

Monika Fuchs

Untersuchungen zur Expression der
Telomeraseuntereinheiten hTERC und
hTERT in normalen und neoplastischem
Nierengewebe

Diplomarbeit

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlanges. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Copyright © 1998 Diplomica Verlag GmbH
ISBN: 9783832410506

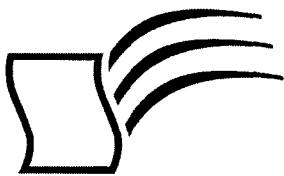
Monika Fuchs

Untersuchungen zur Expression der Telomeraseuntereinheiten hTERC und hTERT in normalen und neoplastischem Nierengewebe

Monika Fuchs

Untersuchungen zur Expression der Telomeraseuntereinheiten hTERC und hTERT in normalen und neoplastischem Nierengewebe

**Diplomarbeit
an der Universität Kaiserslautern
August 1998 Abgabe**



Diplomarbeiten Agentur
Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey
Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke
und Guido Meyer GbR

**Hermannstal 119 k
22119 Hamburg**

**agentur@diplom.de
www.diplom.de**

ID 1050

Fuchs, Monika: Untersuchungen zur Expression der Telomeraseuntereinheiten hTERC und hTERT in normalen und neoplastischem Nierengewebe / Monika Fuchs – Hamburg: Diplomarbeiten Agentur, 1998
Zugl.: Kaiserslautern, Universität, Diplom, 1998

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtes.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die Informationen in diesem Werk wurden mit Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden, und die Diplomarbeiten Agentur, die Autoren oder Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für evtl. verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey, Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke & Guido Meyer GbR
Diplomarbeiten Agentur, <http://www.diplom.de>, Hamburg
Printed in Germany



Diplomarbeiten Agentur

Wissensquellen gewinnbringend nutzen

Qualität, Praxisrelevanz und Aktualität zeichnen unsere Studien aus. Wir bieten Ihnen im Auftrag unserer Autorinnen und Autoren Wirtschaftsstudien und wissenschaftliche Abschlussarbeiten – Dissertationen, Diplomarbeiten, Magisterarbeiten, Staatsexamensarbeiten und Studienarbeiten zum Kauf. Sie wurden an deutschen Universitäten, Fachhochschulen, Akademien oder vergleichbaren Institutionen der Europäischen Union geschrieben. Der Notendurchschnitt liegt bei 1,5.

Wettbewerbsvorteile verschaffen – Vergleichen Sie den Preis unserer Studien mit den Honoraren externer Berater. Um dieses Wissen selbst zusammenzutragen, müssten Sie viel Zeit und Geld aufbringen.

<http://www.diplom.de> bietet Ihnen unser vollständiges Lieferprogramm mit mehreren tausend Studien im Internet. Neben dem Online-Katalog und der Online-Suchmaschine für Ihre Recherche steht Ihnen auch eine Online-Bestellfunktion zur Verfügung. Inhaltliche Zusammenfassungen und Inhaltsverzeichnisse zu jeder Studie sind im Internet einsehbar.

Individueller Service – Gerne senden wir Ihnen auch unseren Papierkatalog zu. Bitte fordern Sie Ihr individuelles Exemplar bei uns an. Für Fragen, Anregungen und individuelle Anfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Wir freuen uns auf eine gute Zusammenarbeit

Ihr Team der *Diplomarbeiten Agentur*

Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey –
Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke —
und Guido Meyer GbR —————

Hermannstal 119 k —————
22119 Hamburg —————

Fon: 040 / 655 99 20 —————
Fax: 040 / 655 99 222 —————

agentur@diplom.de —————
www.diplom.de —————

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 TELOMERE	1
1.1.1 TELOMERAUFBAU	1
1.1.2 TELOMERFUNKTION	4
1.1.3 DAS ENDREPLIKATIONSPROBLEM	5
1.2 TELOMERASE	7
1.2.1 AUFBAU DER TELOMERASE	12
1.2.2 FUNKTION DER TELOMERASE	13
1.3 TELOMERASEAKTIVITÄT	14
1.4 RNA-<i>IN SITU</i>-HYBRIDISIERUNG	15
1.5 RT-PCR	16
1.6 FRAGESTELLUNG / ZIEL DER VORLIEGENDEN ARBEIT	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 UNTERSUCHUNGSMATERIAL	17
2.1.1 NIERENGEWEBE	17
2.1.2 HODENGEWEBE	20
2.2 UNTERSUCHUNGSMETHODEN	20
2.2.1 TELOMERASEAKTIVITÄTSNACHWEIS	20
2.2.2 UNTERSUCHUNG DER TELOMERASE-EXPRESSION MITTELS DER <i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG	23
2.2.2.1 Vorsichtsmaßnahmen gegen die RNase-Aktivität	23
2.2.2.2 Herstellung der Paraffinschnitte für die RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	24
2.2.2.2.1 Fixieren und Einbetten der Gewebestücke	24
2.2.2.2.2 Schneiden der Paraffinblöcke	25
2.2.2.2.3 Silanisieren der Objektträger	25
2.2.2.3 Herstellung der HE-Schnitte	25
2.2.2.4 RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	27
2.2.2.4.1 Hybridisierungs-Mix	28

2.2.2.4.2 Oligonukleotid-Sonden	30
2.2.2.4.3 Positivkontrollen	32
2.2.2.4.4 Negativkontrollen	33
2.2.2.4.5 Detektion der Sonden	33
2.2.2.5 HE-Gegenfärbung	37
2.2.2.6 Apoptose-Färbung	37
2.2.3 SPEZIFISCHER NACHWEIS VON hTERC UND hTERT	38
2.2.3.1 Isolierung von Total-RNA aus Gewebe	38
2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA	40
2.2.3.3 RT-PCR	41
2.2.3.3.1 Transkription der Total-RNA in cDNA	44
2.2.3.3.2 Amplifikation spezifischer cDNA-Sequenzen	45
2.2.3.4 Agarose-Gel-Elektrophorese	47
2.2.3.5 Aufnahme der Gele	48
3 ERGEBNISSE	48
3.1 TELOMERASEAKTIVITÄT	48
3.2 RNA-IN SITU-HYBRIDISIERUNG	50
3.2.1 EXPRESSIONSMUSTER VON POLYA	51
3.2.2 EXPRESSIONSMUSTER DER TELOMERASEUNTEREINHEIT hTERC	51
3.2.3 EXPRESSIONSMUSTER DER TELOMERASEUNTEREINHEIT hTERT	52
3.2.4 EXPRESSIONSMUSTER	53
3.2.5 AUFNAHMEN	59
3.3 RT-PCR	76
3.4 ZUSAMMENFASSUNG ALLER ERGEBNISSE	78
4 DISKUSSION	80
4.1 METHODISCHE ASPEKTE	80
4.1.1 TELOMERASEAKTIVITÄTSNACHWEIS UND RT-PCR	80
4.1.2 RNA-IN SITU-HYBRIDISIERUNG	81
4.2 VERGLEICHENDE BETRACHTUNG DER ERGEBNISSE	84
4.2.1 TELOMERASEAKTIVITÄT	84

4.2.2 SPEZIFISCHER NACHWEIS DER TELOMERASEUNTEREINHEITEN	86
4.2.3 DIAGNOSE- / THERAPIEANSÄTZE	89
5 ZUSAMMENFASSUNG	91
6 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	93
7 LITERATUR	95

1 Einleitung

1.1 Telomere

Die Telomere wurden von Barbara McClintock und Hermann J. Muller in den dreißiger Jahren als spezielle Elemente an den Enden von Chromosomen entdeckt, für deren Stabilisierung sie zuständig sind [McClintock, 1939; Muller, 1938]. Muller prägte die Bezeichnung „Telomer“, welche sich aus dem Griechischen „telos“ für „Ende“ und „meros“ für „Teil“ zusammensetzt.

1.1.1 Telomeraufbau

Erst in den siebziger Jahren konnte der genaue Aufbau der Telomere zunächst für den Ciliaten *Tetrahymena thermophila* charakterisiert werden [Blackburn und Gall, 1978]. Telomere sind multifunktionelle GC-reiche DNA-Strukturen an den Enden eukaryotischer Chromosomen. Sie bestehen aus repetitiven, nicht-kodierenden Sequenzen. Diese sogenannten telomerischen Repeats sind für einen bestimmten Organismus charakteristisch.

Obwohl die Sequenz der Telomerrepeats innerhalb der Ciliaten variieren kann, ist sie innerhalb der Vertebraten hochkonserviert. Die Telomersequenz des Menschen hybridisiert nämlich nicht nur mit den Telomeren menschlicher Chromosomen, sondern auch mit denen aller untersuchten Wirbeltiere von den Fischen bis zu den Säugern. Die Telomere des Menschen sind hexamer, bestehend aus der Basenfolge $(TTAGGG)_n$ [Yu et al., 1990; Zakian, 1989]. Die Telomere des Ciliaten *Tetrahymena* haben die Repeatsequenz $(TTGGGG)_n$, *Oxytricha* und *Euplotes* Telomere haben die Sequenz $(TTTTGGGG)_n$.

Die korrekte Sequenz dieser Repeats ist für die Funktion der Telomere von großer Bedeutung. Versuche mit mutierten Repeats führten in *Tetrahymena* zu Instabilitäten der Telomerlänge und damit zum Tod [Yu et al., 1990].

Der guaninreiche Strang ist immer in die 5'→3'-Richtung zum Chromosomenende hin orientiert. Sein 3'-Terminus ragt als Einzelstrang in evolutiv sehr verschiedenen Spezies wie z.B. *Oxytricha*, *Euplotes*, *Tetrahymena*, *Didymium* und *Saccharomyces* etwas hervor [Klobutcher et al., 1981; Henderson und Blackburn, 1989; Wellinger et al., 1993]. Beispielsweise hat *Oxytricha nova* einen T₄G₄-Einzelstrangüberhang an ihrer telomerischen DNA.

Die Länge der Telomere kann in etwa abgeschätzt werden, indem man das sogenannte TRF (terminal restriction fragment) mißt. Man erhält die TRFs nach dem Verdau der DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen und der Auftrennung über ein Agarosegel, welches dann die Längen der TRFs aller in einer Population enthaltenen Zellen zeigt [Allsopp et al., 1992; Harley et al., 1990; Vaziri et al., 1993].

Das TRF besteht aus den telomerischen Repeats (TTAGGG) am äußersten Ende des Chromosoms, gefolgt von subtelomerischer DNA, die aus degenerierten TTAGGG-Sequenzen besteht, und anderen daran anschließenden DNA-Anteilen, die nicht mit den Telomerrepeats verwandt sind. Das TRF kann in seiner Größe in verschiedenen Organismen und sogar in verschiedenen Zellen eines Organismus variieren. So hat es in peripheren Leukozyten beispielsweise eine durchschnittliche Länge von 5-12 kb und 10-15 kb in Keimbahnzellen [Allshire et al., 1988; Allsopp et al., 1995; Brown, 1989; Dross et al., 1989; de Lange et al., 1990; Morin et al., 1989; Myozis et al., 1988].

Telomere bilden komplexe Strukturen mit spezifischen Telomer-bindenden Proteinen wie dem TRBF (telomeric repeat binding factor), das mit doppelsträngigen TTAGGG-Bereichen [Chong et al. 1995; Hanish et al., 1994; Zhong et al., 1992] und Histonen [Blackburn, 1991; Gilson et al., 1994; Zakian, 1989] assoziiert. Interaktionen zwischen DNA und Proteinen wurden an einfachen Organismen im Detail untersucht [Fang et al., 1993; Fang und Cech, 1993; Gray et al., 1991; Hicke et al., 1990, 1994].

1.1.2 Telomerfunktion

Eine Aufgabe der Telomere ist der Schutz genomischer DNA vor exonucleolytischer Degradation und den damit verbundenen möglichen End-zu-End-Fusionen und aberranten Rekombinationsereignissen [McClintock, 1941; Orr-Weaver et al., 1981; Haber und Thornburn, 1984]. Durch die Assoziation der Chromosomenenden mit der nukleären Matrix sorgen die Telomere vermutlich außerdem für die Positionierung der Chromosomen im Kern und organisieren somit die subnukleäre Architektur [Agard und Sedat, 1983; Allsopp, 1995]. Desweiteren sind die Telomere wahrscheinlich in die Suppression von Genen an distalen Loci involviert [Allsopp, 1995]. Telomere haben auch eine Funktion bei der Chromosomensegregation und bei der genomischen Replikation [Blackburn, 1991; Blackburn und Challoner, 1984; Greider, 1995; Henning, 1995; McClintock, 1939; Zakian, 1989, 1995].

Der Schutz der Chromosomen bzw. deren codierender Sequenzen, die sich an die Telomere anschließen, vor möglichen End-zu-End-Fusionen und aberranten Rekombinationsereignissen ergibt sich unter anderem aufgrund des Phänomens, daß die Menge an terminaler DNA während der Lebensspanne verschiedener somatischer Zelltypen *in vitro* und *in vivo* progressiv abnimmt [Harley et al., 1990; Hastie et al., 1990]. Die Telomere dienen demnach als eine Art Pufferzone, die das Übergreifen des replikativen DNA-Verlustes auf die kodierende Region am Chromosomenende zunächst verhindert.

Man geht davon aus, daß Verluste telomerischer DNA auf dem speziellen Arbeitsmechanismus der DNA-Polymerase beruhen und nennt dieses Ereignis das Endreplikationsproblem [Levy et al., 1992; Olovnikov, 1971, 1973; Watson, 1972].

Der als „replikative Seneszenz“ bezeichnete Verlust an TTAGGG-Sequenzen wurde als Modell für die zelluläre Alterung benutzt [Hayflick und Moorhead, 1961]. Allsopp und Mitarbeiter zeigten 1995, daß die Telomerlänge in sich aktiv teilenden Zellen signifikant kürzer ist als in ruhenden Zellen [Allsopp et al., 1995]. Eine Untersuchung ergab, daß trotz mangelnder Telomeraseaktivität eine allgemeine Telomerstabilität in adultem Cortexgewebe zu beobachten ist, die auf den allgemeinen Mangel von Replikationsereignissen in diesem Gewebe zurückzuführen ist [Allsopp et al., 1995]. Daraus folgerte man, daß die Telomerverkürzung nicht eine Folge von chronologischer Seneszenz sondern allein von replikativer Alterung ist. Somit geht man davon aus, daß die Telomere als sogenannte „mitotische Uhr“ funktionieren [Allsopp et al., 1992; Harley et al., 1991; Olovnikov et al., 1973].