



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 101 61 829 B4 2006.02.16**

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **101 61 829.8**
 (22) Anmeldetag: **15.12.2001**
 (43) Offenlegungstag: **26.06.2003**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **16.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68 (2006.01)**
G01N 27/447 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

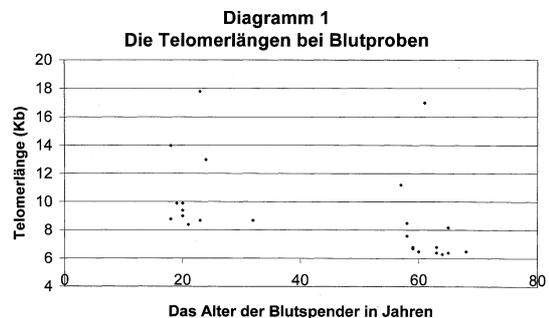
(73) Patentinhaber:
Lahnert, Peter, 16341 Panketal, DE

(72) Erfinder:
gleich Patentinhaber

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:
US 58 34 193 A
US 54 89 508 A
**BENETOS, A. u.a.: Telomere length as an indicator
 of biological aging: the gender effect and
 relation with pulse pressure and pulse wave
 velocity, Hypertension (Februar 2001) 37(2 Part 2)
 381-5;**

(54) Bezeichnung: **Neue Methode zur Bestimmung der Telomerlänge und ihre Verwendung zur Abschätzung des Lebensalters**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Messung der Telomerlänge, bei dem man die Länge der Telomere mittels eines Blot-Verfahrens untersucht, dabei wird die DNA vor dem Blotten gelelektrophoretisch aufgetrennt und die die Telomer-DNA enthaltende Proben-DNA vor der gelelektrophoretischen Auftrennung einem vollständigen Restriktionsverdau unterzogen, dadurch gekennzeichnet, daß die Auftrennung der verdauten DNA in der dem Blot-Verfahren zugrunde liegenden Gelelektrophorese bei
 (a) < 5 Volt/cm und
 (b) für die Dauer von mindestens 4 Stunden stattfindet und
 (c) der Nachweis des Komplexes aus Telomer-DNA und Sonden-Nukleinsäure mittels einer Farbreaktion oder eines chromogenen Nachweises durchgeführt wird.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zu Abschätzung des Lebensalters anhand einer Gewebeprobe. Weiterhin kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die statistische Lebenserwartung von Menschen abgeschätzt werden.

[0002] Bisher sind im Stand der Technik keine Verfahren beschrieben worden, mit deren Hilfe das Lebensalter oder die durchschnittliche Lebenserwartung eines Menschen bestimmt werden können.

Stand der Technik

[0003] In einem Lehrbuch für Rechtsmedizin (Arbab-Zadeh A., Prokop O., Reimann W., Rechtsmedizin für Ärzte, Juristen, Studierende und Kriminalisten, 1. Auflage, Stuttgart, New York: Gustav – Fischer – Verlag 1977) fand sich folgende Information: "Ist das Blut von einem Kind oder von einem Erwachsenen? Diese Frage läßt sich an Blutspuren zur Zeit nicht klären."

[0004] Es gibt allerdings eine etablierte Methode, mittels des Vorkommens von fötalem Hämoglobin im Blut von Kleinkindern dieses vom Blut älterer Kinder und von Erwachsenenblut zu unterscheiden (Arbab-Zadeh A., supra).

[0005] Gerade in der Gerichtsmedizin wäre es jedoch von großem Vorteil, wenn z.B. bei der Erstellung eines Täterprofils etc. ausgehend von einer z. B. an einem Tatort aufgefundenen Gewebeprobe das Lebensalter des Täters abgeschätzt werden könnte.

[0006] Nachfragen bei mit der Strafverfolgung bzw. der Täterermittlung befaßten Behörden ergaben ebenfalls, daß es bisher keine Möglichkeit gibt, aus einer Blut oder Speichelprobe das Lebensalter des Spenders abzuschätzen, und belegen ein hohes Interesse an einem solchem Verfahren.

[0007] Weiterhin wäre es vorteilhaft, wenn ausgehend von einer Gewebeprobe die statistische Lebenserwartung eines Menschen bestimmt werden könnte. Weil die Verkürzung der Telomere allgemein als Grund für das natürliche Altern angesehen wird (Fossel MD Telomerase and the Aging Cell, JAMA (1998) 279, 1732–1735), ist es sehr wahrscheinlich so, das Menschen mit langen Telomeren länger leben als Menschen mit kürzeren Telomeren. Dies könnte beispielsweise für Versicherungsträger eine Rolle spielen.

[0008] Es gibt bereits Untersuchungen zur Messung der Telomerenlänge (genauer: der Länge des terminalen Restriktionsfragments), in denen offenbart wird, daß die Telomerlänge im Laufe der "in-vivo" – Alterung kontinuierlich abnimmt (Hastie N.D., Dempster M., Dunlop M.G., Thompson A.M., Green D.G., Allshire R.C. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging. Nature (1990) 346, 866–868; Vaziri H., Schächter F., Uchida I., Wie L., Zhu X., Effros R., Cohen D., Harley CB., Loss of Teomeric DNA during Aging of Normal and Trisomy 21 Human Lymphocytes., Am. J.Hum.Genet. (1993) 52, 661–667).

[0009] Der Grad der Korrelation zwischen dem "in-vivo" – Alter und der Abnahme der Telomerlänge ist jedoch noch ungenügend untersucht, so daß es bis zur vorliegenden Erfindung in der Praxis nicht möglich war, aus der Telomerlänge aus einer Gewebeprobe auf das Lebensalter der zugehörigen Person zu schließen.

[0010] Außerdem wurde beispielsweise in einer Untersuchung von Levy et al. offenbart, daß eine altersabhängige Verkürzung der Telomere gar nicht auftritt (Levy T., Agoulnik I., Atkinson E.N., Tong X.W., Gause H.M., Hasenburg A., Runnebaum I.B., Stickeler E., Möbus V.J., Kaplan A.L., Kieback D.G., Telomere Length in Human White Blood Cells Remains Constant with Age and is Shorter in Breast Cancer Patients, Anticancer Research (1998) 18, 1345-1350).

[0011] Aufgrund dieser widersprüchlichen Aussagen im Fachgebiet war es bisher völlig unklar, ob die Messung der Telomerlänge überhaupt zur Bestimmung der Lebensalters einsetzbar sein könnte.

[0012] Bei den vorstehend genannten Forschungsarbeiten wurde die Telomerlänge mit ³²P makierten telomerspezifischen Nukleinsäuren bestimmt.

[0013] Kommerziell erhältlich ist auch ein nichtradioaktiver Telomerlängenbestimmungskit von Roche Diagnostics GmbH, Telo TTAGGG Telomere Length Assay, in welchem ein Chemilumineszenzsubstrat für den Nachweis der Telomer-DNA verwendet wird. Das entsprechende Verfahren laut Herstellerangaben führt aber

nachteilhaft dazu, daß der untere und der obere Rand des Telomergeschmiers je nach aufgetrennter DNA – Menge im Gel nach Beendigung der Gelelektrophorese eine unterschiedliche Lage aufweist.

[0014] Es existiert weiterhin eine Veröffentlichung (Gomez D.E., Tejera A.M., Olivero O.A., Irreversible Telomere Shortening by 3'-Azido-2',3'- Dideoxythymidine (AZT) Treatment, Biochemical and Biophysical Research Communications (1998) 246, 107-110), in der die Telomerlänge mittels einer Farbreaktion nachgewiesen wurde. Allerdings wurden dort keine Gewebeprobe untersucht und auch kein Lebensalter bestimmt. Außerdem wurde, da von jeder Probe nur jeweils einmal die Telomerlänge bestimmt wurde, kein oberer und unterer Rand bestimmt. (Um überhaupt zu merken, daß es einen definierten oberen und einen unteren Rand gibt, muß man von einer DNA – Lösung mehrere Telomerbestimmungen mit verschiedenen Konzentrationen durchführen. Erst dann erkennt man sicher, daß der obere und der untere Rand vorhanden sind). Das Blot hat obendrein anscheinend nicht richtig funktioniert, denn das Geschmiere erscheint in der Abbildung nur sehr blaß. Außerdem werden keine Angaben über die verwendete Stromspannung und die Laufzeit des Gels gemacht.

[0015] Außerdem gab es bereits Versuche seitens gerichtsmedizinischer Institute, aus der Telomerlänge auf das Lebensalter zu schließen (Jefferies JMC., Watson ND., Smith WE., Investigation of Donor Age Using Telomere Lengths from Simulated Biological Samples. Progress in Forensic Genetics (1999) 8, 27–29). Bisher haben diese Forschungen aber noch kein greifbares Ergebnis erbracht.

[0016] Zusammengefaßt wird damit deutlich, daß es bisher nicht möglich ist, aus einer Gewebeprobe das Lebensalter des Spenders zu bestimmen.

Aufgabenstellung

[0017] Angesichts des vorstehend genannten Stands der Technik lag der vorliegenden Erfindung daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu Verfügung zu stellen, das diese Nachteile überwindet. Insbesondere sollte das erfindungsgemäße Verfahren in die Lage versetzen, aus Gewebeprobe das Lebensalter und/oder die durchschnittliche Lebenserwartung einer Person zu bestimmen.

[0018] Weitere nicht explizit genannte Aufgaben, die der vorliegenden Erfindung auch zugrunde gelegen haben, ergeben sich in naheliegender Weise aus dem zitierten und diskutierten Stand der Technik.

[0019] Diese Aufgaben werden durch die in Anspruch 1 und den auf diesen zurückbezogenen Ansprüchen offenbarten bevorzugten Ausführungsbeispielen der Erfindung in erstaunlich einfacher Weise gelöst.

[0020] Indem man die Länge der Telomer-DNA aus einer Gewebeprobe mittels eines Southern-Blot-Verfahrens und nachfolgender Hybridisierung der an die aus dem Southern-Blot-Verfahren erhaltenen Membran gebundenen, gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA mit einer zu der Telomersequenz komplementären Nukleinsäuresonde bestimmt, wobei die die Telomer-DNA enthaltende Proben-DNA vor der gelelektrophoretischen Auftrennung mit einem Restriktionsenzym, das eine spezifische Erkennungsstelle von 4-Basenpaaren besitzt, einem vollständigen Restriktionsverdau unterzogen wird, dadurch gekennzeichnet, daß

- (a) die Auftrennung der verdauten DNA in der dem Southern-Blot-Verfahren zugrunde liegenden Gelelektrophorese bei < 5 Volt/cm und für eine Dauer von mindestens 4 Stunden stattfindet,
- (b) man zum spezifischen Nachweis der Telomer-DNA eine markierte, zu der Telomersequenz komplementäre Oligonukleotidsonde zur Hybridisierung einsetzt, (c) der Nachweis des aus Stufe (b) erhaltenen Komplexes aus Telomer-DNA mittels einer Farbreaktion durchgeführt wird und
- (d) durch Auftragen von bekannten Proben in der dem Southern-Blot-Verfahren zugrunde liegenden Gelelektrophorese Vergleichswerte ermittelt,

kann man das Alter und sehr wahrscheinlich die durchschnittliche Lebenserwartung der Person, von der die Probe stammt, durch Vergleich mit den bekannten Proben anhand der Lage des Signals auf dem Southern-Blot auf erstaunlich einfache Weise ermitteln.

[0021] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es nämlich überraschenderweise möglich, die Genauigkeit der Messung der (mittleren) Telomerlänge soweit zu erhöhen, daß bei einem Teil der Personen eine Abschätzung des Lebensalters möglich ist.

[0022] Es ist mit der erfindungsgemäßen Methode außerdem möglich, einen unteren Rand und einen oberen

Rand des im Southern-Blot-Verfahren erhaltenen Signals zu bestimmen, was neben der mittleren Telomerlänge als Anhaltspunkt zur Längenbestimmung genutzt werden kann.

[0023] Dabei ist im Gegensatz zu den bisher verwendeten Methoden überraschenderweise nicht die genaue Konzentration der eingesetzten DNA entscheidend, da bei der erfindungsgemäßen Methode im Gegensatz zu den bisher verwendeten Methoden zur Telomerlängenbestimmung der untere und obere Rand des Signals über einen weiten Bereich von DNS-Konzentrationen eine fast konstante Position auf dem Southern-Blot einnimmt.

[0024] Das dem Fachmann äußerst gut bekannte Southern-Blot-Verfahren dient der Übertragung von DNA aus einem Gel, beispielsweise einem Agarose- oder Polyacrylamidgel, nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf Membranen, z.B. Nylonmembranen, die dann weiteren Analysemethoden zugänglich sind.

[0025] Beispielsweise kann die auf der Membran gebundene DNA mit spezifischen DNA-Sondenmolekülen hybridisiert werden. Die Spezifität der Hybridisierungsreaktion wird dabei über die Wahl der Reaktionsbedingungen gesteuert, wobei wenig stringente (hoher Salzgehalt im Hybridisierungspuffer, niedrige Temperatur) bis sehr stringente Hybridisierungsbedingungen (geringer Salzgehalt im Hybridisierungspuffer, hohe Temperatur) verwendet werden.

[0026] Normalerweise sind die verwendeten DNA-Sondenmoleküle in irgendeiner Weise markiert. Beispielsweise können die Sondenmoleküle radioaktiv markiert sein, einen Biotin-Rest tragen, oder auch an Enzyme, Antikörper oder sonstige Proteine und/oder Peptide gekoppelt sein. Die an die DNA auf der Membran spezifisch hybridisierten Sondenmoleküle werden dann mittels eines Agens nachgewiesen, welches in irgendeiner Weise mit der an dem Sondenmolekül gebundenen Markierung wechselwirkt.

[0027] Bei einer radioaktiven Markierung genügt dafür eine Autoradiographie, bei der ein Röntgenfilm von der radioaktiven Markierung dort geschwärzt wird, wo die spezifischen Sondenmoleküle an die Membran gebunden haben. Das auf dem Röntgenfilm erhaltene Signal kann dann der gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA zugeordnet werden.

[0028] In anderen Fällen werden beispielsweise farblose Substrate zugegeben, die z.B. spezifisch mit Enzymen wechselwirken, und dabei ein farbiges Produkt freisetzen, das dann z.B. fotografisch nachgewiesen werden kann.

[0029] Dies alles ist dem Fachmann gut bekannt, und dies sowie weitere Ausführungsbeispiele des verwendeten Southern-Blot-Verfahrens lassen sich in zahlreichen Lehrbüchern nachlesen, von den hier nur einige wenige stellvertretend genannt werden: Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbour; Bertram S., Gassen HG. (1991), *Gentechnische Methoden, eine Arbeitsanleitung für das molekularbiologische Labor*, Stuttgart, Jena, New York: Fischer G.; Cornel M. (2000), *Der Experimentator: Molekularbiologie*, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akad. Verlag.

[0030] Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ist es besonders wichtig, daß die gelelektrophoretische Auftrennung der mit Restriktionsenzym behandelten Proben-DNA langsam, z.B. mit < 5 Volt/cm und für einen langen Zeitraum, d.h. > 6 Stunden abläuft. Dadurch wird eine gute Trennung der Proben-DNA gewährleistet.

[0031] Weiterhin wird das erfindungsgemäße Verfahren unter Verwendung von Farbreaktionen zum Nachweis des spezifischen Komplexes aus Telomeren- aus der Probe und Sonde durchgeführt.

[0032] Es hat sich nämlich gezeigt, daß andere Nachweismethoden zu ungenaue Ergebnisse liefern und für die Zwecke der vorliegenden Erfindung nicht einsetzbar sind.

[0033] Insbesondere wenn, wie es in der Gerichtsmedizin oft der Fall ist, nur wenig Probenmaterial und damit wenig DNA zu Verfügung steht, ist es sinnvoll, die Farbreaktion möglichst lange, über mehrere Tage bis mehrere Wochen, ablaufen zu lassen. Durch dieses Vorgehen läßt sich die Intensität der Färbung auf einen ausreichenden Stand bringen. Unter Farbreaktion wird für die Zwecke der vorliegenden Erfindung verstanden: Der Nachweis des Telomereschmiere wird über einen sichtbaren chemischen Stoff geführt. Diesen Nachweis bezeichnet man auch als chromogenen Nachweis.

[0034] Im Gegensatz dazu erfolgt der Nachweis der Telomere gemäß Stand der Technik in dem indviduellen Nachweis des Telomereschmiere über irgendeine Art von Strahlung, entweder radioaktiv (P^{32}) (vgl. US 5 834

193 A oder US 5 489 508 A) oder nichtradioaktiv (Chemolumineszenz, Roche) (vgl. Benetos, A. u.a.: Hypertension (2001) 37, 381-5), hierbei muß immer die Strahlung nachgewiesen werden (z.B. mittels einer Röntgenfolie).

[0035] Es ist daher für den Fachmann klar ersichtlich, daß erfindungsgemäß zur Markierung der verwendeten Oligonukleotide solche Systeme verwendet werden, die zur Erzeugung einer spezifischen Farbreaktion geeignet und auf dem Fachgebiet gut bekannt sind. Beispiele für geeignete Farbstoffe sind für die Alkalische Phosphatase 5-Brom-4-chlor-3-indolylophat (BCIP) und Nitroantetrazolium (NBT). Für die Meenettichperoxidase ist Chlornaphthol ein geeigneter Farbstoff.

[0036] Außerdem sollte bei der Aufarbeitung auf das Mischen mit dem Vortexmischer möglichst verzichtet werden, damit die DNA nicht unnötig starken Scherkräften ausgesetzt wird. Der größte Teil der isolierten DNA sollte eine Länge von über 30.000 Basenpaaren besitzen.

[0037] Es ist außerdem günstig, hohe Konzentrationen des markierten, zur Telomersequenz komplementären Oligo- oder Polynukleotid zu verwenden, z.B. 1 µg/ml, was etwa dem Zehnfachen der sonst üblichen Konzentration entspricht.

[0038] Oligo- oder Polynukleotid bedeutet: > 6 Basenpaare. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Agarosegel verwendet, welches in einem unteren Abschnitt eine Agarosekonzentration von 0,7–1,5 % (w/w) und in einem oberen Abschnitt von 0,5– 1% (w/w) aufweist, und wobei die Gelelektrophorese für mindestens 4 Stunden durchgeführt wird, der untere Abschnitt derjenige ist, in dem die Größe der unteren Randes des Telomergeschmiers bestimmt wird und der obere Abschnitt derjenige ist, in dem die Größe des oberen Randes der Telomergeschmiers bestimmt wird. Es hat sich nämlich gezeigt, daß die Auftrennung dann noch besser verläuft, so daß der untere und der obere Rand des Signals noch besser bestimmt werden können.

[0039] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden unterschiedliche Mengen (z.B. 1 µl, 5 µl und 10 µl) der zu untersuchenden DNA nebeneinander aufgetragen, da insbesondere bei hohen DNA Konzentrationen und langer Reaktionszeit der Nachweisreaktion auch Teile der Spur, in der keine Hybridisierung stattgefunden hat, gefärbt werden. Es kann dann schwierig werden, den unteren und den oberen Rand des Geschmiers zu bestimmen.

[0040] Die eben erwähnte Färbung von Teilen der Spur, in denen keine Telomere vorhanden sind, vollzieht sich nämlich zuerst in der Spur, in der die größte Menge DNA aufgetragen wurde. Solange in allen Spuren der obere und der untere Rand die gleiche Länge hat, weiß man also, daß man dem eben genannten Artefakt nicht aufgesessen ist.

[0041] Erfindungsgemäß kann das Verfahren ausgehend von allen Gewebeproben eines Menschen durchgeführt werden, aus denen sich DNA isolieren läßt. Es handelt sich hierbei bevorzugt um, Speichelproben und/oder Blutproben, Hautproben, Haarproben. Allerdings können auch andere Gewebeproben und Sekrete verwendet werden.

[0042] Wie oben erwähnt, ist es am einfachsten, wenn das Lebensalter durch Vergleich mit einer im selben Testansatz mitgeführten Probe ermittelt wird. In einer weiteren ebenfalls bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden von allen in Frage kommenden Kohorten statistische Erhebungen durchgeführt, mit denen dann eine Eichgerade ermittelt wird, die der Ermittlung des Lebensalters zugrunde gelegt wird.

[0043] Gerade für die Bestimmung der durchschnittlichen Lebenserwartung von Personen ist dies besonders günstig, da ja ansonsten im Testansatz eine sehr große Reihe von Vergleichsproben mitgeführt werden müßten.

[0044] [Fig. 1](#) zeigt die fotografische Auswertung eines erfindungsgemäß durchgeführten Southern-Blot-Verfahrens. Die spezifischen Versuchsbedingungen sowie die Belegung der Spuren ist Beispiel 1 zu entnehmen.

Ausführungsbeispiel

[0045] Das folgende Beispiel dient der Veranschaulichung der Erfindung, soll jedoch keineswegs einschränkend verstanden werden.

Beispiel 1

[0046] Die genomische DNA aus einer Speichelprobe oder Blutprobe (100 µl) wird nach Standardmethoden isoliert. (Auf die genaue Methode kommt es nicht an, es ist nur wichtig, daß die DNA noch ein hohes Molekulargewicht (die Hauptmasse der angeschnittenen DNA nach der Isolierung über 30.000 Basenpaare, besser 100.000) besitzt, also nicht zu starken Scherkräften ausgesetzt wurde). Die Proben sollten also während der Aufarbeitung nicht gevortext werden. Einfaches Schütteln oder Anschneiden mit dem Finger ist aber möglich.) Daraufhin wird die DNA mit dem Restriktionsenzym Alu I (Roche Diagnostics GmbH), welches eine Erkennungssequenz von vier Basenpaaren besitzt vollständig geschnitten (genomischer Verdau). Das Restriktionsenzym Alu I schneidet wie die meisten Restriktionsenzyme nicht im Telomer. Die geschnittene DNA wird in einem Agarosegel (1% w/w) mit 30 Volt (entspricht 2 Volt/cm) Spannung elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wird nun nach Standardmethoden denaturiert (der Doppelstrang wird in zwei Einzelstränge getrennt) und ebenfalls nach Standardmethoden (Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbour; Bertram S., Gassen HG. (1991), Gentechnische Methoden, eine Arbeitsanleitung für das molekularbiologische Labor, Stuttgart, Jena, New York: Fischer G.; Cornel M. (2000), Der Experimentator: Molekularbiologie, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akad. Verlag) mittels eines Southern Blots auf eine Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH) übertragen. Daraufhin wird die Membran in einem Hybridisationsofen in einer Hybridisierungslösung, bestehend aus Blockierreagenz 1% (Roche), gelöst in Maleinsäwepuffer (0,1 mol/l Maleinsäure, 0,15 mol/l NaCl, pH 7,5 eingestellt mit konzentrierter NaOH), 5 × SSC, N-Laurylsarkosin 0,1%, SDS 0,02% bei 42°C über Nacht mit dem zur Telomersequenz komplementären mit Digoxigenin markierten Oligonukleotid (TTAGGG)₄ hybridisiert.

[0047] Durch mehrere Waschschrte (1. Waschung in 5 × SSC (0,75 mol/l NaCl, 0,075 mol/l Natrium – Citrat, pH 7,0) für 15 min bei 60°C; 2. Waschung in 4 × SSC für 15 min bei 60°C) werden die nicht hybridisierten, frei in der Hybridisierungslösung befindlichen Oligo- oder Polynukleotide entfernt.

[0048] Die Telomere werden schließlich mit einer auf den zur Markierung benutzten Stoff reagierenden Nachweisreaktion sichtbar gemacht, bevorzugt wird das DIG DNA Labeling and Detection Kit von Roche Diagnostic (früher Boehringer Mannheim).

[0049] Da üblicherweise während der Gelelektrophorese ein DNA Größenstandard (z. B. λ-Hind) mit aufgetrennt wurde, läßt sich über die zurückgelegte Wegstrecke die Größe des Telomers bestimmen.

[0050] Da in einer Zellpopulation nicht alle Zellen und selbst in einer Zelle nicht alle Chromosomen die gleiche Telomerlänge besitzen, erscheinen die Telomere nicht als einzelne Banden, sondern als ein Geschmiere. Als (mittlere) Telomerlänge wird dann der Mittelpunkt des Geschmieres bezeichnet.

[0051] Die einzige Person, die diesem Test falsch zugeordnet werden würde ist Spur 3 unten, sie hat relativ lange Telomere, obwohl sie 57 Jahre alt ist.

[0052] Ansonsten ist deutlich zu erkennen, daß mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens das Lebensalter der meisten Menschen gut abzuschätzen ist.

[0053] Das Ergebnis des Versuchs ist in Diagramm 1 gezeigt. Foto 1 zeigt einen Teil der Telomergeschmiere aus Blutproben. Man kann nun die Lage der Telomergeschmiere auf der Membran mit bloßem Auge betrachten. So lassen sich bereits viele Personen zur alten, oder zur jungen Gruppe zuordnen. Um jedoch exakte Molekulargewichte zu erhalten, muss man die Telomergeschmiere mit einem Densidometer oder einem Scanner analysieren.

[0054] Geeignet ist z.B. die Image Station 440cf von Kodak in Verbindung mit der 1 D Image Analysis Software ebenfalls von Kodak. Außerdem kann es nützlich sein, die Membran zu fotografieren und dieses Foto zu scannen. Insbesondere Telomergeschmiere mit geringer Intensität können so genauer analysiert werden Die bisher bei Blutproben gefundenen Telomerlängen sind in Diagramm 1 dargestellt.

[0055] Durch den Vergleich mit den oben erwähnten Publikationen (Hastie et al. 1990, Vaziri et al. 1993, Levy et al. 1998) wird die Überlegenheit des erfindungsgemäßen Verfahrens auf den ersten Blick deutlich, denn nach deren Ergebnissen wären fast die Hälfte der Personen falsch zugeordnet (dies entspricht fast der Rate-wahrscheinlichkeit.), wenn man ohne das Lebensalter zu kennen diese Personen nur anhand ihrer Telomerlänge zur jungen oder alten Gruppe zuordnen müßte. Die große Streuweite der Meßwerte in diesen Publikationen ist also nur ein Artefakt, bedingt durch die Ungenauigkeiten der verwendeten Methoden.

Tabelle 1 zu Foto 1:

Spur (oben)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Alter (Jahre)	λ -Hind	18	64	60	18	19	20	23	32	65	λ -Hind
Mittlere Telomerlänge (bp)		14.000	6.300	6.500	8.800	9.900	9.900	8.700	8.700	8.200	
Spur (unten)	1	2	3	4	5	6	7				
Alter (Jahre)	λ -Hind	65	59	57	24	63	λ -Hind				
Mittlere Telomerlänge (bp)		6.400	6.800	11.200	13.000	6.800					
oberer Rand (bp)		25.800	21.300	25.200	30.600	27.900					
unterer Rand (bp)		2.900	2.900	4.000	4.000	3.300					

In der oberen Reihe konnte leider kein oberer und kein unterer Rand ermittelt werden, da die Färbung des Hintergrunds der Spur so stark ist. Die einzige Person, die in diesem Test falsch zugeordnet werden würde ist Spur 4 unten, sie hat relativ lange Telomere, obwohl sie bereits 57 Jahre alt ist.

Tabelle 2 zu Foto 2:

Spur (oben)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Quantität	λ -Hind	10 μ l	5 μ l	2 μ l						λ -Hind
Mittlere Telomerlänge (bp)		8.500	8.500	7.100						
oberer Rand (bp)		30.000	31000	30.000						
unterer Rand (bp)		3.900	4.000	4.000						
Spur (unten)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zelltyp					MM6	MM6	MM6	U87	U87	
Quantität	λ -Hind				10 μ l	2 μ l	5 μ l	10 μ l	5 μ l	λ -Hind

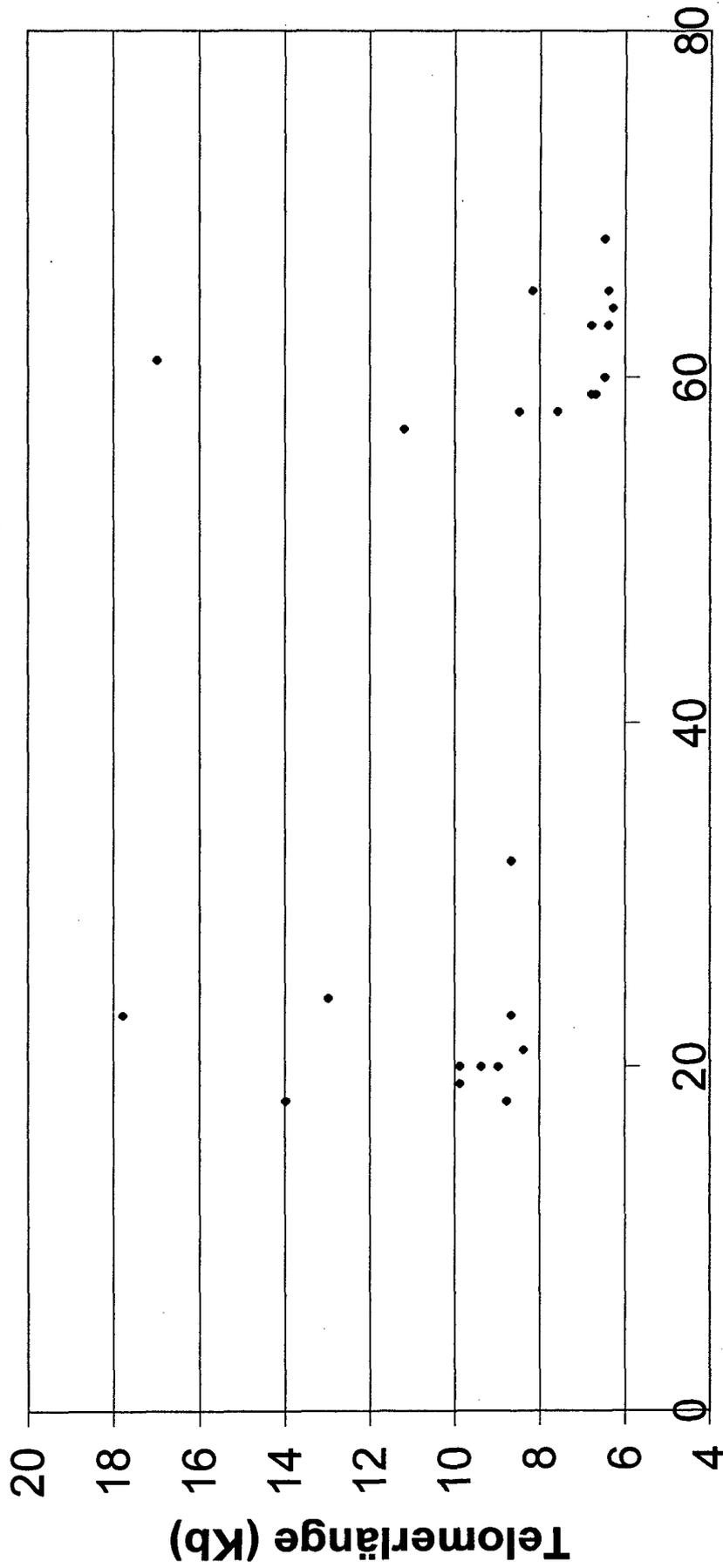
In den Spuren 2,3 und 4 oben wurden unterschiedliche Mengen ein und derselben DNA- Präparation aus Blut (etwa 1 μ g/ μ l DNA) aufgetragen. Man erkennt, dass der obere und der untere Rand der Telomergeschmiers bei allen drei Spuren fast den gleichen Wert besitzen. Ebenso kann bei den aus Zellkulturen gewonnenen Telomergeschmieren in den Spuren 5 bis 9 deutlich erkannt werden, dass die Geschmiere die gleiche Ausdehnung besitzen. Eine zahlenmäßige Bestimmung ist wegen der zu hohen Hintergrundfärbung nur mit großen Ungenauigkeiten möglich.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Messung der Telomerlänge, bei dem man die Länge der Telomere mittels eines Blot-Verfahrens untersucht, dabei wird die DNA vor dem Blotten gelelektrophoretisch aufgetrennt und die die Telomer-DNA enthaltende Proben-DNA vor der gelelektrophoretischen Auftrennung einem vollständigen Restriktionsverdau unterzogen,
dadurch gekennzeichnet, daß die Auftrennung der verdauten DNA in der dem Blot-Verfahren zugrunde liegenden Gelelektrophorese bei
(a) < 5 Volt/cm und
(b) für die Dauer von mindestens 4 Stunden stattfindet und
(c) der Nachweis des Komplexes aus Telomer-DNA und Sonden-Nukleinsäure mittels einer Farbreaktion oder eines chromogenen Nachweises durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass die Länge der nach dem Blotten an die Membran gebundenen Telomere durch eine nachfolgende Hybridisierung mit einer zu der Telomersequenz komplementären Nukleinsäure-Sonde bestimmt wird.
3. Verfahren zur Abschätzung des Lebensalters eines Menschen anhand einer Gewebeprobe oder Sekretprobe, bei dem die Länge der Telomere der DNA aus der Gewebeprobe oder Sekretprobe mittels des Verfahrens nach Anspruch 1 bestimmt wird.
4. Verfahren zur Abschätzung des Lebensalters nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß ein Vergleich mit einer im selben Testansatz mit aufgetrennten Telomer-DNA aus einer Person bekannten Lebensalters das Lebensalter der Person bestimmt wird, aus der die Gewebeprobe stammt.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, bei dem ein Agarosegel verwendet wird, welches in einem unteren Abschnitt eine Agarosekonzentration von 0,7–1,5% (w/w) und in einem oberen Abschnitt von 0,5–1% (w/w) aufweist, und wobei die Gelelektrophorese für mindestens 6 Stunden durchgeführt wird, wobei der untere Abschnitt derjenige ist, in dem der untere Rand des Telomergeschmiers genau bestimmt wird und der obere Abschnitt derjenige ist, in dem der obere Rand bestimmt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Kombination von Farbreaktion und langer Laufzeit sowie niedriger Stromspannung ein stabiler unterer und ein stabiler oberer Rand des TRF-Geschmiers erkennbar wird.
7. Verfahren nach, Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß unterschiedliche Mengen (z.B. 1 µl, 5 µl, und 10 µl) der zu untersuchenden DNA nebeneinander aufgetragen werden.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Farbreaktion über mehrere Tage bis mehrere Monate ausgedehnt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Telomere vor dem Restriktionsverdau direkt markiert werden, bevorzugt mit terminaler Transferase.
10. Verfahren zur Abschätzung der durchschnittlichen Lebenserwartung eines Menschen anhand einer Gewebeprobe oder Sekretprobe, bei dem die Länge der Telomere der DNA aus der Gewebeprobe oder Sekretprobe mittels des Verfahrens nach Anspruch 1 bestimmt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 9 dadurch gekennzeichnet, dass durch Vergleich mit einer im selben Testansatz mit aufgetrennter Telomer-DNA aus einer Vielzahl von Personen, die in einem bekannten Lebensalter verstorben sind, die durchschnittliche Lebenserwartung der Person bestimmt wird, von der die Gewebeprobe stammt.
12. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Telomerlängen mit einer zuvor ermittelten Eichgerade verglichen werden, und wobei entsprechend keine Vergleichsproben mitgeführt werden.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Diagramm 1
Die Telomerlängen bei Blutproben



Das Alter der Blutspender in Jahren

Photo 1



Photo 2

