

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. H. Höhn

**Charakterisierung von genomischer Instabilität  
mit Hilfe der Spektralen Karyotypisierung  
beim Werner-Syndrom**

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Robert von Golitschek  
aus Würzburg

Würzburg, März 2007

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. H. Höhn

**Charakterisierung von genomischer Instabilität  
mit Hilfe der Spektralen Karyotypisierung  
beim Werner-Syndrom**

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Robert von Golitschek  
aus Würzburg

Würzburg, März 2007

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. M. Schmid  
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 9. November 2007

Der Promovend ist Arzt.

## Inhalt:

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Klinik und Diagnose des Werner Syndroms	1
1.2	Genetische Grundlagen	4
1.3	WRNp und dessen hypothetische Rolle in DNA-Transaktionen	4
1.4	Zellkultur und Zytogenetik	10
1.5	Fragestellung	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Zellkultur und Chromosomenpräparation	14
2.1.1	Zellkultur	14
2.1.2	Chromosomenpräparation	16
2.1.3.	Berechnung der Populationsverdoppelungen	17
2.2	Spektrale Karyotypisierung	18
2.2.1	Ziel des Tests	18
2.2.2	Geräte und Testmaterialien	19
2.2.3	Versuchsablauf	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Chromosomenanalyse der Zelllinie H-51	28
3.2	Chromosomenanalyse der Zelllinie SCH	37
3.3	Chromosomenanalyse der Zelllinie AA	45
3.4	Chromosomenanalyse der Zelllinie WL	51
3.5	Chromosomenanalyse des Subklons T der Zelllinie WL	54
3.6	Gesamtergebnisse und Bruchpunktanalyse	57
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1	Variegated Translocation Mosaicism	65
4.2	Die Entstehung des Subklons T aus der seneszenten Mutterkultur WL	69
4.3	Werner Syndrom und die Spektrale Karyotypisierung	70
4.4	Ausblick	74
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>

## **1.0 EINLEITUNG**

Werner Syndrom (WS, Progerie des Erwachsenenalters) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die zu den Chromosomenbruchsyndromen zählt. Dieser Gruppe werden ebenfalls das Rothmund-Thomson Syndrom, das Bloom Syndrom, das Cockayne Syndrom Typ A und Typ B, die Ataxia telangiectasia und das Nijmegen-breakage Syndrom zugeordnet. Chromosomenbruchsyndrome zeichnen sich durch genomische Instabilität, erhöhte Prädisposition zur Entstehung von Neoplasien und eine frühe Sterblichkeit der Patienten aus. Die Instabilität beruht auf der Störung wichtiger DNA Transaktionen wie Replikation, Reparatur, Transkription sowie Rekombination und unterstreicht deren Bedeutung für eine gesunde Entwicklung und Aufrechterhaltung des menschlichen Organismus.

### **1.1 Klinik und Diagnose des Werner Syndroms**

Das Werner Syndrom ist eine sehr seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 1:1.000.000 in der Allgemeinbevölkerung. In einigen japanischen Populationen ist die Frequenz mit 1:3.000 deutlich höher aufgrund konsanguiner Heiraten [1]. Entdeckt wurde das WS im Jahre 1904 von Otto Werner, der in seiner Inaugural-Dissertation *“Über Katarakt in Verbindung mit Sclerodermie”* einige Individuen aus einer Familie mit Symptomen frühzeitigen Alterns beschrieb [2].

Kardinalbefunde bzw. -symptome der Patienten sind juveniler, bilateraler Katarakt, Minderwuchs, frühzeitiges Ergrauen und/oder dünner werden des Haupthaars, charakteristische dermatologische Veränderungen (straffe Haut, Hautatrophien und regionale subkutane Atrophien, Pigmentveränderungen, Hyperkeratosen, Ulzera und ein „Vogelgesicht“), parentale Konsanguinität oder betroffene Geschwister und ein positiver Hyaluronsäuretest im 24-Stunden-Urin.

Weitere Symptome und Befunde sind Diabetes mellitus Typ II, Hypogonadismus, Osteoporose, Osteosklerose der Phalangen der Finger und/oder Zehen, Kalzifizierungen von Weichteilgewebe, frühzeitige Atherosklerose, mesenchymale und/oder bestimmte epidermale, teilweise multiple Neoplasien, Stimmveränderungen (hohe, krächzende, heisere Stimme) und Senkfüße. Als klinisch gesichert gilt das Vorliegen aller Kardinalsymptome/-befunde und zwei zusätzlicher Zeichen. Definitiv ausgeschlossen wird das WS durch das Vorliegen von Symptomen vor Erreichen der Adoleszenz [3]. Als erstes Symptom tritt in der Regel der nicht-vorhandene pubertale Wachstumsschub auf. Patienten berichten oftmals, dass sie nach der Grundschule noch eine durchschnittliche, nach Abschluss der Gesamtschulzeit jedoch eine unterdurchschnittliche Körpergröße besaßen. In der 3. Lebensdekade manifestieren sich allmählich die Haut- und Haarveränderungen, die subkutanen Atrophien, die Stimmveränderungen sowie der Hypogonadismus einhergehend mit dem Verlust der Fertilität. Erkannt wird das WS in der Regel in der Mitte der 3. Lebensdekade, spätestens bis zum 40. Lebensjahr ist das klinische Bild voll ausgeprägt. Bis zur 4. Lebensdekade bedürfen die Patienten einer chirurgischen Exzision bilateraler Katarakte. Die durchschnittliche Lebenserwartung beträgt 47 Jahre, hauptsächliche Todesursachen sind Myokardinfarkt und cerebrale Infarkte als unmittelbare Folge frühzeitiger Artherosklerose sowie maligne Neoplasien [4].

Der Phänotyp des WS hat unverkennbar Gemeinsamkeiten mit dem normalen Alterungsprozess, so dass in der Literatur oftmals von vorzeitigem Altern gesprochen wird. Dies ist jedoch eine zu starke Vereinfachung, da das WS nur einen Teil des komplexen, seneszenten Phänotyps umfasst. Das WS wird daher der Gruppe der „segmentalen progeroiden Syndrome“ zugeordnet [5]. Wesentliche Unterschiede zwischen dem WS und dem normalen Altern (nA) sind beispielsweise: Der Minderwuchs bei WS ist entwicklungsbedingt, Osteosklerose der distalen Phalangen werden im nA nicht beobachtet, demenzielle Syndrome, v.a. Demenzen vom Alzheimertyp, werden beim WS nicht beobachtet, die Katarakte in WS sind subkapsular, nicht nuklear wie im nA, arterielle Hypertonie ist WS-untypisch, das Verhältnis von mesenchymalen zu epithelialen Neoplasien ist bei WS etwa 1:1

gegenüber 1:10 in der normalen Alterspopulation [5,6]. Deutliche Unterschiede finden sich auch in Art, Ausprägung und Verteilung innerhalb der Neoplasien [7].



**Abbildung 1** zeigt eine Japanisch-amerikanische Frau im Alter von 15 bzw. 48 Jahren. Sie hatte 8 Geschwister, 2 davon hatten ebenfalls WS. Mit 27 Jahren erfolgte die Exzision bilateraler Katarakte. Mit 48 Jahren war sie kleinwüchsig und hatte extrem dünne Extremitäten. Die Haut an den Füßen war dünn, gespannt und trocken. Sie hatte chronische, nicht verheilende Ulcera an den Malleoli und den Achillessehnen. Im Alter von 54 Jahren musste ihr linkes Bein amputiert werden. Die Gesichtsveränderungen waren Resultat von Haut- und Weichteilatrophen. Das Haar war ergraut und ausgedünnt. Sie starb mit 57 Jahren an einer Sepsis infolge einer Infektion des Urogenitaltraktes und einer Bronchopneumonie [aus 4].

Die Diagnose stützt sich neben den erwähnten klinischen Kriterien auf zytogenetische und/oder molekulare Befunde. Für die zytogenetische Diagnostik werden Biopsien aus den pathologischen Hautarealen entnommen und daraus in der Zellkultur Fibroblasten gezüchtet. Eine weitere Möglichkeit ist die Gewinnung von Lymphozyten aus peripherem Blut. Aus Fibroblasten und Lymphozyten wiederum werden Metaphasen präpariert, deren Chromosomen mit G- oder R-Bänderung angefärbt werden.

Pathognomonisch in den zytogenetischen Befunden ist das Vorliegen von „Variegated Translocation Mosaicism“ [8]. Dieses Phänomen wird in 1.4 eingehender beschrieben. Eine ungleich aufwendigere Methode ist die Mutationsanalyse, mit deren Hilfe die für das WS verantwortlichen Mutationen im WRN-Gen identifiziert werden können [9].

## **1.2 Genetische Grundlagen**

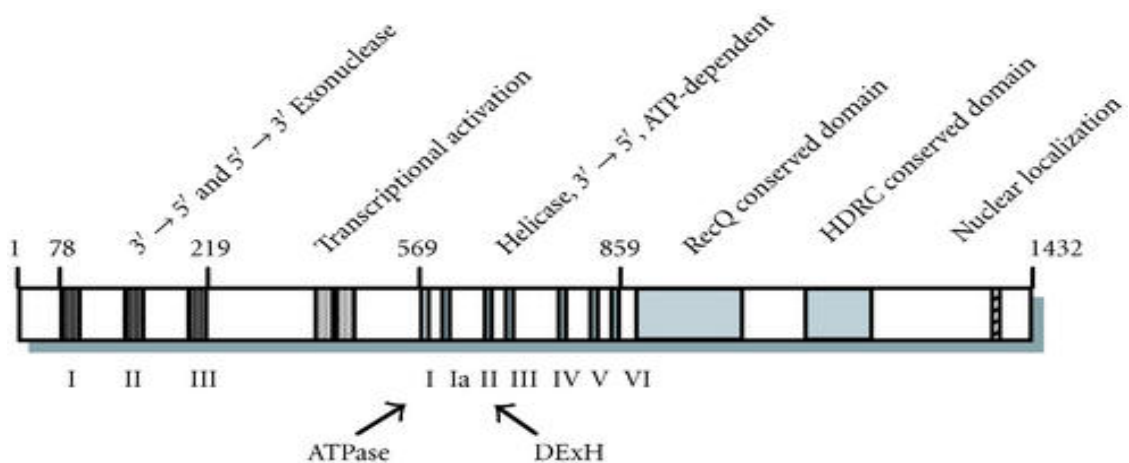
Mit der Entdeckung des WS-Gen, WRN, war 1996, 92 Jahre nach der Erstbeschreibung des WS, dessen Ursache gefunden worden [9]. WRN befindet sich auf dem Chromosom 8p12 und setzt sich aus 35 Exons zusammen [7]. Über 50 Mutationen von WRN sind mittlerweile identifiziert worden. Mutationen sind entweder Stopp Kodons, Insertionen, Deletionen oder Splice-Mutationen, die im Endeffekt zu einer Elimination des nukleären Lokalisationssignals am C-terminalen Ende von dem aus WRN hervorgehenden Genprodukt, dem WRN Protein (WRNp), führen und die eine Interaktion im Nukleus ausschließen und deshalb Null-Mutationen entsprechen. Dies führte zu der Annahme, dass der Phänotyp des WS aus einem vollständigen Fehlen von WRNp unabhängig von der Art der Mutation resultiere [10]. Ein Beispiel, das dieser These widerspricht ist die Tatsache, dass sich Schilddrüsen-Karzinome in zwei hauptsächlichen Mutationen unterscheiden: Papilläre Karzinome sind mit N-terminalen Mutationen assoziiert, wohingegen follikuläre Karzinome öfter in C-Terminalen Mutationen vorkommen [11]. In der neuesten Arbeit über Mutationen wurde zudem von zwei Mutationen am N-Terminus berichtet, die ein instabiles WRNp zur Folge hatten [12].



### 1.3 WRNp und dessen hypothetische Rolle in DNA-Transaktionen

Durch die Entdeckung von WRNp konnten in den letzten Jahren auf molekularer Ebene genauere Thesen über dessen Rolle im Zellstoffwechsel aufgestellt und große Fortschritte bei der Kenntnis von Struktur und Funktionsweise von WRNp gemacht werden.

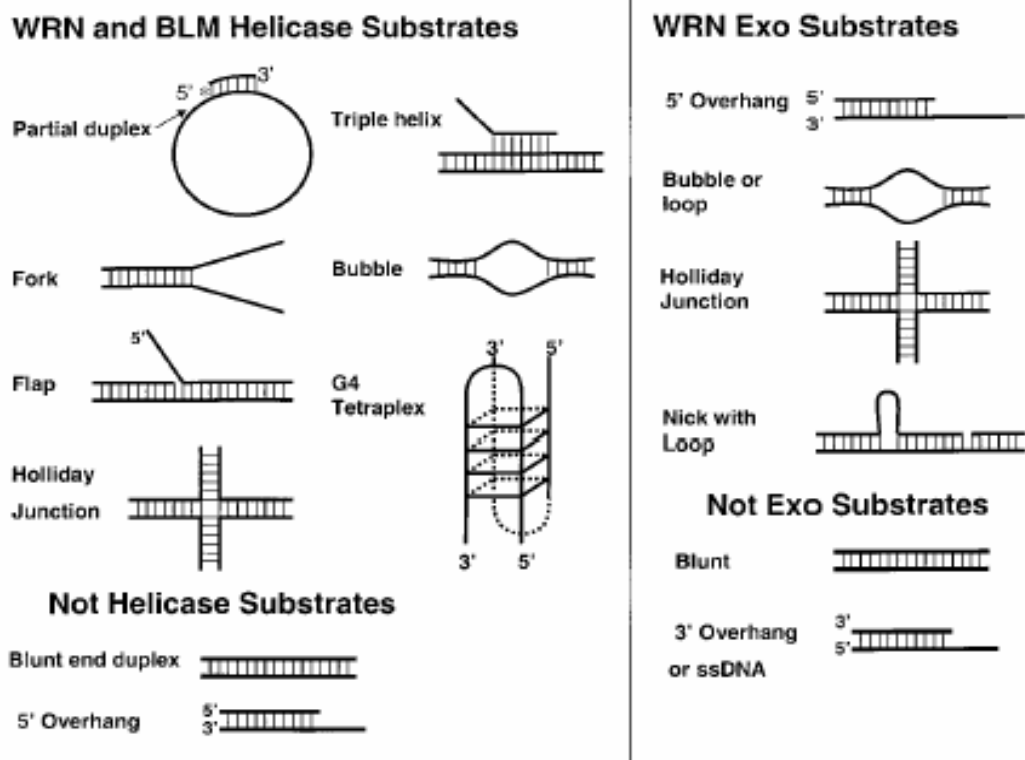
WRNp ist mit 1432 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 167kDa ein relativ großes Protein [7]. Vier definierte Regionen innerhalb des WRNp sind mittlerweile bekannt. Diese beinhalten der Reihenfolge nach, vom N-terminalen Ende ausgehend, die Domänen für eine 3'→5' Exonuklease (I-III), die eines Transkriptionsaktivators, die einer ATP-abhängigen 3'→5' Helikase (I-VI), gefolgt von einer RecQ Domäne, einer Helikase Ribonuklease D Domäne (HDRC) und einem nukleären Lokalisationssignal am C-terminalen Ende (Abbildung 2).



**Abbildung 2** stellt das WRN Protein und seine funktionellen Domänen dar. Die Aminosäuren werden durch die arabischen, die funktionellen Domänen durch die römischen Ziffern repräsentiert [7].

Die wichtigste funktionelle Einheit von WRNp ist die ATP-abhängige Helikase [13]. Hauptaufgabe von Helikasen ist die ATP-getriebene Entwindung von DNA bzw. anderer helikaler Strukturen. WRNp gehört zu der Familie der RecQ-Helikasen, die erstmals 1984 in *Escherichia coli* gefunden wurden [13,14]. Sie beteiligen sich in dem Bakterium an der Rekombination bzw. an der Unterdrückung fehlerhafter DNA-Rekombinationsprozesse und spielen damit eine wichtige Rolle in DNA-Replikation und -Reparatur [7,15]. Neben WRN konnten bisher 4 weitere humane RecQ-Helikasen isoliert werden: BLM, RecQL, RecQ4 und RecQ5. BLM bzw. RecQ4 zeigten sich ebenfalls verantwortlich für 2 monogenetische, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankungen, die mit Verlust der Integrität des Genoms einhergehen: das Bloom Syndrom (BS) bzw. das Rothmund-Thomson Syndrom (RTS). Bei Patienten aller drei Syndrome imponieren ein frühzeitiger Alterungsprozess mit dessen möglichen Konsequenzen sowie eine Prädisposition zu zum Teil ungewöhnlichen Krebsarten [7]. Einzigartig an WRNp ist, dass es im Gegensatz zu BLM bzw. RecQ4 eine 3'→5' Exonuklease besitzt [16]. Dies könnte einer der Gründe für die trotz aller Gemeinsamkeiten bestehenden unterschiedlichen Phänotypen sein.

Die Substrat-Spezifität der WRN Helikase *in vitro* umfasst eine Reihe von Intermediärprodukten der DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur wie Holliday junctions und gegabelte Duplexstrukturen. RNA-DNA-Heteroduplexe werden ebenfalls entwunden. Die 3'→5' Exonuklease initiiert den Abbau von 3'-Resten und die Degradation an stumpfen Duplex-Enden, falls die Substrate gleichzeitig eine „Abzweigung“ oder andere Strukturen beinhaltet, wie eine Holliday junction, ein bubble oder ein gegabeltes Duplex. Die Exonuklease baut außerdem den DNA-Strang von einem RNA-DNA-Heteroduplex ab. Ob Helikase und Exonuklease koordiniert zusammenarbeiten, ist noch unklar, allerdings existieren erste Hinweise dafür [17].



**Abbildung 3:** Substrate der WRN-Helikase und -Exonuklease [aus 17].

In den letzten Jahren wurden die Funktionen und Interaktionen von WRNp genauer aufgeschlüsselt, und es wurde dadurch immer deutlicher, dass WRNp in zahlreichen wichtigen zellulären Prozessen zumindest mitbeteiligt ist.

WRNp ist in der DNA-Replikation involviert. Dies erschließt sich aus folgenden Erkenntnissen: WS-Zellen werden vorzeitig seneszent [18,19], im Zellzyklus haben diese eine verlängerte S-Phase [20] und eine reduzierte Frequenz von Replikations-Initiations-Stellen [21]. Zudem interagiert WRNp mit dem Replikationsprotein A (RPA), beispielsweise in mit Hydroxyurea vorbehandelten Zellen und ist für die Anwesenheit von RPA an Replikationsfoci erforderlich. Weiterhin arbeitet es mit anderen wichtigen Replikationsenzymen wie dem Proliferating cell antigen (PCNA), der Topoisomerase I (Topo I), der DNA-Polymerase  $\delta$  (Pol  $\delta$ ) und der struktur-spezifischen Endonuklease 1 (FEN-1) zusammen [17].

WRNp beeinflusst Zellzyklus, Apoptose und Seneszenz. Dies begründet sich auch aus dem Zusammenspiel zwischen p53 und WRNp: (1) Die Überexpression von WRN führt zu einer erhöhten p53-Transkription, (2) die p53-vermittelte Apoptose ist in WS-Zellen abgeschwächt, (3) die WRN-Exonuklease wird durch den p53-Wildtyp inhibiert und (4) WRNp transloziert zu nukleären Foci und befindet sich dann dort gemeinsam mit p53 nach HU-induzierter S-Phase-Arretierung. Zudem bewirkt das Einbringen einer p53-Nullmutation in WRN-knockout-Mäusen, dass diese eine erhöhte und variabelere Rate an Neoplasien zeigen [17].

WRNp hat eine bedeutende Rolle in unterschiedlichen DNA-Reparaturmechanismen. (1) Da es mit dem Ku-Komplex und dem DNA-abhängigen Proteinkinasekomplex (DNA-PK) interagiert, scheint dessen Mitwirken bei dem Prozess des Non-homologous End Joining (NHEJ), ein Reparaturpfad durch den DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) repariert werden, gesichert. Während NHEJ werden Abschnitte mit Mikrosequenzhomologie zusammengefügt. Es wird vermutet, dass WRNp v.a. an der End-joining-Reaktion beteiligt ist. (2) Biochemische und genetische Untersuchungen deuten darauf hin, dass ein weiterer Reparaturmechanismus, die homologe Rekombination (HR), in erheblichem Maße an der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität sorgt, an der DSB-Reparatur beteiligt ist und WRNp auch hier involviert ist. HR kommt physiologisch beispielsweise in der Meiose vor, dient jedoch auch dazu, DSB zu reparieren, die nach Schädigung durch Röntgenstrahlen entstehen oder durch DNA-Cross-Linkers induziert werden können. WS-Zellen reagieren hypersensitiv auf Cross-Linkers, 4-Nitroquinolin-1-Oxid (4-NQO), Camptothecin (CPT), Methylmethansulfonat (MMS) [22] und interagieren zudem mit Enzymen wie BLM oder RAD51, die in der HR wichtige Funktionen einnehmen [23,24]. Es wird vermutet, dass WRNp an der Wiederauflösung rekombinanter Intermediärprodukte als eines der entscheidenden Enzyme fungiert [17]. (3) WRNp ist an der Basenexzisionsreparatur (BER) beteiligt, die alkylierte, oxidierte oder desaminierte Basen repariert. Hinweise für ein Mitwirken von WRNp ist, dass es BER-Intermediärprodukte entwindet, hypersensitiv auf MMS reagiert und mit PCNA, RPA, Pol  $\delta$  sowie FEN-1 interagiert [17].

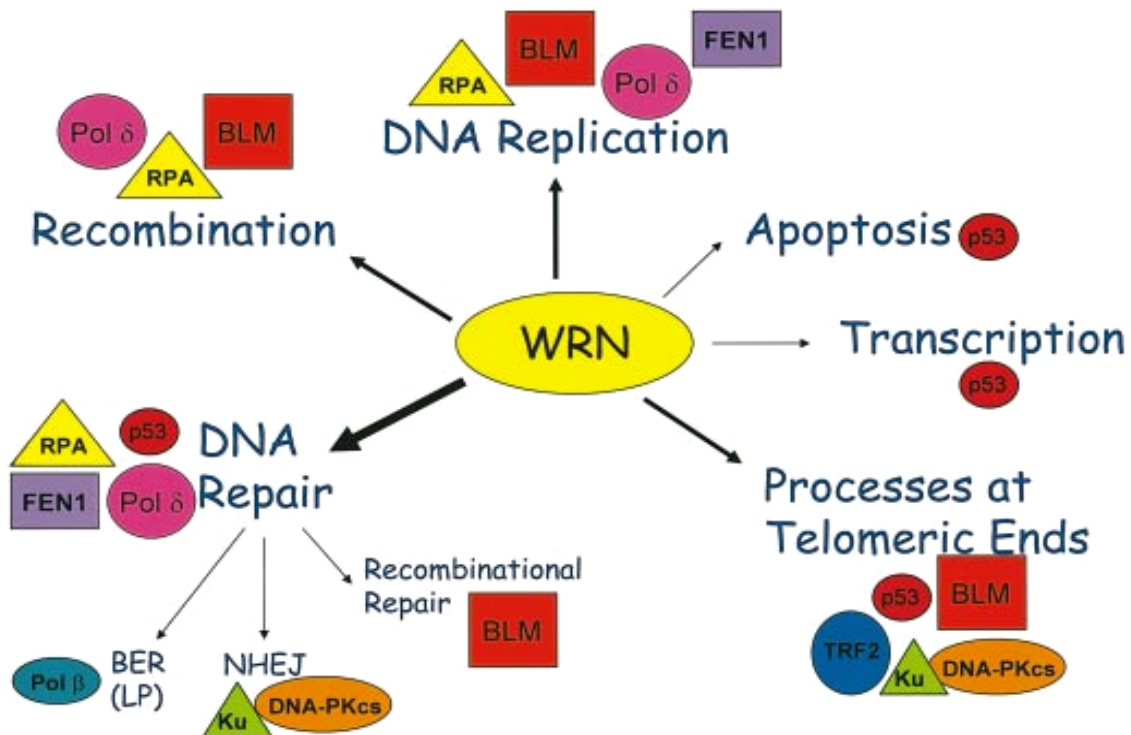
WRNp ist am Telomer-Metabolismus beteiligt. Dadurch, dass WS-Zellen wie bereits erwähnt ein erhöhtes Maß an genomischer Instabilität aufweisen und vorzeitig

seneszent werden bzw. dass WS-Zellen die Telomerase exprimieren, nicht seneszent werden und weniger sensitiv auf 4-NQO reagieren, wird diese These unterstützt. WRNp interagiert zudem mit dem Ku-, dem DNA-PK, dem Mre11-Komplex sowie dem an das Telomere-Bindungs-Protein TRF2. Wie WRNp an den Telomeren wirkt ist jedoch noch nicht geklärt [17].

WRNp ist also in hohem Maße an unterschiedlichen wichtigen DNA-Transaktionen, v.a. an der DNA-Reparatur beteiligt und nimmt regulative und modulierende Funktionen bei der Apoptose und im Zell-Zyklus ein (siehe auch Abbildung 4).

All dies spricht dafür, dass WRNp an der Entstehung von (bestimmten) Neoplasien zumindest mitbeteiligt sein könnte. Neuere Arbeiten in denen gezeigt wurde, dass WRNp in einigen Karzinomen inaktiviert ist, bestätigen dies [25].

## WRN Protein Interactions are Relevant for Which Cellular Pathways?



**Abbildung 4:** Zelluläre Defekte in WS und Proteininteraktionen von WRNp [aus 17].

### 1.4 Zellkultur und Zytogenetik des WS

WS Fibroblasten wachsen in Kultur langsamer und erreichen früher das Stadium der Seneszenz. Sie zeigen deutlich weniger Populationsverdoppelungen (etwa 55% der Kontrollen) bzw. eine stark reduzierte, replikative Lebensspanne pro Zelle (etwa 27% der Kontrollen) [18,19]. Zudem sind sie durch einen Deletion Mutator Phänotyp gekennzeichnet [26]. Post-replikativ überleben sie genauso lange wie normale Fibroblasten. Innerhalb einer Zellkultur kann das Wachstum von Passage zu Passage sehr stark variieren. Vermutet wird, dass Variabilität und Reduktion der replikativen Lebensspanne u.a. von der Art und Anzahl zytogenetisch charakterisierbarer Klone abhängig ist.

Ein zytogenetischer Klon wird als solcher definiert, wenn zwei oder mehr Metaphasen einer Zellkultur dieselbe(n) Chromosomenaberration(en) als kleinsten gemeinsamen Nenner tragen [27].

Fibroblastenkulturen von WS Patienten bestehen zytogenetisch zum größten Teil aus mehreren pseudodiploiden Klonen, was durch mehrere Arbeiten aus unterschiedlichen Laboratorien bestätigt wurde [27-31]. Dabei ist charakteristisch, dass Art und Anzahl der Klone von Patient zu Patient, von Zelllinie zu Zelllinie, aber auch innerhalb einer einzigen Zelllinie stark variieren können. Die Mehrheit der zu beobachtenden zytogenetischen Veränderungen dieser Klone sind balancierte, reziproke, stabile Translokationen und Deletionen. Begleitet werden diese Klone von Zellen mit sehr komplexen, instabilen Rearrangements und von einem geringen Prozentsatz normaler Zellen. Im Verlauf der Zellkultur etablieren sich einige wenige zytogenetische Klone, die für das Wachstum der Massenkultur hauptverantwortlich sind, wohingegen der Grossteil der Zellen, insbesondere jene mit sehr komplexen und instabilen Rearrangements, frühzeitig absterben. Die dominanten Klone vermehren sich in der Regel stärker als andere Klone innerhalb der Zelllinie, aber auch stärker als unveränderte Metaphasen. Kurz vor Seneszenz sind in der Regel nur noch diese dominanten Klone und einige wenige unveränderte Metaphasen zu sehen, singuläre und „kleinere“ Klone jedoch nicht.

Das klonale Wachstum und die Pseudodiploidie, einhergehend mit multiplen, variablen, reziproken Translokationen und instabilen Rearrangements sind das zytogenetische Kennzeichen des WS und wird als „Variegated Translocation Mosaicism“ (VTM) bezeichnet [8], anlehnend an die Definition von „Variegation“ als genetische Instabilität und das gleichzeitige Vorkommen von somatischen Mutationen [32].

Dies wurde maßgeblich mit der ausführlichsten zytogenetischen Studie an Hautfibroblasten von WS Patienten durch Salk et al. an 1538 Metaphasen herausgefunden [28]. Nur 118 Metaphasen (ca. 8%) zeigten keine erkennbaren Aberrationen. Dagegen wurden bei einer signifikanten Anzahl sehr komplexe Rearrangements gesehen. VTM war in allen Zelllinien nachweisbar. 87% der aberranten Metaphasen wurden in 18 definierte Klone unterteilt. In einem Teil der Zelllinien konnte man über die gesamte in vitro Lebenszeit eine Etablierung bzw. ein Überleben von nur einigen wenigen stabilen

Klonen beobachten. Die Gesamtzahl der Zellen nahm über mehrere Passagen ab, innerhalb dieser Population jedoch stieg der Prozentsatz an stabilen Klonen an. Diese charakteristischen Phänomene von WS-Zellen wurden mit den drei Schlagwörtern „clonal attenuation“, „clonal succession“ und „clonal expansion“ treffend umschrieben [28]. Die strukturellen Chromosomenaberrationen waren nicht abhängig von der Länge der Chromosomen. Allerdings fanden sich einige Chromosomenabschnitte, die scheinbar vulnerabler waren und öfters als andere brachen. Diese vermuteten hot-spots führten zu der Annahme, dass trotz der großen Mannigfaltigkeit verschiedener Bruchpunkte eine nicht-zufällige Verteilung dieser besteht.

VTM kommt auch in vivo vor [29,33] und konnte in geringerer Ausprägung ebenfalls in Blutlymphozyten und in, mit Epstein-Barr Virus immortalisierten, lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) von WS-Patienten festgestellt werden [29,30,34]. Chromatid-aberrationen, u.a. nachweisbar in anderen Chromosomeninstabilitäts-syndromen, waren nicht in erhöhtem Ausmaß zu sehen [34]. Die postulierte These, dass WRNp v.a. in der G1- bzw. in der frühen S-Phase des Zellzyklus seine höchste physiologische Aktivität besitzt, konnte auch durchflusszytometrisch bestätigt werden [20].

Ein Hinweis für ein Muster für bestimmte numerische Chromosomenaberrationen fand sich nicht. Diese kamen zwar in teilweiser erhöhter Anzahl vor, waren jedoch in den meisten Fällen mit komplexen Verlusten oder Zugewinnen an genetischem Material durch DSB vergesellschaftet [28].



## 1.5 Fragestellung

In den genannten zytogenetischen Studien wurde mit konventionellen Methoden, insbesondere mit der G- und der R-Bänderung von Chromosomen gearbeitet. Neuere Techniken wurden beim WS bisher einmal bei der Untersuchung von durch Röntgenstrahlen induzierten Chromosomenaberrationen angewendet. Hierbei wurden mit Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) einzelne Chromosomen bzw. bestimmte Chromosomenregionen mit spezifischen Farbproben hybridisiert, detektiert und analysiert [35]. Ausführlichere Studien über die zytogenetischen Eigenschaften des WS mit modernen Methoden wurden bisher nicht veröffentlicht. Die Spektrale Karyotypisierung (SKY) ist eine neue molekular-zytogenetische Methode, die Sensitivität und Spezifität von FISH Analysen mit den Vorteilen herkömmlicher zytogenetischer Methoden, insbesondere der Darstellung aller Chromosomen einer gesamten Metaphase in einem Experiment kombiniert [36].

Des Weiteren vermuteten Salk et al. [28], dass mit den damals angewendeten, konventionellen Methoden nicht alle pathologischen, zytogenetischen Veränderungen von WS-Zellen erfasst wurden. In der hier vorgestellten Arbeit wurden Metaphasen von vier WS-Fibroblastenkulturen (AA, WL, SCH, H-51) mit der Spektralen Karyotypisierung analysiert. Ziel war die Anwendung von SKY als moderne molekular-zytogenetische Methode auf Metaphasen von WS-Fibroblasten, um

- 1) das Werner Syndrom mit Hilfe von SKY als neuartige Methode auf zytogenetischer Ebene zu diagnostizieren bzw. auszuschließen,
- 2) die bisher mit konventionellen Methoden erarbeiteten Erkenntnisse mit SKY zu bestätigen, vertiefen oder evtl. zu erweitern,
- 3) über einen, aus einer seneszenten Mutterkultur hervorgegangenen pseudotetraploiden Subklon mit ungewöhnlichem Wachstumspotential zu berichten [37].

Als Bezugspunkt dienten v.a. die früheren Studien von Hoehn et al. bzw. Salk et al [8,27,28].

## **2.0 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Zellkulturen und Chromosomenpräparation**

#### **2.1.1 Zellkulturen**

Vier Fibroblasten Zelllinien (AA, H-51, WL und SCH) wurden untersucht. Jede dieser Zelllinien stammte aus Hautbiopsien von vier verschiedenen Patienten mit klinisch diagnostiziertem Werner Syndrom, welche zum Zwecke der zytogenetischen Diagnosesicherung zugesandt wurden. Die Hautbiopsien wurden bei  $-77\text{ °C}$  eingefroren und dann ein kleiner Prozentsatz jeder Zelllinie aufgetaut und anschließend mit der SKY-Methode charakterisiert. Die klinischen Verdachtsdiagnosen konnten in allen vier Zellkulturen bestätigt werden.

#### **Ernährung und Subkultivierung der Zellkultur**

Zunächst wird mit einem inversen Mikroskop die Zelldichte erfasst und überprüft, ob die Fibroblasten am Boden der  $25\text{cm}^2$  Kulturflasche haften. An einer sterilen Arbeitsbank wird nun das Medium mit einer Pipette abgesaugt und entsorgt. Dann spült man vorsichtig mit 3ml angewärmtem PBS, saugt dieses wieder ab und fügt der Kulturflasche 10ml ebenfalls angewärmtes frisches Medium hinzu. Die Fütterung der Zellen erfolgt alle 4 Tage. Als Nährmedium wird RPMI (Life Technologies, Eggenstein), versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (Sigma Chemie, Deisenhofen), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$ ), verwendet.

Anschließend inkubiert man die Zellen in einem Brutschrank unter feuchter Atmosphäre bei  $37\text{ °C}$  unter Zufuhr von 5%  $\text{CO}_2$  und 95% Luft. In der Regel haben WS-Zellen in frühen Passagen eine im Vergleich zum späteren Verlauf relativ hohe Proliferationsrate, so dass von nun an täglich die Zelldichte und Bodenhaftung kontrolliert wird. Zunächst finden sich im Mikroskop einzelne Zellnester, die im Verlauf zusammenfließen (konfluieren). Nach einer Woche  $\pm 3$  Tagen, wenn die Zellkultur ausreichend konfluiert ist, wird passagiert. Die Zellen bedecken zu diesem

Zeitpunkt den Boden der Kulturflasche möglichst vollständig, um ausreichend Material zum Anlegen von Subkulturen zu besitzen. Sie dürfen jedoch nicht zu dicht gewachsen sein, um einen Nährstoffmangel beziehungsweise Platzmangel und ein damit verbundenes erhöhtes Absterben der Zellen zu vermeiden.

Zunächst erwärmt man frisches Medium, Trypsin-EDTA und Phosphate Buffered Saline (PBS) 15min lang auf 37 °C. An der sterilen Arbeitsbank wird das Medium aus der Kultur abgesaugt. Dann wird mit 3ml PBS mehrmals vorsichtig gespült und das PBS anschließend in ein 10ml Röhrchen gegeben. Nun wird 4ml Trypsin-EDTA beigefügt, um die Zellen vom Boden der Kulturflasche abzulösen und inkubiert die Zellen in der Trypsin-Lösung 5 min lang im Brutschrank. Anschließend wird unter dem inversen Mikroskop überprüft, ob sich alle Zellen vom Boden gelöst haben. Durch leichtes Klopfen der Kulturflasche auf eine Unterlage lassen sich noch am Boden haftende Zellteppiche leicht ablösen. So können unnötig lange Trypsinzeiten vermieden werden. Die Zell-Trypsin-Suspension wird mit einer Pipette abgesaugt und in das PBS-enhaltende Röhrchen gegeben. Dann spült man die Kulturflasche mehrmals vorsichtig mit 3ml frischem Medium und fügt es dem Rest hinzu und verschließt das Röhrchen. Das Röhrchen wird bei 900 U/min für 8 min zentrifugiert. An der Arbeitsbank wird nun der Überstand abgesaugt und ca. 1cm Abstand zum weißlichen Niederschlag gelassen. Unter vorsichtigem, mehrmaligem Mischen wird die Suspension mit frischem, angewärmtem Medium auf insgesamt 4ml aufgefüllt. Je 1ml wird in je eine der 4 neuen 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen gegeben. Abschließend wird 9 ml frisches Medium zu jeder neuen Subkultur hinzugeben, noch einmal gemischt und bei 37 °C inkubiert.

#### Allgemeines zum Arbeiten an einer sterilen Arbeitsbank

- Vor benutzen die Arbeitsbank mit Alkohol desinfizieren.
- Hände desinfizieren oder Einmalhandschuhe benutzen.
- Abzugshaube anschalten.
- Pipetten, Deckel und Hals der Kulturflasche vor und nach jedem wichtigen Arbeitsschritt mehrmals durch eine Bunsenbrennerflamme ziehen um das Kontaminationsrisiko der Kultur zu minimieren.
- Jeder Arbeitsschritt erfordert eine neue, sterile Pipette.

- Vor Inkubation im Brutschrank den Deckel der Kulturflasche nur locker auf den Flaschenhals aufschrauben, um die für adäquates Zellwachstum notwendige Luftzufuhr nicht zu unterbinden.

## **2.1.2 Chromosomenpräparation**

### Abbruch von Fibroblastenkulturen

Der Abbruch erfolgt, wenn die Zellkulturen subkonfluent sind. Der Boden der Kulturflasche ist noch nicht vollständig mit Zellen bedeckt. Unter dem inversen Mikroskop sind viele abgerundete Zellen zu sehen. Diese Zellen befinden sich gerade im Zellteilungsvorgang. Je mehr abgerundete Zellen vorhanden sind, desto wahrscheinlicher ist eine hohe Anzahl analysierbarer Metaphasen.

Zunächst erwärmt man hypotone 0,075 M Kaliumchlorid-Lösung, Medium, PBS und Trypsin-EDTA im Inkubator auf 37 °C und setzt eine Lösung aus Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1 an; das sogenannte Carnoy Fixativ, welches dann im Gefrierfach auf -20°C gekühlt wird. Subkonfluente Zellkulturen werden nun mit 20µl/ml Colcemid 3 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Nach spülen mit PBS, Ablösen der Zellen mit Trypsin-EDTA und erneutem Spülen mit frischem Medium werden die Zellen in einem 10ml Röhrchen bei 1400 U/min 8min lang zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Pellet wird vorsichtig in ca. 10ml KCl resuspendiert und 12min lang bei 37°C inkubiert. Nun wird erneut bei 1400 U/min 8min zentrifugiert und der Überstand mit ca. 0,5-1cm Abstand zum Niederschlag abgesaugt. Das Pellet wird dann unter ständigem Schütteln in Fixativ (-20°C) resuspendiert. Das Fixativ wird im Folgenden langsam, dann schneller tröpfchenweise hinzugeben, bis das Röhrchen vollständig mit Fixativ aufgefüllt ist. Anschließend wird die Suspension für mindestens 12h im Gefrierfach fixiert. Am nächsten Tag wird die Suspension bei 1400 U/min 8min zentrifugiert und in frischem Fixativ resuspendiert und diese beiden Vorgänge 3 bis 4 mal wiederholt.

### Präparation der Objektträger

Zunächst mehrere Objektträger mit 60% Ethanol reinigen und in eine Küvette mit destillierten Wasser geben. Das Pellet wird in soviel frischem Fixativ resuspendiert,

dass eine trübe Suspension entsteht (ca. 2-3ml). Wenige Tropfen Zellsuspension mit Einmalpipette aufnehmen und aus ca. 8-10cm Höhe auf einen leicht nach unten abgekippten, feuchten Objektträger auftropfen. Zur besseren Spreitung der Metaphasen wird der Objektträger danach kurz durch eine Gasflamme gezogen, anschließend dieser beschriftet und für mindestens 30min getrocknet.

### Auswertung der Objektträger

Die getrockneten Objektträger werden nun systematisch von links nach rechts sowie von oben nach unten bei zehnfacher Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop durchgemustert. Nach Auffinden einer Metaphase wird diese in hundertfacher Vergrößerung auf Vollständigkeit überprüft. Sofern dies gewährleistet ist, notiert man die Koordinaten, nimmt einen zweiten völlig unbehandelten Objektträger, stellt erneut die Koordinaten ein und markiert die exakte Position jeder vollständigen Metaphase mit einem wasserfesten Stift. Das Durchrastern des Objektträgers führt man fort bis die Gesamtanzahl der Metaphasen feststeht und diese auf dem zweiten Objektträger markiert sind. Der letztere fungiert dann bei der Hybridisierung als Schablone. Es sollten sich auf jedem Objektträger mindestens zehn komplette Metaphasen auf einer Fläche von  $18 \times 18\text{mm}^2$  befinden. Objektträger mit weniger Metaphasen werden verworfen beziehungsweise als Reserve zurückgehalten. Zuletzt werden die für SKY zu verwendenden Objektträger bei Raumtemperatur 3-15 Tage aufbewahrt („gealtert“).

### **2.1.3 Berechnung der Populationsverdoppelungen**

Die Anzahl der Populationsverdoppelungen (PD) pro Subkultivierung kann nach folgender Formel näherungsweise berechnet werden:

$$PD = (\log N_t - \log N_0) / \log 2, \quad [38]$$

mit  $N_t$  = Anzahl der Zellen, die sich bis zum Zeitpunkt der Ernte innerhalb der Zeit  $t$  vermehrt haben, und mit  $N_0$  = Anzahl der Zellen die ursprünglich gesät wurde. Da  $\frac{1}{4}$

der Zellen pro Passagierung gesät wurden und jede Subkultur in etwa 7 Tage bis zum Erreichen der Konfluenz wuchs ergibt sich:

$$\begin{aligned}
 \text{PD /} & & & = (\log 4x - \log x) / \log 2 & = \\
 \text{Subkultivierung} & & & = (\log 4x / x) / \log 2 & = \\
 & & & = \log 4 / \log 2 & = \\
 & & & = 2 &
 \end{aligned}$$

## 2.2 Spektrale Karyotypisierung

### 2.2.1. Ziel des Tests

Spektrale Karyotypisierung (SKY) ist eine neuentwickelte, molekular-zytogenetische Methode, die es ermöglicht, alle Chromosomen eines Zellkerns in einem Experiment farblich differenziert darzustellen. Zur Darstellung menschlicher Chromosomen benutzt man 24 verschiedene Farben. Jedem der 22 autosomalen Chromosomenpaare und den beiden Geschlechtschromosomen wird jeweils eine Farbe zugeordnet. Die Karyotypisierung der Chromosomen erfolgt anhand des visuellen Emissionsspektrums. Wie bei den Chromosomenbänderungen, aber im Gegensatz zu der Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) kann die gesamte chromosomale DNA in einem Experiment auf Aberrationen untersucht werden. Gerade im Erkennen mit bis zu 1-2 Megabasen sehr kleinen oder sehr komplexen Veränderungen sowie bei der Klassifikation von Markerchromosomen ist SKY den konventionellen Methoden überlegen [36,39-41]. Anwendungen finden sich hauptsächlich auf dem Gebiet der Krebsdiagnostik, der Charakterisierung von Tumor-Zelllinien [z.B. 42,43], aber auch bei anderen Erkrankungen in denen komplexe chromosomale Rearrangements, insbesondere Translokationen und Deletionen verherrschen.

Das Werner Syndrom ist ein Chromosomeninstabilitätssyndrom oder Chromosomen-“rearrangement“-Syndrom. WS-Karyotypen zeigen v.a. das in der Einleitung beschriebene VTM und Deletionen. Chromatidaberrationen treten nicht gehäuft auf

[8,27-29]. Die bisherigen zytogenetischen Ergebnisse sind mit konventionellen Chromosomenfärbungen, insbesondere der G- und R-Bänderung erzielt worden. Aufgrund der beschriebenen Charakteristika des WS und den Vorteilen und Fähigkeiten von SKY wurde es auf die 4 untersuchten Zelllinien angewendet.

### **2.2.2 Geräte und Testmaterialien**

Der erste Schritt bei SKY ist die Hybridisierung. Bei dieser wird eine komplementäre, mit Fluorochromen markierte DNA-Probe an die zu untersuchende DNA angelagert. Die bei SKY benutzten DNA-Proben bestehen aus ganzen Chromosomen. Diese werden durch „High Resolution Flow Sorting“ gewonnen, durch die so genannte DOP-PCR (degenerate oligonucleotide- primed polymerase chain reaction) amplifiziert und mit Fluorochromen markiert [36,44].

Die DNA-Proben werden dann mit Nukleotiden, die mit verschiedenen Fluorezenfarbstoffen verbunden sind, gelabelt. Genauer gesagt durch den Einbau von Fluorochrom-konjugierten dUTPs sowie von biotinylierten- und digoxigenierten-dUTP-Molekülen. Die letztgenannten werden nach der Hybridisierung über indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht [46]. Man verwendet hierbei fünf verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe [36,47]. In dieser Arbeit waren dies Rhodamin, Texas Red, Cy5, FITC und Cy5.5 (siehe Tabelle II und III) (Applied Spectral Imaging (ASI), 2000). Bei der anschließenden Detektion wird das Hapten Biotin durch den mit Cy5 markierten Antikörper Cy5-StrepAvidin erkannt. Das Hapten Digoxigenin wird mit dem Mausantikörper Anti-Digoxigenin erkannt und anschließend durch Cy5.5 sheep antimouse detektiert. Jede chromosomenspezifische Probe ist entweder mit einem dieser Farbstoffe oder mit einer Kombination aus diesen Farbstoffen markiert. Auf diese Weise ist jedes Chromosom durch ein spezifisches Fluoreszenzspektrum charakterisiert, was letztendlich die Identifizierung ermöglicht [36]. Mit der Kombination von bis zu vier Fluorochromen pro Chromosom der DNA-Probe erreicht man, dass jedes der 24 menschlichen Chromosomen eine einzigartige spektrale Signatur bekommt und so in einer von den anderen Chromsomen unterscheidbaren Farbe dargestellt werden kann. Mittels einer Suppressions-Hybridisierung werden vorhandene repetitive Sequenzen vorher ausgeschaltet. Das so hergestellte, alle 24

menschlichen Chromosomen enthaltende Probengemisch kann mit entsprechend etablierten Standardmethoden auf Metaphasechromosomen in-situ hybridisiert werden [36].

Fluorochrom	A- Rhodamin	B- Texas Red	C- Cy5	D- FITC	E- Cy5.5
Abs. (nm)	550	596	650	495	675
Em. (nm)	570	620	670	525	694

**Tabelle II:** Verwendete Fluorochrome mit Absorptions- und Emissionsspektrum.

Chromosom	Markierung	Chromosom	Markierung	Chromosom	Markierung
1	BCD	9	ADE	17	C
2	E	10	CE	18	ABD
3	ACDE	11	ACD	19	AC
4	CD	12	BE	20	A
5	ABDE	13	AD	21	DE
6	BCDE	14	B	22	ABCE
7	BC	15	ABC	X	AE
8	D	16	BD	Y	CDE

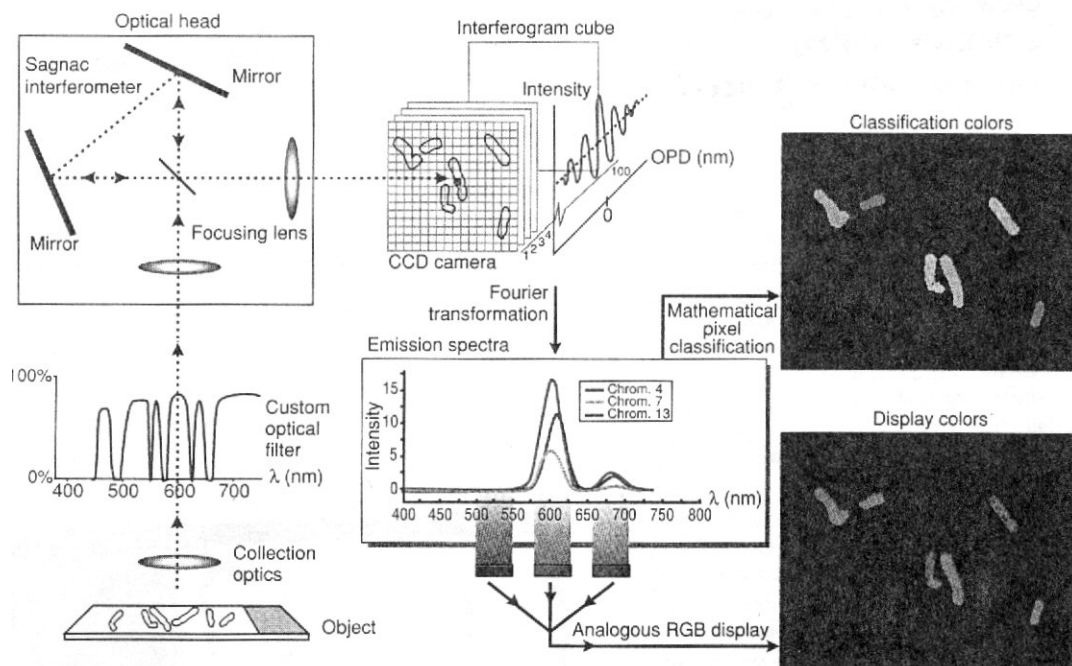
**Tabelle III:** Verwendete Farbstoffkombinationen für die einzelnen Chromosomen.

Nach der Hybridisierung erfolgt die digitale Aufnahme und Auswertung mit dem SKY-System (SD200 spectral bio-imaging system (ASI, Ltd., Israel)). Das System besteht aus einem inversen Mikroskop, einer Quecksilberlampe, einem speziellen Tripleband Filter (SKY CUBE™, ASI), einem Interferometer und einer CCD Kamera. An einem Computer erfolgt die Auswertung mit einer speziellen Software (SKYVIEW™ Software, ASI).



Das von der Probe emittierte Licht gelangt durch das Mikroskop in das Sagnac Interferometer. Dieses erzeugt ein Interferogramm, dessen Fourier Transformation es ermöglicht, das gesamte Emissionsspektrum des Objekts Pixel für Pixel zu ermitteln. Jedem Pixel wird nun mit Hilfe auf den Spektraldaten beruhenden Algorithmen der SKYVIEW<sup>TM</sup> Software, anhand seines Spektrums eine Referenzfarbe zugeordnet. Die Chromosomen, zu sehen als Summe von Pixel eines Spektrums, können so voneinander unterschieden und klassifiziert werden.

Nach der Aufnahme mit der Kamera und Speicherung der Datei erfolgt die Auswertung am Computer. Eine Aufnahme zur SKY-Analyse liefert drei verschiedene Versionen der untersuchten Metaphase-Probe: Einmal das Bild im RGB (Rot-, Grün-, Blau)-Modus, die darauf basierende Darstellung mit zugeordneten Falschfarben und schließlich die Metaphase in der DAPI (4'-6'-diamidino-2-phenylindol)-Gegenfärbung abgebildet. Letztere ist eine Q-Bänderung, die annähernd die Qualität einer G-Bänderung besitzt [47]. Zur besseren Übersicht werden die Chromosomen in ein Klassifizierungsschema gebracht, das die Chromosomen gemäß ihrer Nomenklatur ordnet [36,45].



**Abbildung 5** zeigt den Aufbau und Funktionsweise von SKY. Nach Hybridisierung erfolgt die Aufnahme der Bilder über ein Spectra-Cube-System, das an ein Fluoreszenzmikroskop angeschlossen ist. Die Emissions-Spektren der unterschiedlich markierten Chromosomen-Sonden werden in einer Aufnahme mittels eines “Triple-pass“-Filters gemessen. Mittels Fourier-Transformation wird schließlich das Spektrum exakt berechnet. Die Intensität jeder Display-Farben ist proportional zu der Intensität mit der die einzelnen Spektral-Bereiche vertreten sind. Unter Anwendung verschiedener, auf den Spektraldaten basierender Algorithmen werden den Bildpunkten mit identischen Spektren dann eindeutig definierte Farben zugeordnet. Gleichen Spektraldaten werden entsprechende Falschfarben zugewiesen [36].

### 2.2.3 Versuchsablauf

Der Versuch gliedert sich in Pepsinbehandlung, Denaturierung und Hybridisierung am Tag 1 sowie Detektion und Waschvorgänge am Tag 3.

Unbedingt benötigt wird das Skypaint™ – DNA Kit bestehend aus:

Vial #1: Human Spectral Reagent: Enthält die Probe für die Hybridisierung

Vial #2:	Blocking Reagent:	Enthält eine Lösung, die hilft, den bei der nachfolgenden Analyse störenden Hintergrund, zu minimieren.
Vial #3:	Cy5 Staining Reagent:	Enthält die für die Detektion benötigten Antikörper.
Vial #4:	Cy5.5 Staining Reagent:	Enthält die für die Detektion benötigten Antikörper.
Vial #5:	Anti-Fade-DAPI Reagent:	Enthält die DAPI-Färbung und eine Lösung, die ein vorzeitiges Abblenden der Hybridisierung verhindert.

Vial #1, #2 und #5 müssen bei Applied Spectral Imaging erworben werden, Vial #3 und #4 können selber hergestellt werden.

#### Herstellung von Cy5 Staining Reagent und Cy5.5 Staining Reagent

##### Cy5 Staining Reagent (Vial #3):

1ml 4xSSC-Puffer wird 5µl Anti Digoxin und 5µl Cy5 StrepAvidin hinzuaddiert, gemischt, anschließend bei +4°C aufbewahrt.

##### Cy5.5. Staining Reagent (Vial #4):

1ml 4xSSC – Puffer wird 5µl Cy5.5 Anti mouse beigemischt und bei +4°C aufbewahrt.

Beide Reagenzien sind am selben Tag aufzubrauchen. Die unbenutzten Antikörper bei -20°C lagern. Ist eine längere Aufbewahrung von Vial #3 und #4 erwünscht, kann zu dem 4xSSC – Puffer vorgewärmtes 1% BSA fraction V beigemischt und bei Raumtemperatur in dem Puffer gelöst werden. Bei +4°C ist mit dieser Vorbehandlung eine Lagerung von bis zu 4 Wochen möglich.

## Tag 1 (Hybridisierung):

### *Vorbereitung:*

- 0.01M Salzsäure: 0.5ml HCl in 49.5ml destilliertem Wasser in einer Glasküvette auf 37°C erwärmen.
- 10%ige Pepsinlösung: 100mg Pepsin in 1ml sterilem Wasser auflösen.
- Phosphate Buffered Saline(1xPBS) erstellen und bei Raumtemperatur lagern.
- 1xPBS/MgCl<sub>2</sub>: 50ml von 1M MgCl<sub>2</sub> in 950ml 1xPBS auflösen.
- 1% Formaldehyd: 2.7ml von 37%igen Formaldehyd zu 100ml 1xPBS/MgCl<sub>2</sub> geben.
- Ethanollösungen: Mit destilliertem Wasser 70%, 80% und 100%ige Ethanollösungen mischen und bei Raumtemperatur in drei Glasküvetten lagern. Dieselbe Serie nochmals mischen und bei -20°C lagern.
- Denaturierungslösung: 35ml Formamid, 10ml destilliertes Wasser und 5ml 20xSSC mischen, mit HCl den pH-Wert 7.0 einstellen und auf kurz vor Verwendung auf +72°C erhitzen.

### Pepsinbehandlung

1. Zunächst präparierte Objektträger(siehe 2.1.2) auf Zytoplasmagehalt und Verunreinigungen kontrollieren und anhand dessen die benötigte Pepsinzeit und -konzentration abschätzen.
2. Währenddessen 0.01M HCl auf 37°C in einer Glasküvette erwärmen.
3. 5-15µl Pepsinlösung hinzufügen und die Objektträger für 3-5min in der Lösung inkubieren.

4. Die Objektträger zweimal in 1xPBS 5min lang waschen.
5. Die Objektträger mit einem 24mm x 60mm Abdeckglas bedecken, um genügend Feuchtigkeit zu gewährleisten, und unter Phasenkontrast prüfen und entscheiden, ob eine nochmalige Behandlung mit Pepsin vonnöten ist.

*Sind viele Chromosomen verschwommen und sehen durch das Pepsin deutlich verändert aus, sollten diese Objektträger nicht mehr verwendet werden. In der Regel war ein einmaliger Pepsinschritt mit 6µl Pepsin für 3½min ausreichend.*

6. Objektträger für 5min in 1xPBS/MgCl<sub>2</sub> bei Raumtemperatur waschen.
7. Objektträger in einer Glasküvette 10min lang mit 1%igen Formaldehyd ebenfalls bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Erneut in 1xPBS für 5min waschen.
9. Objektträger jeweils 2min lang in 70%,80% und 100% Ethanol dehydrieren und einige Minuten lufttrocknen.

#### Chromosomendenaturierung

1. 40ml Denaturierungslösung auf 70°C(±2°C) aufwärmen und Objektträger für 90-120s hinzugeben. Sehr vorsichtig und nicht zu lange denaturieren da, die Chromosomen beschädigt werden können. Gegebenenfalls unter Phasenkontrast prüfen und Vorgang anschließend bei Bedarf wiederholen.
2. Objektträger sofort in auf -20°C gekühltem 70%,80% und 100% Ethanol jeweils 2min dehydrieren und dann lufttrocknen.

#### Probendenaturierung und Hybridisierung

1. Vial #1 (= Hybridisierungsprobe) des Skypaint™ DNA-Kit kurz zentrifugieren und anschließend mit Pipette vorsichtig mischen.
2. Für jeden zu behandelnden Objektträger 8-10µl aus Vial #1 entnehmen und in ein gesondertes Eppendorf Cap geben.
3. Das Eppendorf Cap nun in einem Wasserbad für 7min bei 80°C denaturieren und anschließend für 1h in einem Wasserbad auf 37°C halten.

4. Pro denaturierter Chromosomenpräparation nun schnell und vorsichtig mit Pipette 8-10µl der denaturierten Probe auf den Objektträger tropfen. Um die Stelle auf dem Objektträger mit der höchsten Metaphasenzahl zu finden, die unter 2.1.2. erstellte Schablone unter den zu behandelnden Objektträger schieben.
5. Ein 18 x 18mm<sup>2</sup> Abdeckglas nun langsam auf den Tropfen legen. Die Unterseite des Abdeckglases sollte vollständig mit der denaturierten Probe befeuchtet sein. Luftbläschen sind vorsichtig zu entfernen.
6. Die Ränder des Abdeckglases vollständig mit Kunststoffkleber abdichten.
7. Die so behandelten Objektträger nun in eine feuchte, abgedunkelte Kammer geben und bei 37°C in einem Inkubator oder Ofen für 36h inkubieren.

*Nach Hybridisierung die Objektträger immer vor direktem Lichteinfall schützen!*

Tag 3 (Waschprozedur und Detektion):

Vorbereitung:

- Waschlösung I: 15ml 20xSSC, 60ml destilliertes Wasser und 75ml Formamid mischen (=150ml 50% Formamid/2xSSC). Mit HCl pH-Wert auf 7 einstellen und Lösung auf 45°C erwärmen.
- Waschlösung II 12.5ml 20xSSC mit 237.5ml destilliertes Wasser mischen (=250ml 1xSSC). Nun auf 45°C erwärmen.
- Waschlösung III 100ml 20xSSC, 400ml destilliertes Wasser und 0.5ml Tween 20 (=500ml 4xSSC/0.1% Tween) mischen und auf 45°C erwärmen.

1. Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen und Klebstoff mit einer Pinzette entfernen.
2. Objektträger in ein, sich in einem Wasserbad befindliche Glasküvette, das Waschlösung I enthält, geben und 3x bei 45°C waschen.
3. Objektträger nun in Waschlösung II 2x bei 45°C in einem Wasserbad waschen.
4. 2min lang die Objektträger in Waschlösung III halten.
5. Optionaler Schritt: 80µl von Vial #2 auf jeden Objektträger geben, mit einem 24 x 60mm<sup>2</sup> großen Glas abdecken und für 30min bei 37°C und Dunkelheit inkubieren. Dieser Schritt soll überflüssige Lichtreize abblocken.
6. Schritt 3 wiederholen.
7. Auf feuchte Objektträger 80µl von Vial #3 geben, mit einem 24 x 60mm<sup>2</sup> großen Glas abdecken und für 45min bei 37°C und Dunkelheit inkubieren.
8. Objektträger nun im Wasserbad 3x für 3min bei 45°C in Waschlösung III geben.
9. 80µl von Vial #4 auf Objektträger geben, mit einem 24 x 60mm<sup>2</sup> großen Glas abdecken und für 45min bei 37°C und Dunkelheit inkubieren.
10. Schritt 7 wiederholen.
11. Objektträger kurz in destilliertem Wasser reinigen.
12. 20µl von der DAPI/Antifade Lösung (Vial #5) auf Objektträger geben und mit einem 24 x 60mm<sup>2</sup> großen Glas abdecken. Gegebenfalls Luftbläschen entfernen.

### **3.0 ERGEBNISSE**

Im Ergebnisteil wird zunächst über die einzelnen Fibroblasten-Zelllinien (ZLL) H-51, SCH, AA und WL berichtet (3.1-3.4). Von H-51 wurden zwei Zellpassagen untersucht, von SCH, AA und WL jeweils eine Passage. In 3.5 wird der aus der Mutterkultur WL stammende Subklon T (Wls T) beschrieben und in 3.6 werden die Ergebnisse aus den 4 einzelnen Zelllinien zusammengefasst. Die Zellen stammen aus Hautbiopsien von vier verschiedenen Patienten mit klinisch manifestem Werner Syndrom und wurden zu diagnostischen Zwecken entnommen. Für diese Arbeit wurden nur diese bereits vorhandenen Fibroblasten benutzt.

#### **3.1 Zelllinie H-51**

In der Zellkultur durchlief die Zelllinie H-51 neun Passagen bis Seneszenz eintrat. Nach der Formel aus 2.1.3 ergab sich somit näherungsweise eine durchschnittliche Populationsverdoppelung von  $PD = 9 \times 2 = 18$ . Dies entspricht einer für WS-Zellen typischen reduzierten PD, in diesem Fall von etwa 33% im Vergleich zu Kontroll-FL-Zelllinien [19,48]. H-51 überlebte mehrere Monate im postseneszenten Stadium, ohne jedoch seine Teilungsfähigkeit zurückzuerlangen.

Insgesamt wurden 32 Metaphasen ausgewertet, davon 20 Metaphasen in der Frühphase (Passage x+2) und 12 Metaphasen in der Spätphase der Massenkultur (Passage x+7). Bei Durchsicht der Passage x+7 waren zwar deutlich mehr Metaphasen nach der Präparation vorhanden, ein großer Teil dieser beinhaltete jedoch eine teilweise stark reduzierte Chromosomenanzahl (in 6 genauer untersuchten Metaphasen >5 Chromosomen), was für einen ausgeprägten Verlust an genetischem Material 4 PD vor dem Stadium der Seneszenz spricht. Diese wurden nicht mit in die genauere Analyse einbezogen.



28 der 32 Metaphasen (87,5%) beinhalteten chromosomale Aberrationen, nur vier Metaphasen besaßen den normalen Karyotyp 46, XX. 25 der 28 aberranten Metaphasen ( $\approx 89\%$ ) zeichneten sich durch Pseudodiploidie und klonales Wachstum mit insgesamt 4 identifizierten zytogenetischen Klonen aus. Die Mehrheit der Aberrationen waren reziproke, balancierte Translokationen.

In der Passage x+2 dominierte der Klon a, der in 10 aberranten Metaphasen vorhanden war. Einen kleineren Teil, nämlich insgesamt 5 aberrante Metaphasen, machten 2 weitere Klone (Klon b und Klon c) aus (Tabelle IV). 3 Metaphasen zeigten einmalige, 2 Metaphasen waren frei von sichtbaren Veränderungen (Tabelle V). In der Passage x+7 waren neben zwei scheinbar unveränderten Metaphasen, nur noch Subklone des Klon a (insgesamt 10 von 12 Metaphasen) zu sehen (Tabelle VI).

Insgesamt wurden 24 aberrante Chromosomen mit 29 sicher beurteilbaren chromosomalen Bruchpunkten an folgenden Abschnitten gefunden: Xp11, 1q11, 1q21, 2p11, 2q24, 3p21, 3q22, 4q34, 4q35, 6q16, 7q11, 7q33, 8q21, 10q22, 10q24, 11q12, 12p13, 12q22, 2 x 13q12, 13q31, 14q13, 15q23, 15q26, 16q13, 2 x 16q22, 18p11 und 19q12.

5 Bruchpunkte konnten nicht zugeordnet werden (an den Chromosomen 5, 6, 7, 8, 11). Die Chromosomen 3, 4, 13, 16 waren an jeweils 3 der 24 Aberrationen (je 12,5%) beteiligt.

#### Einzelanalyse der Passage H-51 x+2

Insgesamt wurden 20 Metaphasen ausgewertet. 2 Metaphasen besaßen diploiden Chromosomensatz 46, XX und waren scheinbar frei von Aberrationen. 18 Metaphasen waren pseudodiploid oder besaßen Mono- bzw. Trisomien bei gleichzeitig bestehenden strukturellen Chromosomenaberrationen.

15 der 18 aberranten Metaphasen ( $\approx 83,3\%$ ) konnten in drei zytogenetisch klassifizierbare Klone eingeteilt werden. 3 Metaphasen boten singuläre strukturelle Chromosomenaberrationen.

Der dominierende Klon a (10 von 20 Metaphasen) war gekennzeichnet durch die balancierte, reziproke Translokation  $t(3;11)(q22,q12)$ , zeigte aber zusätzliche unterschiedliche chromosomale Rearrangements und numerische Chromosomenaberrationen, sodass Klon a in vier Subklone unterteilt wurde ( $a_1$ - $a_4$ ).

Subklon  $a_1$  (7 von 10 Metaphasen) (Abbildung 6) trug solitär die Translokation  $t(3;11)(q22;q12)$ , Subklon  $a_2$  (1 von 10 Metaphasen) hatte zusätzlich eine Monosomie 21.

Subklon  $a_3$  (1 von 10 Metaphasen)(Abbildung 7) hatte sehr komplexe Rearrangements mit Verlusten und Zugewinnen an genetischem Material. Das aberrante Chromosom 11 war identisch mit denen in den anderen Subklonen. Das 11q-Fragment, das sich an Chromosom 3 angelagert hatte, brach jedoch ein weiteres Mal und lagerte sich im reziproken Austausch mit dem distalen Fragment des Bruchpunktes 4q34 an Chromosom 4 an. Zudem färbte sich zentromernah an 3p ein Abschnitt wie Chromosom 11, jedoch nicht über die gesamte Breite, so dass hier nicht von einem Doppelstrangbruch auszugehen ist. Durch die unmittelbare Nähe zum heterochromatinreichen Zentromer konnte nicht ausreichend festgestellt werden, ob dies einem Präparationsartefakt oder einer aberranten Veränderung entsprach. Es wurde jedoch, unter Vorbehalt, in der Metaphase mit dargestellt, floss jedoch nicht in die Bruchpunktanalyse (in 3.6) mit ein. Aus dieser Veränderung resultierte u.a. das aberrante Chromosom  $der(3) t(3;11;3;11;4)(q22;?;?;?;q34)$ . Zusätzlich fand sich in  $a_3$  das aberrante Chromosom  $der(12)t(5;12)(?;q22)$ . Der Abschnitt distal von 12q22 ging verloren. Ein Bruch an Chromosom 5 war u.a. aufgrund der ungünstigen Faltung des Chromosoms nicht zu entdecken. Weiterhin zu sehen war ein aberrantes Chromosom 8,  $der(8)t(8;13)(q21;q12)$ , ein zusätzliches Markerchromosom 8, die reziproke Translokation  $t(X;16)(p11;q21)$ , eine Deletion von Chromosom 19,  $del(19)(q12)$  und eine Monosomie 13.

Bei Subklon  $a_4$  (1 von 10 Metaphasen) (Abbildung 8) waren folgende Rearrangements identisch mit denen von Subklon  $a_3$ :  $t(3;11)(q22;q12)$ ,  $der(4)t(4;11)(q34;?)$ ,  $der(8)t(8;13)(q21;q12)$ ,  $t(X;16)(p11;q22)$ ,  $+mar(8)$ , die Monosomie 13 und  $der(3) t(3;11;4)(q22;?;q34)$ , allerdings ohne den zusätzlichen zentromernahen Einbau von zusätzlichem Material von Chromosom 11. Die Veränderungen  $der(12)t(5;12)(?;q22)$  und  $del(19)(q12)$  waren nicht zu sehen, stattdessen jedoch das aberrante Chromosom 10,  $der(10)t(3;10)(p21;q24)$ . Das Fragment proximal von 3p21 ging verloren.

Klon b (3 aus 20 Metaphasen) war durch die nicht reziproke Translokation  $der(2)t(2;13)(q24;q12)$  gekennzeichnet, bei Subklon  $b_1$  mit zusätzlicher Monosomie 13 und einem Markerchromosom 2, das vermutlich einem p-Arm entsprach (Abbildung 9) und in Klon  $b_2$  mit einer Monosomie 8.

Bei Klon c (2 aus 20 Metaphasen) war die reziproke Translokation  $t(15;16)(q23;q13)$ , bei Subklon  $c_1$  (Abbildung 10) mit einer Trisomie 12 und bei Subklon  $c_2$  mit einer Monosomie 21, zu sehen.

Die einmalige Metaphase d (Abbildung 11) zeigte einen komplexen Karyotyp mit unbalancierten Rearrangements: Ein Segment des Chromosoms 13 (distal von dem Bruchpunkt 13q31) lagerte sich an das Chromosom 10 an und brach dann, wahrscheinlich bei einer der darauf folgenden Zellteilungen, ein weiteres Mal und lagerte sich distal des Bruchpunktes 16q22 an Chromosom 16 an, dessen Bruchstück sich wiederum an das, das sich am Chromosom 10 befindlichen Bruchstückes von Chromosom 13 anlagerte. Es entstanden  $der(10)t(10;13;16)(q22;q31;q22)$  und  $del(13)(q31)$ . Weiterhin war in dieser Metaphase die nicht-reziproke Translokation  $der(4)t(4,15)(q35;q26)$  zu sehen, dessen Bruchstück 15q26 sich an 4q anlagerte und das Fragment distal von 4q35 verloren ging. Chromosom 15 deletierte an 15q26.

Die Aberrationen der einmaligen Metaphasen e und f sind Tabelle V zu entnehmen.

In der Zelllinie H-51 konnten in jeweils unterschiedlichen Metaphasen bzw. Klonen gemeinsame Bruchpunkte an  $4q34 \rightarrow 4q35$ , 13q12 und 16q22 festgestellt werden, die jedoch jeweils andere Aberrationen nach sich zogen (Tabelle VII).

Klon	Anzahl der Metaphasen	Karyotyp
a	10	-
(a <sub>1</sub> )	(7)	46, XX, t(3;11)(q22;q12).
(a <sub>2</sub> )	(1)	45, XX, -21, t(3;11)(q22;q12).
(a <sub>3</sub> )	(1)	46, XX, -13, +mar(8)(?), der(3)t(3;11;3;11;4)(q22;?;?;?;q34), der(4)t(4;11)(q34;?), der(8)t(8;13)(q21;q12), der(11)t(3;11)(q22;q12), der(12)t(5;12)(?;q22), t(X;16)(p11;q22), del(19)(q12).
(a <sub>4</sub> )	(1)	46, XX, -13, +mar(8)(?), der(3)t(3;11;4)(q22;?;q34), der(4)t(4;11)(q34;?), der(8)t(8;13)(q21;q12), der(11)t(3;11)(q22;q12), t(X;16)(p11;q22), der(10)t(3;10)(p21;q24).
b	3	-
(b <sub>1</sub> )	(1)	46, XX, -13, +mar(2)(p11), der(2)t(2;13)(q24;q12).
(b <sub>2</sub> )	(1)	45, XX, -8, t(2;13)(q24;q12).
(b <sub>3</sub> )	(1)	46, XX, t(2;13)(q24;q12).
c	2	-
(c <sub>1</sub> )	(1)	47, XX, +12, t(15;16)(q23;q13).
(c <sub>2</sub> )	(1)	45, XX, -21, t(15;16)(q23;q13).

**Tabelle IV:** 3 Klone und deren Subklone waren in der Zelllinie H-51 in der Passage x+2 (n=20) für 15 aberrante Metaphasen verantwortlich.

Metaphase	Anzahl der Metaphasen	Karyotyp
d	1	46, XX, der(4)t(4;15)(q35;q26), der(10)t(10;13;16)(q22;q31;q22), t(13;16)(q31;q22), del(15)(q26), del(13)(q31).
e	1	46, XX, t(1;14)(q11;q13).
f	1	45, -20, XX, t(7;18)(q11;p11), del(6)(q16).

**Tabelle V:** Singuläre Metaphasen der Zelllinie H-51 in der Passage x+2 (n = 20).

#### Einzelanalyse der Passage H-51 x+7

Zwar wurden 19 Metaphasen analysiert, 7 davon hatten jedoch wenigstens 4 Chromosomen verloren, sodass diese nicht mit in die Bewertung mit eingingen. Interessanterweise hatten von diesen 7 Metaphasen jedoch 6 auch die Translokation t(3;11)(q22;q12).

Von den 12 in die Bewertung genommenen Metaphasen hatten 10 die Translokation die den Klon a der Passage x+2 kennzeichneten, nur 2 Metaphasen hatten einen scheinbar unveränderten Karyotyp. Komplexe Rearrangements oder die Klone b und c

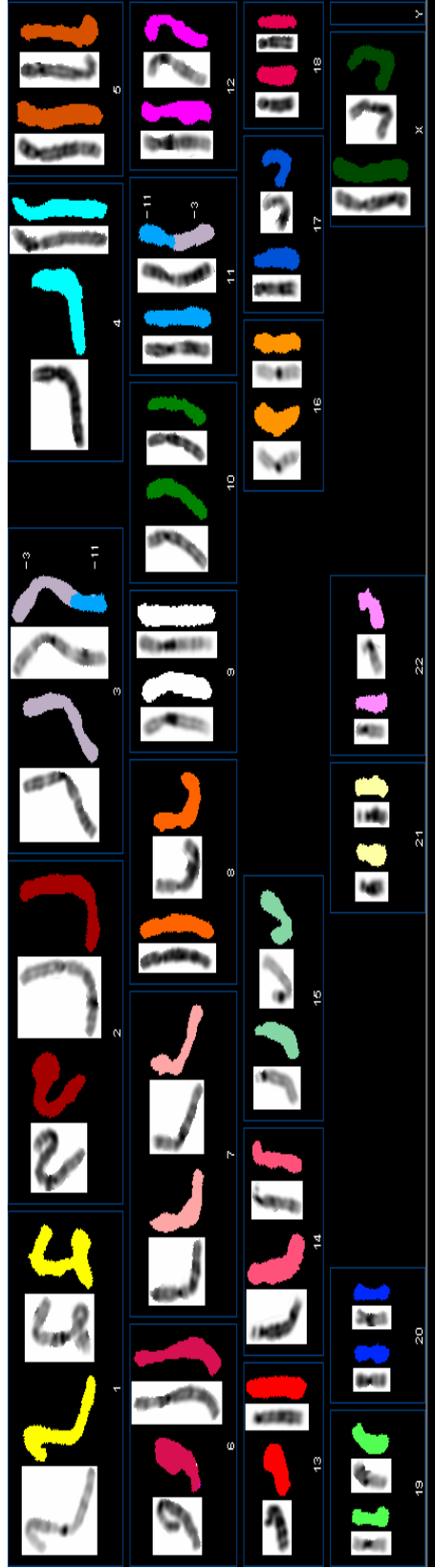
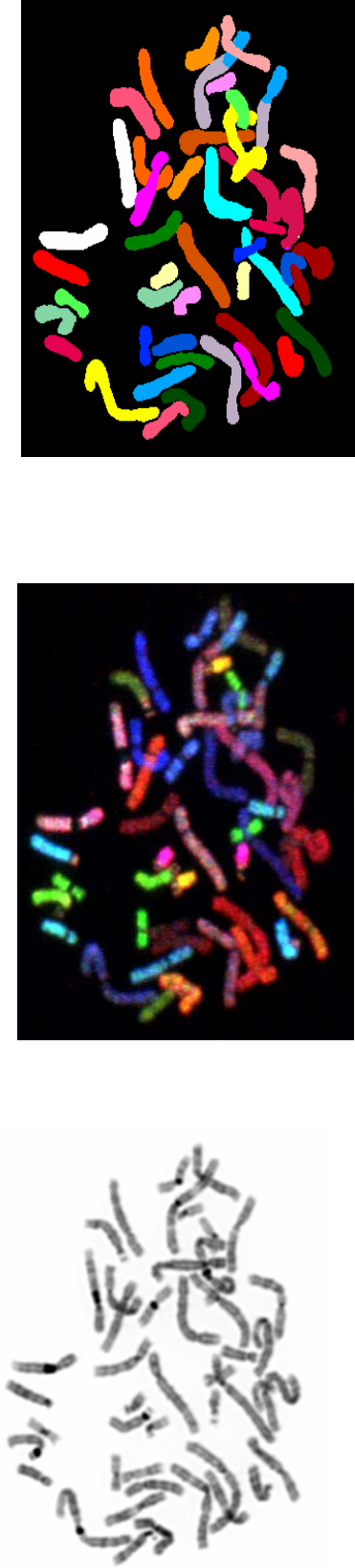
waren nicht mehr zu sehen (Tabelle VI). Eine Wiederholung der in x+2 gesehenen numerischen Aberrationen wurde nicht beobachtet. Erwähnenswert ist noch der in sonst keiner veränderten Metaphase gesehene Chromatidbruch in a<sub>4</sub>.

Klon	Anzahl der Metaphasen	Karyotyp
a	10	-
(a <sub>1</sub> )	(5)	46, XX, t(3;11)(q22;q12)
(a <sub>2</sub> )	(1)	45, XX, -14, -17, +mar(7), t(3;11)(q22;q12), del(7)(q33).
(a <sub>3</sub> )	(1)	46, XX, -20, +mar(6), t(3;11)(q22;q12), del(1)(q21), del(6)(?).
(a <sub>4</sub> )	(1)	46, XX, t(3;11)(q22;q12), ctb(5)(p12).
(a <sub>5</sub> )	(1)	46, XX, t(3;11)(q22;q12), del(12)(p13).
(a <sub>6</sub> )	(1)	45, XX, -12, t(3;11)(q22;q12).

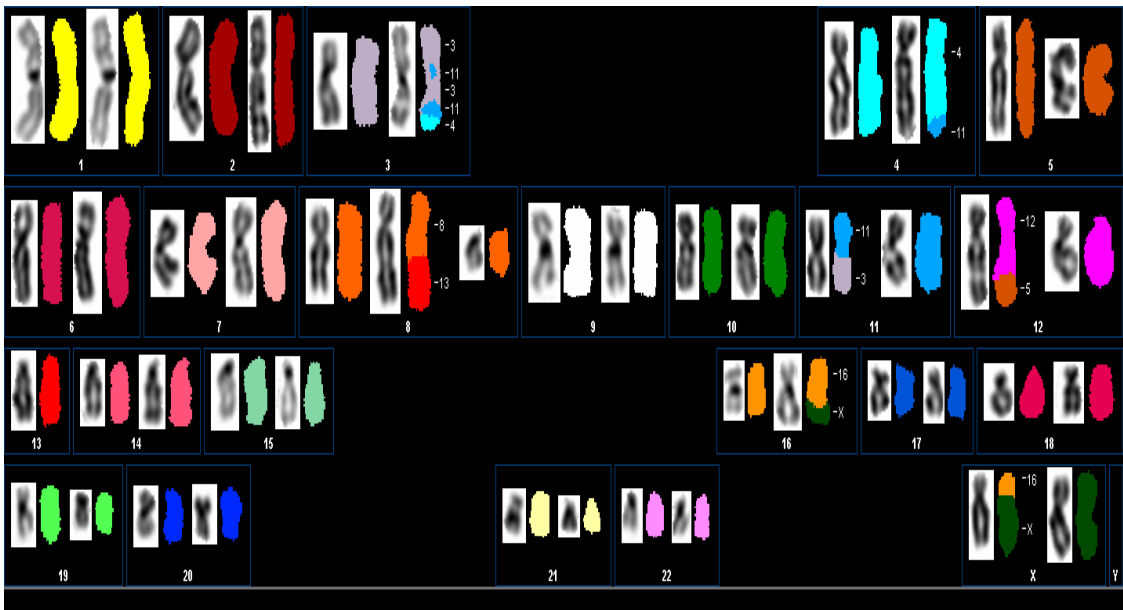
**Tabelle VI:** 10 Aberrante Metaphasen der WS Zelllinie H51 (n = 12) der Passage x+7 entsprechen Varianten des Klons a der Passage x+2.

BP	Klone/ Metaphasen
4q34→q35	a, d
13q12	a, b
16q22	a, d

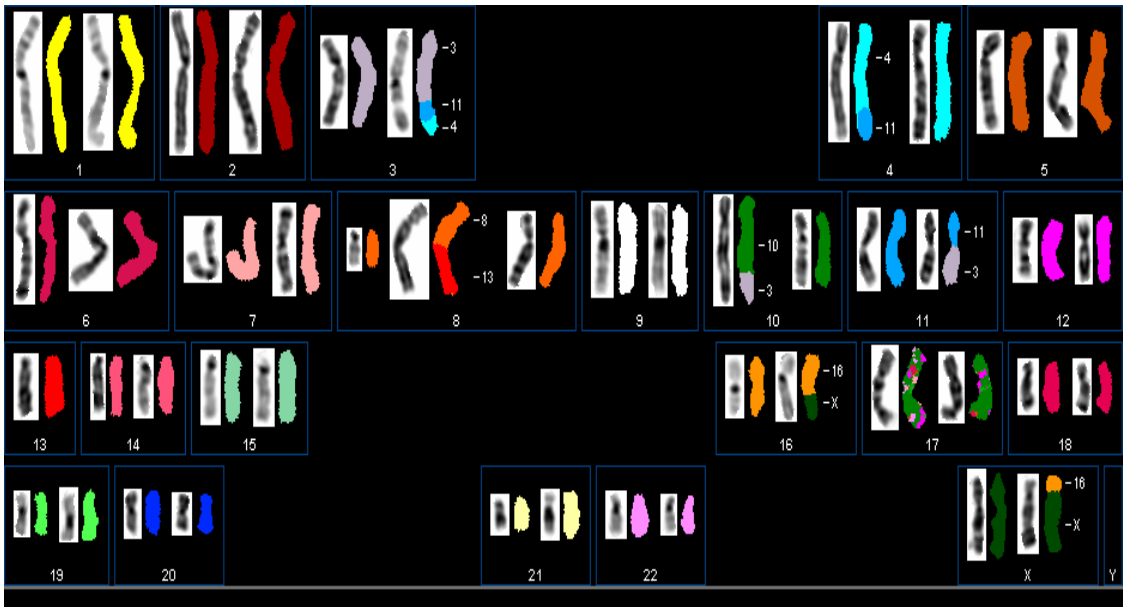
**Tabelle VII** zeigt gemeinsame Bruchpunkte in den unterschiedlichen Metaphasen, die in H-51 für unterschiedliche Aberrationen verantwortlich waren.



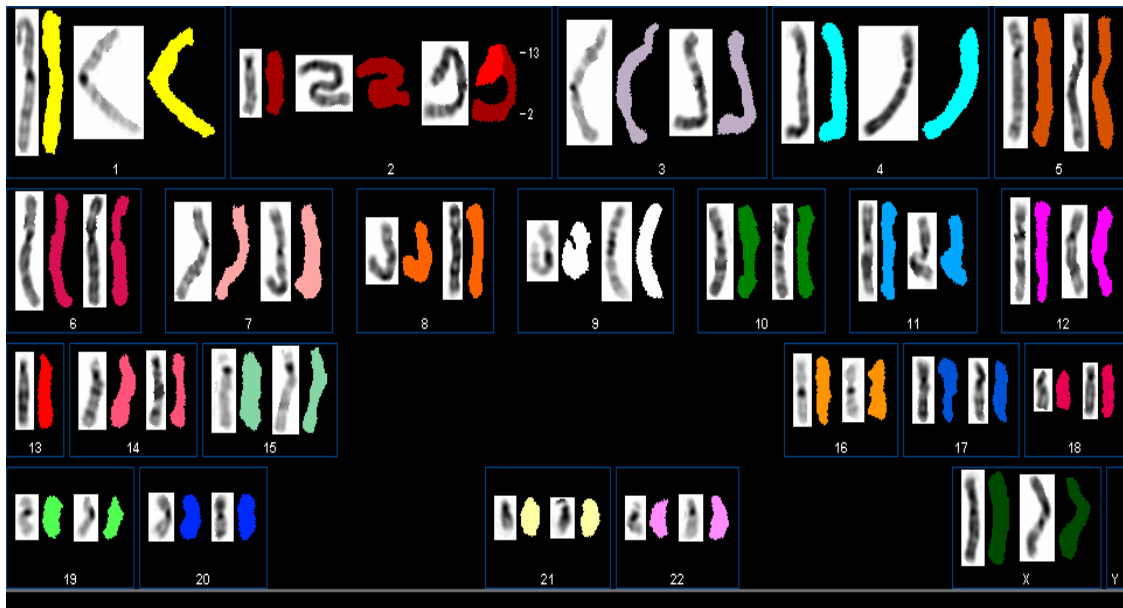
**Abbildung 6** zeigt den Klon a<sub>1</sub> der ZLL H51. In der ersten Reihe von links nach rechts: Metaphase mit Inverser DAPI Färbung, RGB Bild nach SKY-Hybridisierung und Pseudo-color Image, zugeordnet durch die SKY-Software anhand der ‚spektralen Signatur‘ eines jeden Chromosoms. In der zweiten Reihe das Karyogramm mit dem Karyotyp 46, XX, t(3;12)(q22;q12) in Invers-DAPI- und Pseudo-color-Färbung der Chromosomen



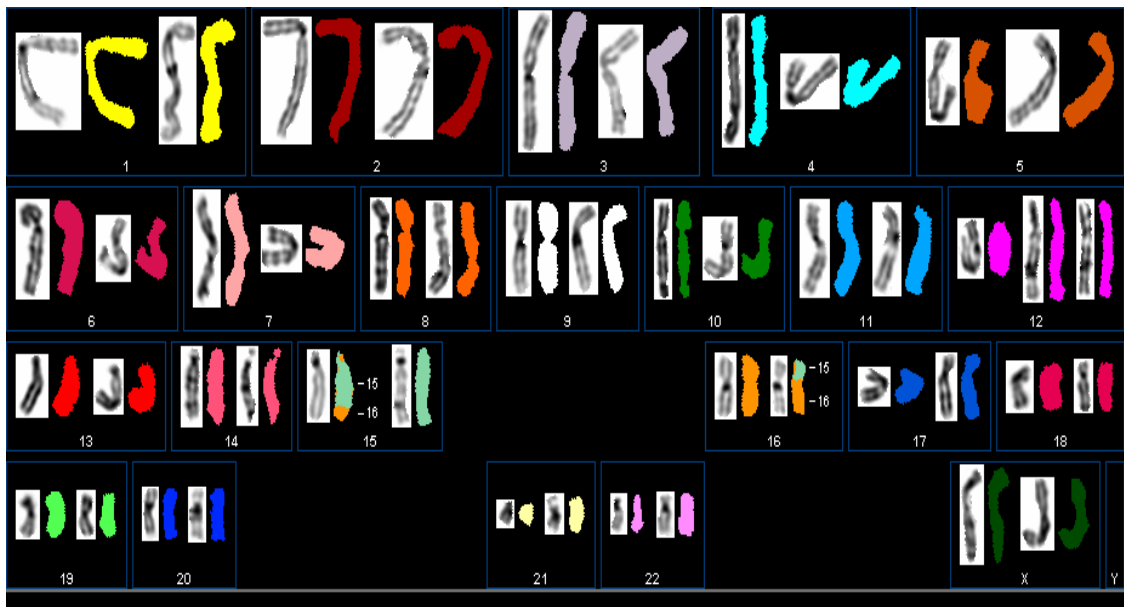
**Abbildung 7:** Klon a<sub>3</sub> der ZLL H51 mit dem Karyotyp 46, XX, -13, +mar(8)(?), der(3) t(3;11;3;11;4)(q22;?;?;?;q34), der(4)t(4;11)(q34;?), der(8)t(8;13) (q21;q12), der(12)t(5;12)(?;q22), t(X;16)(p11;q22), t(3;11)(q22;q12), del(19)(q12).



**Abbildung 8:** Klon a<sub>4</sub> der ZL H51 mit dem Karyotyp 46, XX, -13, +mar(8)(?), der(3) t(3;11;3;4)(q22;?;q34), der(4)t(4;11)(q34;?), der(8)t(8;13)(q21;q12), t(X;16)(p11;q21), t(3;11)(q22;q12), der(10)t(3;10)(p21;q24).

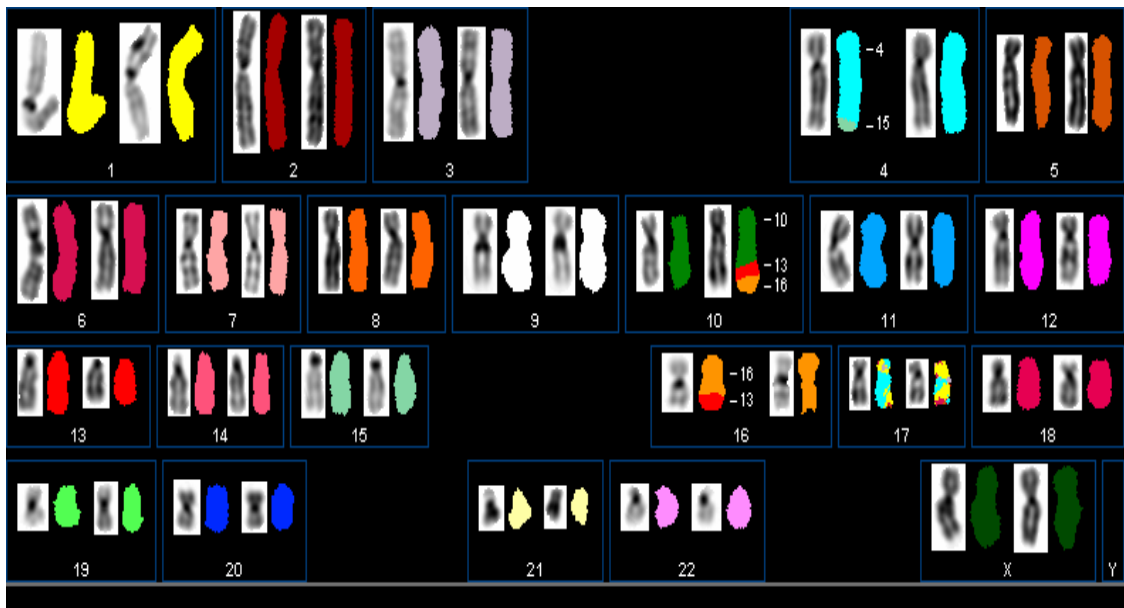


**Abbildung 9:** Klon  $b_1$  der ZLL H51 mit dem Karyotyp 46, XX, -13, +mar(2)(p?), der(2)t(2;13)(q24;q12).



**Abbildung 10:** Klon  $c_1$  der ZL H51 mit dem Karyotyp 47, XX, +12, t(15;16)(q23;q13).





**Abbildung 11:** Metaphase d der ZLL H51 mit dem Karyotyp 46, XX, der(4)t(4,15) (q35;q26), der(10)t(10;13;16)(q22;q31;q22), del(15)(q26), del(13) (q31).

### 3.2 Zelllinie SCH

In der Zellkultur durchlief die Zelllinie SCH insgesamt sieben Passagen bis zum Eintritt in das Stadium der Seneszenz. Nach der Formel aus 2.1.3 ergab sich somit näherungsweise eine durchschnittliche Populationsverdoppelung von  $PD = 7 \times 2 = 14$ . Dies entspricht einer deutlich reduzierten PD, in diesem Falle von etwa 26% im Vergleich zu Kontroll-FL-Zelllinien [19,48]. Die Zellkultur SCH wurde im Gegensatz zu den anderen Zellkulturen direkt nach Eintritt in die Seneszenz verworfen. Die Metaphasen wurden nach der Passage x+1 gewonnen, präpariert und mit SKY analysiert. Es wurden 10 Metaphasen ausgewertet. 2 Metaphasen hatten 46 Chromosomen und waren frei von Aberrationen. 8 Metaphasen waren pseudodiploid oder besaßen numerische Chromosomenaberrationen in Kombination mit strukturellen Veränderungen.

Insgesamt wurden 25 aberrante Chromosomen mit 36 sicher beurteilbaren chromosomalen Bruchpunkten an folgenden Abschnitten gefunden: Xp11, Xq12, Xq23, 1p22, 1q32, 2p11, 2q31, 3q26, 5q12, 5q13, 6q24, 7p21, 7q31, 3 x 9q13, 9q31, 10q12, 11p11, 11p13, 11p15, 11q12, 2 x 12p12, 2 x 12q24, 15q24, 16p13, 2 x 16q12, 3 x 16q22, 18q12, 21q21 und 22q12. 5 Bruchpunkte konnten nicht zugeordnet werden (an den Chromosomen 2, 9, 10, 16, 17). Die Chromosomen X, 2, 5, 11, 12 waren an je 3 (12%), Chromosom 9 an 5 (20%) und Chromosom 16 an 10 (40%) der 25 Aberrationen beteiligt. 2 der 10 aberranten Metaphasen wuchsen klonal (Klon a, Tabelle VIII). Die Mehrheit der Aberrationen waren reziproke, balancierte Translokationen.

Bei Klon a (2 aus 10 Metaphasen) (Abbildung 12) hatten beide Metaphasen den pseudodiploiden Chromosomensatz 46, XY. Er war gekennzeichnet durch die zwei reziproken Translokationen  $t(X;2)(q12;p11)$  und  $t(12;16)(q24;q12)$ .

Die Metaphase b (Abbildung 13) war eine schwierig zu analysierende Metaphase mit dem Karyotyp 46, XY,  $der(10)t(9;10)(?;?)$ ,  $der(22)t(16;22)(q?;q12)$ ,  $del(9)(q13)$ ,  $del(16)(q?)$ . Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich bei der nicht-reziproken Translokation  $t(9;10)(?;?)$  um  $t(9;10)(q13;p12)$ , allerdings erschien hierfür der an Chromosom 10 translozierte p-Arm des Chromosoms 9 in Relation zu dem unveränderten Chromosom 9 zu lang. Das Bruchstück von Chromosom 10 ging verloren. Weiterhin konnte der Bruchpunkt an dem Chromosom 16 nicht exakt definiert werden, zudem ging das Bruchstück von Chromosom 22 verloren, so dass demzufolge die nicht-reziproke Translokation  $t(16;22)(?;q12)$  nicht ausreichend klassifiziert werden konnte. Am ehesten brach Chromosom 16 an 16q12, allerdings war die DAPI-Färbung zwischen den beiden Schwesterchromosomen 16 zu unterschiedlich, um dies mit hinreichender Sicherheit aussagen zu können.

In der komplexen Metaphase c (Abbildung 14) mit dem Karyotyp 45, XY, -21,  $der(16)t(9;16)(q13;q12)$ ,  $t(1;12)(p22;p12)$ ,  $t(3;11)(q26;p13)$ ,  $t(5;18)(q13;q12)$ ,  $t(9;10)(q31;q12)$ ,  $del(9)(q13)$  waren die Translokationen  $t(1;12)(p22;p12)$ ,  $t(3;11)(q26;p13)$

und  $t(5;18)(q13;q12)$ ,  $t(9;10)(q31;q12)$  reziprok. Es zeigten sich jedoch auch instabile Rearrangements: Das distale Fragment von Chromosom 9 unterhalb des BP 9q13 lagerte sich an Chromosom 16 an. Es resultierten daraus die Deletion  $del(9)(q13)$  und das aberrante Chromosom  $der(16)t(9;16)(q13;q12)$ . Das Fragment unterhalb des BP 16q12 ging verloren. Zusätzlich beinhaltete die Metaphase c eine Monosomie 21.

Der singulären, pseudodiploiden Metaphase d (Abbildung 15) waren die zwei reziproken Translokationen  $t(1;2)(q32;q31)$  und  $t(X;16)(p11;q22)$  eigen.

Metaphase e (Abbildung 16) zeigte den komplexen pseudodiploiden Karyotyp 45, XY, -17, -17, +11,  $der(5)t(5;17)(q12;?)$ ,  $der(11)t(5;11)(q12;q12)$ ,  $der(11)t(11;15)(p11;q24)$ ,  $der(12)t(12;17)(p12;?)$ ,  $der(15)t(12;15)(p12;q24)$ ,  $t(X;16)(q23;q22)$ ,  $t(7;16)(q31;q12)$ , mit den zwei reziproken Translokationen  $t(X;16)(q23;q22)$ ,  $t(7;16)(q31;q12)$ , einer Trisomie 11 und dem Verlust des Chromosomenpaares 17. Abschnitte der Chromosomen 17 bzw. zwei der drei Chromosomen 11 waren teil komplexer, instabiler Rearrangements, die im Folgenden beschrieben werden. Das erste nicht sicher zu identifizierende Fragment des Chromosoms 17 lagerte sich an den BP 5q12 an. Das Fragment des Chromosoms 5 proximal des BP wiederum verband sich mit Chromosom 11 an dem BP 11q12. Der Teil von 11 proximal des BP ging verloren. Das zweite nicht sicher zu klassifizierende Fragment des Chromosoms 17 lagerte sich an den BP 12p12 an, das Bruchstück von 12 proximal des BP verschmolz mit Chromosom 15 an 15q24. Das Fragment distal dieses BP ging an 11q11 und hatte somit das Markerchromosom  $der(11)t(11;15)(p11;q24)$  zur Folge. Hier ging ebenfalls das Fragment von 11 proximal des BP verloren. Bei den Chromosomenbruchstücken von 17 könnte es sich um ein und dasselbe Chromosom handeln, dass möglicherweise am BP 17q21 zerbrach. Weiterhin könnte der Verlust zweier Abschnitte beider p-Arme des Chromosoms 11 die Entstehung der Trisomie 11 mitverursacht haben.

Metaphase f (Abbildung 17) zeigte den Karyotyp 45, XY, -20,  $der(16)t(6;16;16;11)(q24;p13;q22;p15)$ ,  $t(6;16)(q24;q22)$ ,  $t(7;12)(p21;q24)$ ,  $t(11;16)(p15;p13)$ , mit der Monosomie 20, der reziproken Translokation  $t(7;12)(p21;q24)$  und dem dreifach-

rekombinierten Chromosom der(16)t(6;16;16;11)(q24;p13;q22;p15), dessen jeweiligen Fragmente reziprok mit den jeweiligen Fragmenten von dem Chromosom 7 und dem Chromosom 11 translozierten.

Metaphase g (Abbildung 18) beinhaltete die Monosomie 22, das zusätzliche Markerchromosom mar(5)(?) sowie die reziproke Translokation t(2;21)(q?;q21). Der BP an 2 konnte aufgrund der etwas schlechteren Hybridisierungsqualität nicht genauer eruiert werden.

Zusammenfassend konnten in der Zelllinie SCH die für das Werner Syndrom typischen Veränderungen (Pseudodiploidie, Klonformation, reziproke Translokationen, aber auch instabile, multiple Aberrationen) entdeckt werden. Allerdings hätte es eine größere Anzahl von Metaphasen in verschiedenen Passagen bedurft, um gerade die Klonformationen genauer beurteilen zu können. Zwar konnte nur ein Klon (Klon a) verifiziert werden, jedoch wiesen mehrere Metaphasen gemeinsame Bruchpunkte auf, aus denen jedoch unterschiedliche Aberrationen hervorgingen (Tabelle X). Besonders sind hier die BP an Chromosom 16 (16q12, 16q22) hervorzuheben, die beide auffällig häufig vorkamen. Wenn Klone durch gemeinsame Bruchpunkte durch mindestens eine gemeinsame Aberration definiert würden, hätte dies in dieser Zelllinie eine deutlich höhere Anzahl an Klonen zur Folge gehabt.

<b>Klon</b>	<b>Anzahl der Metaphasen</b>	<b>Karyotyp</b>
a	2	46, XY, t(X;2)(q12;p11), t(12;16)(q24;q12).

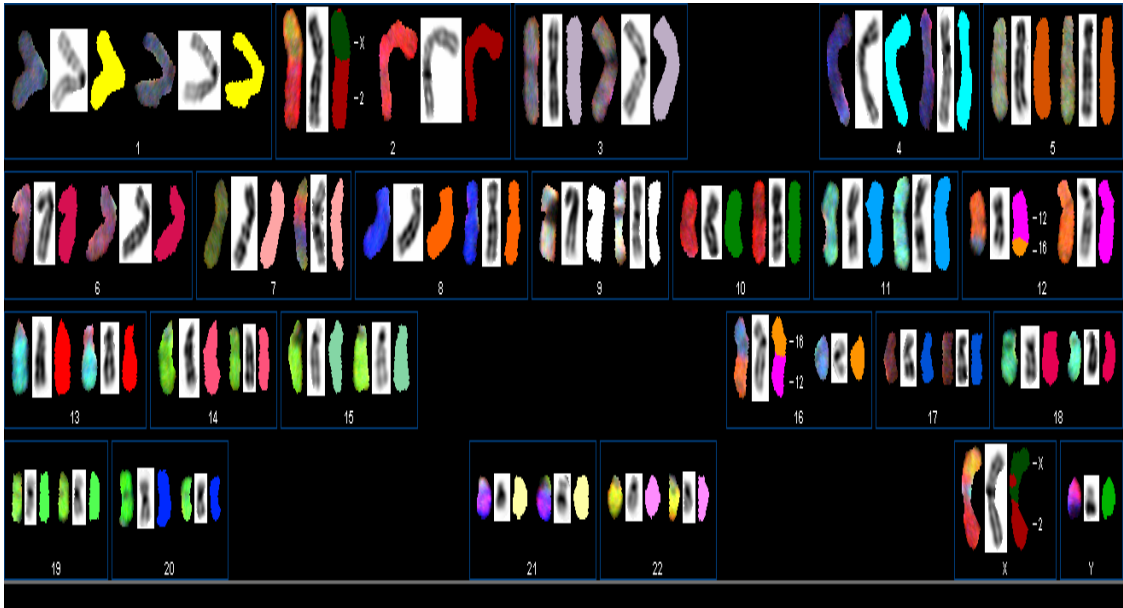
**Tabelle VIII:** Klon a der Zelllinie SCH war in der Passage x+1 (n=10) für 2 aberrante Metaphasen verantwortlich.

Metaphase	Anzahl der Metaphasen	Karyotyp
b	1	46, XY, der(10)t(9;10)(?;?), der(22)t(16;22)(q?;q12), del(9)(q13), del(16)(q?).
c	1	45, XY, -21, der(16)t(9;16)(q13;q12), t(1;12)(p22;p12), t(3;11)(q26;p13), t(5;18)(q13;q12), t(9;10)(q31;q12), del(9)(q13).
d	1	46, XY, t(1;2)(q32;q31), t(X;16)(p11;q22).
e	1	45, XY, -17, -17, +11, der(5)t(5;17)(q12;?), der(11)t(5;11)(q12;q12), der(11) t(11;15)(p11;q24), der(12)t(12;17)(p12;?), der(15) t(12;15)(p12;q24), t(X;16)(q23;q22), t(7;16)(q31;q12).
f	1	45, XY, -20, der(16)t(6;16;16;11)(q24;p13;q22;p15), t(6;16)(q24;q22), t(7;12)(p21;q24), t(11;16) (p15;p13).
g	1	46, XY, -22, +mar(5)(?), t(2,21)(q?;q21).

**Tabelle IX:** 8 der 10 Metaphasen waren in der Passage x+1 der Zelllinie SCH singuläre Metaphasen.

BP	Metaphasen
9q13	b, c
12p12	c, e
12q24	a, f,
16q12	a, (b), c, e
16q22	d, e, f

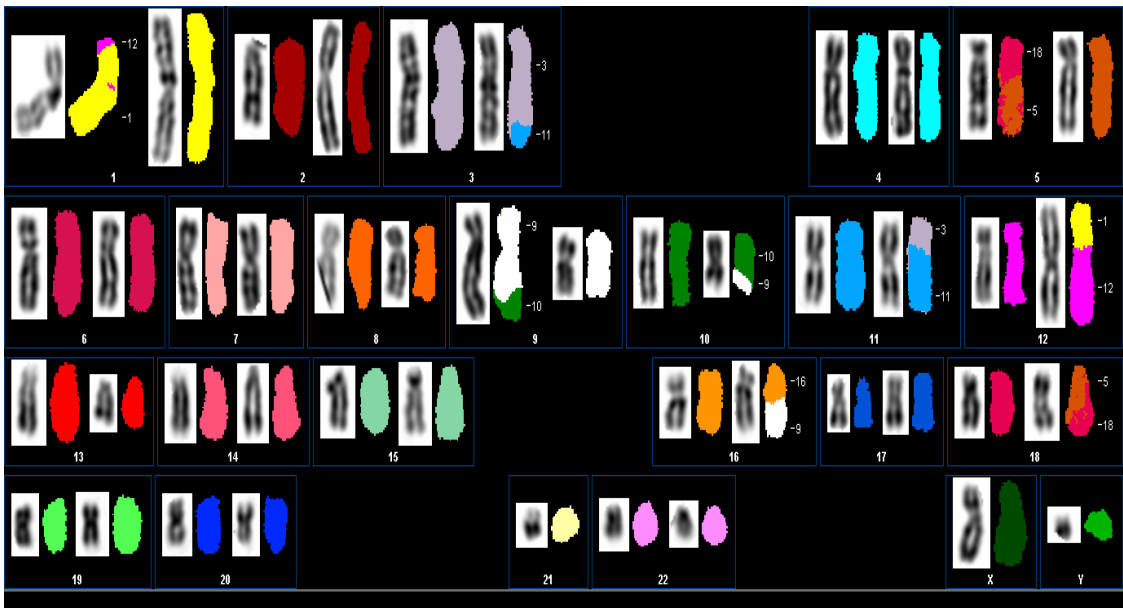
**Tabelle X** zeigt gemeinsame Bruchpunkte in den unterschiedlichen Metaphasen der Zelllinie SCH, die für unterschiedliche Aberrationen verantwortlich waren. In Klammern angegebene Metaphasen zeigen an dieser Stelle vermutete BP.



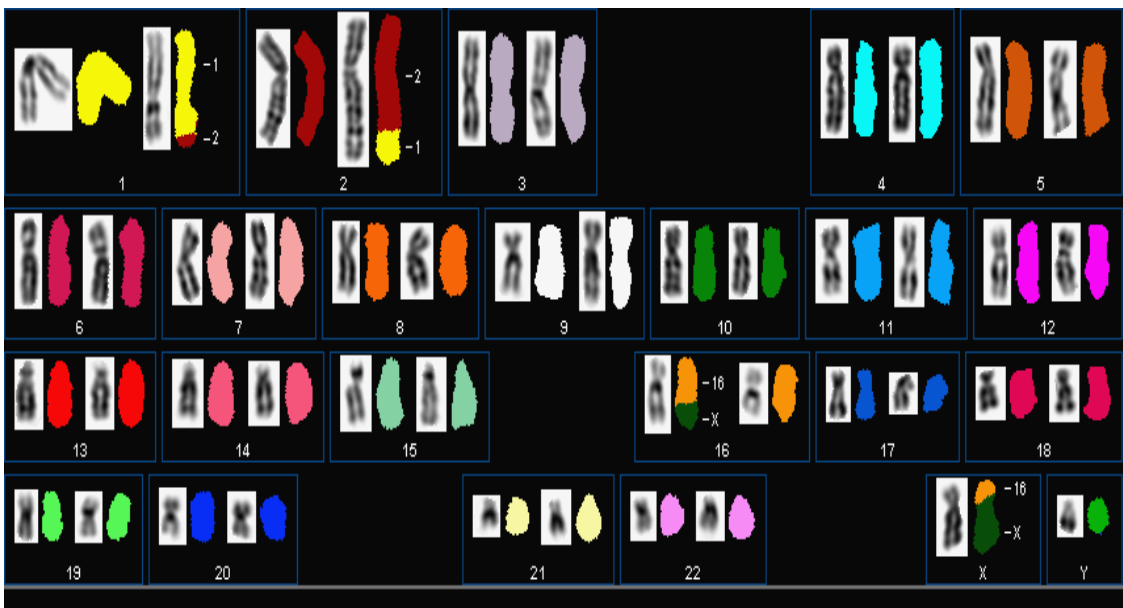
**Abbildung 12:** Klon a der ZLL SCH mit dem Karyotyp 46, XY, t(X;2)(q12;p11), t(12;16)(q24;q12).



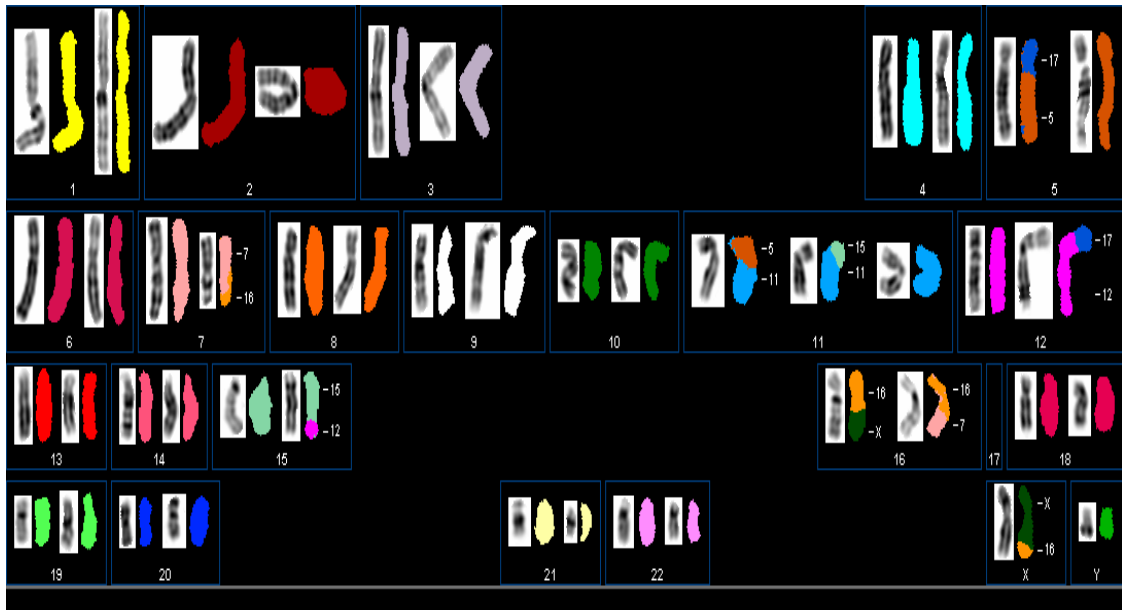
**Abbildung 13:** Metaphase b der ZL SCH mit dem Karyotyp 46, XY, der(10)t(9;10)(?;?), der(22)t(16;22)(q?;p12), del(9)(q13), del(16)(?).



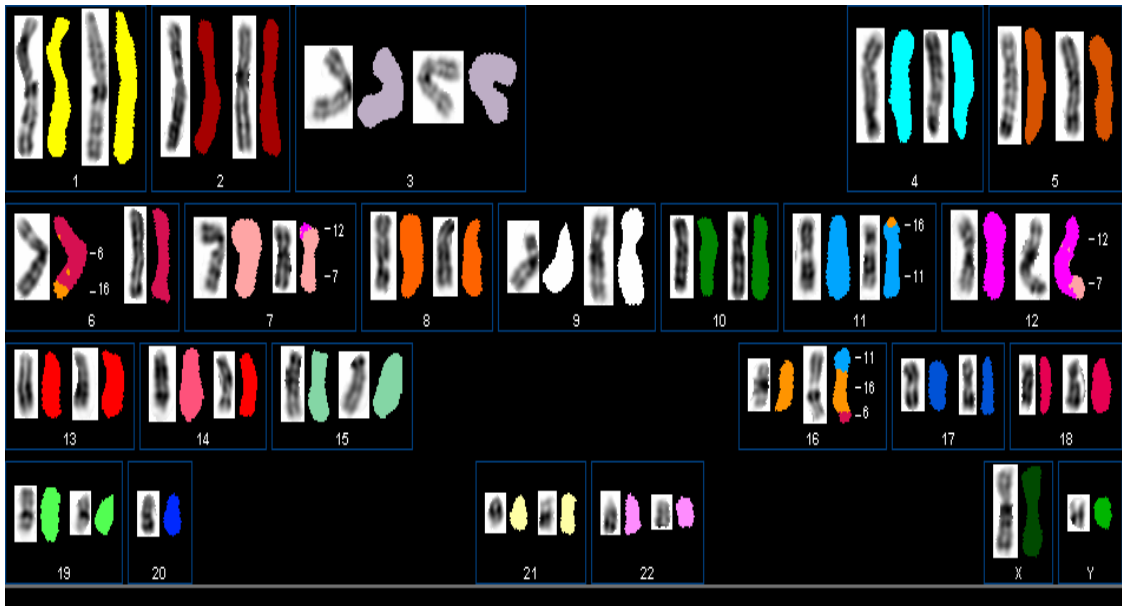
**Abbildung 14:** Metaphase c der ZLL SCH mit dem Karyotyp 45, XY, -21, der(16) t(9;16)(q13;q12), t(1;12)(p22;p12), t(3;11)(q26;p13), t(5;18)(q13;q12), t(9;10)(q31;q12), del(9)(q13).



**Abbildung 15:** Metaphase d der ZL SCH mit dem Karyotyp 46, XY, t(1;2)(q32;q31), t(X;16)(p11;q22).



**Abbildung 16:** Metaphase e der ZLL SCH mit dem Karyotyp 45, XY, -17, -17, +11, der(5)t(5;17)(q12;q?), der(11)t(5;11)(q12;q12), der(11)t(11;15)(p11;q24), der(12)t(12;17)(p13;?), der(15)t(12;15)(p12;q24), t(X;16)(q23;q22), t(7;16)(q31;q12).



**Abbildung 17:** Metaphase f der ZL SCH mit dem Karyotyp 45, XY, -20, der(16)t(6;16;16;11)(q24;p13;q23;p15), t(6;16)(q24;q23), t(7;12)(p21;q24), t(11;16)(p15;p13).





**Abbildung 18:** Metaphase g der ZLL SCH mit dem Karyotyp 45, XY, -22, +mar(5)(?), t(2;21)(q?:q21).

### 3.3 Zelllinie AA

In der Zellkultur durchlief die Zelllinie AA insgesamt acht Passagen bis zum Eintritt in das Stadium der Seneszenz. Nach der Formel aus 2.1.3 ergibt sich somit näherungsweise eine durchschnittliche Populationsverdoppelung von  $PD = 8 \times 2 = 16$ . Dies entspricht einer für WS-Zellen typischen reduzierten PD, in diesem Falle von etwa 30% im Vergleich zu Kontroll-FL-Zelllinien [19,48]. AA überlebte noch mehrere Monate in Kultur, ohne jedoch ihre Teilungsfähigkeit zurückzuerlangen. Die Metaphasen wurden direkt nach der ersten Passage (x+1) gewonnen, präpariert und anschließend mit SKY analysiert.

Insgesamt wurden 13 Metaphasen ausgewertet, 12 Metaphasen hatten 46 Chromosomen, Klon b<sub>2</sub> die Monosomie 17. 11 der 13 Metaphasen (≈85%) hatten chromosomale Aberrationen, zwei Metaphasen besaßen einen normalen Karyotyp. Insgesamt wurden 17 aberrante Chromosomen mit 23 sicher beurteilbaren

chromosomalen Bruchpunkten an folgenden Abschnitten gefunden: Xq26, 1p12, 1p32, 1q21, 2p13, 2q21, 3q13, 3q21, 4p16, 7p14, 8p22, 9q22, 10p11, 10p15, 10q24, 12p11, 13q21, 2x16q22, 17q21, 17q23, 17q25 und 19q13. Alle Bruchpunkte, bis auf das zusätzliche genetische Material des Chromosoms 1 konnten zugeordnet werden. Die Chromosomen 3, 16 und 17 waren an jeweils 3 ( $\approx 18\%$ ), die Chromosomen 1 und 2 an jeweils 5 der 17 Aberrationen ( $\approx 29\%$ ) beteiligt.

10 der 11 aberranten Metaphasen konnten in drei Klone zusammengefasst werden (Tabelle IX), zudem war eine singuläre Metaphase vorhanden. Die Mehrheit der Aberrationen waren reziproke, balancierte Translokationen.

Der dominierende Klon a (6 aus 13 Metaphasen) (Abbildung 19) war gekennzeichnet durch die zwei reziproken Translokationen  $t(9;16)(q22;q22)$  und  $t(17;19)(q21;q13)$ . Weiterhin zeigte Klon a einen zyklischen Austausch dreier Bruchstücke der Chromosomen 2, 3 und 16 (Abbildung 20): Chromosom 2 brach distal von dem BP 2q21. Dieses Bruchstück lagerte sich distal von 3q21 an. Das distale Fragment ab BP 3q21 wiederum translozierte an das Chromosom 16 am BP 16q22 und das distale Fragment ab 16q22 verband sich mit dem Chromosom 2 am BP 2q21. Es resultierten die Chromosomen  $der(2)t(2;16)(q21;q22)$ ,  $der(3)t(2;3)(q21;q21)$  und  $der(16)t(3;16)(q21;q22)$ . Zudem wurde in Klon a ein teilweiser Verlust von Chromosom 4 oberhalb des Bruchpunktes 4p16 und ein möglicher Zugewinn eines Teils von Chromosom 2 mit dem daraus resultierenden Markerchromosom  $der(4)t(2;4)(?;p16)$  beobachtet. Alternativ war das Chromosom 2 an zwei Stellen zerbrochen (q21 und q?) und das eine nicht näher identifizierte Fragment lagerte unter Verlust von 4p16 an Chromosom 4 an.

Im Gegensatz zu diesen komplexen Rearrangements des Klons a waren die beiden anderen Klone jeweils durch balancierte, reziproke Translokationen gekennzeichnet.

Bei Klon b (2 aus 13 Metaphasen) (Abbildung 21) waren dies die Translokationen  $t(1;10)(p12;p11)$  und  $t(10;10)(q24;p15)$ , bei Klon c (2 aus 13 Metaphasen) (Abbildung 22) allein die Translokation  $t(1;12)(q21;p11)$ .

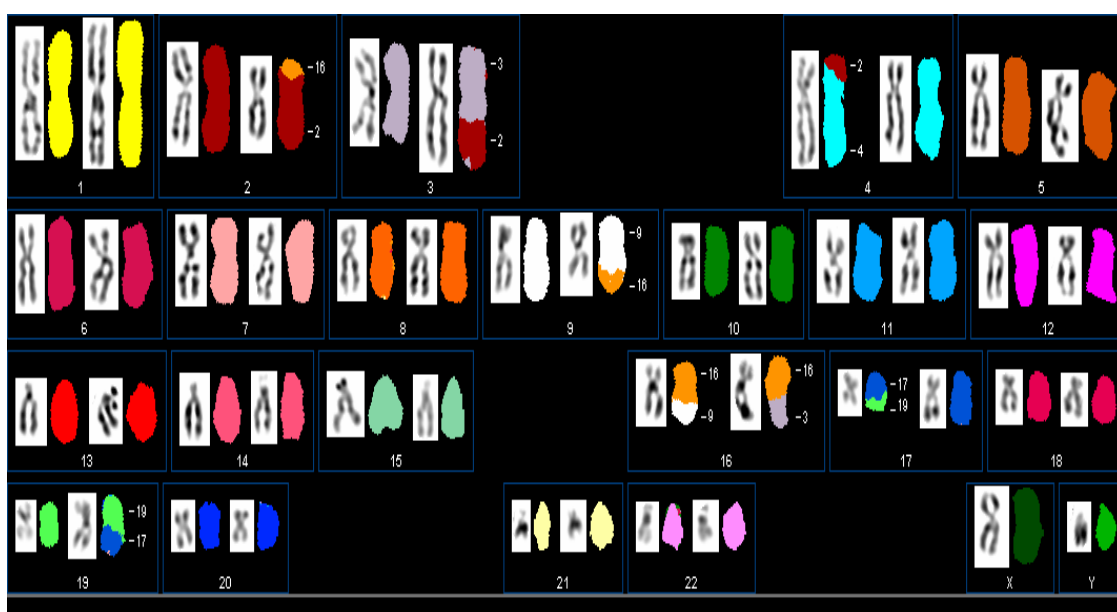
Metaphase d (Abbildung 23) zeigte einen einmaligen, komplexen Karyotyp mit einer reziproken Translokation  $t(3;17)(q13;q23)$  und folgenden komplexen Rearrangements: Ein Segment des Chromosoms 1 (distal von dem Bruchpunkt 1p32) lagerte sich an vier andere Chromosomen an. Es entstanden die Markerchromosomen  $der(1)t(1;8)(p32;p22)$ ,  $der(7)t(1;7)(?;p14)$ ,  $der(8)t(1;8)(?;p12)$  und  $der(17)t(1;17)(?;q23)$ . Die auf diesen Chromosomen neu angelagerten Segmente des Chromosoms 1 waren in der Summe deutlich größer als das verlorene Bruchstück 1p und sprechen für einen Zugewinn an genetischem Material. Des Weiteren konnte auch in dieser Metaphase ein Austausch von drei chromosomalen Bruchstücken, in diesem Fall von X, 2 und 13 entdeckt werden (Abbildung 24) mit den daraus resultierenden Markerchromosomen  $der(X)t(X;2)(q26;p13)$ ,  $der(2)t(2;13)(p12;?)$  und  $der(13)t(X;13)(?;q21)$ : Das Segment proximal von dem Bruchpunkt 2p12 lagerte sich unterhalb von Xq26 an. Das X – Segment distal von Xq26 brach insgesamt zwei Mal und band sich jeweils oberhalb und unterhalb an ein Fragment des Chromosoms 13. Das Segment des Chromosoms 13 lagerte sich wiederum an den Bruchpunkt 2p12 des Chromosoms 2 an. Ein kleiner Teil des Chromosoms 13 (ca. 10-20 Megabasen) ging verloren. Bei  $der(17)t(1;17)(?;q23)$  konnte zudem ein Verlust des distalen Abschnitts von Chromosom 17 beobachtet werden.

Klon	Anzahl der Metaphasen	Karyotyp
a	6	46, XY, $der(2)t(2;16)(q21;q22)$ , $der(3)t(2;3)(q21;q21)$ , $der(4)t(2;4)(?;p16)$ , $der(16)t(3;16)(q21;q22)$ , $t(9;16)(q22;q22)$ , $t(17;19)(q21;q13)$ .
b	2	-
b <sub>1</sub>	(1)	46, XY, , -17, $t(1;10)(p12;p11)$ , $t(10;10)(q24;p15)$
b <sub>2</sub>	(1)	45, XY, $t(1;10)(p12;p11)$ , $t(10;10)(q24;p15)$ .
c	2	46, XY, $t(1;12)(q21;p11)$ .

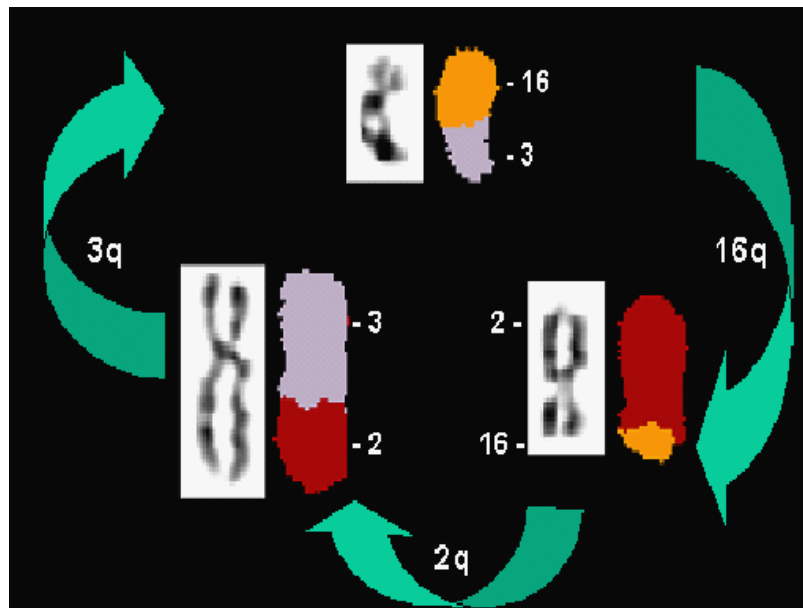
**Tabelle XI:** Drei Klone waren für 10 aberrante Metaphasen der Zelllinie AA (n = 13) in der Passage x+1 verantwortlich.

Metaphase	Anzahl der Metaphasen	Karyotyp
d	1	46, XY, der(X)t(X;2)(q26;p13), der(1)t(1;8)(p32;p22), der(2)t(2;13)(p13;q21), der(7)t(1;7)(?;p14), der(8)t(1;8)(?;p22), der(13)t(X;13)(q26;q21), der(17)t(1;17)(?;q23), t(3;17)(q13;q25).

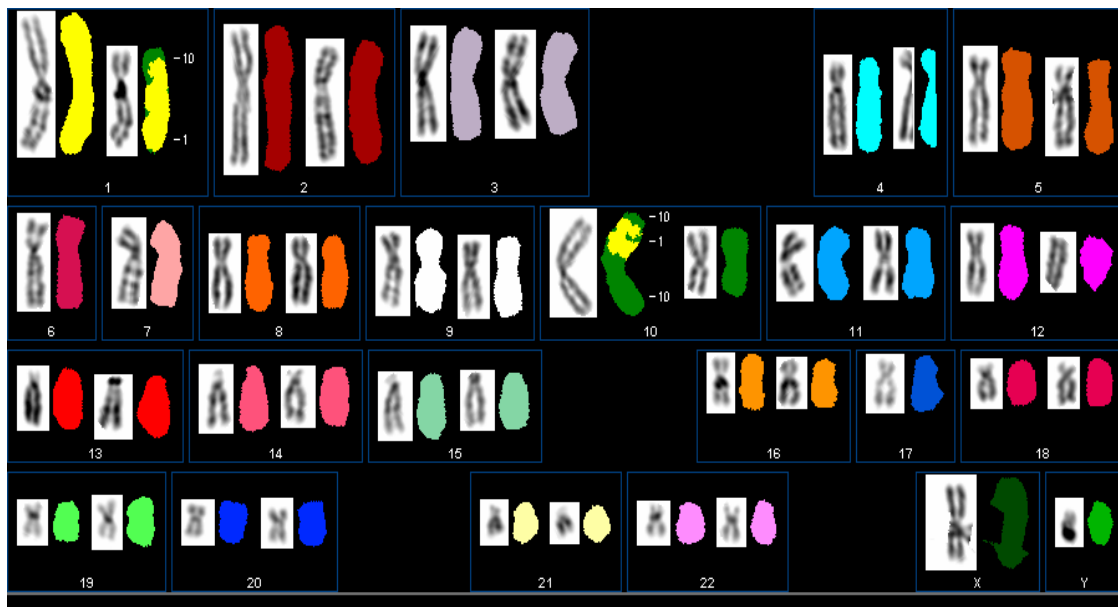
**Tabelle XII:** Die einzige singuläre Metaphase der Zelllinie AA in der Passage x+1.



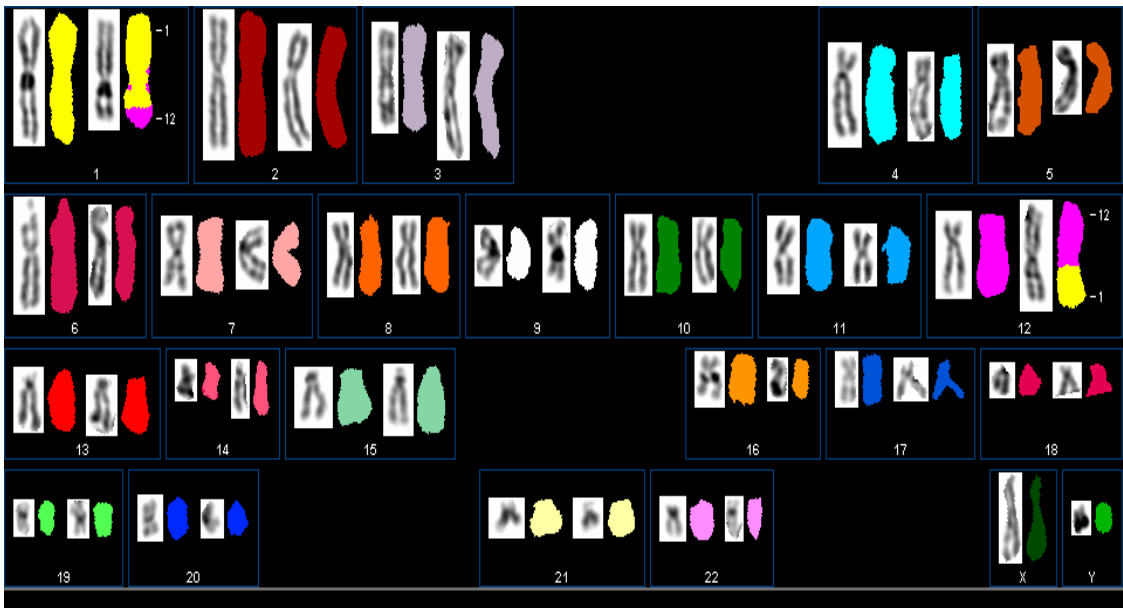
**Abbildung 19:** Klon a der ZLL AA mit dem komplexen Karyotyp 46, XY, der(2)t(2;16)(q21;q22), der(3)t(2;3)(q21;q21), der(4)t(2;4) (?;p16), der(16)t(3;16) (q21;q22), t(9;16)(q22;q22), t(17;19) (q21;q13). Man beachte den trizyklischen Austausch zwischen den Chromosomen 2, 3 und 16 (siehe auch Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Trizyklischer Austausch der Chromosomen 2,3 und 16 als Teil multipler Rearrangements die den Klon a charakterisieren.



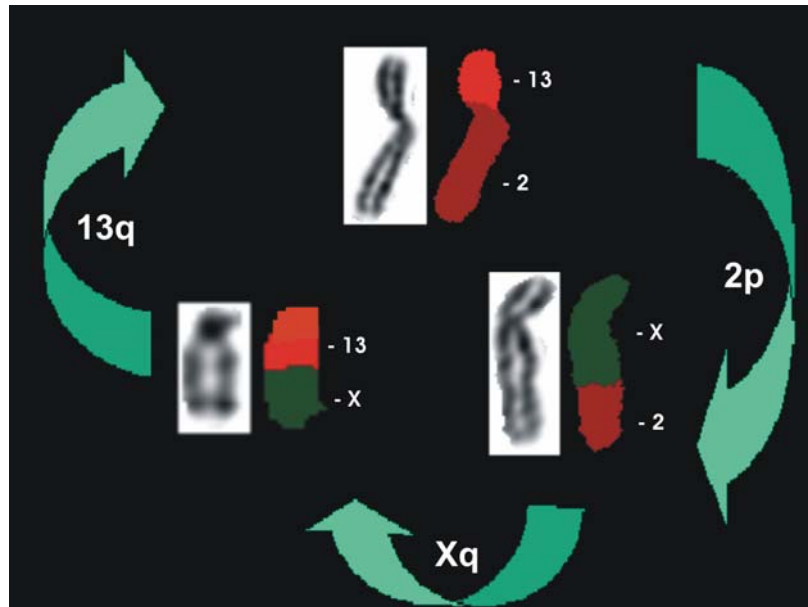
**Abbildung 21:** Klon b<sub>2</sub> der ZL AA mit dem Karyotyp 45, xy, -17, t(1;10)(p12;p11), t(10;10)(q24;p15).



**Abbildung 22:** Klon c der ZLL AA mit dem Karyotyp 46, xy, t(1;12) (q21;p11).



**Abbildung 23:** Metaphase d der ZLL AA mit dem komplexen Karyotyp 46, XY, der(X) t(X;2)(q26;p13), der(1)t(1;8)(p32;p22), der(2)t(2;13) (p13;q21), der(7)t(1;7)(?;p14), der(8)t(1;8)(?;p22), der(13) t(X;13)(q26;q21), der(17)t(1;17)(?;q23), t(3;17)(q13;q25). Man beachte den Zugewinn an chromosomalem Material des Chromosomes 1 und den zyklischen Austausch zwischen den Chromosomen X, 2 und 13.



**Abbildung 24:** Trizyklischer Austausch der Chromosomen X, 2 und 13 in Metaphase d der Zelllinie AA.

### 3.4. Zelllinie WL

Die Zelllinie WL wurde insgesamt achtmal subkultiviert bis Seneszenz eintrat. Nach der Formel aus 2.1.3. ergibt sich somit näherungsweise eine durchschnittliche Populationsverdoppelung von  $PD = 8 \times 2 = 16$  ( $\approx 30\%$  der PD von Kontroll-FL-Zelllinien) [19,48]. Die Metaphasen wurden direkt nach der ersten Passage (x+1) gewonnen, präpariert und anschließend mit SKY analysiert.

Es wurden 14 Metaphasen ausgewertet. Alle 14 Metaphasen hatten jeweils 46 Chromosomen. 13 der 14 Metaphasen ( $\approx 93\%$ ) beinhalteten Aberrationen, alle aberranten Metaphasen zeichneten sich durch klonales Wachstum mit insgesamt 4 identifizierten zytogenetischen Klonen aus. Die Mehrheit der Aberrationen waren reziproke, balancierte Translokationen (Tabelle XIII). Eine Metaphase war frei von sichtbaren pathologischen Veränderungen. Insgesamt wurden 12 aberrante Chromosomen mit 21 sicher beurteilbaren chromosomalen Bruchpunkten an folgenden

Abschnitten gefunden: 3q21, 4q25, 2 x 5q31, 6p21, 7q22, 2 x 8q22, 9p13, 12p13, 13q22, 3 x 15q15, 15q22, 16p11 und 4 x 16q22. 1 Bruchpunkt konnte nicht zugeordnet werden (an Chromosom X). Chromosom 15 war an 5 ( $\approx 42\%$ ) und Chromosom 16 an sechs (50%) der zwölf Rearrangements beteiligt.

Der in der Zelllinie WL dominierende Klon a (7 von 14 Metaphasen) (Abbildung 25) zeigte in allen Metaphasen drei reziproke, balancierte Translokationen:  $t(3;9)(q21;p13)$ ,  $t(5;15)(q31;q15)$  und  $t(8;16)(q22;q22)$ , es wurden keine zusätzlichen Aberrationen oder instabile Rearrangements gesehen.

Insgesamt vier Metaphasen zeigten unbalancierte Translokationen. Die Metaphasen des Klons b (2 von 14 Metaphasen) (ohne Abbildung) beinhalteten die Veränderung  $t(7;16)(q22;p11)$ ,  $del(15)(q22)$ ,  $der(12)t(12;15)(p13;q22)$ . Chromosom 12 verlor das Segment oberhalb von 12p13, gleichzeitig gewann das daraus resultierende Markerchromosom 15 das Segment ab 15q22.

Klon c (2 von 14 Metaphasen) (ohne Abbildung) zeigte die reziproken Translokationen  $t(13;16)(q22;q22)$  und  $t(15;16)(q15;q22)$ .

Klon d (2 von 14 Metaphasen) (ohne Abbildung) war neben den balancierten Rearrangements  $t(4;16)(q25;q22)$ ,  $t(5;16)(q31;q22)$  und  $t(8;15)(q22;q15)$  gekennzeichnet durch das Markerchromosom  $der(6)t(X;6)(q?p21)$  mit Verlust von 6p und Zugewinn eines Abschnittes an Chromosom Xq.

Auch innerhalb der Zelllinie WL hatten eine nicht unerhebliche Anzahl der Metaphasen klonübergreifende, gemeinsame Bruchpunkte. Im Einzelnen waren dies 5q31, 8q22, 15q15 und 16q22, aus denen jedoch unterschiedliche Aberrationen hervorgingen (Tabelle XIV). Besonders ist hier der BP 16q22 hervorzuheben, der bereits in den anderen Zelllinien, insbesondere der Zelllinie SCH in vielen Veränderungen vorkam.

Die Tatsache, dass all diese Bruchpunkte in den Klone a und d vorkamen legt den Schluss nahe, dass die Chromosomen zunächst an diesen „hot spots“ zerbrochen waren,



sich konsekutiv an andere Chromosomenfragmente anlagerten, und dann unterschiedliche Translokationen entstanden.

Klon	Anzahl der Metaphasen	Karyotyp
a	7	46, XY, t(3;9)(q21;p13), t(5;15)(q31;q15), t(8;16)(q22;q22).
b	2	46, XY, der(12)t(12;15)(p13;q22), t(7;16)(q22;p11), del(15)(q22).
c	2	46, XY, t(13;16)(q22;q22), t(15;16)(q15;q22).
d	2	46, XY, der(6)t(X;6)(q?p21), t(4;16)(q25;q22), t(5;16)(q31;q22), t(8;15)(q22;q15).

**Tabelle XIII:** 4 Klone waren für 13 aberrante Metaphasen der Zelllinie WL (n = 14) der Passage x+1 verantwortlich.

BP	Klone
5q31	a, d
8q22	a, d
15q15	a, c, d
16q22	a, c, d

**Tabelle XIV** zeigt gemeinsame Bruchpunkte, die in den unterschiedlichen Klonen der Zelllinie WL für unterschiedliche Aberrationen verantwortlich waren.



**Abbildung 25:** Klon a der Zelllinie WL mit dem Karyotyp 46, xy, t(3;9) (q21;p13), t(5;15)(q31;q15), t(8;16)(q22;q22).

### 3.5 Entstehung eines postsenszenten Subklon T aus der WS Zelllinie WL

Nach Erreichen der Seneszenz wurden alle Zelllinien noch mehrere Wochen kultiviert. Bei einer letzten Prüfung unter dem Mikroskop wurde eine Veränderung in der Zelllinie WL beobachtet. In einer der 75cm<sup>2</sup> Flaschen formierte sich, inmitten von Zelltrümmern und mehrheitlich seneszenten Zellen der Mutterkultur, ein aktiv teilender zusammenhängender rundlicher Zellverband.

Morphologisch waren sich die Zellen dieser neuen Subkultur untereinander sehr ähnlich, jedoch waren sie deutlich kleiner und schlanker als die benachbarten, seneszenten Zellen. Sie zeigten auch kaum mehr Ähnlichkeit mit dem spindeligen Aussehen bzw. mit dem typischen Wachstum von Fibroblasten. Aus dem Zellverband konnte eine neue Zellkultur angesetzt werden, die drei Wochen weiter wuchs. In dieser Zeit wurden etwa 10<sup>4</sup> Zellen subkultiviert. Dies entspricht ca. 13 zusätzlichen

Populationsverdoppelungen im Vergleich zur Mutterkultur WL, aus der sich der Klon als Massenkultur etablierte (= Klonformation).

Nach der Formation wurde der Klon nach acht weiteren Passagen ( $\approx 16$  PD's) seneszent. Acht Wochen nachfolgender Beobachtung der Kultur zeigten typische, postseneszente Zellen ohne Teilungsaktivität.

Insgesamt erreichte der Klon ein ungewöhnliches Wachstumspotential von etwa 45 Populationsverdoppelungen (16 der Mutterkultur WL, 13 in der Phase der Klonformation und 16 Verdoppelungen in der nachfolgenden Massenkultur) und überschritt damit die für WS-Fibroblasten üblichen 20 PD's um mehr als das Doppelte. Jedoch lag sein Wachstum noch unter der durchschnittlichen Populationsverdoppelung normaler Kontrollfibroblasten, die etwa 54 PD's beträgt [19,48].

Es wurde insgesamt fünfmal versucht Chromosomen aus der Kultur zu gewinnen und mit SKY zu analysieren. Aus ungeklärten Gründen bereitete v.a. die Hybridisierung deutlich größere Probleme, als bei der Mutterkultur und den anderen Zelllinien. Nur einmal, nämlich direkt nach der Klonformation, nach etwa 29 PD's, konnten fünf Metaphasen zuverlässig beurteilt werden.

Die zytogenetische Untersuchung nach 29 PD's ergab einen pseudotetraploiden Karyotyp mit 87-90 Chromosomen. Eine Tetrasomie wurde für alle autosomalen Chromosomen festgestellt. Ausnahmen waren die Chromosomen 4 und 6, die bei allen Metaphasen in dreifacher Ausführung vorhanden waren. Einmalig war ein Verlust von Chromosom  $der(9)t(3;9)(q21;p13)$  und von Chromosom 14 zu vermerken, und wahrscheinlich zufällig bedingt waren (random loss). Die Geschlechtschromosomen X und Y waren jeweils zweimal vertreten. Alle Metaphasen zeigten dieselben strukturellen Aberrationen wie Klon a der Mutterkultur WL (Abbildung 25). Die reziproken Translokationen  $t(8;16)(q22;q22)$ ,  $t(5;15)(q31;q15)$  und  $t(3;9)(q21;p13)$ , allerdings im Gegensatz zu WL in jeweils zweifacher Ausführung.

Die Entwicklung einer Subkultur mit klonalem Wachstum, entstanden aus einer einzigen genomisch veränderten „Gründerzelle“ konnte somit beobachtet werden und wurde als Subklon T der Zelllinie WL definiert (Abbildung 26).



**Abbildung 26** zeigt den Subklon T, hervorgegangen aus der postreplikativen Zelllinie WL, mit dem pseudotetraploiden Karyotyp 89, xxyy, -4, -6, t(8;16)(q22;q22), t(5;15)(q31;q15) und t(3;9)(q21;p13). Eine Tetrasomie wurde bei allen Autosomen beobachtet, außer bei den Chromosomen 4 und 6. Chromosom 14 fehlt, war jedoch bei allen anderen Metaphasen vorhanden (random loss).

### 3.6 Auswertung und Bruchpunktanalyse aller vier Zelllinien

Die 4 FL-Zellkulturen hatten einen für das WS typischen, reduzierten Prozentsatz an Populationsverdopplungen im Vergleich zu Nicht-WS-Zellsträngen (27-33%).

Nur 9 ( $\approx 13\%$ ) der insgesamt 69 Metaphasen waren frei von Chromosomenaberrationen. 78 aberrante Chromosomen waren für die Entstehung von 11 zytogenetischen Klonen und deren Subklonen sowie 10 singulären, aberranten Metaphasen verantwortlich. Der Prozentsatz an veränderten Metaphasen bewegte sich im Intervall zwischen 80% und 93%, der Prozentsatz an Metaphasen pro Zelllinie mit klonalem Wachstum zwischen 20% und 93%, wobei, wie bereits bei SCH in dem Abschnitt 3.2. besprochen, identische Bruchpunkte der Metaphasen von SCH verschiedene Aberrationen zur Folge hatte und somit den sehr niedrigen Wert von 20% zumindest teilweise erklären.

Die Mehrheit der Metaphasen waren pseudodiploid (71%). Die meisten aneuploiden Zellen waren das Resultat von artifiziellen Artefakten („overspreading“), von dem Vorhandensein zusätzlicher Markerchromosomen (in H-51 und in SCH) und von Hypo- bzw. Hyperploidien (in H-51, SCH und AA), die gleichzeitig mit strukturellen Veränderungen in diesen Metaphasen auftraten.

22 Metaphasen hatten  $\geq 3$  strukturelle Aberrationen, 8 davon waren singuläre Metaphasen, 14 Metaphasen davon wuchsen klonal (6 in Klon a in AA, 6 in Klon a bzw. 2 in Klon d in WL). Die klonal wachsenden Metaphasen trugen in der Regel stabile, zumeist reziproke Translokationen ohne Veränderung der Summe an genetischem Material. Im Gegensatz dazu beinhalteten die meisten singulären Metaphasen zumeist nicht-reziproke Rearrangements mit Zugewinn und Verlust an genetischem Material. Komplexe Rearrangements wurden in der untersuchten späten Passage (H-51, x+7) nicht gefunden (Tabelle XV).

Es wurden keine instabilen Aberrationen gefunden (Ringe, dizentrische oder azentrische Fragmente) auch keine Chromatidaustausche. Nur ein Chromatidbruch (in  $a_4$  der Passage x+7 der Zelllinie H-51) konnte detektiert werden.

Zelllinie	Anzahl an MP	Chromosomenzahl				46, XX oder 46, XY (normal)	Strukturelle Aberrationen				
		≤45	46	47	Klonal				Singular		
					a		b	c		d	
H-51	32	6	21	1	4	(20)	(3)	(2)	-	3	
SCH	10	3	5	-	2	2	-	-	-	6	
AA	13	1	10	-	2	6	(2)	2	-	1	
WL	14	-	13	-	1	7	2	2	2	-	
<b>SUMME</b>	<b>69</b>	<b>10</b>	<b>49</b>	<b>1</b>	<b>9</b>		<b>50</b>			<b>10</b>	

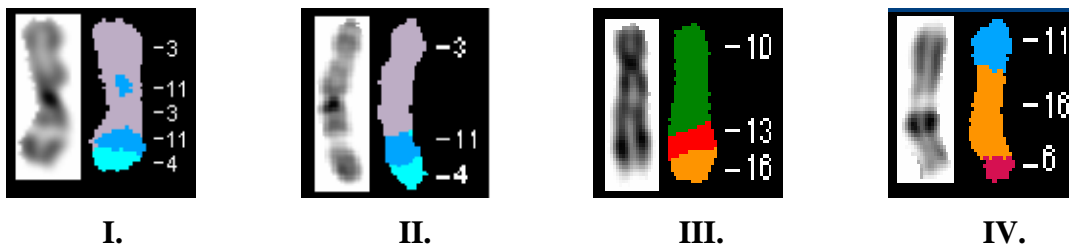
**Tabelle XV:** Frequenz numerischer und struktureller Chromosomenaberrationen sowie Anzahl normaler, klonaler und singularer Metaphasen in den 4 mit SKY untersuchten Zelllinien. Die Nummern in Klammern geben Metaphasen mit mindestens einer identischen, aber auch zusätzlichen, von einander unterschiedlichen Rearrangements an, deren Veränderungen eine detailliertere Einteilung in jeweilige Subklone erforderlich machten (siehe auch Einzelanalysen in 3.1-3.4).

Die Mehrheit der strukturellen Aberrationen waren balancierte, reziproke Translokationen. Es fand sich kein spezifisches Verteilungsmuster bestimmter Translokationen. Keine Translokation trat zweimal oder häufiger in identischer Form auf. Der Rest an strukturellen Aberrationen waren Deletionen und nicht-reziproke Translokationen, die wiederum jeweilig zumeist gekennzeichnet waren durch einen Verlust bzw. einem Zugewinn an chromosomalen Material und jeweilig in der Mehrheit derivative Chromosomen zur Folge hatten.

In der Zelllinie AA wurden in Klon a und der Metaphase d bisher noch nie dokumentierte trizyklische Chromosomenaustausche (zwischen 2, 3 und 16 (Abbildung 20) bzw. X, 2, 13 (Abbildung 24)) gefunden.

Ebenfalls noch nie dokumentiert wurde das Vorhandensein von dreifach-rekombinanten Chromosomen, die in Abbildung 27 noch einmal hervorgehoben werden: I. bzw. II. waren in a<sub>3</sub> bzw. a<sub>4</sub> der Zelllinie AA vorhanden und schienen klonal

zu wachsen, allerdings wurde in I. ein fraglicher, zusätzlicher, nicht in II. gefundener, zentromernaher Einbau von genetischem Material von Chromosom 11 gesehen. Ob dies ein Hybridisierungsartefakt oder ein authentischer, rekombinierter Chromosomenabschnitt war, konnte nicht mit hinreichender Sicherheit festgestellt werden. Für das WS untypisch wäre, dass hier kein Doppelstrangbruch vorgelegen hatte. Mit dieser fraglich neuen Rekombination wurden insgesamt 4 dreifach-rekombinierte Chromosomen gefunden. Interessanterweise waren an diesen Veränderungen je dreimal Chromosom 11 und zweimal 16 beteiligt.



**Abbildung 27:** Dreifach-rekombinante Chromosomen:

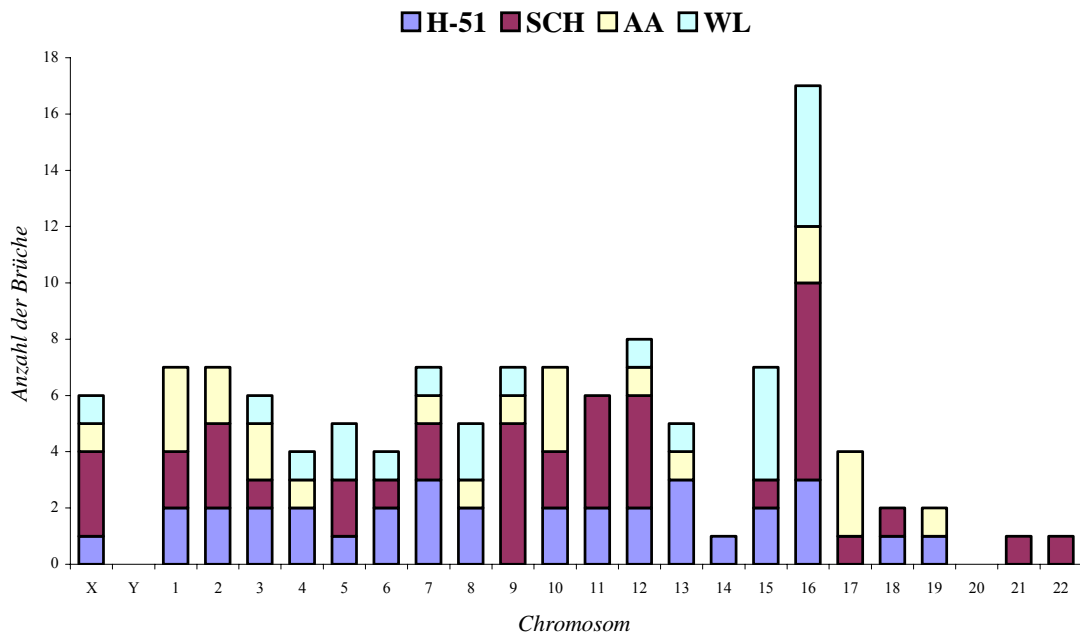
- I.** in H-51, x+2, Klon a<sub>3</sub>:  
 46, XX, -13, +mar(8)(?), der(3)t(3;11;3;11;4)(q22;?;?;?;q34),  
 der(11)t(3;11)(q22;q12), der(4)t(4;11)(q34;?), der(8)t(8;13)  
 (q21;q12), der(12)t(5;12)(?;q22), t(X;16)(p11;q22), del(19)(q12).
- II.** in H-51, x+2, Klon a<sub>4</sub>:  
 46, XX, -13, +mar(8)(?), der(3)t((3;11;4)(q22;?;q34), der(4)  
 t(4;11)(q34;?), der(8)t(8;13)(q21;q12), der(11)t(3;11)(q22;q12),  
 t(X;16)(p11;q22), der(10)t(3;10)(p21;q24).
- III.** in H-51, x+2, Metaphase d:  
 46, XX, der(4)t(4;15)(q35;q26), der(10)t(10;13;16)  
 (q22;q31;q22), t(13;16)(q31;q22), del(15)(q26), del(13)(q31).
- IV.** in SCH, x+1, Metaphase f:  
 45, XY, -20, der(16)t(6;16;11)(q24;p13→q22;p15), t(6;16)  
 (q24;q22), t(7;12)(p21;q24), t(11;16)(p15;p13).

Von strukturellen Aberrationen waren nahezu alle Chromosomen betroffen. Ausnahmen waren nur die Chromosomen Y und 20, die nie beteiligt waren. 11 Chromosomen beinhalteten  $\geq 6$  Brüche und machten mit 85 Brüchen ungefähr 71% der insgesamt 119 Brüche aus. Gerade die Chromosomen 9, 10, 12, 15 und 16 waren, gemessen an ihrer relativ geringen Chromosomengröße, überdurchschnittlich häufig beteiligt, was für eine nicht-zufällige Verteilung der Brüche spricht. Bei einer zufälligen Verteilung, hätte jedes Chromosom durchschnittlich etwa 5 Brüche (multipliziert mit einem Größenkoeffizienten, der hier nicht berücksichtigt wird) beinhalten müssen. V.a. Chromosom 16 verursachte mit 17 Bruchpunkten ( $\approx 14\%$ ) den mit Abstand größten Anteil an Aberrationen. In 23 von insgesamt 78 aberranten Chromosomen ( $\approx 29\%$ ) war das Chromosom 16 vorhanden, was dessen außergewöhnlich hohe Involvierung in die rekombinanten Prozesse zeigt.

Eine weiterer Hinweis für eine nicht-zufällige Verteilung der Bruchpunkte war die Tatsache, dass 5 Chromosomen (X, 3, 7, 12, 16) in allen Zelllinien an Aberrationen beteiligt waren.

Fasst man die allgemeine Bruchpunktanalyse zusammen (die Anzahl der Bruchpunkte pro Chromosom sowie die Beteiligung einzelner Chromosomen in allen Zelllinien an aberranten Chromosomen) waren die Chromosomen X, 3, 7, 10, 12, 15 und 16, insbesondere 12 und 16 „Hauptverursacher“, struktureller Veränderungen (Abbildung 27 und Tabelle XVI).



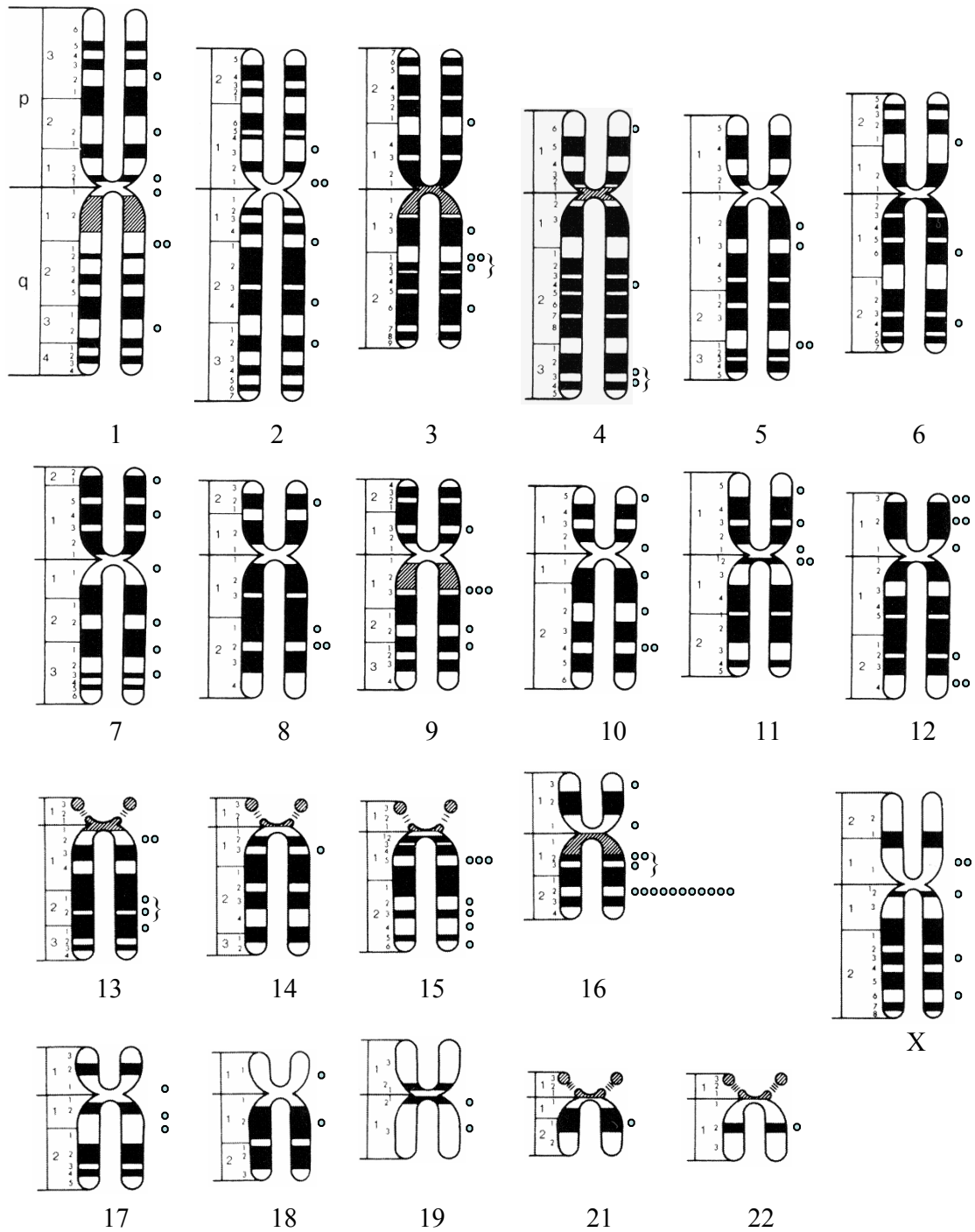


	X	Y	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	SUMME
<i>H-51</i>	1	0	2	2	2	2	1	2	3	2	0	2	2	2	3	1	2	3	0	1	1	0	0	0	<b>34</b>
<i>SCH</i>	3	0	2	3	1	0	2	1	2	0	5	2	4	4	0	0	1	7	1	1	0	0	1	1	<b>41</b>
<i>AA</i>	1	0	3	2	2	1	0	0	1	1	1	3	0	1	1	0	0	2	3	0	1	0	0	0	<b>23</b>
<i>WL</i>	1	0	0	0	1	1	2	1	1	2	1	0	0	1	1	0	4	5	0	0	0	0	0	0	<b>21</b>
<b>SUMME</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>17</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>119</b>

**Abbildung 27 und Tabelle XVI** zeigen die Anzahl der Brüche pro Chromosom in den einzelnen Zelllinien sowie in der Summe: Die Chromosomen 9, 10, 12, 15 und 16 waren überdurchschnittlich häufig für strukturelle Aberrationen verantwortlich. Die Chromosomen X, 3, 7, 12 und 16 waren an den Aberrationen in allen untersuchten Zelllinien beteiligt, 12 und 16 beinhalteten die meisten Bruchpunkte.

119 chromosomale Doppelstrangbrüche wurden detektiert, 108 davon konnten mit SKY sicher zugeordnet werden, die Klassifikation von 11 Brüchen gelang nicht (siehe 3.1-3.5). Diese 119 Brüche waren über das gesamte Genom verteilt. Teilweise brachen jedoch die Chromosomen mehrfach an bestimmten Bruchpunkten. Daraus resultierten Deletionen, reziproke und nicht-reziproke Translokationen. Die Gesamtzahl verschiedener Bruchpunkte betrug 77.

Betrachtete man die einzelnen klassifizierten Bruchpunkte der verschiedenen Chromosomen genauer, konnte auch hier eine nicht-zufällige Verteilung dieser festgestellt werden. Waren 59 ( $\approx 55\%$ ) der 108 Brüche nur an einmaligen Bruchpunkten vorhanden, resultierten aus 18 Bruchpunkten die restlichen 49 Brüche ( $\approx 45\%$ ). 13 chromosomale Abschnitte beinhalteten 2, und 4 Abschnitte 3 Brüche. Im Einzelnen waren dies die Abschnitte 3q11 $\rightarrow$ q12, 9q13, 15q15, 16q12 $\rightarrow$ q13. Eine Frequenz  $>3$  hatte ausschließlich ein Bruchpunkt, nämlich 16q22. Dieser vermutliche „hot spot“ war hauptsächlich für die hohe Beteiligung des Chromosoms 16 an den strukturellen Aberrationen verantwortlich, brach sogar 11mal und war als einziger Bruchpunkt in allen 4 Zelllinien vorhanden. Mit den betroffenen Bruchpunkten mit einer Bruchfrequenz von  $\geq 3$  trugen zusammengenommen fünf Abschnitte Rechnung für  $\approx 21\%$  der Gesamtzahl an Bruchpunkten. Gemessen an der Gesamtgröße des Genoms von etwa 3000 Megabasen, erscheint ein zufälliges Verteilungsmuster der Brüche als äußerst unwahrscheinlich. Bezog man größere Chromosomenanschnitte in die Analyse mit ein, gab es weitere interessante Regionen, nämlich 3q13 $\rightarrow$ q26 (4 Bruchpunkte), 8q21 $\rightarrow$ q22 (3 Bruchpunkte), 9q13 $\rightarrow$ q31 (5 Bruchpunkte), 11cen (3 Bruchpunkte), 12p11 $\rightarrow$ 12tel (5 Bruchpunkte) und 15q21 $\rightarrow$ 15q26 (4 Bruchpunkte), so dass auch hier der Eindruck einer erhöhten Fragilität entstand (Abbildung 28 und Tabelle XVII.).



**Abbildung 28:** Verteilung der an den strukturellen Chromosomenaberrationen beteiligten Abschnitte: 108 auswertbare Bruchpunkte in 69 Metaphasen der 4 untersuchten Zelllinien. Einige „Sites“ wurden in der Einzelbruchpunktanalyse als eine Bruchstelle gewertet (symbolisiert durch die geschweiften Klammern).

Bruchfrequenz	Chromosomenbande der Aberration	Gesamtzahl an Bruchpunkten
1	siehe Abbildung 55	59
2	siehe Abbildung 55	13
3	3q11→q12, 9q13, 15q15, 16q12→q13	4
11	16q22	1
SUMME		77

**Tabelle XVII:** Übersicht über die Bruchfrequenz, die Lokalisation und die Anzahl der Bruchpunkte.

## **4.0 DISKUSSION**

### **4.1 „Variegated Translocation Mosaicism“ als charakteristischer Befund beim Werner-Syndrom**

Die in dieser Arbeit vorgetragenen Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen früherer Studien [8,27-31] insofern überein, dass Metaphasen von WS Fibroblasten einen vornehmlich pseudodiploiden Karyotyp mit multiplen, variablen, größtenteils stabilen strukturellen Chromosomenaberrationen, aber auch einigen instabilen Rearrangements aufweisen und zu einem überwiegenden Prozentsatz klonal wachsen. Damit einhergehen wenige Metaphasen die keine sichtbaren Veränderungen tragen. Diese Charakteristika entsprechen dem zytogenetischen Kennzeichen des WS in Form des „Variegated Translocation Mosaicism“ und reflektieren die scheinbar verminderte Fähigkeit von WRNp aberrante DNA-Strukturen, die während der DNA-Replikation und der DNA-Reparatur entstehen, wieder in korrekter Art und Weise aufzulösen [49]. Alle 4 untersuchten Zelllinien (H-51, SCH, AA, WL), insbesondere H-51, bei der auch die spätere Passage x+7 analysiert wurde, waren charakterisiert durch einen einzigen dominanten Klon, der zumeist begleitet war von multiplen kleineren Klonen (Ausnahme: Zelllinie SCH) und bestätigen somit die weiteren zytogenetischen Eigenschaften des WS in Form der „clonal attenuation“, der „clonal succession“ und der „clonal expansion“ [27,28].

Der Prozentsatz unveränderter und aberranter Metaphasen war im Vergleich zu der ausführlichsten Studie von Salk et al. [28] im Wesentlichen identisch. Auch die Klonanzahl bzw. die Anzahl an singulären aberranten Metaphasen stimmten größtenteils überein. Allerdings war innerhalb der Klone eine teilweise deutlich höhere Varianz an zusätzlichen, singulären Aberrationen beobachtbar und machte eine stärkere Aufspaltung in Subklone erforderlich. Diese einzelnen Subklone wiederum waren zumeist nur einmalig vertreten.

Bezüglich der Klonanzahl war die Zelllinie SCH die einzige Ausnahme und unterschied sich von den Ergebnissen in [28]. Es wuchsen nur 20% der Zellen

eindeutig klonal. In SCH wurden jedoch 5 Bruchpunkte gefunden, die jeweilig unterschiedliche strukturelle Aberrationen in unterschiedlichen Metaphasen zur Folge hatten (siehe Tabelle X). Diese Beobachtung wurde ebenfalls in den Zelllinien H-51 (Tabelle VII) und WL (Tabelle XIV) gemacht, allerdings hatten sich hier bereits weitere Klone entwickelt („formiert“).

Art und Anzahl der Klone können im Allgemeinen von Patient zu Patient, von Zelllinie zu Zelllinie, aber auch innerhalb einer einzigen Zelllinie stark variieren. Am wahrscheinlichsten ist, dass die Zellen in SCH in einem sehr frühen Stadium erfasst wurden („clonal attenuation“) und erst im Verlauf weiterer Zellteilungen „clonal succession“ und „clonal expansion“ stattfanden. Die Zelllinie SCH wurde jedoch in dieser Arbeit nicht in weiteren Passagen untersucht, sodass dies nur als Hypothese gelten kann. SCH zeigte alle weiteren Charakteristika für das WS (ein hoher Prozentsatz aberranter Metaphasen, Pseudodiploidie, ein hoher Anteil reziproker Translokationen, aber auch instabile Rearrangements).

Die Chromosomen X, 1, 2, 3, 7, 9, 10, 12, 15 und 16 beinhalteten  $\geq 6$  Brüche in den 69 Metaphasen und waren in  $\geq 3$  der 4 Zelllinien an Chromosomenaberrationen beteiligt.

V.a. Chromosom 16 war mit 17 Bruchpunkten ( $\approx 14\%$ ) mit Abstand am häufigsten involviert. In 23 von insgesamt 78 aberranten Chromosomen ( $\approx 29\%$ ) war Chromosom 16 beteiligt. Zudem war es Partner bei 2 der 3 dreifach-rekombinierten Chromosomen und bei einem der zwei trizyklischen Chromosomenaustausche.

An dieser Stelle soll eine Untersuchung erwähnt werden, die 2001/02 in den Laboratorien von Professor Monnat und Professor Swisshelm an der University of Washington in Seattle durchgeführt wurde und weitere interessante Aspekte bzgl. des Chromosoms 16 zeigten. Es sei jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, dass dies erste Ergebnisse waren, die weiterer Bestätigung bedürfen.

Es ist bekannt das WS-Zellen sensibel auf bestimmte Stoffe reagieren, die den DNA-Stoffwechsel beeinflussen. Hydroxyurea (HU), ein DNA-Antimetabolit und Replikationsinhibitor, zählt zu diesen Stoffen. HU scheint die bei WS vermutlich fehlerhafte homologe Rekombination negativ zu beeinflussen, hier v.a. die Reinitiation der DNA-Synthese nach HU-Behandlung [23]. In dem hier nur kurz erwähnten

Experiment wurden WS-LCL mit HU behandelt und anschließend u.a. zytogenetisch mittels SKY untersucht. Es fanden sich erhöhte strukturelle Aberrationen v.a. in Form von Deletionen und Zentromer- bzw. Telomerassoziationen in den un- und behandelten WS-Zellen sowie in der behandelten Kontrolle. „Hot-spot“ für Deletionen war die Zentromerregion des Chromosoms 16. An den Abberationen waren v.a. die Chromosomen 1 und 16 beteiligt (Abbildung 29). Chromosom 1 war in dieser Doktorarbeit (siehe Abbildung 27 bzw. 28), aber v.a. in [28] ebenfalls in hohem Maße in Aberrationen involviert.



**Abbildung 29:** Beispiele für die hohe Beteiligung von Chromosom 1 und 16 bzw. erhöhtes Vorkommen von Zentromer- bzw. Telomer-Assoziationen in unbehandelten WS-LCL sowie in mit HU behandelten WS-LCL und Kontrollen: I.  $tas(1;16)$ , II-III.  $cas(1;16)$ , IV.  $tas(3;16)$ .

Dies sollen nur zusätzliche Beispiele für eine möglicherweise wichtige Bedeutung von Chromosom 1 und v.a. Chromosom 16 in Reparatur- und Rekombinationsprozessen innerhalb der DNA in WS-Zellen, aber nicht nur in diesen reflektieren. Untermauert wird dies dadurch, dass ein derivatives Chromosom  $der(16)(1;16)$  als Produkt einer Translokation der Chromosomen 1 und 16 an mindestens 18 verschiedenen Krebsarten des Menschen, u.a. in Sarkomen unterschiedlicher Genese beschrieben wurde [50].

Die Tatsache, dass bestimmte Chromosomen sich gehäuft an den multiplen, von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlichen Translokationen beteiligen, könnte u.a. daran liegen, dass bestimmte Chromosomenabschnitte bevorzugt rekombinieren („hot spots“)

und dies in Kombination mit klonaler Selektion zu einem Überwiegen spezifischer Bruchpunkte führt [51]. In dieser Arbeit waren das die Bruchpunkte 3q11→q12, 9q13, 15q15, 16q12→q13 und v.a. 16q22.

Die Bande 16q22, die in 3 von 24 in H-51, in 4 von 25 in SCH, in 3 von 9 in AA und in 6 von 12 verschiedenen Rearrangements in WL gesehen wurde, ist von besonderem Interesse. 16q22 ist ein bekannter „hot spot“ für Schwesterchromatid-austausche [52] und entspricht dem Distamycin A-sensitivem fragilem Abschnitt FRA 16B, welches aus einem variabel amplifiziertem AT-reichen „minisatellite repeat“ besteht [53]. Die Helikase- und Exonuklease-defizienten WS-Zellen könnten an solchen repetitiven Sequenzen anfällig für molekulare Fehler während der Replikation und/oder Reparatur sein. 16q22 enthält überdies genetisches Material, welches für den klinischen Phänotyp des WS Bedeutung haben könnte. Im Einzelnen sind dies HSD11B2/HSD11K, die beide mit arterieller Hypertonie in Verbindung mit mineralokortikoiden Störungen assoziiert sind, RRAD, das mit Diabetes assoziiert ist. Dergleichen findet sich MAF, das ein Protoonkogen für muskuloaponeurotische Fibrosarkome ist sowie als einer der Mitverursacher für einen „juvenile-onset“ und den kongenitalen Katarakt Typ 4 gilt [54]. Auch scheint u.a. 16q22 in Osteosarkomen verstärkt amplifiziert zu werden [55]. Zudem sind die Abschnitte CDH1/ UVO/LCAM und ECAD mitverantwortlich für bestimmte weibliche Karzinome und Magenkarzinome [54]. Gerade im Hinblick auf weibliche Karzinome ist dies außerordentlich interessant, da erst kürzlich festgestellt wurde, dass WRNp und BRCA1 in der Antwort auf „DNA interstrand cross-links“-Schäden miteinander kooperieren [56]. Die Bruchpunkte 3q11→q12, 9q13, 15q15, 16q12→q13 waren nicht annähernd so oft an Aberrationen beteiligt, haben ebenfalls interessante Abschnitte (z.B. Abschnitte die auch mit der Entstehung von Katarakten eine Rolle spielen) und die in der Referenz [54] diskutiert werden. 16q22 wurde in vorherigen Untersuchungen bisher noch nicht als einer der bevorzugten Bruchpunkte in WS festgestellt [z.B. 28,58].

Einige der in [28] genannten „hot spots“ (Tabelle I) wurden in dieser Arbeit bestätigt, nämlich Xcen, 1cen, 5q12, 7q31, 7q35 und 12q24, jedoch nur jeweils ein- oder zweimal. Einige „hot spots“ in [28] waren 1 oder 2 Banden ober- bzw. unterhalb der in dieser Arbeit detektierten Bruchpunkte (z.B. 16q11 in [28], hier 16q12). Das



unterschiedliche Verteilungsmuster hängt möglicherweise u.a. mit der höheren Sensitivität von SKY zusammen (siehe auch 4.3).

Alle 4 Zelllinien erreichten das Stadium der Seneszenz nach 7 oder 8 Passagen. Diese extrem reduzierte Lebensspanne entspricht den vorherigen Beobachtungen [29,58] und ist pathognomonisch für WS-Fibroblasten-Kulturen.

#### **4.2 Die Entstehung des Subklons T aus der seneszenten Mutterkultur WL**

Die Zellen des Subklons T, der aus der seneszenten Mutterkultur WL entstand, durchlief insgesamt 45 PD bis seine Proliferation sistierte. Normale Fibroblasten erreichen durchschnittlich 60-70 PD, wohingegen sich die Population von WS-Fibroblasten nur ca. 20mal verdoppelt. Subklon T vermehrte sich also wesentlich häufiger als typische WS-Fibroblasten, blieb jedoch in seiner Proliferation immer noch unter der von normalen Fibroblasten. Da T dieselben Translokationen wie Klon a der Zelllinie WL hatte, muss er aus dieser Massenkultur entstanden sein. Polypleide Karyotypen werden regelmäßig während maligner Zelltransformationen und Tumorprogressionen gesehen, was zu einer veränderten Dosis von tausenden regulatorischen und strukturellen Genen führt [58]. Obwohl der Subklon nicht immortal wurde, ist davon auszugehen, dass die Tetraploidisierung möglicherweise ein erster Schritt zur Zelltransformation bedeutete und das mehr als doppelt so hohe Wachstumspotential erklären könnte. Trotz des erhöhten Risikos für WS-Patienten Malignome zu entwickeln wurde bisher noch nie von spontaner Transformation bzw. Immortalisierung von WS-Fibroblasten berichtet. Bisher ist nicht bekannt welche Chromosomenalterationen in WS-Patienten bevorzugt vorherrschen. Wyllie et al. [59] analysierten mehrere tausend Klone von verschiedenen WS-Patienten, entdeckten jedoch keinen einzigen immortalen Klon. Ihnen war allerdings möglich, nachdem sie WS-Fibroblasten mit Telomerase-cDNA transfizierten, zwei Klone zu isolieren, die scheinbar immortal wurden. Leider publizierten Wyllie et al. keine zytogenetischen

Daten dieser Zellkulturen. Es wäre nicht von unerheblichem Interesse zu wissen, ob zytogenetische Veränderungen die vermutete Immortalität begleiteten.

Da in dieser Arbeit vermutlich eine einzige Zelle innerhalb einer seneszenten Massenkultur der WS-typischen, vorzeitigen Seneszenz entkam, und ein solches Ereignis bisher noch nie beschrieben wurde, könnte man spekulieren, dass Polyploidie in Kombination mit einmaligen Chromosomentranslokationen und/oder Gendosisveränderungen an den Chromosomen 4 und 6 diesen Effekt hervorrief. Der Verlust von den Chromosomen 4 und 6 wurde in normalen Fibroblasten-Kulturen, in Kulturen von verschiedenen „premature aging“-Syndromen [60,61], aber auch in Kulturen kolorektaler Tumoren gefunden [z.B. 62]. Zu letzterem würde auch passen, dass WRN in kolorektalen Tumoren inaktiviert wird [25]. Bisher wurden noch keine Tumorsuppressorgene auf Chromosom 4 oder 6 enthüllt, es konnte jedoch eine mögliche Beteiligung von Chromosom 4 an zellulärer Seneszenz *in vitro* festgestellt werden [63].

#### **4.3. Werner-Syndrom und die Spektrale Karyotypisierung**

Die hier mit SKY untersuchten 4 Zelllinien bestätigten die grundlegenden zytogenetischen Charakteristika, die zuvor mit konventionellen Methoden gewonnen wurden. Auch die Anzahl aberranter Metaphasen bzw. scheinbar normaler Metaphasen war in etwa vergleichbar. Obwohl man kryptische Translokationen in den normalen Metaphasen nicht ausschließen kann, ist deren Existenz aufgrund der hohen Sensibilität von SKY äußerst unwahrscheinlich.

Innerhalb der Analyse der aberranten Metaphasen war SKY den konventionellen Methoden deutlich überlegen. Während in [28] 1005 Metaphasen aus 11 FL-Zelllinien 271 identifizierbare Brüche aufwiesen, konnten in der vorliegenden Arbeit in 69 Metaphasen aus 4 Zelllinien insgesamt 119 Brüche detektiert und davon 108 Brüche eindeutig klassifiziert werden. Zellen mit hochkomplexen Rearrangements, aber auch mit kleineren Veränderungen konnten viel eingehender untersucht werden und machten beispielsweise eine detailliertere Einteilung der Klone in unterschiedliche, teilweise

singuläre Subklone erforderlich. Es konnten komplexe genomische Veränderungen genau beschrieben werden, die die enorme Dynamik in der Pathophysiologie des WS reflektieren und die konventionellen Methoden niemals zu beschreiben vermochten. Als Beispiele seien hier nochmals die bisher noch nie dokumentierten trizyklischen Chromosomenaustausche (Abbildungen 20 und 24), die Darstellung dreifach-rekombinanter Chromosomen (Abbildung 27), der Zugewinn an genetischem Material von Chromosom 1 mit der Anlagerung von dessen Bruchstücken an unterschiedliche Chromosomen (Abbildung 23), die Klassifikation der zahlreich vorhandenen Markerchromosomen und die Beschreibung des pseudotetraploiden Subklones T der Zelllinie WL (Abbildung 26) genannt.

Die Tatsache, dass in der Einzelbruchpunktanalyse eine unterschiedliche Verteilung gesehen wurde ist auch, aber nicht nur, der hohen Sensitivität von SKY geschuldet. Sicherlich spielen die im Vergleich zu [28] deutlich niedrigere Anzahl an analysierten Metaphasen, bereits in vivo bestandene Veränderungen, unterschiedliches Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme, unterschiedliche Kultur- und Präparationsbedingungen sowie andere, beispielsweise molekulare Faktoren (unterschiedliche Aktivität und Funktionalität des WRNp bzw. verschiedene WRN-Mutationen, die durch unterschiedliche strukturelle Aberrationen hervorgerufenen unterschiedlichen somatischen Mutationen) eine nicht unbedeutende Rolle. Auch die Tatsache, dass neueste Erkenntnisse darauf hinweisen, dass aus unterschiedlichen Mutationen nicht nur nicht-aktive WRNp's resultieren soll hier nochmals erwähnt werden [12]. Die Untersuchung einer statistisch signifikanteren Anzahl an Metaphasen mit SKY würde bzgl. der vermuteten nicht-zufälligen Verteilung und der Verifizierung bzw. Erweiterung bisheriger Ergebnisse hilfreich sein.

Einige wenige Bruchpunkte konnten nicht eindeutig einem bestimmten Chromosomenabschnitt zugeordnet werden. Eine der Gründe war, dass die Invers-DAPI Färbung in Kombination mit der spektralen Signatur und der pseudo-colour Färbung keine eindeutigen Ergebnisse lieferten. Um dies zu optimieren könnten G- und R-Bänderung mit SKY in einem Experiment kombiniert werden, wie bereits beschrieben in [45].

SKY kann auch mit anderen neuartigen Methoden kombiniert werden. Als Beispiel soll hier die Kombination mit „Peptide Nucleic Acids“ (PNAs) genannt werden. PNAs sind

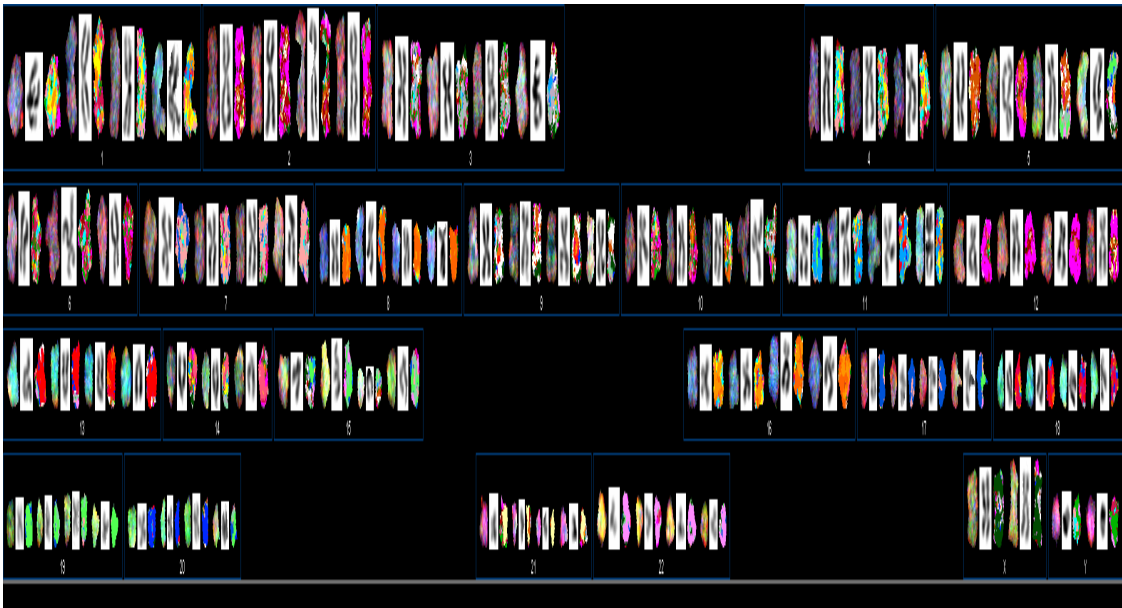
eine bemerkenswerte neue Klasse synthetischer Nukleinsäureanaloge mit Peptid-ähnlichem Rückgrat. Diese haben die Eigenschaft mit hoher Spezifität und Affinität komplementäre RNA- und DNA-Sequenzen zu hybridisieren und sind resistent gegenüber Nukleasen und Proteasen [64,65]. PNAs kamen bisher v.a. in der Anfärbung von Zentromeren und Telomeren zur Anwendung [z.B. 66]. Es ist eine Untersuchung bekannt, in der SKY mit einer PNA-Telomer-Hybridisierung, allerdings in Mäusen, kombiniert wurde. Zudem ist eine Schätzung der Telomerlänge über die Fluoreszenz-Signalstärke möglich [67]. Gerade neueste Erkenntnisse zeigen, dass WRN in der Aufrechterhaltung von Telomeren bzw. in der Telomer-assoziierten Antwort auf DNA-Schäden eine bedeutende Rolle spielt, so dass eine kombinierte PNA-SKY-Hybridisierung als sinnvoll erscheint, um eine Korrelation zwischen WRN, Chromosomenaberrationen und der Länge bzw. dem Fehlen von Telomeren herzustellen [68,69,70].

Nicht nur die Kombination mit PNAs wäre eine sinnvolle Anwendung für SKY den Zusammenhang von WRN und den Telomeren näher zu ergründen. WS-Fibroblasten die Telomerase (hTERT) verstärkt exprimieren, sind scheinbar immortal und die typische vorzeitige Seneszenz von WS-Fibroblasten wird so verhindert [59]. Bisher wurden an diesen noch keine zytogenetischen Untersuchungen durchgeführt und mit SKY als hochgradig-sensitive Methode, könnte man auch hier neue interessante Erkenntnisse gewinnen.

Wie in Abschnitt 1.4. und in 4.1. (u.a. Abbildung 32) erwähnt, sind WS-Zellen sensitiv auf bestimmte Stoffe, wie z.B. „Cross-Linkers“, womit u.a. entscheidende Fortschritte in der WS-Forschung gemacht wurden [17,22]. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von SKY könnte sein, systematisch die behandelten Zellen zytogenetisch zu untersuchen, um eventuelle Auswirkungen auf chromosomaler Ebene entdecken zu können. Da mit cTERT immortalisierte WS-Fibroblasten weniger sensitiv z.B. 4-NQO reagieren [17], wären zytogenetische Untersuchungsreihen, die diese Zellen miteinbeziehen zudem sinnvoll.

Zusammenfassend kann man sagen, dass SKY die bisher gewonnen zytogenetischen Erkenntnisse bestätigt, vertieft und erweitern konnte und weitere mannigfaltige

Anwendungsmöglichkeiten bestehen. SKY ist zudem eine relativ sichere Methode. Nur ein geringer Prozentsatz an Objektträgern mit darauf befindlichen Metaphasen mussten aufgrund einer unzureichenden Hybridisierungsqualität verworfen werden. Einschränkend muß man aber hinzufügen, dass nie alle Metaphasen eines Objektträgers ausgewertet werden konnten, da diese entweder unvollständig oder nicht alle Fluoreszenzfarbstoffe gleich verteilt waren (Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Exemplarisches Beispiel einer ungenügenden Hybridisierung anhand einer SKY-Metaphase des Suklons T nach 43 PD. Die Chromosomenklassifikation bereitete große Schwierigkeiten. Aberrationen waren nicht hinreichend beurteilbar.

Der vergleichsweise hohe zeitliche und materielle Aufwand der Präparation und der Auswertung limitieren die Möglichkeiten von SKY, so dass Experimente mit einer sehr großen Anzahl von Metaphasen, wie z.B. in [28], sehr oder sogar fast zu aufwendig wären. Die Hybridisierung dauert 2 Tage, die Aufnahme und Auswertung einer einzelnen Metaphase bis sie wie in dieser Arbeit dargestellt werden kann, erfordert mehrere Stunden.

Als diagnostisches Instrument erscheint SKY nur in den Fällen, in denen konventionelle Methoden nicht ausreichen die zytogenetischen Charakteristika des WS darzustellen als sinnvoll. Mit der Eigenschaft komplexe Rearrangements, Translokationen und Deletionen mit hoher Sensitivität zweifelsfrei nachzuweisen, kann es jedoch als der Gold-Standard bei unklaren Fällen gelten. Es können neue Erkenntnisse in der Pathophysiologie und dem zytogenetischen Korrelat des WS gewonnen werden, gerade wenn man SKY mit anderen Methoden kombiniert bzw. WS-Zellen zuvor systematisch unterschiedlichen Einflüssen (genetisch: z.B. hTERT, exogen: z.B. HU, „cross-linking drugs“) aussetzt. Die Technik wird in den kommenden Jahren zudem mit hoher Wahrscheinlichkeit verfeinert werden, so dass noch kleiner Abschnitte innerhalb der DNA analysiert werden können.

#### **4.4 Ausblick**

Wie die einzigartigen zytogenetischen Charakteristika des WS entstehen, bleibt bisher nicht vollständig geklärt. Wie die Zelle für die genomische Integrität sorgt und welche Mechanismen für den Verlust dieser verantwortlich sind, sind nicht nur das WS betreffend Gegenstand intensiver interdisziplinärer Forschung. Schon allein die Tatsache, dass noch nicht genau verstanden ist, wie Translokationen im Allgemeinen entstehen und welche Enzyme an deren Formation beteiligt sind, spiegelt die Komplexität der biochemischen Prozesse wieder: Nur wenn die exakte DNA-Sequenz des Bruchpunktes von vornherein bekannt ist, können relativ sichere Schlussfolgerungen gezogen und Thesen aufgestellt werden. Sichere und anwendbare Methoden um einen Bruchpunkt genau zu lokalisieren, der in einer Zelle bereits vorhanden ist, existieren bisher nicht [57].

Auch wenn dieser einzelne Aspekt in der Suche nach der Ursache des WS ein unglaublich schweres Unterfangen und in dieser, für jeden einzelnen Patienten tragischen, unheilbaren Erkrankung, die Entwicklung vom Genotyp zum klinischen Phänotyp noch vollkommen unklar ist, gibt es neben der Hoffnung eine mögliche

Therapie zu finden, mehr als nur einen überzeugenden Grund an WS bzw. an anderen seltenen, monogenetischen Erkrankungen weiter zu forschen. Der Effekt einer einzelnen Genmutation mit hoher Penetranz vermag, unabhängig von beträchtlichen genetischen Variationen im menschlichen Genom und unterschiedlichen Umweltbedingungen, in denen Menschen leben, eine komplexe Erkrankung zu bewirken. Diese einzelnen Gene erscheinen hochpenetrant, da sie an entscheidenden physiologischen Schnittpunkten agieren und so unabhängig von anderen Faktoren untersucht werden können. Diese seltenen Erkrankungen können somit maßgeblich zum pathophysiologischen Verständnis von genetisch komplexeren, jedoch weitaus häufigeren Erkrankungen führen. Als Beispiele seien hier die Entstehung erster Erklärungsmodelle für die neurodegenerativen Erkrankungen Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Amyotrophe Lateralsklerose genannt [71].

Das Werner Syndrom stellt zudem eine sehr seltene menschliche Genomvariante dar, deren phänotypische Expression den normalen Alterungsprozess zumindest teilweise und in beschleunigter Form nachahmt. Insofern kann die Aufklärung der molekularen Mechanismen, welche den pleiotropen Phänotyp des Werner-Syndroms bedingen, wichtige Hinweise auf die Pathogenese des normalen Alterungsprozess liefern [5].

## **5.0 ZUSAMMENFASSUNG**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Metaphasen von Fibroblastenkulturen (AA, WL, SCH, H-51) von Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose Werner Syndrom (WS) mit der Spektralen Karyotypisierung (SKY) analysiert.

Die Auswertung bestätigte in allen vier Zelllinien (ZLL) die zuvor mit konventionellen Methoden (z.B. mit G- und R-Bänderung) etablierten zytogenetischen Charakteristika des WS in Form des „Variegated Translocation Mosaicism“ (VTM) und in Form der im zeitlichen Verlauf einer Zellkultur vorherrschenden zytogenetischen, dominanten Klone, deren Eigenschaften mit den drei Schlagwörtern „clonal attenuation“, „clonal succession“ und „clonal expansion“ bereits durch Salk et al. [28] treffend umschrieben wurden. Alle ZLL wurden nach 7 oder 8 Passagen seneszent, einer für WS-Fibroblasten typischen, reduzierten Lebensspanne.

In der genaueren Analyse der aberranten Metaphasen war SKY den konventionellen Methoden deutlich überlegen. Während bei Salk et al. in 1005 Metaphasen 271 Brüche entdeckt wurden, wurden mit SKY in 69 Metaphasen 108 Brüche eindeutig klassifiziert, was außerdem eine detailliertere Einteilung der Klone in unterschiedliche, teilweise singuläre Subklone erforderlich machte. Die bisher noch nie in WS-Zellen festgestellten trizyklischen Chromosomenaustausche und dreifach-rekombinanten Chromosomen zeigten die Fähigkeit der SKY-Methode, komplexe genomische Veränderungen zu erkennen und genau darzustellen. Zudem wurde erstmals ein pseudotetraploider Subklon T mit 87-90 Chromosomen entdeckt, der aus der Mutterkultur WL stammte und ein ungewöhnliches Wachstumspotential von etwa 45 Populationsverdoppelungen (PD) erreichte und die durchschnittlichen 20 PD von WS-Fibroblasten um mehr als das Doppelte überschritt, aber unter den 54 PD von Kontrollfibroblasten lag. Durch SKY konnte der Subklon T exakt karyotypisiert werden. Eine Tetrasomie wurde für alle autosomalen Chromosomen außer den Chromosomen 4 und 6 festgestellt, die jeweils dreimal, die Geschlechtschromosomen X und Y jeweils zweimal vertreten waren. Die Translokationen waren identisch mit denen von Klon a aus WL, allerdings in jeweils zweifacher Ausführung.



10 Chromosomen beinhalteten in den 69 Metaphasen  $\geq 6$  Brüche und waren in jeweils mindestens 3 der 4 ZLL an Chromosomenaberrationen beteiligt. V.a. Chromosom 16 war mit 17 Bruchpunkten bzw. in 23 von 78 aberranten Chromosomen am häufigsten involviert. Zudem war es an zwei der drei dreifach-rekombinierten Chromosomen und bei einem der zwei trizyklischen Chromosomenaustausche beteiligt. Dies weist auf eine möglicherweise große Bedeutung von Chromosom 16 in Rekombinationsprozessen hin. Auffällig war eine nicht-zufällige Bruchpunktverteilung. Die Bruchpunkte 3q11→q12, 9q13, 15q15, 16q12→q13 und 16q22 waren mögliche hot spots für Bruchereignisse und trugen Rechnung für  $\approx 21\%$  der Bruchereignisse. V.a. 16q22 brach am häufigsten (11mal), war als einziger Bruchpunkt in allen 4 Zelllinien vorhanden und maßgeblich für die hohe Beteiligung des Chromosoms 16 an strukturellen Aberrationen verantwortlich. 16q22 wurde in vorherigen Untersuchungen bisher noch nicht als einer der bevorzugten Bruchpunkte in WS festgestellt. Einige der bei Salk et al. genannten hot spots wurden in dieser Arbeit bestätigt, jedoch mit unterschiedlichem Verteilungsmuster. Dies hängt möglicherweise mit der höheren Sensitivität von SKY, aber auch mit der in dieser Arbeit relativ niedrigen Anzahl an Metaphasen zusammen.

Für SKY bestehen weitere mannigfaltige Anwendungsmöglichkeiten von (beispielsweise in Kombination mit anderen modernen Methoden wie PNA-FISH), die in der zytogenetischen Forschung nicht nur auf dem Gebiet des WS Fortschritte erzielen können. SKY ist zudem eine sichere Methode, erfordert jedoch einen vergleichsweise hohen zeitlichen und materiellen Aufwand, die die Anwendungsmöglichkeiten wiederum limitieren. Als diagnostisches Instrument erscheint SKY daher nur in Fällen sinnvoll, in denen nach der Anwendung konventioneller Methoden weiterhin Unsicherheiten bezüglich der Diagnose bestehen. Mit der Eigenschaft komplexe Rearrangements mit hoher Sensitivität zweifelsfrei nachzuweisen, kann es jedoch als der Gold-Standard bei unklaren Fällen gelten.

## **6.0 LITERATURVERZEICHNIS**

- [1] Miki T, Nakura J, Ye L, Mitsuda N, Morishima A, Sato N, Kamino K, Ogihara T: Molecular und epidemiological studies of Werner syndrome in the Japanese population. *Mech. Ageing Dev.* 1998; 255-265.
- [2] Werner, CWO: Über Katarakt in Verbindung mit Sclerodermie. Inaugural Dissertation Univ. Kiel; 1904
- [3] Martin GM, Oshima J, Gray M, Poot M: What Geriatricians should know about the Werner Syndrome. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1999; 47: 1136-1144.
- [4] Epstein CJ, Martin GM, Schultz AL, Motulsky AG: Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine* 1966; 45: 177-221.
- [5] Martin GM, Oshima J: Lessons from human progeroid syndromes. *Nature* 2000 Nov 9; Vol. 408: 263-266.
- [6] Goto M, Miller RW, Ishikawa Y, Sugano H: Excess of rare cancers in Werner Syndrome (adult progeria). *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev.* 1996; 5: 239-246.
- [7] L Chen, J Oshima: Werner Syndrome. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2002; 2:2: 46-54.
- [8] H Hoehn, EM Bryant, K Au, TH Norwood, H Boman, GM Martin: Variegated translocation mosaicism in human fibroblast cultures. *Cytogenet. Cell Genet.* 1975; 15: 282-298.
- [9] Yu CE, Oshima J, Fu YH, Hisama F, Wijsman EM, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD: Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996a; 272: 258-262.
- [10] Moser M, Oshima J, Monnat RJ Jr.: WRN mutations in Werner Syndrome. *Hum Mutat.* 1999; 13(4): 271-279.
- [11] Ishikawa Y, Sugano H, Matsumoto T, Furuichi Y, Miller RW, Goto M: Unusual features of thyroid carcinomas in Japanese patients with Werner syndrome and

- possible genotype-phenotype relations to cell type and race. *Cancer* 1999; 85(6): 1345-1352.
- [12] Huang S, Lee L, Hanson NB, Lenaerts C, Hoehn H, Poot M, Rubin CD, Chen DF, Yang CC, Juch H, Dorn T, Spiegel R, Oral EA, Abid M, Battisti C, Lucci-Cordisco E, Neri G, Steed EH, Kidd, A, Isley W, Showalter D, Vittone JL, Konstantinow A, Ring J, Meyer P, Wenger SL, von Herbay A, Wollina U, Schuelke M, Huizenga CR, Leistriz DF, Martin GM, Mian IS, Oshima J: The spectrum of WRN mutations in Werner syndrome patients. *Hum Mutat.* 2006 Jun; 27(6): 558-67.
- [13] Gray MD, Shen JC, Kamath-Loeb AS, Oshima J, Fry M, Loeb LA: The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat Genet.* 1997; 17(1): 100-03.
- [14] Moser MJ, Kamath-Loeb AS, Jacob JE, Bennett SE, Oshima J, Monnat RJ Jr.: WRN helicase expression in Werner syndrome cell lines. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(2): 648-654.
- [15] T Enomoto: Functions of RecQ Family Helicases: Possible involvement of Bloom's and Werner's Syndrome Gene Products in guarding genome integrity during DNA replication. *J. Biochem.* 2001; 129:501-07.
- [16] Huang S, Li B, Gray MD, Oshima J, Mian I, Campisi J: The premature aging syndrome protein, WRN, is a 5' → 3' exonuclease. *Nature Genet.* 1998; 20, 114-116.
- [17] Opresko P, Cheng W, von Kobbe C, Harrigan J, Bohr V: Werner syndrome and the function of the Werner protein; what they can teach us about the molecular aging process. *Carcinogenesis* 2003; 24(5): 791-802.
- [18] Martin GM, Sprague CA, Epstein CJ: Replicative lifespan of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue and genotype. *Lab Invest* 1970; 23:86-92.
- [19] Salk D, Bryant E, Hoehn H, Johnston P, Martin GM: Growth characteristics of Werner syndrome cells in vitro. *Adv exp Med Biol* 1985; 190: 305-311.
- [20] M Poot, H Hoehn, T Runger, GM Martin: Impaired S-Phase Transit of Werner Syndrome Cells Expressed in Lymphoblastoid Cell Lines: *Experimental Cell Research* 1992; 202: 267-273.

- [21] Takeuchi F, Hanaoka F, Moto G, Akoaka I, Hori T, Yamada M, Miyamoto T: Altered frequency of initiation sites of DNA replication in Werner's syndrome cells. *Hum. Genet.*, 1982; 60: 365-368.
- [22] Poot M, Yom S, Whang SH, Kato T, Gollahon A, Rabinovitch: Werner syndrome cells are sensitive to DNA cross-linking drugs. *FAEB J.* 2001; 15: 1224-1226.
- [23] Y Saintigny, K Makienko, Cristina Swanson, M Emond, RJ Monnat jr.: Homologous Recombination Resolution Defect in Werner Syndrome. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6971-6978.
- [24] Prince PR, Edmond MJ, Monnat RJ jr.: Loss of Werner syndrome protein function promotes aberrant mitotic recombination. *Genes Dev.* 2001; 15: 933-938.
- [25] R Agrelo, WH Cheng, F Setien, S Ropero, J Espada, M Fraga, M Herranz, M Paz, M Sanchez-Céspedes, MJ Artiga, D Guerrero, A Castells, C von Kobbe, V Bohr, M Esteller: Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer. *PNAS* 2006; Jun 6; 103(23): 8822-8827.
- [26] KI Fukuchi, GM Martin, RJ Monnat, Jr.: Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc.Natl.Acad.USA* 1989; 86: 5893-5897.
- [27] D Salk, K Au, H Hoehn, MR Stenchever, GM Martin: Evidence of clonal attenuation, clonal succession and clonal expansion in mass cultures of aging Werner's syndrome skin fibroblasts. *Cytogenet. Cell Genet.* 1981; 30: 108-117.
- [28] D Salk, K Au, H Hoehn und GM Martin: Cytogenetics of Werner's syndrome cultured skin fibroblasts: variegated translocation mosaicism. *Cytogenet. Cell Genet.* 1981; 30: 92-107.
- [29] Scappaticci S, Cerimele D, Fraccaro M: Clonal structural chromosomal rearrangements in primary fibroblast cultures and in lymphocytes of patients with Werner's Syndrome. *Hum Genet.* 1982; 62(1): 16-24.
- [30] Schonberg S, Niermeijer MF, Bootsma D, Henderson E, German J: Werner's Syndrome: proliferation in vitro of clones of cells bearing chromosome translocations. *Am J Hum Genet* 1984; 36: 387-397.

- [31] Benn PA: Chromosome translocations in fibroblast cultures derived from patients with Werner's syndrome. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 221-223.
- [32] Rieger R., Michaelis A., Green M.M.: A glossary of genetics and cytogenetics, p. 456 (Springer-Verlag, New York 1968).
- [33] Fraccaro M, Scappaticci S, Cerimele D: A population and cytogenetic study of the Werner Syndrome in Sardinia. *Adv Exp Med Biol.* 1985; 190: 547-52.
- [34] E Gebhart, R Bauer, M Schinzel, KW Ruprecht, JB Jonas: Spontaneous and induced chromosomal instability in Werner syndrom. *Hum Genet* 1988; 80: 135-139.
- [35] M Grigorova, AS Balajee, AT Natarajan: Spontaneous and X-ray-induced chromosomal aberrations in Werner syndrome cells detected by FISH using chromosome-specific painting probes. *Mutagenesis* 2000; 15: 303-310.
- [36] E Schröck, S du Manoir, T Veldman, B Schoell, J Wienberg, M Ferguson-Smith, Y Ning, DH Ledbetter, I Bar-Am, D Soenksen, Y Garini, T Ried: Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. *Science* 1996; 273: 494-97.
- [37] R Melcher, R. von Golitschek, C. Steinlein, D Schindler, H Neitzel, K Kainer, M Schmid, H Hoehn: Spektrale Karyotypisierung of Werner syndrome fibroblast cultures. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 91: 180-185.
- [38] RGA Faragher, IR Kill, JAA Hunter, FM Pope, C Tannock, S Shall: The gene responsible for Werner syndrome may be a cell division "counting" gene. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 12030-12034.
- [39] Fan YS et al.: Sensitivity of multiple color Spektrale Karyotypisierung in detecting small interchromosomal rearrangments. *Genet. Test* 2000; 4: 9-14.
- [40] E Schröck, T Veldman, H Padilla-Nash, Y Ning, J Spurbeck, S Jalal, L Shaffer, P Papenhausen, C Kozma, M Phelan, E Kjeldsen, S Schonberg, P O'Brien, L Biesecker, S du Manoir, T Ried: Spektrale Karyotypisierung refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Gen* 1997; 101: 255-262.

- [41] B Haddad, E Schröck, J Meck, J Cowan, H Young, M Ferguson-Smith, S du Manoir, T Ried: Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by Spektrale Karyotypisierung. *Hum Genet* 1998; 103: 619-625.
- [42] R Melcher, C Steinlein, W Feichtinger, CR Müller, T Menzel, H Lührs, W Scheppach, M Schmid: Spektrale Karyotypisierung of the human colon cell lines SW480 and SW620. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 88: 145-152.
- [43] T Veldman, C Vignon, E Schröck, JD Rowley, T Ried: Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolor Spektrale Karyotypisierung. *Nature Genet* 1997; 15: 406-410.
- [44] Telenius H et al.: Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 4: 257-263.
- [45] Y Garini, M Macville, S du Manoir, RA Buckwald, M Lavi, N Katzir, D Wine, I Bar-Am, E Schröck, D Cabib, T Ried : Spektrale Karyotypisierung. *Bioimaging* 1996; 4: 65-72.
- [46] Köhler MR, Gräve W (1999): SKY (Spektrale Karyotypisierung): Ein neues, molekularzytogenetisches Verfahren zur Chromosomenanalyse. *Biospektrum* 1/1999, 5. Jahrgang.
- [47] Ried T, Baldini A, Rand TC, Ward DC (1992(1)): Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89, 1388-92.
- [48] H Hoehn, M Simpson, EM Bryant, PS Rabinovitch, D Salk, GM Martin: Effects of chromosome constitution on growth and longevity of human skin fibroblast cultures. *Am J of Med Gen* 1980; 7: 141-154.
- [49] Shen JC, Loeb LA: The Werner syndrome gene: the molecular Basis of RecQ helicase-deficiency diseases. *Trends Genet* 2000; 16: 213-220.
- [50] Mrozek K, Bloomfield CD: Der(16)(1;16) is a secondary chromosome aberration in at least eighteen different types of human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1998 Sep; 23(1): 78-80.

- [51] Salk D: Werner syndrome: A review of recent research with an analysis of connective tissue metabolism, growth control of cultured cells, and chromosomal aberrations. *Hum Genet* 1982; 62: 1-15.
- [52] Lukusa T, Meulepas E, Fryns JP, Van den Berghe H, Cassiman JJ: "Spontaneous" FRA 16B is a hot spot for sister chromatid exchanges. *Hum Genet* 1991; 87: 583-586.
- [53] Yu S, Mangelsdorf M, Hewett D, Hobson L, Baker E, Eyre HJ, Lapsys N, Le Paslier D, Dogget NA, Sutherland GR, Richards RI: Human chromosomal fragile site FRA 16B is an AT-rich minisatellite repeat. *Cell* 1997; 88: 367-374.
- [54] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/getmap.cgi>
- [55] C Lau, C Harris, XY Lu, L Perlaky, S Gogineni, M Chintagumpala, J Hicks, M Johnson, N Davino, A Huvos, P Meyers, J Healy, R Gorlick, P Rao: Frequent Amplification and Rearrangement of Chromosomal Bands 6p12-p21 and 17p11.2 in Osteosarcoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2004; 39: 11-21.
- [56] WH Cheng, R Kusumoto, P Opresko, X Sui, S Huang, M Nicolette, T Paull, J Campisi, M Seidman, V Bohr: Collaboration of Werner syndrome protein and BRCA 1 in cellular response to DNA interstrand cross-links. *Nucleic Acids Research* 2006, Vol. 34, No. 9: 2751-2760.
- [57] Povirk, LF: Biochemical mechanisms of chromosomal translocations resulting from DNA double-strand breaks. *DNA Repair* 2006; 5: 1199-1212.
- [58] Li R, Sonik A, Stindl R, Rasnick D, Duesberg P: Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidie. *PNAS USA* 2000; 97: 3236-3241.
- [59] Wyllie F, Jones C, Skinner J, Haughton M, Wallis C, Wynford-Thomas D, Faragher R, Kipling D: Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts. *Nat genetics* 2000; vol. 24: 16-17.
- [60] Mukherjee AB, Thomas S: A longitudinal study of human age-related chromosomal analysis in skin-fibroblasts. *Exp Cell Res* 1997; 235: 161-169.
- [61] Murkherjee AB, Costello C: Aneuploidy analysis in fibroblasts of human premature aging syndromes by FISH during in vitro cellular aging. *Mech Age Dev* 1998; 103:209-222.

- [62] Melcher R, Steinlein C, Feichtinger W, Müller CR, Menzel T, Lührs H, Scheppach W, Schmid M: Spektrale Karyotypisierung of the human colon cancer cell lines SW480 and SW620. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 88: 145-152.
- [63] Ning Y, Weber JL, Killary AM, Ledbetter DH, Smith JR, Pereira-Smith OM: Genetic analysis of indefinite division in human cells:evidence for a cell senescence-related gene(s) on human chromosome 4. *PNAS USA* 1991; 88: 5635-5639.
- [64] Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O: Sequence-selektive recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991; 254: 1497-1500.
- [65] Nielsen PE, Engholm M: An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol* 1999; 1: 89-104.
- [66] Boei JJWA, Vermeulen S, Natarajan AT: Analysis of radiation-induced chromosomal aberrations using telomeric and centromeric PNA probes. *Int J Radiat Biol* 2000; 76:163-167.
- [67] Hemann M, Strong M, Hao LY, Greider C: The Shortest Telomere, Not Average Telomere Length, Is Critical for Cell Viability and Chromosome Stability. *Cell* 2001; Vol. 107, 67-77.
- [68] Opresko P, Otterlei J, Graakjaer P, Bruheim L, Dawut S, Kolvraa A, May M, Seidman V, Bohr V: The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell* 2004; 14: 763-774.
- [69] Crabbe L, Verdun C, Haggblom C, Karlseder J: Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* 2004; 306: 1951-1953.
- [70] Eller M, Liao X, SuiYang L, Hanna K, Bäckvall H, Opresko P, Bohr V, Gilchrist B: A role for WRN in telomere-based DNA damage responses: *PNAS USA* 2006; vol. 103, no. 41: 15073-15078.
- [71] Hisama FM, Bohr VA, Oshima J: WRN's tenth anniversary. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2006(10): PE18.





## DANKSAGUNG

In erster Linie gilt mein Dank natürlich Herrn Professor Höhn, der mir zu jedem Zeitpunkt mit Rat und Tat zur Seite stand, mir vieles ermöglicht hat und gerade die etwas zähe letzte Zeit mit dem ihm eigenen süffisanten Humor zunächst zu kommentieren, dann mit seinem Wissen aber natürlich rasch zu helfen wusste.

Ebenfalls nicht vollständig frei von Humor war Herr Professor Schmid der stets ein offenes Ohr für mich hatte und dem ich außerdem für die Übernahme des Korreferates danke.

Keinesfalls zu vergessen sind Herr Steinlein und Herr Nanda aus dem zytogenetischen Labor ohne die ich auch heute noch nicht wissen würde, wie CHROMOSOM geschweige denn SKY buchstabiert werden. Sie waren immer eine große Unterstützung, ersetzten teilweise sogar diverse Schlüsselnotdienste und retteten nicht nur einmal meine ersten experimentellen (Geh)versuche.

Besonderer und persönlicher Dank gilt selbstverständlich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, nicht nur weil sie sich, teilweise in Haupt-, teilweise in Nebensätzen, nach dem Stand meiner Doktorarbeit erkundigten, sondern weil sie, egal in welcher Lebensphase ich mich befinde, immer für mich da sind.

## LEBENS LAUF

**Geburtstag:** 02.09.1975

**Geburtsort:** Würzburg

**Ausbildung:** 1982-1986: Eichendorff-Grundschule, Gerbrunn.  
1986-1995: Besuch des Röntgen-Gymnasiums, Würzburg.  
1995-1996: Zivildienst als Rettungsdiensthelfer in Miesbach.  
1996-2004: Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.  
2001-2002: Visiting studentship an der University of Washington, School of Medicine, Dpt. of Pathology und Dpt. of Genome Sciences, Seattle, USA.  
2003: Praktisches Jahr, 1. Teil des 1. Tertial Innere Medizin, University of Sydney, Australia.  
2003-2004: Praktisches Jahr, 2. Teil des 1. Tertials, Innere Medizin, 2. Tertial Chirurgie und 3. Tertial Neurologie an der Universität Würzburg.  
Juni 2004: 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung.  
2005-2007: Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der psychiatrischen Universitätsklinik der TU Dresden.  
Seit Juni 2007 Assistenzarzt am psychiatrischen Universitätsspital Bern.

Bern, den 06.07.2007

Robert von Golitschek