

**Untersuchungen zur Chromosomenevolution und  
Charakterisierung des Telomerkomplexes  
von Muntjakhirschen**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
genehmigte Dissertation

Bibliotheksnummer D 386

vorgelegt von  
Diplom-Biologe  
Nils Hartmann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 1. Juli 2005

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. J. Cullum  
Erster Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scherthan  
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. H. Zankl

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Harry Scherthan für die Vergabe des Themas, die intensive Betreuung der Arbeit, seine stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Hans-Hilger Ropers möchte ich für die fortwährende und bis zuletzt großzügige Unterstützung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Zankl danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Bei Frau Dr. Hanna Weiss-Schneeweiss von der Universität Wien möchte ich mich ganz herzlich für ihre Hilfe und Einsatz beim TRAP-Assay bedanken.

Herrn Dr. Manfred Ochs vom Berliner Zoo danke ich für die Gewebeproben des chinesischen Muntjaks, Herrn Dr. Fengtang Yang von der Universität Cambridge (England) für die *MRE*-Chromosom-12 Paintsonde und Herrn Prof. Dr. Jerry Shay von der Universität Texas (USA) für die primären Muntjakfibroblasten.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Mitstreitern an der Bench bedanken: Allen voran bei Bodo Liebe für seine stete Unterstützung und Geduld in allen Computerfragen, bei Dr. Edgar Trelles-Sticken für seine Unterstützung und Hilfe, zum Beispiel beim Mikroskopieren, sowie bei Dr. Caroline Adelfalk für die Hilfe im Laboralltag. Außerdem danke ich Sybille Krauß für die Unterstützung beim Isolieren von Proteinen, Dr. Jennifer Winter für ihre Hilfe bei allen Fragen rund um das Thema RNA und bei Jörn Dullinger für wertvolle Tipps beim Southern Blot.

Ein ganz dickes Dankeschön geht an Corinna Menzel, Barbara Meinck und Petra Viertel für die Unterstützung im Laboralltag. Außerdem danke ich Susanne Freier und Hannelore Madle für die Hilfe beim Versorgen der Zellen und allen anderen aus der Abteilung Ropers für ihre Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern bin ich für sehr vieles dankbar, vor allem dafür, dass sie mich mein ganzes Leben lang ermutigt und unterstützt haben.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
1.1	Die Bedeutung von Chromosomenumbauten für die Artbildung .....	4
1.2	Chromosomenevolution der Muntjakhirsche .....	6
1.3	Chromosomenfusionen .....	9
1.4	Centromer- und Satelliten-DNA.....	13
1.5	Telomere .....	15
1.6	Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	26
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>28</b>
2.1.1	Chemikalien .....	28
2.1.2	Puffer und Lösungen.....	31
2.1.2.1	Isolation und Analyse von Nukleinsäuren .....	31
2.1.2.2	Northern Blot (NB) / Southern Blot (SB).....	31
2.1.2.3	Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....	32
2.1.2.4	Arbeiten mit Zellen.....	33
2.1.2.5	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung .....	34
2.1.2.6	TRAP-Assay .....	34
2.1.3	Oligonukleotide (Primer).....	35
2.1.4	DNA-Marker.....	38
2.1.5	Enzyme .....	38
2.1.6	Kommerzielle Kits.....	39
2.1.7	Antikörper und andere Detektionsreagenzien.....	40
2.1.8	Zellen und Gewebeproben .....	40
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>42</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	42
2.2.1.1	Präparation von genomischer DNA .....	42
2.2.1.2	Präparation von RNA aus Zelllinien und Gewebe.....	43
2.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	44
2.2.1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	45
2.2.1.5.1	Standard-PCR .....	46
2.2.1.5.2	Nested PCR.....	47
2.2.1.5.3	Long-Range PCR.....	47
2.2.1.5.4	RT-PCR.....	47
2.2.1.5.5	RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) .....	48
2.2.1.5.6	Inverse PCR .....	49
2.2.1.6	Klonierung von PCR-Produkten.....	50

2.2.1.6.1	Aufreinigung und Ligation von PCR-Produkten .....	50
2.2.1.6.2	Transformation.....	50
2.2.1.6.3	Präparation von Plasmid-DNA .....	51
2.2.1.6.4	Klonierung des <i>TERF2</i> -Gens vom chinesischen Muntjak.....	52
2.2.1.7	Sequenzierung.....	53
2.2.1.8	Sequenzanalyse.....	54
2.2.1.9	Northern Blot.....	54
2.2.1.10	Telomerlängenbestimmung mittels Southern Blot .....	56
2.2.2	Cytologische und cytogenetische Methoden .....	57
2.2.2.1	Zellkultur.....	57
2.2.2.2	Isolierung von Fibroblasten aus Muntjak-Bindegewebe .....	58
2.2.2.3	Transfektion von Muntjakfibroblasten .....	59
2.2.2.4	Immunfärbung.....	60
2.2.2.5	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	61
2.2.2.5.1	Präparation von Metaphasechromosomen .....	61
2.2.2.5.2	Herstellung von C <sub>0</sub> t 1-DNA.....	63
2.2.2.5.3	Markierung von DNA-Sonden.....	63
2.2.2.5.4	Dot-Blot .....	65
2.2.2.5.5	Vorbehandlung der Sonden-DNA für die <i>in situ</i> Hybridisierung.....	65
2.2.2.5.6	Vorbehandlung der Chromosomen und <i>in situ</i> Hybridisierung.....	66
2.2.2.5.7	Detektion.....	67
2.2.2.6	Fiber-FISH.....	68
2.2.2.7	Mikroskopische Auswertung und Bildverarbeitung.....	69
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	70
2.2.3.1	TRAP-Assay .....	70
2.2.3.1.1	Isolation von Proteinen .....	70
2.2.3.1.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	71
2.2.3.1.3	Bestimmung der Telomeraseaktivität .....	72
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>74</b>
<b>3.1</b>	<b>Kombinierte Telomer-Satelliten PCR.....</b>	<b>74</b>
<b>3.2</b>	<b>Sequenzanalyse der isolierten PCR-Produkte.....</b>	<b>78</b>
<b>3.3</b>	<b>Chromosomale Lokalisation der PCR-Produkte.....</b>	<b>82</b>
<b>3.4</b>	<b>Fiber-FISH mit Telomer- und Satellitensonden .....</b>	<b>84</b>
<b>3.5</b>	<b>Kolokalisation von Telomer- und Satelliten-DNA .....</b>	<b>85</b>
<b>3.6</b>	<b>Isolation der Muntjak <i>TERF</i>-Gene .....</b>	<b>88</b>
<b>3.7</b>	<b>Sequenzanalyse der Muntjak <i>TERF</i>-Gene .....</b>	<b>90</b>
<b>3.8</b>	<b>Expressionsmuster von <i>TERF1</i> und -2 .....</b>	<b>91</b>

---

3.9	Spleißvarianten von <i>TERF1</i> und -2.....	92
3.10	Kartierung der <i>TERF</i> -Gene auf Muntjakchromosomen .....	95
3.11	ClustalW-Vergleich der homologen cDNA- und Proteinsequenzen .....	99
3.12	Das <i>mre</i> TRF2-GFP-Protein lokalisiert an Telomere.....	105
3.13	Expression weiterer Telomer-relevanter Gene .....	108
3.14	Testisgewebe vom chinesischen Muntjak zeigt Telomeraseaktivität .....	111
3.15	Bestimmung der Telomerlänge.....	112
4	<b>DISKUSSION</b> .....	115
4.1	Chromosomenumbauten im Laufe der Evolution .....	115
4.2	Die Rolle von repetitiven DNA-Sequenzen bei Chromosomenumbauten ...	116
4.3	Telomer- und Satellitensequenzen im indischen Muntjakgenom .....	118
4.4	Die Telomere schützten vor Chromosomenfusionen.....	123
4.5	Expression Telomer-assoziiertes Gene .....	125
4.6	Die <i>TERF</i> -Gene der Muntjaks.....	127
4.7	Expression und Spleißvarianten von <i>TERF1</i> und -2 .....	128
4.8	Die <i>TERF</i> -Gene kartieren in Regionen konservierter Syntenie .....	130
4.9	Die TRF-Proteine der Muntjaks sind hoch konserviert.....	131
4.10	Muntjakzellen exprimieren funktionelles TRF2.....	132
4.11	Ausblick .....	133
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	135
6	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	136
7	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	154
8	<b>LEBENS LAUF</b> .....	156
9	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN AUS DIESER ARBEIT</b> .....	157

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung von Chromosomenumbauten für die Artbildung

Ein zentraler Vorgang in der Evolution ist die Artbildung (Speziation). Schon Darwin (1859) betrachtete in seinem Buch „On The Origin of Species“ die Evolution als eine Folge von Artbildungsvorgängen. Eine wichtige Rolle bei dem Prozess der Artbildung spielen sogenannte Isolationsmechanismen und Reproduktionsbarrieren, die seit der Entwicklung des Spezies-Konzepts (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942), das die Art als eine Fortpflanzungsgemeinschaft definiert, deren Angehörige sich potentiell untereinander fortpflanzen können, aber von den Angehörigen anderer Arten reproduktiv isoliert sind, intensiv studiert werden. Als eine der wichtigsten Isolationsmechanismen gilt die geographische Trennung des Verbreitungsgebietes, man spricht hierbei von allopatrischer Artbildung (Mayr, 1970). Daneben kennt man inzwischen eine Vielzahl von Reproduktionsbarrieren, von denen Veränderungen der Chromosomen eine Möglichkeit darstellen (King, 1993).

Da jede Art eine charakteristische Konstitution und Anzahl von Chromosomen besitzt (Karyotyp), werden Veränderungen der Chromosomenzahl durch zum Beispiel Fusionen oder Fissionen sowie andere chromosomale Umbauten wie zum Beispiel Translokationen oder Inversionen schon seit längerem mit dem Prozess der Artbildung in Verbindung gebracht (White, 1973; King, 1993). Bei dieser sogenannten stasipatrischen Artbildung entsteht aufgrund der reduzierten Fruchtbarkeit der Heterozygoten eine

Barriere zwischen Trägern der ursprünglichen Chromosomenanordnung und Trägern mit der neuen Chromosomenveränderung (White, 1973). Das Problem besteht darin, wie zumindest einmal dieses nachteilige, heterozygote Stadium überwunden werden kann (zur Übersicht siehe Elder und Hsu, 1988; Capanna und Castiglia, 2004). Es wird angenommen, dass verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel eine kleine Populationsgröße und Verpaarung mit nahen Verwandten (Inzucht), die Überwindung eines solchen Stadiums begünstigen (Bush et al., 1977). Das Konzept der stasipatrischen Artbildung ist jedoch umstritten, da Chromosomenumbauten auch erst nach der Speziation erfolgen können und dann völlig unabhängig von dem Prozess der Artbildung wären (zur Übersicht siehe Ayala und Coluzzi, 2005). Im Nachhinein lässt sich nur schwer feststellen, inwieweit die Chromosomenumbauten die Artbildung verursacht haben oder inwieweit sie nur als Folgerscheinung der Artbildung aufgetreten sind (Gibson, 1984).

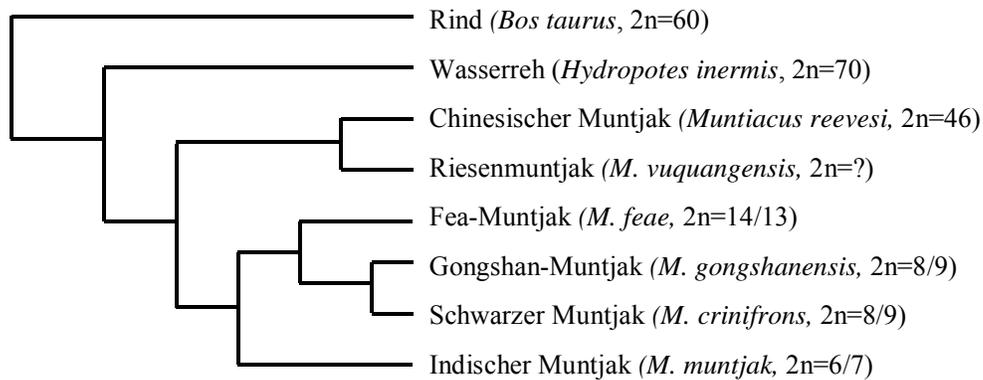
Um mehr über die Mechanismen von Chromosomenveränderungen zu erfahren, spielen Vergleiche zwischen verschiedenen Spezies und Gruppen eine große Rolle. So sind schon seit längerem die Chromosomenzahlen von zahlreichen Säugetieren bekannt (zur Übersicht siehe Matthey, 1973; Scherthan, 2003). Danach haben die meisten Säugetiere mittlere Chromosomenzahlen von  $2n=36-60$ . Insgesamt variiert die Chromosomenzahl zwischen  $2n=6$  im weiblichen indischen Muntjakhirsch (*Muntiacus muntjak vaginalis*; Wurster und Benirschke, 1970) und  $2n=102$  in der roten Viscacharatte (*Tympanoctomys barrerae*; Contreras et al., 1990).

Des Weiteren haben Vergleiche der Chromosomenzahlen ergeben, dass in manchen Gruppen, wie zum Beispiel bei den Felidae (Katzen), nahverwandte Arten

gleiche oder sehr ähnliche Chromosomenzahlen aufweisen (Wurster-Hill und Gray, 1978; Nash und O'Brien, 1982). Auf der anderen Seite existieren Taxa, wie zum Beispiel die Cervidae (Hirsche) und die Rodentia (Nagetiere), die große Unterschieden in der Chromosomenzahl besitzen und somit durch eine rasche Karyotypevolution gekennzeichnet sind (zur Übersicht siehe Neitzel, 1987; Scherthan, 2003).

## 1.2 Chromosomenevolution der Muntjakhirsche

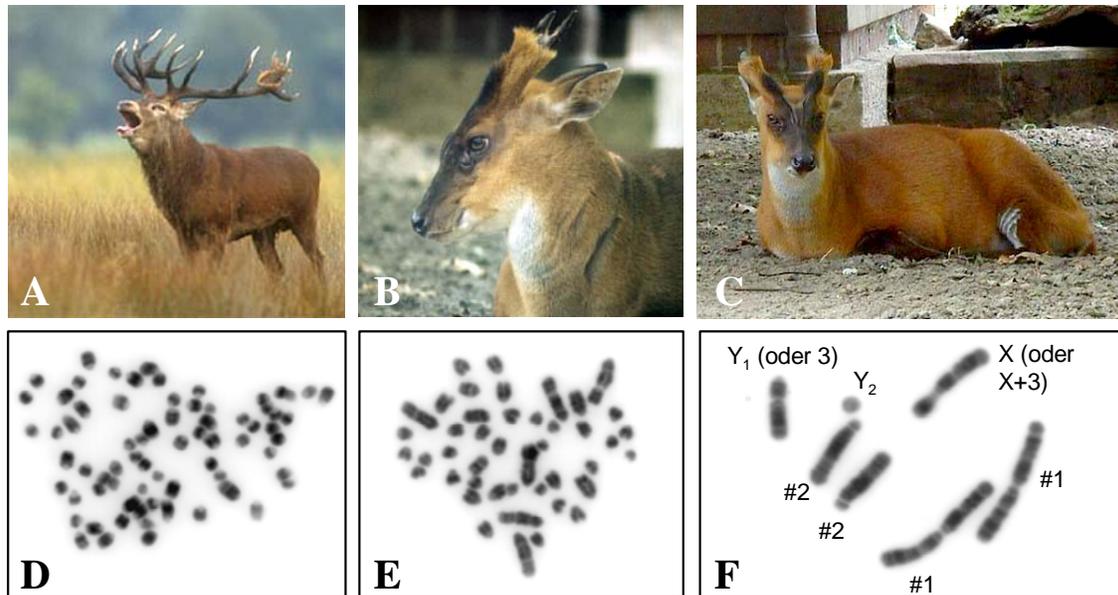
Die Gattung *Muntiacus* ist durch sehr unterschiedliche Chromosomenzahlen gekennzeichnet, die von  $2n=46$  Chromosomen im chinesischen Muntjak (*Muntiacus reevesi*) (Wurster und Benirschke, 1967) bis zu  $2n=6$  im weiblichen und  $2n=7$  Chromosomen im männlichen indischen Muntjak reichen. Dazwischen liegende Chromosomenzahlen besitzt der schwarze Muntjak (*M. crinifrons*) und der Gongshan-Muntjak (*M. gongshanensis*) mit jeweils  $2n=8♀/9♂$  Chromosomen (Shi, 1983; Shi und Ma, 1988) sowie der Fea- bzw. Tenasserim-Muntjak (*M. feae*) mit  $2n=13♀/14♂$  (Soma et al., 1983). Außerdem kennt man einige weitere Muntjakarten, wie den Riesenmuntjak (*M. vuquangensis*) (Schaller und Vrba, 1996), den Roosevelt-Muntjak (*M. rooseveltorum*) (Wurster-Hill und Seidel, 1985), den Truong-Son-Muntjak (*M. truongsoneensis*) (Giao et al., 1998) und den Putao-Muntjak (*M. putaoensis*) (Datta et al., 2003). Da letztere Muntjakarten zum Teil erst vor kurzem beschrieben wurden, ist ihre Einordnung als eigenständige Arten oder Unterarten noch umstritten und ihre Chromosomenzahl nicht bekannt.



**Abb. 1:** Phylogenetischer Stammbaum der Gattung *Muntiacus* anhand mitochondrialer DNA-Sequenzen (nach Wang und Lan, 2000). *Bos taurus* und *Hydropotes inermis* dienen als Außengruppen und in Klammern sind die diploiden Chromosomenzahlen von jeder Art angegeben. Der erstellte Stammbaum unterstützt die Vorstellung, dass die Karyotypevolution innerhalb der Gattung *Muntiacus* von einem vermeintlichen Vorfahren mit  $2n=70$  Chromosomen über einen dem heutigen chinesischen Muntjak entsprechenden Karyotyp ( $2n=46$ ) bis zu einem dem heutigen Fea-Muntjak entsprechenden Karyotyp ( $2n=13/14$ ) linear verlaufen ist. Allerdings müsste nach diesem Stammbaum die Reduzierung der Chromosomenanzahl von einem dem Fea-Muntjak entsprechenden Karyotyp zum Gongshan- und schwarzen Muntjak ( $2n=8/9$ ) und der zum indischen Muntjak ( $2n=6/7$ ) unabhängig voneinander verlaufen sein.

Kürzlich haben Wang und Lan (2000) anhand von mitochondrialen DNA-Fragmenten einen phylogenetischen Stammbaum der Gattung *Muntiacus* erstellt und dabei ermittelt, dass der letzte gemeinsame Vorfahre aller heutigen Muntjakarten vor etwa 1,9 - 3,7 Millionen Jahre lebte (siehe Abb. 1). Berücksichtigt man die drastischen Veränderungen der Chromosomenzahl, ist dies eine relativ kurze evolutionäre Zeitspanne. Die enge Verwandtschaft zwischen den Muntjakarten wird auch in Kreuzungsexperimenten zwischen einem männlichen indischen Muntjak und einem weiblichen chinesischen Muntjak deutlich, die trotz der sehr unterschiedlichen Chromosomenzahlen zu lebensfähigen, aber unfruchtbaren Nachkommen führten (Shi et

al., 1980; Neitzel et al., 1986). Die Karyotypanalyse der Nachkommen ergab, dass männliche F1-Hybriden  $2n=27$  und weibliche Hybriden  $2n=26$  Chromosomen besaßen. Die Zahlen belegen eindeutig, dass der Karyotyp der Hybriden aus den zwei haploiden Chromosomensätzen der Eltern besteht.



**Abb. 2:** Variation der Chromosomenanzahl innerhalb der Cervidae. Europäischer Rothirsch (*Cervus elaphus*) (A) mit  $2n=68$  Chromosomen (D). Chinesischer Muntjak (*Muntiacus reevesi*) (B) mit  $2n=46$  (E). Indischer Muntjak (*Muntiacus muntjak vag.*) (C) mit  $2n=6$  beim Weibchen und  $2n=7$  beim Männchen (F). Der Unterschied in der Chromosomenzahl zwischen Männchen und Weibchen beim indischen Muntjak resultiert aus einer Fusion des früheren X-Chromosoms mit dem Autosom 3 zum heutigen X-Chromosom bzw. X+3 Chromosom. Da Männchen dieses X+3 Chromosom nur einmal haben, besitzen sie zusätzlich das ursprüngliche Chromosom 3 (auch  $Y_1$  genannt) und das eigentliche kleine Y-Chromosom ( $Y_2$ ).

Die extremen Chromosomenveränderungen werden besonders deutlich, wenn man von einem ursprünglichen Karyotyp der Cervidae (Familie der Hirsche) von  $2n=70$  akrozentrischen Chromosomen ausgeht, dem wahrscheinlich der heutige Karyotyp von

*Mazama gouazoubira* (Brauner Spießhirsch,  $2n=70$ ) und *Hydropotes inermis* (Wasserreh,  $2n=70$ ) am nächsten kommt (Neitzel, 1987). Außerdem besitzen viele der heutigen Hirscharten im Vergleich zu anderen Säugetieren relativ hohe Chromosomenzahlen (Fontana und Rubini, 1990). Daher wurde schon früh die Hypothese aufgestellt, dass der heutige Karyotyp des indischen Muntjaks durch zahlreiche Chromosomenfusionen entstanden ist (Abb. 2; Hsu et al., 1975).

### 1.3 Chromosomenfusionen

Für die Veränderungen des Karyotyps und der Chromosomenanzahl einer Art können verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Neben Chromosomenfusionen und -fissionen spielen vor allem reziproke Translokationen, bei denen Chromosomenabschnitte zwischen zwei nicht-homologen Chromosomen ausgetauscht werden, und Inversionen eine wichtige Rolle (White, 1973; King, 1993). Bei Inversionen wird zwischen einer parazentrischen Inversion, bei der die Orientierung eines Abschnitts innerhalb eines Chromosomenarmes verändert wird, und einer perizentrischen Inversion, bei der der invertierte Chromosomenabschnitt das Centromer beinhaltet, unterschieden.

Bei Chromosomenfusionen unterscheidet man grundsätzlich drei Typen von Chromosomenfusionen, die Centromer-Centromerfusion, die Centromer-Telomerfusion und die Telomer-Telomerfusion, wobei sich die Begriffe Centromer und Telomer auf die Orientierung der Chromosomen beziehen und nicht zwangsläufig die Involvierung dieser Strukturen in dem Fusionsprozess bedeuten (Abb. 3; Elder und Hsu, 1988). Die Centromer-Centromerfusion wird auch als zentrische oder Robertson'sche Translokation

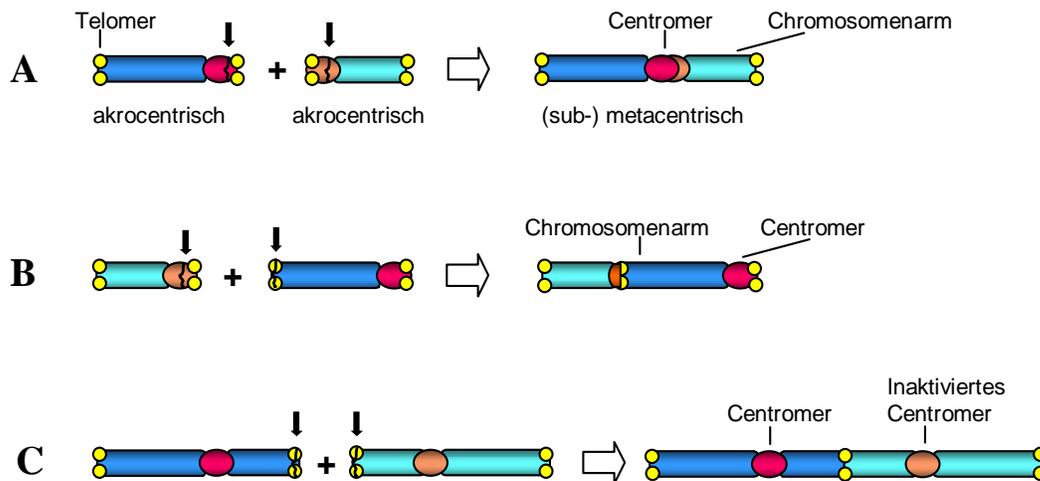
bzw. Fusion bezeichnet und beschreibt die Fusion von zwei akrocentrischen Chromosomen zu einem zweiarmigen (metacentrischen oder submetacentrischen) Chromosom (Abb. 3A). Voraussetzung hierfür sind Brüche im Centromerbereich der beiden akrocentrischen Chromosomen. Außerdem muss nach der Fusion, wenn beide Centromere noch intakt sind, ein Centromer inaktiviert werden. Dieser Vorgang kann auch in umgekehrter Weise erfolgen und man spricht dann von einer zentrischen Fission. Hierbei bricht ein meta- oder submetacentrisches Chromosom auseinander, so dass zwei akrocentrische Chromosomen entstehen.

Für die Centromer-Telomerfusion, auch als Tandemfusion (oder Head-to-Tail Fusion) bezeichnet, müssen Chromosomenbrüche im distalen Ende und im Centromerbereich eines zweiten Chromosoms erfolgen (Abb. 3B). Nach der Fusion muss das unterbrochene Centromer inaktiviert werden, um eine Weitergabe an Tochterzellen zu gewährleisten.

Die Telomer-Telomerfusion (End-to-End Fusion) kann zwischen den Enden unterschiedlicher Chromosomen erfolgen (Abb. 3C). Auch hierbei sind Brüche, zum Beispiel in den Telomerregionen beider Chromosomen, erforderlich. Es entsteht in jedem Fall ein dicentrisches Chromosom, in dem ein Centromer inaktiviert werden muss. So ist zum Beispiel das humane Chromosom 2 das Ergebnis einer solchen Fusion, bei dem sich ein inaktiviertes Centromer und interstitielle Telomersequenzen am vermeintlichen Fusionsort nachweisen lassen (Yunis und Prakash, 1982; Azzalin et al., 2001).

Die Robertson'sche Fusion ist der häufigste Fusionstyp in der Evolution der Säugetiere, was zahlreiche Beispiele in verschiedenen Taxa belegen (Fredga, 1977). Das bekannteste Beispiel ist die Maus (*Mus musculus*), von der eine Vielzahl von

Subpopulationen mit verschiedenen Chromosomenzahlen bekannt sind, die alle das Ergebnis einer oder mehrerer Robertson'scher Fusionen sind (Capanna et al., 1976; Garagna et al., 2001). Dagegen ist die Tandemfusion ein seltener Fusionstyp und das am besten untersuchte Beispiel ist die Gattung *Muntiacus*.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung verschiedener evolutionärer Fusionstypen von Chromosomen. **(A)** Bei der Robertson'schen oder zentrischen Fusion führen Brüche (Pfeile) in den Centromerbereichen zur Fusion von zwei akrocentrischen Chromosomen. Das daraus resultierende Chromosom ist zweiarmlig, d. h. metacentrisch oder submetacentrisch. **(B)** Bei der Tandemfusion sind ebenfalls Brüche (Pfeile) erforderlich und die Fusion ereignet sich zwischen dem Centromerbereich eines akrocentrischen Chromosoms und dem distalen Ende eines anderen Chromosoms. Daraus ergibt sich für das fusionierte Chromosom eine „Head-to-Tail“- oder Tandem-Anordnung. **(C)** Bei der Telomer-Telomerfusion bzw. „End-to-End“-Fusion verschmelzen die distalen Enden von zwei Chromosomen. Auch hier gehen der Fusion Brüche in beiden Chromosomen, z. B. in den Telomerregionen, voraus und in jedem Fall muss hierbei eines der Centromere inaktiviert werden (nach Scherthan, 2003).

Schon früh wurde die Theorie aufgestellt, dass die extreme Reduktion der Chromosomenzahl beim indischen Muntjak das Ergebnis von zahlreichen

Tandemfusionen und einigen Robertson'schen Fusionen ist (Hsu et al., 1975; Shi et al., 1980). Seitdem wurde diese Theorie durch zahlreiche Untersuchungen mit Hilfe der sogenannten Zoo-FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) -Technik, mit der homologe Chromosomenabschnitte bei verschiedenen Säugetieren miteinander verglichen werden können (Scherthan et al., 1994), untermauert. So führte die Hybridisierung von einzelnen markierten Chromosomen des Menschen, des indischen Muntjaks, des chinesischen Muntjaks und des braunen Spießhirsches (*Mazama gouazoubira*) auf Chromosomenpräparate von verschiedenen Muntjakarten zu einer detaillierten Vorstellung, wie der heutige Karyotyp des indischen Muntjaks im Verlauf der Evolution entstanden ist (Yang et al., 1995; Fronicke und Scherthan, 1997; Yang et al., 1997a). Neben zahlreichen Tandem- und wenigen Robertson'schen Fusionen müssen demnach auch noch zusätzliche intrachromosomale Veränderungen aufgetreten sein.

Weitere Hinweise für die Fusionstheorie resultieren aus der Hybridisierung von repetitiven DNA-Sequenzen auf Metaphasechromosomen des indischen Muntjaks. So kolokalisiert die C5 Satellitensonde (Lin et al., 1991), die aus repetitiver centromerischer DNA (siehe auch 1.4) des chinesischen Muntjaks besteht, mit den Grenzen der konservierten Chromosomensegmente (Fronicke und Scherthan, 1997; Yang et al., 1997b). Außerdem wurden repetitive Telomer-DNA-Sequenzen (siehe 1.5) innerhalb der indischen Muntjakchromosomen entdeckt (Lee et al., 1993; Scherthan, 1995; Zou et al., 2002). Solche interstitiellen Telomersequenzen wurden schon in Chromosomen von vielen verschiedenen Wirbeltieren gefunden und gelten oftmals als Relikte ehemaliger Fusionspunkte, bei denen die Chromosomenenden involviert waren (Meyne et al., 1990; Vermeesch et al., 1996; Metcalfe et al., 2002; Nanda et al., 2002; Santani et al., 2002).

Ausgehend von diesen Beobachtungen wird vermutet, dass an den Tandemfusionen, die zum heutigen indischen Muntjak Karyotyp geführt haben, sowohl Satelliten- als auch Telomer-DNA beteiligt war (Brinkley et al., 1984; Elder und Hsu, 1988). Die Fusionen könnten durch illegitime Rekombination zwischen Satelliten- und Telomer-DNA ausgelöst worden sein, wenn sich diese in räumlicher Nähe befanden, wie zum Beispiel während der Prophase der Meiose I (Scherthan, 1990).

## **1.4 Centromer- und Satelliten-DNA**

Das Centromer stellt einen bestimmten Chromosomenabschnitt dar, dessen Hauptaufgabe in der Segregation der Chromosomen während der Zellteilung besteht. Hierbei bildet das Centromer die Basis für das Kinetochor, das die Kontaktstelle für die Mikrotubuli ist (Alberts et al., 2002). Des Weiteren ist das Centromer an der Regulation des Beginns der Anaphase und an der Erkennung von homologen Chromosomen während der Prophase der Meiose I beteiligt (zur Übersicht siehe Pluta et al., 1995; McKee, 2004). Ein Charakteristikum der Centromere sind besondere repetitive DNA-Sequenzen, die sogenannte Satelliten-DNA. Die klassische Satelliten-DNA besteht aus verschiedenen tandemartig-angeordneten Sequenzblöcken von meist mehreren hundert Wiederholungseinheiten, die wiederum aus mehreren hundert Basenpaaren bestehen, die hauptsächlich in den heterochromatischen Centromerbereichen vorkommen (Alberts et al., 2002). Außerhalb des Heterochromatins kennt man auch repetitive DNA, wie die Mikro- und Minisatelliten sowie repetitive Elemente wie SINE- und LINE-DNA, die verstreut im Genom vorliegen (zur Übersicht siehe Jurka et al., 2003). Außerdem

bestehen die Chromosomenenden aus repetitiven DNA-Sequenzen; doch während die Telomer-DNA (siehe 1.5) relativ konserviert ist, unterscheidet sich die Satelliten-DNA der Centromere zwischen verschiedenen Taxa und teilweise sogar zwischen den einzelnen Chromosomen innerhalb einer Spezies (Willard, 1990).

Die am besten untersuchte humane Satelliten-Sequenz ist die  $\alpha$ -Satelliten-DNA, die ursprünglich in der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) entdeckt wurde (Maio, 1971) und die in den Centromerbereichen von allen humanen Chromosomen nachgewiesen wurde. Die  $\alpha$ -Satelliten-DNA besteht aus ähnlichen, hintereinander geschalteten Monomeren, die eine ungefähre Länge von 171 Basenpaaren haben (zur Übersicht siehe Lee et al., 1997). Die Reihenfolge von mehreren verschiedenen Monomeren wiederholt sich ebenfalls und wird als Wiederholung höherer Ordnung (Higher-Order Repeat) bezeichnet (Wevrick und Willard, 1989). Zusätzlich unterscheidet sich die Reihenfolge in verschiedenen humanen Chromosomen (Choo et al., 1991).

Bei der Maus unterscheidet man Major und Minor Satelliten-DNA (Pardue und Gall, 1970; Wong und Rattner, 1988). Die Major Satelliten-DNA besteht aus tandemartigen Wiederholungen von etwa 234 Basenpaaren, liegt aber außerhalb des zentralen Heterochromatins, das die Basis für das Kinetochor bildet. Dagegen besteht die Minor Satelliten-DNA aus Wiederholungen von etwa 120 Basenpaaren und wurde in dem zentralen Heterochromatin lokalisiert (Wong et al., 1990; Choo, 1997; Garagna et al., 2002).

Bei den Cerviden kennt man vier verschiedene Familien von Satelliten-DNA. Die Satelliten-DNA I wurde erstmalig aus dem indischen Muntjak isoliert und besteht hier aus Wiederholungen von 31 Basenpaaren, die zu Higher-Order Repeats von etwa 800

Basenpaaren zusammengefasst sind (Bogenberger et al., 1982). Diese Satelliten-DNA des indischen Muntjaks zeigte eine große Ähnlichkeit zu der Satelliten-DNA 1715 des Rindes (*Bos taurus*) (Bogenberger et al., 1985) und konnte bei allen untersuchten Hirscharten nachgewiesen werden (Bogenberger et al., 1987; Lin et al., 1991; Scherthan, 1991). Die Familie der Satelliten-DNA II wurde erstmalig aus dem Weisswedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) isoliert und besteht aus Wiederholungen von 700 Basenpaaren (Qureshi und Blake, 1995). Inzwischen wurde sie auch im indischen Muntjak und in anderen Hirscharten nachgewiesen (Vafa et al., 1999; Li et al., 2000b). Die Satelliten-DNA III besteht aus Wiederholungseinheiten von 2200 Basenpaaren und wurde bis jetzt nur im europäischen Reh (*Capreolus capreolus*) gefunden (Buntjer et al., 1998). Die letzte bis jetzt in einigen Hirscharten nachgewiesene Satelliten-Familie ist die Satelliten-DNA IV, die aus Wiederholungen von etwa 1000 Basenpaaren besteht (Li et al., 2002).

## 1.5 Telomere

Die Telomere sind die natürlichen Enden der Chromosomen und spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung und für den Schutz der Chromosomenstruktur (zur Übersicht siehe Blackburn, 2001). Die späteren Nobelpreisträger Muller und McClintock beschrieben schon 1938 und 1941 die schützende Funktion der Telomere in der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) und in der Maispflanze (*Zea mays*). Anhand von induzierten Chromosomenbrüchen konnten sie zeigen, dass diese im Gegensatz zu den natürlichen Chromosomenenden dazu neigen, miteinander zu verschmelzen (Muller, 1938; McClintock, 1941). Neben dieser Schutzfunktion vor interchromosomalen Fusionen,

verhindern die Telomere die Erkennung der Chromosomenenden als Doppelstrangbrüche, den Abbau der DNA-Enden durch Nukleasen und unterdrücken illegitime Rekombination zwischen den Enden (zur Übersicht siehe de Lange, 2002; d'Adda di Fagagna et al., 2004). Eine weitere wichtige Funktion der Telomere besteht in der Replikation der äußersten Chromosomenenden und in der Aufrechterhaltung der Telomerlänge. Außerdem sind die Telomere am Aufbau der dreidimensionalen Kerntopologie beteiligt, die zur Paarung der homologen Chromosomen während der Meiose führt (Scherthan, 2001).

Die Telomere bestehen aus einer speziellen repetitiven DNA-Sequenz und einer Vielzahl von assoziierten Proteinen. Die DNA-Sequenz der meisten eukaryotischen Telomere bildet eine lange Anordnung von sich wiederholenden kurzen Sequenzen (Tandem Repeats), wobei ein DNA-Strang aus TG-reichen Wiederholungen besteht, während der komplementäre Strang CA-reich ist. Blackburn und Gall (1978) gelang es erstmalig eine solche telomerische DNA-Sequenz, nämlich  $(TTGGGG)_n$ , aus dem Ciliaten *Tetrahymena* zu isolieren (Blackburn und Gall, 1978). Es zeigte sich, dass die Telomersequenz verschiedener Eukaryoten relativ konserviert ist. So besitzt die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* die Telomersequenz  $(T(G)_{2-3}(TG)_{1-6})_n$  (Shampay et al., 1984), der Nematode *Caenorhabditis elegans* besitzt die Sequenzfolge  $(TTAGGC)_n$  (Wicky et al., 1996) und die Blütenpflanze *Arabidopsis thaliana* die Sequenz  $(TTTAGGG)_n$  (Richards und Ausubel, 1988). Moyzis et al. (1988) konnten erstmalig aus humanen Telomeren die Sequenz  $(TTAGGG)_n$  identifizieren und es zeigte sich, dass diese Sequenz bei allen bisher untersuchten Wirbeltieren konserviert ist (Moyzis et al., 1988; Meyne et al., 1989). Allerdings gibt es auch Abweichungen von diesem DNA-

Motiv. So bestehen z. B. die Telomere von *Drosophila* aus aneinander gereihten Wiederholungen der beiden Retrotransposons *HeT-A* und *TART*, die sich mittels reverser Transkriptase replizieren können (zur Übersicht siehe Pardue und DeBaryshe, 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass einige monokotyle Pflanzenarten aus der Gruppe *Asparagales* verschiedene telomerische Sequenzmotive in ihre Chromosomen einbauen (Weiss und Scherthan, 2002; Weiss-Schneeweiss et al., 2004).

Beim Menschen hat die Telomer-DNA eine ungefähre Länge von 3-20 kb und endet in einem 50-200 Nukleotid (nt) langen einzelsträngigen 3'-Überhang, der ebenfalls aus  $(T_2AG_3)_n$ -Wiederholungen besteht (zur Übersicht siehe Ouellette, 2003). Anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieser Überhang eine Schleife (T-Loop) bildet, indem er sich in die doppelsträngige Telomer-DNA einfügt (Griffith et al., 1999). Der Einzelstrang fädelt sich dabei in den Doppelstrang ein, verdrängt den G-reichen Strang und bildet mit dem komplementären C-reichen Strang Wasserstoffbrückenbindungen aus (siehe Abb. 4). Diese Lassostruktur trägt ganz wesentlich zur Stabilität und zum Schutz der Telomere bei (de Lange, 2004).

Eine weitere wichtige Funktion der Telomere besteht in der Replikation der äußersten DNA-Enden und somit in der Erhaltung der Telomerlänge. Die äußersten Enden eines linearen DNA-Moleküls können nicht vollständig mit Hilfe von DNA-Polymerasen repliziert werden, da diese nur in 5'-3'-Richtung synthetisieren können und



Mechanismus bei jeder Replikationsrunde kürzer werden und es nach einer gewissen Anzahl von Zellteilungen zum Verlust von genetischer Information kommen würde. Man bezeichnet dieses Problem daher auch als „Endreplikationsproblem“ (Watson, 1972; Olovnikov, 1973; Lingner et al., 1995).

In humanen Zellen und in Zellen der Maus konnte gezeigt werden, dass sich die Telomer-DNA bei jeder Zellteilung um etwa 50-150 bp verkürzt (Harley et al., 1990; Blasco et al., 1997). Daraus entstand die Vorstellung, dass Zellen beim Erreichen einer kritischen Telomerlänge das Wachstum einstellen und ein Stadium der zellulären Seneszenz erreichen (Bodnar et al., 1998). Primäre Fibroblasten erreichen dieses Stadium, das sogenannte Hayflick Limit, nach etwa 50-80 Teilungen (zur Übersicht siehe Wright und Shay, 2002). Dabei stellt sich die Frage, wie dieser Verlust der Telomer-DNA ausgeglichen werden kann. In den meisten Eukaryoten ist dieses Problem durch ein spezielles Ribonukleoprotein gelöst, das den einzelsträngigen 3'-Überhang der Telomere verlängert (Abb. 4C). Dieses Enzym wurde erstmals in *Tetrahymena* nachgewiesen und wird als Telomerase bezeichnet (Greider und Blackburn, 1985). Es besteht aus einer RNA-Untereinheit (TR, TER oder TERC) und einer katalytischen Untereinheit (TERT) (Greider und Blackburn, 1989). Während letztere die Funktion einer reversen Transkriptase erfüllt, enthält die RNA-Untereinheit bei *Tetrahymena* die komplementäre Sequenz 5'-CAACCCCAA-3' und dient damit als Matrize bei der Verlängerung des G-reichen 3'-Überhangs (Abb. 4C). Blackburn und Kollegen konnten dies durch eine Mutation in der RNA-Untereinheit zeigen, indem die Überexpression dieser mutierten RNA zu einer veränderten Telomersequenz führte (Yu et al., 1990). Später wurde die Telomerase auch im Menschen und in der Maus nachgewiesen, die hier

die Sequenz 5'-CUAACCCUAAC-3' enthält, entsprechend der komplementären Telomerasequenz  $(T_2AG_3)_n$  (Blasco et al., 1995; Feng et al., 1995; Nakamura et al., 1997). Während die humane RNA-Untereinheit hTERC konstitutiv in allen Geweben exprimiert wird, ist die Expression der katalytischen Untereinheit TERT streng reguliert und korreliert mit der Telomeraseaktivität (Nakamura und Cech, 1998). Daher wird die Expression von TERT als der limitierende Faktor für die Telomeraseaktivität in somatischen Zellen angesehen. In den meisten somatischen Zellen ist die TERT Expression sehr niedrig oder fehlt (Masutomi et al., 2003), wohingegen sie in stark proliferierenden Zellen wie z. B. in Keimzellen oder in etwa 85% aller untersuchten Krebszellen erhöht ist (zur Übersicht siehe Cech, 2004). Überexpression von TERT in primären Fibroblasten führt zu einer Erhöhung der Telomeraseaktivität und somit zu einer Verlängerung der Telomere und Lebensdauer der Zellen (Bodnar et al., 1998).

Neben der Telomerase gibt es noch zahlreiche weitere Telomer-assoziierte Proteine, die eine Rolle bei der Erhaltung der Telomere spielen (Abb. 5). Hierzu zählen bei Säugetieren die beiden Telomerproteine TRF1 und TRF2 (Telomeric Repeat Binding Factors), die als Homodimere an doppelsträngige Telomer-DNA binden (Chong et al., 1995; Billaud et al., 1997; Broccoli et al., 1997b). Beide Proteine werden ubiquitär exprimiert und sind während des gesamten Zellzyklus an die Telomere gebunden (Bianchi et al., 1997). So besitzen sie an ihrem Carboxyl-Terminus eine Myb-ähnliche Proteindomäne, die aus einem Helix-Turn-Helix-Motiv besteht und für die DNA-Bindung verantwortlich ist (Broccoli et al., 1997a). Trotz einer weiteren Gemeinsamkeit von TRF1 und -2, nämlich einer zentralen Dimerisierungsdomäne, findet man keine Heterodimere, d. h. keine Dimerisierung zwischen TRF1 und -2. Die beiden Proteine

unterscheiden sich jedoch in ihrem Amino-Terminus; TRF1 besitzt ein saures Aminoende, während das Aminoende von TRF2 basisch ist (zur Übersicht siehe de Lange, 2002; Smogorzewska und de Lange, 2004).

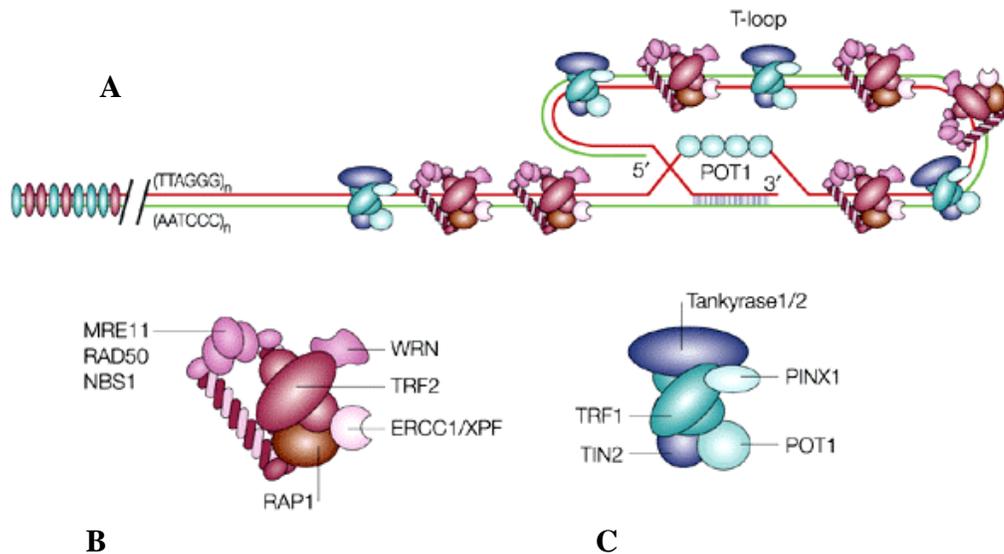
TRF1 spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Telomerlänge. So konnte in verschiedenen immortalisierten humanen Zelllinien gezeigt werden, dass die Überexpression von TRF1 zu einer Reduzierung der Telomerlänge führt (van Steensel und de Lange, 1997). Außerdem konnten de Lange und Mitarbeiter die Funktion von TRF1 in Zellen ausschalten, indem sie TRF1 mit fehlender Myb-Domäne (TRF1<sup>ΔM</sup>) überexprimierten. Diese dominant-negative Variante von TRF1 dimerisierte mit Wildtyp-TRF1, so dass dieses Heterodimer nicht mehr an Telomer-DNA binden konnte. Als Ergebnis der Überexpression von TRF1<sup>ΔM</sup> kam es zu einer Zunahme der Telomerlänge (van Steensel und de Lange, 1997; Smogorzewska et al., 2000). TRF1 gilt daher als negativer Regulator der Telomerlänge. Daneben lassen Untersuchungen an Knockout-Mäusen (*Terf1*<sup>-/-</sup>) weitere essentielle Funktionen von TRF1 vermuten, da die Mäuse unabhängig von ihrer Telomerlänge schon früh in der Embryonalentwicklung starben (Karlseder et al., 2003).

TRF2 spielt ebenfalls eine Rolle für die Telomerlänge, da die Überexpression von Wildtyp-TRF2 zu einer Verringerung der Telomerlänge führte (Smogorzewska et al., 2000). Auf der anderen Seite verursachte das Ausschalten von funktionellem TRF2 mit Hilfe der oben beschriebenen Methode eine Vielzahl von Phenotypen (zur Übersicht siehe Karlseder, 2003). In vielen humanen Zellen, wie in primären Lymphozyten, löst das Fehlen von funktionellem TRF2 sofortige ATM/p53-abhängige Apoptose aus (Karlseder et al., 1999), während das Fehlen von TRF2 in anderen Zellen, wie z. B. in primären

Fibroblasten, zu p53/p21- und/oder p16/Rb-vermittelter Seneszenz führt (Karlseder et al., 2002; Smogorzewska und de Lange, 2002). Andere Konsequenzen von fehlendem TRF2 sind der Verlust des 3'-Überhangs am äußersten Chromosomenende, die Auflösung der T-Schleife und Telomer-Telomerfusionen (van Steensel et al., 1998). Mit anderen Worten, das Fehlen von TRF2 führt zu ungeschützten Chromosomenenden, die als Doppelstrangbrüche erkannt werden und somit verschiedene Reaktionen auf DNA-Schädigungen, wie DNA-Reparatur, Seneszenz oder Apoptose, auslösen (zur Übersicht siehe de Lange, 2002).

Neben TRF1, TRF2 und der Telomerase wurden in den letzten Jahren im Menschen und in der Maus eine ganze Reihe weiterer Telomer-assoziiierter Proteine identifiziert, die fast immer über eine Interaktion mit TRF1 oder TRF2 mit den Telomeren verbunden sind (zur Übersicht siehe Smogorzewska und de Lange, 2004; Wright und Shay, 2005). TRF1 interagiert mit der Tankyrase 1 und 2, TIN2, PINX1, POT1 und PTOP/PIP1 (siehe Abb. 5B). Die Tankyrase (TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase) besitzt eine Ankyrin-ähnliche Domäne und eine homologe Domäne zur Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP), die die Synthese von ADP-Ribosegruppen an Proteinen katalysiert (Smith et al., 1998). Die ADP-Ribosylierung von TRF1 durch die Tankyrase verhindert *in vitro* die Bindung von TRF1 an die Telomer-DNA, wodurch die Tankyrase eine potentielle, über TRF1-vermittelte Rolle bei der Regulation der Telomerlänge besitzt (Cook et al., 2002). Ein weiterer Interaktionspartner von TRF1 ist TIN2, das ebenfalls die Telomerlänge beeinflussen kann (Kim et al., 1999). Es ist ein kleines Protein mit nur einer bekannten Domäne, nämlich der TRF1-Bindedomäne. *In vitro* wird TRF1 durch TIN2 vor Modifizierungen durch die Tankyrase

geschützt, wodurch TIN2 indirekt an der Regulation der Telomerlänge beteiligt ist (Ye und de Lange, 2004). Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass TIN2 sowohl TRF1 als auch TRF2 binden kann, wodurch beide Telomerproteine miteinander verbunden wären (Ye et al., 2004a). Auch für das TRF1-assoziierte Protein PINX1 wird eine Rolle bei der Regulation der Telomerlänge vermutet, allerdings kann PINX1 *in vitro* direkt die Telomeraseaktivität unterdrücken und unterscheidet sich somit von der indirekten Wirkungsweise der anderen TRF1-assoziierten Proteine (Zhou und Lu, 2001). Das Protein POT1 wiederum reguliert die Telomerlänge, in dem es an den 3'-Überhang der Telomere bindet. Das humane POT1 (protection of telomeres) wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Proteinen aus Ciliaten identifiziert, die am Aminoende eine DNA-Bindedomäne besitzen, mit der sie spezifisch an einzelsträngige Telomer-DNA binden können (Baumann und Cech, 2001). Untersuchungen mit einer mutierten Form von POT1, bei der die DNA-Bindedomäne fehlte, führten zu einer Verlängerung der Telomere (Loayza und De Lange, 2003). Durch das Fehlen von POT1 am einzelsträngigen 3'-Überhang kann vermutlich die Telomerase den telomerischen 3'-Überhang ungehindert verlängern (Colgin et al., 2003). Allerdings war eine solche mutierte POT1-Variante immer noch mit den Telomeren assoziiert. Inzwischen weiß man, dass das erst kürzlich von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander isolierte Protein PTOP/PIP den TRF1-Komplex mit POT1 verbindet (Liu et al., 2004; Ye et al., 2004b).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der meisten zur Zeit bekannten Telomer-assoziierten Proteine. (A) Direkt an die Telomer-DNA binden nur die Proteine TRF1, TRF2 und POT1. Alle anderen Faktoren sind durch Interaktion mit entweder TRF1 oder TRF2 mit den Telomeren verbunden. (B) TRF2 interagiert mit RAP1, WRN, ERCC1/XPF und dem MRE11/RAD50/NBS1-Komplex. (C) Dagegen interagiert TRF1 mit der Tankyrase 1 und 2, TIN2, PINX1, POT1 und PTOP/PIP1. Der KU70/80/DNA-PKcs-Komplex interagiert sowohl mit TRF1 als auch mit TRF2 (nicht gezeigt) (aus de Lange, 2004).

TRF2 besitzt ebenfalls Interaktionspartner wie RAP1 und einige Proteine, die bei der DNA-Reparatur und Rekombination eine Rolle spielen (Abb. 5B). Das humane RAP1 wurde mit Hilfe einer Two-Hybrid-Suche als Interaktionspartner von TRF2 identifiziert und beeinflusst die Telomerlänge (Li et al., 2000a). Es ist ortholog zum Rap1 der Bäckerhefe, das dort direkt an die Telomer-DNA bindet. Im Unterschied dazu bindet das RAP1 beim Menschen nicht direkt an die Telomer-DNA, sondern ist durch die

Interaktion mit TRF2 mit den Chromosomenenden assoziiert. Dies deutet auf eine Veränderung der Funktion der einzelnen Telomerproteine im Lauf der Evolution hin (Li et al., 2000a). Ein weiterer Interaktionspartner von TRF2 ist der MRE11/RAD50/NBS1-Komplex, der eine Rolle bei der homologen Rekombination, bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen und bei der Erhaltung der Telomerlänge spielt. Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation haben gezeigt, dass ein kleiner Teil des zellulären MRE11/RAD50/NBS1-Komplexes an den TRF2/RAP1-Komplex bindet (Zhu et al., 2000).

Des Weiteren konnte für die Endonuklease ERCC1/XPF und die beiden RecQ-Helikasen BLM und WRN eine Assoziation mit dem TRF2-Komplex nachgewiesen werden (Opresko et al., 2002; Zhu et al., 2003). Während ERCC1/XPF den ungeschützten 3'-Überhang entfernen kann, haben letztere die Fähigkeit, die G-G Basenpaarungen der Quadruplex-Strukturen aufzulösen, die durch die T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>-Wiederholungen entstehen können (zur Übersicht siehe Simonsson, 2001). Des Weiteren wurde vor kurzem gezeigt, dass PARP2 (Poly ADP-Ribose Polymerase 2), eine Komponente der DNA-Reparatur, mit TRF2 interagiert und auf diese Weise die Bindung von TRF2 zu telomerischer DNA beeinflusst (Dantzer et al., 2004). Darüber hinaus ist noch der heterotrimerische Komplex, bestehend aus KU70, KU80 und aus der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) mit TRF2 assoziiert (Song et al., 2000). Dieses DNA-PK Holoenzym spielt eine zentrale Rolle bei der DNA-Reparatur, vor allem bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch Non-Homologous End-Joining, in dem es unabhängig von der Sequenz an DNA-Enden bindet (zur Übersicht siehe Downs und Jackson, 2004). Zusätzlich ist es noch an einer Reihe

weiterer grundlegender zellulärer Mechanismen beteiligt, wie bei der V(D)J-Rekombination von Immungenen, der Verlagerung von mobilen genetischen Elementen, der Transkription, der Apoptose und dem Schutz der Telomere. Letztere Funktion zeigte sich durch eine drastische Zunahme von Telomer-Telomerfusionen, nach dem Fehlen von DNA-PK (Bailey et al., 1999). Neueste Untersuchungen lassen vermuten, dass nicht nur viele Komponenten der DNA-Reparatur an der Stabilität der Telomere beteiligt sind, sondern dass umgekehrt TRF2 auch eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Doppelstrangbrüchen spielt (Bradshaw et al., 2005).

## **1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Der rezente Karyotyp des indischen Muntjaks ist durch zahlreiche Chromosomenfusionen gekennzeichnet und stellt daher schon seit längerem einen Modellorganismus für Fragestellungen zur Chromosomenstabilität und Chromosomen-evolution dar. Um die Mechanismen solcher Chromosomenfusionen besser zu verstehen, sollten in dieser Arbeit die konservierten Bruch- und Fusionspunkte des indischen Muntjaks isoliert und charakterisiert werden.

Des Weiteren sollten mögliche Faktoren untersucht werden, die eine Rolle bei den Chromosomenfusionen gespielt haben könnten. Hierzu sollten die Telomere und Telomer-assoziierte Proteine, die Schutz vor Chromosomenfusionen vermitteln, in indischen und chinesischen Muntjakzellen untersucht werden. Insbesondere die Proteine TRF1 und -2, die an telomerische  $(T_2AG_3)_n$ -DNA binden, sollten charakterisiert werden.

Etwaige Funktionsänderungen der TRF-Proteine in Muntjaks sollten durch Vergleiche der Aminosäuresequenzen mit anderen Säugern und mit Hilfe von *in vivo* Studien in Muntjakzellen analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamid/bis-Acrylamid (29:1)	Roth, Karlsruhe
Actinomycin D	Sigma, München
Agar	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	AppliChem, Roth
APS (Ammoniumperoxydisulfat)	Sigma, München
Aqua ad iniectabilia (H <sub>2</sub> O reinst)	Baxter, Unterschleißheim
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat)	Sigma, München
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bradford-Reagenz	Sigma, München
BrdU (5-Brom-2'-Desoxyuridin)	Sigma, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, München
Calciumchlorid	AppliChem, Darmstadt
CHAPS (3-3-Cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propansulfonat)	Sigma, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Colcemid	Invitrogen, Karlsruhe
Coomassie Blau	Roth, Karlsruhe
DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma, München
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, München
Dextransulfat	Merck, Darmstadt
DMEM (Dulbecco's Minimum Eagle Medium)	BioWhittaker, Verviers (Belgien)
DMF (Dimethylformamid)	Roth, Karlsruhe

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Qiagen, Hilden / Bioline, Luckenwalde
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, München
EDTA (Ethylendinitrotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
EGTA (Titrplex VI)	Merck, Darmstadt
EMEM (Essential Minimum Eagle Medium)	BioWhittaker, Verviers (Belgien)
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FCS (Fötales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Gelatine	Sigma, München
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
HEPES	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	AppliChem, Roth
L-Glutamin	Sigma, München
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma, München
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma, München
N-Lauroylsarcosin	Sigma, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiocyanat	Sigma, München
NBT (Nitroblau-tetrazoliumchlorid)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40	Sigma, München
PEG 6000 (Polyethylen Glykol)	Merck, Darmstadt
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluorid)	Sigma, München
PIPES	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecalsulfat)	Serva, Heidelberg
TEMED	Roth, Karlsruhe
Thymidin	Sigma, München
TRIS	Merck, Darmstadt
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, München
Trypton	Roth, Karlsruhe
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid)	Sigma, München
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

## 2.1.2 Puffer und Lösungen

### 2.1.2.1 Isolation und Analyse von Nukleinsäuren

SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA (pH 8,0)
TE-Puffer (pH 7,5)	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA
RNA-Lysepuffer (RLN-Puffer)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 140 mM NaCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,5% (v/v) Nonidet P-40
50x TAE-Puffer	2 M Tris 50 mM EDTA (pH 8,0) 5,71% Eisessig
6x Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot (Deutschland)
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% (v/v) DEPC in H <sub>2</sub> O
10x MOPS-Puffer (pH 7,0)	200 mM 3-(N-Morpholin-)Propansulfonsäure 50 mM Natriumacetat (pH 7,0) 10 mM EDTA (pH 8,0) mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
RNA-Ladepuffer	1x MOPS-Puffer 2,2 M Formaldehyd 50% Formamid 0,1% Bromphenolblau

### 2.1.2.2 Northern Blot (NB) / Southern Blot (SB)

5x OLB-Puffer	0,1 mM dATP, dGTP, dTTP 1 M HEPES 0,425 mM 5'-pd(N) <sub>6</sub> 25 mM MgCl <sub>2</sub> 250 mM Tris 0,36% (v/v) β-Mercaptoethanol
---------------	---

20x SSC (pH 7,0)	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat mit HCl auf pH 7,0 einstellen
NB-Waschlösung 1	2x SSC 0,1% SDS in DEPC-H <sub>2</sub> O
NB-Waschlösung 2	0,1x SSC 0,1% SDS in DEPC-H <sub>2</sub> O
SB-Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
SB-Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) 1,5 M NaCl
PEG-Hybridisierungslösung (SB)	250 mM NaCl 125 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 mM EDTA 7% (w/v) SDS 10% (w/v) PEG 6000
SB-Hybridisierungspuffer	5x SSC 2% Blockierungsreagenz (Roche) 0,1% N-Lauroylsarcosin 0,02% SDS
SB-Waschpuffer	40 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5% SDS

### 2.1.2.3 Arbeiten mit *E. coli*

LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l H <sub>2</sub> O
LB-Platten	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium 50 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin
X-Gal	20 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid in Dimethylformamid
IPTG	100 mM (n H <sub>2</sub> O)

**2.1.2.4 Arbeiten mit Zellen**

Standard-Zellmedium	EMEM (BioWhittaker) 10% FCS (Biochrom) 2 mM L-Glutamin (Sigma) 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)
Einfriermedium	DMEM (BioWhittaker) 20% FCS (Biochrom) 10% DMSO
Best-Medium	DMEM (BioWhittaker) 20% Leibovitz's L15-Medium (Invitrogen) 15% FCS (Biochrom) 2 mM L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin 5 mM HEPES 50 mM Mercaptoethanol 2,5 µg/ml Insulin vom Rind 0,25 µg/ml Human Epidermal Growth Factor 0,01 µg/ml Human Fibroblast Growth Factor 0,25 nmol/100ml Natriumselenit 2,5 µg/ml Patrizin (Fungizid)
1x PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Pen/Strep-Stammlsg.	10 000 U/ml / 10 mg/ml (Invitrogen)
PBS/EDTA-Puffer	PBS 1% (w/v) EDTA
10x PEM (pH 7,0)	1 M PIPES 0,05 M EGTA 0,02 M MgCl <sub>2</sub>
PBTG-Puffer	1x PBS 0,1% BSA 0,05% Tween 20 0,5% Gelatine

**2.1.2.5 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung**

Denaturierungslösung (pH 7,0)	70% Formamid 2x SSC
Hybmix	50% deionisiertes Formamid 2x SSC 10% Dextransulfat
AP1-Puffer (pH 7,5)	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl
AP2-Puffer (pH 9,5)	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
NBT/BCIP-Färbelösung	1 Tablette Nitroblau Tetrazolium / 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (Roche) in 10 ml H <sub>2</sub> O auflösen
BT-Puffer	150 mM NaHCO <sub>3</sub> 0,1% Tween 20
BT-Block	BT-Puffer 1% BSA (Rinderserumalbumin)

**2.1.2.6 TRAP-Assay**

TRAP-Waschpuffer	10 mM HEPES-KOH (pH 7,5) 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 1 mM DTT
TRAP-Lysepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 0,1 mM PMSF 100-200 U/ml RNase OUT 5 mM β-Mercaptoethanol 0,5% (w/v) CHAPS 10% (v/v) Glycerin
10x TBE (pH 8,3)	0,9 M Tris 0,9 M Borsäure 0,2 M EDTA

10x TRAP-Puffer	200 mM Tris-HCl (pH 8,3) 630 mM KCl 15 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM EGTA 0,5% Tween 20
11x Ladepuffer	50% Glycerin 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) 25 mM EDTA 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
Polyacrylamidgel (13%)	40% Acrylamid/bis-Acrylamid (29:1; Roth) 1x TBE 0,15% APS 2 µl/ml TEMED

### 2.1.3 Oligonukleotide (Primer)

Alle Primer stammten von der Firma Invitrogen (Karlsruhe).

<b>Primernamen</b>	<b>Primersequenz (5`-3`)</b>
<b>Telomer-/Satellitenprimer</b>	
Telo-G	GGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
Telo-C	CCTAACCCCTAACCCCTAACCC
MMV SatIA	CCCCGCCGTAACCTCG
Munt-2	TCGAGAGGAATCCTGAG
Sat II fw	GAGCTGCCTGACAGACTCG
Sat II rv	CAGAGCCGACCTAGGATCAC
Sat II modified fw	GACTGATTTTCTGGGTTAAGAG
Sat II modified rv	CACACAGAATGCTAGGAAATCC
TGM225 fw	GTTAGGGCATCTCGGGGTC
TGMundS rv	CCTGGCTTCAAATCAAGAGG
TGS400 fw	GTTAGGGTGGAGGCCGCAA
TCS165 fw	CTAACCCCTTTGACTGTGTGG
TCS165 rv	CAGGTCTCGCCGCAACTAG
<b>TERF-Primer</b>	
TRF1.1 fw	GAGGCTATTATTCATGGAC
TRF1.2 rv	CTTCTTCCCAAAGCCATG

TRF2.2 fw	GCTGGGTGCTCAAGTTC
TRF2.2 rv	ATCATCACAGCTGTTTCGG
TRF1.3 fw	CAACACTTCAGCTACAACC
TRF1.3 rv	TACTTTTGCTGCTGCCTTC
TRF2.3 fw	AAACACATGTCCAAGGACC
TRF2.3 rv	CTTCTGCTGGAAGGTCTC
TRF2.4 fw	ATCACCAGCCCTCAAAAAC
TRF2.4 rv	CTCAGTACTCTGGCTGTC
Race3Terf1	GGAGAACAGTAGGCGAGCCACTGAAAG
Race3Terf2	AGCGAGTGGGTCAAGGCTGGAGTGC
Race5 Terf1	GCCATTTTCCATGCAAACGGCTATAGCC
Race5Terf2	GACAAGCAAAGCCTGCATGATGTCCCG
Race3Terf2Extension fw	CCCTTCTTTAGTGGTTTGC
Race3Terf2Extension 1 rv	ACCAGAACCAAAGTCAAATG
Race3Terf2Extension 3 rv	ATGGCAGGTTACAAAG
Race3Terf1Extension rv	CAGGATCTTGCTTATTTACTA
Race3Terf1Extension fw	GTTAGGAGCATTACCATCAT
Terf2 Inverse fw 1	ATCCGGGACATCATGCAG
Terf2 Inverse fw 2	TATGCAGTGTCTGTTCGG
Terf2 Inverse fw 3	CTGTTCTTTTGATATGGAAG
Mrev TRF2 TOPO GFP-N3 fw	CACCATGGCGGGAGGAGGCGGGA
Mrev TRF2 TOPO GFP-N3 rv	GTTTCATGCCAAGTCTTTTCATG
Mrev Terf2 cDNA rv	GGAACATATGCTCCTGTGAAC
TRF2-Kpn1 fw	GCGGGTACCATGAAAAGACTTGGCATGAACTGA
TRF2-Kpn1 rv	CGCGGTACCGGTTGCACTGTCTTCATCTGG
TERF1 Intron 1 fw	TCCGACGACTTCCACCG
TERF1 Intron 2 fw	TGACAAGAATTGCAGCTGG
TERF1 Intron 3 fw	GAACATGACAAGCTTCATG
TERF1 Intron 4 fw	TGGTGACCCAAATTCTTAC
TERF1 Intron 5 fw	GTGAGTTGTGTGCTAAATG
TERF1 Intron 6 fw	GAAGCTAATTTGGATACAGG
TERF1 Intron 7 fw	GAGGAAAGAGTGGAAACTC
TERF1 Intron 8 fw	AAAGTCAGCCTGTAACTCC
TERF2 Intron 1 fw	ACGGGGACTTCAGGCAG
TERF2 Intron 2 fw	ATCCAGTAGAAAACCTGGTC
TERF2 Intron 3 fw	CATGTCCAAGGACCCTAC
TERF2 Intron 4 fw	TGGAGAGTCACCTGGATG
TERF2 Intron 5 fw	TCCCTGGGGAGAAGAATC
TERF2 Intron 6 fw	GAAGAGGACGAACTGTTTC
TERF1 Intron 1 rv	TAGACTGGACAGTCCATG
TERF1 Intron 2 rv	GGTGTAAATTCGTTTCATCAC
TERF1 Intron 3 rv	CATTTTCCATGCAAACGGC
TERF1 Intron 4 rv	GGTTGTAGCTGAAGTGTG
TERF1 Intron 5 rv	CCTGTATCCAAATTAGCTTC
TERF1 Intron 6 rv	CACGTTTCAACTTAGATAAG
TERF1 Intron 7 rv	TTTCAGTGGCTCGCCTAC

TERF1 Intron 8 rv	GACCAATTTCCCTCTCCG
TERF2 Intron 1 rv	CTCAGCTTCCATATCAAAG
TERF2 Intron 2 rv	GAAGCCTTTTCAAATTCCTTTG
TERF2 Intron 3 rv	TCACGGATAATGTTTAGGAG
TERF2 Intron 4 rv	GAAAGCTGCTTTCAGAGTC
TERF2 Intron 5 rv	ATTAGAGCTGTTCCACTTG
TERF2 Intron 6 rv	CTTGACCCACTCGCTTTC

### Primer von weiteren Telomer-assoziierten Genen

PRKDC fw neu	GCAATTCGTCCTCAGATTG
KU70 fw	ATGAGCATCCAGTGTATCC
ATM fw 3	CAGATACACAGTAAAGGTTTC
P53 fw	GCCATGGCCATCTACAAG
H2AX fw	AAGGCCAAGTCGCGCTC
MRE11 fw	CAGATGAAAGGCTCTATCG
RAD50 fw neu	ACCAGGGACAGACTTGCC
NBS1 fw	GTGCACTCATTGTGGACG
POT1 fw	AGGAACTGATTATTGCTCAG
RAP1 fw	AAGGACCGCTACCTCAAG
Terc fw	CGCTGTTTTTCTCGCTGAC
Tankyrase fw	TGGATANTCTTGGTCAGAC
TIN2 neu fw	TTGGTTNGCTACCGGCACC
LIG4 fw	GAGTTTTGTGTTATGAGTGG
PRKDC rv neu	CCACTGGTTTAGAACATATTC
KU70 rv	AAGAGGTTGGCACAGACC
ATM rv 3	CTGTTTCGATCCTCATCAAG
P53 rv	GTCAGTCTGAGTCAGGCC
H2AX rv	CTGGATGTTGGGCAGGACG
MRE11 rv	TTACACTCATGTTTCATGGCC
RAD50 rv neu	TTGAGTTTATCTGGAGCAAG
NBS1 rv	AAAGGCTTGGTCCTGGAG
POT1 rv	CCATCCCATAACCTTTAGAAG
RAP1 rv	GGGTGGATCATCATCACAC
Terc rv	CAGXTCCCACAGCTCAGG
Tankyrase rv	ACATCAGCTCCATGNTGTAG
TIN2 neu rv	CTTTCTCNAGCTGACACAAG
LIG4 rv	GTCGAAACATACTGAGAGG

### TRAP-Pimer

TS-21	GACAATCCGTCGAGCAGAGTT
reverse primer_hum	TAACCCTAACCCTAACCCTAA

### 2.1.4 DNA-Marker

HyperLadder I	Bioline, Luckenwalde
GeneRuler 50 bp	Fermentas, St. Leon-Rot
Längenstandard II (Dig-markiert)	Roche, Penzberg
Lambda DNA / HindIII	Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.5 Enzyme

Proteinase K (20 µg/µl)	Sigma, München
Restriktionsenzyme (in der Regel 10 U/µl) ApoI, ApaI, AvrII, BamHI, BssS1, DraI, Eco0109I, EcoRI, HindIII, HpaII, MboI, MspI, PstI, RsaI, SacI, SmaI, SphI, SspI, XbaI	New England Biolabs, Schwalbach
RNase A (10 µg/µl)	Qiagen, Hilden
RNase OUT Inhibitor (40 U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
S1 Nuklease (400 U/µl)	Roche, Penzberg
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	Qiagen, Hilden
Terminale Transferase (400 U/µl)	Roche, Penzberg
Terminale Transferase (20 U/µl)	New England Biolabs, Schwalbach
T4 DNA-Ligase (3 U/µl)	Promega, Heidelberg

### 2.1.6 Kommerzielle Kits

RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
SMART RACE cDNA Amplification Kit	BD Biosciences (Clontech), Heidelberg
Advantage 2 PCR Enzyme System	BD Biosciences, Heidelberg
Expand Long Template PCR System	Roche, Penzberg
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
pGEM-T Easy Vector System	Promega, Heidelberg
pENTR/D-TOPO Vector Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA-DEST47 Gateway Vector Kit	Invitrogen, Karlsruhe
ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
DIG Luminescent Detection Kit	Roche, Penzberg
Biotin – Nick Translation Mix	Roche, Penzberg
DIG – Nick Translation Mix	Roche, Penzberg
BioPrime DNA Labeling System	Invitrogen, Karlsruhe
Telomer PNA FISH Kit/FITC	Dako, Glostrup (Dänemark)

### 2.1.7 Antikörper und andere Detektionsreagenzien

Monoklonaler Antikörper gegen humanes TRF2 (Arbeitsverdünnung 1:500)	Imgenex, San Diego (USA)
Kaninchen-Antikörper gegen humanes TRF1 (#371, Verdünnung 1:1000)	van Steensel und de Lange, 1997
Cy5-konjugierter anti-Kaninchen Antikörper (infrarot, Verdünnung 1:500)	Dianova, Hamburg
Cy3-konjugierter anti-Maus Antikörper (rot, Verdünnung 1:1000)	Dianova, Hamburg
Rhodamin-konjugierte anti-Dig-Fab-Fragmente (rot, Verdünnung 1:500)	Roche, Penzberg
ExtrAvidin Fluoresceinisothiocyanat (FITC, grün, Verdünnung 1:250)	Sigma, München
Biotin-konjugierter anti-Avidin-Antikörper (Verdünnung 1:500)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP, Verdünnung 1:5000)	Roche, Penzberg
Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragmente (Verdünnung 1:1000)	Roche, Penzberg

### 2.1.8 Zellen und Gewebeproben

Fibroblasten vom indischen Muntjak ( <i>Muntiacus muntjak</i> <i>vag.</i> )	Universität Kaiserslautern (Harry Scherthan)
Primäre Fibroblasten vom indischen Muntjak ( <i>MMV</i> )	University of Texas Medical Center (USA) (Jerry Shay)
SV40-transformierte Fibroblasten vom indischen Muntjak ( <i>MMV</i> )	Charité Berlin (Karl Sperling)

Fibroblasten vom chineischen Muntjak ( <i>M. reevesi</i> )	Universität Kaiserslautern (Harry Scherthan)
Primäre Fibroblasten vom chinesischem Muntjak ( <i>MRE</i> )	Männlicher chinesischer Muntjak aus dem Berliner Zoo Alter: 2 Jahre (9. 5. 2000 – 24. 7. 2002)
HeLa Zellen (Humane Krebszellen mit verlängerten Telomeren)	Rockefeller University New York (USA) (Titia de Lange)
Gewebe (Hoden, Leber und Muskel) vom chinesischem Muntjak ( <i>MRE</i> )	Männlicher chinesischer Muntjak aus dem Berliner Zoo Alter: 2 Jahre (9. 5. 2000 – 24. 7. 2002)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Präparation von genomischer DNA

Die Präparation von genomischer DNA erfolgte entweder aus Fibroblasten oder aus Lebergewebe, wobei zunächst die Zellen bzw. das Gewebe lysiert wurden, danach Proteine und Lipide mittels Phenol und Chloroform extrahiert wurden und anschließend die DNA mit Hilfe von Isopropanol gefällt wurde (Sambrook et al., 1989).  $1-5 \times 10^7$  Zellen (entspricht etwa 4-8 konfluent gewachsenen großen ( $150 \text{ cm}^2$ ) Flaschen) oder etwa 0,25-1 g Lebergewebe, das mit Skalpellklingen in möglichst kleine Stücke geschnitten wurde, wurden in 9 ml eiskaltem SE-Puffer aufgenommen und mit 1 ml SDS (10%) und 100  $\mu\text{l}$  Proteinase K (20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) versetzt. Die Zellen bzw. Gewebestücke wurden für mindestens 4 Stunden oder über Nacht bei  $56^\circ\text{C}$  lysiert. Nach vollständiger Lyse wurden 100  $\mu\text{l}$  (1/10 Volumen) NaCl (5 M) und 10 ml Phenol (1 Volumen) dazugegeben und für mindestens 20 min unter leichtem Schütteln gemischt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 2000 Rpm und RT wurde die wässrige (obere) Phase mit einer weiten Pipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, und die Extraktion wurde mit gleichem Volumen Chloroform wiederholt. Anschließend wurde die DNA mit 10 ml Isopropanol gefällt und als Knäuel mit einer Öse oder Pipettenspitze in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde zweimal mit 70% Ethanol

gewaschen, bei 50°C getrocknet und je nach DNA-Menge in 100-1000 µl TE-Puffer resuspendiert. Noch vorhandene RNA wurde durch Zugabe von 1-10 µl (1/100 Volumen) RNase A (10 µg/µl) für mindestens 1 Stunde bei 37 °C verdaut. Falls für nachfolgende Reaktionen verkürzte DNA-Fragmente (200-800 bp) erforderlich waren, wurde die isolierte DNA bei 4 °C für einige Minuten mit einem Ultraschall Homogenisator (Bandelin) beschallt.

### **2.2.1.2 Präparation von RNA aus Zelllinien und Gewebe**

Für die Präparation von RNA wurde nach Anleitung des RNeasy Midi Kit (Qiagen) verfahren. Hierbei wird die RNA nach Aufschluss der Zellen bzw. des Gewebes selektiv an eine Silikamembran gebunden. Nach mehreren Waschschritten wird die RNA in destilliertem Wasser eluiert. Etwa  $5 \times 10^7$  Zellen wurden durch Inkubation für 5 min in 1 ml eiskaltem RNA-Lysepuffer aufgeschlossen, während Gewebeproben (ca. 250 mg) in 4 ml eiskaltem RLT-Puffer (Qiagen) mit Hilfe eines Homogenisators lysiert wurden. Die lysierte Zellsuspension wurde noch für 5 min bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert, wodurch die DNA-enthaltenden Zellkerne und Zelldebris ein Pellet bildeten, während sich die cytoplasmatische RNA im Überstand befand. Der Überstand wurde mit 4 ml RLT-Puffer vermischt und so wie das lysierte Gewebe auf jeweils ein Säulchen gegeben. Die folgenden Waschschrritte erfolgten nach Anleitung des Herstellers. Zum Schluss wurde die RNA in 150 µl destilliertem Wasser eluiert und mit 1 µl RNase OUT Inhibitor (40 U/µl) versetzt. Die RNA-Lösung wurde aliquotiert und sofort bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer negativen Ladung durch Anlegen einer elektrischen Spannung aufgetrennt werden. In Abhängigkeit ihrer Größe wandern sie unterschiedlich schnell Richtung Anode (Sambrook et al., 1989). Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden je nach der zu erwartenden Größe 0,8% - 2% Agarosegele (0,8-2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer und 5 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl)) hergestellt. Vor dem Auftragen wurde die DNA-Lösung mit dem Ladepuffer (Fermentas) vermischt. Als Standard diente meist der  $\lambda$ /HindIII Marker (Fermentas) oder der Hyperladder I Marker (Bioline). Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei 120 V für etwa 30 Minuten. Die Auswertung der Gele erfolgte mit einem UV-Transilluminator (302 nm) und einem Geldokumentationssystem (Herolab).

Zur Auftrennung von RNA wurde ein 1% denaturierendes Formaldehydgel hergestellt. Dazu wurde 1 g Agarose in 72 ml DEPC-H<sub>2</sub>O und 10 ml 10x MOPS-Puffer aufgeköcht. Nach Abkühlung auf etwa 60 °C wurden 18 ml 37% Formaldehyd dazugegeben und das Gel in eine Gelkammer gegossen. Die RNA-Proben wurden mit dem RNA-Ladepuffer vermischt und für 5 min auf 65 °C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte in 1x MOPS Puffer bei 60-90 V für mehrere Stunden.

### 2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration wurde zum einen nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Vergleich mit einem Marker (definierte

Menge) abgeschätzt und zum anderen wurde sie im Photometer bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) gemessen. Zusätzlich konnte die Reinheit der Proben anhand des Quotienten aus 260 nm zu 280 nm (letzteres entspricht dem Absorptionsmaximum von Proteinen) ermittelt werden. Der Quotient sollte möglichst zwischen 1,5 und 2 liegen. Die Messungen erfolgten bei einer Verdünnung von 1:100 in einem Volumen von 100 µl.

#### **2.2.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Bei dieser Methode werden spezifische DNA-Fragmente mit Hilfe kurzer Oligonukleotide (Primer) und einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) amplifiziert (Saiki et al., 1988). Als Matrize (Template) dient meist doppelsträngige DNA, die durch Erhitzen denaturiert wird. Im zweiten Schritt binden die Primer bei der sogenannten Annealing-Temperatur an die Matrize. Die Annealing-Temperatur liegt in der Regel zwischen 48 °C und 68 °C und kann für jeden Primer anhand der Formel  $T_m = 2^\circ\text{C} \times (n_A + n_T) + 4^\circ\text{C} \times (n_C + n_G)$ , wobei  $n_A$  die Anzahl an Adenin,  $n_T$  die Anzahl an Thymin,  $n_C$  die Anzahl an Cytosin und  $n_G$  die Anzahl an Guanin im Primer angibt, abgeschätzt werden (Nelson und Brutlag, 1979). Im dritten Schritt erfolgt die Amplifikation, d. h. die Synthese des komplementären Stranges, bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase. Diese Temperaturabfolge (Zyklus) wiederholt sich 25 bis 40 mal, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Fragmente kommt. Die Auswahl der Primersequenzen erfolgte nach folgenden Kriterien: Die Primer sollten eine Länge von 18-24 Basenpaaren haben, das Verhältnis der

Basenpaare Guanin/Cytosin zu Thymin/Adenin sollte möglichst ausgeglichen sein und das letzte Nukleotid am 3'-Ende sollte ein Guanin oder Cytosin sein, um eine stabile Basenpaarbindung (drei Wasserstoffbrücken) zu gewährleisten.

### 2.2.1.5.1 Standard-PCR

In der Regel wurde die PCR mit der Taq-Polymerase von Qiagen im mitgelieferten Puffer und mit folgenden Reagenzien angesetzt.

Reagenz	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
10x PCR-Puffer (inkl. MgCl <sub>2</sub> )	5 µl	1x
eventuell 5x Q-solution	10 µl	1x
dNTPs (10 mM je Nukleotid)	1 µl	200 µM je Nukleotid
Primer vorwärts (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Primer rückwärts (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Template-DNA	x µl	etwa 100 ng pro Reaktion
Taq-Polymerase (5 Units/µl)	0,2 µl	1 Einheit pro Reaktion
Aqua dest.	x µl	-
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>	

Das folgende Schema zeigt die Temperaturabfolge einer typischen PCR:

	Zeit	Temperatur
1. Denaturierung	3 min	94 °C
25 – 40 Zyklen: Denaturierung	30 sec	94 °C
Annealing	30 sec	48 °C – 68 °C
Elongation	1 – 10 min	72 °C
Abschluss-Elongation	7 – 20 min	72 °C
Kühlen	∞	4 °C

#### **2.2.1.5.2 Nested PCR**

Mit Hilfe einer verschachtelten (Nested) PCR kann die Empfindlichkeit und Spezifität der DNA-Amplifikation erheblich gesteigert werden. Hierzu wird eine zweite PCR mit Primern, die innerhalb des ersten PCR-Produkts hybridisieren, durchgeführt (Newton und Graham, 1994). Daher wurde oftmals nach Durchführung einer Standard-PCR 1 µl des Ansatzes in einer zweiten, verschachtelten PCR eingesetzt, die mit internen Primern durchgeführt wurde.

#### **2.2.1.5.3 Long-Range PCR**

Zur Amplifikation langer DNA-Fragmente (5-10 kb) wurde das Expand Long Template PCR System (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das System basiert auf einer Mischung aus herkömmlicher und „Proof-Reading“ Taq-Polymerase, wobei die Elongation bei 68 °C stattfindet und sich die Elongationszeit bei jedem PCR-Zyklus um 20 sec verlängert.

#### **2.2.1.5.4 RT-PCR**

Das Umschreiben von RNA in cDNA (Reverse Transkription, RT) und die Amplifizierung spezifischer cDNA-Fragmente mittels PCR wurde in einem Reaktionsansatz mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) durchgeführt. Den PCR-Zyklen ging dabei eine 30-minütige Phase bei 50 °C für die reverse Transkription und eine 15-

minütige Phase bei 95 °C zur Aktivierung der HotStar Taq-Polymerase voraus. Als entscheidendes Kriterium stellte sich die RNA-Konzentration heraus, die möglichst zwischen 250 und 500 ng pro Reaktion liegen sollte.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Reaktion</b>	<b>Endkonzentration</b>
5x OneStep RT-PCR Puffer	10 µl	1x
dNTPs (10 mM je Nukleotid)	2 µl	400 µM je Nukleotid
Primer vorwärts (10 µM)	3 µl	0,6 µM
Primer rückwärts (10 µM)	3 µl	0,6 µM
Template RNA	x µl	250-500 ng pro Reaktion
Enzymmix	2 µl	-
RNase-freies Aqua dest.	x µl	-
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>	

#### **2.2.1.5.5 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)**

Die 3'- und 5'-RACE-Experimente wurden mit dem SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese sowie die Ansätze für die erste PCR und die nachfolgende Nested PCR erfolgten exakt nach den Angaben des Herstellers. Die Sequenzen der in den RACE-Experimenten eingesetzten Primer sind der Liste in 2.1.3 zu entnehmen.

### 2.2.1.5.6 Inverse PCR

Mit Hilfe der inversen PCR können unbekannte DNA-Bereiche, die eine bekannte Sequenz flankieren, amplifiziert werden (Ochman et al., 1988). Voraussetzung hierfür ist, dass innerhalb der unbekannt DNA-Bereiche ein Restriktionsenzym schneidet und dass die entstandenen Fragmente dann zu einem DNA-Ring geschlossen werden. Anschließend kann der DNA-Ring, der die unbekannt DNA-Bereiche enthält, mittels PCR amplifiziert werden. Um die Chance einer Restriktionsschnittstelle in der unbekannt DNA zu erhöhen, wurden 14 verschiedene Restriktionsenzyme (Apo I, Apa I, Avr II, BamH I, Dra I, Eco0109 I, EcoR I, Hind III, Pst I, Sac I, Sma I, Sph I, Ssp I, Xba I), die im Durchschnitt alle 1-4 kb im Genom von Mensch und Maus schneiden (New England Biolabs Katalog, 2003), getestet. Es wurden jeweils 1-5 µg genomische Muntjak-DNA mit einem Restriktionsenzym nach Angaben des Herstellers (NEB) über Nacht geschnitten. 500 ng der geschnittenen DNA wurde mit der T4 DNA-Ligase (Promega) in einem 100 µl Volumen bei 12 °C über Nacht ligiert. Nach Ethanol-fällung der DNA und Resuspension in H<sub>2</sub>O dienten 100 ng der ligierten DNA als Matrize für eine Long-Range PCR.

## 2.2.1.6 Klonierung von PCR-Produkten

### 2.2.1.6.1 Aufreinigung und Ligation von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden entweder aus Agarose-Gelen ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert oder direkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte in beiden Fällen nach Angaben des Herstellers. Alle PCR-Produkte wurden in 30 µl destilliertem Wasser eluiert und bei –20 °C aufbewahrt.

Die Ligation von einem PCR-Produkt (Insert) in den pGEM-T Easy Vektor (Promega) erfolgte mit der T4 DNA-Ligase (Promega) in einem Reaktionsvolumen von 10 µl. Das Mengenverhältnis von Vektor zu Insert sollte etwa 1:3 betragen, wobei die Insertmenge mit folgender Formel berechnet werden kann:

$$\text{Insertmenge [ng]} = 3 \times \text{Vektormenge [ng]} \times \text{Insertlänge [kb]} / \text{Vektorlänge [kb]}$$

Ein typischer Ligationsansatz enthielt 0,5 µl Vektor (50 ng/µl), 5 µl 2x Ligations-Puffer, 1 µl Ligase (3 U/µl), x µl Insert und x µl H<sub>2</sub>O. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C oder für mehrere Stunden bei RT.

### 2.2.1.6.2 Transformation

Für die Transformation wurden kompetente *E. coli*-Bakterien vom Stamm DH5α (Invitrogen) verwendet. 30 µl Bakteriensuspension wurden mit 5 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock von 45

Sekunden bei 42 °C. Nach kurzem Kühlen auf Eis wurde 600 µl LB-Medium dazugegeben und die Bakterien wurden unter Schütteln für eine Stunde bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden 50 µl und 500 µl eines Ansatzes auf jeweils einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Zur Herstellung der LB-Platten wurde LB-Medium mit 1,5 % Agar (w/v) versetzt und autoklaviert. Wenn sich der LB-Agar nach dem Autoklavieren auf ca. 60 °C abgekühlt hatte, wurde das entsprechende Antibiotikum (Endkonzentration 50 µg/ml) dazugegeben und der LB-Agar wurde unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Nach Aushärtung des Agars konnten die Platten für 2-3 Wochen bei 4 °C gelagert werden. Für die Blau-Weiß-Selektion wurden LB-Ampicillin-Platten verwendet, die etwa eine Stunde vor Ausstreichen der Bakterienkultur mit IPTG und X-Gal (100 µl LB-Medium, 10 µl IPTG (0,1M) und 40 µl X-Gal (4%) pro Platte) bestrichen wurden. Weiße Kolonien lassen daraufhin auf ein Plasmid mit Insert schließen, während blaue Kolonien ein Plasmid ohne Insert anzeigen.

#### **2.2.1.6.3 Präparation von Plasmid-DNA**

Die Plasmid-Präparation erfolgte mit dem Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen). Je eine *E. coli*-Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium plus entsprechendem Antibiotikum unter Schütteln bei 37 °C und über Nacht kultiviert. Die Bakterien wurden dann abzentrifugiert und mit Hilfe eines alkalischen SDS-Puffers (Qiagen) lysiert. Zellpartikel und genomische DNA wurden präzipitiert und abzentrifugiert, um anschließend den Überstand auf ein Säulchen mit einer Silikamatrix

(Qiagen) zu überführen, an der die Plasmid-DNA bindet. Nach einem Waschschrift zum Beseitigen von Proteinen und RNA, wurde die Plasmid-DNA in destilliertem Wasser eluiert. Um das Insert zu überprüfen, wurde nach der Plasmidpräparation ein Restriktionsverdau (im Fall des pGemT Easy Vektors mit EcoRI) durchgeführt.

#### **2.2.1.6.4 Klonierung des *TERF2*-Gens vom chinesischen Muntjak**

Die Klonierung des *TERF2*-Gens vom chinesischen Muntjak in den GFP-Expressionsvektor pcDNA-DEST47 erfolgte nach Angaben des Herstellers (Invitrogen). Dabei wurde die Gateway Technologie (Invitrogen) genutzt, die auf dem Rekombinationsmechanismus des  $\lambda$ -Phagen basiert (Hartley et al., 2000). Zunächst wurde das gewonnene PCR-Produkt in den pENTR-D-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert und mittels Sequenzierung überprüft (siehe Klonierung von PCR-Produkten, 2.2.1.6). Danach wurde das Insert des TOPO-Vektors genau nach Angaben des Herstellers in den GFP-Expressionsvektor umkloniert: 2  $\mu$ l pENTR-D-TOPO-Vektor (50 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l pcDNA-DEST47 Expressionsvektor (150 ng/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l LR Clonase II Enzymmix (Invitrogen) und 5  $\mu$ l TE-Puffer (pH 8,0) wurden für eine Stunde bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde 1  $\mu$ l Proteinase K (20  $\mu$ g/ $\mu$ l) dazugegeben und der Ansatz wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgte die Übertragung des Expressionsvektors mit dem neuen Insert in kompetente *E. coli*-Bakterien vom Stamm DH5 $\alpha$  (siehe Transformation und Präparation von Plasmid-DNA, 2.2.1.6.2 und 2.2.1.6.3).

### 2.2.1.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde mit dem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt und erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Dabei wird eine spezielle Mischung aus dNTPs und Didesoxynukleotiden (ddNTPs), wobei letztere jeweils mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, in einer Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Ohne die Hydroxylgruppe an den dNTPs ist eine DNA-Verlängerung durch eine DNA-Polymerase nicht möglich, und es kommt zum Kettenabbruch. Da die ddNTPs zufällig eingebaut werden, bricht die DNA-Synthese an verschiedenen Stellen ab. Die entstehenden Produkte werden in einem Kapillarsystem aufgetrennt und durch einen Laserstrahl angeregt, wodurch die Fluoreszenzfarbstoffe der eingebauten Didesoxynukleotide Licht verschiedener Wellenlängen entsenden.

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde 1-3 ng DNA pro 100 bp und für Plasmid-DNA 100 ng pro Reaktion eingesetzt. Dabei wurden 3 µl des BigDye Terminator Mixes (bestehend aus Polymerase und markierten dNTPs), 1 µl des jeweiligen Primers (10 µM) zusammen mit der DNA und H<sub>2</sub>O in einem 10 µl-Ansatz verwendet. Das PCR-Programm bestand aus einer Denaturierungsphase von 1 min bei 96°C, gefolgt von 25 Zyklen mit je 10 sec bei 96°C, 5 sec mit der für den jeweiligen Primer spezifischen Hybridisierungstemperatur und 4 min bei 60°C. Die Ansätze wurden mit Ethanol gefällt und getrocknet. Nach Resuspendierung in 30 µl H<sub>2</sub>O erfolgte die Auftrennung in einer Kapillare und die Detektion der Fluoreszenzsignale in einem hauseigenen 3130x/Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### **2.2.1.8 Sequenzanalyse**

Die Analyse und das Zusammensetzen der einzelnen Sequenzen erfolgte mit dem in den Programmpackungen GCG und STADEN (Accelrys) enthaltenen Programm Gap4. Ähnlichkeiten zu schon bekannten Sequenzen wurden mit dem Programm BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und mit dem Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) untersucht. Repetitive Sequenzen wurden mit dem RepeatMasker Programm (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>) identifiziert. Alle Vergleiche von Protein- und DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) durchgeführt und mit dem Programm Genedoc ([www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc)) graphisch dargestellt. Mit dem Programm 6-Frame Translation (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>) wurden cDNA-Sequenzen in alle möglichen Proteinsequenzen übersetzt. Vorhersagen über Proteindomänen wurden mit den Programmen Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>) und Prosite (<http://au.expasy.org/prosite>) erstellt. Vorhersagen über mögliche sekundäre RNA-Strukturen erfolgten mit dem Programm Genebee (<http://www.genebee.msu.su>).

### **2.2.1.9 Northern Blot**

Je etwa 10 µg RNA aus Muntjakzellen und -gewebe wurde mit Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 70 °C denaturiert. Die RNA wurde in einem denaturierenden 1% Agarosegel (siehe Agarose-Gelelektrophorese, 2.2.1.3) über Nacht bei 30-40 V aufgetrennt. Bevor die RNA auf eine Hybond N<sup>+</sup>-Nylonmembran (Amersham

Biosciences) übertragen wurde, wurde das Gel fotografiert und zweimal in DEPC-H<sub>2</sub>O für 10 min und zweimal in 10x SSC für 10 min gewaschen. Der Transfer der RNA erfolgte über Nacht, in dem das Gel auf eine Brücke aus Whatman-Filterpapier gelegt wurde, deren Enden in den Transferpuffer (10x SSC) hingen, und mit der Nylonmembran, drei Lagen Whatman-Papier, mehreren Lagen Zellstoff und einem Gewicht luftblasenfrei bedeckt wurde. Die RNA wurde mit dem UV-Stratalinker (Stratagene) auf der Nylonmembran fixiert.

Als Hybridisierungssonden wurden muntjakspezifische PCR-Produkte von *TERF1* (900 bp) und von *TERF2* (1200 bp) verwendet, die nach der Methode der degenerativen Hexanukleotidprimer (Feinberg und Vogelstein, 1983) radioaktiv markiert wurden. Dazu wurden in einem 20- $\mu$ l Volumen 4  $\mu$ l 5x OLB-Puffer, 20 ng PCR-Produkt und x  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gemischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden 1  $\mu$ l Klenow-Fragment und 2  $\mu$ l [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham Biosciences) zugegeben und für etwa 1 h bei 37°C inkubiert. Die markierte Sonde wurde aufgereinigt und kurz vor der Hybridisierung noch einmal denaturiert (5 min bei 95 °C).

Die Hybridisierung erfolgte in einer Glasröhre mit dem Hybridisierungspuffer ExpressHyb (Clontech) über Nacht bei 65 °C. Zuvor wurde die Membran in 15 ml ExpressHyb mit 150  $\mu$ l Heringsperma-DNA (10  $\mu$ g/ $\mu$ l) versetzt und ebenfalls bei 65 °C für 45-60 min vorbehandelt. Zum Waschen wurde die Membran zweimal 20 min in 2x SSC/0,1% SDS-Puffer und zweimal 20 min in 0,1x SSC/0,1% SDS-Puffer geschwenkt. Die Detektion erfolgte über Nacht in einer PhosphorImager-Kassette (Molecular Dynamics), die mit dem PhosphorImager Storm 820 (Molecular Dynamics) gescannt wurde und mit dem Programm ImageQuant ausgewertet wurde.

### 2.2.1.10 Telomerlängenbestimmung mittels Southern Blot

Jeweils 20 µg genomische DNA wurden in einem 200 µl Volumen mit den Restriktionsenzymen RsaI und HpaII bzw. mit MboI und MspI (je 50 U pro Reaktion) über Nacht bei 37 °C verdaut. Die geschnittene DNA wurde gefällt und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen. Etwa 5 µg geschnittene DNA wurden in einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt und fotografiert. Das Gel wurde zur Depurinierung der DNA für 5 min mit 250 mM HCl-Lösung behandelt, danach kurz in H<sub>2</sub>O gespült und anschließend 2x 15 min in Denaturierungslösung geschwenkt. Das Gel wurde dann noch für 2x 15 min mit der Neutralisierungslösung behandelt. Der Blotaufbau und die Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran erfolgte wie beim Northern Blot über Nacht mit 10x SSC. Als Sonde diente ein Telomeroligonukleotid (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>7</sub>, das mittels terminaler Transferase (New England Biolabs) entweder mit Digoxigenin (siehe Markierung von DNA-Sonden, 2.2.2.5.3) oder radioaktiv markiert wurde. Die radioaktive Tailing-Reaktion erfolgte bei 37 °C für 1 Stunde in einem 50 µl Ansatz: 5 µl 10x NEB-Puffer, 5 µl 2,5 mM CoCl<sub>2</sub>, 1 µl (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>7</sub> (15 ng/µl), 0,5 µl Terminale Transferase (20 U/µl), 36 µl H<sub>2</sub>O und 2,5 µl dNTP-Mix, wobei der dNTP-Mix aus 7,5 µl H<sub>2</sub>O, 0,5 µl dGTP (2 mM) und 2 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham Biosciences) bestand. Nach Aufreinigung der Sonde in einem Sephadex-Säulchen und Prähybridisierung der Nylonmembran in PEG-Hybridisierungslösung (inkl. 1 µg/ml tRNA von *E. coli*) bei 65 °C für eine Stunde erfolgte die Hybridisierung ebenfalls in PEG-Puffer (inkl. Telomersonde und tRNA) bei 65 °C über Nacht. Die Membran wurde in Phosphatpuffer für eine Stunde bei 60-65 °C gewaschen und in einer PhosphoImager-Kassette über Nacht detektiert (siehe Northern Blot, 2.2.1.10).

Zur Hybridisierung der Dig-markierten Telomersonde wurde die Nylonmembran in 5x SSC, 2% Blockierungsreagenz (Roche), 0,1% N-Lauroylsarcosin, 0,02% SDS, 1 µg/ml *E. coli*-tRNA für eine Stunde bei 55 °C prähybridisiert und anschließend im gleichen Puffer inklusive Telomersonde (15 ng/ml) über Nacht bei 55 °C inkubiert. Die Stringenzwaschung erfolgte in 2x SSC, 0,1% SDS für 2x 15 min bei Raumtemperatur und in 0,1x SSC, 0,1% SDS für 2x 15 min bei 42 °C. Die Detektion der hybridisierten Telomersonde wurde mit dem DIG Luminescent Detection Kit (Roche) genau nach Anleitung durchgeführt, wobei die hybridisierten Proben mit einem anti-DIG-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, immunologisch nachgewiesen wurden und mit der chemilumineszenten Substanz CSPD sichtbar gemacht wurden. Die enzymatische Dephosphorylierung von CSPD durch alkalische Phosphatase führte zu einer Lichtemission, die durch Auflegen eines Röntgenfilms für etwa 10 min detektiert wurde.

## **2.2.2 Cytologische und cytogenetische Methoden**

### **2.2.2.1 Zellkultur**

Alle Fibroblastenkulturen wurden in EMEM (BioWhittaker), das mit 10% FCS (Biochrom), 1% L-Glutamin (Sigma) und 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) angereichert war, bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zum Einfrieren wurden etwa 5-10 x 10<sup>6</sup> Zellen aus je einer subkonfluenten mittleren (75 cm<sup>2</sup>) Flasche trypsinisiert, in PBS gewaschen und bei 1000 Rpm, 5 min und RT abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,5

ml Einfriermedium (DMEM, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und unverzüglich in ein Kryotube überführt. Dieses wurde in eine gekühlte (4 °C) und von Isopropanol umgebende Einfrierbox gestellt und darin zum kontrollierten Einfrieren für mindestens 24 h bei -70 °C gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Kryotubes in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Da DMSO die Zellen schädigt, sollte das Auftauen so schnell wie möglich erfolgen. Dazu wurden die Zellen unverzüglich nach dem Auftauen in 10 ml und 37 °C warmen Medium verdünnt. Danach wurden sie zentrifugiert (1000 Rpm, 5 min und RT) und anschließend je nach Größe des Zellpellets in kleine (25 cm<sup>2</sup>) oder mittlere (75 cm<sup>2</sup>) Flaschen ausgesät.

### **2.2.2.2 Isolierung von Fibroblasten aus Muntjak-Bindegewebe**

Zur Etablierung einer primären Muntjakfibroblastenzelllinie wurde ein Stück Bindegewebe aus dem Bauchinnenraum eines frisch getöteten, männlichen Muntjaks (*Muntiacus reevesi*) entnommen. Das Gewebestück (ca. 1 cm<sup>3</sup>) wurde unter sterilen Bedingungen mit PBS gewaschen und mit zwei Skalpellklingen in kleine Stückchen geschnitten. Diese zerkleinerten Gewebestückchen wurden in Trypsin getränkt und anschließend in kleine (25 cm<sup>2</sup>) Zellkulturflaschen überführt. Nachdem die Gewebestückchen am Flaschenboden angeheftet waren, wurde vorsichtig 5 ml Best-Medium (siehe Arbeiten mit Zellen, 2.1.2.4) zugegeben. Nach 3 Tagen bei 37 °C zeigten sich die ersten Zellen am Rand der angehefteten Gewebestückchen, und das Best-Medium wurde gewechselt. Nach weiteren 7 Tagen und einem Mediumwechsel wurden

die Gewebestückchen entfernt, und die ausgewachsenen Fibroblasten wurden in mittlere (75 cm<sup>2</sup>) Flaschen umgesetzt. Nach weiteren 4 Tagen (14 Tage nach Entnahme der Gewebeprobe) wurden die primären Muntjakfibroblasten aus jeweils einer mittleren Flasche in einem Kryotube eingefroren oder in Standard-Medium weiter kultiviert (siehe Zellkultur, 2.2.2.1).

### **2.2.2.3 Transfektion von Muntjakfibroblasten**

Die Transfektion der Muntjakfibroblasten erfolgte in 6-Well Platten mittels Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Hierzu wurden am Tag vor der Transfektion unter sterilen Bedingungen die Platten mit Deckgläsern (18 x 18 mm) versehen und jeweils 1-4 x 10<sup>5</sup> Zellen ausgesät, so dass die Platte zum Zeitpunkt der Transfektion 90-95% konfluent war. Kurz vor der Transfektion wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und mit 1,5 ml frischem Medium (EMEM, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und ohne Antibiotika) versetzt. Pro Deckglas wurden 4 µg Plasmid-DNA in 250 µl OptiMEM (serumfreies Medium; Invitrogen) und 10 µl Lipofectamine in 250 µl OptiMEM verdünnt. Nach 5 min wurden beide Ansätze vereinigt und für 20 min inkubiert. Das Gemisch wurde zu den Zellen gegeben und diese für 36 h bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Danach wurden die Zellen fixiert, gegebenenfalls mit Antikörpern behandelt (siehe Immunfärbung, 2.2.2.4) und unter einem Fluoreszenzmikroskop auf die Expression der Plasmide untersucht (siehe Mikroskopische Auswertung und Bildverarbeitung, 2.2.2.7).

#### 2.2.2.4 Immunfärbung

Um die Lokalisation von TRF2 in Muntjakfibroblasten zu untersuchen, wurden diese auf Deckgläsern (18 x 18 mm) in 6-Well Platten ausgesät und gegebenenfalls mit einem Plasmid transfiziert (siehe Transfektion von Muntjakfibroblasten, 2.2.2.3). Einen Tag nach dem Aussäen bzw. 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1,2x PEM-Puffer gewaschen und für 10 min mit 3,7% Paraformaldehyd/1,2x PEM fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit PBS/0,5% Triton X für 10 min permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit PBTG-Puffer für mind. 10 min gesättigt (Scherthan et al., 2000). Als primärer Antikörper wurde in der Regel der monoklonale anti-TRF2 Antikörper (Imgenex) 1:500 in PBTG verdünnt. Jedes Deckglas wurde mit 20 µl Antikörperlösung überschichtet, mit einem Stück Parafilm bedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser 3 x 5 min mit PBTG gewaschen und mit dem sekundären Antikörper, in diesem Fall mit einem Cy3-konjugierten anti-Maus Antikörper (1:1000), für 30-45 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen für 3 x 5 min in PBTG wurden die Deckgläser mit DAPI-haltigem VectaShield Medium (1 µg/ml) versetzt und auf Objektträger überführt. Die Zellen wurden danach im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (siehe Mikroskopische Auswertung und Bildverarbeitung, 2.2.2.7).

### 2.2.2.5 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung dient der Lokalisation spezifischer Nukleinsäuresequenzen und wurde erstmalig 1969 von Gall und Pardue sowie von John et al. beschrieben. Die zunächst verwendeten radioaktiv-markierten Sonden wurden ab den 1980iger Jahren durch Biotin-markierte Sonden, die mit Hilfe von Avidin-konjugierten Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht werden, ersetzt (Manuelidis et al., 1982; Pinkel et al., 1986). Heutzutage werden oftmals Biotin- oder Digoxigenin-markierte Sonden oder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden verwendet. Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) soll auf der einen Seite die Struktur der Präparate, meist Metaphasechromosomen, möglichst gut erhalten bleiben und auf der anderen Seite eine möglichst effiziente Hybridisierung gewährleistet sein. In der Regel besteht ein FISH-Protokoll daher aus der Präparation und Fixierung der Chromosomen, der Herstellung und Markierung der Sonden, der Denaturierung von Chromosomen und Sonden, der eigentlichen Hybridisierung und dem Nachweis der hybridisierten Sondenmoleküle (Scherthan, 2002).

#### 2.2.2.5.1 Präparation von Metaphasechromosomen

Um die Ausbeute an Metaphasechromosomen zu erhöhen, wurde zunächst das Wachstum der Zellen synchronisiert. Zu einer proliferierenden, 50-70% konfluenten Zellkultur wurde Thymidin (Endkonz. 500 µg/ml) zugegeben, wodurch der Zellzyklus in der Mitte der S-Phase angehalten wird (Dutrillaux und Couturier, 1983). Nach 12-20 h

wurde das Thymidin durch mehrmaligen Mediumwechsel herausgewaschen. Anschließend wurde BrdU (Endkonz. 14 µg/ml) dazugegeben, um die spätere DAPI-Bänderung zu verstärken (Fronicke und Scherthan, 1997). Sobald die ersten mitotischen Zellen zu erkennen waren (nach etwa 4-6 h), wurde das Spindelgift Colcemid (Endkonz. 100 ng/ml) für 1-2 h zugegeben. Danach erfolgte das Abernten der mitotischen Zellen, indem das Medium abgenommen und der Zellrasen für wenige Minuten mit PBS/1% EDTA behandelt wurde. Mitotische Zellen wurden durch vorsichtiges Klopfen an der Kulturflasche vom Boden gelöst, während die restlichen Zellen noch adhärent blieben. Danach wurden die mitotischen Zellen mit dem PBS/EDTA-Puffer abpipettiert und mit Medium aus dem Überstand vereinigt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1000 Rpm, 5-10 min, RT), mit PBS gewaschen und in einem 15-ml Zentrifugenröhrchen zusammengefasst. Anschließend wurde das Zellpellet in 50 mM KCl-Lösung resuspendiert und für 15-20 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (1000 Rpm, 5 min, RT) wurde der Überstand bis auf einen kleinen Rest (50-200 µl) verworfen und das Zellpellet darin resuspendiert. Dann wurde frisches, eisgekühltes Fixativ (Methanol/Essigsäure 3:1) langsam dazugegeben und immer wieder gründlich durchmischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde die Zellsuspension mindestens fünfmal mit kaltem Fixativ gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet entweder in 5 ml Fixativ zur Lagerung bei -20 °C aufgenommen oder es wurde zum Auftropfen in 250-500 µl Fixativ suspendiert. Hierzu wurden einige Tropfen auf Ethanol-gereinigte, angehauchte OTs aufgetropft und sobald sich das Fixativ verflüchtigt hatte, wurden die OTs für etwa 1 min über heißem Wasserdampf getrocknet (Scherthan, 2002). Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgte bei -20 °C.

#### **2.2.2.5.2 Herstellung von C<sub>0</sub>t 1-DNA**

C<sub>0</sub>t 1-DNA besteht vor allem aus hoch- und mittelrepetitiven DNA-Sequenzen und wird bei Hybridisierungen zur Unterdrückung repetitiver Sequenzen eingesetzt. Die C<sub>0</sub>t 1-DNA wurde wie von Kappler et al. (1998) beschrieben hergestellt. Dazu wurde fragmentierte, genomische Muntjak-DNA auf eine Konzentration von 1 mg/ml in 0,3 M NaCl eingestellt. Die DNA wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert, dann genau für 330 sec bei 65 °C renaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Danach wurden die wenig repetitiven Einzelstränge mit der S1-Nuklease (Roche) für 30 min bei 37 °C verdaut. Die verbleibende doppelsträngige DNA wurde mit Isopropanol gefällt, in TE-Puffer aufgenommen und bei –20 °C aufbewahrt.

#### **2.2.2.5.3 Markierung von DNA-Sonden**

Zur Markierung der DNA-Sonden wurden drei verschiedene Verfahren, nämlich die Nick-Translation (Rigby et al., 1977), das Random-Priming (Feinberg und Vogelstein, 1983) und das End-Labeling (Roychoudhury et al., 1976) verwendet. Als Template dienten PCR-Produkte, Plasmide oder Oligonukleotide, die entweder mit Biotin oder Digoxigenin markiert wurden. Bei der Nick-Translation setzt die DNaseI Einzelstrangbrüche in die zu markierende DNA, die dann von der DNA-Polymerase I in 3'-5' Richtung abgebaut und mit markierten und nicht-markierten Nukleotiden wieder aufgefüllt wird. Die Reaktion wurde mittels Biotin bzw. Digoxigenin Nick Translation

Mix (Roche) durchgeführt. In der Regel wurden 1-2 µg Template-DNA in einem Reaktionsansatz (20 µl) bei 15 °C für 3 h markiert.

Beim Random-Priming binden kurze Primer (Oktamere im Fall des Kit der Firma Invitrogen) an denaturierte DNA, von wo aus das Klenow-Fragment beim Vorhandensein von markierten Nukleotiden einen neuen, markierten Strang synthetisiert. Die Random-Prime Reaktion wurde mit dem BioPrime DNA Labeling System (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zur Herstellung einer Dig-markierten Sonde wurde die dNTP-Mischung des Kits durch folgende 10x dNTP-Mischung ersetzt: 0,2 mM Digoxigenin-11-dUTP (Roche), 1 mM dTTP, 2 mM dATP, 2mM dCTP, 2 mM dTTP.

Für die Markierung von kurzen DNA-Fragmenten (Oligonukleotide) wird die End-Labeling Methode verwendet, bei der die Terminale Transferase eine Template unabhängige Reaktion, nämlich die Verknüpfung von dNTPs und dem 3'-Ende von einzel- oder doppelsträngiger DNA, katalysiert. In dieser Arbeit wurden die Telomer-Oligonukleotide  $(T_2AG_3)_7$  und  $(C_3TA_2)_7$  mit Biotin bzw. Digoxigenin markiert (Scherthan und Cremer, 1994). Die Reaktion wurde in einem 50 µl Volumen folgendermaßen angesetzt: 1 µl  $(T_2AG_3)_7$  oder  $(C_3TA_2)_7$  Oligo (160 ng/µl), 1,5 µl Biotin-14-dUTP (1 mM), 2,15 µl dATP (1 mM), 10 µl 5x Reaktionspuffer, 0,5 µl  $CoCl_2$ -Lösung (25 mM), 2,5 µl Terminale Transferase (25 U/µl; Roche) und 32,35 µl  $H_2O$ . Zur Herstellung einer Digoxigenin-markierten Telomersonde wurde der gleiche Ansatz, nur mit veränderten Nukleotiden (1 µl Dig-11-dUTP (1 mM) und 6 µl dATP (1 mM)), angesetzt. Nach drei Stunden bei 37 °C wurde jeder Ansatz mit 20 µg tRNA von *E. coli* versetzt und mit Ethanol gefällt. Abschließend wurde jeder Ansatz in 16 µl  $H_2O$  suspendiert, so dass die Sondenkonzentration ungefähr 10 ng/µl betrug. Die

Konzentration und Markierungseffizienz aller Sonden wurde zum einen im Agarosegel und zum anderen im sogenannten Dot-Blot Test überprüft.

#### **2.2.2.5.4 Dot-Blot**

Mit Hilfe des Dot-Blot-Tests, der auf einem antikörpergekoppelten Enzym- und Farbreaktionssystem beruht, wurde der Einbau der Biotin- bzw. Digoxigenin-markierten Nukleotide in die DNA-Sonden überprüft (Scherthan und Cremer, 1994). Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der markierten Sonde in 6x SSC auf eine Nylonmembran aufgetragen und mittels UV-Licht auf der Membran fixiert. Dann wurde die Membran mit AP1/1% BSA-Puffer gewaschen und mit Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Roche; Verdünnung 1:5000 in AP1-Puffer) bzw. Anti-DIG-Alkalische Phosphatase (Roche; 1:1000) für 10 min bei RT inkubiert. Nach Waschen mit AP2-Puffer wurde die Membran mit einer NBT/BCIP-Färbelösung (Roche) für 10-30 min im Dunkeln inkubiert. Bei einer guten Markierung sind die ersten zwei Punkte (Dots) der Verdünnungsreihe schon nach wenigen Minuten sichtbar und weitere Farbreaktionen der Verdünnungsreihe sollten am Ende der Inkubationszeit erkennbar sein. Wenn dies nicht der Fall war, wurde die Sonde verworfen.

#### **2.2.2.5.5 Vorbehandlung der Sonden-DNA für die *in situ* Hybridisierung**

Um die nicht eingebauten Nukleotide von der Sonde zu trennen und um eine definierte DNA-Menge bei der Hybridisierung einzusetzen, wurden die markierten

Sonden zusammen mit gescherter *E. coli*-DNA oder muntjakspezifischer C<sub>0</sub>t-DNA gefällt. Hierzu wurde der Ansatz (Sonde und Carrier- bzw. C<sub>0</sub>t-DNA) mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,5) und 2½-3 Volumen absolutem Ethanol versetzt, durchmischt und für 15 min bei -70 °C oder über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die gefällte DNA wurde zentrifugiert (14 000 Rpm, 30 min, 4 °C), mit 70% EtOH gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde dann direkt in der Hybridisierungslösung (Hybmix) aufgenommen und darin für 1-2 h bei 50 °C gelöst. Die Konzentration der Sonde im Hybmix betrug in der Regel 50 ng/µl und die Konzentration der Carrier- bzw. C<sub>0</sub>t-DNA 1µg/µl. Die DNA wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert und entweder direkt auf Eis gestellt oder zum Abblocken repetitiver Sequenzen für 1-2 h bei 37 °C vorhybridisiert. Die Sonden waren nun bereit für die *in situ* Hybridisierung.

#### **2.2.2.5.6 Vorbehandlung der Chromosomen und *in situ* Hybridisierung**

Die nächsten Schritte dienten der Vorbereitung der Objektträger für die FISH. Als erstes wurden die Metaphasechromosomen zur Erhaltung der Struktur für 1 h bei 90 °C gehärtet (Kappler et al., 1998). Anschließend wurde das Chromatin aufgelockert, um es für Sonden zugänglicher zu machen. Hierzu wurde jeweils ein OT mit 100 µl Natriumthiocyanat-Lösung (1 M NaSCN) versetzt, mit einem Deckglas (24 x 60 mm) bedeckt und für 15 min bei 90 °C inkubiert. Nach kurzem Waschen mit destilliertem Wasser erfolgte die Denaturierung des Chromatins in 100 µl 70% Formamid/ 2x SSC (pH 7,0) unter einem Deckglas (24 x 60 mm) für 2 min bei 68-72 °C. Die OTs wurden wieder kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurde

je 1,2 µl Hybmix (inkl. denaturierte Sonde und Carrier- bzw. C<sub>0</sub>t-DNA) auf zuvor markierte Bereiche des OTs gegeben, mit einem runden Deckglas (Ø 10 mm) bedeckt und mit Fixogum (Rubber Cement; Marabu) versiegelt. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte für 1-3 Tage in einer feuchten Kammer bei 37 °C.

#### **2.2.2.5.7 Detektion**

Bei der Detektion von Biotin-markierten DNA-Fragmenten wurde die hohe Affinität von Biotin zu Avidin, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC; grün) gekoppelt ist, ausgenutzt. Digoxigenin-markierte DNA-Fragmente wurden mit Rhodamin-konjugierten anti-Dig-Fab-Antikörperfragmenten (rot) nachgewiesen. Nach der Hybridisierung wurden die OTs zunächst 2 x 5 min in 0,05x SSC bei 42 °C gewaschen und dann zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen 3 x 5 min in BT/1% BSA bei 37 °C inkubiert. Je OT wurden 100 µl Avidin-FITC (Verdünnung 1:250 in BT-Puffer) und Rhodamin-anti-Dig Antikörperlösung (1:500 in BT) aufgetragen und mit einem Deckglas (24 x 60 mm) bedeckt. Die Inkubation erfolgte für 45 min bei 37 °C. Danach wurden die OTs 3 x 5 min in BT-Puffer bei 37 °C gewaschen. Um die Fluoreszenzsignale von Biotin-markierten Präparaten zu verstärken, wurden die OTs mit einem Biotin-konjugierten anti-Avidin-Antikörper (Verdünnung 1:500 in BT) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die OTs wieder mit Avidin-FITC (1:500) für 30 min bei 37 °C versetzt und danach gewaschen. Abschließend wurde jeder OT mit 18 µl DAPI-haltigem VectaShield Medium (1 µg/ml) versetzt und eingedeckt. Um die DAPI-Bänderung der

Chromosomen zu verstärken, wurde das VectaShield Medium mit Actinomycin D (Endkonz. 10 µg/ml) versetzt und die DAPI-Konzentration auf 0,5 µg/ml (Endkonz.) reduziert (Kappler et al., 1998). Die Präparate konnten nun im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden (siehe Mikroskopische Auswertung und Bildverarbeitung, 2.2.2.7).

### **2.2.2.6 Fiber-FISH**

Bei der Fiber-FISH werden Chromatinfasern auf einem Objektträger gestreckt und fixiert, um anschließend eine Hybridisierung mit in der Regel mindestens zwei verschiedenen Sonden durchzuführen. Muntjakfibroblasten aus jeweils einer großen (150 cm<sup>2</sup>) Zellkulturflasche wurden hierzu abgeerntet, mit PBS gewaschen und mit einer hypotonen KCl-Lösung (0,05 M KCl) für 20 min bei 37 °C behandelt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1000 Rpm, 10 min) und nach Größe des Pellets in etwa 1 ml 0,05 M KCl aufgenommen. 20 µl der Zellsuspension wurde auf Ethanolgereinigte Objektträger gegeben und mit entweder 20 µl Lipsol (5%) oder mit 20 µl NaOH (0,1 M) vermischt. Nach etwa einer Minute wurde ein Deckgläschen im schrägen Winkel langsam und ohne zu starken Druck über den Objektträger gezogen. Die so gestreckten Chromatinfasern wurden kurz luftgetrocknet und dann für 2 x 5 min in eiskaltem Fixativ (Methanol-Eisessig 3:1) fixiert. Des Weiteren wurden die OTs noch mit 1 M NaSCN für 15 min bei 90 °C behandelt. Die Denaturierung der Chromatinfasern erfolgte mit 70% Formamid/2x SSC für 4 min bei 72 °C, während die biotinylierte Telomersonde für 5 min bei 95 °C im Hybmix denaturiert wurde. Zur Hybridisierung wurde die Telomersonde auf den OT mit den denaturierten Chromatinfasern überführt

und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die denaturierte Digoxigenin-markierte TGS400-Sonde zur Hybridisierung mit den Chromatinfasern für 1-3 Tage in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte wie bei der herkömmlichen FISH (siehe Detektion, 2.2.2.5.7).

### **2.2.2.7 Mikroskopische Auswertung und Bildverarbeitung**

Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Axioskop I), das zur Darstellung blauer, grüner, roter und infraroter Fluoreszenzsignale mit Einzelbandpassfiltern ausgestattet war. Des weiteren war ein Doppelbandpassfilter installiert, der die simultane Aufnahme von roten und grünen Fluoreszenzen erlaubte. Die Signale der verschiedenen Fluoreszenzen wurden mit einer gekühlten CCD-Monochromkamera (Hamamatsu) aufgenommen, mit Hilfe des Programms ISIS (MetaSystems) verarbeitet und zu einem Bild zusammengesetzt. Außerdem konnten mit dem Programm DAPI-gefärbte Chromosomen als invertierte Schwarzweiß-Bilder dargestellt werden. Die nachträgliche Bildverarbeitung und das Erstellen der Abbildungen erfolgte mit den Programmen Adobe Photoshop und Paintshop Pro.

## **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.3.1 TRAP-Assay**

Die verwendete Methode zur Bestimmung der Telomeraseaktivität (Telomerase Repeat Amplification Protocol; TRAP) beruht auf dem Protokoll von Kim et al. (1994) und wurde von der Firma Chemicon optimiert. Die Isolation der Proteine und Bestimmung der Telomeraseaktivität wurde daher genau nach dem Protokoll des TRAPeze Telomerase Detection Kit (Chemicon) durchgeführt (<http://www.chemicon.com/webfiles/PDF/S7700.pdf>). Dabei verlängert die Telomerase ein Oligonukleotid (Substrat), das im zweiten Schritt mittels PCR amplifiziert und in einem Polyacrylamid-Gel sichtbar gemacht wird. Aufgrund der repetitiven Telomerasequenz entsteht ein Leitermuster. Die Methode ist relativ anfällig gegenüber Kontaminationen, weil zum einen die RNA- und Proteinkomponente der Telomerase isoliert werden muss und zum anderen der Nachweis mittels PCR erfolgt. Daher wurden nur RNase-freie Materialien verwendet und Lösungen zum Teil mit RNase OUT Inhibitor (Invitrogen) versetzt. Außerdem wurden bei jedem PCR-Ansatz verschiedene Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt.

#### **2.2.3.1.1 Isolation von Proteinen**

Proteinextrakte wurden aus Muntjakfibroblasten, HeLa-Zellen, Muntjak-Testisgewebe und humanem Testisgewebe gewonnen. Hierzu wurden  $1-2 \times 10^6$

Fibroblastenzellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und in eiskaltem Waschpuffer aufgenommen. Nach Überführung in Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden die Zellen bei 6000 Rpm, 6 min und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl eiskaltem Lysepuffer durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Extraktion aus Testisgewebe erfolgte mit einem Homogenisator. Hierzu wurde 1 g Gewebe in 1,5 ml eisgekühltem Lysepuffer homogenisiert und ebenfalls für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Zell- sowie der Gewebeextrakt zentrifugiert (14 000 Rpm, 4 °C, 20 min), um gröbere Zellpartikel zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und sofort auf Trockeneis eingefroren. Die Aufbewahrung fand bei –70 °C statt.

#### **2.2.3.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmung nach Bradford dient der Ermittlung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976). Bei dieser Methode bildet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G (Bradford-Reagenz) einen Komplex mit vorhandenen Proteinen und nimmt dabei eine blaue Farbe an. Die Intensität der blauen Farbe wird im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Durchführung der Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Sigma) des Bradford-Reagenz. Hierzu wurde zunächst eine Eichreihe pipettiert, wobei BSA in 1:1000 verdünntem Probenpuffer (hier Lysepuffer) auf Konzentrationen von 1; 2; 4; 5; 7,5 und 10 µg/ml eingestellt wurde. Die Proben wurden 1:1000 in H<sub>2</sub>O verdünnt. Jeweils 80 µl einer Probe bzw. einer BSA-Verdünnung wurden mit 20 µl Bradford-Reagenz vermischt, und nach einigen Minuten

wurde die Absorption in einem Mikroplatten-Photometer (Anthos Mikrosysteme) gemessen. Anhand der BSA-Verdünnungen konnte eine Eichgerade erstellt werden und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt werden.

### 2.2.3.1.3 Bestimmung der Telomeraseaktivität

Die Messung der Telomeraseaktivität erfolgte nach dem Protokoll des TRAPeze Telomerase Detection Kit (Chemicon). Hierzu wurden pro Reaktion Zell- oder Gewebeextrakte mit einer Proteinmenge von 1-2 µg eingesetzt (siehe Isolation von Proteinen, 2.2.3.1.1). Das Verlängern des Oligonukleotids beim Vorhandensein von Telomerase und die anschließende Amplifizierung mittels PCR fand in einem 50-µl Reaktionsansatz statt. Der Amplifizierung ging eine 45-minütige Phase bei 30 °C voraus, gefolgt von einer 3-minütigen Denaturierung und 30-35 PCR-Zyklen (30 sec bei 94 °C, 30 sec bei 55 °C und 1 min bei 72 °C).

Reagenz	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
10x TRAP-Puffer	5 µl	1x
dNTPs (10 mM je Nukleotid)	1 µl	200 µM je Nukleotid
TS-21 Primer (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Telo-Primer rv (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Proteinextrakt	x µl	1-2 µg Protein
Taq-Polymerase (Qiagen)	0,4 µl	2 Units pro Reaktion
RNase-freies Aqua dest.	x µl	-
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>	

Zur Visualisierung der Reaktionen wurden alle PCR-Produkte mit Ethanol gefällt und in 10 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Proben wurden mit 2 µl 11x Ladepuffer gemischt und auf ein 13% Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Standard dienten 10 µl eines 50-bp Markers (Fermentas). Die Herstellung eines Polyacrylamidgels (60 ml) erfolgte aus 20 ml 40% Acrylamid/bis-Acrylamid (29:1; Roth), 12 ml 5x TBE, 27,5 ml H<sub>2</sub>O, 420 µl 10% APS und 30 µl TEMED. Dieses wurde zwischen zwei Glasplatten, die in einem Gießgestell fixiert worden waren, gegossen und nach Aushärtung in die Laufapparatur eingespannt und mit TBE-Puffer überschichtet. Der Gellauf erfolgte bei 150 V für etwa 5-6 h. Anschließend wurde das Gel für 15-20 min in SybrGreen-Lösung (Sigma; Verdünnung 1:10 000 in TBE) bei 4 °C gefärbt. Abschließend wurde das Gel mit dem FluorImager 575 (Molecular Dynamics) eingescannt und mit dem Programm ImageQuant ausgewertet.

### 3 Ergebnisse

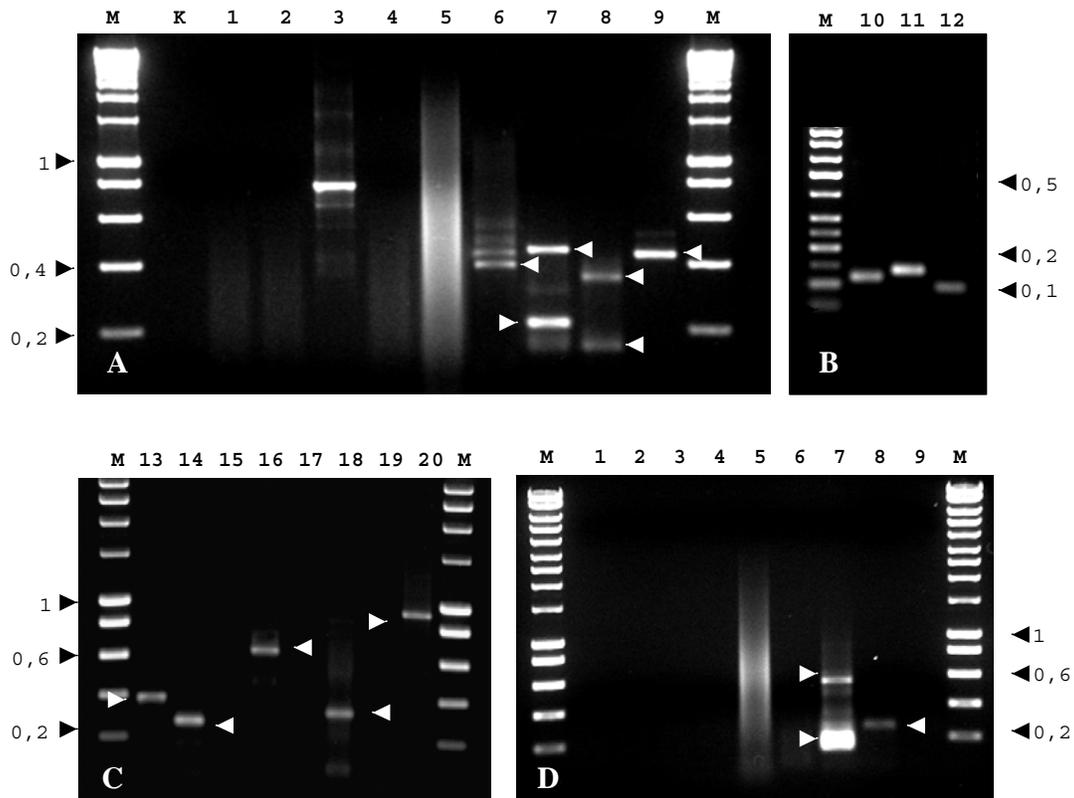
#### 3.1 Kombinierte Telomer-Satelliten PCR

Der indische Muntjak besitzt mit 6 (♀) bzw. 7 (♂) Chromosomen die niedrigste bekannte diploide Chromosomenzahl aller Säugetiere (Wurster und Benirschke, 1970). Es wird angenommen, dass die Reduktion der Chromosomenzahl durch zahlreiche Chromosomenfusionen vom Typ der Tandem- und Robertson'schen Fusion im Laufe der Evolution entstanden ist und dass bei den Tandemfusionen Brüche und anschließende Reparatur zwischen Satelliten-DNA und Telomersequenzen eine wichtige Rolle gespielt haben (zur Übersicht siehe Elder und Hsu, 1988; Scherthan, 1995). Diese Reparatur könnte durch illegitime Rekombination erfolgt sein und als Relikte müssten Satelliten- und Telomersequenzen direkt nebeneinander zu finden sein (zur Übersicht siehe Scherthan, 1995). Um solche mutmaßlichen Fusionspunkte im indischen Muntjakgenom aufzuspüren, wurde mit Hilfe einer PCR-Strategie benachbarte Telomer- und Satelliten-DNA isoliert und sequenziert. Des Weiteren wurde das Vorhandensein von solchen benachbarten Telomer- und Satellitensequenzen mit Hilfe von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen untersucht.

Die PCR-Strategie bestand aus unterschiedlichen Kombinationen von jeweils einem Telomer- und einem Satellitenprimer, die in verschiedenen PCR-Ansätzen mit genomischer *MMV*-DNA getestet wurden. Während die Telomerprimer aus der in allen Wirbeltieren vorkommenden Telomersequenz  $(T_2AG_3)_n$  (TeloG-Primer) und der komplementären Sequenz  $(C_3TA_2)_n$  (TeloC-Primer) bestanden, wurden die

Satellitenprimer für Muntjak-spezifische Satellitensequenzen ausgewählt. So besteht der SatIA-Primer aus Sequenzen der *MMV* Satelliten-DNA IA (Bogenberger et al., 1985) und der Munt2-Primer aus *MRE* Satelliten-DNA I (Lin et al., 1991; Bayerer, 2000). Um nur direkt benachbarte Sequenzen zu amplifizieren, wurde zuvor die genomische Muntjak-DNA mittels Ultraschall zu einer Größe von etwa 200 bis 1000 bp fragmentiert. Da es sich bei den Primersequenzen um repetitive Sequenzen handelte, wurde jeder der vier Primer (TeloG, TeloC, SatIA und Munt2) auch einzeln getestet. Bis auf ein mit dem SatIA-Primer amplifiziertes ca. 800-bp Produkt konnten keine Produkte amplifiziert werden (Abb. 6A). Dieses 800-bp-Produkt zeigt, dass im *MMV*-Genom Wiederholungen der SatIA-Sequenz mit entgegengesetzter Orientierung in naher Nachbarschaft vorkommen müssen. Die Abwesenheit jeglicher PCR-Produkte bei den PCR-Reaktionen mit einzelnen Telomerprimern deutet auf das Fehlen von Telomersequenzen in direkter Nachbarschaft mit entgegengesetzter Orientierung hin, wie sie bei Telomer-Telomerfusionen entstehen könnten (Ijdo et al., 1991). Dagegen führte die Kombination aus beiden Telomerprimern, wie aufgrund der repetitiven Struktur der Telomer-DNA zu erwarten ist, zu der Amplifikation von Telomersequenzen mit unterschiedlicher Länge (Abb. 6A). Die Kombinationen aus jeweils einem Telomer- und einem Satellitenprimer führte in allen Reaktionen zu spezifischen PCR-Produkten (Abb. 6A). So ergab die Kombination aus dem G-reichen Telomerprimer TeloG und dem Satellitenprimer SatIA ein 400-bp Produkt, im Folgenden als TGS400 bezeichnet, während die Kombination aus TeloG-Primer und der Satellitenprimer Munt2 zwei PCR-Produkte mit einer Größe von 225 bp (TGM225) und 451 bp (TGM451) ergaben. Der C-reiche Telomerprimer TeloC führte in Kombination mit dem SatIA-Primer zu einem 165-bp Produkt (TCS165) und

einem 349-bp Produkt (TCS349) sowie in Kombination mit Munt2 zu einem 431-bp Produkt (TCM431). Alle hier beschriebenen Produkte wurden in mehrfach wiederholten und mit DNA aus verschiedenen *MMV*-Zelllinien durchgeführten PCR-Reaktionen bestätigt.



**Abb. 6:** PCR-Experimente mit verschiedenen Primerkombinationen und genomischer Muntjak-DNA. **(A)** Reaktionen mit *MMV*-DNA und einzelnen Primern ergaben ein PCR-Produkt von ca. 800 bp mit dem Primer SatIA (Spur 3). Die Kombination aus beiden Telomerprimern führte zu einem erwarteten Schmier (Spur 5), während die Kombinationen aus einem Telomer- und einem Satellitenprimer zu einer Reihe von spezifischen Banden (Pfeile) führten: Ein 400-bp Produkt in Spur 6, ein 451-bp und ein 225-bp Produkt in Spur 7, ein 349-bp und ein 165-bp Produkt in Spur 8 und ein 421-bp Produkt in Spur 9. **(B)** Nested PCR mit *MMV*-DNA und Primern, die die Fusionsstelle überspannen, bestätigten die Spezifität der Produkte TGS400 (Spur 10), TGM225 (Spur 11) und TCS165 (Spur 12). **(C)** PCR mit *MMV*-DNA und verschiedenen Kombinationen

aus je einem Telomer- und einem Satelliten-II-Primer. Insgesamt fünf spezifische PCR-Produkte (Pfeile) wurden in acht getesteten Kombinationen detektiert. (D) PCR mit *MRE*-DNA und Primerkombinationen wie in A. Die Kombinationen aus beiden Telomerprimern resultierten ebenfalls in einem Schmier (Spur 5), während die Kombination aus einem Telomer- und einem Satellitenprimer zu insgesamt drei Produkten führte, nämlich zu zwei Produkten mit der Kombination TeloG und Munt2 (Spur 7) und zu einem Produkt mit der Kombination TeloC und SatIA (Spur 8). Primerkombinationen: 1: TeloG, 2: TeloC, 3: SatIA, 4: Munt2, 5: TeloG + TeloC, 6: TeloG + SatIA, 7: TeloG + Munt2, 8 : TeloC + SatIA, 9: TeloC + Munt2, 10: Nested TGS400 fw + Nested TGS400 rv, 11: Nested TGM225 fw + Nested TGM225 rv, 12: Nested TCS165 fw + Nested TCS165 rv, 13: TeloG + SatII fw, 14: TeloG + SatII rv, 15: TeloG + SatII modified fw, 16: TeloG + SatII modified rv, 17: TeloC + SatII fw, 18: TeloC + SatII rv, 19: TeloC + SatII modified fw, 20: TeloC + SatII modified rv, M: Verschiedene DNA-Marker, K: Kontrolle (negativ). Die Größen der Markerbanden sind jeweils in kb angegeben.

Zum Vergleich wurden PCR-Reaktionen mit fragmentierter *MRE*-DNA und mit den gleichen Primerkombinationen durchgeführt. Dabei entstanden bei den Reaktionen mit einzelnen Primern keine Produkte, während bei der Kombination beider Telomerprimer der erwartete Schmier von Fragmenten unterschiedlicher Länge entstand. Die Kombination aus einem Telomer- und einem Satellitenprimer führte mit *MRE*-DNA zu insgesamt drei PCR-Produkten. So konnte mit der Primerkombination TeloG und Munt2 zwei Produkte mit Größen von 223 bp und 448 bp und mit der Kombination aus TeloC und SatIA ein Produkt von 276 bp amplifiziert werden (Abb. 6D).

In jüngster Zeit haben Li et al., (2000b, 2000c) weitere Satelliten-DNAs im indischen Muntjak nachgewiesen und die Vermutung geäußert, dass die Satelliten-DNA II ebenfalls eine Rolle bei den Chromosomenfusionen gespielt hat. Um eine mögliche räumliche Nähe zwischen der Satelliten-DNA II und interstitiellen Telomersequenzen nachzuweisen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Kombinationen aus

einem Telomer- und einem Satelliten-II-Primer überprüft. Mehrere Wiederholungen der PCR-Reaktionen mit DNA aus verschiedenen *MMV*-Zelllinien bestätigten hier insgesamt fünf spezifische Produkte, die im Folgenden aufgelistet sind: Mit der Primerkombination TeloG/SatII fw wurde ein 380-bp Produkt amplifiziert, mit TeloG/SatII rv ein 281-bp Produkt, mit TeloG/SatII modified rv ein 696-bp Produkt, mit TeloC/SatIIrv 333-bp Produkt und mit TeloC/SatII modified rv wurde ein 923-Produkt amplifiziert (Abb. 6C). Alle hier beschriebenen PCR-Produkte wurden zur weiteren Untersuchung nach elektrophoretischer Auftrennung aufgereinigt, in den T/A-Überhangsvektor pGEM-T easy (Promega) kloniert und sequenziert.

### 3.2 Sequenzanalyse der isolierten PCR-Produkte

Die Sequenzen der amplifizierten und klonierten PCR-Produkte wurden mit dem Programm BLASTn und ClustalW analysiert. Während ClustalW die beste Übereinstimmung zwischen zwei vorgegebenen Sequenzen sucht, gleicht BLASTn die eingegebene Sequenz mit denen der Datenbanken GenBank/EMBL/DDBJ ab und bestimmt dabei den Grad an Übereinstimmung zwischen zwei Sequenzen in Prozent. Weiterhin gibt es die Länge in Basenpaaren an, auf die sich die Übereinstimmung bezieht. Zunächst wurden die mit je einem Telomer- und einem SatI-Primer aus dem *MMV*-Genom isolierten PCR-Produkte mit der BLASTn-Methode analysiert. Drei der sechs PCR-Produkte, nämlich TGS400, TGM225 und TCS165 wiesen ein hohes Maß an Übereinstimmung zu der Satelliten-DNA I von verschiedenen Hirscharten auf (Tab. 1). Hierbei wurden nur Sequenzübereinstimmungen von mehr als 50 bp berücksichtigt.

Übereinstimmungen zu den verwendeten Primersequenzen von ungefähr 20 Basenpaaren wurden zwar von dem Programm erkannt, dienten aber lediglich als Kontrolle.

**Tabelle 1:** BLASTn-Analyse der kombinierten Telomer-Satelliten PCR-Produkte

PCR-Produkt	Primerkombination	Länge des PCR-Produkts	Bekannte DNA-Sequenzen mit der höchsten Übereinstimmung zu den Sequenzen der isolierten PCR-Produkte
TGS400	TeloG + SatIA	400 bp	97% (211 bp) - Muntjak Satelliten-Sequenz IA (X02323.1) 94% (177 bp) - <i>M. reevesi</i> Repetitive DNA-Sequenz (X56823.1) 82% (343 bp) - <i>Cervus elaphus canadensis</i> Satelliten-DNA(U53516.1)
TGM451	TeloG + Munt2	451 bp	–
TGM225	TeloG + Munt2	225 bp	93% (132 bp) - <i>M. reevesi</i> Repetitive DNA-Sequenz (X56823.1) 90% (155 bp) - Muntjak Satelliten-Sequenz IA (X02323.1) 90% (63 bp) - <i>Alces alces</i> Satelliten-DNA (U53518.1)
TCS349	TeloC + SatIA	349 bp	93% (114 bp) - <i>Bos taurus</i> Klon RP42-354B6 (AC091660.2) 94% (110 bp) - <i>Bos taurus</i> Klon rp42-158g13 (AC105306.13) 94% (118 bp) - <i>Bos taurus</i> Butyrophilin Gen (AF005497.1)
TCS165	TeloC + SatIA	165 bp	92% (116 bp) – <i>Cervus elaphus canadensis</i> Satelliten-DNA(U53516.1) 90% (122 bp) - <i>Odocoileus hemionus</i> Satelliten-DNA (U55814.1) 89% (117 bp) - Muntjak Satelliten-Sequenz IA (X02323.1)
TCM431	TeloC + Munt2	431 bp	90% (149 bp) - <i>Bos taurus</i> Kappa Casein Gen, Intron 2 (AY185364.1) 91% (132 bp) - <i>Bos taurus</i> Klon rp42-513g13 (AC107065.4) 90% (133 bp) - <i>Bos taurus</i> Klon RP42-518P7 (AC129959.6)

Die zu jedem PCR-Produkt drei ähnlichsten DNA-Sequenzen aus der Datenbank (GenBank, Version vom Mai 2003) sind mit Namen und GenBank-Nummern aufgelistet. Der Grad der Übereinstimmung ist in Prozent angegeben und bezieht sich auf die Länge der untersuchten Sequenz der PCR-Produkte. Berücksichtigt wurden nur Sequenzen von mehr als 50 bp. Für das PCR-Produkt TGM451 wurden keine Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus der Datenbank gefunden.

So besitzt die Sequenz von TGS400 die größte Übereinstimmung mit der Satelliten-DNA IA des indischen Muntjaks, TGM225 die größte Übereinstimmung zu der Satelliten-DNA I vom chinesischen Muntjak und TCS165 mit der Satelliten-DNA des

nordamerikanischen Rothirsches (*Cervus elaphus canadensis*). Das PCR-Produkt TGM451 wies keine Ähnlichkeit zu bekannten DNA-Sequenzen aus der Datenbank auf, während die Produkte TCS349 und TCM431 einen hohen Grad an Übereinstimmung zu nicht-kodierenden Sequenzen verschiedener Rinder-DNA-Klone aufwiesen (Tabelle 1). Bei letzteren identifizierte das Programm RepeatMasker darüber hinaus verschiedene repetitive Sequenzen. So besitzt TCM431 eine Ähnlichkeit zu dem humanen LINE-Motiv, während TCS349 eine kurze Sequenz enthielt, die der humanen tRNA-Sequenz ähnlich ist.

Weitere Untersuchungen der Satelliten-ähnlichen PCR-Produkte zeigten, dass diese Telomersequenzen enthielten, die direkt an die Satelliten-DNA angrenzten. Daraufhin wurden die mit dem G-reichen Telomerprimer und einem Satellitenprimer amplifizierten PCR-Produkte TGS400 und TGM225 mit der Satelliten-DNA IA vom indischen Muntjak (*MMV SatIA*) verglichen. Dieser ClustalW-Vergleich zeigte, dass die Telomersequenzen der beiden PCR-Produkte mit dem gleichen DNA-Strang der *MMV SatIA*-DNA fusioniert waren, wenn auch an unterschiedlichen Positionen (Abb. 7A). Im Unterschied dazu war die Telomersequenz des mit dem C-reichen Telomerprimer und *SatIA*-Primer amplifizierte PCR-Produkt TCS165 mit dem komplementären und reversen Strang der *MMV SatIA*-DNA verbunden, was sich im Vergleich der TCS165-Sequenz mit der Satelliten-DNA IA zeigte (Abb. 7B).

Um die direkte Verbindung zwischen Telomer- und Satellitensequenzen in den PCR-Produkten TGS400, TGM225 und TCS165 zu überprüfen, wurde eine sogenannte Nested PCR durchgeführt. Hierzu wurden Primer erstellt, die genau den Übergang zwischen Telomer- und Satellitensequenzen überspannen. Die Primer wurden in PCR-



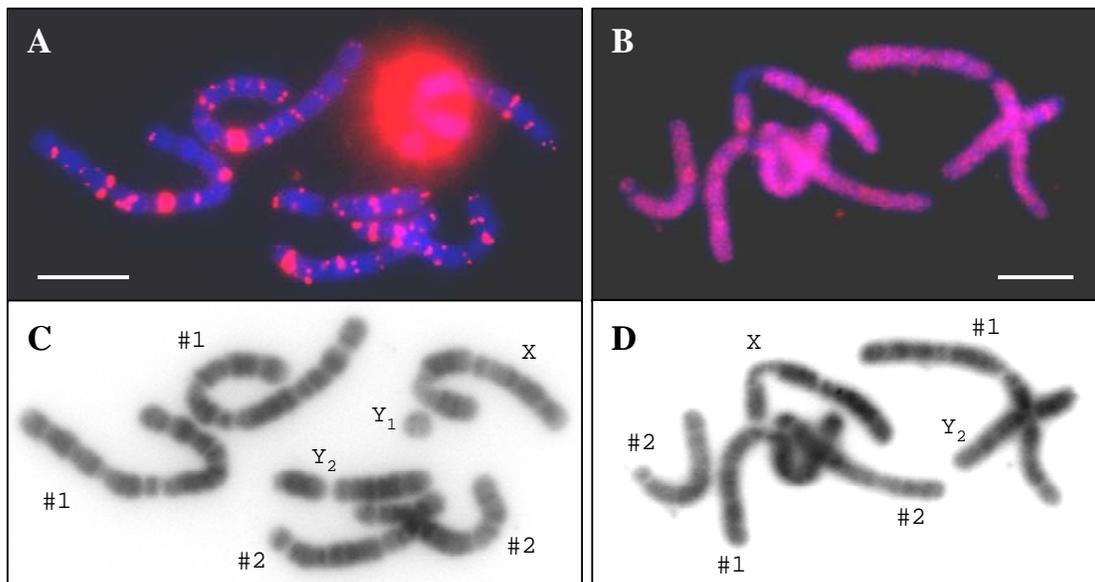
Reaktionen mit genomischer *MMV*-DNA eingesetzt und das Ergebnis waren spezifische PCR-Produkte mit der erwarteten Länge (Abb. 6B). Auf diese Weise konnten die oben beschriebenen Telomer-Satelliten-Übergänge im *MMV*-Genom bestätigt werden und das Vorhandensein von PCR-Artefakten ausgeschlossen werden.

Um die Vermutung zu testen, ob die erst kürzlich entdeckte Satelliten-DNA II (Vafa et al., 1999; Li et al., 2000c) eine Rolle bei den Tandemfusionen gespielt hat und inwieweit sie mit Telomersequenzen assoziiert ist, wurden auch die mit Telomer und SatII-Primern isolierten PCR-Produkte mit dem BLASTn Programm analysiert. Hierbei fand sich allerdings für keines der sechs sequenzierten PCR-Produkte eine Ähnlichkeit zu schon bekannten DNA-Sequenzen. Auch die drei PCR-Produkte, die mit einem Telomerprimer und einem SatI-Primer aus dem Genom des chinesischen Muntjaks amplifiziert worden waren, zeigten keine Ähnlichkeiten zu anderen Sequenzen.

### 3.3 Chromosomale Lokalisation der PCR-Produkte

Die chromosomale Lokalisation der isolierten PCR-Produkte sollte mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) untersucht werden. Hierzu wurden die PCR-Produkte mit Digoxigenin markiert und anschließend auf Metaphasechromosomen vom indischen Muntjak hybridisiert. Die Detektion erfolgte mit Rhodamin-konjugierten Fab-Fragmenten. Die Hybridisierung der PCR-Produkte TGS400, TGM225 und TCS165, deren Sequenzen eine hohe Übereinstimmung mit Satelliten-DNA aufwiesen, resultierte in spezifischen, interstitiellen Signalen auf den *MMV*-Chromosomen (Abb. 8A). Die stärksten Signale wurden im Centromerbereich des X-Chromosoms, an der Grenze

zwischen Eu- und Heterochromatin, beobachtet. Die Centromere der Chromosomen 1 und 2 wiesen ebenfalls starke Signale auf. Zusätzlich zeigten sich insgesamt 27-29 interstitielle Signale von teilweise schwacher Intensität auf allen Chromosomen außer auf dem kleinen Y<sub>2</sub>-Chromosom. Dieses Hybridisierungsmuster stimmt weitgehend mit dem Hybridisierungsmuster der aus *MRE* Satelliten-DNA I bestehenden C5-Sonde auf *MMV*-Chromosomen überein (Lin et al., 1991; Fronicke und Scherthan, 1997).



**Abb. 8:** Hybridisierungsmuster der beiden PCR-Produkte TGS400 und TCS249. **(A)** Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) des Satelliten-ähnlichen PCR-Produktes TGS400 generiert auf *MMV*-Metaphasechromosomen zahlreiche interstitielle Signale (rot). Das stärkste Signal befindet sich im Bereich des langen Centromers des X-Chromosoms. Ebenfalls starke Signale können an den Centromeren der Chromosomen 1 und 2 beobachtet werden, während die interstitiellen Signale schwächer sind. Damit stimmt das Hybridisierungsmuster weitgehend mit der C5-Probe überein, die aus *MRE* Satelliten-DNA besteht (Fröhnicke et al., 1997) (Balken entspricht 10  $\mu$ m). **(B)** Dagegen markiert das PCR-Produkt TCS349, das eine große Ähnlichkeit mit verschiedenen repetitiven Rindersequenzen hat, das gesamte Euchromatin der *MMV*-Chromosomen (Balken entspricht 10  $\mu$ m). **(C + D)** Inverse DAPI-Bänderung der Chromosomen aus A und B.

Im Gegensatz dazu erzeugten die PCR-Produkte TGM451 und TCM431 keine spezifischen Signale auf den *MMV*-Chromosomen. Interessanterweise markierte jedoch das PCR-Produkt TCS349, das eine hohe Übereinstimmung mit verschiedenen repetitiven Rindersequenzen aufwies, das gesamte Euchromatin der *MMV*-Chromosomen. Die Centromerbereiche, vor allem des X-Chromosoms, aber auch von Chromosom 1 und 2 wurden nicht markiert (Abb. 8B). Ein solches Muster wurde schon früher nach Hybridisierung einer aus einer Mikrodisektions-Bibliothek isolierten repetitiven *MMV*-Sequenz beobachtet (H. Scherthan, persönliche Mitteilung). Des weiteren wurden alle mittels Telomerprimer und einem Primer aus Satelliten-DNA II amplifizierten PCR-Produkte auf *MMV*-Chromosomen hybridisiert. In keinem Fall konnten spezifische Signale festgestellt werden. Dieser Befund deutet darauf hin, dass zumindest mit den hier gewählten Methoden keine direkte Verbindung zwischen Telomersequenzen und Satelliten-DNA II nachzuweisen ist.

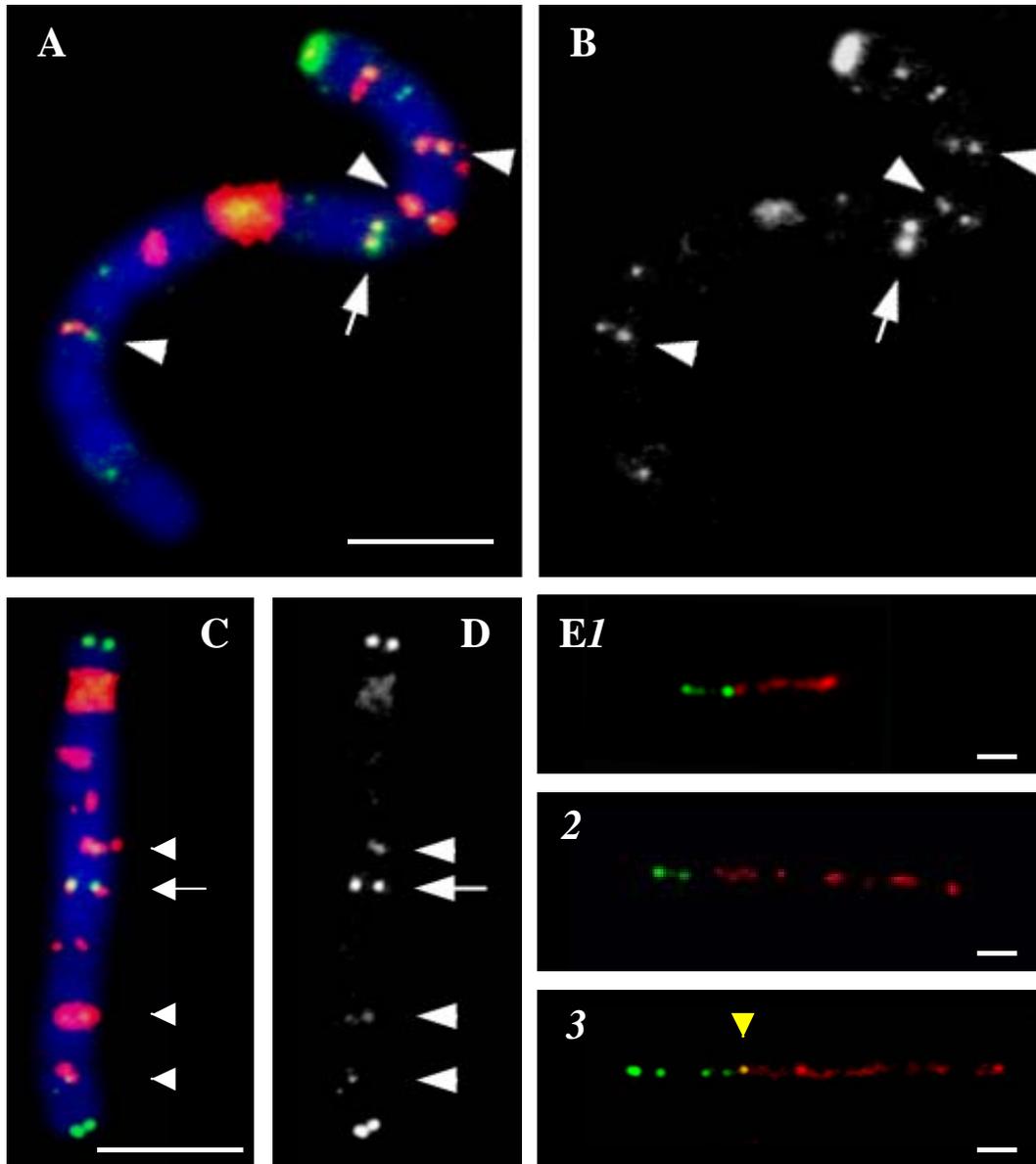
### 3.4 Fiber-FISH mit Telomer- und Satellitensonden

Mit Hilfe der Fiber-FISH Methode, bei der markierte DNA-Sonden auf gestreckte Chromatinfasern hybridisiert werden (siehe Heng et al., 1992; Wiegant et al., 1992 und 2.2.2.6), sollten weitere Informationen über die räumliche Anordnung von Telomer- und Satelliten-DNA gewonnen werden. Dafür wurde das Satelliten-ähnliche PCR-Produkt TGS400 zusammen mit einer Telomersonde auf *MMV*-Chromatinfasern hybridisiert (Abb. 9E). Die Telomersonde bestand aus einer Biotin-markierten T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>-Sequenz, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC detektiert wurde, während das PCR-Produkt TGS400

wie zuvor mit Digoxigenin markiert war und mit Rhodamin sichtbar gemacht wurde. Die Auswertung dieser Zwei-Farben FISH-Experimente ergab, dass einige Chromatinfasern kurze Telomersignale und direkt daran angrenzende Satellitensignale enthielten (Abb. 9E). Die Signale waren dabei typischerweise wie Perlen auf einer Kette angeordnet und gelegentlich überlagerten sich dabei beide Farbsignale, was auf einen direkten Übergang von Telomer- zu Satellitensequenzen an dieser Stelle hinweist (Abb. 9E3). Berücksichtigt man die Auflösungsgrenze der Fiber-FISH von ungefähr 1 kb (Florijn et al., 1995), ist es ferner möglich, dass einige sehr kurze Telomersignale nicht detektiert werden konnten und dadurch eine Reihe von möglichen Verbindungen zwischen Telomer- und Satellitensequenzen nicht erfasst wurden.

### **3.5 Kolokalisation von Telomer- und Satelliten-DNA**

Nach dem Nachweis einer direkten Verbindung von Telomersequenzen und Satelliten-DNA I mittels PCR und Fiber-FISH, sollte im Folgenden untersucht werden, inwieweit sich eine räumliche Nähe bzw. Kolokalisation dieser Sequenzen auch auf Chromosomenebene nachweisen lässt. Der Vorteil besteht darin, dass man hierbei zusätzliche Informationen über die chromosomale Lokalisation erhält. Hierzu wurde wieder das PCR-Produkt TGS400 als Satellitensonde zusammen mit einer Telomersonde, diesmal bestehend aus einer Fluorescein-konjugierten PNA-Sonde (Lansdorp et al., 1996), auf *MMV*-Metaphasechromosomen hybridisiert. Nach Optimierung des Hybridisierungsverfahrens wurden zunächst die denaturierten Chromosomen mit der



**Abb. 9:** Zwei-Farben FISH mit dem Satelliten-ähnlichen PCR-Produkt TGS400 als Sonde (rot) und einer Telomersonde (grün bzw. grau). **(A)** Das *MMV*-Chromosom 1 zeigt ein starkes (Pfeil) und drei schwache (Pfeilköpfe) interstitielle Telomersignale, die mit den Satelliten-ähnlichen Sequenzen des PCR-Produkts TGS400 kolokalisieren. Das Chromosomenende des p-Arms zeigt starke Telomersignale, während das Ende des q-Arms sehr schwache Telomersignale aufweist (Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ ). **(B)** Chromosom 1 mit nur den Telomersignalen in grau. **(C)** Das Chromosom 2 zeigt Telomersignale an beiden Chromosomenenden und auch ein starkes (Pfeil) und drei schwache (Pfeilköpfe) interstitielle Telomersignale, die mit der TGS400-Sonde kolokalisieren (Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ ). **(D)** Chromosom 2 mit den Telomersignalen in grau.

(E) Fiber-FISH mit einer Telomersonde (grün) und dem PCR-Produkt TGS400 als Satellitensonde (rot) auf gestreckten *MMV*-Chromatinfasern. Telomersignale grenzen direkt an Satellitensignale, wobei sich in E3 beide Signale (gelb) an einer Stelle überlagern (Pfeilkopf). Balken entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

Telomersonde versetzt, während die denaturierte TGS400-Sonde vier Stunden später dazugegeben wurde. Die Auswertung dieser FISH-Experimente zeigte zum einen die erwarteten Telomersignale an den *MMV*-Chromosomenenden, wobei das Ende des q-Arms von Chromosom 1 teilweise keine bis sehr schwache Telomersignale aufwies, und zum anderen eine Reihe von interstitiellen Telomersignalen, die mit den Satellitensignalen der TGS400-Sonde kolokalisierten (Abb. 9). Drei dieser interstitiellen Loci wurden auf dem p-Arm und einer auf dem q-Arm von Chromosom 1 detektiert (Abb. 9A-B). Beim Chromosom 2 befanden sich alle vier nachgewiesenen interstitiellen Loci auf dem q-Arm (Abb. 9C-D). Damit konnte auch mit dem Ansatz der Zwei-Farben FISH auf Metaphasechromosomen eine räumliche Nähe von Telomer-DNA und Satelliten-DNA I gezeigt werden.

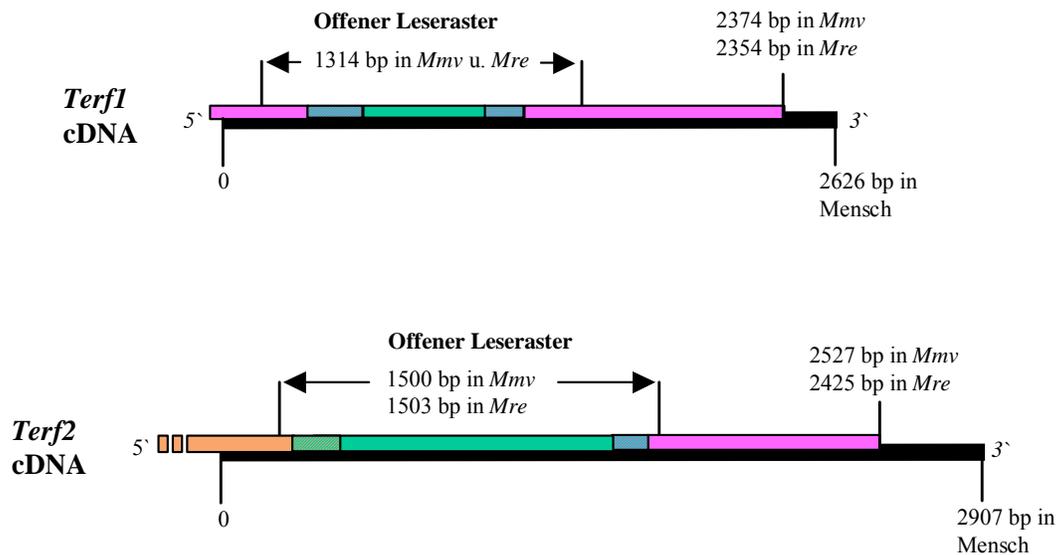
Insgesamt zeigen diese Ergebnisse auf der Ebene der DNA-Sequenz, auf der Ebene der Chromatinfaser und auf der chromosomalen Ebene, dass Telomer- und Satellitensequenzen direkt aneinander grenzen. Die Ergebnisse untermauern somit die Hypothese, dass die untersuchten repetitiven DNA-Sequenzen an den Chromosomenfusionen des indischen Muntjaks beteiligt waren (Scherthan, 1995).

### 3.6 Isolation der Muntjak *TERF*-Gene

Da die bisherigen Ergebnisse die Beteiligung von Telomersequenzen an den Chromosomenfusionen des indischen Muntjaks als sehr wahrscheinlich erscheinen lassen, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Telomere von sowohl *MMV* als auch vom *MRE* genauer untersucht. In jüngster Zeit hat man eine ganze Reihe von Proteinen gefunden, die mit der Telomer-DNA assoziiert sind und zum Erhalt und Schutz der Telomere beitragen (zur Übersicht siehe Einleitung, van Steensel et al., 1998; Ferreira et al., 2004). Zwei wichtige Faktoren sind hierbei die beiden an telomerische DNA bindenden Proteine TRF1 und TRF2 (de Lange, 2002). Im Folgenden sollten daher die entsprechenden *TERF*-Gene des indischen und chinesischen Muntjaks isoliert und charakterisiert werden.

Zunächst wurden hierfür die cDNA-Sequenzen der *TERF*-Gene von Mensch und Maus mit Hilfe des Programms ClustalW miteinander verglichen. Dabei zeigten sich in beiden Genen mehrere konservierte Regionen, in denen identische Sequenzabschnitte von über 20 Basenpaaren vorkamen (Daten nicht gezeigt). Anhand dieser zwischen Mensch und Maus konservierten Abschnitten wurden Primer erstellt, die in sogenannten One-Step RT-PCR-Experimenten eingesetzt wurden. Als Matrize diente aus *MMV*- oder *MRE*-Fibroblasten isolierte RNA, die mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und im gleichen Reaktionsansatz mit Hilfe einer HotStar Taq-Polymerase amplifiziert wurde (Qiagen). Die Verwendung der *TERF1*-spezifischen Primer (TRF1.1 fw und TRF1.2 rv, siehe 2.1.2) resultierte in einem PCR-Produkt mit einer Länge von etwa 850 bp in *MMV* und *MRE*, während *TERF2*-spezifische Primer (TRF2.2 fw und TRF2.2 rv) in etwa 1300-bp-Produkt aus beiden Muntjakspezies isolierten. Die erhaltenen PCR-

Produkte wurden aufgereinigt, in den pGEM-T easy Vektor (Promega) kloniert und sequenziert. Vergleiche zwischen den gewonnenen PCR-Produkten und den humanen cDNA-Sequenzen von *TERF1* und -2 bestätigten die Spezifität der Sequenzen. Diese Vorgehensweise ermöglichte jedoch nicht die Isolation der vollständigen Gensequenzen, da die 5`- und 3`-Enden der cDNA geringer konserviert sind. Diese wurden daher mit Hilfe der RACE-Methode (Rapid Amplification of cDNA Ends) isoliert, bei der beim Umschreiben von RNA in cDNA zunächst ein Linker angehängt wird, um anschließend die gesuchten cDNA-Enden per PCR mit Linker- und Gen-spezifischen Primern zu amplifizieren. Um die Ausbeute und die Spezifität dieser Reaktionen zu erhöhen, folgte eine Nested-PCR mit weiteren Linker- und Gen-spezifischen Primern. Die auf diese Weise erhaltenen PCR-Produkte wurden ebenfalls kloniert und sequenziert. Im Fall von *TERF1* konnten alle Sequenzabschnitte mit Hilfe der Gap4 Software (Accelrys) zu einer vollständigen *TERF1* cDNA-Sequenz von *MMV* und *MRE* zusammengesetzt werden (Abb. 10). Dagegen ließ sich trotz mehrfacher Wiederholungen und Variation der RACE Methode nur ein kurzes Fragment des 5`-Endes von *TERF2* isolieren. Wie sich im Nachhinein zeigte, führte sehr wahrscheinlich der hohe GC-Gehalt (über 80%) dieser Region und eine Haarnadelschleifenregion der mRNA, wie sie später vom Programm GeneBee aufgezeigt wurde, zur Blockade der reversen Transkription. Letztendlich führte eine inverse PCR-Strategie, mit der unbekannte Sequenzen amplifiziert werden können, wenn sie von bekannten DNA-Abschnitte flankiert werden (Ochman et al., 1988), zur Isolation des 5`-Endes von *TERF2* aus genomischer Muntjak-DNA. Nach Klonierung und Sequenzierung dieses Endes konnten alle Abschnitte des *TERF2*-Gens von *MMV* und *MRE* zusammengesetzt werden (Abb. 10).



**Abb. 10:** Schema zur Isolation der *TERF*-Gene aus *MMV* und *MRE* mittels PCR. Die humanen cDNA-Sequenzen (schwarz) dienen dabei als Referenz. Zunächst wurden die konservierten Genbereiche (grün) mit homologen Primern isoliert. Danach wurden die weniger konservierten 3'- und 5'-Enden (pink) mittels RACE und das 5'-Ende von *TERF2* (orange) mittels inverser PCR isoliert. Computerprogramme setzten die Sequenzabschnitte anhand von überlappenden Bereichen (schraffiert) zusammen und identifizierten die offenen Leseraster.

### 3.7 Sequenzanalyse der Muntjak *TERF*-Gene

Die vollständigen *TERF1*-cDNA-Sequenz des indischen Muntjaks hat eine Länge von 2374 bp (GenBank-Nummer AY606018), während das *TERF1*-Gen des chinesischen Muntjaks aus 2354 bp besteht (GenBank-Nummer AY606022). Mit Hilfe des Übersetzungsprogramms 6-Frame Translation (siehe Sequenzanalyse 2.2.1.9) wurden die cDNA-Sequenzen in alle möglichen Aminosäuresequenzen übersetzt. Auf diese Weise konnte ein offener Leseraster (ORF) von 1314 bp in beiden Muntjakspezies identifiziert werden. Der Leseraster begann mit dem ersten ATG-Startcodon, das in eine Kozak-

Konsensussequenz ([G/A]NNATGG) eingebettet war (Kozak, 1991), und endete mit dem Stopcodon TGA. Die Übersetzung des vollständigen offenen Leseraster ergab für beide Muntjakarten ein TRF1-Protein mit einer Länge von 438 Aminosäuren (aa) (Abb. 14).

Das isolierte *TERF2*-Gen besteht aus einem genomischen Abschnitt (5'-Ende) und einer cDNA-Sequenz. Aus diesem Grund beginnt die hier beschriebene *TERF2*-Sequenz mit dem ersten ATG-Startcodon, das von einer Kozaksequenz umgeben war. Die Länge dieser *TERF2*-Sequenz beträgt 2527 bp im indischen Muntjak (GenBank-Nummer AY606026) und 2425 bp im chinesischen Muntjak (AY606028). Mit Hilfe des Übersetzungsprogramms konnte ein offener Leseraster von 1500 bp in *MMV* und von 1503 bp in *MRE* identifiziert werden. Die Leseraster codieren somit ein TRF2-Protein von 500 aa in *MMV* und von 501 aa in *MRE* (Abb. 14).

### 3.8 Expressionsmuster von *TERF1* und -2

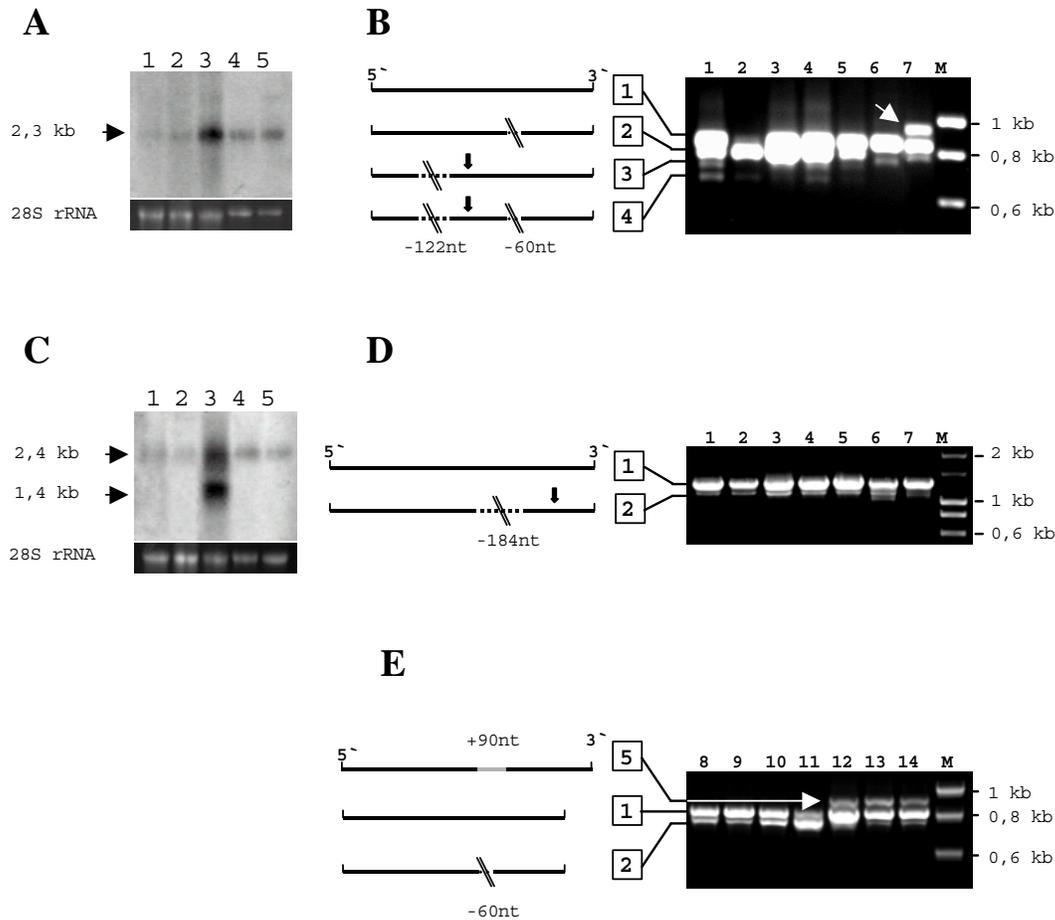
Die Expression von *TERF1* und -2 wurde mit Hilfe von Northern Blots und RT-PCR-Experimenten untersucht. Für die Northern Blot Analyse wurde RNA aus Hoden-, Muskel- und Lebergewebe des chinesischen Muntjaks sowie RNA aus indischen und chinesischen Muntjakfibroblasten in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Als Sonde dienten Muntjak-spezifische PCR-Produkte des *TERF1*-Gens und des *TERF2*-Gens, die mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP radioaktiv markiert waren. Eine solche *TERF1*-Sonde detektierte ein einziges Transkript in allen untersuchten Proben (Abb. 11A). Das detektierte Transkript hat eine ungefähre Länge von 2,3 kb, was im Einklang mit der sequenzierten *TERF1*-cDNA von *MMV* und *MRE* (2354 bp und 2374

bp) steht. Des weiteren zeigt der Northern Blot, dass *TERF1* stark im *MRE*-Hoden, mittelmäßig in den *MMV* und *MRE* Fibroblasten und nur schwach in *MRE* Leber- und Muskelgewebe exprimiert wird. Dieses Expressionsmuster von *TERF1* in Muntjakgeweben entspricht Ergebnissen früherer Expressionsstudien in humanen Geweben (Broccoli et al., 1997a).

Die *TERF2*-Sonde detektiert ein ungefähr 2,4 kb langes Transkript (Abb. 11C), das mit dem Längenbereich des sequenzierten *TERF2*-Gens (2527 bp in *MMV* und 2425 bp in *MRE*) übereinstimmt. Auch *TERF2* wird am stärksten im Hodengewebe, mittelmäßig in den Fibroblasten und schwach in Leber- und Muskelgewebe exprimiert. Auffällig ist eine zusätzliche Bande im *MRE*-Hoden von ungefähr 1,4 kb Länge, die allerdings nicht in RT-PCR Experimenten bestätigt werden konnte.

### 3.9 Spleißvarianten von *TERF1* und -2

Neben der Expressionsanalyse mittels Northern Blots sollte die Expression der *TERF*-Gene auch mit Hilfe von RT-PCR untersucht werden. Hierzu wurden RT-PCR-Experimente mit RNA aus *MRE*-Gewebe (Hoden, Muskel und Leber), mit RNA aus *MMV* und *MRE* Fibroblasten sowie mit RNA aus Mausgewebe (Leber) und humanem Gewebe (Hoden) durchgeführt. Es zeigte sich, dass sowohl *TERF1*- als auch *TERF2*-spezifische Produkte in allen untersuchten *MRE*-Geweben, Muntjakzellen und in den Kontrollen von Mensch und Maus vorhanden waren (Abb. 11B+D). Damit bestätigen die Ergebnisse das Expressionsmuster der Northern Blot Analyse.



**Abb. 11:** Expressionsmuster und Spleißvarianten von *TERF1* (A,B + E) und von *TERF2* (C + D) mittels Northern Blot und RT-PCR.

1: Leber (*MRE*), 2: Muskel (*MRE*), 3: Hoden (*MRE*), 4: Fibroblasten (*MRE*), 5: Fibroblasten (*MMV*), 6: Leber (Maus), 7: Hoden (human), 8: Fibroblasten (human), 9: Gehirn (human), 10: Leber (human), 11: Herz (human), 12: Hoden #1 (human), 13: Hoden #2 (human), 14: Hoden #3 (human), M: Marker. In Northern Blot Analysen detektieren Muntjak-spezifische *TERF*-Sonden ein *TERF1*-Transkript mit einer Länge von ca. 2,3 kb (A) und ein *TERF2*-Transkript von ca. 2,4 kb (C) in allen untersuchten Muntjak-RNAs. Beide Gene sind am stärksten in Hodengewebe exprimiert und die *TERF2*-Sonde detektiert hier eine zusätzlichen Bande von ca. 1,4 kb. Die 28S rRNA Bande zeigt die gleichmäßige Beladung der Gele. RT-PCR-Experimente bestätigen, dass *TERF1* (B) und *TERF2* (D) ubiquitär exprimiert sind und decken vier verschiedene *TERF1*-Transkriptvarianten und zwei *TERF2*-Varianten in allen untersuchten Muntjakzellen und –geweben auf. *TERF1*-Variante #1 repräsentiert das vollständige Transkript, der Variante #2 fehlen 60 Nukleotide (nt), der Variante #3 fehlen 122 nt und der Variante #4

fehlen die 60 und 122 nt. Die Varianten #1 und #2 besitzen einen intakten offenen Leseraster (ORF), während der ORF bei den Varianten #3 und #4 durch ein frühzeitiges Stopcodon (schwarzer Pfeil) unterbrochen ist. Eine weitere *TERF1*-Variante (weißer Pfeil) mit zusätzlichen 90 nt und einem intakten ORF wurde ausschließlich in humanem Hodengewebe gefunden (**E**). Die Amplifizierung von *TERF2* (**D**) ergab eine Variante mit vollständigem ORF und eine mit unterbrochenem ORF, der 184 nt fehlen.

Zusätzlich deckten die RT-PCR Experimente eine Reihe von Transkriptvarianten von *TERF1* und *-2* auf. Die Sequenzierung aller isolierten Varianten lässt vermuten, dass sie durch alternatives Spleißen (zur Übersicht siehe Knippers, 2001) entstanden sind. Insgesamt wurden vier Spleißvarianten des *TERF1*-Gens und zwei Varianten des *TERF2*-Gens in beiden Muntjakspezies gefunden. Die Spleißvariante #1 von *TERF1* repräsentiert den vollständigen offenen Leseraster. Die Variante #2 enthält ebenfalls einen offenen Leseraster, jedoch fehlen ihr 60 Nukleotide. Sie ist ortholog zu der schon bekannten Spleißvariante *PIN2* des Menschen (Shen et al., 1997). Die Transkriptvariante #3 ist durch den Verlust von 122 Nukleotiden gekennzeichnet. Dadurch verschiebt sich der Leseraster und es kommt zu einem frühzeitigen Stoppcodon. Der Variante #4 fehlen sowohl die 60 als auch die 122 Nukleotide, was ebenfalls zu einer vorzeitigen Unterbrechung des offenen Leserasters führt (Abb. 11B).

Vom *TERF2*-Gen wurden zwei Spleißvarianten in *MMV* und *MRE* identifiziert. Variante #1 enthält den vollständigen Leseraster, während der Variante #2 eine Sequenz von 184 Nukleotiden fehlt. Daraus resultiert eine Leserasterverschiebung, die zu einem vorzeitigen Stopcodon führt (Abb. 11D). Es soll hier noch angemerkt werden, dass in allen untersuchten Gewebe- und Zelltypen die PCR-Banden der Spleißvarianten mit unterbrochenem Leseraster (PCR-Produkte #3 und #4 von *TERF1* und #2 von *TERF2*)

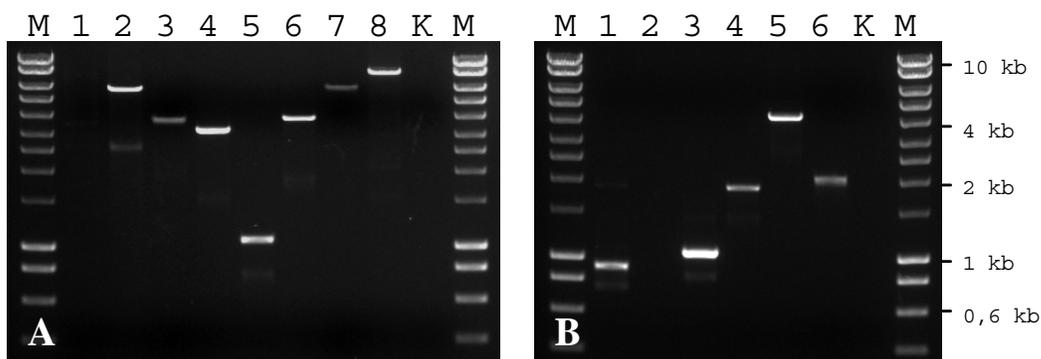
deutlich schwächer amplifiziert worden waren als die Spleißvarianten mit intaktem Leseraster. Auch wenn RT-PCR-Experimente dieser Art keine exakte Quantifizierung der Expression zulassen, lässt sich dennoch vermuten, dass die Spleißvarianten mit unterbrochenem Leseraster auch deutlich schwächer exprimiert werden. Des Weiteren wurde die Spezifität der Varianten #3 und #4 von *TERF1* mit Primern überprüft, die die Spleißstelle überspannen. Dabei wurden zum einen beide Spleißvarianten in Muntjaks bestätigt und zum anderen wurden sie auch in den untersuchten Kontrollen von Mensch und Maus nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus wurde eine weitere Spleißvariante von *TERF1* in humanem Hodengewebe gefunden (Abb. 11E), die eine zusätzliche Sequenz von 90 Nukleotiden enthält und einen vollständigen offenen Leseraster besitzt. Die Spleißvariante konnte aus drei unabhängigen humanen Hodenproben isoliert werden. Sie konnte jedoch nicht in anderen humanen Gewebetypen oder in Hodengewebe der Maus oder des chinesischen Muntjaks nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Bedeutung dieser Spleißvariante für die humane Spermatogenese hinweist.

### 3.10 Kartierung der *TERF*-Gene auf Muntjakchromosomen

Die Kartierung von *TERF1* und *-2* erfolgte mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf Metaphasechromosomen des indischen und chinesischen Muntjaks. Als Sonden wurden die isolierten cDNAs mit einer ungefähren Länge von 2,5 kb und genspezifische Intronsequenzen verwendet. Letztere wurden in Long-Range PCR-Experimenten mit Primern, die stromaufwärts und –abwärts von konservierten Intron-

Exon-Grenzen binden, isoliert. Auf diese Weise wurden sieben von acht mutmaßlichen Introns des *TERF1*-Gens mit einer Gesamtlänge von geschätzten 30,5 kb aus dem Genom von *MMV* und *MRE* amplifiziert (Abb. 12A). Im Falle von *TERF2* wurden fünf von sechs mutmaßlichen Introns mit einer Gesamtlänge von etwa 9,5 kb aus beiden Muntjakgenomen isoliert (Abb. 12B).

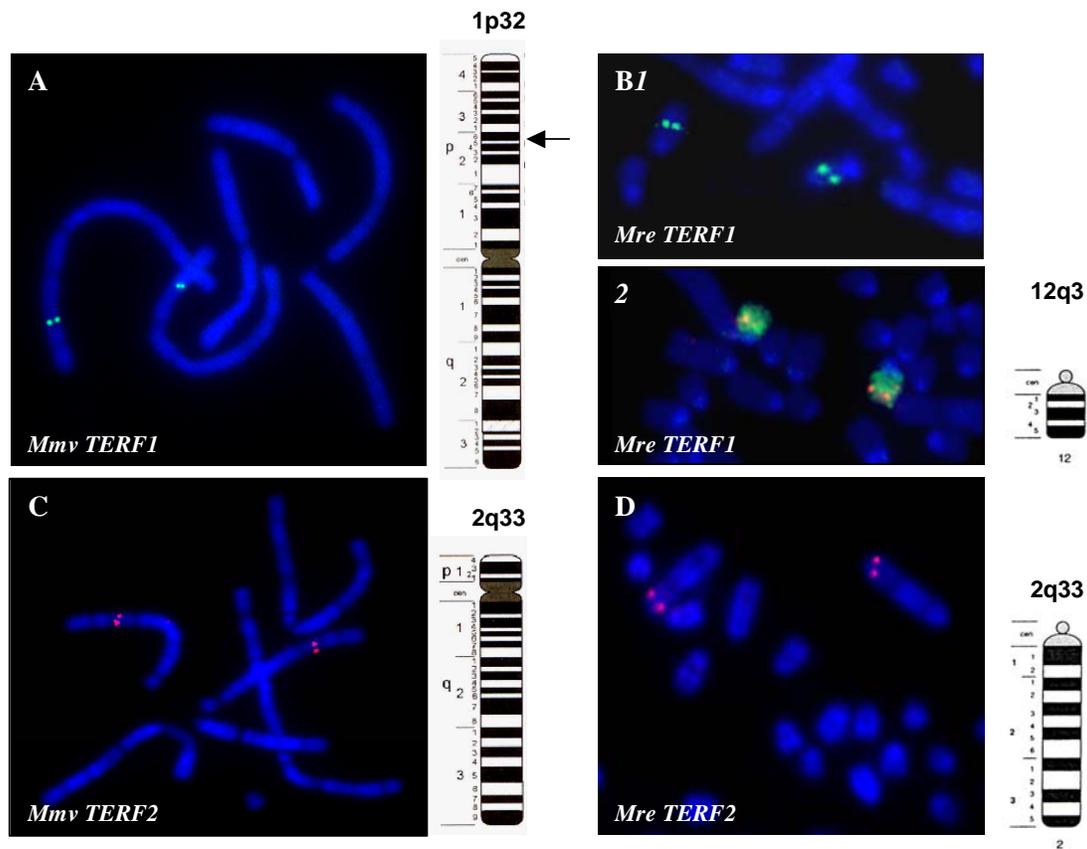


**Abb. 12:** Long-Range PCR-Amplifikation der *MRE*-Intronsequenzen von *TERF1* (A) und *TERF2* (B). Von 8 mutmaßlichen Introns des *TERF1*-Gens wurden bis auf Intron 1 alle amplifiziert (A). Die Gesamtlänge der amplifizierten Introns wurde auf 30,5 kb geschätzt. Vom *TERF2*-Gen wurden 5 von 6 mutmaßlichen Introns mit einer Gesamtlänge von etwa 9,5 kb isoliert (B). Intron-Amplifizierung aus genomischer *MMV*-DNA ergab PCR-Produkte mit den gleichen Größen. Spur 1: Intron 1, 2: Intron 2, 3: Intron 3, 4: Intron 4, 5: Intron 5, 6: Intron 6, 7: Intron 7, 8: Intron 8 (letztere nur bei *TERF1*), K: Kontrolle (negativ), M: Marker.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Positionen der Intron-Exon-Grenzen relativ konserviert sein müssen, wohingegen die Länge der einzelnen Introns nur zwischen den beiden Muntjakspezies, nicht aber zwischen Muntjak, Mensch und Maus, konserviert ist. Für die Hybridisierung auf *MMV*-Chromosomen wurden nur *MMV*-spezifische cDNA- und Intronsequenzen bzw. für *MRE*-Chromosomen nur *MRE*-

spezifische Sonden verwendet. Zur Unterscheidung wurden die *TERF1*-spezifischen cDNA- und Intronsequenzen mit Biotin und die *TERF2*-spezifischen Sequenzen mit Digoxigenin markiert.

Nach Hybridisierung der *TERF1*-Sonde auf *MMV*-Metaphasezellen wurden 22 Zellkerne ausgewertet, von denen 7 Kerne spezifische Signale auf allen vier Chromatiden, 9 Kerne Signale auf drei Chromatiden und 6 Kerne Signalen auf zwei Chromatiden aufwiesen. Die Signale wurden auf dem p-Arm von Chromosom 1 lokalisiert und variierten zwischen Bande 31 und 33 (Abb. 13A). Die genaue Kartierung der spezifischen Signale ergab, dass 9% der Signale mit der Bande 31 lokalisierten, 68% der Signale mit Bande 32 und 23% mit Bande 33. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde das *TERF1*-Gen beim indischen Muntjak auf Position 1p32 kartiert. Die *MRE*-spezifische *TERF1*-Sonde ergab ebenfalls spezifische Signale auf einem *MRE*-Chromosom, das aber zunächst nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnte. Zweifarben FISH-Experimente mit der *TERF1*-Sonde und einer für das *MRE*-Chromosom 12 spezifischen Sonde (Chromosome Paint) ergaben, dass die *TERF1*-Signale auf den q-Arm von *MRE*-Chromosom 12 im Bereich der Banden 2 bis 4 lokalisierten. Insgesamt wurden 33 Metaphase-Zellkerne ausgewertet, von denen 13 Kerne Signale auf allen vier Chromatiden, 13 Kerne Signale auf drei Chromatiden und 7 Kerne Signale auf zwei Chromatiden aufwiesen. 14% der Signale lokalisierten mit der Bande 12q2, 83% mit der Bande 3 und 3% mit der Bande 4, so dass das *TERF1*-Gen auf *MRE*-Chromosom 12q3 kartiert wurde (Abb. 13B).



**Abb. 13:** Kartierung der *TERF*-Gene auf Metaphasechromosomen des indischen und chinesischen Muntjaks mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung. Signale der *TERF1*-Sonde (grün) wurden auf *MMV*-Chromosom 1p32 detektiert (**A**), während beim chinesischen Muntjak *TERF1*-Signale (grün) auf *MRE*-Chromosom 12q3 nachgewiesen wurden (**B1**). Die Kartierung auf Chromosom 12 wurde durch Kolokalisation der *TERF1*-Sonde (rot) mit einer *MRE*-spezifischen Sonde für Chromosom 12 (grün) bestätigt (**B2**). Das *TERF2*-Gen (rot) kartiert sowohl beim indischen Muntjak auf Chromosom 2q33 (**C**), als auch beim chinesischen Muntjak auf Chromosom 2q33 (**D**).

Die Kartierung des *TERF2*-Gens beim indischen Muntjak ergab spezifische Signale auf dem q-Arm von *MMV*-Chromosom 2 im Bereich der Banden 32 bis 34 (Abb. 13C). Insgesamt wurden 34 Metaphase-Kerne, davon 11 mit jeweils vier spezifischen Signalen, 7 Kerne mit je drei Signalen, 13 Kerne mit je zwei Signalen und 3 Kerne mit je

einem Signal, ausgewertet. 15% der Signale lokalisierten mit Bande 2q32, 70% der Signale mit 2q33 und 15% mit 2q34. Die Hybridisierung der *MRE*-spezifischen *TERF2*-Sonde auf *MRE*-Chromosomen ergab ebenfalls Signale auf dem großen Arm des Chromosoms 2 im Bereich der Banden 33 und 34 (Abb. 13D). Von 30 untersuchten *MRE*-Kernen wiesen 9 Kerne jeweils vier spezifische Signale, 6 Kerne je drei Signale und 15 Kerne jeweils zwei Signale auf. 85% der Signale lokalisierten mit Position 2q33 und 15% der Signale mit 2q34. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass das *TERF2*-Gen sowohl bei *MMV* als auch bei *MRE* auf Position 2q33 kartiert. Die hier beschriebenen Genloci stimmen mit Zoo-FISH Karten des indischen Muntjaks (Fronicke und Scherthan, 1997) überein.

### **3.11 ClustalW-Vergleich der homologen cDNA- und Proteinsequenzen**

Vergleiche von Aminosäuresequenzen liefern Informationen darüber, inwieweit Proteine konserviert sind und erlauben dadurch Rückschlüsse über die Funktion von Proteinen. Im Folgenden sollen die Aminosäuresequenzen von TRF1 und -2 zwischen *MMV*, *MRE*, Mensch und Maus mit Hilfe des Programms ClustalW verglichen werden. Das Programm ermittelt dabei einen Wert für die Übereinstimmung („Aligned Score“) zweier Sequenzen, der dem Grad an Übereinstimmung („Level of Identity“) in Prozent entspricht. Der höchste Grad an Übereinstimmung, nämlich 98%, wurde beim Vergleich der TRF1-Sequenzen sowie der TRF2-Sequenzen zwischen beiden Muntjakspezies ermittelt (Tab. 2). Dagegen betrug die Übereinstimmung der TRF1-Sequenz zwischen

Muntjak und Mensch nur 81%, während sie zwischen Muntjak und Maus mit 63% noch geringer war. Letzteres ist vergleichbar mit 65% Übereinstimmung von TRF1 zwischen Mensch und Maus (Abb. 14A). Im Gegensatz dazu ist der Grad an Übereinstimmung beim TRF2-Protein insgesamt höher als bei TRF1. So beträgt die Übereinstimmung von TRF2 zwischen *MMV* bzw. *MRE* und der humanen Sequenz 90% bzw. 91%, zwischen Muntjak und Maus 82% bzw. 83% sowie zwischen Mensch und Maus 85% (Abb. 14C).

**Tabelle 2:** Sequenzvergleiche zwischen indischem Muntjak, chinesischem Muntjak, Mensch und Maus

		<i>TERF1</i> (cDNA)	TRF1 (Protein)	<i>TERF2</i> (cDNA)	TRF2 (Protein)
<i>MMV</i>	: <i>MRE</i>	98%	98%	98%	98%
<i>MMV</i>	: Human	60%	81%	88%	90%
<i>MMV</i>	: Maus	62%	63%	82%	82%
<i>MRE</i>	: Human	60%	81%	90%	91%
<i>MRE</i>	: Maus	62%	63%	82%	83%
Human	: Maus	72%	65%	67%	85%

Vergleich der cDNA- und Aminosäuresequenzen von TRF1 und -2 zwischen *MMV*, *MRE*, Mensch und Maus. Der Grad an Übereinstimmung ist in Prozent angegeben.

Für beide TRF-Proteine gilt, dass die Übereinstimmung zwischen Muntjak und Mensch jeweils höher ist als zwischen Muntjak und Maus und als zwischen Mensch und Maus. Unterstützung finden diese Befunde durch Vergleiche der entsprechenden cDNA-Sequenzen (Tab. 2). So ergeben sich beim Vergleich der *TERF*-Sequenzen sehr ähnliche Werte wie bei den entsprechenden TRF-Vergleichen. Eine Ausnahme hiervon stellt die geringe Übereinstimmung der *TERF1*-Sequenz zwischen Muntjak und Mensch (60%) im

Vergleich zur entsprechenden TRF1 Übereinstimmung (81%) dar. Dies liegt vor allem am relativ langen und wenig konservierten 5'-Ende der *TERF1*-Sequenz von Muntjak und Mensch. Die *TERF1*-cDNA der Maus ist dagegen viel kürzer, so dass hier cDNA- und Proteinvergleiche zu ähnlichen Übereinstimmungen führen (Tab. 2).

Als nächstes wurden die Strukturen der mutmaßlichen TRF-Proteine der Muntjaks mit Hilfe der Programme Prosite und Pfam (siehe 2.2.1.9) untersucht. Dabei ließen sich in Anlehnung an die humanen TRF-Proteine vier verschiedene Proteindomänen unterscheiden, nämlich eine N-terminale saure bzw. basische Domäne, eine für die Dimerisierung verantwortliche TRF-spezifische Domäne, eine NLS (Nuclear Localization Signal) enthaltende Domäne und eine DNA-Bindedomäne, die aus einem Helix-Turn-Helix Motif bestehende Myb-Domäne. Ein Vergleich der einzelnen Proteindomänen zwischen *MMV*, *MRE*, Mensch und Maus zeigte, dass sie unterschiedlich stark konserviert sind (Abb. 14B). Beim TRF1-Protein sind die Myb- und die Dimerisierungsdomäne stärker konserviert als die saure N-terminale und die NLS-enthaltende Domäne. So wurde zum Beispiel für die Myb-Domäne eine Übereinstimmung von 100% zwischen *MMV* und *MRE*, 93% Übereinstimmung zwischen *MMV* und Mensch und 81% zwischen *MMV* und Maus gefunden. Demgegenüber zeigt die saure N-terminale Domäne eine Übereinstimmung von 98% zwischen *MMV* und *MRE*, 59% zwischen *MMV* und Mensch und 26% zwischen *MMV* und Maus.

**A**

```

mmvTRF1 : MAEDTASAAQSPRCRADGEDAGSSKDRVADTVTDDQEQFECQELLECAVQPCVPEE : 56
mreTRF1 : MAEDTASAAQSPRCRADGEDAGSSKDRVADTVTDDQEQFECQELLECPVQPCVPEE : 56
hTRF1 : MAEDVSSAAPSPRRCADGRDADPTBEQMAETERNDEEQFECQELLECCVQVCAPEEEEE : 60
mTRF1 : MAETVSSAARDAPSRREGWTDSDSPEQ---EEVGGD-----AELLOCLOLCTP----RE : 47

mmvTRF1 : EEDPGLVAEAEAVAAGWMLDFLCVSLCRAFRDGRSDDFHRTRDSAEAIHGLSSSLTAYQL : 116
mreTRF1 : EEDPGLVAEAEAVAAGWMLDFLCVSLCRAFRDGRSDDFHRTRDSAEAIHGLSSSLTAYQL : 116
hTRF1 : EEDAQLVAEAEAVAAGWMLDFLCVSLCRAFRDGRSDDFRRTRNSAEAIHGLSSSLTAYQL : 120
mTRF1 : MENAELVAEAEAVAAGWMLDFLCVSLCRAFRDGRSDDFRRTRDSAEAIHGLHRLTAYQL : 107

mmvTRF1 : KTIYVCOFLTRIAAGKTPDAQFESDERITPLESALMIWASIEKEHDKLHEELENLIKIQA : 176
mreTRF1 : KTIYVCOFLTRIAAGKTLDAQFESDERITPLESALMIWASIEKEHDKLHEELENLIKIQA : 176
hTRF1 : RTIYICQFLTRIAAGKTLDAQFENRDERITPLESALMIWGSIEKEHDKLHEELENLIKIQA : 180
mTRF1 : KTVYICQFLTRVASCALDAQFEVDERITPLESALMIWNSIEKEHDKLHEELENLIKIQA : 167

mmvTRF1 : IAVCMENGNFKEAEVFERVFGDPNSYTPFKRKLTIISQKDTFHSFFQHFYSYNHMEKI : 236
mreTRF1 : IAVCMENGNFKEAEVFERVFGDPNSYTPFKRKLTIISQKDTFHSFFQHFYSYNHMEKI : 236
hTRF1 : IAVCMENGNFKEAEVFERIFGDPNSHMPFKSKLMTIISQKDTFHSFFQHFYSYNHMEKI : 240
mTRF1 : VAVCMETGSEFKEAEVFERIFGDPPEFYTPLEKRLKIISQKDVHSLFQHFYSYSCMMEKI : 227

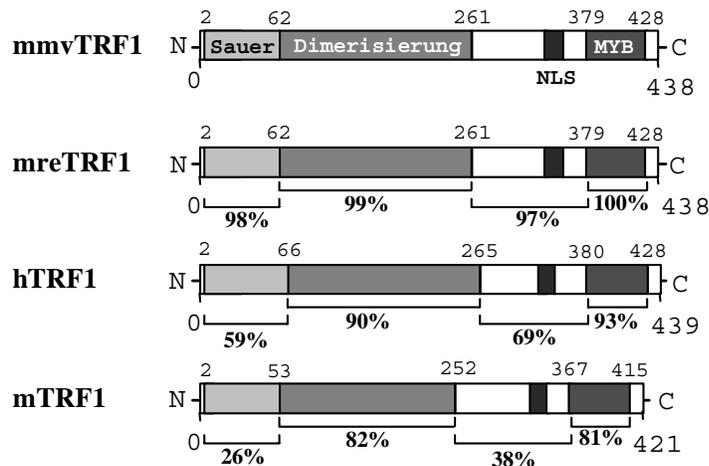
mmvTRF1 : KSYVSCVLEKSSSTFLMKAAAKVVEVKRARTIYSEDKPNDKVELATEANLDTGKSVSDK : 296
mreTRF1 : KSYVSCVLEKSSSTFLMKAAAKVVEVKRARTIYSEDKPNDKVELATEANLDTGKSVSDK : 296
hTRF1 : KSYVNYVLEKSSSTFLMKAAAKVVEVKRARTITSODKPSGNDVEMATEANLDTGKSVSDK : 300
mTRF1 : QSYVGDVLEKSSSTFLMKAAAKVVEVNEKARTQASKDRPDATNTGMDTEVGLNKEKSVNGQ : 287

mmvTRF1 : QSAVTESSGDTVSLLRSHKNLFLSKLKRQ-NEODFKKKEERVETLQSQSGRKKKENSRRRA : 355
mreTRF1 : QSAVTESSGDTVSLLRSHKNLFLSKLKRQ-NEODFKKKEERVETLQSQSGRKKKENSRRRA : 355
hTRF1 : QSAVTESSGDTVSLLRSHKNLFLSKLQHGTTQOODLNKKERRVGTPOSS---TKKKKESRRRA : 357
mTRF1 : QSTETETPLVDIVSSLRSHKNA-LSQLKRRAPSDESRNEARTGTLCQET---TMERNRRT : 343

mmvTRF1 : TESKRIRILKSNQVTPPEKHRPRKKQAWLWEEDKNLRS GVRKYGEGNWSKILSHYEFNNRT : 415
mreTRF1 : TESKRIRILKSNQVTPPEKHRPRKKQAWLWEEDKNLRS GVRKYGEGNWSKILSHYEFNNRT : 415
hTRF1 : TESRIPVSKSNQVTPPEKHRARKRQAWLWEEDKNLRS GVRKYGEGNWSKILSHYKFNRT : 416
mTRF1 : SGRNRLCVSENQPDITDDKSGRRKROITWLWEEDRIILKCGVKKYGEGNWAKILSHYKFNRT : 403

mmvTRF1 : SVMLKDRWRTMKKLLKLI CSDSED : 438
mreTRF1 : SVMLKDRWRTMKKLLKLI CSDSED : 438
hTRF1 : SVMLKDRWRTMKKLLKLI S DSED : 439
mTRF1 : SVMLKDRWRTMKRLKLI S----- : 421
    
```

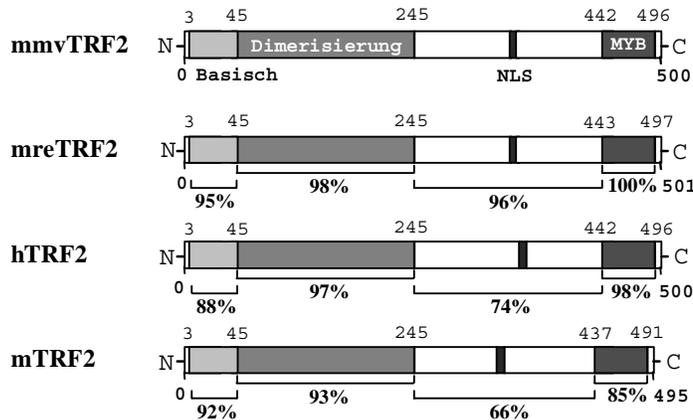
**B**



**C**

		*	20	*	40	*	60		
mmvTRF2	:	MAGGGGSSDS	SGRAAGRRASRS	GGRARRGRHA	PGLGGAER	SGAGEARLEEAVNRWVLKFY	:	60	
mreTRF2	:	MAGGGGSSDS	SGRVAGRRASRS	GGRARRGRHA	PGLGGAER	SGAGEARLEEAVNRWVLKFY	:	60	
hTRF2	:	MAGGGGSSDS	SGRAAGRRASRS	GGRARRGRHE	PGLGGAER	SGAGEARLEEAVNRWVLKFY	:	60	
mTRF2	:	MAGGGGSSDS	SGRAASRRASRS	GGRARRGRHE	PGLGGAER	SGAGEARLEEAVNRWVLKFY	:	60	
		*	80	*	100	*	120		
mmvTRF2	:	FHEALRAFRG	SRYGDFRQIRD	IMQALLVW	PLGKEHTVS	RLLRVMQCLSRIE	EEGENLDCSF	:120	
mreTRF2	:	FHEALRAFRG	SRYGDFRQIRD	IMQALLVR	PLGKEHTVS	RLLRVMQCLSRIE	EEGENLDCSF	:120	
hTRF2	:	FHEALRAFRG	SRYGDFRQIRD	IMQALLVR	PLGKEHTVS	RLLRVMQCLSRIE	EEGENLDCSF	:120	
mTRF2	:	FHEALRAFRS	SRYRDFRQIRD	IMQALLVR	PLGKEHTVS	RLLRVMQCLSRIE	EEGENLDCSF	:120	
		*	140	*	160	*	180		
mmvTRF2	:	DMEAELTPLESA	INVLEMIKTEFTL	TEAVI	ESSRKL	VKEAAV	IICIKNKEFEKASKILKK	:180	
mreTRF2	:	DMEAELTPLESA	INVLEMIKTEFTL	TEAVI	ESSRKL	VKEAAV	IICIKNKEFEKASKILKK	:180	
hTRF2	:	DMEAELTPLESA	INVLEMIKTEFTL	TEAVV	ESSRKL	VKEAAV	IICIKNKEFEKASKILKK	:180	
mTRF2	:	DMEAELTPLESA	INVLEMIKTEFTL	DSMV	ESSRKL	VKEAAV	IICIKNKEFEKASKILKK	:180	
		*	200	*	220	*	240		
mmvTRF2	:	HMSKDPTTQKLR	NDLLNIIREKNLAH	PVIQNS	SYET	FQOKMLRFLESHLDD	AEPCLLTMA	:240	
mreTRF2	:	HMSKDPTTQKLR	NDLLNIIREKNLAH	PVIQNS	SYET	FQOKMLRFLESHLDD	AEPEYLLTMA	:240	
hTRF2	:	HMSKDPTTQKLR	NDLLNIIREKNLAH	PVIQNS	SYET	FQOKMLRFLESHLDD	AEPEYLLTMA	:240	
mTRF2	:	YMSKDPTTQKLR	NDLLNIIREKNLAH	PVIQNS	SYEV	FQOKMLRFLESHLDD	TEPEYLLTMA	:240	
		*	260	*	280	*	300		
mmvTRF2	:	KKALKSESST	SATVKEPQPQPA	PEPVEKPLREPAR	QLOSTPT	TIGIRTLKAAFKTLSS	AAQ	:300	
mreTRF2	:	KKALKSESST	SATVKEPQPQPA	PEPVEKPLREPAR	QLOSTPT	TIGIRTLKAAFKTLSS	AAQ	:300	
hTRF2	:	KKALKSES	AASSTGKEDK-Q	PAPGPEKPLREPAR	QLRNPPT	TIGIMTLKAAFKTLSS	AAQ	:299	
mTRF2	:	KKALKSES	AASSTVREKHK	---	PEPVEKPLREPR	QPNPPTATIGIRTLKAAFKALS	AAQ	:297	
		*	320	*	340	*	360		
mmvTRF2	:	DSEAAFS	SKLDQKDMVFP	PNKVCPP	SPALKNKRTR	KDDNDS	SAPTEGEGSSELQPKTKRMTI	:360	
mreTRF2	:	DSEAAFS	SKLDQKDMVFP	PNKVCPP	SPALKNKRTR	KDDNDS	SAPTEGEGSSELQPKTKRMTI	:360	
hTRF2	:	DSEAAFA	SKLDQKDLVLE	TQALP	SPALKNKRPR	KDENES	SAPADGEGGSELQPKNKRMTI	:359	
mTRF2	:	DSEAAFA	SKLDQKDLVLAN	LA	SPSPAHK	KRPRKDEHES	SAPAEGEGSSSRQPRNSPMTI	:357	
		*	380	*	400	*	420		
mmvTRF2	:	SRLVLEEDSQST	EPSFGLDSAQ	EVTPAS	SKPTVLNQPL	PGEKNPKVPK	KGWNS	NGVEE	:420
mreTRF2	:	SRLVLEEDSQST	EPSFGLDSAQ	EVTPAS	SKPTVLNQPL	PGEKNPKVPK	KGWNS	NGVEE	:420
hTRF2	:	SRLVLEEDSQST	EPSAGLNS	QEAASAP	SKPTVLNQPL	PGEKNPKVPK	KGWNS	NGVEE	:419
mTRF2	:	SRLLEEDSQST	EPSFGLNS	SHAMS	A--SKPRAL	NQPH	PGEKKPKASKDKWNS	PNGLEE	:415
		*	440	*	460	*	480		
mmvTRF2	:	KETWVEEDEL	FQVQ-AP	DEDSATNT	TKKQKWTVEE	SEWVKAGV	QKYGEGNWAAISK	SNYPF	:479
mreTRF2	:	KETWVEEDEL	FQVQ-AP	DEDSATNT	TKKQKWTVEE	SEWVKAGV	QKYGEGNWAAISK	SNYPF	:480
hTRF2	:	KETWVEEDEL	FQVQ-AP	DEDSSTNI	TKKQKWTVEE	SEWVKAGV	QKYGEGNWAAISK	SNYPF	:479
mTRF2	:	KEVWLEEDQL	FEVQ-AP	GEDRSS	SLTRKQKWTIEE	SEWVKD	GVRKYGEGNWAAISK	SNYPF	:474
		*	500						
mmvTRF2	:	VNRTAVMIKDRWR	TMKRLGMN	:				:500	
mreTRF2	:	VNRTAVMIKDRWR	TMKRLGMN	:				:501	
hTRF2	:	VNRTAVMIKDRWR	TMKRLGMN	:				:500	
mTRF2	:	VNRTAVMIKDRWR	TMKRLGMN	:				:495	

**D**



**Abb. 14:** Vergleich der TRF-Proteine zwischen *MMV*, *MRE*, Mensch und Maus. **(A)** Vergleich der Aminosäuresequenzen von TRF1 ergibt 98% Übereinstimmung zwischen beiden Muntjakarten, 81% Übereinstimmung zwischen den Muntjaksequenzen und der humanen Sequenz und 63% Übereinstimmung zwischen den Muntjaks und dem Maus-TRF1. **(B)** TRF1 besitzt eine N-terminale saure Domäne, eine Dimerisierungsdomäne, eine NLS-enhaltende Domäne und eine DNA-Bindedomäne (Myb). Die oberen Zahlen geben die Grenzen der Proteindomänen mit der Position der Aminosäure an, während die Prozentwerte den Grad an Übereinstimmung der einzelnen Domänen in Bezug auf *MMV* angeben. **(C)** Die Aminosäuresequenzen von TRF2 zeigen eine Übereinstimmung von 98% zwischen *MMV* und *MRE*, eine Übereinstimmung von 90% bzw. 91% zwischen Muntjak und Mensch und eine Übereinstimmung von 82% bzw. 83% zwischen Muntjak und Maus. **(D)** TRF2 besitzt eine ähnliche Proteinstruktur wie TRF1 außer dem Unterschied, dass die N-terminale Domäne bei TRF2 höher konserviert und basisch ist.

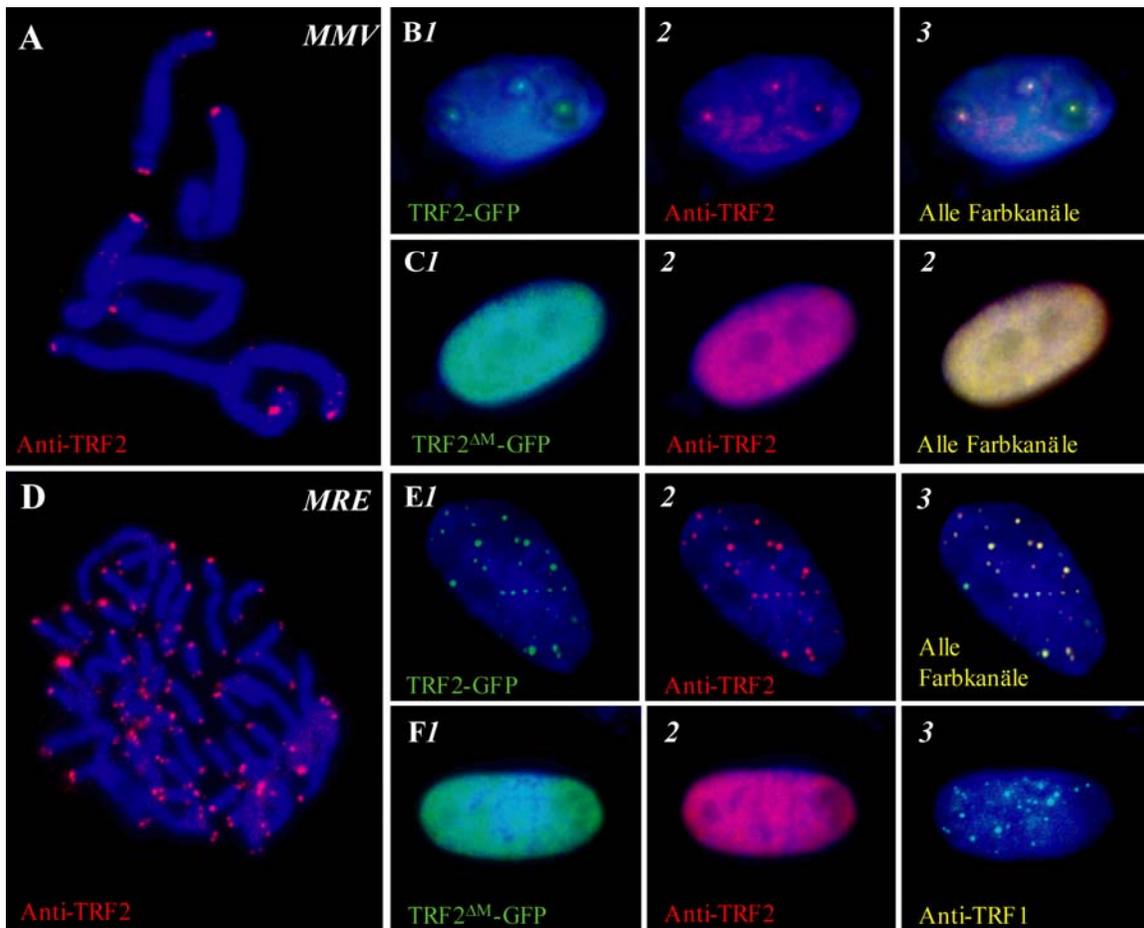
Beim Vergleich der TRF2-Domänen findet sich ein sehr ähnliches Muster wie bei TRF1 (Abb. 14D). Einzige Ausnahme ist die basische N-terminale Domäne des TRF2-Proteins, die viel stärker konserviert ist als die saure Domäne von TRF1. So reicht bei TRF2 die Übereinstimmung der basischen Domäne von 95% zwischen beiden Muntjakspezies bis zu 88% zwischen *MMV* und Mensch. Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass funktionell wichtige Domänen, wie z. B. die Dimerisierungsdomäne und die Myb-Domäne auch besonders stark konserviert sind. Des Weiteren zeigen die Vergleiche der Proteinsequenzen, dass die einzelnen Domänen von TRF2 innerhalb der untersuchten Arten stärker konserviert sind als die vergleichbaren TRF1-Proteindomänen.

### 3.12 Das *mre*TRF2-GFP-Protein lokalisiert an Telomere

Nachdem die vergleichende Untersuchung der TRF1- und TRF2-Sequenzen darauf hinweist, dass beide Muntjakspezies funktionsfähige TRF-Proteine besitzen, sollte im Folgenden die Funktionsfähigkeit von TRF2 *in vivo* untersucht werden, da vor allem TRF2 als Schutzfaktor vor Chromosomenfusionen angesehen wird (de Lange, 2002). Hierzu sollte der offene Leseraster des *TERF2*-Gens des chinesischen Muntjaks in einen GFP-Expressionsvektor kloniert und anschließend in Muntjakzellen überexprimiert werden. Da der vollständige, zusammenhängende Leseraster nicht amplifiziert werden konnte (siehe Isolation der Muntjak *TERF*-Gene, 3.6), wurde das G/C-reiche 5'-Ende und der restliche Teil von *TERF2* in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen amplifiziert. Danach wurden beide PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym BssSI (New England Biolabs), das im überlappenden Bereich beider PCR-Produkte schneidet, behandelt. Dann wurden beide Produkte über die Schnittstelle miteinander verbunden, ohne dabei eine Verschiebung des Leserasters zu verursachen. Als erfolgreiche Klonierungsstrategie stellte sich die Gateway-Technologie von Invitrogen heraus, bei der das ligierte Produkt zunächst in einen sogenannten Entry-Vektor kloniert wurde und von dort aus in den eigentlichen GFP-Expressionsvektor (pcDNA-DEST47) umkloniert wurde (siehe Klonierung des *TERF2*-Gens vom chinesischen Muntjaks, 2.2.1.6.4). Die Expression der *TERF2*-Sequenz erfolgte hierbei in der Reihenfolge N-*mre*TRF2-GFP-C, was durch Sequenzieren überprüft worden war.

Nach Transfektion von sowohl *MMV*- als auch *MRE*-Fibroblasten mit diesem Vektor zeigte sich ein für Telomere typisches punktiertes Signalmuster in den Interphase-Zellkernen der transfizierten Zellen. Zur Überprüfung der Spezifität und Lokalisation der

GFP-Signale sollte in den transfizierten Zellen das TRF2 mittels Immunfärbung nachgewiesen werden. Hierfür wurde zunächst ein monoklonaler Antikörper gegen das humane TRF2 in nicht-transfizierten *MMV*- und *MRE*-Zellen getestet. Es zeigte sich, dass



**Abb. 15:** Der TRF2-Antikörper (rot) markiert die Telomere von *MMV*- und *MRE*-Chromosomen (A + D). Überexpression von chinesischem Muntjak TRF2-GFP in *MMV*- (B) und *MRE*- (E) Fibroblasten erzeugt ein für Telomere typisches punktiertes Signalmuster (grün), das mit der TRF2-Antikörperfärbung (rot) kolokalisiert. Überexpression einer dominant negativen Version von *mre*TRF2, der die für die DNA-Bindung verantwortliche Myb-Domäne fehlt (*mre*TRF2<sup>ΔM</sup>-GFP) generiert ein diffuses, den gesamten Zellkern ausfüllendes GFP- und anti-TRF2-Signal in *MMV*- (C) und in *MRE*- (F) Zellen. (1) *mre*TRF2-GFP-Signale bzw. *mre*TRF2<sup>ΔM</sup>-GFP-Signale (grün), (2) Anti-TRF2-Signale (rot), (3) Überlagerung beider Farbkanäle (gelb) bzw. anti-TRF1-Signale (gelb). Chromosomen und Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt (blau).

der Antikörper spezifische Signale an den Chromosomenenden generiert und somit zum Nachweis von Muntjak-spezifischem TRF2 geeignet ist (Abb. 15A+D). Nach Anfärben der transfizierten Zellen mit dem Anti-TRF2 Antikörper zeigte sich eine deutliche Kolokalisation der GFP-Signale und der TRF2-spezifischen Signale (Abb. 15B+E). Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl von Chromosomenenden, männliche *MMV*-Zellen haben 14 und *MRE*-Zellen haben 92 Telomere, weisen *MMV*-Zellkerne nur wenige GFP-TRF2-Signale auf, wohingegen *MRE*-Zellkerne zahlreiche Signale aufweisen. Des weiteren sollte ein trunkiertes TRF2-GFP-Protein, bei dem die für die DNA-Bindung verantwortliche Myb-Domäne fehlt, hergestellt werden und dessen Lokalisation untersucht werden. Hierzu wurde der gesamte *mre*TRF2-GFP-Vektor, außer der Myb-Domäne, in einer Long-Range PCR amplifiziert und anschließend wieder ligiert, ohne dabei den Leseraster zu verändern. Die Expression dieses *mre*TRF2<sup>ΔM</sup>-GFP-Vektors in *MMV*- und *MRE*-Fibroblasten resultierte in einem diffusen GFP-Signal, das den gesamten Zellkern ausfüllte (Abb. 15C+F). Immunfärbungen der transfizierten Zellen gegen TRF2 zeigten ebenfalls ein diffuses TRF2-Signal in den Kernen, das mit den *mre*TRF2<sup>ΔM</sup>-GFP-Signalen kolokalisierte. Darüber hinaus zeigten TRF1-Immunfärbungen von *MRE*-Zellen, die mit dem *mre*TRF2<sup>ΔM</sup>-GFP-Vektor transfiziert waren, das typische Punktemuster für ein Telomer-assoziiertes Protein (Abb. 15F3). Die Überexpression des *mre*TRF2<sup>ΔM</sup>-GFP-Vektors führt demnach zu keiner Dislokation von TRF1.

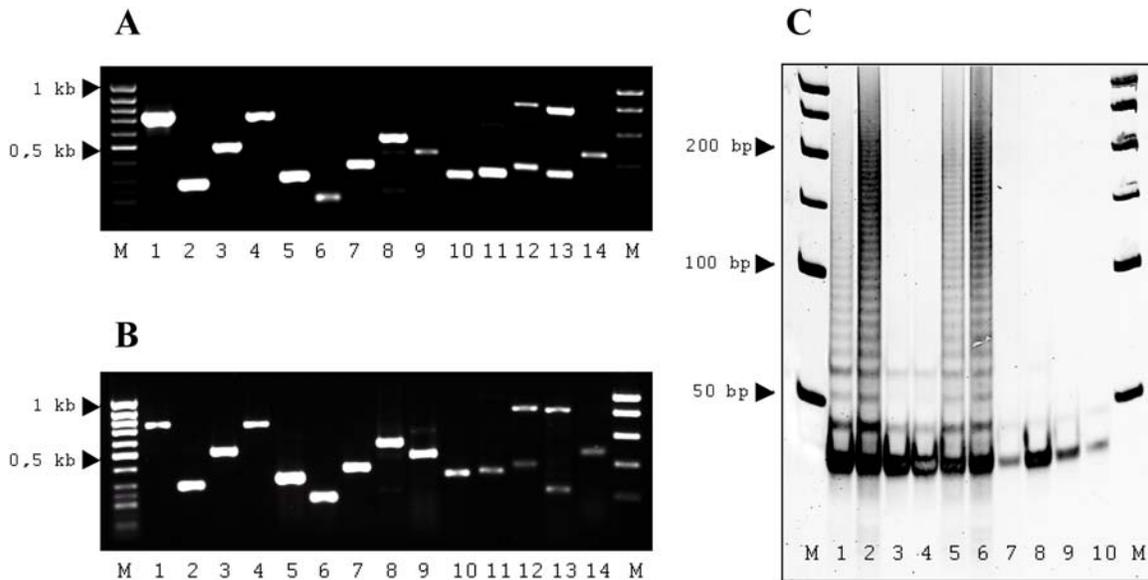
Diese Beobachtungen machen deutlich, dass auf der einen Seite die Myb-Domäne für die Lokalisation von TRF2 an die Telomere verantwortlich ist und dass auf der anderen Seite durch die Überexpression der trunkierten TRF2-Variante auch das

endogene TRF2 von den Telomeren entfernt wird. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen in humanen Zellen überein, nach denen TRF-Proteine nur als intakte Dimere an die Telomer-DNA binden können (van Steensel et al., 1998). Heterodimere, die aus der trunkierten TRF2-Variante (dominant-negativ) und der funktionsfähigen Variante bestehen, können daher nicht an die Telomere binden. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen außerdem, dass das klonierte *TERF2*-Gen des chinesischen Muntjaks ein funktionelles TRF2-Protein codiert, das an die Telomere in Muntjakzellen bindet.

### 3.13 Expression weiterer Telomer-relevanter Gene

Da die bisherigen Ergebnisse den Schluss nahe legen, dass sowohl der indische als auch der chinesische Muntjak vollständige und funktionelle TRF-Proteine besitzen, erscheint es fragwürdig, ob diese Proteine eine Rolle bei der Chromosomenevolution gespielt haben. Im Folgenden sollte daher die Expression von 15 weiteren Genen untersucht werden, die wichtig für die Telomerstabilität sind. Deshalb wurden folgende Gene untersucht: *ATM*, *H2AX*, *KU70*, *LIG4*, *MRE11*, *NBS1*, *P53*, *POT1*, *PRKDC*, *RAD50*, *RAP1*, *TERC*, *TERT*, *TIN2* und *TNKS2*. Um mögliche Muntjak-spezifische Besonderheiten in der Expression dieser Gene zu analysieren, wurden anhand von konservierten Bereichen für alle Gene PCR-Primer etabliert (siehe Oligonukleotide, 2.1.3), die in anschließenden RT-PCR-Experimenten mit RNA vom indischen und chinesischen Muntjak getestet wurden. Es zeigte sich, dass bis auf das *TERT*-Gen die Expression aller Kandidatengene in *MMV*-Fibroblasten und *MRE*-Hodengewebe

nachgewiesen werden konnte (Abb. 16). Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch Sequenzierung aller *MMV*-Produkte überprüft (GenBank-Nummern AY760063-76).



**Abb. 16:** Expressionsanalyse von 15 Telomer-assoziierten Genen mittels RT-PCR (A+B) und Analyse der Telomeraseaktivität mittels TRAP-Assay (C). Bis auf das *TERT*-Gen, das die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert, wurde die Expression aller untersuchten Gene sowohl in *MMV*-Fibroblasten (A) als auch in *MRE*-Hodengewebe (B) nachgewiesen. 1: *PRKDC*; 2: *KU70*; 3: *ATM*; 4: *P53*; 5: *H2AX*; 6: *MRE11*; 7: *RAD50*; 8: *NBS1*; 9: *POT1*; 10: *RAP1*; 11: *TERC*; 12: *TNKS2*; 13: *TIN2*; 14: *LIG4*; M: Marker. Die Gene *TNKS2* und *TIN2* sind durch zwei Spleißvarianten repräsentiert, die auch bei Mensch und Maus vorkommen. Die Spezifität der Produkte wurde zum einen durch Größenvergleich mit den homologen Sequenzen von Mensch und Maus und zum anderen durch Sequenzierung aller *MMV*-Produkte bestätigt. (C) Die Analyse mittels TRAP-Assay weist Telomeraseaktivität in humanem und *MRE*-Hodengewebe sowie in HeLa-Zellen nach. Keine signifikante Telomeraseaktivität konnte in *MMV*- und *MRE*-Fibroblasten sowie in verschiedenen Kontrollen nachgewiesen werden. 1: Hoden (*MRE*), 2: Hoden (human), 3: Fibroblasten (*MMV*) 4: Fibroblasten (*MRE*), 5 + 6: HeLa-Zellen (Positivkontrollen), 7-10: Negativkontrollen (erhitzter HeLa-Zellextrakt, mit RNase-behandelter HeLa-Zellextrakt, Lysepuffer und H<sub>2</sub>O), M: Marker.

**Tabelle 3:** Liste von Telomer-relevanten Genen und Sequenzvergleiche zwischen indischem Muntjak, Mensch und Maus

Gen-name	GenBank-Nummer	<i>MMV</i> Sequenzlänge in bp	Grad an Übereinstimmung zwischen <i>MMV</i> und humanen Gensequenzen	Grad an Übereinstimmung zwischen <i>MMV</i> und Maus Gensequenzen	Grad an Übereinstimmung zwischen Maus und humanen Gensequenzen
<i>ATM</i>	AY760063	494	93 %	88 %	88 %
<i>H2AX</i>	AY760064	300	94 %	92 %	93 %
<i>KU70</i>	AY760065	278	87 %	85 %	85 %
<i>LIG4</i>	AY760066	457	80 %	79 %	84 %
<i>MRE11</i>	AY760067	105	96 %	93 %	95 %
<i>NBS1</i>	AY760068	504	87 %	82 %	83 %
<i>P53</i>	AY760069	651	86 %	82 %	83 %
<i>POT1</i>	AY760070	364	92 %	79 %	80 %
<i>PRKDC</i>	AY760071	668	77 %	75 %	83 %
<i>RAD50</i>	AY760072	371	90 %	87 %	89 %
<i>RAP1</i>	AY760073	290	90 %	80 %	85 %
<i>TERC</i>	AY760074	321	87 %	72 %	73 %
<i>TIN2</i>	AY760075	340	88 %	83 %	84 %
<i>TNKS2</i>	AY760076	370	68 %	72 %	87 %

Partielle cDNA-Sequenzen von 14 verschiedenen Genen wurden mittels RT-PCR aus Fibroblasten des indischem Muntjaks isoliert und sequenziert. Der Grad an Übereinstimmung in Prozent bezieht sich auf die *MMV*-Sequenzen und die entsprechenden Genabschnitte von Mensch und Maus. Es gilt noch anzumerken, dass die genannten Prozentzahlen wahrscheinlich höher sind als bei Vergleichen der vollständigen Gensequenzen, da Primer vorzugsweise innerhalb konservierter Regionen ausgewählt wurden.

Darüber hinaus offenbarten ClustalW-Vergleiche zwischen den homologen Genabschnitten von *MMV*, Mensch und Maus einen relativ hohen Grad an Sequenzhomologie (Tab. 3). Die höchste ermittelte Übereinstimmung, nämlich 96%,

zeigte die untersuchte Sequenz des *MRE11*-Gens zwischen *MMV* und Mensch, während die *TNKS2*-Sequenz nur zu 68% zwischen *MMV* und Mensch übereinstimmte. Es gilt allerdings anzumerken, dass die ermittelten Werte nur für die untersuchten Genabschnitte gelten und dass die Übereinstimmung der gesamten Gensequenzen geringer sein dürften, da durch die Wahl der Primer konservierte Regionen bevorzugt wurden. Insgesamt macht der Vergleich deutlich, dass die untersuchten Abschnitte dieser Telomer-relevanten Gene, bis auf die *TNKS2*-Sequenz, höhere Homologie zwischen *MMV* und Mensch als zwischen *MMV* und Maus zeigten (Tab. 3).

### **3.14 Testisgewebe vom chinesischen Muntjak zeigt Telomeraseaktivität**

Da das *TERC*-Gen, das die RNA-Untereinheit der Telomerase kodiert, in *MMV*- und *MRE*-RNA nachgewiesen wurde, war erwartet worden, dass auch das *TERT*-Gen, das die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert, in Muntjakzellen exprimiert wird. Das *TERT*-Gen ließ sich jedoch, trotz mehrfacher Versuche mit insgesamt zehn verschiedenen Primerkombinationen, die alle anhand von konservierten Genabschnitten ausgewählt worden waren, weder in RNA aus *MMV*-Fibroblasten noch in RNA aus *MRE*-Hodengewebe nachweisen. Auch konnte das Gen nicht aus genomischer Muntjak-DNA isoliert werden, obwohl alle verwendeten Primerkombinationen bei humaner DNA zu *TERT*-spezifische PCR-Produkten führten. Daher galt es die Frage zu klären, ob das *TERT*-Gen in Muntjaks nicht vorhanden ist oder ob es verändert ist, da es mit konservierten Primern nicht mehr aufzuspüren war. Hierzu sollte die Aktivität der

Telomerase mit Hilfe des sogenannten TRAP-Assays nachgewiesen werden (Kim et al., 1994). Es wurden Proteinextrakte aus Muntjakfibroblasten, HeLa-Zellen sowie aus in Isopentan kryokonserviertem *MRE*- und humanem Hodengewebe gewonnen und auf mögliche Telomeraseaktivität getestet (siehe Bestimmung der Telomeraseaktivität, 2.2.3.1.3). In den untersuchten Muntjakfibroblasten konnte keine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden, was im Einklang mit Beobachtungen in humanen Fibroblasten steht (Masutomi et al., 2003). Dagegen ließ sich im *MRE*-Hodengewebe sowie in den verwendeten Positivkontrollen (humanes Hodengewebe und HeLa-Zellen) Telomeraseaktivität nachweisen (Abb. 16C). Das Ergebnis zeigt somit, dass die Telomerase in Muntjakgewebe vorkommt und der fehlende Nachweis des *TERT*-Gens mittels RT-PCR vermutlich die Folge von Unterschieden in der Gensequenz ist.

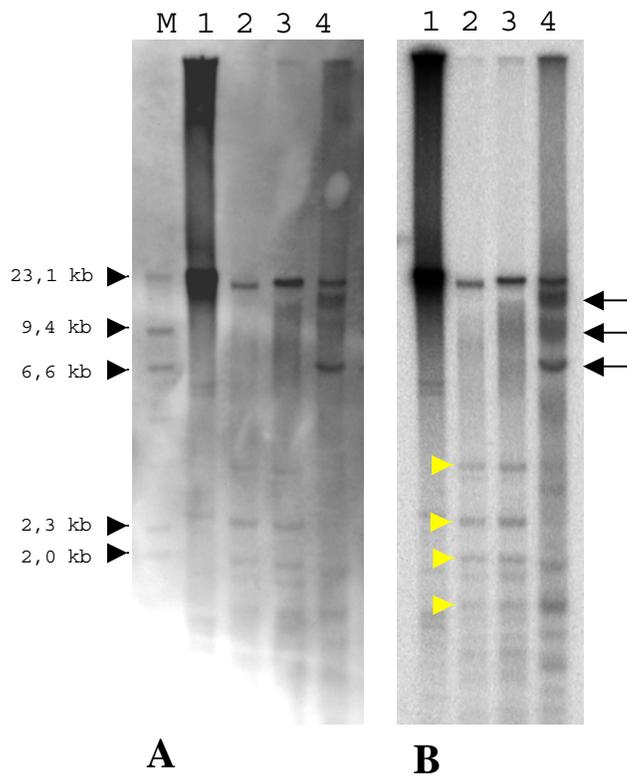
### 3.15 Bestimmung der Telomerlänge

Um die Untersuchungen der Telomere beim indischen Muntjak zu vervollständigen, sollte die Telomerlänge von den in dieser Arbeit untersuchten *MMV*-Zelllinien bestimmt werden. Aus früheren Untersuchungen von SV40-transformierten Zelllinien des indischen Muntjaks mittels Telomer-FISH war bekannt, dass manche Chromosomenenden, vor allem die der langen Chromosomenarme, schwache Telomersignale aufwiesen (H. Scherthan, persönliche Mitteilung). Um eine genauere Vorstellung über die Telomerlänge zu erhalten, wurde verdaute *MMV*-DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, mittels Southern Blot auf eine Nylonmembran übertragen, wo die Telomer-DNA nach Hybridisierung detektiert wurde (siehe 2.2.1.11).

Als Sonde diente zum einen eine Digoxigenin-markierte Telomersonde (siehe 2.2.2.5.3), die mit dem DIG Luminescent Detection Kit (Roche) nachgewiesen wurde, und zum anderen eine radioaktiv-markierte Telomersonde.

Der Vergleich der beiden Hybridisierungsergebnisse zeigte, dass beide Experimente das gleiche Hybridisierungsmuster ergaben (Abb. 17). So wurde die Telomerlänge der *MMV*-Fibroblasten (Scherthan, 1990) auf etwa 4-12 kb geschätzt, während die primären *MMV*-Fibroblasten (Zou et al., 2002) eine ungefähre Telomerlänge von 5-15 kb aufwiesen. Zusätzlich wurden in beiden *MMV*-Zelllinien Banden detektiert, die interstitielle Telomersequenzen darstellen, da die Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme auch zu unterschiedlichen Bandenmustern führte (Daten nicht gezeigt). Dagegen detektierten die Southern-Hybridisierungen mit TTAGGG bei den ebenfalls untersuchten SV40-transformierten *MMV*-Fibroblasten (Lee et al., 1994) ein ganz anderes Bandenmuster. Dies könnte auf Telomersequenzveränderungen an interstitiellen oder terminalen Loci zurückzuführen sein, die im Zuge der Transformation mit SV40 aufgetreten sind (Ducray et al., 1999).

Diese vorläufigen Ergebnisse zeigen, dass die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten *MMV*-Fibroblasten (Scherthan, 1990) eine Telomerlänge von mehreren Kilobasen besitzen und somit funktionsfähige Telomerkomplexe bilden können. Zusammen mit den anderen Telomeruntersuchungen sprechen alle Ergebnisse dafür, dass beide Muntjakspezies intakte Telomere besitzen.



**Abb. 17:** Bestimmung der Telomerlänge von drei verschiedenen *MMV*-Zelllinien und einer HeLa-Zelllinie mittels Southern Blot. Hierzu wurde genomische DNA aus den Zellen isoliert, die DNA mit den Restriktionsenzymen MboI und MspI verdaut und auf einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt. Telomer-DNA wurde mit einer Digoxigenin-markierten Telomersonde (**A**) und einer radioaktiv-markierten Telomersonde (**B**) nachgewiesen. Die Telomerlänge der *MMV*-Fibroblasten (Scherthan, 1990) wurde auf ca. 4-12 kb (Spur 2) und die Telomerlänge der primären *MMV*-Fibroblasten (Zou et al., 2002) auf ca. 5-15 kb (Spur 3) geschätzt. Die SV40-transformierten *MMV*-Zellen (Lee et al., 1994) zeigten distinkte Banden (schwarze Pfeile), die durch Telomerveränderungen nach der SV40-Transformation entstanden sein können (Spur 4). Die in allen *MMV*-Zellen detektierten Banden (gelbe Pfeile) repräsentieren vermutlich interstitielle Telomersequenzen, da die Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme zu unterschiedlichen Bandenmuster führte (nicht gezeigt). Als Positivkontrolle dienten HeLa-Zellen mit verlängerten Telomeren (Spur 1). M: Dig-markierter Marker (Lambda/HindIII) 1: HeLa-Zellen mit langen Telomeren (Positivkontrolle), 2: Fibroblasten (*MMV*), 3: Primäre Fibroblasten (*MMV*), 4: SV40-transformierte Fibroblasten (*MMV*).

## 4 Diskussion

### 4.1 Chromosomenumbauten im Laufe der Evolution

Die Evolution von Chromosomen ist gekennzeichnet durch Veränderungen wie Modifikation, Anreicherung, Verlust und Umbau des genetischen Materials. Es ist daher für das Verständnis der Evolution von entscheidender Bedeutung, welche Kräfte und Mechanismen das eukaryotische Genom beeinflusst und geformt haben (Eichler und Sankoff, 2003). Um Antworten auf diese Fragen zu finden, werden seit langem Chromosomen, und neuerdings auch die DNA-Sequenzen ganzer Genome, zwischen nah- und fernverwandten Arten verglichen. Durch detaillierte Chromosomenvergleiche, wie z. B. mittels genetischer Kartierung und *in situ* Methoden, ließ sich zeigen, dass eine Vielzahl von Chromosomenabschnitten (Segmente) zwischen verschiedenen Säugetieren konserviert ist (Scherthan et al., 1994; Hayes, 1995; Rettenberger et al., 1995; O'Brien et al., 1999; Chowdhary und Raudsepp, 2001). Die Grenzen zwischen den konservierten Chromosomensegmenten sind dabei von besonderem Interesse, weil hier Brüche in der DNA und anschließende Fusionen stattgefunden haben müssen. Daher spielen insbesondere die Analyse und der Vergleich der DNA-Sequenzen, die diesen Bruch- und Fusionspunkten zugrunde liegen, eine Rolle für das molekulare Verständnis solcher Chromosomenumbauten (Eichler und Sankoff, 2003).

Mit der Verfügbarkeit der kompletten DNA-Sequenz des humanen Genoms (Lander et al., 2001) und der Genomsequenzen von weiteren Säugetieren wie Maus

(Waterston et al., 2002), Ratte (Gibbs et al., 2004), Schimpanse (<http://www.genome.ucsc.edu>, November 2003), Hund (<http://www.genome.ucsc.edu>, Juli 2004) und Rind (<http://www.genome.ucsc.edu>, September 2004) ist eine umfassende vergleichende Analyse der DNA-Sequenzen, die zwischen konservierten Segmenten lokalisiert sind, möglich geworden. So konnten Vergleiche zwischen den Genomsequenzen von Mensch und Maus zeigen, dass Chromosomenumbauten, wie z. B. Brüche und anschließende Fusionen, keinesfalls zufällig verteilt im Genom stattfinden, wie von Nadeau und Taylor (1984) vorausgesagt, sondern in bestimmten Regionen gehäuft auftreten (Pevzner und Tesler, 2003; Bailey et al., 2004). Pevzner und Tesler (2003) stellen daher dem herkömmlichen „Random Breakage Model“ der Chromosomenevolution ein neues sogenanntes „Fragile Breakage Model“ gegenüber, das von einer „Wiederverwendung“ der ancestralen Bruchpunkte in Laufe der Evolution ausgeht. Diese als Hotspots der Chromosomenevolution bezeichneten Regionen befinden sich an der Grenze zwischen konservierten Chromosomensegmenten und korrelieren mit dem gehäuften Auftreten von Duplikationen und repetitiven Sequenzen (Bailey et al., 2003; Bailey et al., 2004).

## **4.2 Die Rolle von repetitiven DNA-Sequenzen bei Chromosomenumbauten**

Laut Wichman et al. (1991) sind repetitive Sequenzen in besonderem Maße für chromosomale Umstrukturierungen prädestiniert, da durch Veränderungen in repetitiven

Regionen, im Gegensatz zu anderen Orten im Genom, kein Funktionsverlust von Genen erfolgen kann. Ferner würden repetitive Sequenzen die Chromosomenevolution, wie zum Beispiel bei den Equiden (Pferdeartigen), geradezu antreiben. Ein gut untersuchtes Beispiel für die Beteiligung von repetitiver Satelliten-DNA an Chromosomenfusionen stellt die Hausmaus dar. Hier konnte gezeigt werden, dass die in manchen Subpopulationen zahlreich auftretenden Robertson'schen Fusionen sehr wahrscheinlich durch illegitime Rekombination zwischen den Satelliten-DNAs zweier akrozentrischer Chromosomen erfolgen (Garagna et al., 2001; Capanna und Castiglia, 2004).

Ein anderes Beispiel stellt der indische Muntjak dar, bei dem die Hybridisierung von centromerischer Satelliten-DNA des chinesischen Muntjaks (C5-Sonde) bis zu 27 interstitielle Satelliten-Loci markierte (Lin et al., 1991). Diese Loci im indischen Muntjakgenom kolokalisieren außerdem mit den konservierten Grenzen homologer Segmente, die in Zoo-FISH-Studien angefärbt wurden (Fronicke und Scherthan, 1997; Yang et al., 1997b), was auf eine Beteiligung dieser Sequenzen an den Chromosomenfusionen des indischen Muntjaks hinweist.

Des Weiteren gibt es zahlreiche Beispiele für interstitielle repetitive  $(T_2AG_3)_n$ -Sequenzen, die als molekulare Relikte von ancestralen Telomerfusionen gelten. So wurden interstitielle Telomersequenzen in so unterschiedlichen Vertebraten wie im Menschen (Azzalin et al., 2001), in Makakenaffen (Ruiz-Herrera et al., 2002), in Lemuren (Go et al., 2000), in Equiden (Lear, 2001; Santani et al., 2002), in Schweinen (de la Sena et al., 1995), in Mäusen (Yen et al., 1997), in Waldlemmingen (Liu und Fredga, 1999), in Hamsterartigen (Fagundes et al., 1997), in Giraffenartigen (Vermeesch et al., 1996), in Wallabies (Mittelkängurus) der Gattung *Petrogale* (Metcalf et al., 2002),

in verschiedenen Vogelarten (Nanda et al., 2002) und in Haien (Selachier) (Rocco et al., 2001) nachgewiesen. Das molekular am besten charakterisierte Beispiel stellen die interstitiellen Telomersequenzen des humanen Chromosoms 2q13 dar (Ijdo et al., 1991). An diesem ancestralen Telomer-Telomerfusionspunkt sind nicht nur die Telomersequenzen, sondern auch subtelomerische DNA-Sequenzen in entgegengesetzter Orientierung angeordnet, die somit die Herkunft von den beiden früheren Einzelchromosomen noch deutlich erkennen lassen. Allerdings gibt es auch Vermutungen, dass nicht alle interstitielle Telomersequenzen im humanen Genom das Ergebnis von Chromosomenfusionen sind (Azzalin et al., 2001).

Ein anderer Aspekt von interstitiellen Telomersequenzen ist deren gehäuftes Vorkommen in Chromosomenregionen, die besonders anfällig für Chromosomenbrüche sind. Ruiz-Herrera et al. (2005) konnten bei verschiedenen Primaten zeigen, dass Aphidicolin-induzierte Bruchpunkte (Fragile Sites) mit interstitiellen Telomersequenzen kolokalisieren.

### **4.3 Telomer- und Satellitensequenzen im indischen Muntjakgenom**

Auch im indischen Muntjak wurden interstitielle  $(T_2AG_3)_n$ -Telomersequenzen gefunden, die als Relikte von Chromosomenfusionen angesehen werden (Lee et al., 1993; Scherthan, 1995; Zou et al., 2002). Außerdem konnten Zou et al. (2002) spontane

Chromosomenbrüche in indischen Muntjakfibroblasten beobachten, wobei ein Drittel dieser „Fragile Sites“ mit interstitiellen Telomer-Loci kolokalisierte.

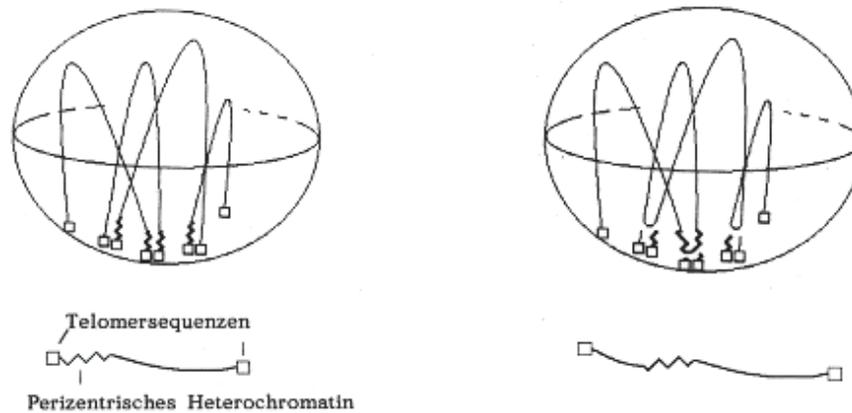
Um die Orientierung und Anordnung von solchen interstitiellen repetitiven DNA-Sequenzen im indischen Muntjak zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene PCR-Strategien verfolgt. Dabei führte die Verwendung von jeweils einem einzelnen Telomerprimer und genomischer indischer Muntjak-DNA zu keinen PCR-Produkten (Abb. 6). Das weist darauf hin, dass im indischen Muntjakgenom keine Telomersequenzen mit entgegengesetzter Orientierung („Head-to-Head“) angeordnet sind, so wie es nach einer Telomer-Telomerfusion zu erwarten wäre (Ijdo et al., 1991). Die Verwendung von einzelnen muntjakspezifischen Satellitenprimern führte zu einem einzigen PCR-Produkt (Abb. 6), was darauf hinweist, dass Satellitensequenzen in entgegengesetzter Orientierung vorliegen. Dies kann z. B. im langen Centromer des X-Chromosoms vom indischen Muntjak der Fall sein, das aus Satelliten-DNA I besteht und das bei einer Robertson'schen Fusion zwischen dem ursprünglichen X-Chromosom und einem autosomalen Chromosom entstanden ist (Bogenberger et al., 1987).

Der überwiegende Teil aller Chromosomenfusionen, die zum rezenten Karyotyp des indischen Muntjaks geführt haben, sind jedoch Tandemfusionen (Hsu et al., 1975; Shi et al., 1980). Die Theorie der multiplen Tandemfusionen wird durch Vergleiche der G-Bänderung (Shi et al., 1980), DNA-Reassoziierungsexperimente (Johnston et al., 1982) und verschiedene Zoo-FISH-Studien (Yang et al., 1995; Fronicke und Scherthan, 1997; Yang et al., 1997a; Yang et al., 1997b) unterstützt. Bei der Tandemfusion gehen der Fusion Brüche am distalen Ende des einen Chromosoms und im Centromerbereich des anderen Chromosoms voraus (Brinkley et al., 1984; Elder und Hsu, 1988). Die Fusion

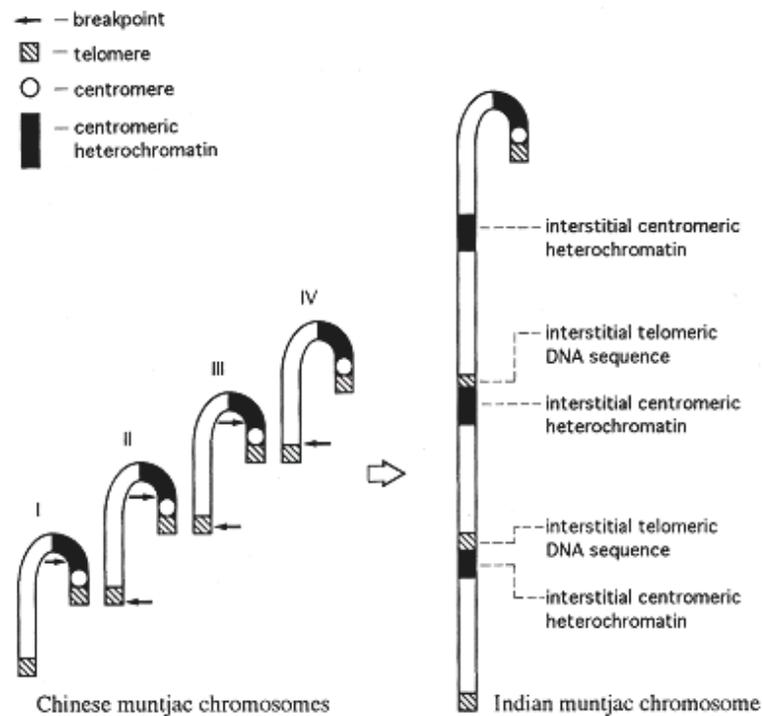
kann dann durch illegitime Rekombination zwischen repetitiven Telomersequenzen des distalen Endes und Satellitensequenzen des Centromers erfolgen. Diese Tandemfusionen haben vermutlich während des Bouquetstadiums der Meiose stattgefunden, bei dem es zu einer lokalen Konzentration von telomerischen und centromerischen Sequenzen kommt (siehe Abb. 18; Scherthan, 1990).

Um diese Theorie erstmalig auf der molekularen DNA-Ebene zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine direkte Nachbarschaft zwischen interstitiellen Telomer- und Satellitensequenzen untersucht. Hierzu wurden PCR-Ansätze mit verschiedenen Kombinationen aus jeweils einem Telomer- und einem Satellitenprimer durchgeführt. Dabei ergaben sich bei der Verwendung von indischer Muntjak-DNA insgesamt sechs spezifische PCR-Produkte (Abb. 6). Die Kombination aus einem Satellitenprimer und dem C-reichen Telomerprimer führte zu PCR-Produkten, deren Sequenzen eine große Ähnlichkeit zu repetitiven Rindersequenzen aufweisen (Tab. 1). FISH-Untersuchungen mit diesen PCR-Produkten zeigten, dass die Sequenzen über das gesamte Euchromatin des indischen Muntjaks verteilt sind (Abb. 8B). Die Verbreitung dieser Sequenzen könnte daher mittels Transposition, ähnlich der Verbreitung von SINEs, LINEs (Short bzw. Long Interspersed Nuclear Elements) oder anderen mobilen genetischen Elementen, erfolgt sein (Jurka et al., 2003). Dagegen zeigten vor allem die PCR-Produkte, die mit dem G-reichen Telomerprimer und einem Satellitenprimer isoliert wurden, eine hohe Übereinstimmung zu der Satelliten-DNA I der Cerviden (Tab. 1). Die Sequenzanalyse der Produkte zeigte außerdem, dass hier Telomersequenzen direkt mit Satellitensequenzen verbunden sind. Mit diesen PCR-Produkten wurden distinkte, inter-

**A**



**B**



**Abb. 18:** Modell zur Entstehung der indischen Muntjakchromosomen durch multiple Tandemfusionen ([**A**] nach Scherthan, 1989 und [**B**] nach Lee et al., 1993). Die Chromosomenfusion erfolgt während der räumlichen Konzentration von telomerischen und centromerischen Sequenzen im Bouquetstadium der Meiose durch illegitime Rekombination (**A**). Je nach Position der Bruchpunkte variiert der Anteil an interstitiellen Telomer- und Satellitensequenzen im späteren fusionierten Chromosom (**B**).

stitielle Loci innerhalb der indischen Muntjakchromosomen mittels FISH detektiert (Abb. 8). Dabei entsprach das Hybridisierungsmuster weitgehend dem Ergebnis früherer FISH-Untersuchungen mit der C5-Sonde (Lin et al., 1991), die mit den Grenzen konservierter syntenischer Segmente und damit den ancestralen Bruch- und Fusionpunkten kolokalisierte (Fronicke und Scherthan, 1997; Yang et al., 1997b). Durch weitere Zweifarben FISH-Experimente mit dem hauptsächlich aus Satelliten-DNA I bestehenden PCR-Produkt TGS400 und einer TTAGGG-Sonde wurde eine Kolokalisation von Satelliten- und Telomersequenzen an diesen interstitiellen Loci gezeigt (Abb. 9). Darüber hinaus konnte eine solche Kolokalisation auch auf ausgestreckten Chromatinfasern des indischen Muntjaks nachgewiesen werden (Fiber-FISH). Die Auflösungsgrenze einer Fiber-FISH ist dabei mit etwa 1 kb deutlich besser als die Auflösung einer Chromosomen-FISH (Florijn et al., 1995).

Die gleiche PCR-Strategie mit verschiedenen Primerkombinationen wurde auch mit DNA des chinesischen Muntjaks durchgeführt (Abb. 6D). Die Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte ergab keine Hinweise auf Ähnlichkeiten zu schon bekannten DNA-Sequenzen oder auf eine direkte Verbindung zwischen Telomer- und Satellitensequenzen im chinesischen Muntjakgenom.

Kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass die Satelliten-DNA II mit einigen der interstitiellen Loci der Satelliten-DNA I im indischen Muntjakgenom kolokalisiert (Li et al., 2000b; Li et al., 2000c). Daher schlugen Li et al. (2000c) die Anordnung Satelliten-DNA I – Satelliten-DNA II – Telomer-DNA für die ursprünglichen akrocentrischen Muntjakchromosomen vor und folgerten daraus, dass die Tandemfusionen des indischen Muntjaks auch nach Brüchen in der Satelliten-DNA II und der Telomer-DNA erfolgt sein

könnten. Um die Hypothese von Li et al. (2000c) zu testen, wurden verschiedene PCR-Ansätze mit Kombinationen aus jeweils einem Telomer- und einem Satelliten-DNA II-Primer durchgeführt (Abb. 6C). Alle erhaltenen PCR-Produkte zeigten keine direkte Verbindung zwischen Telomer- und Satelliten-DNA II, was eine Beteiligung der Satelliten-DNA II an den Tandemfusionen unwahrscheinlich erscheinen lässt. Das Fehlen der mit den Centromeren assoziierten Satelliten-DNA II (Vafa et al., 1999) könnte allerdings auch die Folge der Inaktivierung von einem der beiden Centromere nach einer Chromosomenfusion sein.

Die Ergebnisse zeigen, dass die direkte Verbindung von Telomer-DNA und Satelliten-DNA I, wie sie mittels PCR nachgewiesen wurde, für den indischen Muntjak spezifisch ist und somit als Relikt von ancestralen Tandemfusionen angesehen werden kann. Die Ergebnisse untermauern ferner die Vorstellung, dass der Mechanismus der multiplen Tandemfusionen, die zum rezenten Karyotyp des indischen Muntjaks geführt haben, die illegitime Rekombination zwischen Telomer-DNA und centromerischer Satelliten-DNA I ist (Scherthan, 1995).

#### **4.4 Die Telomere schützen vor Chromosomenfusionen**

Die Telomere stellen spezielle Nukleoproteinstrukturen dar, die aus einem Doppelstrang repetitiver  $(T_2AG_3)_n$ -Wiederholungen, einem einzelsträngigen 3'-Überhang und zahlreichen assoziierten Proteinen bestehen. Sie schützen die Chromosomenenden vor der Erkennung als Doppelstrangbrüche, vor dem Abbau durch Nukleasen, vor

illegitimer Rekombination und vor chromosomalen Fusionen (Blackburn, 2001). Dabei sind verschiedene Faktoren für die Stabilität der Telomere verantwortlich und Veränderungen dieser Faktoren können zu Chromosomenfusionen führen (de Lange, 2002; Karlseder, 2003; Cech, 2004). So spielt zum Beispiel eine ausreichende Telomerlänge, die Verlängerung der Telomere durch Telomerase und das Vorhandensein weiterer assoziierter Proteine eine ganz entscheidende Rolle für den Erhalt der Telomere (McEachern et al., 2000; Ferreira et al., 2004). Von den assoziierten Proteinen kommt den beiden TRF-Proteinen eine besondere Bedeutung für den Schutz der Telomere und die Regulation der Telomerlänge zu, da sie direkt an doppelsträngige Telomer-DNA binden. Außerdem werden durch sie viele weitere Telomer-assoziierte Faktoren rekrutiert, wie z. B. Tankyrase 2 (TNKS2), TIN2, POT1 und RAP1 (Smogorzewska und de Lange, 2004). In jüngster Zeit wurden auch immer mehr Telomer-assoziierte Proteine identifiziert, die ursprünglich als Reparaturfaktoren von DNA-Schäden, vor allem im Zusammenhang mit der Erkennung und Reparatur von Doppelstrangbrüchen, beschrieben wurden (d'Adda di Fagagna et al., 2004). Hierzu zählen unter anderem der MRE11/RAD50/NBS1-Komplex (Zhu et al., 2000), die DNA-abhängige Proteinkinase (PRKDC und KU70/80) (Song et al., 2000) und die ATM-Kinase (Karlseder et al., 2004). Inzwischen wurde auch für TRF2 gezeigt, dass es nach kürzester Zeit (zwei Sekunden) an Laser-induzierten Doppelstrangbrüchen auftritt und damit noch schneller an induzierten Doppelstrangbrüchen erscheint, als alle anderen bisher mit Doppelstrangbrüchen assoziierte Proteine wie ATM, NBS1 oder phosphoryliertes H2AX (Bradshaw et al., 2005). Daher wird ein engerer Zusammenhang als bisher vermutet zwischen Telomer-assoziierten Proteinen und an der Erkennung und Reparatur von DNA-

Doppelstrangbrüchen beteiligten Proteinen angenommen. Wright und Shay (2005) vermuten sogar, dass einige ursprünglich generelle DNA-Reparaturfaktoren im Lauf der Evolution Telomer-spezifische Funktionen übernommen haben, aber ihre Beteiligung an der DNA-Reparatur nie ganz aufgegeben haben.

#### **4.5 Expression Telomer-assoziiierter Gene**

Um mögliche molekulare Mechanismen für das gehäufte Auftreten von Chromosomenfusionen in der Evolution des indischen Muntjaks zu untersuchen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Telomere vom indischen und chinesischen Muntjak genauer untersucht. Hierzu wurde zunächst die Expression von 17 Genen in Fibroblasten vom indischen Muntjak und im Hodengewebe des chinesischen Muntjaks mittels RT-PCR überprüft. Die untersuchten Gene kodieren dabei für die folgenden Proteine: TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2, Tankyrase 2 (TNKS2), Telomerase (TERC und TERT), die ATM-Kinase, das Histon H2AX, die DNA-abhängige Proteinkinase (PRKDC und KU70/80), der MRN-Komplex (MRE11, RAD50 und NBS1), die DNA-Ligase IV (LIG4) und das Tumorsuppressorprotein p53.

Bis auf das *TERT*-Gen, das für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert, wurden alle untersuchten Gene sowohl in Fibroblasten vom indischen Muntjak als auch im Hodengewebe des chinesischen Muntjaks exprimiert (Abb. 16A+B). Der Sequenzvergleich der entsprechenden genspezifischen PCR-Produkte ergab eine hohe Übereinstimmung zwischen indischem Muntjak und Mensch und eine ebenfalls hohe,

wenn auch etwas geringere Übereinstimmung zwischen indischem Muntjak und Maus (Tab. 3). Die hier nachgewiesene Expression der untersuchten Gene deutet daher mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf hin, dass auch die entsprechenden Proteine in beiden Muntjakspezies vorhanden sind.

Von den beiden Telomerase-Genen wurde nur die Expression des *TERC*-Gens in beiden Muntjaks nachgewiesen, während das *TERT*-Gen trotz verschiedener Primerkombinationen nicht amplifiziert werden konnte. Allerdings konnte mit Hilfe eines TRAP-Assays aktive Telomerase im Hodengewebe des chinesischen Muntjaks nachgewiesen werden (Abb. 16C). Da somit das *TERT*-Gen in diesem Gewebe exprimiert sein sollte, könnte der Grund für den fehlenden Nachweis des Gens mittels RT-PCR eine im Vergleich zu anderen Säugern stark abweichende Nukleotidsequenz sein. Bemerkenswerterweise gilt gerade die katalytische Untereinheit der Telomerase als phylogenetisch sehr konserviert, wie Vergleiche zwischen so entfernt verwandten Organismen wie Mensch und Spaltheefe (*Schizosaccharomyces pombe*) nahelegen (Nakamura et al., 1997). Andererseits scheint die *TERT*-Untereinheit jedoch innerhalb der Säuger nicht sehr konserviert zu sein, wenn man eine Übereinstimmung von 64% zwischen Mensch und Maus berücksichtigt (Greenberg et al., 1998). Aus diesem Grund wäre es interessant, die orthologe Sequenz im Muntjak zu bestimmen und mögliche Unterschiede zu anderen Säugern bezüglich der Telomerase zu analysieren.

## 4.6 Die *TERF*-Gene der Muntjaks

Von entscheidender Bedeutung für den Schutz der Telomere und die Regulation der Telomerlänge sind die beiden Proteine TRF1 und TRF2 (Smogorzewska und de Lange, 2004). Besonders der Verlust von TRF2 führt zu einer drastischen Zunahme von Fusionen zwischen den Chromosomenenden (siehe Einleitung 1.5 und van Steensel et al., 1998). Ferner werden beiden Proteinen noch weitere essentielle Funktionen zugesprochen. So wurden zum Beispiel, im Gegensatz zu anderen Telomer-assoziierten Proteinen, keine Krankheiten beim Menschen identifiziert, die auf einem Funktionsverlust oder einer Mutation der beiden *TERF*-Gene beruhen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>, April 2005). Des Weiteren schlug die Herstellung von Knock-Out Mäusen fehl, da homozygote *Terf1*<sup>-/-</sup> Mäuse bereits als Embryonen, d. h. 5-6 Tage nach der Befruchtung, starben (Karlseder et al., 2003). Da in den abgestorbenen Embryonen keine Verkürzung der Telomere und keine Fusionen der Chromosomenenden zu beobachten waren, vermuten die Autoren zusätzliche Funktionen für TRF1 in der frühen Entwicklung (Karlseder et al., 2003).

Um die TRF-Proteine in Muntjaks zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst das *TERF1*- und *TERF2*-Gen aus dem indischen und chinesischen Muntjak isoliert und charakterisiert. Es zeigte sich, dass die vollständige cDNA-Sequenz von *TERF1* eine Länge von 2374 bp im indischen Muntjak (GenBank-Nummer AY606018) und eine Länge von 2354 bp im chinesischen Muntjak (AY606022) besitzt. Diese Längen sind vergleichbar mit der humanen *TERF1*-Sequenz von 2686 bp

(GenBank-Nummer NM\_017489; Chong et al., 1995), aber länger als die *TERF1*-Sequenz (1679 bp) der Maus (NM\_009352; Broccoli et al., 1997a).

Beim *TERF2*-Gen verhinderte eine sehr GC-reiche Region im 5'-Bereich der cDNA die vollständige Isolation des Gens, so dass die hier beschriebenen *TERF2*-Sequenzen mit dem ersten ATG-Codon (Startcodon) des offenen Leserasters beginnen. Die Länge der *TERF2*-Sequenz beträgt 2527 bp im indischen Muntjak (AY606026) und 2425 bp im chinesischen Muntjak (AY606028). Der hohe GC-Gehalt im 5'-Bereich stimmt mit der Untersuchung der *TERF2*-Sequenz des Huhns (*Gallus gallus*) überein (Konrad et al., 1999).

#### **4.7 Expression und Spleißvarianten von *TERF1* und –2**

Die Expressionsanalyse der *TERF*-Gene mittels Northern Blot und RT-PCR zeigte, dass diese ubiquitär, d. h. in unterschiedlichen Muntjakzelllinien und in verschiedenen Geweben eines zweijährigen chinesischen Muntjaks aus dem Berliner Zoo, exprimiert wurden (Abb. 11). Besonders hoch war die Expression beider Gene im Hodengewebe des chinesischen Muntjaks, was im Einklang mit früheren Expressionsuntersuchungen der *TERF*-Gene in Mensch und Maus steht (Broccoli et al., 1997b). Zusätzlich deckte die Expressionsanalyse vier Spleißvarianten des *TERF1*-Gens und zwei Varianten des *TERF2*-Gens auf (Abb. 11). Während die Variante #2 von *TERF1* einen offenen Leseraster besitzt und schon im Menschen beschrieben wurde

(Shen et al., 1997) sind die Varianten #3 und #4 von *TERF1* und #2 von *TERF2* durch eine Leserasterverschiebung und ein vorzeitiges Stopcodon gekennzeichnet.

Interessanterweise wurden diese Spleißvarianten nicht nur in beiden Muntjakspezies, sondern auch bei Mensch und Maus gefunden. Solche konservierten Spleißvarianten mit einem vorzeitigen Stopcodon wurden schon in anderen Säugergenen entdeckt und es wird vermutet, dass sie bei der posttranskriptionellen Regulation des betreffenden Gens eine Rolle spielen (Lamba et al., 2003; Lareau et al., 2004). Diese Vorstellung wird durch eine Studie von humanen Genen unterstützt, die zeigen konnte, dass ein Drittel aller untersuchten Spleißvarianten ein vorzeitiges Stopcodon besitzen und dass einige dieser Spleißvarianten die Expression des betreffenden Gens beeinflussen (Lewis et al., 2003). Hierbei spielt vermutlich der NMD-Mechanismus („Nonsense-Mediated mRNA Decay“) eine Rolle, mit dessen Hilfe Spleißvarianten mit einem vorzeitigen Stopcodon erkannt werden (Hentze und Kulozik, 1999).

Außerdem sind seit kurzem weitere Spleißvarianten des *TERF1*-Gens bekannt. So beschrieben Lages et al. (2004) die Existenz einer humanen Spleißvariante von *TERF1* mit einer Insertion von 76 Nukleotiden, die ebenfalls eine Leserasterverschiebung und ein vorzeitiges Stopcodon aufweist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine neue humane *TERF1*-Spleißvariante mit einer Insertion von 90 Nukleotiden isoliert werden (Abb. 12E). Die Sequenzierung der Variante zeigte, dass sie einen vollständigen offenen Leseraster enthält und dass die zusätzlichen Nukleotide zwischen einer Exon-Intron-Genze eingefügt sind. Bemerkenswerterweise wurde die Spleißvariante nur im humanen Hodengewebe exprimiert und weder in anderen humanen Geweben noch im Hodengewebe von Maus bzw. chinesischem Muntjak detektiert. Da die Telomere

spezielle Funktionen in der Prophase der Meiose I annehmen (Scherthan, 2001; Bekaert et al., 2004), könnte diese Spleißvariante eine Rolle bei der menschlichen Spermatogenese spielen.

#### **4.8 Die *TERF*-Gene kartieren in Regionen konservierter Syntenie**

Die Kartierung der *TERF*-Gene mittels FISH auf Metaphasechromosomen des indischen und chinesischen Muntjaks ergab, dass das *TERF1*-Gen auf *MMV*-Chromosom 1p32 und auf *MRE*-Chromosom 12q3, sowie das *TERF2*-Gen auf *MMV*-Chromosom 2q33 und *MRE*-Chromosom 2q33 lokalisiert sind (Abb. 13). Die Bestimmung der Gen-Loci erfolgte dabei anhand von etablierten Ideogrammen und wurde durch existierende Zoo-FISH-Karten bestätigt (Yang et al., 1995; Fronicke und Scherthan, 1997; Yang et al., 1997b). Darüber hinaus ergab die Amplifikation der Intronbereiche, dass die Positionen der Intron-Exon-Grenzen zwischen Mensch, Maus und beiden Muntjakspezies konserviert sind, die Länge der einzelnen Introns stimmte dagegen nur zwischen indischem und chinesischem Muntjak überein, nicht jedoch zwischen Muntjak, Mensch und Maus. Beim Vergleich der Gesamtgröße der Gen-Loci fiel auf, dass der *TERF1*-Locus mit einer Größe von etwa 33 kb in beiden Muntjakspezies, 38 kb im Menschen und 37 kb in der Maus sehr viel einheitlicher erscheint als der *TERF2*-Locus mit einer Größe von etwa 12 kb in beiden Muntjaks, 30 kb im Menschen und 26 kb in der Maus (<http://www.genome.ucsc.edu>, Mai 2004).

## 4.9 Die TRF-Proteine der Muntjaks sind hoch konserviert

Vergleiche der Aminosäuresequenzen ergaben, dass sowohl TRF1 als auch TRF2 zwischen indischem und chinesischem Muntjak sehr stark (98%) konserviert sind (Tab. 2), wie es für nah verwandte Arten zu erwarten ist, deren letzter gemeinsamer Vorfahre vor etwa 1,9 - 3,7 Millionen Jahren lebte (Wang und Lan, 2000). So ergaben zum Beispiel Vergleiche der Proteine TRF1 und TIN2 zwischen den beiden nah verwandten Mausspezies *Mus musculus* und *Mus spretus* ebenfalls eine Übereinstimmung von >95% (Kim et al., 2003). Die Übereinstimmung von TRF1 zwischen indischem Muntjak und Mensch betrug 81%, während die Übereinstimmung zwischen indischem Muntjak und Maus mit 63% deutlich geringer war (Tab. 2). Ein vergleichbarer Wert, nämlich 67%, wurde für die Übereinstimmung zwischen Mensch und Maus ermittelt (Broccoli et al., 1997a). Im Gegensatz dazu wies das TRF2-Protein insgesamt einen höheren Grad an Übereinstimmung auf. So betrug die Übereinstimmung von TRF2 zwischen indischem Muntjak und Mensch 90% und zwischen indischem Muntjak und Maus 80% (Tab. 2). Vergleiche mit anderen Vertebraten, wie z. B. mit dem Huhn bestätigen, dass TRF2 höher konserviert ist als TRF1 (Konrad et al., 1999).

Von den einzelnen Domänen der TRF-Proteine sind die Dimerisierungs- und DNA-Bindedomäne am stärksten konserviert (Abb. 14), was durch die Untersuchungen der TRF-Proteine von Mensch, Maus und Huhn bestätigt wird (Broccoli et al., 1997a; Konrad et al., 1999; Fairall et al., 2001). Die hier beschriebenen Sequenzen und Vergleiche bestätigen allerdings nicht die TRF1-Sequenz vom chinesischen Hamster

(Smilenov et al., 1998), die vermutlich humane Abschnitte enthält und daher überprüft werden sollte.

Eine weitere Auffälligkeit bei den Vergleichen ist, dass die Übereinstimmung zwischen Muntjak und Mensch in der Regel höher ist als zwischen Muntjak und Maus sowie zwischen Mensch und Maus. Diese Beobachtung wird von neueren phylogenetischen Stammbäumen der Säugetiere unterstützt. So beschreiben die Untersuchungen von Liu et al. (2001), die sowohl auf molekularen als auch auf morphologischen Merkmalen beruhen, eine engere phylogenetische Verwandtschaft zwischen der Gruppe der Artiodactyla (Paarhufer) und der Gruppe der Primaten (Herrentiere) als zwischen Artiodactyla und Rodentia (Nagetiere). Trotzdem ist der phylogenetische Stammbaum der verschiedenen Säugergruppen noch nicht endgültig geklärt und immer noch Gegenstand heftiger Diskussionen (Novacek, 2001).

#### **4.10 Muntjakzellen exprimieren funktionelles TRF2**

Nachdem die *in silico* Analyse der TRF-Sequenzen darauf schließen läßt, dass beide Muntjakspezies funktionelle TRF-Proteine besitzen, wurde die isolierte cDNA Sequenz des *TERF2*-Gens vom chinesischen Muntjak in einen GFP-Vektor kloniert und in Muntjakzellen exprimiert (Abb. 15). Auf diese Weise wurde auch *in vivo* nachgewiesen, dass TRF2 vom Muntjak (*mreTRF2*) an die  $(T_2AG_3)_n$ -Wiederholungen der Muntjaktelomere bindet. Hierfür ist die Myb-Domäne verantwortlich, da Überexpression von *mreTRF2<sup>ΔM</sup>*, dem die Myb-Domäne fehlt, nicht an die Muntjaktelomere

lokalisiert. Es ist anzunehmen, dass sich hier Heterodimere zwischen der trunkierten *mreTRF2<sup>AM</sup>*-Variante und dem endogenen TRF2 bilden, wodurch die Chromosomenenden ohne schützendes TRF2 vorliegen (siehe Abb. 15C+F; van Steensel et al., 1998; Karlseder et al., 1999). Dagegen bleibt das endogene TRF1 an den Telomeren gebunden (Abb. 15F3).

Diese Ergebnisse und die hohe Übereinstimmung zwischen Muntjak und humanen *TERF*-Genen legen den Schluss nahe, dass beide Muntjakspezies über funktionelle TRF-Proteine verfügen und dass daher Veränderungen dieser Proteine nicht als Auslöser für die ancestralen Chromosomenfusionen in Frage kommen. Des Weiteren weist die Expression von zahlreichen weiteren Telomer-assoziierten Genen in beiden Muntjakspezies auf das Vorhandensein der entsprechenden Proteine in Muntjaks hin. Vermutlich waren daher andere Faktoren, oder zum Beispiel zeitlich begrenzte Veränderungen in der Genexpression, die sich heute nicht mehr nachweisen lassen, für die ancestralen Chromosomenfusionen verantwortlich.

#### 4.11 Ausblick

Die Expressionsanalysen der Telomer-assoziierten Gene im indischen und chinesischen Muntjak zeigen, dass sich trotz zahlreicher Versuche die Expression des *TERT*-Gens, das die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert, nicht nachweisen ließ. Daher wäre es interessant, mehr über die Rolle und die Sequenz der Telomerase im indischen Muntjak zu erfahren.

Für das Verständnis von Chromosomenumbauten sind vor allem die zugrunde liegenden DNA-Sequenzen von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurde durch den Nachweis von direkt aneinander grenzenden Telomer- und Satellitensequenzen ein Anfang für das molekulare Verständnis der Chromosomenfusionen beim indischen Muntjak gemacht. In Zukunft wird es darum gehen, noch mehr Fusionspunkte zu isolieren und die beteiligten Sequenzen zu studieren. Mit Hilfe der vor kurzem etablierten Genom-Bibliotheken des indischen und chinesischen Muntjaks (<http://bacpac.chori.org>) können nicht nur die Fusionspunkte und deren Umgebung sequenziert werden, sondern auch eine eindeutige Korrelation zwischen den DNA-Sequenzen und Chromosomenloci hergestellt werden. Da in jüngster Zeit die Genome von immer mehr Säugetieren entschlüsselt wurden (siehe 4.1), könnten solche Genom-Bibliotheken auch als Grundlage für die vollständige Sequenzierung der Muntjakgenome dienen, was zu ganz neuen Möglichkeiten für die Untersuchung der Chromosomenumbauten führen würde.

## 5 Zusammenfassung

Der indische Muntjak (*Muntiacus muntjak* vag.) stellt aufgrund seiner geringen Chromosomenzahl von  $2n=6/7$  (Weibchen/Männchen) einen ausgezeichneten Modellorganismus für Fragen zur Chromosomenstabilität und Telomerbiologie dar. Die Reduktion der Chromosomenzahl erfolgte im Laufe der Evolution durch zahlreiche chromosomale Tandemfusionen, wobei angenommen wird, dass diese Fusionen auf illegitimer Rekombination zwischen telomerischen und centromerischen (Satelliten) DNA-Sequenzen beruhen. Diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, indem mit Hilfe einer PCR-Strategie direkt aneinander grenzende Telomer- und Satellitensequenzen aus dem indischen Muntjakgenom isoliert wurden. Darüber hinaus konnte eine Verbindung dieser Sequenzen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf ausgestreckten Chromatinfasern (Fiber-FISH) und eine Kollokalisierung von Telomer- und Satelliten-DNA an interstitiellen Chromosomenloci (Metaphase-FISH) nachgewiesen werden, wobei letztere mit den vermuteten ancestralen Bruch- und Fusionspunkten übereinstimmen.

Um mögliche Ursachen für das gehäufte Auftreten dieser Chromosomenfusionen zu studieren, wurden die Telomere und Telomer-assoziierte Proteine, die eine wichtige Rolle beim Schutz vor Chromosomenfusionen spielen, im indischen und chinesischen Muntjak untersucht. So wurde die Expression und ein hohes Maß an Übereinstimmung für zahlreiche Telomer-relevante Gene in beiden Muntjakspezies nachgewiesen. Insbesondere die Charakterisierung der direkt an die Telomer-DNA bindenden TRF-Proteine, die als wichtige Schutzfaktoren gelten, ergab, dass TRF1 und in noch stärkerem Maße TRF2 hoch konserviert zwischen Muntjak und Mensch sind. Außerdem zeigten Immunfärbungen und die Überexpression von Muntjak-spezifischem TRF2, dass auch in Muntjakzellen TRF2 an die Telomere bindet.

Die Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass beide Muntjakspezies funktionelle Telomere besitzen und damit andere Faktoren als Ursache für die zahlreichen Chromosomenfusionen des indischen Muntjaks in Betracht gezogen werden müssen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Fourth Edition, Garland Science, New York.
- Ayala, F. J. & Coluzzi, M. (2005). Chromosome speciation: Humans, Drosophila, and mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102 Suppl 1**, 6535-42.
- Azzalin, C. M., Nergadze, S. G. & Giulotto, E. (2001). Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma* **110**, 75-82.
- Bailey, J. A., Baertsch, R., Kent, W. J., Haussler, D. & Eichler, E. E. (2004). Hotspots of mammalian chromosomal evolution. *Genome Biol* **5**, R23.
- Bailey, J. A., Liu, G. & Eichler, E. E. (2003). An Alu transposition model for the origin and expansion of human segmental duplications. *Am J Hum Genet* **73**, 823-34.
- Bailey, S. M., Meyne, J., Chen, D. J., Kurimasa, A., Li, G. C., Lehnert, B. E. & Goodwin, E. H. (1999). DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14899-904.
- Baumann, P. & Cech, T. R. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**, 1171-5.
- Bayerer, B. (2000). *Molekulargenetische Untersuchungen zur Konservierung der Terf1 und Terf2 Gene im Indischen Muntjak*. Fachbereich Biologie, Universität Kaiserslautern.
- Bekaert, S., Derradji, H. & Baatout, S. (2004). Telomere biology in mammalian germ cells and during development. *Dev Biol* **274**, 15-30.
- Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P. & de Lange, T. (1997). TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *Embo J* **16**, 1785-94.
- Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K., Koering, C. E., Laroche, T. & Gilson, E. (1997). Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* **17**, 236-9.
- Blackburn, E. H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**, 661-73.
- Blackburn, E. H. & Gall, J. G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol* **120**, 33-53.

- Blasco, M. A., Funk, W., Villeponteau, B. & Greider, C. W. (1995). Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* **269**, 1267-70.
- Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A. & Greider, C. W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**, 25-34.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S. & Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-52.
- Bogenberger, J., Schnell, H. & Fittler, F. (1982). Characterization of X-chromosome specific satellite DNA of *Muntiacus muntjak vaginalis*. *Chromosoma* **87**, 9-20.
- Bogenberger, J. M., Neitzel, H. & Fittler, F. (1987). A highly repetitive DNA component common to all Cervidae: its organization and chromosomal distribution during evolution. *Chromosoma* **95**, 154-61.
- Bogenberger, J. M., Neumaier, P. S. & Fittler, F. (1985). The muntjak satellite IA sequence is composed of 31-base-pair internal repeats that are highly homologous to the 31-base-pair subrepeats of the bovine satellite 1.715. *Eur J Biochem* **148**, 55-9.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bradshaw, P. S., Stavropoulos, D. J. & Meyn, M. S. (2005). Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nat Genet* **37**, 193-197.
- Brinkley, B. R., Valdivia, M. M., Tousson, A. & Brenner, S. L. (1984). Compound kinetochores of the Indian muntjac. Evolution by linear fusion of unit kinetochores. *Chromosoma* **91**, 1-11.
- Broccoli, D., Chong, L., Oelmann, S., Fernald, A. A., Marziliano, N., van Steensel, B., Kipling, D., Le Beau, M. M. & de Lange, T. (1997a). Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression and conserved protein domains. *Hum Mol Genet* **6**, 69-76.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. & de Lange, T. (1997b). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* **17**, 231-5.
- Buntjer, J. B., Nijman, I. J., Zijlstra, C. & Lenstra, J. A. (1998). A satellite DNA element specific for roe deer (*Capreolus capreolus*). *Chromosoma* **107**, 1-5.

- Bush, G. L., Case, S. M., Wilson, A. C. & Patton, J. L. (1977). Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3942-6.
- Capanna, E. & Castiglia, R. (2004). Chromosomes and speciation in *Mus musculus domesticus*. *Cytogenet Genome Res* **105**, 375-84.
- Capanna, E., Gropp, A., Winking, H., Noack, G. & Civitelli, M. V. (1976). Robertsonian metacentrics in the mouse. *Chromosoma* **58**, 341-53.
- Cech, T. R. (2004). Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* **116**, 273-9.
- Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P. & de Lange, T. (1995). A human telomeric protein. *Science* **270**, 1663-7.
- Choo, K. H. (1997). *The Centromere*. Oxford University Press, Oxford.
- Choo, K. H., Vissel, B., Nagy, A., Earle, E. & Kalitsis, P. (1991). A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. *Nucleic Acids Res* **19**, 1179-82.
- Chowdhary, B. P. & Raudsepp, T. (2001). Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. *Methods Cell Sci* **23**, 37-55.
- Colgin, L. M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T. R. & Reddel, R. R. (2003). Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr Biol* **13**, 942-6.
- Contreras, L. C., Torres-Mura, J. C. & Spotorno, A. E. (1990). The largest known chromosome number for a mammal, in a South American desert rodent. *Experientia* **46**, 506-8.
- Cook, B. D., Dynek, J. N., Chang, W., Shostak, G. & Smith, S. (2002). Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol* **22**, 332-42.
- d'Adda di Fagagna, F., Teo, S. H. & Jackson, S. P. (2004). Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* **18**, 1781-99.
- Dantzer, F., Giraud-Panis, M. J., Jaco, I., Ame, J. C., Schultz, I., Blasco, M., Koering, C. E., Gilson, E., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G. & Schreiber, V. (2004). Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol Cell Biol* **24**, 1595-607.
- Darwin, C. (1859). *On The Origin of Species By Means of Natural Selection*. Oxford University Press (1996), Oxford, UK.

- Datta, A., Pansa, J., Madhusudan, M. D. & Mishra, C. (2003). Discovery of the leaf deer *Muntiacus putaoensis* in Arunachal Pradesh: An addition to the large mammals of India. *Current Science* **84**, 454-458.
- de la Sena, C., Chowdhary, B. P. & Gustavsson, I. (1995). Localization of the telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in chromosomes of some domestic animals by fluorescence in situ hybridization. *Hereditas* **123**, 269-74.
- de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21**, 532-40.
- de Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 323-9.
- Dobzhansky, T. (1937). *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Downs, J. A. & Jackson, S. P. (2004). A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 367-78.
- Ducray, C., Pommier, J. P., Martins, L., Boussin, F. D. & Sabatier, L. (1999). Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process. *Oncogene* **18**, 4211-23.
- Dutrillaux, B. & Couturier, J. (1983). *Praktikum der Chromosomenanalyse*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Eichler, E. E. & Sankoff, D. (2003). Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science* **301**, 793-7.
- Elder, F. F. B. & Hsu, T. C. (1988). Tandem fusions in the evolution of mammalian chromosomes. In *The cytogenetics of mammals. Autosomal rearrangements* (Ed, Sandberg, A. A.) Alan R Liss, New York, pp. 481-506.
- Fagundes, V., Vianna-Morgante, A. M. & Yonenaga-Yassuda, Y. (1997). Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent Akodon cursor (2n=14,15 and 16). *Chromosome Res* **5**, 228-32.
- Fairall, L., Chapman, L., Moss, H., de Lange, T. & Rhodes, D. (2001). Structure of the TRFH dimerization domain of the human telomeric proteins TRF1 and TRF2. *Mol Cell* **8**, 351-61.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**, 6-13.

- Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J. & et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* **269**, 1236-41.
- Ferreira, M. G., Miller, K. M. & Cooper, J. P. (2004). Indecent exposure: when telomeres become uncapped. *Mol Cell* **13**, 7-18.
- Florijn, R. J., Bonden, L. A., Vrolijk, H., Wiegant, J., Vaandrager, J. W., Baas, F., den Dunnen, J. T., Tanke, H. J., van Ommen, G. J. & Raap, A. K. (1995). High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. *Hum Mol Genet* **4**, 831-6.
- Fontana, F. & Rubini, M. (1990). Chromosomal evolution in Cervidae. *Biosystems* **24**, 157-74.
- Fredga, K. (1977). Chromosomal changes in vertebrate evolution. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **199**, 377-97.
- Fronicke, L. & Scherthan, H. (1997). Zoo-fluorescence in situ hybridization analysis of human and Indian muntjac karyotypes (*Muntiacus muntjak vaginalis*) reveals satellite DNA clusters at the margins of conserved syntenic segments. *Chromosome Res* **5**, 254-61.
- Gall, J. G. & Pardue, M. L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **63**, 378-83.
- Garagna, S., Marziliano, N., Zuccotti, M., Searle, J. B., Capanna, E. & Redi, C. A. (2001). Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 171-5.
- Garagna, S., Zuccotti, M., Capanna, E. & Redi, C. A. (2002). High-resolution organization of mouse telomeric and pericentromeric DNA. *Cytogenet Genome Res* **96**, 125-9.
- Giao, P., Tuoc, D., Dung, V., Wikramanayake, E., Amato, G., Arctander, P. & MacKinnon, J. (1998). Description of *Muntiacus truongsonensis*, a new species of muntjac (Artiodactyla: Muntiacidae) from central Vietnam, and implications for conservation. *Animal Conservation* **1**, 61-68.
- Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K. C., Burch, P. E., Okwuonu, G., Hines, S., Lewis, L., DeRamo, C., Delgado, O., Dugan-Rocha, S., Miner, G., Morgan, M., Hawes, A., Gill, R., Celera, Holt, R. A., Adams, M. D., Amanatides, P. G., Baden-Tillson, H., Barnstead, M., Chin, S., Evans, C. A., Ferreira, S., Fosler, C., Glodek, A., Gu, Z., Jennings, D., Kraft, C. L., Nguyen, T., Pfannkoch, C. M., Sitter, C., Sutton, G. G., Venter, J. C., Woodage, T., Smith, D., Lee, H. M.,

- Gustafson, E., Cahill, P., Kana, A., Doucette-Stamm, L., Weinstock, K., Fechtel, K., Weiss, R. B., Dunn, D. M., Green, E. D., Blakesley, R. W., Bouffard, G. G., De Jong, P. J., Osoegawa, K., Zhu, B., Marra, M., Schein, J., Bosdet, I., Fjell, C., Jones, S., Krzywinski, M., Mathewson, C., Siddiqui, A., Wye, N., McPherson, J., Zhao, S., Fraser, C. M., Shetty, J., Shatsman, S., Geer, K., Chen, Y., Abramzon, S., Nierman, W. C., Havlak, P. H., Chen, R., Durbin, K. J., Egan, A., Ren, Y., Song, X. Z., Li, B., Liu, Y., Qin, X., Cawley, S., Cooney, A. J., D'Souza, L. M., Martin, K., Wu, J. Q., Gonzalez-Garay, M. L., Jackson, A. R., Kalafus, K. J., McLeod, M. P., Milosavljevic, A., Virk, D., Volkov, A., Wheeler, D. A., Zhang, Z., Bailey, J. A., Eichler, E. E., Tuzun, E., et al. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**, 493-521.
- Gibson, L. J. (1984). Chromosomal changes in mammalian speciation: a literature review. *Origins* **11**, 67-89.
- Go, Y., Rakotoarisoa, G., Kawamoto, Y., Randrianjafy, A., Koyama, N. & Hirai, H. (2000). PRINS analysis of the telomeric sequence in seven lemurs. *Chromosome Res* **8**, 57-65.
- Greenberg, R. A., Allsopp, R. C., Chin, L., Morin, G. B. & DePinho, R. A. (1998). Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* **16**, 1723-30.
- Greider, C. W. & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405-13.
- Greider, C. W. & Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**, 331-7.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H. & de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503-14.
- Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-60.
- Hartley, J. L., Temple, G. F. & Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**, 1788-95.
- Hayes, H. (1995). Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **71**, 168-74.

- Heng, H. H., Squire, J. & Tsui, L. C. (1992). High-resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridization to free chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9509-13.
- Hentze, M. W. & Kulozik, A. E. (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* **96**, 307-10.
- Hsu, T. C., Pathak, S. & Chen, T. R. (1975). The possibility of latent centromeres and a proposed nomenclature system for total chromosome and whole arm translocations. *Cytogenet Cell Genet* **15**, 41-9.
- Ijdo, J. W., Baldini, A., Ward, D. C., Reeders, S. T. & Wells, R. A. (1991). Origin of human chromosome 2: an ancestral telomere-telomere fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9051-5.
- John, H. A., Birnstiel, M. L. & Jones, K. W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* **223**, 582-7.
- Johnston, F. P., Church, R. B. & Lin, C. C. (1982). Chromosome rearrangement between the Indian muntjac and Chinese muntjac is accompanied by a deletion of middle repetitive DNA. *Can J Biochem* **60**, 497-506.
- Jurka, J., Kapitonov, V. V. & Smit, A. (2003). Repetitive Elements: Detection. In *nature Encyclopedia of the Human Genome*, Vol. 5, (Ed, Cooper, D. N.) Macmillan Publishers, London, pp. 9-14.
- Kappler, R., Schlegel, J., Romanakis, K., Mennel, H. D. & Scherthan, H. (1998). Comparative genomic in situ hybridization discloses chromosomal copy number changes in a transplanted brain tumor line of the rat (*Rattus norvegicus*). *Mamm Genome* **9**, 193-7.
- Karlseder, J. (2003). Telomere repeat binding factors: keeping the ends in check. *Cancer Lett* **194**, 189-97.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. & de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* **283**, 1321-5.
- Karlseder, J., Hoke, K., Mirzoeva, O. K., Bakkenist, C., Kastan, M. B., Petrini, J. H. & de Lange, T. (2004). The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* **2**, E240.
- Karlseder, J., Kachatrian, L., Takai, H., Mercer, K., Hingorani, S., Jacks, T. & de Lange, T. (2003). Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1. *Mol Cell Biol* **23**, 6533-41.

- Karlseder, J., Smogorzewska, A. & de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* **295**, 2446-9.
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L. & Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011-5.
- Kim, S. H., Kaminker, P. & Campisi, J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* **23**, 405-12.
- Kim, S. H., Parrinello, S., Kim, J. & Campisi, J. (2003). Mus musculus and Mus spretus homologues of the human telomere-associated protein TIN2. *Genomics* **81**, 422-32.
- King, M. (1993). *Species Evolution - The role of chromosome change*. Cambridge University Press, Cambridge (England).
- Knippers, R. (2001). *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Konrad, J. P., Mills, W., Easty, D. J. & Farr, C. J. (1999). Cloning and characterisation of the chicken gene encoding the telomeric protein TRF2. *Gene* **239**, 81-90.
- Kozak, M. (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol* **115**, 887-903.
- Lages, C. S., Etienne, O., Comte, J., Gauthier, L. R., Granotier, C., Pennarun, G. & Boussin, F. D. (2004). Identification of alternative transcripts of the TRF1/Pin2 gene. *J Cell Biochem* **93**, 968-79.
- Lamba, J. K., Adachi, M., Sun, D., Tammur, J., Schuetz, E. G., Allikmets, R. & Schuetz, J. D. (2003). Nonsense mediated decay downregulates conserved alternatively spliced ABCC4 transcripts bearing nonsense codons. *Hum Mol Genet* **12**, 99-109.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R.,

- Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissole, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Lansdorp, P. M., Verwoerd, N. P., van de Rijke, F. M., Dragowska, V., Little, M. T., Dirks, R. W., Raap, A. K. & Tanke, H. J. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* **5**, 685-91.
- Lareau, L. F., Green, R. E., Bhatnagar, R. S. & Brenner, S. E. (2004). The evolving roles of alternative splicing. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 273-82.
- Lear, T. L. (2001). Chromosomal distribution of the telomere sequence (TTAGGG)(n) in the Equidae. *Cytogenet Cell Genet* **93**, 127-30.
- Lee, C., Sasi, R. & Lin, C. C. (1993). Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs. *Cytogenet Cell Genet* **63**, 156-9.
- Lee, C., Wevrick, R., Fisher, R. B., Ferguson-Smith, M. A. & Lin, C. C. (1997). Human centromeric DNAs. *Hum Genet* **100**, 291-304.
- Lee, J. Y., Koi, M., Stanbridge, E. J., Oshimura, M., Kumamoto, A. T. & Feinberg, A. P. (1994). Simple purification of human chromosomes to homogeneity using muntjac hybrid cells. *Nat Genet* **7**, 29-33.
- Lewis, B. P., Green, R. E. & Brenner, S. E. (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 189-92.
- Li, B., Oestreich, S. & de Lange, T. (2000a). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**, 471-83.
- Li, Y. C., Lee, C., Chang, W. S., Li, S. Y. & Lin, C. C. (2002). Isolation and identification of a novel satellite DNA family highly conserved in several Cervidae species. *Chromosoma* **111**, 176-83.
- Li, Y. C., Lee, C., Hseu, T. H., Li, S. Y. & Lin, C. C. (2000b). Direct visualization of the genomic distribution and organization of two cervid centromeric satellite DNA families. *Cytogenet Cell Genet* **89**, 192-8.

- Li, Y. C., Lee, C., Sanoudou, D., Hseu, T. H., Li, S. Y. & Lin, C. C. (2000c). Interstitial colocalization of two cervid satellite DNAs involved in the genesis of the Indian muntjac karyotype. *Chromosome Res* **8**, 363-73.
- Lin, C. C., Sasi, R., Fan, Y. S. & Chen, Z. Q. (1991). New evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of Asian muntjacs. *Chromosoma* **101**, 19-24.
- Lingner, J., Cooper, J. P. & Cech, T. R. (1995). Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* **269**, 1533-4.
- Liu, D., Safari, A., O'Connor, M. S., Chan, D. W., Laegeler, A., Qin, J. & Songyang, Z. (2004). POT1 interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat Cell Biol* **6**, 673-80.
- Liu, F. G., Miyamoto, M. M., Freire, N. P., Ong, P. Q., Tennant, M. R., Young, T. S. & Gugel, K. F. (2001). Molecular and morphological supertrees for eutherian (placental) mammals. *Science* **291**, 1786-9.
- Liu, W. S. & Fredga, K. (1999). Telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences are associated with nucleolus organizer regions (NORs) in the wood lemming. *Chromosome Res* **7**, 235-40.
- Loayza, D. & De Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* **423**, 1013-8.
- Maio, J. J. (1971). DNA strand reassociation and polyribonucleotide binding in the African green monkey, *Cercopithecus aethiops*. *J Mol Biol* **56**, 579-95.
- Manuelidis, L., Langer-Safer, P. R. & Ward, D. C. (1982). High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. *J Cell Biol* **95**, 619-25.
- Masutomi, K., Yu, E. Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J. L., Metz, G. B., Brooks, M. W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J. A., Weinberg, R. A., Stewart, S. A. & Hahn, W. C. (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* **114**, 241-53.
- Matthey, R. (1973). Chromosome formulae of eutherian mammals. In *Chromosome formulae of eutherian mammals* (Eds, Chiarelli, A. B., Capanna, E.) Academic Press, London, pp. 531-616.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Mayr, E. (1970). *Populations, species, and evolution*. Belknap Press, Cambridge, Massachusetts.

- McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**, 234-282.
- McEachern, M. J., Krauskopf, A. & Blackburn, E. H. (2000). Telomeres and their control. *Annu Rev Genet* **34**, 331-358.
- McKee, B. D. (2004). Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochim Biophys Acta* **1677**, 165-80.
- Metcalf, C. J., Eldridge, M. D. & Johnston, P. G. (2002). Mapping the distribution of the telomeric sequence (T(2)AG(3))(n) in rock wallabies, *Petrogale* (Marsupialia: Macropodidae), by fluorescence in situ hybridization. ii. the lateralis complex. *Cytogenet Genome Res* **96**, 169-75.
- Meyne, J., Baker, R. J., Hobart, H. H., Hsu, T. C., Ryder, O. A., Ward, O. G., Wiley, J. E., Wurster-Hill, D. H., Yates, T. L. & Moyzis, R. K. (1990). Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* **99**, 3-10.
- Meyne, J., Ratliff, R. L. & Moyzis, R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7049-53.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L. & Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6622-6.
- Muller, H. J. (1938). The remaking of chromosomes. *Collecting Net* **8**, 182-198.
- Nadeau, J. H. & Taylor, B. A. (1984). Lengths of chromosomal segments conserved since divergence of man and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 814-8.
- Nakamura, T. M. & Cech, T. R. (1998). Reversing time: origin of telomerase. *Cell* **92**, 587-90.
- Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B. & Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**, 955-9.
- Nanda, I., Schrama, D., Feichtinger, W., Haaf, T., Scharl, M. & Schmid, M. (2002). Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in avian chromosomes. *Chromosoma* **111**, 215-27.
- Nash, W. G. & O'Brien, S. J. (1982). Conserved regions of homologous G-banding chromosomes between orders in mammalian evolution: Carnivore and primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6631-6635.

- Neitzel, H. (1987). Chromosome evolution of cervidae: karyotypic and molecular aspects. In *Cytogenetics* (Eds, Obe, G. and Basler, A.) Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 91-112.
- Neitzel, H., Benedum, U., Bogenberger, J., Fittler, F. & Sperling, K. (1986). Chromosomal and molecular evolution in Cervidae. *Verh Dtsch Zool Ges* **79**, 149-59.
- Nelson, T. & Brutlag, D. (1979). Addition of homopolymers to the 3'-ends of duplex DNA with terminal transferase. *Methods Enzymol* **68**, 41-50.
- Newton, C. R. & Graham, A. (1994). *PCR*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Novacek, M. J. (2001). Mammalian phylogeny: genes and supertrees. *Curr Biol* **11**, R573-5.
- O'Brien, S. J., Menotti-Raymond, M., Murphy, W. J., Nash, W. G., Wienberg, J., Stanyon, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Womack, J. E. & Marshall Graves, J. A. (1999). The promise of comparative genomics in mammals. *Science* **286**, 458-62, 479-81.
- Ochman, H., Gerber, A. S. & Hartl, D. L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**, 621-3.
- Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* **41**, 181-90.
- Opresko, P. L., von Kobbe, C., Laine, J. P., Harrigan, J., Hickson, I. D. & Bohr, V. A. (2002). Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* **277**, 41110-9.
- Ouellette, M. (2003). Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. In *nature Encyclopedia of the Human Genome*, Vol. 5, (Ed, Cooper, D. N.) Macmillan Publishers, London, pp. 487-492.
- Pardue, M. L. & DeBaryshe, P. G. (2003). Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annu Rev Genet* **37**, 485-511.
- Pardue, M. L. & Gall, J. G. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* **168**, 1356-8.
- Pevzner, P. & Tesler, G. (2003). Human and mouse genomic sequences reveal extensive breakpoint reuse in mammalian evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7672-7.

- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2934-8.
- Pluta, A. F., Mackay, A. M., Ainsztein, A. M., Goldberg, I. G. & Earnshaw, W. C. (1995). The centromere: hub of chromosomal activities. *Science* **270**, 1591-4.
- Qureshi, S. A. & Blake, R. D. (1995). Sequence characteristics of a cervid DNA repeat family. *J Mol Evol* **40**, 400-4.
- Rettenberger, G., Klett, C., Zechner, U., Bruch, J., Just, W., Vogel, W. & Hameister, H. (1995). ZOO-FISH analysis: cat and human karyotypes closely resemble the putative ancestral mammalian karyotype. *Chromosome Res* **3**, 479-86.
- Richards, E. J. & Ausubel, F. M. (1988). Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **53**, 127-36.
- Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* **113**, 237-51.
- Rocco, L., Costagliola, D. & Stingo, V. (2001). (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in selachian chromosomes. *Heredity* **87**, 583-8.
- Roychoudhury, R., Jay, E. & Wu, R. (1976). Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Res* **3**, 101-16.
- Ruiz-Herrera, A., Garcia, F., Azzalin, C., Giulotto, E., Egozcue, J., Ponsa, M. & Garcia, M. (2002). Distribution of intrachromosomal telomeric sequences (ITS) on *Macaca fascicularis* (Primates) chromosomes and their implication for chromosome evolution. *Hum Genet* **110**, 578-86.
- Ruiz-Herrera, A., Garcia, F., Giulotto, E., Attolini, C., Egozcue, J., Ponsa, M. & Garcia, M. (2005). Evolutionary breakpoints are co-localized with fragile sites and intrachromosomal telomeric sequences in primates. *Cytogenet Genome Res* **108**, 234-47.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.

- Santani, A., Raudsepp, T. & Chowdhary, B. P. (2002). Interstitial telomeric sites and NORs in Hartmann's zebra (*Equus zebra hartmannae*) chromosomes. *Chromosome Res* **10**, 527-34.
- Schaller, G. & Vrba, E. S. (1996). Description of the Giant Muntjac *Megamuntiacus vuquangensis* in Laos. *Journal of Mammalogy* **77**, 675-683.
- Scherthan, H. (1989). *Molekularzytogenetische Untersuchungen zur Karyotypevolution der Muntiacinae*. Doktorarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.
- Scherthan, H. (1990). Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> in two muntjac species and implications for their karyotypic evolution. *Cytogenet Cell Genet* **53**, 115-7.
- Scherthan, H. (1991). Characterisation of a tandem repetitive sequence cloned from the deer *Capreolus capreolus* and its chromosomal localisation in two muntjac species. *Hereditas* **115**, 43-9.
- Scherthan, H. (1995). Chromosome evolution in muntjac revealed by centromere, telomere and whole chromosome paint probes. In *Kew Chromosome Conference IV* (Eds, Brandham, P. E. and Bennett, M. D.) Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 267-280.
- Scherthan, H. (2001). A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 621-7.
- Scherthan, H. (2002). Detection of chromosome ends by telomere FISH. *Methods Mol Biol* **191**, 13-31.
- Scherthan, H. (2003). Chromosome Numbers in Mammals. In *nature Encyclopedia of the Human Genome*, Vol. 1, (Ed, Cooper, D. N.) Macmillan Publishers, London, pp. 747-754.
- Scherthan, H. & Cremer, T. (1994). Nonisotopic *in Situ* Hybridization in Paraffin-Embedded Tissue Sections. In *Methods in Molecular Genetics*, Vol. 5, Academic Press, pp. 223-238.
- Scherthan, H., Cremer, T., Arnason, U., Weier, H. U., Lima-de-Faria, A. & Fronicke, L. (1994). Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals. *Nat Genet* **6**, 342-7.
- Scherthan, H., Jerratsch, M., Li, B., Smith, S., Hulten, M., Lock, T. & de Lange, T. (2000). Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores. *Mol Biol Cell* **11**, 4189-203.

- Shampay, J., Szostak, J. W. & Blackburn, E. H. (1984). DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**, 154-7.
- Shen, M., Haggblom, C., Vogt, M., Hunter, T. & Lu, K. P. (1997). Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and TRF1 suggest a role in mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13618-23.
- Shi, L. M. (1983). Sex linked chromosome polymorphism in black muntjac, *Muntiacus crinifrons*. In *Proceedings of the Fifth International Congress of Genetics* (Ed, Swaminathan, M. S.) New Delhi, pp. 153.
- Shi, L. M. & Ma, C. X. (1988). A new karyotype of muntjac (*Muntiacus* sp.) from Gongshan county in China. *Zool Res* **9**, 343-347.
- Shi, L. M., Yingying, Y. & Xingsheng, D. (1980). Comparative cytogenetic studies on the red muntjac, Chinese muntjac, and their F1 hybrids. *Cytogenet Cell Genet* **26**, 22-27.
- Simonsson, T. (2001). G-quadruplex DNA structures--variations on a theme. *Biol Chem* **382**, 621-8.
- Smilenov, L. B., Mellado, W., Rao, P. H., Sawant, S. G., Umbricht, C. B., Sukumar, S. & Pandita, T. K. (1998). Molecular cloning and chromosomal localization of Chinese hamster telomeric protein chTRF1. Its potential role in chromosomal instability. *Oncogene* **17**, 2137-42.
- Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A. & de Lange, T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* **282**, 1484-7.
- Smogorzewska, A. & de Lange, T. (2002). Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *Embo J* **21**, 4338-48.
- Smogorzewska, A. & de Lange, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* **73**, 177-208.
- Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G. & de Lange, T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* **20**, 1659-68.
- Soma, H., Kada, H., Mtayoshi, K., Suzuki, Y., Meckvichal, C., Mahannop, A. & Vatanaromya, B. (1983). The chromosomes of *Muntiacus feae*. *Cytogenet Cell Genet* **35**, 156-8.
- Song, K., Jung, D., Jung, Y., Lee, S. G. & Lee, I. (2000). Interaction of human Ku70 with TRF2. *FEBS Lett* **481**, 81-5.

- Vafa, O., Shelby, R. D. & Sullivan, K. F. (1999). CENP-A associated complex satellite DNA in the kinetochore of the Indian muntjac. *Chromosoma* **108**, 367-74.
- van Steensel, B. & de Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**, 740-3.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**, 401-13.
- Vermeesch, J. R., De Meurichy, W., Van Den Berghe, H., Marynen, P. & Petit, P. (1996). Differences in the distribution and nature of the interstitial telomeric (TTAGGG)n sequences in the chromosomes of the Giraffidae, okapai (*Okapia johnstoni*), and giraffe (*Giraffa camelopardalis*): evidence for ancestral telomeres at the okapi polymorphic rob(5;26) fusion site. *Cytogenet Cell Genet* **72**, 310-5.
- Wang, W. & Lan, H. (2000). Rapid and parallel chromosomal number reductions in muntjac deer inferred from mitochondrial DNA phylogeny. *Mol Biol Evol* **17**, 1326-33.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M. R., Brown, D. G., Brown, S. D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R. D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A. T., Church, D. M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F. S., Cook, L. L., Copley, R. R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K. D., Deri, J., Dermitzakis, E. T., Dewey, C., Dickens, N. J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D. M., Eddy, S. R., Elnitski, L., Emes, R. D., Eswara, P., Eyraas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G. A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W. N., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Furey, T. S., Gage, D., Gibbs, R. A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T. A., Green, E. D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R. C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L. W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D. B., Johnson, L. S., Jones, M., Jones, T. A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E. K., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-62.
- Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* **239**, 197-201.
- Weiss, H. & Scherthan, H. (2002). Aloe spp.--plants with vertebrate-like telomeric sequences. *Chromosome Res* **10**, 155-64.
- Weiss-Schneeweiss, H., Riha, K., Jang, C. G., Puizina, J., Scherthan, H. & Schweizer, D. (2004). Chromosome termini of the monocot plant *Othocallis siberica* are

- maintained by telomerase, which specifically synthesises vertebrate-type telomere sequences. *Plant J* **37**, 484-93.
- Wevrick, R. & Willard, H. F. (1989). Long-range organization of tandem arrays of alpha satellite DNA at the centromeres of human chromosomes: high-frequency array-length polymorphism and meiotic stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9394-8.
- White, M. D. J. (1973). *Animal Cytology and Evolution*. Cambridge University Press, London, pp. 450-454.
- Wicky, C., Villeneuve, A. M., Lauper, N., Codourey, L., Tobler, H. & Muller, F. (1996). Telomeric repeats (TTAGGC)<sub>n</sub> are sufficient for chromosome capping function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8983-8.
- Wiegant, J., Kalle, W., Mullenders, L., Brookes, S., Hoovers, J. M., Dauwerse, J. G., van Ommen, G. J. & Raap, A. K. (1992). High-resolution in situ hybridization using DNA halo preparations. *Hum Mol Genet* **1**, 587-91.
- Willard, H. F. (1990). Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends Genet* **6**, 410-6.
- Wong, A. K., Biddle, F. G. & Rattner, J. B. (1990). The chromosomal distribution of the major and minor satellite is not conserved in the genus *Mus*. *Chromosoma* **99**, 190-5.
- Wong, A. K. & Rattner, J. B. (1988). Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse. *Nucleic Acids Res* **16**, 11645-61.
- Wright, W. E. & Shay, J. W. (2002). Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat Biotechnol* **20**, 682-8.
- Wright, W. E. & Shay, J. W. (2005). Telomere-binding factors and general DNA repair. *Nat Genet* **37**, 116-118.
- Wurster, D. H. & Benirschke, K. (1967). Chromosome studies in some deer, the springbok and the pronghorn, with notes on placentation in deer. *Cytologia* **32**, 273-285.
- Wurster, D. H. & Benirschke, K. (1970). Indian muntjac, *Muntiacus muntjak*: a deer with a low diploid chromosome number. *Science* **168**, 1364-6.
- Wurster-Hill, D. H. & Gray, C. W. (1973). Giemsa banding patterns in the chromosomes of twelve species of cats (Felidae). *Cytogenet Cell Genet* **12**, 377-397.
- Wurster-Hill, D. H. & Seidel, B. (1985). The G-banded chromosomes of Roosevelt's muntjac, *Muntiacus rooseveltorum*. *Cytogenet Cell Genet* **39**, 75-6.

- Yang, F., Carter, N. P., Shi, L. & Ferguson-Smith, M. A. (1995). A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma* **103**, 642-52.
- Yang, F., Muller, S., Just, R., Ferguson-Smith, M. A. & Wienberg, J. (1997a). Comparative chromosome painting in mammals: human and the Indian muntjac (*Muntiacus muntjak vaginalis*). *Genomics* **39**, 396-401.
- Yang, F., O'Brien, P. C., Wienberg, J. & Ferguson-Smith, M. A. (1997b). A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in Indian muntjac using chromosome painting. *Chromosome Res* **5**, 109-17.
- Ye, J. Z. & de Lange, T. (2004). TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex. *Nat Genet* **36**, 618-23.
- Ye, J. Z., Donigian, J. R., Van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A. N., Chait, B. T. & De Lange, T. (2004a). TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem* **279**, 47264-71.
- Ye, J. Z., Hockemeyer, D., Krutchinsky, A. N., Loayza, D., Hooper, S. M., Chait, B. T. & de Lange, T. (2004b). POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev* **18**, 1649-54.
- Yen, C. H., Hohman, C. & Elliott, R. W. (1997). Mapping and characterization of three YAC clones containing TTAGGG arrays. *Mamm Genome* **8**, 775-7.
- Yu, G. L., Bradley, J. D., Attardi, L. D. & Blackburn, E. H. (1990). In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* **344**, 126-32.
- Yunis, J. J. & Prakash, O. (1982). The origin of man: a chromosomal pictorial legacy. *Science* **215**, 1525-30.
- Zhou, X. Z. & Lu, K. P. (2001). The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* **107**, 347-59.
- Zhu, X. D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J. H. & de Lange, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* **25**, 347-52.
- Zhu, X. D., Niedernhofer, L., Kuster, B., Mann, M., Hoeijmakers, J. H. & de Lange, T. (2003). ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol Cell* **12**, 1489-98.
- Zou, Y., Yi, X., Wright, W. E. & Shay, J. W. (2002). Human telomerase can immortalize Indian muntjac cells. *Exp Cell Res* **281**, 63-76.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure (Amino Acid)
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxydisulfat
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
BAC	Künstliches Bakterienchromosom (Bacterial Artificial Chromosome)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin, (Bovine Serum Albumin)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
d. h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIG	Digoxigenin
DMEM	Zellmedium (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EMEM	Zellmedium (Essential Minimum Eagle Medium)
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	gramm, Zentrifugalkraft
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-thio- $\beta$ -D-Galactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	Milli
min	Minute
<i>MMV</i>	<i>Muntiacus muntjak vaginalis</i> (Indischer Muntjak)
<i>MRE</i>	<i>Muntiacus reevesi</i> (Chinesischer Muntjak)
OT	Objektträger
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

Pen	Penicillin
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro Minute (Rotation per Minute)
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecylsulfate)
sec	Sekunde
SSC	Natrium-Citrat-Puffer (Standard Saline Citrate)
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>TERF1</i>	<i>Telomeric Repeat Binding Factor 1</i> (Gen)
<i>TERF2</i>	<i>Telomeric Repeat Binding Factor 2</i> (Gen)
TRAP	Telomerase Repeat Amplification Protocol
TRF1	Telomeric Repeat Binding Factor 1 (Protein)
TRF2	Telomeric Repeat Binding Factor 2 (Protein)
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
U	Einheit (Unit)
μ	Mikro
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galacto-pyranosid
YAC	Künstliches Hefechromosom (Yeast Artificial Chromosome)
z. B.	zum Beispiel

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

**Vorname:** Nils  
**Nachname:** Hartmann  
**Geburtstag:** 18. November 1974  
**Geburtsort:** San Diego (USA)

### Ausbildung und Qualifikation

**1985 – 1994** Gymnasium Philippinum in Marburg

**1994 – 1995** Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Marburg

**1995 – 1997** Grundstudium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg

**1997 – 1998** Erasmus-Stipendium für die Universität Leeds (England)

**1998 – 11/2001** Hauptstudium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin  
Diplomarbeit am Institut für molekulare Parasitologie bei Prof. R. Lucius, Humboldt-Universität, Berlin  
Thema: „Studien zu intrazellulären Bakterien aus Filarien: Lassen sich Wolbachien aus *Litomosoides sigmodontis* auf *Acanthocheilonema viteae* übertragen?“

**Seit 02/2002** Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Scherthan, Abteilung Ropers, Berlin  
Thema: „Untersuchungen zur Chromosomenevolution und Charakterisierung des Telomerkomplexes von Muntjakhirschen“

## 9 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

### Publikationen

Kalscheuer V.M., Freude K., Musante L., Jensen L.R., Yntema H.G., Gecz J., Sefiani A., Hoffmann K., Moser B., Haas S., Gurok U., Haesler S., Aranda B., Nshedjan A., Tzschach A., **Hartmann N.**, Roloff T.C., Shoichet S., Hagens O., Tao J., Van Bokhoven H., Turner G., Chelly J., Moraine C., Fryns J.P., Nuber U., Hoeltzenbein M., Scharff C., Scherthan H., Lenzner S., Hamel B.C., Schweiger S. & Ropers H.H. (2003). Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nature Genetics* **35**, 313-5.

**Hartmann, N.** & Scherthan, H. (2004). Characterization of ancestral chromosome fusion points in the Indian muntjac deer. *Chromosoma* **112**, 213-20.

**Hartmann, N.** & Scherthan, H. (2005). Characterization of the telomere complex, *TERF1* and *TERF2* genes in muntjac species with fusion karyotypes. *Experimental Cell Research* **306**, 64-74.

**Hartmann, N.** & Scherthan, H. (2005). Assignment of telomeric repeat binding factor genes *TERF1* and *TERF2* to Indian muntjac chromosome bands 1p32 and 2q33 by *in situ* hybridisation. *Cytogenetic and Genome Research* (im Druck).

**Hartmann, N.** & Scherthan, H. (2005). Assignment of telomeric repeat binding factor genes *TERRF1* and *TERF2* to Chinese muntjac chromosome bands 12q3 and 2q33 by *in situ* hybridisation. *Cytogenetic and Genome Research* (im Druck).

### Tagungsbeiträge

**Hartmann, N.** & Scherthan, H.: Isolation and Analysis of Ancient Chromosome Fusion Points in the Indian Muntjac Deer. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (DZG) in Berlin, Juni 2003.

**Hartmann, N.** & Scherthan, H.: Characterisation of *TERF* Genes and Interstitial Telomere Sequences in the Model Genome of the Indian Muntjac. EMBO Workshop/58th Harden Conference – Telomeres and Genome Stability – in Cambridge (England), April 2004.

**Erklärung:**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 10. Mai 2005