfolgten im Labor von Keith E. Latham, Ph. D., Temple University School of Medicine, Philadelphia, USA.

2.2.22 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen werden von der Firma Agowa (Berlin) nach dem „Taq Dye Terminator Cycle Sequencing“-Prinzip durchgeführt.

Eine Ansequenzierung (ca. 300 bp) der Plasmide erfolgte vom 5'-Ende her über den Vektor-Primer T3 oder T7. Die so erhaltene Sequenz wird einem Datenbankvergleich unterzogen und interessierende Klone zur weiteren Verwendung ausgewählt.

2.2.23 Sequenzauswertung am Computer

Die Sequenzdaten werden mit Hilfe einer Vielzahl von Computerprogrammen bearbeitet und ausgewertet, die zum größten Teil als „Freeware“ im Internet zur Verfügung stehen. Es folgt eine tabellarische Auflistung (Tabelle 4) der verwendeten Programme und der entsprechenden Internetadressen bzw. Angaben zum Softwarehersteller.

Tab. 4: Verwendete Computerprogramme bei der Sequenzauswertung

Computerprogramm	Herkunft
Align	http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi
Blast NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Chromas	http://www.technelysium.com.au/chromas.html
Revers Complement	http://www2.igh.cnrs.fr/bin/lalign-guess.cgi
Lalign	http://www.expasy.ch/tools/dna.html
Translate	http://www.expasy.org/tools/dna.html

2.3 Tierexperimentelle Methoden

Alle tierexperimentellen Methoden werden unter Berücksichtigung der im Tierschutzgesetz verankerten Richtlinien durchgeführt.

2.3.1 Gewinnung von Mausembryonen

Das Töten der Mäuse erfolgt nach einer CO₂-Narkose durch Genickbruch. Wildtyp und Telomerase knockout Weibchen werden an Tag 2,5 (8-Zell und Morula Stadium) und 3,5 (Blastozysten-Stadium) getötet. Die Gewinnung der Embryonen erfolgt wie beschriebenen von Hogan *et al.* (1994). Die gewonnen Embryonen werden kurz in Medium gewaschen und in Lysis-Puffer (100 mM HCl, 0,1% Triton-X 100) auf die Objektträger überführt. Dort werden sie kurz vor der Trockene mit Essigsäure/Methanol (1:3) fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Von Embryonen späterer Zeitpunkte (Tag 8,5; Tag 10,5 und Tag 13,5) werden Maus Embryonale Fibroblasten (MEF) gewonnen und genauso aufgearbeitet wie Morula oder Blastozyste.

2.3.2 *In vivo* Produktion (IVP) boviner Embryonen

Alle Arbeiten mit bovinem Material werden im Forschungsbereich Biotechnologie des Instituts für Tierzucht der FAL in Mariensee durchgeführt.

Bovine Embryonen werden wie bereits beschrieben *in vitro* hergestellt (Eckert *et al.* 1995; Wrenzycki *et al.* 2001). Um vollständig gereifte, befruchtungsfähige Oozyten zu erhalten, werden Cumulus-Oozyten-Complexe (COC) von Ovarien aus den Schlachthöfen Lübbecke oder Minden *in vitro* in Gruppen von 15-20 in 100 µl TCM-199 Medium kultiviert, das mit 10 IU PMSG und 5 IU HCG (Suigonan, Intervet, Tönisvorst, Deutschland) und 0.1% BSA-FAF (Sigma, #A7030) supplementiert ist. Die Kultur erfolgt unter Siliconöl in luftfeuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 39°C für 24 h. Gereifte COC werden mit 1x10⁶ Spermien/ml (gefroren/aufgetaut) eines fertilen Bullen für 19^h *in vitro* fertilisiert (IVF) (Wrenzycki *et al.* 2001). Zygoten werden bis zum Morula-Stadium (Tag 6 nach Befruchtung) oder Blastozysten-Stadium (Tag 8 nach Befruchtung) in Synthetic Ovidust Fluid (SOF) Medium in einer Gasatmosphäre von 5% O₂, 90% N₂ und 5% CO₂ in Modular Inkubator Kammern (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, No. 615300, Ohio, USA) kultiviert.

2.3.3 *In vivo* Produktion (IVP) boviner Embryonen

In vivo entwickelte bovine Embryonen werden von superovulierten Spendertieren, die mit dem Spermia desselben Bullen wie in der IVF besamt worden sind, gewonnen. Die Embryonen werden 6 (Morula) bzw. 8 (Blastozyste) Tage nach der Befruchtung mit Hilfe etablierter unblutiger Gewinnungsverfahren aus dem Genitaltrakt der Spendertiere gespült (Bungartz *et al.* 1994).

2.3.4 Gewinnung von Embryonen mittels Nukleär-Transfer (NT)

Bovine fetale Fibroblasten stammen von einem 61-Tage-alten weiblichen Fetus der aus einer Schlachtkuh isoliert wurde. Adulte Fibroblasten werden aus Ohr-Biopsien einer adulten Schlachtkuh gewonnen. Gewinnung der Fibroblasten und Anlage der Primärkultur sind in Kues *et al.* (2000) beschrieben. Donorzellen und geklonte Tiere zeigen dasselbe Microsatelliten Muster (nicht gezeigt). Für „Entfernung der Metaphasenplatte (MII)“ werden die gereiften Oozyten kurzzeitig mit Cytochalasin B (7,5 µg/ml) der TCM-air inkubiert. Dadurch wird das Cytoskelett depolymerisiert und die MII Chromosomen können ohne Schädigung der Oozyte entfernt werden. Für die Fusion werden 0,285 M (0,1 mM MgSO₄, 0,05% BSA) dem Medium zugefügt. Geklonte Embryonen und Nachkommen werden wie beschrieben hergestellt (Lucas-Hahn *et al.* 2002; Niemann *et al.* 2002). *In vitro* gereifte Oozyten werden durch Ansaugen des ersten Polarkörpers und der Methaphasen II Platte entkernt. Donorzellen werden pelletiert, in TCM-air resuspendiert und dort bis zum Transfer kultiviert. Eine Oozyte wird in eine 30 µm (äußerer Durchmesser) Pipette gesaugt und vorsichtig in den perivitellinen Raum der Empfängeroozyte transferiert. Die Fusion beider Komponenten wird durch 1-2 DC Pulse von 0,7 kV für 30 µsec (Krüss Zellfusionsgerät) vermittelt. Die Kerntransferkomplexe werden nach 27 h chemisch aktiviert durch Inkubation über 3 Std. in 5 µm Ionomycin (Sigma) in TCM-199 bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen werden die Embryonen in SOF für 6 oder 8 Tage kultiviert. Telomerlängen von Morulae und Blastozysten werden mittels Q-FISH bestimmt.

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 DAPI-Färbung

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

2.4.2 Immunhistochemischer Nachweis von TRF1 und EST1A

Für die immunhistochemischen Nachweise werden bei -20°C gelagerte Embryonen aufgetaut und zunächst für 5 min in 1xPBS gewaschen. Durch 7 min Hitzezitratsäurebehandlung (0,1 mM Zitronensäure, 8 mM Natriumzitat) in der Mikrowelle (240 W) werden die Zellen permeabilisiert. Nach 10 min Abkühlzeit werden die Schnitte für 2 x 5 min in 1xPBS gewaschen und anschließend für eine Stunde in einer feuchten Kammer mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Die Antikörper werden wie folgt jeweils in 1xPBS verdünnt angewendet: rabbit-anti-mouse TRF1: 1:400 und rabbit-anti-human-EST1A: 1:4000.

Zum Entfernen ungebundener Antikörper wird danach in 1xPBS für 3 x 5min gewaschen und anschließend für 45 min in der feuchten Kammer mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert: Cy3-conjugated goat-anti-rabbit (1:300). Nach abschließendem Waschen in 1xPBS wird mit Fluoreszein Mounting Medium mit DAPI eingedeckt und die Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.5 Sondenmarkierung

Mit Hilfe der T4-Polynukleotid Kinase (T4-PNK) lassen sich Phosphatgruppen von Nukleotiden auf das freie 3'-OH-Ende einzelsträngiger DNA übertragen. Die Energie für diese Reaktion stammt dabei aus der Abspaltung der Phosphatgruppe. Durch die Verwendung radioaktiver Nuklide ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (0,37MBq/µl)) werden die TRF-Sonden (Telomer-Repeat-Fragment) markiert. Versuchsansatz wie folgt:

1 µl TFR3 [100 ng/µl]
2 µl PNK-Puffer
2,5 µl [γ -³²P]dATP [0,37MBq/µl]
1 µl T4-PNK (10 U/µl)
ad 20 µl ddH₂O

Der Ansatz wird kurz gemischt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach anschließender Aufreinigung über eine Säule (Amersham) und kurzer Denaturierung bei 95°C war die Probe bereit zur Hybridisierung.

2.6 Telomerlängenbestimmung

Zur Telomerlängenbestimmung werden zwei unterschiedliche Methoden herangezogen. Je nach Anforderung konnte die Telomerlänge entweder mittels Quantitativer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (Q-FISH) oder über Southern Blot ermittelt werden.

Die Q-FISH-Methode wird vor allem bei geringer Zellverfügbarkeit (Oozyten, Mehrzellstadien, Morulae und Blastozysten) angewandt, während sich die Southern Blot Technik auf Grund des hohen DNA-Bedarfs auf Zellen beschränkt, die in größerem Maß zur Verfügung stehen (Weiße Blutzellen, Ohrbiopsien, Fibroblasten, Sperma). Telomere der fetalen und adulten Fibroblasten der Kühe werden mit beiden Methoden analysiert.

2.6.1 Quantitative Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (Q-FISH)

Zur Bestimmung der Telomerlängen werden mit Hilfe einer Fluoreszenz markierten spezifischen PNA Sonde (cy3-OO-(CCC-TAA)₃) die Telomere *in situ* markiert und die Intensität der Signale quantitativ mittels Computersoftware (Lansdorp) ausgewertet. Die Menge gebundener Sonde und damit die Intensität der positiven Signale ist direkt proportional zur der Telomerlänge. Es werden Interphasen-Zellkerne von adulten und fetalen Kuhfibroblasten, sowie Embryonen von Mäusen und Kühen untersucht.

Nach dem Auftauen und Waschen in 1x PBS werden die Schnitte zunächst für 2 min in 4% Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Nach Waschen in 1xPBS folgt nun die Dehydrierung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und abs. Ethanol). Nach Trocknen der Zellen für etwa 5 min werden jeweils 15 µl der Hybridisierungslösung aufgetropft und die Proben eingedeckelt. Bei 80°C wird die DNA

für 3 min denaturiert und anschließend für 2 Stunden in einer feuchten Kammer mit der Sonde inkubiert. Die Deckgläschen werden anschließend in WASH I (70% Formamid; 10 mM Tris pH 7,2; 0,1% BSA) bei kräftigem Schütteln entfernt und die Schnitte für 15 min gewaschen. Nach 3x5 min in TBS-Tween und einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und abs. Ethanol) werden die Proben an der Luft getrocknet und mit DAPI mounting medium eingedeckt. Nach etwa 15 min waren die Chromosomen durch DAPI angefärbt. Die Lagerung der gefärbten Zellen erfolgte bei 4°C bis zur zeitnahen Auswertung. Dazu werden von den Zellen jeweils DAPI- und korrespondierende cy3-Aufnahmen in 1000x Vergrößerung mit einer digitalen Mikroskopkamera bei konstanten Einstellungen (1,5 sek Verschlusszeit) angefertigt. Die cy3-Bilder werden anschließend mit Hilfe des TFL-TELO V1.0a Programms ausgewertet. Als interne Kontrolle dienten Phoenixzellen (2.1.9), die zunächst mit 0,075 M KCl-Lösung lysiert und anschließend mit Essigsäure-Methanol (1:3) fixiert und auf die Objektträger augetropft werden.

Die Umrechnung der TFU (Telomere Fluoreszenz Units) in kilobasen (kb) erfolgte durch Multiplikation mit dem Faktor: 579,1 [TFU]/5,33 [kb]. Die Messung der Phoenix Zellen mittels Southern Blot ergab eine Telomerlänge von 5,33 kb und dies entsprach einer Fluoreszenzintensität von 579,1 TFU.

2.6.2 Southern Blot

Die gängige Methode zur Bestimmung der Telomerlänge ist der Southern Blot. Dabei wird genomische DNA mittels Restriktionsenzymen, die jedoch nicht in der Telomerasequenz schneiden, fragmentiert. Die entstandenen Telomerfragmente unterscheiden sich in ihrer Länge (Telomer-Restriktions-Fragmente, TRF) und bestehen aus einem subtelomeren und einem telomeren Anteil. Die Größe des subtelomeren Anteils ist abhängig von den Schnittstellen der verwendeten Enzyme und dem Methylierungsgrad der DNA (Greider *et al.* 1996). Der Telomeranteil in den Fragmenten variiert aufgrund der unterschiedlichen Telomerlänge der einzelnen Chromosomen einer Zelle (Bass *et al.* 1997).

Die Gewebe- oder Zellproben werden zunächst mit Proteinase K-Puffer (100 mM NaCl₂, 10 mM TrisCL pH 8, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 3 U/ml Proteinase K) bei 56°C verdaut und die DNA anschließend mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. 4 µg gesamtgenomischer DNA werden mit den Restriktionsenzymen Hinf I und Rsa I über Nacht bei 37°C verdaut und Erfolg und Qualität des Verdaus auf einem DNA-Gel überprüft.

Gleiche Mengen des Restriktionsverdau werden auf ein großes TAE-Gel geladen und über Nacht (16 – 18 Stunden) bei 50 V aufgetrennt. Wenn die 2 kb Bande des 1 kb-Molekulargewichtstandards 14 cm gelaufen ist, wird das Gel gestoppt und fotografisch festgehalten. Auf Whatmanpapier wird das Gel 1 h bei 60°C getrocknet und anschließend 30 min denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und weitere 30 min neutralisiert (3 M NaCl, 0,5 M TrisCl pH 7,5). Das Blocken unspezifischer DNA-Bindungsstellen erfolgt in geeigneten Hybridisierungsröhren für 1 h bei 37°C mittels Prähybridisierungslösung (0,05 mg/ml Lachssperma DNA, 5xSSC, 5xDenhardts, 1,5 mM Di-Natrium-Hydrophosphat, 0,1 mM Natrium Pyrophosphat).

Eine telomerspezifische Sonde, (TTAGGG)₃-Oligonukleotid, wird mittels Polynucleotide Kinase (PNK) radioaktiv markiert (1 h, 37°C), über eine Säule aufgereinigt und bei 95°C für 10 min denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wird die fertige Sonde der Prähybridisierungslösung beigefügt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Gel 3 x 10 min bei Raumtemperatur gewaschen (0,25xSSC, 0,1X SDS), in Folie eingeschweisst und über Nacht auf einer Phosphoimager Membran exponiert.

Um quantitative Resultate zu erhalten, wird ein Bio-Imaging Analyser (Fuji Bas 1000, Fa. Fuji Photo Film Co.) und PC-Bas Software (PCBAS Version 2.09f, Fa. raytest Isotopenmessgeräte GmbH) verwendet. Die Berechnung der Telomerlänge erfolgte über das arithmetische Mittel: $C = \Sigma ((OD)_i \times L_i) / \Sigma (OD)_i$, (OD = optische Dichte, i = Intensität, L = Lage)

2.7 Bestimmung der Telomeraseaktivität mittels TRAP-Assay

Die Aktivität der Telomerase wird mittels TRAP Assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol) bestimmt. Der Nachweis erfolgt dabei nicht über Isolierung des Enzyms sondern durch den Nachweis seiner Aktivität. Zunächst werden mittels Telomerase „Telomer-Repeats“ (GGTTAG) an das 3'-Ende eines Oligonucleotids (TS-Primer) angehängt und in einem zweiten Schritt werden diese Produkte durch PCR amplifiziert (Abb. 8). Dabei entsteht eine Leiter aus Produkten, die Vielfache von 6 (Telomer-Repeat) sind und bei 50 Nukleotiden beginnt (50, 56, 62, 68, etc.). Diese relativ kleinen Fragmente werden in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Zur Bestimmung der Telomeraseaktivität wird der TRAPeze Telomerase Detection Kit der Firma Chemicon benutzt.

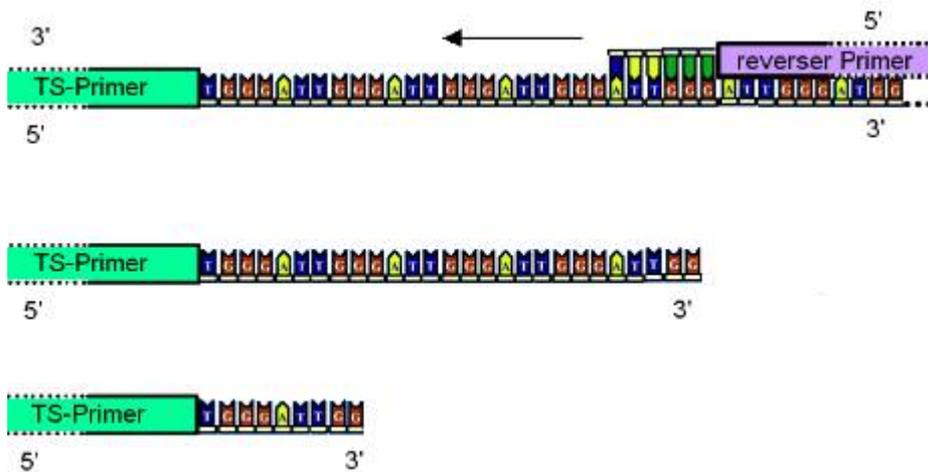


Abb. 8: Prinzip des Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP). In einer ersten Telomerase abhängigen Reaktion werden Oligonukleotide an den TS-Primer geknüpft, die dann in einem zweiten Schritt mittels PCR amplifiziert werden. Der TS-Primer dient dabei als forward-Primer und RP als revers-Primer. (Die Abb. Stammt von <http://www.gymnasium-bethel.de/projekte/bioprojekt/telom7.htm>)

Die Zellen werden in 200 µl CHAPS-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden Zellfragmente bei 12000 x g und 4°C für 20 min abzentrifugiert. 160 µl des Überstandes werden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgt photometrisch und wird mittels externer Kalibration eines Konzentrationsstandards (Bovines Serum Albumin) bestimmt. Insgesamt werden 200 – 300 ng Protein eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle dienten Telomerase exprimierende Zellen (293 Zellen). Als Negativ-Kontrolle wird ein Teil dieser Zellen hitzeinaktiviert, da es sich bei der Telomerase um ein hitze-instabiles Enzym handelt.

Der TS-Primer wird mittels PNK (Polynucleotide Kinase) für 20 min bei 37°C radioaktiv (γ - ^{32}P -ATP) markiert und die Kinase anschließend für 5 min bei 85°C inaktiviert.

Die darauf folgende PCR wird wie folgt angesetzt: 5 µl 10x TRAP Reaction Buffer, 1,0 µl dNTP, 2,0 µl ^{32}P -TS Primer, 1,0 µl TRAP Primer Mix, 0,4 µl Taq Polymerase (5 U/µl), 2,0 µl Proteinextrakt (200 ng/µl), mit Wasser auf 50 µl auffüllen. Der Ansatz wird zunächst für 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend die Fragmente mittels 2-Schritt-PCR amplifiziert (94°C/30 Sekunden, 59°C/30 Sekunden, 30 Zyklen).

Die PCR-Produkte werden mittels PAGE 2.2.10 aufgetrennt, das Gel anschließend getrocknet und über Nacht auf einem Photofilm exponiert.

2.8 Statistische Auswertung

Zur Berechnung der statistischen Signifikanzen und Standardabweichungen wird der „Student's t-test“ und die „Graphpad Instat“-Software benutzt.

3. ERGEBNISSE

Um zu untersuchen, ob es während der frühen Embryogenese bei Säugern zu einer gezielten Verlängerung der Telomere kommt, wurden Maus- und Rinderembryonen untersucht, die durch natürliche Fertilisierung (*in vivo*), *in vitro* Fertilisierung bzw. durch Klonen gewonnen wurden.

3.1 Telomerlängenanalyse der Spenderzellen:

Zunächst wurden die Telomerlängen, der für die Klonierung benutzten adulten und fetalen Fibroblasten mittels Southern Blot oder Q-FISH, bestimmt. Um den Q-FISH Signalen später eine reelle Telomerlänge zuordnen zu können, wurden Telomerlängen von Phoenix-Zellen mittels Southern Blot bestimmt. Beide Methoden zeigten eine gute Korrelation der Telomerlänge.

Bovine fetale Fibroblasten stammten von einem 61-Tage-alten weiblichen Fetus, der aus einer Schlachtkuh isoliert worden war. Adulte Fibroblasten wurden aus Ohr-Biopsien einer adulten Schlachtkuh gewonnen. Vergleicht man beide Zelllinien, die zur Klonierung benutzt wurden, miteinander, so ergaben sich bei beiden Methoden kürzere Telomere in den adulten Fibroblasten verglichen mit den fetalen Fibroblasten.

Die mittels Q-FISH gemessenen Telomerlängen für adulte Fibroblasten betragen $10,84 \pm 5,73$ kb und $14,61 \pm 4,58$ kb für fetale Fibroblasten (Abb. 9). Die mit Hilfe von Southern-Analysen bestimmten Telomerlängen betragen $12,03 \pm 2,51$ kb für adulte bzw. $13,37 \pm 0,46$ kb für fetale Fibroblasten (Abb. 10).

Für die *in vitro* bzw. *in vivo* fertilisierten Embryonen wurden Cumulus-Oozyten-Complexe (COC) von Ovarien aus Spendertieren von Schlachthöfen und Samen eines fertilen Bullen benutzt. Die Telomerlängen der Oozyten konnten auf Grund der geringen Zellzahl ausschließlich mit Hilfe der Q-FISH Technik ermittelt werden. Die Telomere der Spermienprobe wurde dagegen mittels Southern Blot analysiert. Für beide Keimzellen (Oozyten: $16,95 \pm 2,51$ kb, Spermien: $15,83 \pm 0,41$ kb) ergaben sich längere Telomere verglichen mit denen der adulten oder fetalen Fibroblasten, die für die Klonierung eingesetzt wurden (Abb. 9 und 10).

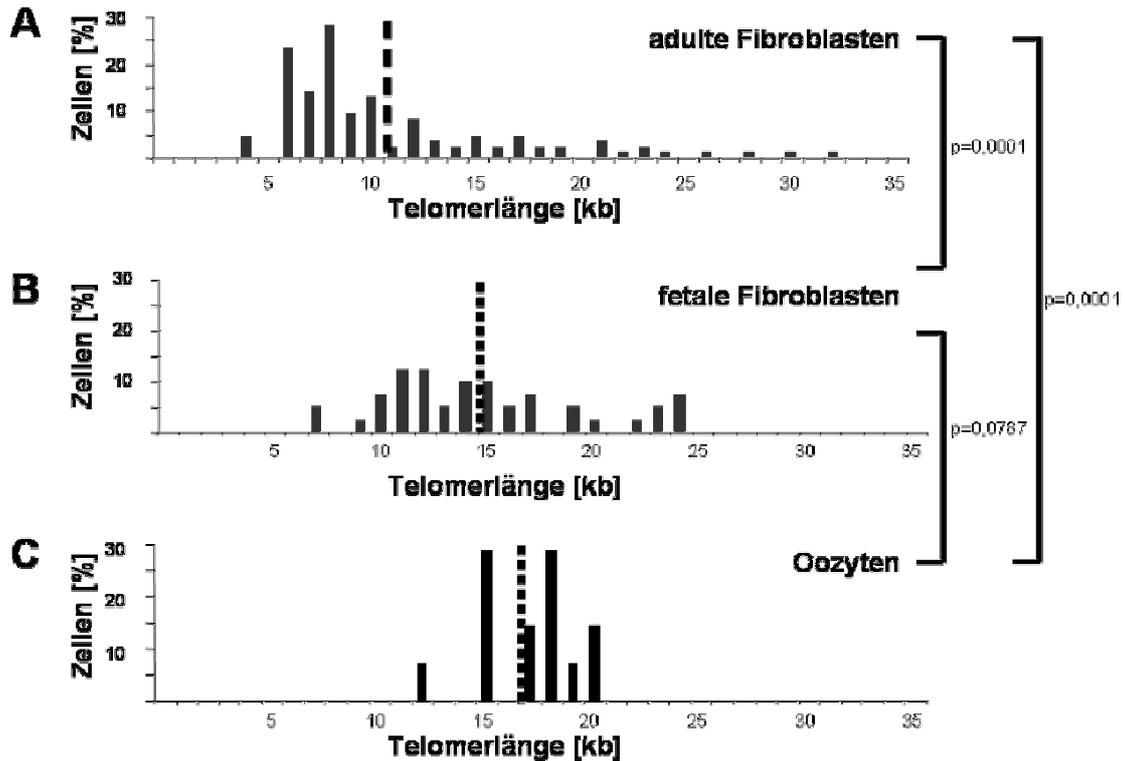


Abb. 9: Telomerlängenbestimmung mittels Q-FISH von bovinen Keimzellen und primären adulten und fetalen Fibroblasten. (A) Verteilung der mittleren Telomerlängen in Zellkernen adulter Fibroblasten ($10,84 \pm 5,73$ kb, $n = 118$), (B) fetaler Fibroblasten ($14,61 \pm 4,58$ kb, $n = 40$) und (C) Oozyten ($16,95 \pm 2,51$ kb, $n=13$). Adulte Fibroblasten haben signifikant kürzere Telomere als fetale Fibroblasten und Oozyten ($p < 0,001$). Der Telomerlängenunterschied zwischen fetalen Fibroblasten und Oozyten ist wahrscheinlich aufgrund der geringen Zellzahl nicht signifikant.

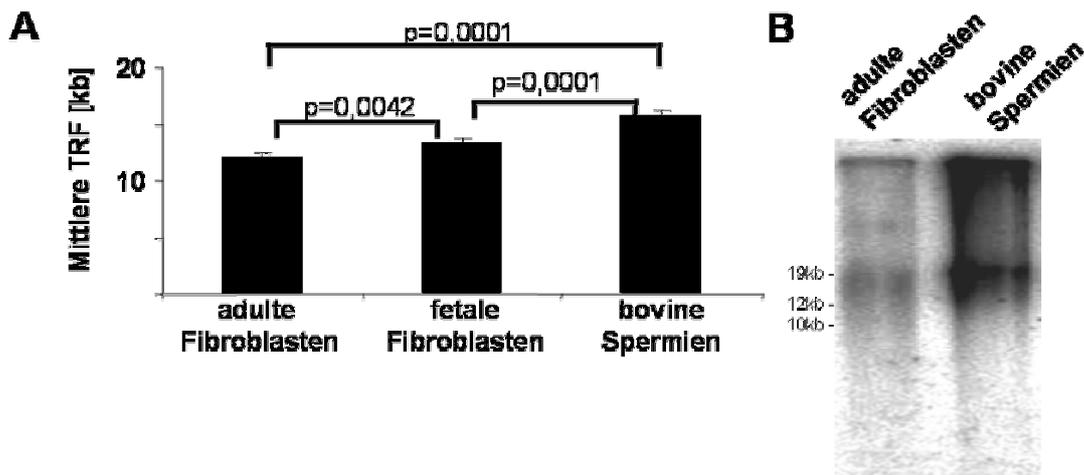


Abb. 10: Telomerlängen-Bestimmung mittels Southern Blot von bovinen Keimzellen und primären Fibroblasten. (A) Histogramm der mittleren Telomer-Restriktions-Fragment-Länge (TRF-Länge) bestimmt durch Dreifachmessung. Telomere waren in beiden Fibroblasten Zelllinien (adulte: $12,03 \pm 2,51$ kb und fetale: $13,37 \pm 0,46$ kb), die für die Klonierung benutzt wurden, signifikant kürzer verglichen mit bovinen Spermien ($15,83 \pm 0,41$ kb).

3.2 Telomerlängenanalyse von bovinen Morulae

Um zu überprüfen, ob das Klonen mit Zellkernen mit kürzeren Telomeren, verglichen mit Keimzellen, Einfluss auf die Telomerlänge während der Embryogenese hat, wurden geklonte bovine Morulae (Tag 6 der bovinen embryonalen Entwicklung), die von fetalen oder adulten Fibroblasten produziert waren, hinsichtlich ihrer Telomer-Länge untersucht. Zur Kontrolle dienten *in vitro* fertilisierte und natürlich gezeugte Embryonen (Abb. 11).

Die Q-FISH Analysen der Embryonen ergaben kürzere Telomere in den geklonten Morulae, unabhängig vom Zellmaterial, mit dem sie geklont wurden (adulte oder fetale Fibroblasten) verglichen zu *in vitro* fertilisierten Morulae oder natürlich gezeugten. Zusätzlich wiesen die geklonten Morulae im Vergleich zu den Kontrollgruppen mehr kürzeren Telomere (< 5 kb) auf (Abb. 11).

Diese Ergebnisse belegen, dass Klonen mit fetalen oder adulten Fibroblasten zu kürzeren Telomeren während der frühen Embryogenese führt, verglichen mit natürlich gewonnenen oder *in vitro* erzeugten Embryonen. Die Telomerlängen der *in vitro* kultivierten Morulae waren vergleichbar mit denen durch natürliche Befruchtung gewonnenen Morulae (Abb. 11A, 11B und 12).

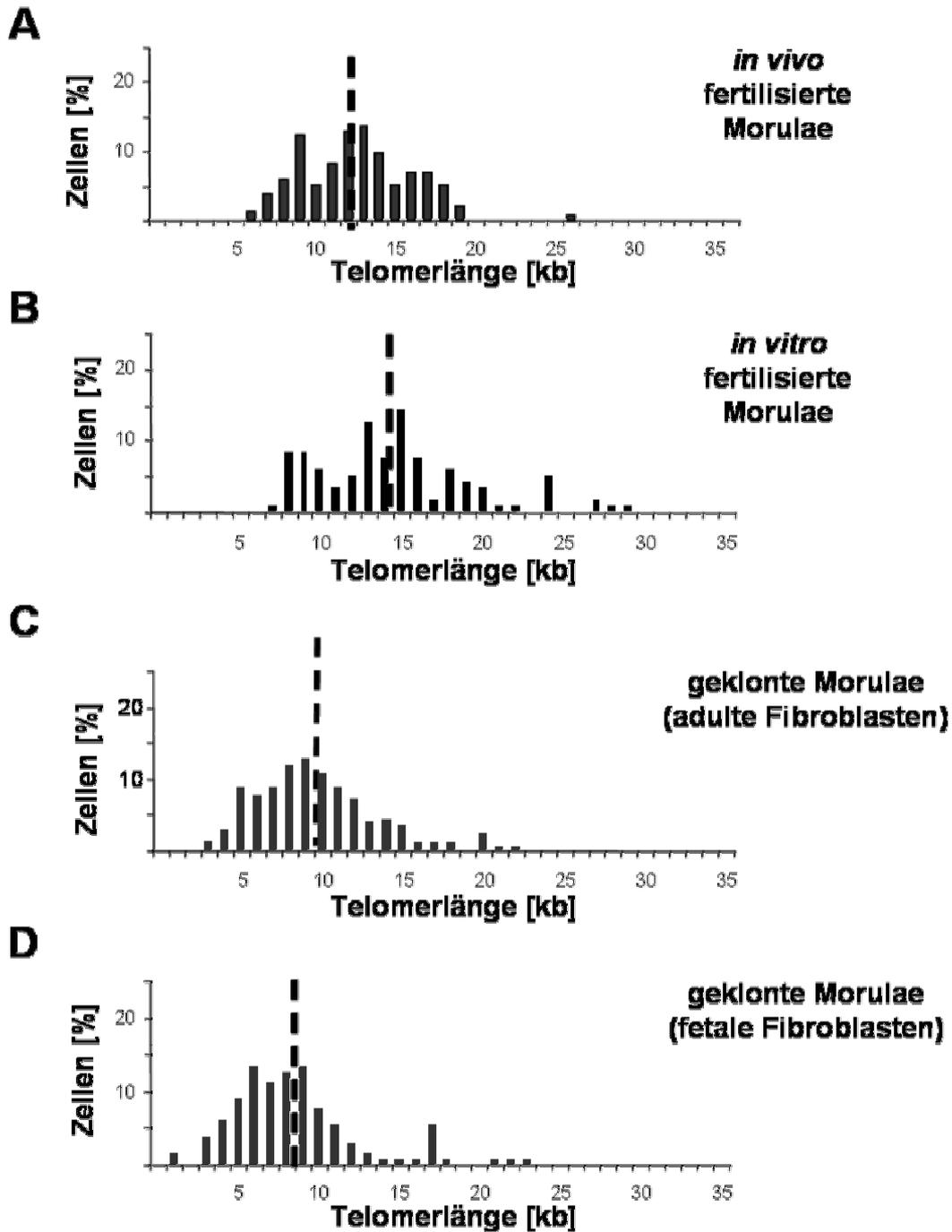


Abb. 11: Telomerlängen von geklonten und fertilisierten bovinen Morulae bestimmt mittels Q-FISH. Verteilung der mittleren Telomerlängen aller analysierten Zellkerne der Morulae (Tag 6 der bovinen embryonalen Entwicklung) aus (A) *in vivo* Fertilisation (12,57 kb, n = 234), (B) *in vitro* Fertilisation (14,37 kb, n = 118), (C) mit adulten Fibroblasten geklonte Morulae (9,66 kb, n = 203) und (D) mit fetalen Fibroblasten geklonte Morulae (8,27 kb, n = 134).

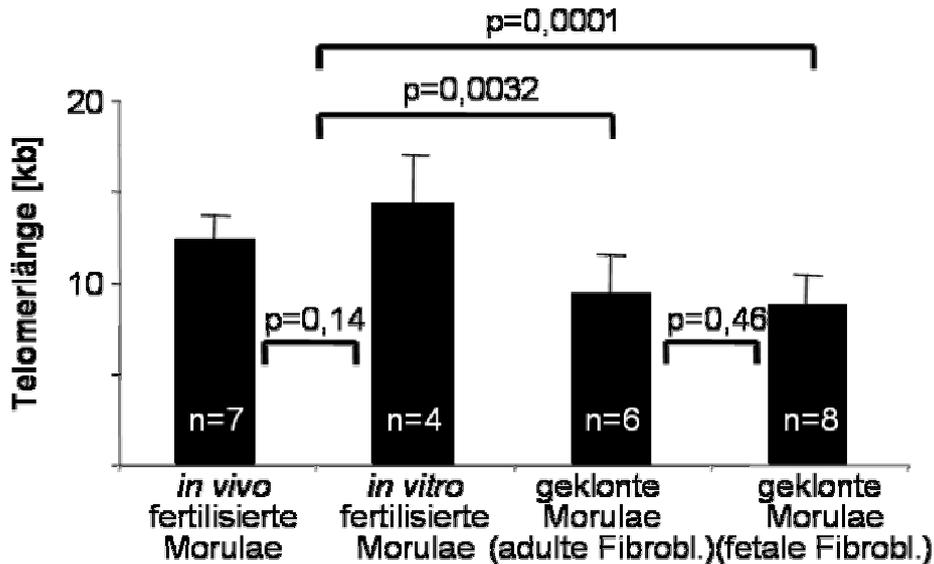


Abb. 12: Mittlere Telomerlängen der einzelnen Morulae von fetalen ($8,71 \pm 1,81$ kb, $n = 8$) und adulten Fibroblasten ($9,47 \pm 2,07$ kb, $n = 6$) geklont, bzw. *in vivo* fertilisierte ($12,42 \pm 1,37$ kb, $n = 7$) und *in vitro* fertilisierte ($14,36 \pm 2,67$ kb, $n = 4$) Morulae. Die Telomerlängen zwischen Morulae, gewonnen durch *in vitro* Fertilisierung, unterschieden sich nicht signifikant ($p=0,14$) von den Embryonen, die auf natürlichem Weg befruchtet wurden (*in vivo*). Die Mittelwerte über einzelnen Embryonen weichen von den in Abb. 11 erwähnten Mittelwerten geringfügig ab. Dies ergibt sich durch die unterschiedliche Berechnung der Mittelwerte. Hier wurde zunächst für jede Morula der Mittelwert bestimmt, die einzelnen Embryonen in Gruppen gepoolt und dann für jede Gruppe nochmal ein Mittelwert bestimmt. In Abb. 3 wurde der Mittelwert über alle fotografierten Zellkerne dargestellt, ohne zwischen einzelnen Embryonen zu unterscheiden. Hieraus resultieren auch die unterschiedlichen Angaben der Anzahlen.

3.3 Telomerlängenanalyse von bovinen Blastozysten

Um zu überprüfen ob es während der Embryogenese zu einer Verlängerung der Telomere kommt, wurden bovine Blastozysten (Tag 8 der bovinen Embryogenese) hinsichtlich ihrer Telomerlängen untersucht. Auch hier wurden wieder geklonte Embryonen bzw. Blastozysten aus *in vitro* Fertilisierung analysiert. Auf eine Telomerlängenbestimmung *in vivo* produzierter Blastozysten wurde verzichtet, da sich bereits bei den Untersuchungen der Morulae gezeigt hat, dass die *in vitro* Kultivierung *per se* keinen Einfluss auf die Telomerlänge hat. Als Kontrolle dienten daher ausschließlich *in vitro* gewonnene Embryonen. Frühere Arbeiten konnten bereits nachweisen, dass es während des Blastozysten-Stadiums in der Embryogenese zur Aktivierung von Telomerase kommt (siehe Einleitung 1.7). Um zu überprüfen, ob auch bei unseren experimentellen Bedingungen, eine Reaktivierung von Telomerase zum Zeitpunkt des Blastozysten-Stadiums stattfindet, wurde nun die Telomerlänge in diesen Telomerase-positiven Blastozysten analysiert. Zur Bestimmung wurde die Q-FISH-Methode benutzt.

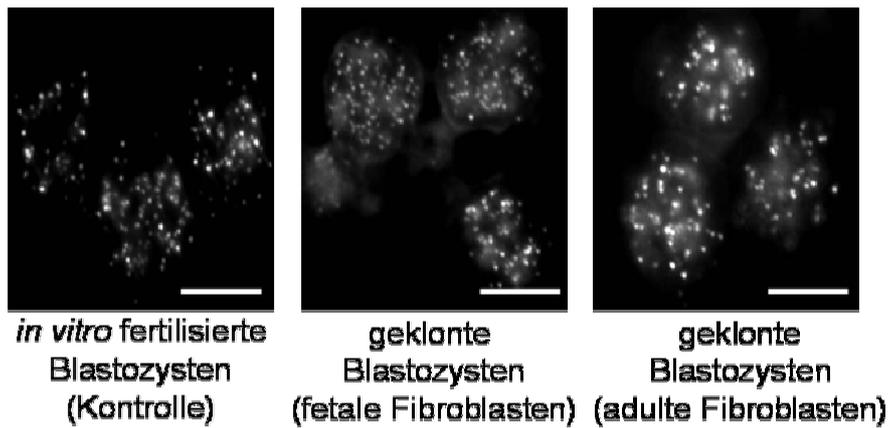


Abb. 13: Repräsentative Bilder von mittels Cy3-markierter Sonde detektierter Telomerspots in Zellkernen von geklonten (fetal und adulte Fibroblasten) sowie *in vitro* fertilisierten Blastozysten (Tag 8 der bovinen embryonalen Entwicklung). Die Intensität der Telomerspots ist abhängig von der Zahl gebundener telomerspezifischer Sonde und damit direkt proportional zur Telomerlänge. Vergrößerungskala: 5µm.

Verglichen mit dem Morula-Stadium zeigten sich längere Telomere während des Blastozysten-Stadiums. Dies galt sowohl für die geklonten Embryonen (aus fetalen oder adulten Fibroblasten geklont), als auch für die *in vitro* fertilisierten Blastozysten (Abb. 13 und 14).

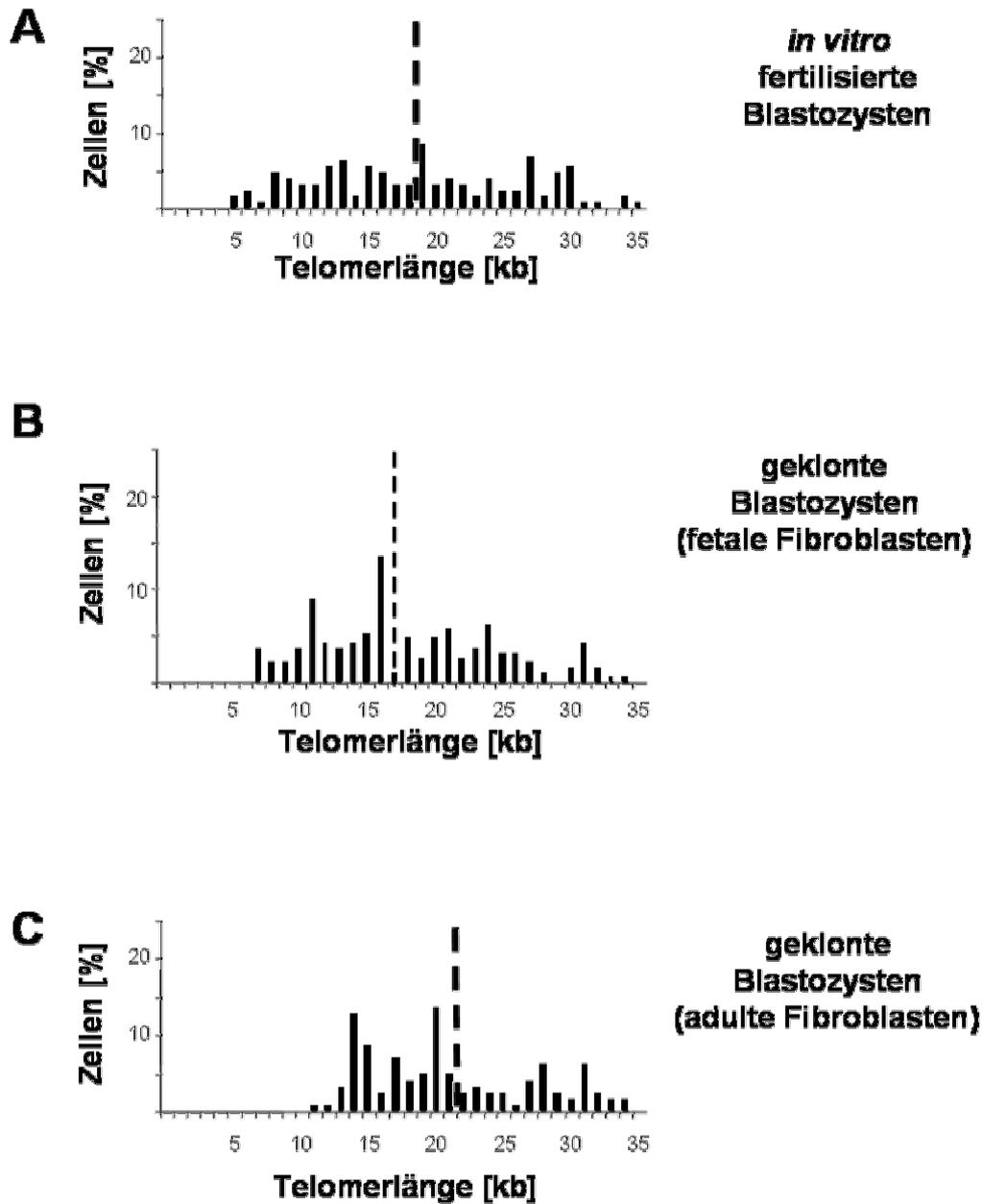


Abb. 14: Telomerlängen von geklonten und fertilisierten bovinen Blastozysten bestimmt mittels Q-FISH. Verteilung der mittleren Telomerlängen aller analysierten Zellkerne der Blastozysten (Tag 8 der bovinen Embryonalentwicklung) aus (A) *in vitro* Fertilisation (18,42 kb, n = 129), (B) mit fetalen Fibroblasten geklonte Blastozysten (17,74 kb, n = 192) und (C) mit adulten Fibroblasten geklonte Blastozysten (21,25 kb, n = 126).

Im Vergleich zu den signifikanten Unterschieden der Telomerlänge in den geklonten Morulae, gab es im Blastozysten-Stadium keine signifikanten Unterschiede der Telomerlänge zwischen den geklonten Embryonen und den *in vitro* fertilisierten Embryonen (Abb. 14 und 15).

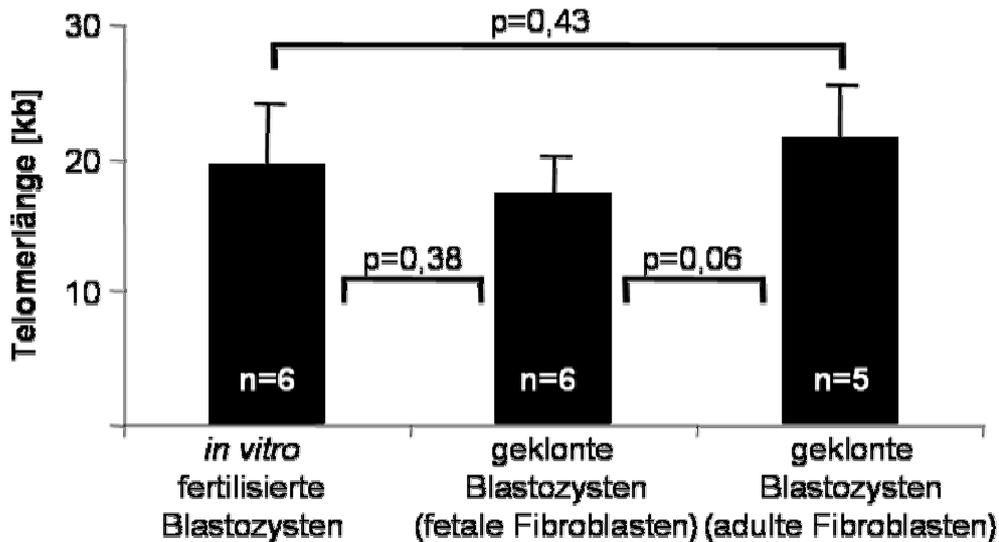


Abb. 15: Mittlere Telomerlängen der einzelnen Blastozysten von *in vitro* fertilisierten Blastozysten ($21,67 \pm 3,921$ kb, $n = 6$), von fetal geklonten Blastozysten ($17,3 \pm 2,66$ kb, $n = 6$) bzw. adult geklonten Blastozysten ($19,53 \pm 4,6$ kb, $n = 6$). In allen untersuchten Gruppen waren die Telomere länger verglichen mit dem Morula-Stadium. Innerhalb der Blastozysten konnten keine signifikanten Unterschiede der Telomerlängen festgestellt werden. Die Mittelwerte über die einzelnen Embryonen weichen von den in Abb. 14 erwähnten Mittelwerten über alle gemessenen Zellkerne geringfügig ab. Dies ergibt sich durch die unterschiedliche Berechnung der Mittelwerte. Hier wurde zunächst für jede Blastozyste der Mittelwert bestimmt, anschließend die einzelnen Embryonen in Gruppen gepoolt und dann für jede Gruppe erneut ein Mittelwert bestimmt. In Abb. 5 wurde der Mittelwert über alle fotografierten Zellkerne dargestellt, ohne zwischen einzelnen Embryonen zu unterscheiden. Hieraus resultieren auch die unterschiedlichen Angabe der Anzahlen.

Tendenziell kam es bei den Blastozysten, die von adulten Fibroblasten geklont wurden, zu einer ausgeprägteren Verlängerung der Telomere, im Vergleich zu den aus fetalen Fibroblasten geklonten Blastozysten (Abb. 14 und 15). Es zeigte sich aber in allen Gruppen eine Verlängerung der Telomere vom Morula- zum Blastozysten-Stadium.

Um die embryonale Telomerverlängerung zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung zu bestätigen, wurde die Telomerlänge von Embryonen, die aus einem einzelnen *in vitro* Fertilisierungsansatzes genommen wurden, untersucht. Auch diese untersuchten Embryonen zeigten einen signifikanten Anstieg der Telomerlängen vom Morula- ($15,8 \pm 3,1$ kb, $n = 6$) zum Blastozysten-Stadium ($28,7 \pm 7,4$ kb, $n = 6$) (Abb. 16).

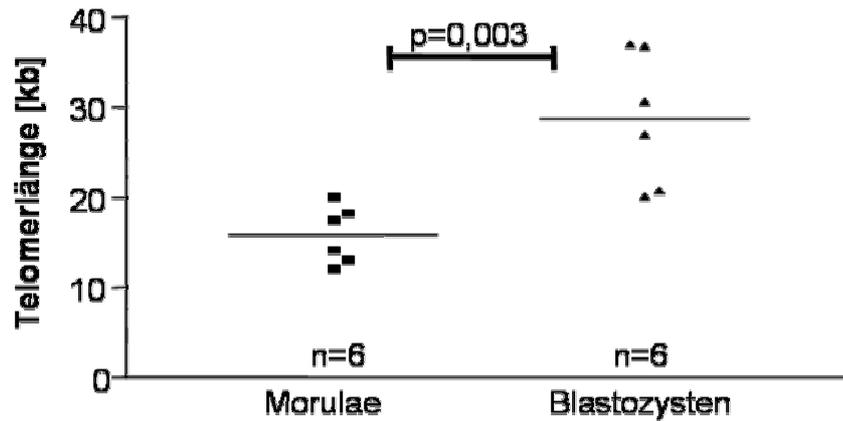


Abb. 16: Mittlere Telomerlängen von *in vitro* fertilisierten Morulae und Blastozysten eines einzelnen *in vitro* Fertilisationsansatzes ermittelt durch Q-FISH. Auch hier kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Telomerlänge vom Morula-Stadium ($15,8 \pm 3,1$ kb, $n = 6$) zum Blastozysten-Stadium ($28,7 \pm 7,4$ kb, $n = 6$).

3.4 Telomerlängen in adulten geklonten und nicht geklonten Rindern

Um zu untersuchen, ob die Telomerlänge postnatal in geklonten Kühen vergleichbar mit der von Kontrolltieren ist, wurde die Telomerlänge erwachsener Tiere (Tab. 5) in zwei unterschiedlichen Zelltypen ermittelt: zum einen in einem Telomerase-positiven Gewebe, den weißen Blutzellen, zum anderen in Telomerase-negativen Fibroblasten aus einer Ohrbiopsie.

Tab. 5: Übersicht der untersuchten Kühe und die gemessene Telomerlänge in Fibroblasten und weißen Blutzellen. Insgesamt wurden 11 adulte Tiere untersucht. Drei Kühe wurden von fetalen bzw. adulten Fibroblasten geklont und fünf Tiere wurden auf natürlichem Weg gezeugt. Die Telomerlänge wurde mittels Southern Blot bestimmt. Für Kuh Nr. 9 wurden nur die Telomerlängen der Fibroblasten bestimmt. Bei Kuh Nr. 11 wurden die Telomerlängen in adulten Fibroblasten nur einmal bestimmt, daher kann keine Standardabweichung angegeben werden.

	Kuh nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht	Telomerlänge [kb]	
				Fibroblasten	Weisse Blutzellen
Von fetalen Fibroblasten geklonte Kühe	1	2	weiblich	12,4 ± 1,1	15,3 ± 0,9
	2	2	weiblich	12,1 ± 0,7	15,7 ± 1,4
	3	2	weiblich	12,8 ± 1,2	14,7 ± 0,9
Von adulten Fibroblasten Geklonte Kühe	4	1	weiblich	11,6 ± 1,3	14,4 ± 1,1
	5	1	weiblich	13,4 ± 0,9	14,3 ± 0,9
	6	0,5	weiblich	13,1 ± 1,2	14,9 ± 0,9
Gleichaltrige Kontroll-Kühe	7	1	weiblich	11,2 ± 0,9	14,7 ± 2,11
	8	2	weiblich	12,0 ± 1,2	17,0 ± 0,5
	9	2	weiblich	11,0 ± 1,0	
	10	2	weiblich	9,2 ± 0,9	16,2 ± 1,0
	11	1	weiblich	9,7	14,1 ± 1,3

Mittels Southern Blot wurden geklonte Rinder, von fetalen und adulten Fibroblasten, sowie natürlich gezeugte, gleichaltrige Tieren (1 bis 2 Jahre alt) untersucht (Abb. 17 und 18). Die Telomerlänge in den weißen Blutzellen der geklonten Tiere, unterschied sich dabei nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe (Abb.17).

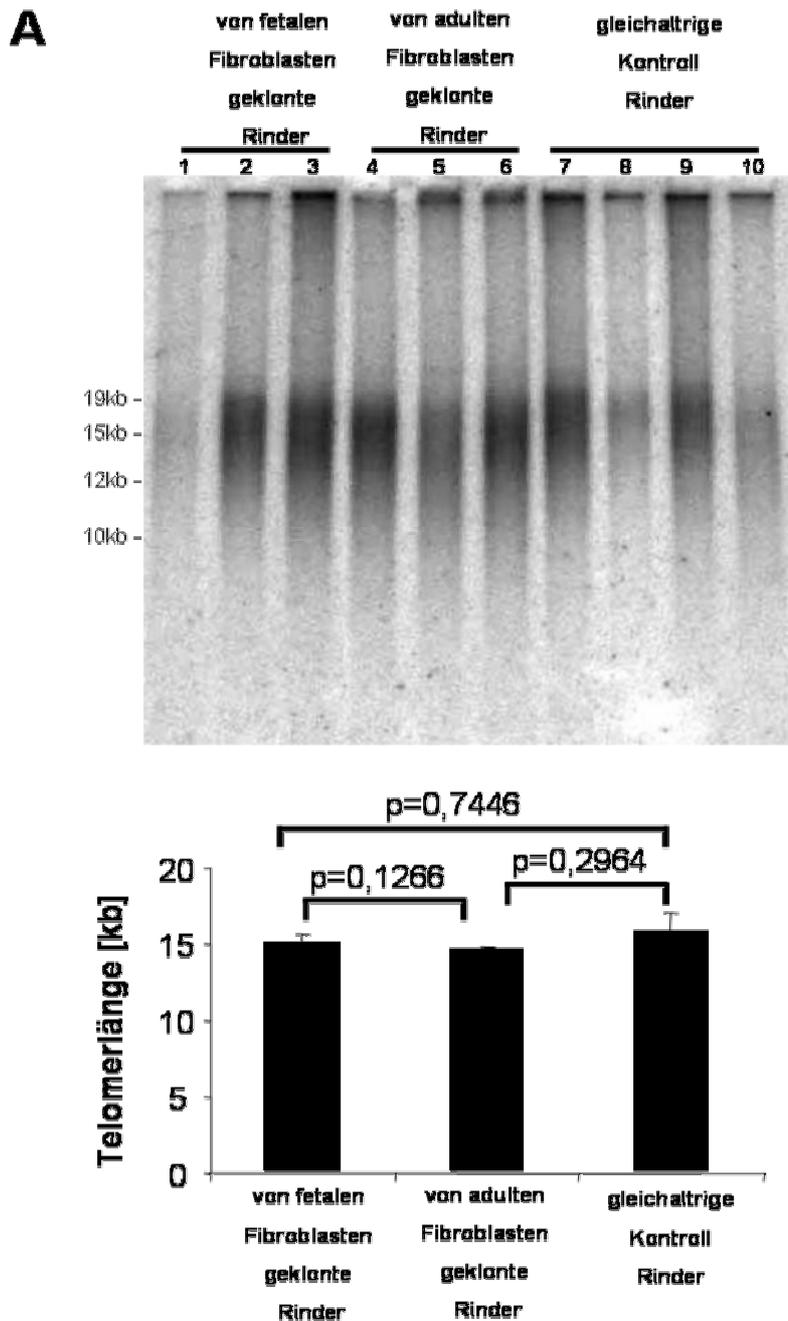


Abb. 17: Telomerlängenbestimmung in weißen Blutzellen von geklonten und natürlich gezeugten Rindern, bestimmt mittels Southern Blot. (A) Repräsentatives Bild eines Southern Blots mit der Verteilung der radioaktiv markierten TRF (Telomer Repeat Fragment) aus DNA weißer Blutzellen der genannten Gruppen. (B) Mittlere Telomerlängen aus weißen Blutzellen der genannten Gruppen bestimmt durch Dreifachmessung mittels Southern Blot. Die Telomerlängen der geklonten Tiere unterschied sich nicht signifikant von der der gleichaltrigen Kontrollgruppe.

In Einklang mit höherer Telomeraseaktivität in Knochenmark verglichen mit geringer oder fehlender Telomeraseaktivität in Hautbiopsien (Counter *et al.* 1995; Hiyama *et al.* 1995; Harle-Bachor *et al.* 1996), wiesen die weißen Blutzellen (Abb. 17) längere Telomere auf als die Zellen der Ohrbiopsien (Abb. 18).

In den Zellen der Ohrbiopsien waren die Telomere geklonter Rinder etwas länger als in der Kontrollgruppe (Abb. 18). Trotz der relativ kleinen Gruppe von Tieren waren die Unterschiede statistisch signifikant.

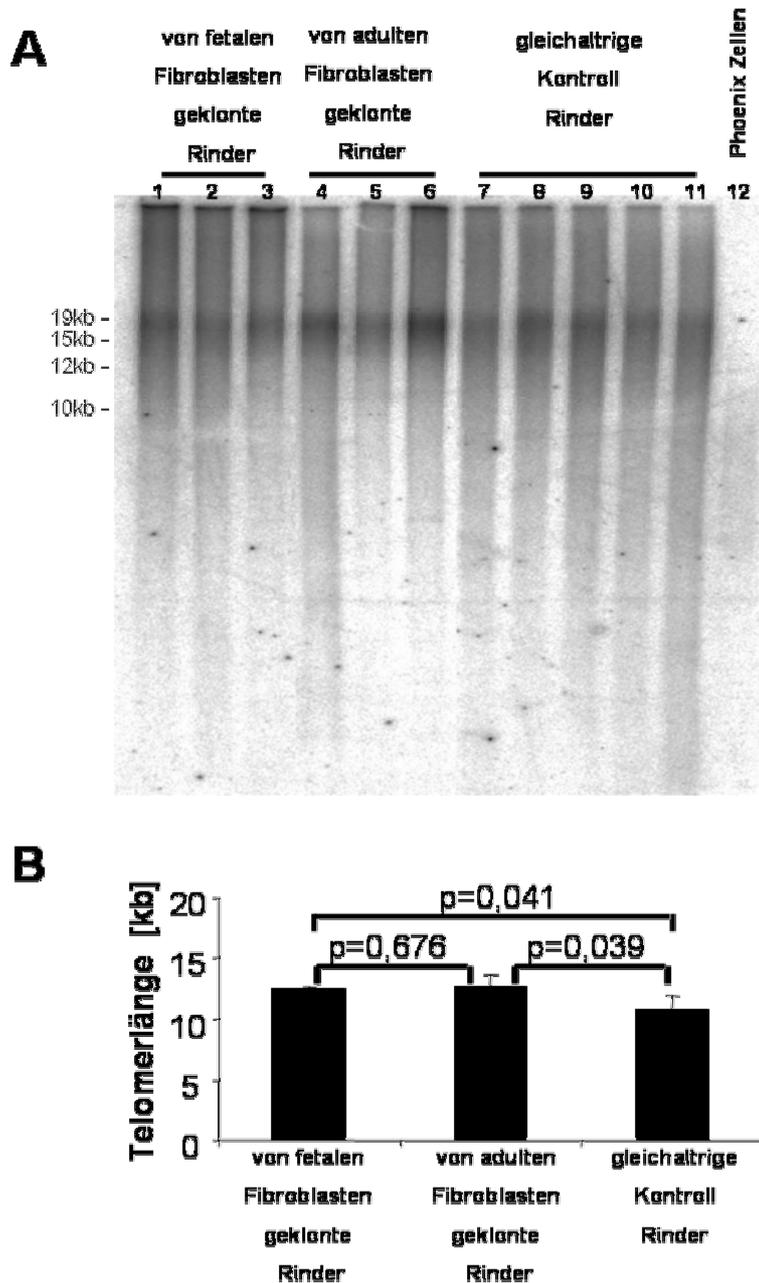


Abb. 18: Telomerlängenbestimmung in adulten Fibroblasten aus Ohrbiopsien von geklonten und natürlich gezeugten Rindern bestimmt mittels Southern Blot. (A) Repräsentatives Bild eines Southern Blots mit der Verteilung der radioaktiv markierten TRFs aus DNA adulten Fibroblasten der genannten Gruppen. Phoenix Zellen dienen als Kontrolle bei den Q-FISH Analysen (B) Mittlere TRF-Längen aus adulten Fibroblasten der genannten Gruppen bestimmt durch Dreifachmessung mittels Southern Blot. Die Telomerlängen der geklonten Tiere unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Allerdings weisen beide Gruppen signifikant längere Telomere verglichen mit den gleichaltrigen Kontrolltieren auf.

Beim Vergleich der Telomerlängen weisser Blutzellen und Fibroblasten aus Ohrbiopsien von Kühen, die aus adulten oder fetalen Fibroblasten geklont wurden konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Bei den untersuchten Phoenix-Zellen (Abb. 18) handelt es sich um humane Tumorzellen, die aufgrund der einfachen Kultivierung und der konstanten Telomerlängen bei den Q-FISH-Analysen als Kontrolle dienten. Daher wurde die Telomerlänge mit Southern Blot absolut bestimmt um dem Fluoreszenzsignal (TFU, Telomer Fluorescence Units) später eine reale Telomerlänge zuordnen zu können.

3.5 Telomerlängen in Wildtyp-Mausembryonen am Morula–Blastozysten-Übergang

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem Telomerverlängerungsprogramm während der frühen Embryogenese um einen generellen Mechanismus in der Säugerentwicklung handelt und ob dieser Mechanismus Telomerase-abhängig ist, wurden Telomeranalysen an Embryonen von Telomerase-Wildtyp Mäusen (mTERC^{+/+}) und Telomerase-Knockout-Mäusen (mTERC^{-/-}) durchgeführt. Die Embryonen wurden an Tag 2,5 (8-Zell/Morula-Stadium) bzw. Tag 3,5 (Blastozysten-Stadium) entnommen und mittels Q-FISH-Analyse die Telomerlängen bestimmt.

In Übereinstimmung mit den Daten aus den bovinen Embryonen konnte auch in den Wildtyp-Mäusen eine signifikante Verlängerung der Telomere vom 8-Zell/Morula-Stadium zum Blastozysten-Stadium festgestellt werden (Abb. 19 und 21). Der Anstieg der Telomerlänge ist dabei sowohl signifikant für die Mittelwerte über alle gemessenen Zellkerne (8-Zell/Morula vs. Blastozysten: $p = 0,0001$) als auch für die Mittelwerte über die Mittelwerte, die für einzelne Embryonen bestimmt wurden (8-Zell/Morula vs. Blastozysten: $p = 0,03$).

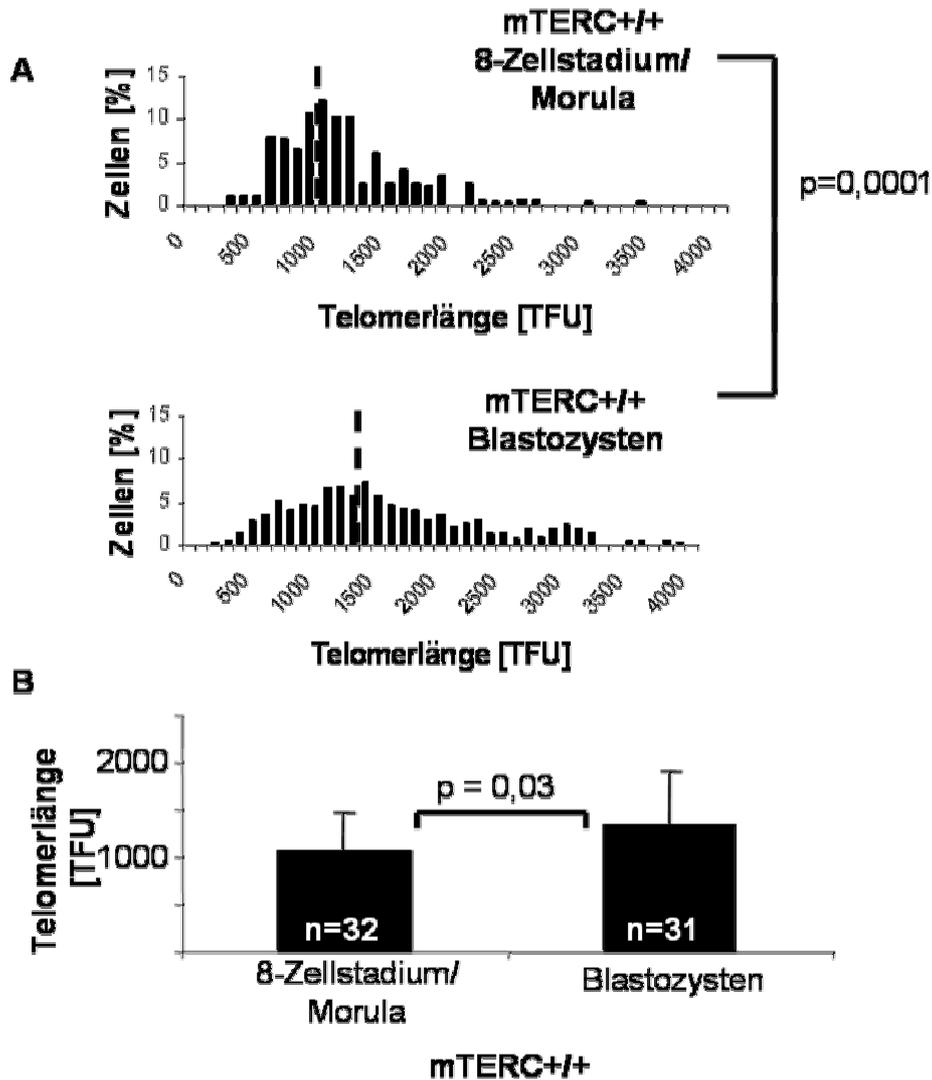


Abb. 19: Telomerlänge in Embryonen von $mTERC^{+/+}$ -Mäusen (Wildtyp) ermittelt mit Q-FISH. (A) Verteilung der mittleren Telomer-Fluoreszenz-Units (TFU) aller analysierten Zellkerne von Wildtyp Embryos im 8-Zell/Morula-Stadium (1118 ± 484 TFU, $n = 274$) und Blastozysten-Stadium (1501 ± 753 TFU, $n = 681$). (B) Mittelwert der mittleren Telomer-Fluoreszenz-Units bestimmt für individuelle Embryonen im 8-Zell/Morula-Stadium (1066 ± 406 TFU, $n = 32$) und und Blastozysten-Stadium (1350 ± 565 TFU, $n = 31$). Bei den Analysen der Mausembryonen wurde auf eine Umrechnung in Kilobasen (kb) verzichtet.

Die Telomerlängenbestimmung mittels Q-FISH Technik bei Telomerase-Knockout-Embryonen ($mTERC^{-/-}$) zeigte keine Telomerverlängerung im Blastozysten-Stadium (Abb. 20 und 21). Es zeigte sich vielmehr eine geringfügige ,allerdings nicht signifikante , Verkürzung der Telomere in Blastozysten im Vergleich zu den Morulae. Dies spricht dafür, dass Telomeraseaktivität notwendig ist für die Telomerverlängerung zu diesem Zeitpunkt der Embryogenese.

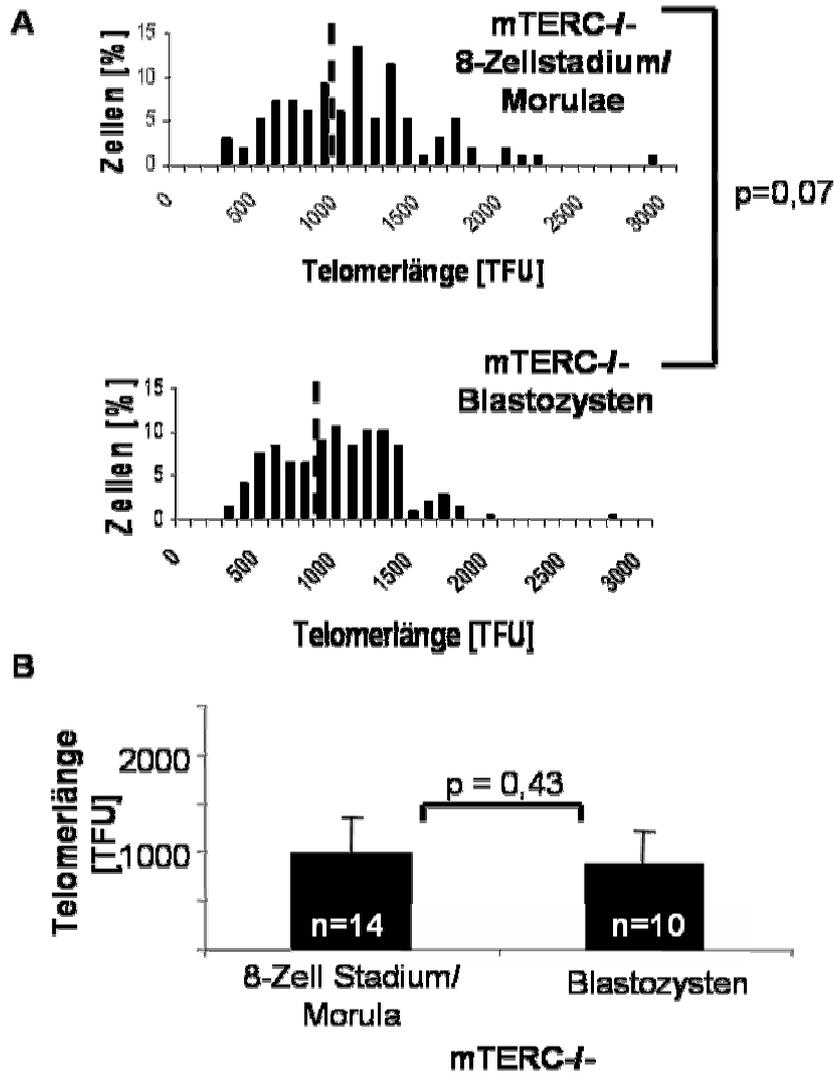


Abb. 20: Telomerlänge in Embryonen von $mTERC^{-/-}$ -Mäusen (Knockout) ermittelt mit Q-FISH. (A) Verteilung der mittleren Telomer-Fluoreszenz-Units (TFU) aller analysierten Zellkerne von $mTERC^{-/-}$ -Embryonen im 8-Zell/Morula-Stadium (1060 ± 503 TFU, $n = 96$) und Blastozysten-Stadium (949 ± 388 TFU, $n = 199$). (B) Mittelwert der mittleren Telomer-Fluoreszenz-Units bestimmt für individuelle Embryonen im 8-Zell/Morula-Stadium (995 ± 356 TFU, $n = 14$) und Blastozysten-Stadium (877 ± 348 TFU, $n = 10$).

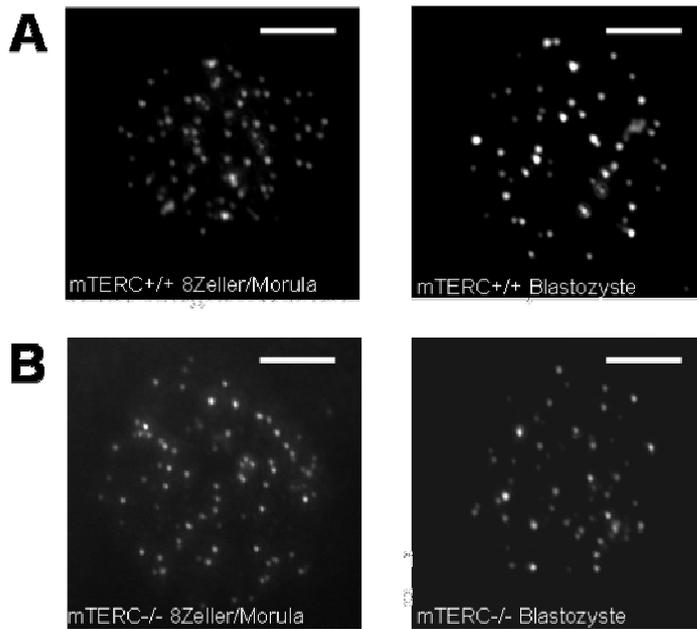


Abb. 21: Repräsentative Bilder von Telomerspots in Zellkernen von $mTERC^{+/+}$ - (A) und $mTERC^{-/-}$ Mäusen (B). Bei den $mTERC^{+/+}$ Mäusen kommt es während der frühen Embryogenese zu einer Telomerase abhängigen Telomerverlängerung, was sich anhand stärkerer Telomerspots messen lässt (A). Diese Verlängerung wird in den $mTERC^{-/-}$ Embryonen nicht beobachtet (B). Die Intensität der Telomerspots ist abhängig von der Zahl gebundener telomerspezifischer Sonde und damit direkt proportional zur Telomerlänge. Vergrößerungsskala: 2,5 μm

3.6 Telomerlängen in Wildtyp-Mausembryonen zu späteren Zeitpunkten der Embryogenese

Um zu ermitteln ob sich die Telomerverlängerung lediglich auf den Zeitpunkt des Morula-Blastozysten-Übergangs beschränkt oder darüber hinaus eine Verlängerung stattfindet, wurden primäre Zellkulturen von adhärent wachsenden Zellen aus 8,5, 10,5 und 13,5 Tage alten Mausembryonen hinsichtlich der Telomerlänge untersucht. Diese Analyse zeigte keinen weiteren signifikanten Anstieg der Telomerlänge nach dem Morula-Blastozysten-Übergang (Abb. 22).

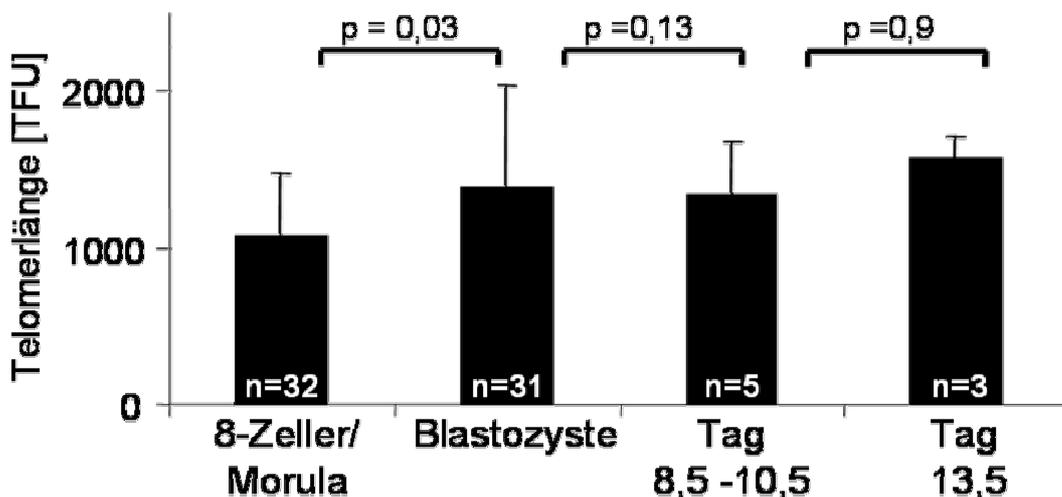


Abb. 22: Mittelwerte der Telomer Fluoreszenz Intensität einzelner Embryonen des 8-Zellstadiums/Morula, Blastozysten-Stadium, Tag 8,5/10,5 (1329 ± 353 TFU, $n = 5$) und Tag 13,5 (1573 ± 133 TFU, $n = 5$). Die Telomerlängenanalyse ergab keine signifikante Verlängerung der Telomere nach dem Morula-Blastozysten-Übergang ($p > 0,05$).

3.7 Analyse der Expression Telomer-bindender Proteine in der Mausembryogenese

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob neben der Telomerase auch noch andere Telomer-bindende Proteine für das embryonale Telomer-Verlängerungsprogramm notwendig sind. Mit Hilfe von Dot Blot-Analysen wurde die Expression verschiedener Telomer-assoziiierter Proteine auf RNA-Ebene ermittelt. Insgesamt wurden fünf verschiedene Gene für Expressionsstudien ausgewählt. Hierfür wurden spezifische cDNA-Sonden mittels Reverser Transkription aus RNA der Mausleber erstellt. Die RNA stammte aus Lebergewebe des ruhenden (G0-Phase) sowie proliferierenden Organs (S-Phase nach partieller Hepatektomie) und wurde von Dr. Ande zur Verfügung gestellt. Die Primer zur Amplifizierung spezifischer Genabschnitte wurden so gewählt, dass sie nach Möglichkeit den 3'-Bereich des entsprechenden Gens abdecken und mindestens 600 bp lang sind (Abb. 23 und 24).

Die cDNAs für TRF1 und 2 (telomeric-repeat binding factor 1 und 2), Tankyrase und POT1 (Protection of Telomeres 1) wurden im Rahmen dieser Arbeit amplifiziert und kloniert. Die cDNA für EST1A (Ever shorter Telomere) wurde freundlicherweise von Prof. J. Lingner (Schweizer Institut für Experimentelle Krebsforschung, Epalinges, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

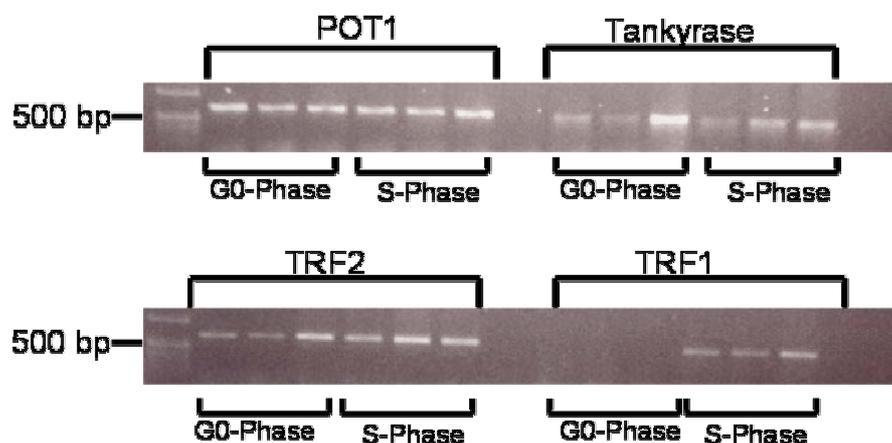


Abb. 23: cDNA Banden Telomer-assoziiierter Gene. Die RNA für die reverse Transkription stammt aus Maus Lebergewebe vom ruhenden (G0-Phase) und proliferierenden Organ (S-Phase) nach partieller Hepatektomie. POT1 (684 bp), Tankyrase (669 bp) und TRF2 (697 bp) sind sowohl während der G0-Phase als auch in der S-Phase transkribiert, während TRF1 (648 bp) lediglich in der S-Phase transkribiert wird. Als Größenmarker diente die 1 kb Leiter.

Die Genabschnitte von POT1, Tankyrase und TRF2 ließen sich sowohl aus cDNA von ruhender Leber (G0-Phase) als auch proliferierender Leber (S-Phase) amplifizieren. TRF1 dagegen scheint nur in der S-Phase transkribiert zu werden (Abb. 23)

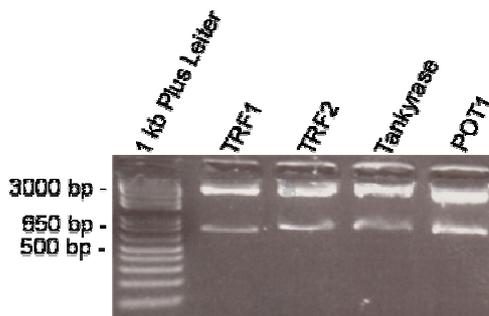


Abb. 24: Restriktionsverdau (EcoRI) Insert-tragender Plasmide (pGem® T easy). Die Inserts TRF1, TRF2, Tankyrase und POT1 sind ca. 700 bp lang und der pGEM® T easy Vektor 3 kb. Als Größenmarker wurde die 1 kb PLUS-Leiter zur Größenbestimmung des Plasmids und der Inserts aufgetragen.

Die mRNA-Expressionsstudien mit Hilfe von Dot Blot-Analysen wurden im Labor von Keith Latham an der Temple University School of Medicine in Philadelphia, USA durchgeführt (Abb. 25).

Alle Gene zeigen im Oozyten-Stadium bis zum frühen 1-Zell-Stadium eine relativ hohe Expression, die dann im Fall von Tankyrase und TRF2 (Abb. 25 A und B) dramatisch abnimmt und erst im Blastozysten-Stadium wieder ansteigt. Dies beruht darauf, dass diese mRNAs bereits transkribiert im Zytoplasma der Oocyte vorliegen. Man spricht auch von „maternal storage“. Diese maternalen mRNAs werden während der Reifung oder nach der Befruchtung zum Teil degradiert oder de-adenyliert, was zu einem verminderten Expressionssignal führt. Die TRF1-Expression sinkt nach dem Oozytenstadium stark ab (Abb. 25 C). Dies beruht wahrscheinlich auf einer de-Adenylierung der mRNA, die dann nicht mehr mit Hilfe des polyT-Primers in cDNA umgeschrieben werden kann und so zu einem reduzierten Signal führt. Die Expression der TRF1 mRNA nimmt vom 4-Zellstadium kontinuierlich bis zum Blastozysten-Stadium zu.

Durch die Behandlung der Embryonen mit α -Amantin, einem potenten Inhibitor der RNA-Polymerase, wird die *de novo* Transkription von mRNA unterdrückt, um festzustellen, ob es sich tatsächlich um maternale Produkte handelt. Allerdings kann α -Amantin mRNA auch stabilisieren, indem es vor de-Adenylierung schützt. Dies kann beispielsweise im 2-Zellstadium (39 und 39A) von POT1 (Abb. 25 D) beobachtet werden. Lediglich eine starke

Abnahme des Expressionssignals nach α -Amantin-Behandlung lässt auf Transkription des Gens schließen. Andernfalls handelt es sich um maternal gespeicherte mRNA. POT1-mRNA wird maternal exprimiert und während des 2-Zellstadiums degradiert, gefolgt von einer Re-Expression, die kontinuierlich bis zum Blastozysten-Stadium akkumuliert. Die Expressionssignale der EST1-mRNA sind im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen sehr schwach (Abb. 25 E). Die niedrigeren Werte im GVOOC- und Ei-Stadium könnten evtl. auch auf de-Adenylierung der maternalen mRNA beruhen. Während des 1-Zellstadiums kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme des Signals. Die α -Amantin-Behandlung 29 h nach der Befruchtung könnte eine Transkription des Gens vermuten lassen, da das Signal schwächer ist als ohne Behandlung mit dem Inhibitor. EST1-mRNA wird im frühen 8-Zell/Morula- und im späten Blastozysten-Stadium exprimiert.

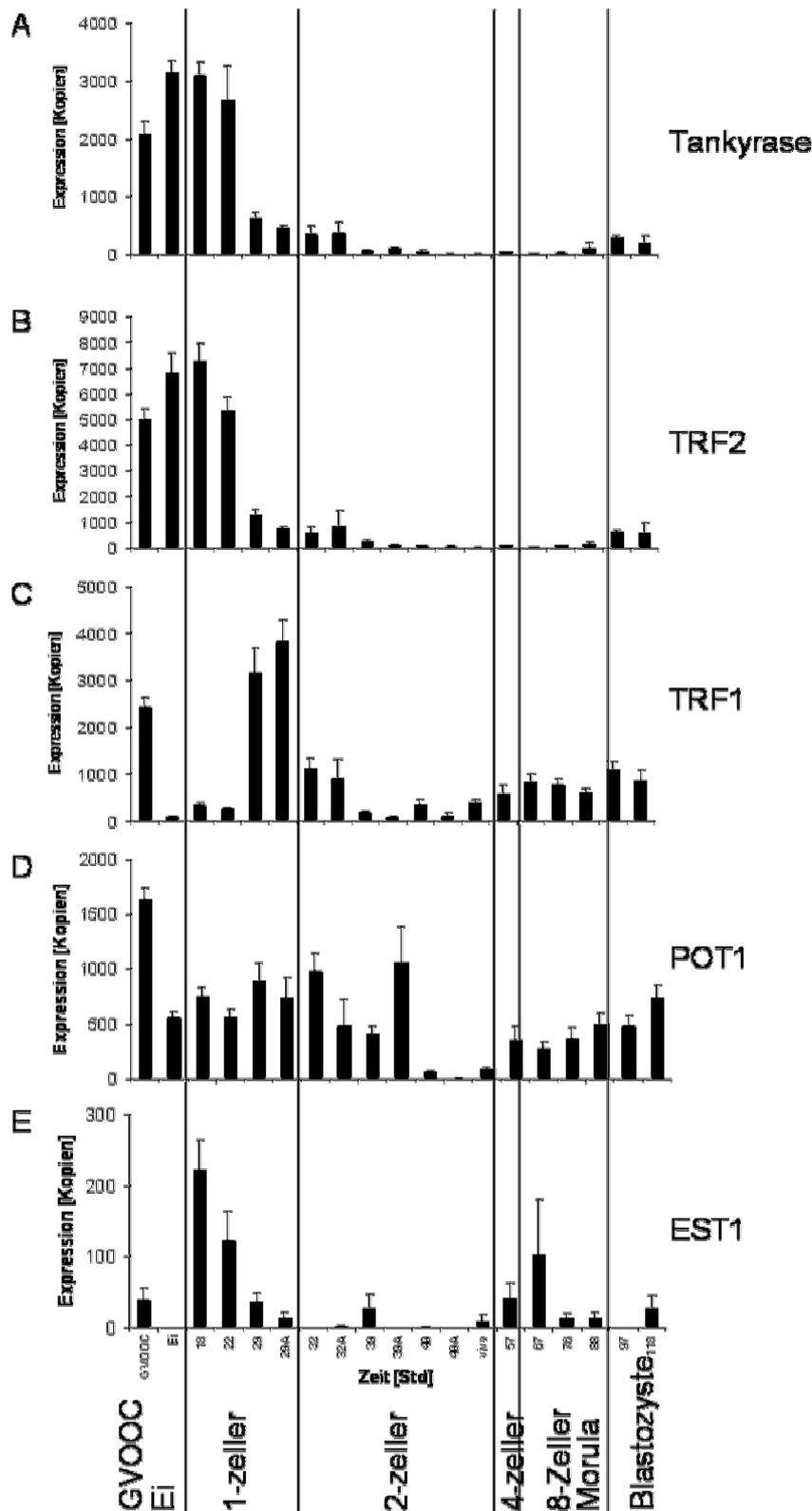


Abb. 25: mRNA-Expressions-Muster der Telomer-assoziierten Proteine TRF1 und 2, POT1, Tankyrase und EST1 von Mausembryonen. Die cDNAs der abgebildeten Zeitwerte wurden mittels Dot Blot Hybridisierung analysiert. Die Expression der mRNA wird in Kopien/Embryo angegeben. Die einzelnen Entwicklungsstadien, GVOOC (germinal Vesicle intact Oocyte), Ei (MII-Oocyte), 1-Zeller (Einzellstadium), 2-Zeller (Zweizellstadium), 4-Zeller (Vierzellstadium), 8-Zeller (Achtzellstadium), Morula- und Blastozystenstadium, sind unter dem Graphen abgebildet. Zeitangabe [Std.] bezieht sich auf Stunden nach Fertilisierung. Die mit „A“ gekennzeichneten Zeitwerte stehen für α -Amantin behandelte Embryonen. Dadurch kommt es zur Inhibierung von RNA-Polymerasen und damit zu keiner mRNA-Neusynthese.

4. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein frühembryonales Telomerverlängerungs-Programm in Säugern identifiziert. Dieses Programm führt zu einer Verlängerung der Telomere am Morula-Blastozysten-Übergang in murinen und bovinen Embryonen. Dieser Prozess ist nicht nur in *in vitro* oder *in vivo* fertilisierten bovinen Embryonen vorhanden, sondern führt auch in aus Fibroblasten geklonten Embryonen zur Normalisierung der Telomerlänge, die in frühen Embryonalstadien im Vergleich zu fertilisierten Embryonen verkürzte Telomere aufwiesen. Die Arbeit zeigt darüber hinaus eine Telomerverlängerung am Morula-Blastozysten-Übergang, die Telomerase-abhängig ist, da es in Telomerase-Knockout-Mäusen zu keiner Verlängerung, sondern zu einer Verkürzung der Telomere zu diesem Zeitpunkt kam.

Aufgrund der niedrigen Effizienz des Klonens - weniger als 2% geklonter Oozyten entwickeln sich zu lebensfähigen Organismen - konnten frühere Arbeiten, die eine normale Telomerlänge in späten Embryonalstadien und in geklonten Tieren zeigten, nicht die Möglichkeit ausschließen, dass Donorzellkerne mit ausreichender Telomerlänge im Prozess des Klonens selektioniert wurden. In dieser Arbeit wird nun erstmals gezeigt, dass geklonte Embryonen des Morula-Stadiums tatsächlich verkürzte Telomere aufweisen, diese aber im Blastozysten-Stadium normalisiert werden. Die kürzeren Telomere im Morula-Stadium der geklonten Embryonen könnten darauf zurück zu führen sein, dass die Donorzellen, die für das Klonen eingesetzt wurden (adulte und fetale Fibroblasten) kürzere Telomere haben, verglichen mit Keimzellen (siehe Ergebnisse 3.1). Einhergehend mit dieser Hypothese konnte bereits gezeigt werden, dass Telomere in Keimzellen länger sind verglichen mit somatischen Zellen (de Lange *et al.* 1990) und auch während des Alterns stabil bleiben (Allsopp *et al.* 1992).

Ob es sich hierbei um Selektion von Embryonen mit besonders langen Telomeren handelt kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dagegen spricht aber eine relativ hohe Entwicklungsrate geklonter Embryonen vom Morulae- zum Blastozysten-Stadium. Rund 70-80% der Klone des Morula-Stadiums entwickeln sich weiter zum Blastozysten-Stadium. Dafür spricht außerdem, dass sowohl die Telomere der *in vitro* fertilisierten bovinen Embryonen als auch die der Mausembryonen verlängert wurden, was ein wohldefiniertes Programm vermuten lässt, welches Telomer-Stabilität, notwendig für chromosomale Integrität, gewährleistet. Da sich keine signifikanten Unterschiede in der

Telomerlänge der *in vitro* bzw. *in vivo* fertilisierten Embryonen feststellen ließ, hat die *in vitro* Befruchtung und Kultivierung offensichtlich keinen Einfluss auf die Telomerlänge.

Da Telomerlängen Einfluss auf Regeneration, Alterung und Krebs haben (Djojsubroto *et al.* 2003), besteht ein wichtiger Aspekt des Klonens darin, ob verkürzte Telomere somatischer Donorzellen, die zum Klonen eingesetzt werden, wieder verlängert werden können, damit Stabilität und Integrität des Genoms für die weitere Entwicklung gewährleistet sind. Dies ist besonders im Hinblick auf therapeutisches Klonen von elementarer Bedeutung. Zellkerntransplantation (therapeutisches Klonen) gewährleistet eine unlimitierte Zellressource für die regenerative Medizin, denn durch die Verwendung körpereigener Donorzellen werden die Gefahren eventueller Abstoßungsreaktionen, wie es in der traditionellen Transplantationsmedizin der Fall ist, umgangen. Erste Transplantationsversuche mit bovinen Fibroblasten geklonte Gewebe (Herz- und Muskelzellen), die den Spendertieren wieder retransplantiert wurden, zeigen keine Abstoßungsreaktionen (Lanza *et al.* 2002). Eine Reihe chronischer Erkrankungen des Menschen zeigen in unterschiedlichen betroffenen Geweben eine deutliche Verkürzung der Telomere: Endothelzellen bei Atherosklerose (Samani *et al.* 2001), die peripheren Blutzellen von Patienten unterschiedlicher Knochenmarkserkrankungen (Brummendorf *et al.* 2001; Vulliamy *et al.* 2001), Hepatozyten in Patienten mit chronischen Lebererkrankungen und -zirrhose (Kitada *et al.* 1995; Urabe *et al.* 1996; Miura *et al.* 1997; Aikata *et al.* 2000; Wiemann *et al.* 2002) sowie Kolonepithelzellen bei Patienten mit Colitis ulcerosa (Kinouchi *et al.* 1998).

Gerade bei Knochenmarkstransplantationen könnte die Anwendung eines solchen Telomerverlängerungs-Programms von Bedeutung sein. Bislang konnte beobachtet werden, dass sich Telomere haematopoetischer Zellen einige Jahre nach Knochenmarkstransplantationen um bis zu 2 Kilobasen (kb) verkürzen (Notaro *et al.* 1997; Akiyama *et al.* 1998; Wynn *et al.* 1998; Lee *et al.* 1999; Wynn *et al.* 1999; Akiyama *et al.* 2000). Es wird vermutet, dass dies auf der starken Expansion der transplantierten haematopoetischen Stammzellen beruht, die das gesamte Knochenmark des Empfängers repopulieren müssen. Dadurch kommt es vermutlich zur Entwicklung einer Stammzell-Population mit verminderter Telomerlänge, die nicht dieselbe regenerative Kapazität aufweist wie der Stammzell-Pool einer gesunden Person (Notaro *et al.* 1997; Akiyama *et al.* 1998; Wynn *et al.* 1998; Lee *et al.* 1999; Wynn *et al.* 1999; Akiyama *et al.* 2000). Dies ist insbesondere im Hinblick auf Langzeiteffekte von Transplantationen und der Möglichkeit eines Organversagens von entscheidender Bedeutung. Die beschleunigte Telomerverkürzung in

transplantierten Stammzellen stellt dabei wahrscheinlich nur ein transientes Phänomen der Transplantation dar, denn Jahrzehnte nach einer Transplantation verkürzen sich die Telomere transplantiertter Zellen im selben Maß wie das bei gesunden Personen der Fall ist (Wynn *et al.* 1999; Mathioudakis *et al.* 2000; de Pauw *et al.* 2002; Roelofs *et al.* 2003). Die Reaktivierung eines Telomerverlängerungs-Programms in Zellen, die bei der Knochenmarkstransplantation eingesetzt werden, könnte daher von großem Nutzen sein. Auf diese Weise könnte der rapiden Telomerverkürzung entgegengewirkt und klonale Funktionsstörungen im Alter vermieden werden.

Telomerlängenanalysen geklonter Rinder konnten bereits zeigen, dass eine Rekonstitution der Telomere möglich ist. Mit fetalen oder adulten Fibroblasten geklonte Rinder wiesen mit gleichaltrigen Kontrolltieren vergleichbare (Tian *et al.* 2000; Betts *et al.* 2001) oder sogar längere Telomere auf, wenn seneszente Donorzellen zur Klonierung eingesetzt wurden (Lanza *et al.* 2000). Demgegenüber entsprachen die Telomere des Klonschafs Dolly der Telomerlänge der zum Klonen verwendeten Donorzellen (Shiels *et al.* 1999). Man geht heute davon, dass der zum Klonen verwendete Zelltyp Einfluss auf die Rekonstruktion der Telomere hat. Mit Fibroblasten geklonte Rinder, Schafe und Mäuse zeigen eine Wiederherstellung der Telomere verglichen mit den Donorzellen und gleichaltrigen Kontrolltieren (Lanza *et al.* 2000; Tian *et al.* 2000; Wakayama *et al.* 2000; Betts *et al.* 2001; Miyashita *et al.* 2002). Die Verwendung von Epithelzellen zum Klonen wie bei Dolly zeigt weder bei Schafen noch bei Rindern einen solchen Effekt (Shiels *et al.* 1999; Miyashita *et al.* 2002). Warum Zellkerne der Epithelzellen während des Klonens nicht auf ähnliche Weise wie Fibroblasten reprogrammiert werden ist weiterhin unklar. Bislang gibt es keine Daten über Telomeraseaktivität während der frühen Embryogenese mit Epithelzellen geklonter Tiere. Daher lässt sich nicht ausschließen, ob es gar nicht erst zur Telomerase-Aktivierung während der frühen Embryogenese kommt oder ob andere Faktoren (Telomer-bindende Proteine), die Telomerlängen beeinflussen, nicht exprimiert werden können. Eventuell kommt es in Epithelzellen während der Transdifferenzierung zur unterschiedlichen Verpackung des genetischen Materials als dies bei Fibroblasten der Fall ist. Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass Telomerlängen auch auf epigenetischer Ebene durch unterschiedliche Methylierung der am Telomer gebundenen Histone reguliert werden (Garcia-Cao *et al.* 2004). Auch genetisches „imprinting“¹ wird im

¹ Imprinting bedeutet genetische Prägung. Die genetische Information auf dem väterlichen und mütterlichen Genom in den Vorkernen einer befruchteten Eizelle wird unterschiedlich intensiv gelesen. Diese Beeinflussung der Gene erfolgt wahrscheinlich durch Methylierung und betrifft meist nur eine begrenzte Anzahl von Genen.

Zusammenhang mit Klonierung durch NT (nuclear transfer) diskutiert. Demnach zeigen geklonte Tiere eine unterschiedliche Expression dieser Gene verglichen mit natürlich geborenen Kontrolltieren (Rideout *et al.* 2001). Interessanterweise finden sich weniger Abweichungen des „imprintings“ in Klonen aus Cumulus-Zellen² verglichen mit ES-Zellen (embryonic stem cells) geklonte Tiere (Humpherys *et al.* 2001). Daher wird vermutet, dass sich Cumulus-Zellkerne nach dem Transfer in die Eizelle besser reprogrammieren lassen.

Neben längeren Telomeren in Keimzellen wird die Weitergabe ausreichender Telomerreserven von einer Generation zur nächsten offensichtlich noch durch den in dieser Arbeit beschriebenen zweiten, embryonalen Mechanismus gesichert. Ein solches Programm wäre wichtig, wenn die Telomeraseaktivität in Keimzellen nicht ausreichte, um Telomere in allen Keimzellen während des Alterns zu stabilisieren oder falls es zur Telomerverkürzung während der Embryogenese, käme noch bevor es zur Keimzellentwicklung³ kommt.

Dass Telomeraseaktivität Einfluss auf die Telomerlänge während der Embryogenese hat, zeigten bereits Untersuchungen an Mäusemryonen, die aus der Kreuzung zweier unterschiedlicher Mauslinien, einer mit langen, der andere mit kurzen Telomeren, hervorgingen (Zhu *et al.* 1998). Diese Experimente zeigten eine Verlängerung der kurzen Telomere des einen Mausstrangs am Tag 14 der embryonalen Entwicklung. Dieser Prozess war durch Haploinsuffizienz der Telomerase RNA Komponente (TERC) in mTERC^{+/-}-Mäusen beeinträchtigt (Chiang *et al.* 2004).

Daten von Xu und Young zeigen, dass Telomerase nur schwach in bovinen Oozyten, Zygoten, den ersten Teilungsstadien und Morulae exprimiert wird und es im Blastocystenstadium zu einem signifikanten Anstieg der Telomerase-Aktivität kommt. Darüber hinaus zeigen bovine parthenogenetisch⁴ aktivierte Embryonen und Embryonen aus nuklärem Transfer die selben Telomerase-Expressionsmuster verglichen mit *in vitro* fertilisierten Embryonen (Xu *et al.* 2001). Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität der

² Die beim Eisprung die Eizelle umgebende Epithelschicht besteht aus Cumulus-Zellen.

³ Keimzellen entstehen aus Urkeimzellen, die im Verlauf der Embryogenese (Gastrulation) von den Körperzellen aussondern und in den Keimdrüsen (Gonaden) gelagert werden, wo sie sich prä- und postnatal zu funktionsfähigen Keimzellen weiterentwickeln. Humane Urkeimzellen sind drei Wochen post conceptinem in der Dottersackwand (also extraembryonal) nachweisbar.

⁴ Reife Eizellen (Oozyten) der meisten Säugetiere arretieren in Metaphase II, bis es entweder zur Befruchtung oder parthenogenetischen (nicht sexuellen) Aktivierung kommt. Durch Behandlung mit Ethanol, Calciumionophore oder verminderter Temperatur lassen sich bovine Oozyten aktivieren (Nagai 1987; Presicce *et al.* 1994a; Presicce *et al.* 1994b) und bis zum Blastozysten-Stadium kultivieren (Presicce *et al.* 1994b)

Telomerase auch in geklonten Embryonen erfolgreich reprogrammiert ist (Xu *et al.* 2001) und dies mit einer Verlängerung der Telomere, wie in unseren Studien gezeigt, einhergeht. Dies belegen auch Untersuchungen an seriell geklonten Mäusen aus Cumulus-Zellen. Zunächst wurde mit Cumulus-Zellen die erste Generation (G1) kloniert. Anschließend wurde mit Cumulus-Zellen der adulten G1-Generation die nächste Generation (G2) generiert. Dies wurde bis zur 6. Generation (G6) durchgeführt. Auch hier kam es in den Klonen zu keiner Verkürzung der Telomere sondern vielmehr zu einer Verlängerung (Wakayama *et al.* 2000). Telomeraseaktivität bzw. verlängerte Telomere führen allerdings nicht zwangsläufig zu einem Klonierungserfolg. Dies belegen Untersuchungen an geklonten Schafembryonen. Zunächst wurde die replikative Lebensspanne oviner Fibroblasten mittels Expression der humanen katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) verlängert und die Zellkerne anschließend für Klonierungsexperimente benutzt. Die geklonten Embryonen entwickelten sich mit ähnlicher Frequenz wie die Kontrollembryonen, ohne vorherige Telomerase-Behandlung, bis zum Blastozystenstadium. Und obwohl die Telomerase-behandelten Embryonen eine erhöhte Einnistungs- und Entwicklungsrate zeigten, überlebte keiner der Feten länger als 40 Tage (Cui *et al.* 2003). Allerdings zeigten diese Studien keine Daten über Telomerlängen bzw. Telomerase-Aktivität während der frühen Embryogenese und die Klonierungs-Experimente erfolgten nur mit einer Zelllinie.

In vitro Expressionsstudien mit Telomerase haben bereits gezeigt, dass Telomeraseaktivität nicht zwangsläufig zu Telomerverlängerung führt, wie es in diesen Studien während der Embryogenese zu beobachten war. Die ektope Expression der humanen Telomerase (hTERT) in humanen Fibroblasten konnte zwar die Lebensspanne verlängern, nicht aber die Telomere. Offensichtlich erfüllt die humane Telomerase auch eine protektive Funktion, die Zellproliferation zulässt, jedoch nicht mit einer netto Verlängerung der Telomere einhergeht (Zhu *et al.* 1999). Dagegen konnten Bodnar und Kollegen durch Reaktivierung von Telomerase *in vitro* in humanen Zellen eine Verlängerung der Telomere und der Zellebensdauer beobachten (Bodnar *et al.* 1998).

In vivo führt Telomerase-Expression lediglich zur Stabilisierung von Telomeren und nicht zur Verlängerung. Stamm- und Keimzellen besitzen zwar längere Telomere als somatische Zellen und können diese mittels Telomerase während der Alterung aufrecht erhalten, aber nicht verlängern (de Lange *et al.* 1990; Allsopp *et al.* 1992; Hiyama *et al.* 1995; Chiu *et al.* 1996). Ähnlich verhält es sich mit humanen Tumorzellen. Ein weitverbreitetes Charakteristikum von Tumorzellen ist die Telomerase-Reaktivierung, die einen

Tumorprogress erst ermöglicht. Dennoch zeigen die meisten Tumorzellen keine Verlängerung der Telomere. Vielmehr belegen zahlreiche Studien, dass Telomere maligner Tumore verglichen mit dem umgebenden Gewebe kürzer sind (Ohashi *et al.* 1996a; Ohashi *et al.* 1996b; Engelhardt *et al.* 1997; Ball *et al.* 1998; Furugori *et al.* 2000; Remes *et al.* 2000). Die Tatsache, dass 80% maligner Tumore Telomerase reaktivieren, ließ vermuten, dass die postnatale Suppression der Telomerase in den meisten somatischen Geweben als Anti-Tumor-Schranke wirkt, die immortale Proliferation transformierter Zellen verhindern soll (Wright *et al.* 2001). Da aber Stamm- und Keimzellen ebenfalls Telomerase exprimieren (Chiu *et al.* 1996; Xu *et al.* 2000) und über eine lange Lebensspanne verfügen, scheint Telomerase-Expression *per se* nicht onkogen zu sein. Allerdings wird das onkogene Potential TERT-immortalisierter Zellen derzeit kontrovers diskutiert. Nach sehr langen Passagen hTERT-transformierter humaner Fibroblasten kommt es zur Akkumulation von Klonen mit potentiellen, malignen Veränderung (Milyavsky *et al.* 2003).

Telomerase-Aktivität ist zwar für Telomerverlängerung oftmals notwendig, aber andere Faktoren, wie Telomer-bindende Proteine sind wahrscheinlich auch an der Telomerlängenregulation beteiligt (Broccoli *et al.* 1997). Der Einfluss Telomer-bindender Proteine auf die Telomerlänge wurde bereits in einigen *in vitro* Studien untersucht (van Steensel *et al.* 1997; van Steensel *et al.* 1998; Ancelin *et al.* 2002; Loayza *et al.* 2003a; Reichenbach *et al.* 2003).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mRNA-Expressionsanalysen von Telomer-bindenden Proteinen in der frühen Embryogenese zeigten eine signifikante Regulation einzelner solcher Gene.

Dabei zeigten Tankyrase und TRF2, beide positive Regulatoren von Telomerlänge (van Steensel *et al.* 1997; Smith *et al.* 2000; Stansel *et al.* 2001; Cook *et al.* 2002; Loayza *et al.* 2003a) ein ähnliches Expressionsmuster. Bis zum frühen Einzellstadium sind beide relativ stark exprimiert, was vermutlich auf maternales storage⁵ zurück zu führen ist. Bis zum Morula-Blastocysten-Übergang sind beide Transkripte nachfolgend nicht detektierbar. Dies beruht wahrscheinlich auf Degradation oder de-Adenylierung der mRNA, die dann nicht mehr mit dem Poly-T Primer in cDNA umgeschrieben werden kann.

⁵ mRNA, die bereits vor der Befruchtung im Cytoplasma der Eizelle vorhanden ist, ist ausschließlich maternalen Ursprungs. Man spricht auch von maternal-effect-genes

POT1 zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie TRF1. Die starke Abnahme von TRF1 während des Ei- und 1-Zellstadiums beruht, ähnlich wie dies für Tankyrase und TRF2 beobachtet wurde, auf de-Adenylierung der maternalen mRNA und einer damit einhergehenden verminderten Sensitivität des Dot Blot Signals. Auf Protein-Ebene verhindern sowohl TRF1 als auch POT1 die Bindung von Telomerase am Telomer und wirken damit einer Telomerverlängerung entgegen (Ancelin *et al.* 2002). Falls der Anstieg der mRNA-Expression während des Blastozysten-Stadiums auch mit einer vermehrten Produktion der beiden Proteine einhergeht, würde dies erklären, warum es zu späteren Zeitpunkten der Embryogenese (Tag 8,5 bis 13,5) zu keiner weiteren Telomerverlängerung kam (siehe Ergebnisse).

EST1-mRNA wird im Vergleich zu den übrigen untersuchten Genen nur relativ schwach detektiert. Dies könnte allerdings auch an einer geringeren Sensitivität der verwendeten Dot Blots liegen oder auf posttranskriptioneller Regulation dieses Gens hinweisen. Während der Oozyten-Reifung kommt es wahrscheinlich zur de-Adenylierung der mRNA, gefolgt von einer re-Adenylierung, die nach der Fertilisation wieder degradiert wird

Die stärksten Signale werden im 1-Zellstadium gemessen. Die anschließende Abnahme der Signalstärke könnte ähnlich wie bei TRF1, TRF2 und Tankyrase auf einer Degradierung bzw. Deadenylierung der mRNA beruhen. Im 8-Zell und frühen Morula-Stadium kommt es nochmals zu einer starken Expression. Das EST1-Protein assoziiert mit Telomerase und begünstigt die Demaskierung der Chromosomenenden, wodurch eine Telomerase-vermittelte Telomerverlängerung erst möglich wird (Reichenbach *et al.* 2003). Falls der Anstieg der mRNA-Expression auch mit erhöhter Expression des Proteins einhergeht, könnten zu diesem Zeitpunkt der Embryogenese die Bedingungen zur Bindung der Telomerase an die Telomere geschaffen werden.

Ungeklärt bleibt allerdings, ob die hier gemessenen mRNA-Expressionen mit einer vergleichbaren Proteinexpression korrelieren. Daher müssen Proteinanalysen zeigen, ob TRF1 und POT1 tatsächlich in Abhängigkeit zur Telomerlänge translatiert und am Telomer gebunden werden. Genauso verhält es sich mit Expressionsanalysen von Tankyrase und TRF1. Die Beantwortung dieser Fragen wird dadurch erschwert, dass auf Grund der geringen Zellzahl von Morula und Blastozyste eine Vielzahl Protein-detektierender Untersuchungen (Western Blot, chromosomal immun precipitation) nicht durchführbar sind.

Für solche Analysen könnten eventuell andere Zelltypen untersucht werden, in denen ebenfalls Telomerverlängerung beobachtet werden konnte. B-Lymphozyten des peripheren

Blutes zeigten nach *in vitro* Aktivierung einen Anstieg der Telomerlänge, der mit einer erhöhten Telomerase-Aktivität einhergeht (Weng *et al.* 1997; Norrback *et al.* 2001; Martens *et al.* 2002). Telomerverlängerung könnte eine Rolle bei der Entwicklung von Langzeit B-Gedächtniszellen spielen. Es wurde bereits vermutet, dass die verminderte Immunantwort älterer Menschen teilweise auf Telomer-gesteuerter verringerter Lymphozyten-Proliferation beruht. Studien an Telomerase Knockout Mäusen zeigen ähnliche Ergebnisse einer verminderten Immunantwort (Lee *et al.* 1998; Herrera *et al.* 1999; Herrera *et al.* 2000). Kontroverse Daten existieren über Telomerlängen aktivierter T-Lymphozyten. Während einige Studien belegen, dass Differenzierung bei humanen T-Lymphozyten von naiven Vorläuferzellen zu Gedächtniszellen mit Telomerverkürzung einhergeht (Frenck *et al.* 1998; Rufer *et al.* 1999), zeigen neuere Untersuchungen, dass aktivierte T-Zellen seriell transplantierter haematopoetischer Stammzellen (HSC) in Mäusen zu einer Telomerverlängerung von 7 kb führt (Allsopp *et al.* 2002). Obwohl es bei serieller Transplantation der Stammzellen zunächst zu einer Verkürzung der Telomere kommt (Allsopp *et al.* 2001), können diese durch Stimulation der T-Zellen verlängert werden, allerdings nur vergleichbar mit Telomerlängen in ruhenden T-Zellen junger Mäuse. Auch hierbei handelt es sich um einen Telomerase-abhängigen Prozess, da es in T-Zellen aus Telomerase-Knockout-Mäusen zu keiner Verlängerung kam (Allsopp *et al.* 2002).

Das hier identifizierte Telomerverlängerungs-Programm könnte eventuell genutzt werden, die Telomere somatischer Zellen zu verlängern. Klonierte diploide Zellen könnten etablierte Tumorzelllinien in biochemischen und physiologischen Studien des Wachstums und der Differenzierung ersetzen; langlebige humane Zellen könnten zur Produktion biotechnologischer Produkte herangezogen werden und große Populationen gentechnisch verjüngter Zellen könnten von zunehmender Bedeutung in der autologen bzw. allogenen Zell- und Gentherapie sein.

In vivo Experimente Telomerase-defizienter Mäuse unterstützen bereits die potentiellen Möglichkeiten der Telomerase-Gentherapie. So führte die adenovirale Reaktivierung von Telomerase in mTERC^{-/-} mit chronischer Leberschädigung zu einer Milderung des Phänotyps (Rudolph *et al.* 2000).

Die Möglichkeit die Lebensspanne von Zellen zu verlängern, bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung des diploiden Status, der Wachstumseigenschaften und des Genexpressionsmusters junger Zellen könnte insgesamt von großer Bedeutung für biologische Forschungen, pharmazeutische Industrie und die Medizin sein. Die weiteren

Untersuchungen der molekularen Anwendungen dieses Telomerverlängerungs-Programms erscheint deswegen von großer Bedeutung. Die hier beschriebenen Arbeiten könnten eine gute Grundlage für solche Untersuchungen darstellen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Achi, M. V., N. Ravindranath und M. Dym (2000). "Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity." *Biol Reprod* **63**(2): 591-8.
- Aikata, H., H. Takaishi, Y. Kawakami, S. Takahashi, M. Kitamoto, T. Nakanishi, Y. Nakamura, F. Shimamoto, G. Kajiyama und T. Ide (2000). "Telomere reduction in human liver tissues with age and chronic inflammation." *Exp Cell Res* **256**(2): 578-82.
- Akiyama, M., O. Asai, Y. Kuraishi, M. Urashima, Y. Hoshi, H. Sakamaki, H. Yabe, T. Furukawa, O. Yamada, H. Mizoguchi und H. Yamada (2000). "Shortening of telomeres in recipients of both autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Bone Marrow Transplant* **25**(4): 441-7.
- Akiyama, M., Y. Hoshi, S. Sakurai, H. Yamada, O. Yamada und H. Mizoguchi (1998). "Changes of telomere length in children after hematopoietic stem cell transplantation." *Bone Marrow Transplant* **21**(2): 167-71.
- Allsopp, R. C., S. Cheshier und I. L. Weissman (2001). "Telomere shortening accompanies increased cell cycle activity during serial transplantation of hematopoietic stem cells." *J Exp Med* **193**(8): 917-24.
- Allsopp, R. C., S. Cheshier und I. L. Weissman (2002). "Telomerase activation and rejuvenation of telomere length in stimulated T cells derived from serially transplanted hematopoietic stem cells." *J Exp Med* **196**(11): 1427-33.
- Allsopp, R. C., H. Vaziri, C. Patterson, S. Goldstein, E. V. Younglai, A. B. Futcher, C. W. Greider und C. B. Harley (1992). "Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21): 10114-8.
- Ancelin, K., M. Brunori, S. Bauwens, C. E. Koering, C. Brun, M. Ricoul, J. P. Pommier, L. Sabatier und E. Gilson (2002). "Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2." *Mol Cell Biol* **22**(10): 3474-87.
- Ball, S. E., F. M. Gibson, S. Rizzo, J. A. Tooze, J. C. Marsh und E. C. Gordon-Smith (1998). "Progressive telomere shortening in aplastic anemia." *Blood* **91**(10): 3582-92.
- Bass, H. W., W. F. Marshall, J. W. Sedat, D. A. Agard und W. Z. Cande (1997). "Telomeres cluster de novo before the initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase." *J Cell Biol* **137**(1): 5-18.
- Baumann, P. und T. R. Cech (2001). "Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans." *Science* **292**(5519): 1171-5.
- Betts, D., V. Bordignon, J. Hill, Q. Winger, M. Westhusin, L. Smith und W. King (2001). "Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(3): 1077-82.
- Betts, D. H. und W. A. King (1999). "Telomerase activity and telomere detection during early bovine development." *Dev Genet* **25**(4): 397-403.
- Bilaud, T., C. Brun, K. Ancelin, C. E. Koering, T. Laroche und E. Gilson (1997). "Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein." *Nat Genet* **17**(2): 236-9.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Blackburn, E. H. (1991). "Telomeres." *Trends Biochem Sci* **16**(10): 378-81.

- Blackburn, E. H. (2001). "Switching and signaling at the telomere." *Cell* **106**(6): 661-73.
- Blasco, M. A., H. W. Lee, M. P. Hande, E. Samper, P. M. Lansdorp, R. A. DePinho und C. W. Greider (1997a). "Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA." *Cell* **91**(1): 25-34.
- Blasco, M. A., H. W. Lee, M. Rizen, D. Hanahan, R. DePinho und C. W. Greider (1997b). "Mouse models for the study of telomerase." *Ciba Found Symp* **211**: 160-70; discussion 170-6.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner und W. E. Wright (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." *Science* **279**(5349): 349-52.
- Broccoli, D., A. Smogorzewska, L. Chong und T. de Lange (1997). "Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2." *Nat Genet* **17**(2): 231-5.
- Brummendorf, T. H., N. Rufer, T. L. Holyoake, J. Maciejewski, M. J. Barnett, C. J. Eaves, A. C. Eaves, N. Young und P. M. Lansdorp (2001). "Telomere length dynamics in normal individuals and in patients with hematopoietic stem cell-associated disorders." *Ann N Y Acad Sci* **938**: 293-303; discussion 303-4.
- Budiyanto, A., T. Bito, M. Kunisada, M. Ashida, M. Ichihashi und M. Ueda (2003). "Inhibition of the epidermal growth factor receptor suppresses telomerase activity in HSC-1 human cutaneous squamous cell carcinoma cells." *J Invest Dermatol* **121**(5): 1088-94.
- Bungartz, L. und H. Niemann (1994). "Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination." *J Reprod Fertil* **101**(3): 583-91.
- Burger, A. M., M. C. Bibby und J. A. Double (1997). "Telomerase activity in normal and malignant mammalian tissues: feasibility of telomerase as a target for cancer chemotherapy." *Br J Cancer* **75**(4): 516-22.
- Campbell, N. A. (1997). *Biologie*. Heidelberg, Markl, J.
- Chiang, Y. J., M. T. Hemann, K. S. Hathcock, L. Tessarollo, L. Feigenbaum, W. C. Hahn und R. J. Hodes (2004). "Expression of telomerase RNA template, but not telomerase reverse transcriptase, is limiting for telomere length maintenance in vivo." *Mol Cell Biol* **24**(16): 7024-31.
- Chiu, C. P., W. Dragowska, N. W. Kim, H. Vaziri, J. Yui, T. E. Thomas, C. B. Harley und P. M. Lansdorp (1996). "Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow." *Stem Cells* **14**(2): 239-48.
- Chong, L., B. van Steensel, D. Broccoli, H. Erdjument-Bromage, J. Hanish, P. Tempst und T. de Lange (1995). "A human telomeric protein." *Science* **270**(5242): 1663-7.
- Clark, A. J., P. Ferrier, S. Aslam, S. Burl, C. Denning, D. Wylie, A. Ross, P. de Sousa, I. Wilmut und W. Cui (2003). "Proliferative lifespan is conserved after nuclear transfer." *Nat Cell Biol* **5**(6): 535-8.
- Colgin, L. M., K. Baran, P. Baumann, T. R. Cech und R. R. Reddel (2003). "Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase." *Curr Biol* **13**(11): 942-6.
- Cook, B. D., J. N. Dynek, W. Chang, G. Shostak und S. Smith (2002). "Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres." *Mol Cell Biol* **22**(1): 332-42.
- Counter, C. M., A. A. Avilion, C. E. LeFeuvre, N. G. Stewart, C. W. Greider, C. B. Harley und S. Bacchetti (1992). "Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity." *Embo J* **11**(5): 1921-9.

- Counter, C. M., J. Gupta, C. B. Harley, B. Leber und S. Bacchetti (1995). "Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies." *Blood* **85**(9): 2315-20.
- Cui, W., D. Wylie, S. Aslam, A. Dinnyes, T. King, I. Wilmut und A. J. Clark (2003). "Telomerase-immortalized sheep fibroblasts can be reprogrammed by nuclear transfer to undergo early development." *Biol Reprod* **69**(1): 15-21.
- d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter und S. P. Jackson (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." *Nature* **426**(6963): 194-8.
- de Lange, T. (2002). "Protection of mammalian telomeres." *Oncogene* **21**(4): 532-40.
- de Lange, T., L. Shiue, R. M. Myers, D. R. Cox, S. L. Naylor, A. M. Killery und H. E. Varmus (1990). "Structure and variability of human chromosome ends." *Mol Cell Biol* **10**(2): 518-27.
- de Pauw, E. S., S. A. Otto, J. T. Wijnen, J. M. Vossen, M. H. van Weel, H. J. Tanke, F. Miedema, R. Willemze, H. Roelofs und W. E. Fibbe (2002). "Long-term follow-up of recipients of allogeneic bone marrow grafts reveals no progressive telomere shortening and provides no evidence for haematopoietic stem cell exhaustion." *Br J Haematol* **116**(2): 491-6.
- Ding, H., M. Schertzer, X. Wu, M. Gertsenstein, S. Selig, M. Kammori, R. Pourvali, S. Poon, I. Vulto, E. Chavez, P. P. Tam, A. Nagy und P. M. Lansdorp (2004). "Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein." *Cell* **117**(7): 873-86.
- Djojotubroto, M. W., Y. S. Choi, H. W. Lee und K. L. Rudolph (2003). "Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer." *Mol Cells* **15**(2): 164-75.
- Eckert, J. und H. Niemann (1995). "In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media." *Theriogenology* **43**: 1211-25.
- Engelhardt, M., P. Drullinsky, J. Guillem und M. A. Moore (1997). "Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer." *Clin Cancer Res* **3**(11): 1931-41.
- Feng, J., W. D. Funk, S. S. Wang, S. L. Weinrich, A. A. Avilion, C. P. Chiu, R. R. Adams, E. Chang, R. C. Allsopp, J. Yu und et al. (1995). "The RNA component of human telomerase." *Science* **269**(5228): 1236-41.
- Frenck, R. W., Jr., E. H. Blackburn und K. M. Shannon (1998). "The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10): 5607-10.
- Furugori, E., R. Hirayama, K. I. Nakamura, M. Kammori, Y. Esaki und K. Takubo (2000). "Telomere shortening in gastric carcinoma with aging despite telomerase activation." *J Cancer Res Clin Oncol* **126**(8): 481-5.
- Garcia-Cao, M., R. O'Sullivan, A. H. Peters, T. Jenuwein und M. A. Blasco (2004). "Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases." *Nat Genet* **36**(1): 94-9.
- Greenberg, R. A., R. C. Allsopp, L. Chin, G. B. Morin und R. A. DePinho (1998). "Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation." *Oncogene* **16**(13): 1723-30.
- Greenberg, R. A., R. C. O'Hagan, H. Deng, Q. Xiao, S. R. Hann, R. R. Adams, S. Lichtsteiner, L. Chin, G. B. Morin und R. A. DePinho (1999). "Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation." *Oncogene* **18**(5): 1219-26.
- Greider, C. W. und E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts." *Cell* **43**(2 Pt 1): 405-13.

- Greider, C. W. und E. H. Blackburn (1989). "A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis." *Nature* **337**(6205): 331-7.
- Greider, C. W. und E. H. Blackburn (1996). "Telomeres, telomerase and cancer." *Sci Am* **274**(2): 92-7.
- Griffith, J. D., L. Comeau, S. Rosenfield, R. M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss und T. de Lange (1999). "Mammalian telomeres end in a large duplex loop." *Cell* **97**(4): 503-14.
- Hande, M. P., E. Samper, P. Lansdorp und M. A. Blasco (1999). "Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice." *J Cell Biol* **144**(4): 589-601.
- Harle-Bachor, C. und P. Boukamp (1996). "Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6476-81.
- Harley, C. B., A. B. Futcher und C. W. Greider (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* **345**(6274): 458-60.
- Hayflick, L. und P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Exp Cell Res* **25**: 585-621.
- Henderson, E. R. und E. H. Blackburn (1989). "An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres." *Mol Cell Biol* **9**(1): 345-8.
- Herrera, E., A. C. Martinez und M. A. Blasco (2000). "Impaired germinal center reaction in mice with short telomeres." *Embo J* **19**(3): 472-81.
- Herrera, E., E. Samper, J. Martin-Caballero, J. M. Flores, H. W. Lee und M. A. Blasco (1999). "Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres." *Embo J* **18**(11): 2950-60.
- Hiyama, E., K. Hiyama, T. Yokoyama und J. W. Shay (2001). "Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues." *Neoplasia* **3**(1): 17-26.
- Hiyama, K., Y. Hirai, S. Kyoizumi, M. Akiyama, E. Hiyama, M. A. Piatyszek, J. W. Shay, S. Ishioka und M. Yamakido (1995). "Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells." *J Immunol* **155**(8): 3711-5.
- Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini und E. Lacy (1994). Manipulating the mouse embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Humpherys, D., K. Eggan, H. Akutsu, K. Hochedlinger, W. M. Rideout, 3rd, D. Binizskiewicz, R. Yanagimachi und R. Jaenisch (2001). "Epigenetic instability in ES cells and cloned mice." *Science* **293**(5527): 95-7.
- Jeppesen, C. und P. E. Nielsen (1989). "Photofootprinting of drug-binding sites on DNA using diazo- and azido-9-aminoacridine derivatives." *Eur J Biochem* **182**(2): 437-44.
- Kaminker, P. G., S. H. Kim, R. D. Taylor, Y. Zebarjadian, W. D. Funk, G. B. Morin, P. Yaswen und J. Campisi (2001). "TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression." *J Biol Chem* **276**(38): 35891-9.
- Karlseder, J., D. Broccoli, Y. Dai, S. Hardy und T. de Lange (1999). "p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2." *Science* **283**(5406): 1321-5.
- Karlseder, J., A. Smogorzewska und T. de Lange (2002). "Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss." *Science* **295**(5564): 2446-9.
- Kim, S. H., P. Kaminker und J. Campisi (1999). "TIN2, a new regulator of telomere length in human cells." *Nat Genet* **23**(4): 405-12.

- Kinouchi, Y., N. Hiwatashi, M. Chida, F. Nagashima, S. Takagi, H. Maekawa und T. Toyota (1998). "Telomere shortening in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis." *J Gastroenterol* **33**(3): 343-8.
- Kitada, T., S. Seki, N. Kawakita, T. Kuroki und T. Monna (1995). "Telomere shortening in chronic liver diseases." *Biochem Biophys Res Commun* **211**(1): 33-9.
- Kues, W. A., M. Anger, J. W. Carnwath, D. Paul, J. Motlik und H. Niemann (2000). "Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors." *Biol Reprod* **62**(2): 412-9.
- Kyo, S., T. Kanaya, M. Takakura, M. Tanaka und M. Inoue (1999). "Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues." *Int J Cancer* **80**(1): 60-3.
- Lanza, R. P., H. Y. Chung, J. J. Yoo, P. J. Wettstein, C. Blackwell, N. Borson, E. Hofmeister, G. Schuch, S. Soker, C. T. Moraes, M. D. West und A. Atala (2002). "Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation." *Nat Biotechnol* **20**(7): 689-96.
- Lanza, R. P., J. B. Cibelli, C. Blackwell, V. J. Cristofalo, M. K. Francis, G. M. Baerlocher, J. Mak, M. Schertzer, E. A. Chavez, N. Sawyer, P. M. Lansdorp und M. D. West (2000). "Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells." *Science* **288**(5466): 665-9.
- Lee, H. W., M. A. Blasco, G. J. Gottlieb, J. W. Horner, 2nd, C. W. Greider und R. A. DePinho (1998). "Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs." *Nature* **392**(6676): 569-74.
- Lee, J., H. Kook, I. Chung, H. Kim, M. Park, C. Kim, J. Nah und T. Hwang (1999). "Telomere length changes in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation." *Bone Marrow Transplant* **24**(4): 411-5.
- Lieber, M. R. und Z. E. Karanjawala (2004). "Ageing, repetitive genomes and DNA damage." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(1): 69-75.
- Lingner, J., T. R. Hughes, A. Shevchenko, M. Mann, V. Lundblad und T. R. Cech (1997). "Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase." *Science* **276**(5312): 561-7.
- Loayza, D. und T. De Lange (2003a). "POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control." *Nature* **424**(6943): 1013-8.
- Loayza, D. und T. De Lange (2003b). "POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control." *Nature* **423**(6943): 1013-8.
- Loayza, D., H. Parsons, J. Donigian, K. Hoke und T. de Lange (2004). "DNA binding features of human POT1: a nonamer 5'-TAGGGTTAG-3' minimal binding site, sequence specificity, and internal binding to multimeric sites." *J Biol Chem* **279**(13): 13241-8.
- Lucas-Hahn, A., E. Lemme, K. G. Haderler, H. G. Sander und H. Niemann (2002). "The source of fibroblast affect in vivo development of cloned bovine embryos." *Theriogenology* **57**: 433.
- Makarov, V. L., Y. Hirose und J. P. Langmore (1997). "Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening." *Cell* **88**(5): 657-66.
- Martens, U. M., V. Brass, L. Sedlacek, M. Pantic, C. Exner, Y. Guo, M. Engelhardt, P. M. Lansdorp, C. F. Waller und W. Lange (2002). "Telomere maintenance in human B lymphocytes." *Br J Haematol* **119**(3): 810-8.
- Martin-Rivera, L., E. Herrera, J. P. Albar und M. A. Blasco (1998). "Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10471-6.

- Mathioudakis, G., R. Storb, P. A. McSweeney, B. Torok-Storb, P. M. Lansdorp, T. H. Brummendorf, M. J. Gass, E. M. Bryant, J. Storek, M. E. Flowers, T. Gooley und R. A. Nash (2000). "Polyclonal hematopoiesis with variable telomere shortening in human long-term allogeneic marrow graft recipients." *Blood* **96**(12): 3991-4.
- McClintock, B. (1941). "The stability of broken ends of chromosomes in *Zea Mays*." *Genetics* **26**: 234-282.
- McClintock, B. (1942). "The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **28**: 458-463.
- McEachern, M. J., A. Krauskopf und E. H. Blackburn (2000). "Telomeres and their control." *Annu Rev Genet* **34**: 331-358.
- McElligott, R. und R. J. Wellinger (1997). "The terminal DNA structure of mammalian chromosomes." *Embo J* **16**(12): 3705-14.
- Meyerson, M. (2000). "Role of telomerase in normal and cancer cells." *J Clin Oncol* **18**(13): 2626-34.
- Meyerson, M., C. M. Counter, E. N. Eaton, L. W. Ellisen, P. Steiner, S. D. Caddle, L. Ziaugra, R. L. Beijersbergen, M. J. Davidoff, Q. Liu, S. Bacchetti, D. A. Haber und R. A. Weinberg (1997). "hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization." *Cell* **90**(4): 785-95.
- Meyne, J., R. L. Ratliff und R. K. Moyzis (1989). "Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(18): 7049-53.
- Milyavsky, M., I. Shats, N. Erez, X. Tang, S. Senderovich, A. Meerson, Y. Tabach, N. Goldfinger, D. Ginsberg, C. C. Harris und V. Rotter (2003). "Prolonged culture of telomerase-immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype." *Cancer Res* **63**(21): 7147-57.
- Miura, N., I. Horikawa, A. Nishimoto, H. Ohmura, H. Ito, S. Hirohashi, J. W. Shay und M. Oshimura (1997). "Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis." *Cancer Genet Cytogenet* **93**(1): 56-62.
- Miyashita, N., K. Shiga, M. Yonai, K. Kaneyama, S. Kobayashi, T. Kojima, Y. Goto, M. Kishi, H. Aso, T. Suzuki, M. Sakaguchi und T. Nagai (2002). "Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types." *Biol Reprod* **66**(6): 1649-55.
- Morin, G. B. (1989). "The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats." *Cell* **59**(3): 521-9.
- Moyzis, R. K., J. M. Buckingham, L. S. Cram, M. Dani, L. L. Deaven, M. D. Jones, J. Meyne, R. L. Ratliff und J. R. Wu (1988). "A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(18): 6622-6.
- Munoz-Jordan, J. L., G. A. Cross, T. de Lange und J. D. Griffith (2001). "t-loops at trypanosome telomeres." *Embo J* **20**(3): 579-88.
- Nagai, T. (1987). "Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol." *Gamete Res* **16**(3): 243-9.
- Nakamura, T. M. und T. R. Cech (1998). "Reversing time: origin of telomerase." *Cell* **92**(5): 587-90.
- Nakamura, T. M., G. B. Morin, K. B. Chapman, S. L. Weinrich, W. H. Andrews, J. Lingner, C. B. Harley und T. R. Cech (1997). "Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human." *Science* **277**(5328): 955-9.
- Nakayama, J., H. Tahara, E. Tahara, M. Saito, K. Ito, H. Nakamura, T. Nakanishi, T. Ide und F. Ishikawa (1998). "Telomerase activation by hTRT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas." *Nat Genet* **18**(1): 65-8.

- Niemann, H., C. Wrenzycki, A. Lucas-Hahn, T. Brambrink, W. A. Kues und J. W. Carnwath (2002). "Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development." *Cloning Stem Cells* **4**(1): 29-38.
- Norrback, K. F., M. Hultdin, K. Dahlenborg, P. Osterman, R. Carlsson und G. Roos (2001). "Telomerase regulation and telomere dynamics in germinal centers." *Eur J Haematol* **67**(5-6): 309-17.
- Notaro, R., A. Cimmino, D. Tabarini, B. Rotoli und L. Luzzatto (1997). "In vivo telomere dynamics of human hematopoietic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13782-5.
- Nugent, C. I. und V. Lundblad (1998). "The telomerase reverse transcriptase: components and regulation." *Genes Dev* **12**(8): 1073-85.
- Ohashi, K., M. Tsutsumi, K. Kobitsu, T. Fukuda, T. Tsujiuchi, E. Okajima, S. Ko, Y. Nakajima, H. Nakano und Y. Konishi (1996a). "Shortened telomere length in hepatocellular carcinomas and corresponding background liver tissues of patients infected with hepatitis virus." *Jpn J Cancer Res* **87**(5): 419-22.
- Ohashi, K., M. Tsutsumi, Y. Nakajima, K. Kobitsu, H. Nakano und Y. Konishi (1996b). "Telomere changes in human hepatocellular carcinomas and hepatitis virus infected noncancerous livers." *Cancer* **77**(8 Suppl): 1747-51.
- Olovnikov, A. M. (1971). "[Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]." *Dokl Akad Nauk SSSR* **201**(6): 1496-9.
- Presicce, G. A. und X. Yang (1994a). "Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment." *Mol Reprod Dev* **37**(1): 61-8.
- Presicce, G. A. und X. Yang (1994b). "Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide." *Mol Reprod Dev* **38**(4): 380-5.
- Prowse, K. R. und C. W. Greider (1995). "Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 4818-22.
- Rambhatla, L., B. Patel, N. Dhanasekaran und K. E. Latham (1995). "Analysis of G protein alpha subunit mRNA abundance in preimplantation mouse embryos using a rapid, quantitative RT-PCR approach." *Mol Reprod Dev* **41**(3): 314-24.
- Reaper, P. M., F. di Fagagna und S. P. Jackson (2004). "Activation of the DNA damage response by telomere attrition: a passage to cellular senescence." *Cell Cycle* **3**(5): 543-6.
- Reichenbach, P., M. Hoss, C. M. Azzalin, M. Nabholz, P. Bucher und J. Lingner (2003). "A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed." *Curr Biol* **13**(7): 568-74.
- Remes, K., K. F. Norrback, R. Rosenquist, C. Mehle, J. Lindh und G. Roos (2000). "Telomere length and telomerase activity in malignant lymphomas at diagnosis and relapse." *Br J Cancer* **82**(3): 601-7.
- Rhodes, D., L. Fairall, T. Simonsson, R. Court und L. Chapman (2002). "Telomere architecture." *EMBO Rep* **3**(12): 1139-45.
- Rideout, W. M., 3rd, K. Eggan und R. Jaenisch (2001). "Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome." *Science* **293**(5532): 1093-8.
- Roelofs, H., E. S. de Pauw, A. H. Zwinderman, S. M. Opdam, R. Willemze, H. J. Tanke und W. E. Fibbe (2003). "Homeostasis of telomere length rather than telomere shortening after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation." *Blood* **101**(1): 358-62.

- Rudolph, K. L., S. Chang, H. W. Lee, M. Blasco, G. J. Gottlieb, C. Greider und R. A. DePinho (1999). "Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice." *Cell* **96**(5): 701-12.
- Rudolph, K. L., S. Chang, M. Millard, N. Schreiber-Agus und R. A. DePinho (2000). "Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery." *Science* **287**(5456): 1253-8.
- Rufer, N., T. H. Brummendorf, S. Kolvraa, C. Bischoff, K. Christensen, L. Wadsworth, M. Schulzer und P. M. Lansdorp (1999). "Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood." *J Exp Med* **190**(2): 157-67.
- Samani, N. J., R. Boulby, R. Butler, J. R. Thompson und A. H. Goodall (2001). "Telomere shortening in atherosclerosis." *Lancet* **358**(9280): 472-3.
- Satyanarayana, A., R. A. Greenberg, S. Schaezlein, J. Buer, K. Masutomi, W. C. Hahn, S. Zimmermann, U. Martens, M. P. Manns und K. L. Rudolph (2004a). "Mitogen stimulation cooperates with telomere shortening to activate DNA damage responses and senescence signaling." *Mol Cell Biol* **24**(12): 5459-74.
- Satyanarayana, A., M. Manns und K. Rudolph (2004b). "Telomeres and Telomerase: A dual role in hepatocarcinogenesis." *Hepatology* **40**(2): 276-283.
- Satyanarayana, A., M. Manns und K. Rudolph (2004 in press). "Telomeres and Telomerase: A dual role in hepatocarcinogenesis." *Hepatology*.
- Sbodio, J. I. und N. W. Chi (2002a). "Identification of a tankyrase-binding motif shared by IRAP, TAB182, and human TRF1 but not mouse TRF1. NuMA contains this RXXPDG motif and is a novel tankyrase partner." *J Biol Chem* **277**(35): 31887-92.
- Sbodio, J. I., H. F. Lodish und N. W. Chi (2002b). "Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase)." *Biochem J* **361**(Pt 3): 451-9.
- Seimiya, H. und S. Smith (2002). "The telomeric poly(ADP-ribose) polymerase, tankyrase 1, contains multiple binding sites for telomeric repeat binding factor 1 (TRF1) and a novel acceptor, 182-kDa tankyrase-binding protein (TAB182)." *J Biol Chem* **277**(16): 14116-26.
- Shay, J. W. und S. Bacchetti (1997). "A survey of telomerase activity in human cancer." *Eur J Cancer* **33**(5): 787-91.
- Shiels, P. G., A. J. Kind, K. H. Campbell, D. Waddington, I. Wilmut, A. Colman und A. E. Schnieke (1999). "Analysis of telomere lengths in cloned sheep." *Nature* **399**(6734): 316-7.
- Slagboom, P. E., S. Droog und D. I. Boomsma (1994). "Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups." *Am J Hum Genet* **55**(5): 876-82.
- Smith, S. und T. de Lange (2000). "Tankyrase promotes telomere elongation in human cells." *Curr Biol* **10**(20): 1299-302.
- Smith, S., I. Girit, A. Schmitt und T. de Lange (1998). "Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres." *Science* **282**(5393): 1484-7.
- Smogorzewska, A. und T. De Lange (2004). "Regulation of telomerase by telomeric proteins." *Annu Rev Biochem* **73**: 177-208.
- Stansel, R. M., T. de Lange und J. D. Griffith (2001). "T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang." *Embo J* **20**(19): 5532-40.
- Takai, H., A. Smogorzewska und T. de Lange (2003). "DNA damage foci at dysfunctional telomeres." *Curr Biol* **13**(17): 1549-56.
- Takubo, K., N. Izumiyama-Shimomura, N. Honma, M. Sawabe, T. Arai, M. Kato, M. Oshimura und K. Nakamura (2002). "Telomere lengths are characteristic in each human individual." *Exp Gerontol* **37**(4): 523-31.

- Takubo, K., K. Nakamura, N. Izumiyama, E. Furugori, M. Sawabe, T. Arai, Y. Esaki, K. Mafune, M. Kammori, M. Fujiwara, M. Kato, M. Oshimura und K. Sasajima (2000). "Telomere shortening with aging in human liver." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**(11): B533-6.
- Tian, X. C., J. Xu und X. Yang (2000). "Normal telomere lengths found in cloned cattle." *Nat Genet* **26**(3): 272-3.
- Tommerup, H., A. Dousmanis und T. de Lange (1994). "Unusual chromatin in human telomeres." *Mol Cell Biol* **14**(9): 5777-85.
- Urabe, Y., K. Nouse, T. Higashi, H. Nakatsukasa, N. Hino, K. Ashida, N. Kinugasa, K. Yoshida, S. Uematsu und T. Tsuji (1996). "Telomere length in human liver diseases." *Liver* **16**(5): 293-7.
- van Steensel, B. und T. de Lange (1997). "Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1." *Nature* **385**(6618): 740-3.
- van Steensel, B., A. Smogorzewska und T. de Lange (1998). "TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions." *Cell* **92**(3): 401-13.
- Vaziri, H., F. Schachter, I. Uchida, L. Wei, X. Zhu, R. Effros, D. Cohen und C. B. Harley (1993). "Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes." *Am J Hum Genet* **52**(4): 661-7.
- Vulliamy, T., A. Marrone, F. Goldman, A. Dearlove, M. Bessler, P. J. Mason und I. Dokal (2001). "The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita." *Nature* **413**(6854): 432-5.
- Wakayama, T., Y. Shinkai, K. L. Tamashiro, H. Niida, D. C. Blanchard, R. J. Blanchard, A. Ogura, K. Tanemura, M. Tachibana, A. C. Perry, D. F. Colgan, P. Mombaerts und R. Yanagimachi (2000). "Cloning of mice to six generations." *Nature* **407**(6802): 318-9.
- Weng, N. P., L. Granger und R. J. Hodes (1997). "Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10827-32.
- Wiemann, S. U., A. Satyanarayana, M. Tsahuridu, H. L. Tillmann, L. Zender, J. Klempnauer, P. Flemming, S. Franco, M. A. Blasco, M. P. Manns und K. L. Rudolph (2002). "Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis." *Faseb J* **16**(9): 935-42.
- Wrenzycki, C., D. Herrmann, L. Keskinetepe, A. Martins, Jr., S. Sirisathien, B. Brackett und H. Niemann (2001). "Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos." *Hum Reprod* **16**(5): 893-901.
- Wright, W. E., M. A. Piatyszek, W. E. Rainey, W. Byrd und J. W. Shay (1996). "Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells." *Dev Genet* **18**(2): 173-9.
- Wright, W. E. und J. W. Shay (1992). "The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization." *Exp Gerontol* **27**(4): 383-9.
- Wright, W. E. und J. W. Shay (2001). "Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting." *Curr Opin Genet Dev* **11**(1): 98-103.
- Wright, W. E., V. M. Tesmer, K. E. Huffman, S. D. Levene und J. W. Shay (1997). "Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end." *Genes Dev* **11**(21): 2801-9.
- Wu, K. J., C. Grandori, M. Amacker, N. Simon-Vermot, A. Polack, J. Lingner und R. Dalla-Favera (1999). "Direct activation of TERT transcription by c-MYC." *Nat Genet* **21**(2): 220-4.

- Wynn, R., I. Thornley, M. Freedman und E. F. Saunders (1999). "Telomere shortening in leucocyte subsets of long-term survivors of allogeneic bone marrow transplantation." *Br J Haematol* **105**(4): 997-1001.
- Wynn, R. F., M. A. Cross, C. Hatton, A. M. Will, L. S. Lashford, T. M. Dexter und N. G. Testa (1998). "Accelerated telomere shortening in young recipients of allogeneic bone-marrow transplants." *Lancet* **351**(9097): 178-81.
- Xu, J. und X. Yang (2000). "Telomerase activity in bovine embryos during early development." *Biol Reprod* **63**(4): 1124-8.
- Xu, J. und X. Yang (2001). *Biol. Reprod* **64**: 770-774.
- Xu, J. und X. Yang (2001). "Telomerase activity in early bovine embryos derived from parthenogenetic activation and nuclear transfer." *Biol Reprod* **64**(3): 770-4.
- Yatabe, N., S. Kyo, Y. Maida, H. Nishi, M. Nakamura, T. Kanaya, M. Tanaka, K. Isaka, S. Ogawa und M. Inoue (2004). "HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells." *Oncogene* **23**(20): 3708-15.
- Youngren, K., E. Jeanclos, H. Aviv, M. Kimura, J. Stock, M. Hanna, J. Skurnick, A. Bardeguet und A. Aviv (1998). "Synchrony in telomere length of the human fetus." *Hum Genet* **102**(6): 640-3.
- Zhu, J., H. Wang, J. M. Bishop und E. H. Blackburn (1999). "Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3723-8.
- Zhu, L., K. S. Hathcock, P. Hande, P. M. Lansdorp, M. F. Seldin und R. J. Hodes (1998). "Telomere length regulation in mice is linked to a novel chromosome locus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8648-53.

6. LEBENS LAUF

Buchenhain 6 Telefon 0511-532 6996
 30629
 Hannover Fax 0511-532 6998
 E-Mail schaeztlein.sonja@mh-hannover.de

Sonja Schätzlein

Persönliche Informationen

Gebrutstag: 03. April 1977
 Geburtsort: Mainz

Schulbildung

1983 – 1987 Grundschule, Mainz
 1987 – 1993 Realschule, Mainz
 1993 - 1996 Oberstufe des Bischöflichen Willigis Gymnasiums,
 Mainz

Studium

1996 - 2001 Biologiestudium an der
 Johannes Gutenberg- Universität Mainz
 1998 Vordiplom (Zoologie, Botanik, Mathematik, Chemie)
 2000 – 2001 Diplomarbeit, Institut für Tierphysiologie II
 2001 Abschluss des Biologiestudiums mit dem Diplom
 (Biochemie, Zoologie, Genetik)

Doktorarbeit

2001 Beginn der Doktorarbeit an der
 Medizinischen Hochschule
 Hannover, Abt. Gastroenterologie, AG Rudolph

Publikationen

Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis.
 Schaeztlein S, Lucas-Hahn A, Lemme E, Kues WA, Dorsch M,
 Manns MP, Niemann H, Rudolph KL Proc Natl Acad Sci U S A. 2004
 May 25;101(21):8034-8. Epub 2004 May 17.

**Mitogen stimulation cooperates with telomere shortening to activate
 DNA damage responses and senescence
 signaling.**

Satyanarayana A, Greenberg RA, Schaeztlein S, Buer J, Masutomi K,
 Hahn WC, Zimmermann S, Martens U, Manns MP, Rudolph KL.
 Mol Cell Biol. 2004 Jun;24(12):5459-74.

**Telomere Length Regulation during Cloning, Embryogenesis,
 and Aging**

S. Schaeztlein, K.L. Rudolph
 Reproduction Fertility and Development, eingereicht

Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis.
 Poster auf dem Workshop: Telomeres and Telomerase: Therapeutical
 Targets for Cancer and Aging
 Madrid

7. DANKSAGUNG

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

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

Meinem Arbeitsgruppenleiter PD Dr. Rudolph danke ich für Bereitstellung des interessanten Themas, die tatkräftige Betreuung und Unterstützung während der Arbeit, den produktiven Diskussionen, sowie dem Gegenlesen der Dissertation.

Dem Kooperationspartner Herrn Prof. Dr. Niemann und seinen Kollegen danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit in Zusammenhang mit den geklonten Rindern und Embryonen und für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials.

Ganz besonderer Dank geht auch an meine Arbeitskollegen der AG Rudolph: André, Christoph, Meta, Ruben, Satya und Steffi. Ihr habt den Laboralltag nie langweilig werden lassen und ich bin froh, in Euch nicht nur Kollegen, sondern auch Freunde gewonnen zu haben.

Dr. Latham danke ich für die Durchführung der Dot Blot Analysen und die geduldige Beantwortung meiner Fragen bezüglich der embryonalen mRNA-Expression. Prof. Dr. Ungewickell möchte ich für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops danken, an dem ich teilweise Tage für die Dokumentation der Q-FISH Analysen verbracht habe.

Besonderer Dank geht auch an die Mitarbeiter der AGs Kubicka und Trautwein, die mir geduldig meine Fragen rund um die Molekularbiologie beantworteten und mir nicht selten mit Arbeitsmaterial ausgeholfen haben.

Dr. Malek und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die zahlreichen und sehr kritischen Anmerkungen zu meiner Arbeit während unserer gemeinsamen lab meetings.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Dorsch und ihren Mitarbeiterinnen des Zentralen Tierlabors, Regina und Cindy, ohne deren Hilfe die Präparation der Mausembryonen nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir durch ihre Hilfe und Unterstützung das Studium der Biologie am „Sandkasten der Universität“ erst ermöglicht haben.

Last not least danke ich Dir Holger, dass Du meine Entscheidung nach Hannover zu gehen und diese Arbeit anzunehmen nie in Frage gestellt hast, mich immer vorbehaltlos unterstützt und meine Hochs und Tiefs geduldig ertragen hast.

Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

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

Hannover, den 25. Oktober 2004