

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

Der altersabhängige Verlust der Geschlechtschromosomen beim Menschen unter  
Einwirkung von 5-Azadeoxycytidin

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Andreas Klein  
aus Augsburg

Würzburg, Januar 2001

Referent: Prof. Dr. M. Schmid  
Korreferent: Prof. Dr. H. Höhn  
Dekan: Prof. Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2002

Der Promovend ist Arzt

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die menschlichen Geschlechtschromosomen	1
1.1.1 Das X-Chromosom	2
1.1.2 Das Y-Chromosom	6
1.2 Der Verlust von Geschlechtschromosomen durch Mikronuklei	8
1.3 Die Wirkung des Nukleosidanalogs 5-Azadeoxycytidin	10
1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	14
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Chemikalien	16
2.2 Medien und Lösungen	17
2.3 DNA-Sonden	18
2.4 Probanden und Zellmaterial	19
2.5 Anlegen einer Lymphozytenkultur	19
2.6 Präparation und Färbung von Interphasekernen und Metaphase- chromosomen	20
2.7 In situ Hybridisierung	21
2.7.1 Denaturierung der Chromosomenpräparate	21
2.7.2 Der Hybridisierungsansatz	22
2.7.3 Nachweis der Hybridisierung mit Streptavidin-Meerrettich- peroxidase	22
2.8 Mikroskopie und fotografische Dokumentation	24
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1 Die Anzahl der aufgetretenen Mikronuklei	25
3.1.1 Auswertungskriterien	26

	Seite
3.1.2 Die Mikronuklei-Rate bei Frauen und Männern	27
3.1.3 Der direkte Vergleich innerhalb der Altersgruppen	30
3.1.4 Das verstärkte Auftreten von Mikronuklei im höheren Lebensalter	34
3.2 Der Anteil der Mikronuklei mit Hybridisierungssignal	34
3.2.1 Auswertungskriterien	34
3.2.2 Der Nachweis des X-Chromosoms in den Mikronuklei der Frauen	35
3.2.3 Der Nachweis des Y-Chromosoms in den Mikronuklei der Männer	37
3.3 Der Anteil aller hybridisierten Mikronuklei im direkten Vergleich zwischen den Geschlechtern	38
<b>4 Diskussion</b>	<b>40</b>
4.1 Die Aneuploidierate in Blutlymphozyten im Alterungsprozeß	40
4.2 Der Chromosomenverlust durch Mikronuklei erhöht sich im Alter	41
4.3 Mögliche Ursachen für das überproportionale Fehlen der Geschlechtschromosomen im Alter	43
4.4 Die Wirkung von 5-Azadeoxycytidin auf die Hypoploidie der Geschlechtschromosomen, insbesondere auf das Y-Chromosom	45
4.5 Fehlverteilung von Chromosomen durch Hypomethylierung der DNA	49
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>55</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>67</b>

# 1 Einleitung

Die Zellen des menschlichen Körpers enthalten 46 Chromosomen, 44 Autosomen und zwei Geschlechtschromosomen, die auch Gonosomen genannt werden. Die Entwicklung eines Menschen beginnt mit der Vereinigung einer weiblichen und einer männlichen Keimzelle, deren jeweiliger Chromosomensatz in den Reifeteilungen zuvor auf die Hälfte reduziert wurde, daß heißt von 46 auf 23. Das genetische Geschlecht des Embryos ist davon abhängig, ob das Spermium bei der Befruchtung ein X- oder ein Y-Chromosom trägt. Die weiblichen Geschlechtschromosomen bestehen aus zwei X-Chromosomen, die männlichen aus einem X- und einem sehr viel kürzerem Y-Chromosom. Im Jahre 1959 ergab die Untersuchung des Chromosomensatzes bei zwei Erkrankungen des Menschen, dem Turner- und dem Klinefelter-Syndrom, erste Hinweise darauf, daß genetische Faktoren auf dem Y-Chromosom für die Festlegung des männlichen Geschlechts bedeutend sind (Jacobs und Strong 1959; Ford et al. 1959; Welshorn und Russell 1959). Ursprünglich nahm man an, daß der Karyotyp des Menschen stabil sei. Zwei Jahre später fanden sich jedoch erste Hinweise darauf, daß die Anzahl der Chromosomen in den Körperzellen möglicherweise nicht über das gesamte Lebensalter konstant ist und sich insbesondere die Zahl der Geschlechtschromosomen verändern kann (Jacobs und Court Brown 1961).

## 1.1 Die menschlichen Geschlechtschromosomen

Die Geschlechtschromosomen haben sich vermutlich ursprünglich aus einem homologen Chromosomenpaar zum Z und W der Vögel, sowie zum X und Y der Säugetiere entwickelt (Ohno 1967). Während das Y-Chromosom sich erheblich verkleinert hat, enthält das X-Chromosom weitgehend Genloci ursprünglich autosomalen Charakters. An primitiven Wirbeltierklassen lassen sich einzelne Entwicklungsschritte nachvollziehen. So besitzen noch heute die meisten Spezies der Fische, Amphibien und Reptilien morphologisch identische, zytogenetisch nicht unterscheidbare Geschlechtschromosomen.

Die Entwicklung des Y-Chromosoms scheint vom Schema her einen ähnlichen Verlauf wie die Entstehung des W-Chromosoms der Vögel genommen zu haben (White 1973; Bull 1983; Stearns 1987). Die ersten Schritte hierzu sind vermutlich der Verlust von autosomalen Genen, eine Ansammlung von geschlechtsbestimmenden Faktoren sowie eine perizentrische Inversion gewesen. Als weitere Voraussetzung zur Entwicklung differenzierter Chromosomen war eine weitgehende Verhinderung des Crossing-overs nötig, damit in der Meiose keine unbalanzierten Gameten entstehen konnten. Während die vormals Y-gebundenen Gene verloren gingen, wurden ihre Allele auf dem ursprünglich homologen Chromosom konserviert. Nur die sogenannte „pseudoautosomale Region“, die im Euchromatin distal von Yp1 lokalisiert ist, bildet während der Meiose im frühen Pachytän den sogenannten synaptomalen Komplex (Ford und Hamerton 1956; Moses et al. 1975; Solari 1980). Dabei paart sich der kurze Arm des Y-Chromosoms mit dem distalen Drittel des kurzen Arms des X-Chromosoms und es kommt zum Crossing-over zwischen den Chromatiden. Die Gene innerhalb der pseudoautosomalen Region besitzen folglich auch Homologe auf dem X-Chromosom, wie z. B. MIC 2 Y, das für einen monoklonalen Antikörper (12E7) codiert (Goodfellow et al. 1983), Yg, dem Locus für des Blutzellenantigen Yg, das dem Allel Xg entspricht (Goodfellow und Tippet 1981) und das GM-CSF Rezeptorgen (**granulocyte-macrophage colony stimulating factor**) (Gough et al. 1990).

### 1.1.1 Das X-Chromosom

Die Entwicklung des X-Chromosoms und des geschlechtsbestimmenden Mechanismus erklärt einige Besonderheiten, wie z.B. die Entstehung des Sex-Chromatins durch die notwendige Inaktivierung eines X-Chromosoms zur Gendosis-Kompensation.

Eine starke Homologie in der Abfolge der X-gebundenen Gene innerhalb der placentalen Säugetiere weist auf eine Konservierung des ursprünglichen X-Chromosoms hin (Ohno 1967 und 1969). Während die Autosomen des ursprünglichen Karyotyps durch Brüche und Fusionen ständigen Umformungen unterlagen, fanden im X-Chromosom keine substantiellen Veränderungen mehr statt. Nachdem sich der

geschlechtsbestimmende Mechanismus entwickelt hatte, stabilisierte sich das gesamte Genom. So beträgt der DNA-Gehalt aller placentalen Säugetiere trotz unterschiedlicher Karyotypen  $7.0 \times 10^{-9}$  mg DNA pro diploidem Zellkern und das X-Chromosom nimmt dabei etwa 5% des Genoms ein, wenn man nur den Anteil an euchromatischen Material betrachtet (White 1973).

Bestimmte X-gebundene Gene liegen folglich beim männlichen Geschlecht nur hemizygot vor, während sie im weiblichen Geschlecht zweifach vorhanden sind. Dennoch ließ sich kein Unterschied in der Menge oder Aktivität der gebildeten Genprodukte feststellen, wie z.B. dem X-chromosomal lokalisiertem Gen für das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Parallel zur Differenzierung der Geschlechtschromosomen mußte sich vermutlich ein sogenannter „Gendosis-Kompensations-Mechanismus“ entwickeln, um das Gleichgewicht der genetischen Aktivität zwischen den Geschlechtern zu erhalten. 1949 entdeckten Barr und Bertram in den Nervenzellen weiblicher Katzen hoch kondensiertes Chromatin, das entweder am Nucleolus oder an der Kernmembran anlag. Es wurde Barr-Körperchen oder Sex-Chromatin genannt und konnte später in den Interphasezellkernen somatischer Zellen bei fast allen weiblichen placentalen und marsupialen Säugetieren gefunden werden. Allerdings nie in männlichen Individuen (Moore und Barr 1953; Barr 1961).

1959 stellten Ohno und Mitarbeiter die Hypothese auf, beim Barr-Körperchen handele es sich um ein X-Chromosom im kondensierten (heterochromatischen) Zustand, während das zweite X-Chromosom ebenso wie das restliche Euchromatin während der Interphase entspiralisiert vorliege (Ohno et al. 1959). Bald darauf konnte nachgewiesen werden, daß das Sex-Chromatin bildende X-Chromosom in der späten S-Phase repliziert, nachdem die Autosomen und das andere X-Chromosom ihre DNA-Replikation schon fast beendet haben (Taylor 1960; Grumbach und Morishima 1962; Galton und Holt 1964).

Da heterochromatische Bereiche der DNA als genetisch inaktiv galten, vermuteten auch Lyon (1961) und Beutler et al. (1962), daß es sich hier aus Gründen der genannten Gendosis-Kompensation um eine Inaktivierung des X-Chromosoms handeln könnte.

Die Lyon-Hypothese besagt im wesentlichen:

1. In einem frühen Stadium der embryonalen Entwicklung wird in den Somazellen weiblicher Säugetiere ein X-Chromosom inaktiviert.
2. Diese Inaktivierung geschieht zufällig, d.h. in den verschiedenen Zellen desselben Individuums kann entweder das paternale oder das maternale X-Chromosom inaktiv sein.
3. Der Vorgang der Inaktivierung ist irreversibel und erblich. Alle Tochterzellen einer Zelle besitzen das gleiche inaktive X-Chromosom.

Als Heterochromatin wurden ursprünglich Chromosomen oder Chromosomenabschnitte bezeichnet, die im Gegensatz zum Euchromatin während der Interphase, der frühen Pro- und späten Telophase als stärker anfärbbare, kompakte Strukturen sichtbar blieben. [Brown](#) prägte 1966 die Begriffe des fakultativen und konstitutiven Heterochromatins, wobei letzteres die entsprechende Färbbeeigenschaft praktisch in allen Zelltypen und Entwicklungsstadien aufwies. Es besteht - nach heutigem Wissensstand - aus genetisch inaktiven Polynukleotidsequenzen, meist in hochrepetitiver Form. Konstitutives Heterochromatin wird nicht für die Proteinbiosynthese transkribiert; es besitzt aber strukturelle Aufgaben und ist in vielzelligen Organismen essentiell für die Organisation sowohl auf chromosomaler Ebene als auch in Bezug auf den Interphasekern ([Yunis](#) und [Yasmin](#) 1971). Fakultatives Heterochromatin ist nicht aufgrund seiner Basensequenz genetisch inert, sondern wird nachträglich in den Zellen inaktiviert. Es ist durchaus möglich, daß es sich dabei in unterschiedlich differenzierten Zelltypen um jeweils unterschiedlich genetisches Material handelt. Das trifft beispielsweise für das inaktivierte X-Chromosom zu. Generell findet die X-Inaktivierung zwischen dem Morula- und spätem Blastulastadium statt. Der exakte Zeitpunkt konnte bis heute nicht genau festgelegt werden. Das Prinzip der Zufälligkeit bei der Inaktivierung (#2 der Lyon-Hypothese) trifft nicht immer zu. Insbesondere bei strukturellen Aberrationen eines X-Chromosoms wird in den Somazellen bevorzugt das abnormale X inaktiviert.



Durch die klinischen Befunde bei numerischen X-chromosomalen Aberrationen, wie dem Turner- (45, X0) und dem Klinefelter-Syndrom (47, XXY), kam man bereits 1965 ([Ferguson-Smith 1965](#)) zu der Überzeugung, daß nicht alle auf dem X lokalisierten Gene der Inaktivierung unterliegen. Ansonsten müßten betroffene Individuen klinisch völlig unauffällig sein. Zwei Genloci konnten gefunden werden, die aktiv bleiben: das Gen für das rote Blutzell-Antigen Xg und das Gen für die Steroid-Sulfatase. Beide liegen am distalen Ende des kurzen Arms des X-Chromosoms. Vermutlich entgehen gerade diese Gene der Inaktivierung, da sie sich in der männlichen Meiose mit der pseudoautosomalen Region des Y-Chromosoms paaren ([Burgoyne 1982](#)).

Bei Chromosomenuntersuchungen von Männern und Frauen in allen Altersstufen fiel bereits 1961 auf, daß mit zunehmenden Alter vor allem bei Frauen ein Chromosom der C-Gruppe (Chromosomen 6-12, X) fehlte ([Jacobs und Court Brown 1961](#); [Jacobs et al. 1963](#)). Schon damals wurde der Verdacht geäußert, daß es sich dabei vorwiegend um das X-Chromosom handeln könnte. Erhärtet werden konnte der Verdacht durch die Methode der G-Bänderung ([Sumner et al. 1971](#)), bei der das X-Chromosom zweifelsfrei identifiziert wurde ([Galloway und Buckton 1978](#)). So zählte man beispielsweise von jeder Versuchsperson 100 gebänderte Metaphasen aus, die bei Frauen im Alter von über 70 Jahren eine Aneuploidierate von bis zu 8% für das X-Chromosom aufwiesen. 1985 beschäftigte sich dann eine Forschergruppe mit der Frage, ob es sich bei dem fehlenden Chromosom um das aktive oder das inaktive X handelt ([Abbruzzo et al. 1985](#)). Unter der Annahme, daß das spät replizierende X-Chromosom das inaktive darstellt, vermutete man vor allem den Verlust des inaktiven durch Fehler während der Mitose. Einige Studien kamen jedoch zu einer anderen Auffassung und widersprachen dieser Hypothese. Zum Vergleich wurden dabei auch Untersuchungen am Y-Chromosom der Männer durchgeführt.

### 1.1.2 Das Y-Chromosom

Das Y-Chromosom hat sich während der Evolution aus einem Autosom entwickelt und sich im Gegensatz zum X-Chromosom erheblich verkleinert. Autosomale Genloci gingen größtenteils verloren. Es ist eines der kleinsten Chromosomen des menschlichen Genoms mit ca.  $6 \times 10^7$  bp DNA. Nicht das gesamte Y-Chromosom ist für die männliche Geschlechtsdetermination erforderlich, sondern nur ein kleiner Bereich von etwa 35 kb im kurzen Arm. Ein Großteil des Y-Chromosoms besteht aus konstitutivem Heterochromatin.

Die Festlegung des gonadalen Geschlechts ist vom Vorhandensein oder Fehlen des Y-spezifischen Abschnitts SRY (Sex determining region of the Y chromosome) abhängig, das das Gen für den Testis determinierenden Faktor (TDF) enthält. Es liegt im Euchromatin nahe des Grenzbereichs zur pseudoautosomalen Region. Diese männlich determinierende DNA-Sequenz verbleibt normalerweise auf dem Y-Chromosom und wird nicht in der Meiose durch homologe Paarung auf das X übertragen. Mutationen in der Region können eine Geschlechtsumkehr bewirken. Betroffene Individuen haben einen unvollständigen weiblichen Phänotyp und XY-Chromosomen.

Die pseudoautosomale Region befindet sich im Euchromatin distal von Yp1 im kurzen Arm. An der pseudoautosomalen Region wird während der Meiose der synaptonemale Komplex gebildet (Ford und Hamerton 1956; Moses et al. 1975; Solari 1980) Dabei paart sich, wie erwähnt, der kurze Arm des Y-Chromosoms mit dem distalen Drittel von Xp, wobei es zum obligaten Crossing-over zwischen den Chromatiden kommt.

Das Y-Chromosom besteht zu 50-70% aus konstitutivem Heterochromatin, das im distalen Ende des langen Arms lokalisiert ist. Es umfaßt die Bande Yq12 und setzt sich aus hochrepetitiver Satelliten-DNA zusammen (Gosden et al. 1975). Die Menge an Heterochromatin variiert individuell.

Verdaut man menschliche, genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *Hae*III und trennt sie im Agarosegel auf, so werden zwei mit Ethidiumbromid anfärbbare Banden

sichtbar. Die 3.4 kb- und die 2.1-Bande sind Y-spezifisch und stellen jeweils ein repetitives Element dar.

In 4000-6000 Kopien kommt das 3.4 kb-Fragment (DYZ1) auf dem Y-Chromosom vor (Cooke et al. 1983), so daß die DYZ1-Familie ca. 25-30% der gesamten Y-DNA und über 50% des heterochromatischen Teils umfaßt. Es enthält aber nicht ausschließlich Y-spezifische Sequenzen und Burke et al. (1985) fanden heraus, daß diese Sequenzen homologe Regionen in den Autosomen 1, 9, und 15 haben. Die Erklärung hierfür ist eine tandemartige Wiederholung des Pentamers 5'-TTCCA-3' (Cooke und Hindley 1979; Deininger et al. 1981).

Die zweite und kleinere Y-spezifische Bande ist das 2.1 kb-*Hae*III-Fragment (DYZ2), das in ca. 2000 Kopien vorkommt und ungefähr 10-20% der Y-DNA ausmacht. Durch die in situ Hybridisierung mit der Sonde pHY2.1 (Cooke et al. 1982) konnte gezeigt werden, daß sich diese Sequenz über die gesamte Bande Yq12 verteilt (Schmid et al. 1990). Das 2.1 kb-Fragment ist eigentlich Teil einer größeren Einheit, dem 2.47 kb-Fragment, welches durch *Hin*fl in weitere drei Fragmente von 775 bp, 820 und 875 bp gespalten werden kann. Insbesondere das Fragment mit 775 bp ist sehr GC-reich und wird wegen der vielen Schnittstellen für Restriktionsenzyme auch als "noisy region" bezeichnet. Die beiden anderen sind AT-reich und haben nur wenige Schnittstellen, folglich werden sie "silent regions" genannt. Gerade diese Bereiche mit einem hohen Anteil an Cytosin sind für die vorliegende Arbeit von hohem Interesse, da sehr wahrscheinlich der heterochromatische Bereich des Y-Chromosoms durch den Einbau des Nukleosid-analogons 5-Azadeoxycytidin an diesen Stellen hypokondensiert.

Auch für das Y-Chromosom postulierten schon 1961 Jacobs und Court Brown, daß der Anteil an aneuploiden Zellen in menschlichen Lymphozytenkulturen mit dem Alter der Probanden zunimmt. Damals konnte nur festgestellt werden, daß es sich um ein Chromosom der G-Gruppe (21, 22, Y) handeln müßte. Erst durch die Einführung der G-Bänderung war auch hier eine eindeutige Identifizierung möglich (Galloway und Buckton 1978). In dieser grundlegenden Arbeit zeigte sich, daß die Anzahl von aneuploiden Zellen im Alter für beide Geschlechter ansteigt und dabei vor allem

Geschlechtschromosomen betroffen sind. Allerdings gingen auch andere kleine Chromosomen, wie z.B. die Chromosomen 21 und 22, verloren. Die Resultate waren jedoch wegen der niedrigen Verlustrate von 2-8%, bei 100 ausgezählten Metaphasen pro Individuum, statistisch wenig signifikant. Breite Schwankungen innerhalb einer Altersgruppe, zwischen verschiedenen Kulturen vom gleichen Individuum und bei unterschiedlichen Inkubationszeiten erschwerten die Interpretation der Ergebnisse.

## 1.2 Der Verlust von Geschlechtschromosomen durch Mikronuklei

Nach Einführung der Bänderungstechnik konzentrierten sich die Untersuchungen meist auf den altersabhängigen Verlust der Geschlechtschromosomen. Dabei wurde eine möglichst große Anzahl von Metaphasen ausgezählt und dabei nach verlorengegangenen Chromosomen gefahndet. Die Methode erwies sich als aufwendig und störanfällig, wie bei wiederholten Kulturen und mehrfachen Zählungen festgestellt wurde. So kann beispielsweise schon beim Auftropfen auf den Objektträger die Metaphase beschädigt werden und dadurch Chromosomen verlorengehen. Deshalb glaubten Kritiker, angesichts der hohen Variabilität der Ergebnisse aus den Lymphozytenkulturen, eher an ein zufälliges Ereignis, das *in vitro* stattfindet (Wenger et al. 1984).

Die These vom Chromosomenverlust erhielt neuen Auftrieb durch die Entdeckung, daß im Alter verstärkt sogenannte Mikronuklei auftreten (Fenech und Morley 1985). Mikronuklei besitzen eine Kernmembran und sind anscheinend wesentlich kleinere Teile von Kernen, die nur Bruchstücke oder ganze Chromosomen enthalten. Dabei handelt es sich vermutlich um Kernmaterial, das während der Mitose nicht in die Kerne der Tochterzellen integriert wurde (Heddle et al. 1978 und 1978b). Beschädigt man die DNA vorsätzlich durch Röntgenstrahlung oder Zellgifte, wie z.B. Mitomycin, erhöht sich die Rate der Mikronuklei signifikant (Miller und Nüsse 1993). Ihr Auftreten steht folglich allem Anschein nach in unmittelbarem Zusammenhang mit Chromosomenschäden, die z.B. durch Mutagene verursacht wurden. Allerdings muß es für die Zelle

trotzdem noch möglich sein, einen Zellzyklus zu durchlaufen. Bei zu starker Schädigung oder beeinträchtigter Wachstumsrate sinkt selbstverständlich auch die Anzahl der Mikronuklei wieder. [Ford](#) et al. (1988) stellten die These auf, daß es sich bei dem Kernmaterial vorwiegend um ganze Chromosomen handeln müßte. Durch die nichtradioaktive in situ Hybridisierung mit einer zentromerischen Sonde ( $\alpha$ R1), die mit 9 von 23 menschlichen Chromosomen hybridisiert, konnten sie in 32,3% der Mikronuklei zentromerische DNA feststellen. Die Autoren folgerten daraus, daß es sich deshalb vorwiegend um ganze Chromosomen handeln dürfte. Sie könnten durch eine "Verzögerung" in der Anaphase – möglicherweise durch eine Fehlfunktion des Kinetochors – verlorengegangen sein. Beim Betrachten von Mitosen in verschiedenen Stadien fielen nämlich immer wieder Chromosomen auf, die gewissermaßen in der Mitte der Äquatorialplatte zurückblieben, während sich die anderen schon an den beiden Polen des Spindelapparats befanden. Eine andere Erklärung wäre z.B. auch ein verlängertes "Aneinanderhaften" von homologen Chromosomen bis in die Metaphase hinein.

Nachdem mit den Mikronuklei ein Erklärungsmechanismus für den Chromosomenverlust gefunden worden war, beschäftigten sich wieder einige Arbeiten mit den Geschlechtschromosomen. Bis zu 72,2% der Mikronuklei aus Lymphozyten von Frauen im höheren Lebensalter sollten ein X-Chromosom enthalten ([Hando](#) et al. 1994). Die Forscher untersuchten dabei Zellen, deren Zellteilung mit Cytochalasin B gehemmt wurde, und die dadurch zwei Zellkerne enthielten. Durch in situ Hybridisierung mit einer X-spezifischen Gensonde konnten sie die Verteilung der X-Chromosomen in Tochterkernen und Mikronuklei ermitteln. Andere Methoden ergaben aber eine wesentlich geringere Rate an X-positiven Mikronuklei ([Guttenbach](#) et al. 1994; [Surrallés](#) et al. 1996). Beide Studien zeigten eine Zunahme der Mikronuklei im Alter um das 3-4fache auf 0,46% aller ausgezählten Kerne. In den Mikronuklei fand sich gleichzeitig einen höherer Anteil an Geschlechtschromosomen bei den über 70jährigen Probanden: von 14% bis 30% für das Y-Chromosom und von 8% bis 40% für das X-Chromosom ([Guttenbach](#) et al. 1994). Inzwischen gilt es als erwiesen, daß vor allem das X-Chromosom überzufällig häufig in den Lymphozyten älterer Frauen fehlt. [Surrallés](#) und Mitarbeiter entdeckten, daß dabei nicht nur – wie vermutet – das inaktive X,

sondern auch das aktive verloren ging. Dieser These widersprachen allerdings die Arbeiten von [Tucker et al. \(1996\)](#).

Die Aneuploidie des Y-Chromosoms während des Alterns ist im Vergleich zum X weniger ausgeprägt. [Koschorz \(1992\)](#) fand eine Aneuploidierate von bis zu 0,89% aller Zellkerne in Lymphozyten älterer Männer. In durchschnittlich 14% bis 20% der auftretenden Mikronuklei ([Guttenbach et al. 1994](#)) bzw. 13,5% ([Nath et al. 1995](#)) konnte das Y-Chromosom mittels in situ Hybridisierung nachgewiesen werden. Im Unterschied zum X-Chromosom fanden sich allerdings wesentlich weniger Kinetochore im Mikronukleus, so daß ein Defekt am Kinetochor selbst diese Auffälligkeit erklären könnte.

Trotz umfassender Studien zu den Themen Altern und Verlust von Geschlechtschromosomen konnten bisher keine schlüssigen Erklärungen dafür gefunden werden. Ist der Verlust wirklich spezifisch für Gonosomen oder sehen wir das Ergebnis eines Selektionsprozesses, da das Fehlen von großen Autosomen für die Zelle möglicherweise tödlich ist?

### 1.3 Die Wirkung des Nukleosidanalogs 5-Azadeoxycytidin

Das Nukleosidanalogon 5-Azadeoxycytidin wird während der Replikation anstelle von Cytosin in alle Arten von DNA und RNA eingebaut. Es konnte erstmals 1964 von [Pliml](#) und [Sorm](#) synthetisiert werden. Seine Wirkungsweise entspricht weitgehend dem Cytidinanalogon 5-Azacytidin, einem Fermentationsprodukt von *Streptovercillium ladakanus* ([Hanka et al. 1966](#)), ruft aber seine Effekte schon bei niedrigeren Konzentrationen hervor. 5-Azadeoxycytidin wirkt sehr vielfältig und weist bakterio- statische, zytostatische, immunsuppressive, antileukämische und karzinogene Eigenschaften auf ([Fucík et al. 1970](#); [Cihák 1974](#)).

Der Einbau des Basenanalogs in die DNA erfolgt während der Replikation und ersetzt Cytosin. In Vertebraten ist Cytosin die einzige Base, die von einer zelleigenen Methylase methyliert werden kann. Dabei wird eine Methylgruppe von 3-Adenosylmethionin auf die Position 5 des Cytosins transferiert (Ehrlich und Wang 1981). Eine einmal gegebene Methylierung wird bei jeder nachfolgenden Replikation an die Tochterzellen weitergegeben (Razin und Riggs 1980). Bei 5-Azadeoxycytidin ist dieser Schritt jedoch unmöglich, da das C-Atom an Position 5 hier durch ein Stickstoffatom substituiert ist (Abb. 1).

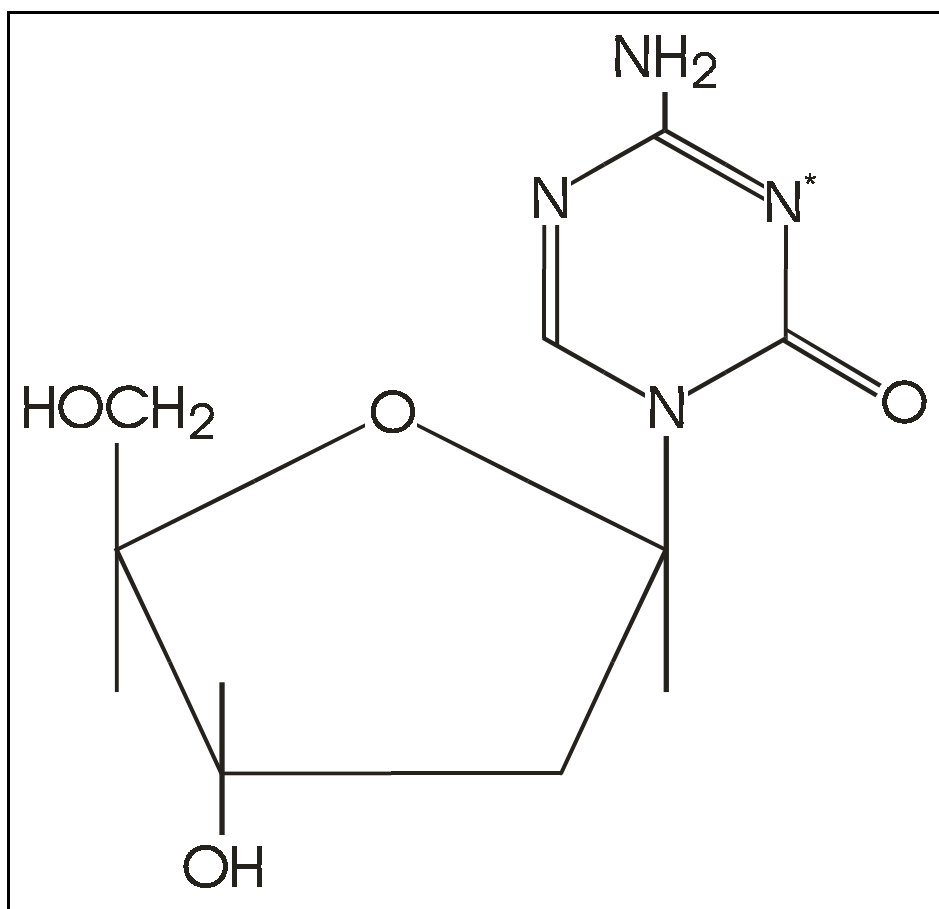


Abbildung 1: Strukturformel von 5-Azadeoxycytidin. Das Stickstoffatom an Position 5 des Pyrimidinrings ist mit \* gekennzeichnet

Der Einbau von 5-Azadeoxycytidin in die DNA führt somit zu einer deutlichen Hypomethylierung des neu synthetisierten DNA-Strangs, wobei dies vermutlich mit der direkten Einbaumöglichkeit des Pyrimidinanalogs zusammenhängt (Jones und Taylor 1981; Creusot et al. 1982). Interessanterweise korreliert die Expression von Genen bei

Wirbeltieren mit dem Grad der Methylierung von Cytosin innerhalb und in der Nähe der Gen-regulierenden Regionen. Genaktivität ist in der Regel mit Abwesenheit oder reduzierter Methylierung in diesen Bereichen assoziiert (Hypomethylierung), was beispielsweise auch bei der X-Inaktivierung eine Rolle spielt (Ehrlich und Wang 1981; Razin und Riggs 1980; Mohandas und Shapiro 1983). Im folgenden wird jedoch das Augenmerk vor allem auf die strukturellen und funktionellen Veränderungen an bestimmten Chromosomen gerichtet.

1970 wurde zum ersten Mal berichtet, daß das Basenanalogon im Lichtmikroskop sichtbare Strukturveränderungen an den Chromosomen in pflanzlichen Wurzelspitzen hervorruft (Fucík et al. 1970). Spezifische Chromosomenabschnitte wiesen unterkondensierte Segmente auf. Durch Zugabe von 5-Azadeoxycytidin zu menschlichen Lymphozytenkulturen, segmentierten sich die Metaphasechromosomen ähnlich einem R-Banden Muster (Viégas-Pequinot und Dutrillaux 1976). Dieselben Autoren verwendeten dann 1981 5-Azadeoxycytidin zum gezielten Nachweis GC-reichen Heterochromatins in den Chromosomen verschiedener Säugetierspezies (Viégas-Pequinot 1981).

Weitere Untersuchungen mit 5-Azacytidin und 5-Azadeoxycytidin zeigten, daß die Wirkung sowohl zeit- als auch dosisabhängig ist. Umfassende Untersuchungen dazu veröffentlichten Schmid und Mitarbeiter im Jahr 1984. Beispielsweise führen hohe Konzentrationen von  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  M zu einer so starken Hypokondensierung, daß die Chromosomen wie "pulverisiert" aussehen. Bei mittleren Dosen von  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$  M kann man eine Segmentierung erkennen, die der R-Bänderung sehr ähnlich ist und wie oben erwähnt schon 1976 beobachtet wurde. Versetzt man 7 Stunden vor Abbruch der Zellkulturen das Kulturmedium mit 5-Azadeoxycytidin, so daß sich die Konzentration im Bereich von  $10^{-6}$  bis  $10^{-7}$  mol/l bewegt, erhält man sehr spezifische Hypokondensierungen im heterochromatischen Bereich der Chromosomen 1, 9, 15, 16 und Y (Schmid et al. 1983 und 1984). Diese Hypokondensierungen prägen sich auch in gleicher Weise bei veränderter Lokalisation aus, wenn das konstitutive Heterochromatin durch Rearrangement innerhalb dieser Chromosomen verlagert oder auf andere transloziert wurde. Somit können durch die Behandlung von Lymphozytenkulturen mit 5-Azacytidin bzw. 5-Azadeoxycytidin beispielsweise Chromosomenaberrationen identifiziert



werden, bei denen das konstitutive Heterochromatin dieser Chromosomen mitbetroffen ist.

Ein weiterer Effekt ist die Konservierung somatischer Paarungen des Heterochromatins vom Interphase- bis ins Metaphasestadium hinein. Die Fusion heterochromatischer Regionen in den Metaphasechromosomen wird mit dem Begriff der "ektopischen Paarung" bezeichnet. Weiterhin wurde beobachtet, daß diese Chromosomenabschnitte eine starke Tendenz zeigen, miteinander zu verschmelzen und im Interphasekern große Chromozentren zu bilden. Über die mögliche natürliche Funktion von somatischen Paarungen ist wenig bekannt. Möglicherweise stellen sie einen wichtigen Ordnungsfaktor des Chromatins im Interphasekern dar (Comings 1980). Zusätzlich scheinen sie eine der Voraussetzungen für ein ungleiches mitotisches Crossing-over zu sein, das zu den bekannten Heterochromatinvarianten führt (Kurnit 1979). Weiterhin spielen sie vermutlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Translokationsereignissen zwischen Chromosomen, die auch in der Interphase häufig miteinander assoziiert sind (Natarajan und Gropp 1972). Interessant ist, daß in 70 % der Translokationen zwischen dem Y-Chromosom und einem Autosom das Heterochromatin auf den kurzen Arm eines akrozentrischen Chromosoms transloziert wurde. Dabei ist am häufigsten das Chromosom 15 betroffen (Smith et al. 1979). Grundlegender Mechanismus für die Neubildung von Heterochromatinvarianten ist ein ungleiches mitotisches Crossing-over und der dadurch bedingte Austausch von Doppelstrang-DNA während der mitotischen Replikationsphase (Kurnit 1979).

Während der Interphase liegen somatische Paarungen zwischen dem Heterochromatin der Chromosomen 1, 9, 15, 16, und Y im Kern der Lymphozyten vor. Durch die Einwirkung von 5-Azadeoxycytidin bleibt die somatische Paarung bis weit in die Metaphase hinein erhalten (Schmid et al. 1983), was somit ein verlängertes "Aneinanderhaften" bewirken könnte.

#### 1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Mikronuklei enthalten Chromosomen oder -bruchstücke, die während der Mitose nicht in die Tochterkerne integriert wurden. In der vorliegenden Arbeit soll erörtert werden, ob das Auftreten von Mikronuklei eine mögliche Erklärung für den bereits 1961 von [Jacobs](#) und Mitarbeitern postulierten Zusammenhang zwischen Aneuploidie und Alter darstellt.

Im ersten Schritt wurde 5-Azadeoxycytidin zur Lymphozytenkultur hinzugegeben. 5-Azadeoxycytidin wird, wie zuvor erwähnt, bei der Replikation anstelle von Cytosin in die DNA eingebaut und verhindert die Methylierung des neu entstandenen Strangs. Ziel dieser spezifischen Schädigung sollte nicht nur die Beobachtung der veränderten Mikronuklei-Rate sein, sondern auch, ob – im Vergleich zu früheren Publikationen – Unterschiede in den verschiedenen Altersstufen und zwischen den Geschlechtern auftreten würden.

Im zweiten Schritt wurde der Inhalt der aufgetretenen Mikronuklei untersucht. Viele der bisherigen Studien lieferten Hinweise darauf, daß es sich vorwiegend um den Verlust von Geschlechtschromosomen handeln könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser These durch das Untersuchen von Lymphozytenkulturen gesunder Probanden aus drei Altersstufen nachgegangen. Der Nachweis erfolgte mittels nichtradioaktiver in situ Hybridisierung durch X- bzw. Y-spezifische DNA-Sonden. Mit dieser Methode konnte genauer überprüft werden, ob im Interphasekern oder im Mikronukleus ein bestimmtes Chromosom vorhanden ist oder nicht. Zu leicht wird beispielsweise beim Auswerten von Metaphasen ein Chromosom durch das Auftropfen auf den Objektträger versprengt und dann fälschlich als Aneuploidie gedeutet.

Die vorliegende Arbeit soll weiter Aufschluß darüber geben, ob die Aneuploidie im höheren Lebensalter aktiv durch einen erhöhten Verlust über Mikronuklei zustande kommt oder nur die Summe aller Verlustereignisse während des Lebens darstellt. Denkbar wäre eine Selektion, wie sie von [Hando](#) und Mitarbeitern (1994) in Betracht gezogen wurde. Er stellte die These auf, daß möglicherweise jedes Chromosom das

gleiche Risiko habe, in der Mitose durch Fehlverteilung verloren zu gehen. Somit gingen alle Chromosomen mit gleicher Häufigkeit verloren, fehlende Geschlechtschromosomen würden jedoch die Funktion der Zelle und ihr Weiterleben weniger beeinträchtigen. Aus diesem Grund fänden sich dann im Alter vermehrt Zellen ohne Gonosomen.

Letztlich soll das Ergebnis dieser Arbeit neue Anhaltspunkte hinsichtlich der Entstehung und des möglichen Mechanismus für den Chromosomenverlust durch Mikronuklei und zytogenetischer Veränderungen im Alter liefern. Ein Vergleich der Ergebnisse mit den bisher veröffentlichten Arbeiten kann Aufschluß darüber geben, ob die Einwirkung von 5-Azadeoxycytidin spezifisch den Verlust der Geschlechtschromosomen beeinflusst und neue Phänomene auftreten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Gängige Chemikalien (Reinheitsgrad p.a., falls nicht anders erwähnt) und Verbrauchsmaterial stammen von den Herstellern GIBCO<sup>®</sup>, Merck, Roth, Serva, Sigma oder vom örtlichen Handel für Laborbedarf. Zusätzliches Material von anderen Firmen wird eigens angegeben. Standardmethoden, soweit nicht gesondert referiert, sind von [Sambrook et al. \(1989\)](#) übernommen worden.

Agfa: Agfaortho-25-Filme

Apotheke der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg:

Diäthyläther

Assistent<sup>®</sup>: Histokitt<sup>®</sup>

Boehringer: BSA (Bovines Serum Albumin), Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase, Blocking Reagent

Fresenius-AG: Ampuwa<sup>®</sup> (Aqua pro injectione, steril und pyrogenfrei)

Fluka: Formamid

GIBCO<sup>®</sup>: RPMI 1640 Medium, fötales Kälberserum (FKS), Colcemid<sup>®</sup> (Colchicin), Penicillin/Streptomycin Gemisch, Phytohämagglutinin (PHA)

Marabu<sup>®</sup>: Fixogum<sup>®</sup>

Sigma: Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (=Tween 20)

## 2.2 Medien und Lösungen

Für das Ansetzen von Puffern und Lösungen wurde ausschließlich destilliertes Wasser (Ampuwa®) verwendet. Sie wurden steril gehandhabt oder autoklaviert, falls nötig.

DAB-Lösung:	0,5 mg DAB (Diaminobenzidin) 5 µl 30-35 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 ml 1 x PBS
Dilution Buffer (5 x )	5 x PBS 5 % BSA (Bovines Serum Albumin) 25 mM EDTA
Fixativ:	3 Teile Methanol 1 Teil Eisessig
Giemsalösung:	2 ml Giemsalösung (Merck) 98 ml Sörensen Phosphatpuffer (pH 6,88)
Hypotone Lösung:	0,075 M KCl
PBS:	0,15 M NaCl 0,05 M NaHPO <sub>4</sub> Calcium- und Magnesiumfrei
RPMI-Kulturmedium:	970 ml Ampuwa® 27 ml NaHCO <sub>3</sub> Trockenpulver RPMI

RPMI-Komplettmedium:	200 ml RPMI-Kulturmedium 38 ml inaktiviertes, fötales Kälberserum (FKS) (Inaktiviert bei 56°C für 30 Minuten) 2,0 ml Penicillin/Streptomycin Gemisch
Sörensen PO <sub>4</sub> -Puffer:	11 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O (pH 6,88)
SSC (20 x):	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat

### 2.3 DNA-Sonden

Biotin gehört neben Digoxigenin im Zuge der nicht radioaktiven in situ Hybridisierung zu den sensitivsten Rezeptormolekülen (Burns et al. 1985). Durch seinen Einbau in die Sonden-DNA kann es anschließend über biotinbindende Proteine wie Avidin und Streptavidin nachgewiesen werden. Die sehr hohe Affinität der Avidine zu Biotin sorgt hierbei für die Beständigkeit der Komplexe. Zur Markierung der DNA-Sonden mit Biotin wurden hier das Random Priming und die Nick Translation eingesetzt (Feinberg und Vogelstein 1983 und 1984). Mit Hilfe des Spot Tests wurde vor Durchführung der Experimente überprüft, ob ein Biotineinbau auch tatsächlich erfolgt war.

Zur in situ Hybridisierung des Y-Chromosoms wurde die DNA-Probe pHY2.1 (Cooke et al. 1982) verwendet. Es handelt sich bei dieser Probe um ein 2.1 kb Fragment, welches unter stringenten Bedingungen ausschließlich an die 2,1 kb *HaeIII*-Fragmente in der Heterochromatinregion im langen Arms des Y-Chromosoms bindet. In diese Probe wurde, wie erwähnt, durch Nick-Translation Biotin (Biotin-16-dUTP) eingebaut. Die biotinylierte DNA-Sonde wurde vom Labor bereits fertig zur Verfügung gestellt. Der Nachweis des X-Chromosoms wurde durch Hybridisierung mit den Proben pXBR oder BamX7 geführt. Beide Proben binden an perizentromerische Sequenzen des

X-Chromosoms (Yang et al. 1982; Willard et al. 1983). Die X-spezifischen Sonden wurden ebenfalls biotinyliert vom Labor zur Verfügung gestellt.

## 2.4 Probanden und Zellmaterial

Alle Untersuchungen erfolgten an Blutlymphozyten. Von insgesamt 120 freiwilligen und klinisch gesunden Probanden wurden aus 3-5 ml heparinisierem Vollblut jeweils zwei Lymphozytenkulturen angelegt. Die Blutproben wurden anonymisiert weiter verarbeitet.

Die Probanden wurden aus drei Altersstufen ausgewählt: 0-5 Jahre, 30-35 Jahre und 60-65 Jahre. In jeder Altersstufe befanden sich 20 weibliche und 20 männliche Probanden. Die Verteilung wird hier zur besseren Übersicht tabellarisch dargestellt:

<b>Alter</b>	<b>Anzahl der Probanden und Geschlecht</b>	
0 - 5 Jahre	20 weiblich	20 männlich
30 - 35 Jahre	20 weiblich	20 männlich
60 - 65 Jahre	20 weiblich	20 männlich

## 2.5 Anlegen einer Lymphozytenkultur (Methode nach Pfeiffer 1974)

Zu 10 ml des komplettierten und auf 37°C vorgewärmten RPMI-Mediums wurden 0,8 ml heparinisieretes Vollblut in sterile 50 ml Zellkulturflaschen gegeben. Um das Zellwachstum zu stimulieren wurden 150 µl des Mitogens Phytohämagglutinin (PHA von GIBCO®) hinzugefügt. Von jeder Versuchsperson wurden mindestens zwei Zellkulturen angelegt.

Alle Kulturen wurden bei 37°C für insgesamt 72 Stunden in einem Brutschrank inkubiert. Genau sieben Stunden vor Abbruch wurde jeweils eine der Zellkulturen mit

5-Azadeoxycytidin versetzt. Die Konzentration von 5-Azadeoxycytidin im Medium betrug  $1,82 \times 10^{-6}$  mol/l. Die andere Kultur diente als Kontrolle. Sowohl Zeitpunkt der Zugabe als auch Konzentration basierten auf Erfahrungen und Analysen von M. Schmid und Mitarbeitern (Schmid et al. 1984), die in ihren Studien eine möglichst große Anzahl von Hypokondensierungen im Heterochromatin der Chromosomen 1, 9, 15, 16 und Y erreichen wollten. Zusätzlich führte der Autor eigene Verdünnungsreihen an sechs exemplarischen Versuchspersonen aus allen Altersstufen durch, um ein Maximum an Hypokondensierungen zu erzielen. Gleichzeitig beeinträchtigte die genannte Konzentration die Wachstumsrate der Lymphozyten am geringsten. Zur genauen Auswertung wird auf den Ergebnisteil der Arbeit verwiesen.

## 2.6 Präparation und Färbung von Interphasekernen und Metaphasechromosomen

50 Minuten vor Abbruch der Zellkulturen wurden 80 µl Colcemid<sup>®</sup>, ein Spindelgift (Colchicin), in die Kulturflaschen gegeben, um die Chromosomen in der Metaphase zu arretieren. Nach dieser Einwirkzeit wurden die Kulturen in Zentrifugenröhrchen überführt und für 8 Minuten bei 1400 U/min (=276 g) zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt und es erfolgte die Resuspendierung des Zellsediments mit der auf 37°C vorgewärmten, hypotonen Lösung. Diese Zellsuspension wurde anschließend für fünf Minuten im Wasserbad bei 37°C aufbewahrt. Danach wurden die Röhrchen erneut für 8 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert. Nach Abnehmen der hypotonen Phase wurde das Zellsediment rasch und gründlich mit frisch angesetzttem, eiskaltem Fixativ auf dem Schüttler vermischt und auf 10 ml aufgefüllt. Die so fixierten Zellen mußten dann für mindestens 12 Stunden bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt werden. Nach dieser Zeit wurden die Zellen noch zwei Mal mit frischem, eisgekühltem Fixativ gewaschen und jedesmal bei 1600 U/min für sechs Minuten zentrifugiert. Schließlich entnahm man Zellen in soviel Fixativ, daß eine trübe Suspension entstand und tropfte diese auf 6-10 saubere, nasse Objektträger auf. Da eine zu große Auftropfhöhe eine Versprengung von Chromosomen oder Mikronuklei zur Folge haben könnte, wurden alle Präparate gleich behandelt und aus etwa fünf bis sieben Zentimetern aufgetropft.



Nachdem die Objektträger einige Stunden an der Luft trocknen konnten, wurden sie entweder gefärbt, oder bei -20°C in der Tiefkühltruhe zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Die Giemsa-Färbung ist die konventionelle Standardfärbung für Chromosomen und Zellkerne. Sie wurde bei jeder Zellkultur durchgeführt, um den Mitoseindex bestimmen zu können. Gleichzeitig wurde das Auftreten von Hypokondensierungen und Mikronuklei beachtet und ausgewertet. Ein Präparat wurde für fünf Minuten in einer 5%igen Giemsa-Lösung gefärbt, anschließend in destilliertem Wasser abgespült, an der Luft getrocknet und ausgewertet. Falls erforderlich, erfolgte nach der Färbung eine dauerhafte Eindeckung mit Histokitt® und einem Deckgläschen. Bei der Weiterverarbeitung zeigte es sich, daß die Hybridisierungsergebnisse am exaktesten waren, wenn die Chromosomenpräparate nach dem Auftropfen für etwa ein bis zwei Wochen in der Tiefkühltruhe aufbewahrt worden waren.

## 2.7 In situ Hybridisierung

Mit in situ Hybridisierung bezeichnet man ein Verfahren, das den Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen in Zellkernen und Chromosomen erlaubt. Dieser Nachweis wurde mit markierter Proben-DNA nach einer leicht veränderten Methode von [Ambros](#) und [Schweizer](#) (1987) durchgeführt (siehe auch [Schmid](#) et al., 1990).

### 2.7.1 Denaturierung der Chromosomenpräparate

Ein Ansatz von 70%igem, deionisiertem Formamid (Fluka®) in 2 x SSC wurde mit HCl oder NaOH auf pH 7,0 eingestellt und in einem Wasserbad auf 70°C erwärmt. Nachdem die Präparate für ein bis zwei Wochen tiefgekühlt gelagert worden waren, wurden sie im 70°C warmen Formamid für ca. 15-60 Sekunden denaturiert und anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit 70, 80, 90 und 100% Ethanol bei -20°C geführt. Der

Erfolg der Denaturierung wurde dann anhand der Chromosomenmorphologie im Phasenkontrastmikroskop überprüft. Damit die Interphasekerne sicher hybridisieren konnten, mußte eine deutliche Denaturierung der Metaphasechromosomen sichergestellt sein. Daher erfolgte die Denaturierung so lange, bis die Chromosomen sichtbar aufgequollen waren. Aus jeder Altersstufe wurden jeweils fünf Präparate von weiblichen und fünf von männlichen Probanden zufällig ausgewählt und hybridisiert.

### 2.7.2 Der Hybridisierungsansatz

Der Hybridisierungsansatz setzte sich aus 50% oder 60% Formamid mit 2 x SSC, 5-10%igem Dextransulfat und 6-20 ng DNA-Probe pro Objektträger zusammen. Dieser Ansatz variiert für die jeweilige Probe ein wenig, gemäß der zuvor durchgeführten Austestung im Labor. Die Denaturierung der DNA-Sonden erfolgte getrennt von den Präparaten in einem Heizblock bei 75°C für fünf Minuten. Anschließend wurde der gesamte Hybridisierungsmix sofort für einige Minuten in Eis gekühlt, um eine Renaturierung der DNA-Stränge zu verhindern.

Der denaturierte Hybridisierungsansatz wurde auf die vorbereiteten Chromosomenpräparate gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum®-Kleber gegen Austrocknung eingefaßt. Danach wurden sie in eine feuchte Kammer gegeben und über Nacht in einen 37°C warmen Brutschrank gestellt.

### 2.7.3 Nachweis der Hybridisierung mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase

Zum Waschen der Präparate für den Ansatz mit der Y-Sonde wurden zwei Lösungen bestehend aus 2 x SSC und 1 x SSC mit pH 7,0 bei Raumtemperatur bereitgestellt. Nach dem Entfernen der Deckgläschen wurden die Objektträger jeweils 10 Minuten in beiden Lösungen auf dem Schüttler gewaschen.

Bei den X-spezifischen Proben pXBR und BamX7 mußte anders verfahren werden. Sie wurden zuerst zweimal hintereinander für je 7 Minuten in frischer 2 x SSC-Lösung mit 50- bzw. 60%igem Formamid bei pH 7,0 und 45°C im Schüttlerwasserbad gewaschen. Der Gehalt an Formamid entsprach dem jeweiligen Hybridisierungsansatz der Probe. Danach kamen sie wieder für 15 Minuten ins Schüttlerbad mit 2 x SSC und anschließend für die gleiche Zeit in 0,1 x SSC bei jeweils 45-55°C Temperatur.

Die folgenden Schritte waren wieder für alle DNA-Proben gleich. Nach den ersten Waschgängen wurden alle Präparate fünf Minuten in 1 x PBS/ 0,05% Tween und in 1 x PBS bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geschwenkt.

Für jeden Objektträger wurden 200 µl Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Lösung angesetzt. Dazu wurden je 40 µl 5x dilution buffer, 160 µl H<sub>2</sub>O und 0,2 µl Streptavidin-Meerrettichperoxidase gemischt, auf die Objektträgern verteilt und mit einem Deckgläschen versehen.

Nach einer Stunde Inkubation bei 25°C wurden die Präparate in 1 x PBS/0,05% Tween einmal abgespült und dann in frisch zubereitetem 1 x PBS/0,05% Tween nochmals für fünf Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Gleich darauf wurden 300 µl der frisch angesetzten DAB-Lösung auf jeden Objektträger gegeben, wobei das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erst unmittelbar zuvor zur DAB-Lösung hinzugefügt worden war. Nach einer Inkubationszeit von 10-12 Minuten kamen die hybridisierten Präparate in destilliertes Wasser. Sie wurden dann für 15-45 Sekunden in GiemsaLösung gefärbt, getrocknet und mit Histokitt® dauerhaft eingedeckt.

Die Nachweisreaktion für die Hellfeldmikroskopie beruht darauf, daß das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat eine sehr hohe Affinität zu Biotin besitzt. Es entsteht eine kovalente Bindung mit 4 Bindungsstellen. Durch Zugabe von Diaminobenzidin (DAB) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Reaktionsauslöser entsteht ein brauner Niederschlag, der im Phasenkontrast gegenüber der blau-violetten GiemsaFärbung sehr gut zu erkennen ist.

## 2.8 Mikroskopie und fotografische Dokumentation

Die Auswertung und Auszählung aller Präparate erfolgte am Phasenkontrastmikroskop "Axioskop" der Firma Zeiss. Alle hybridisierten Mikronuklei wurden mit der Kamera MC 100 und Agfaortho-25-Filmen fotografiert. Fotografische Beispiele finden sich unter [3.2.1](#) auf Seite [35](#).

### 3 Ergebnisse

Die vorliegende Studie konzentriert sich auf den Verlust von Geschlechtschromosomen durch Mikronuklei. Das Thema Aneuploidie im Alter war schon in mehreren Arbeiten Gegenstand der Untersuchung, wobei die Ergebnisse teilweise auf der Auswertung von Metaphasen oder auf eine geringe Anzahl von Probanden bzw. Mikronuklei beruhte. Deshalb versucht diese Arbeit mit insgesamt 120 Versuchspersonen in drei Altersstufen und durch Zugabe von 5-Azadeoxycytidin einen Beitrag zur Klärung der beobachteten Phänomene zu leisten.

#### 3.1 Die Anzahl der aufgetretenen Mikronuklei

Ein Ziel des ersten Schrittes war es, mit 5-Azadeoxycytidin die Rate der Mikronuklei in der Lymphozytenkultur zu erhöhen. In vorausgehenden Studien fand sich eine Zunahme der Mikronuklei-Rate im höheren Alter bis auf 0,46% aller Zellkerne. Bei der mikroskopischen Auswertung von 2000 Zellkernen pro Objektträger bedeutete dies, daß nur 9 Mikronuklei vorliegen. Obwohl die Hybridisierung eine präzise und gut reproduzierbare Methode darstellt, bewegen sich die Ergebnisse am Rande des Fehlerbereichs. Einige Studien werteten deshalb bis zu 5000 Zellkerne pro Individuum aus ([Guttenbach et al. 1994](#)). Trotzdem bleibt die Zahl der Mikronuklei zwischen 10 und 20, die der hybridisierten zwischen 1 bis maximal 4.

Aus diesem Grund wurde sieben Stunden vor Abbruch der Zellkulturen jeweils eine Kultur pro Versuchsperson mit 5-Azadeoxycytidin versetzt, so daß die Konzentration im Kulturmedium  $1,82 \times 10^{-6}$  mol/l betrug. Die andere Kultur diente als Kontrolle. Sowohl der Zeitpunkt als auch die Konzentration basierten auf Erfahrungen und Analysen von M. [Schmid](#) und Mitarbeitern (1984), die in ihren Studien eine möglichst große Anzahl von Hypokondensierungen im Heterochromatin der Chromosomen 1, 9, 15, 16 und Y erreicht hatten. Eigene Verdünnungsreihen, die an sechs Versuchspersonen aus den jeweiligen Altersstufen vorgenommen wurden, wiesen bei dieser Vorgehensweise eine

maximale Anzahl an Hypokondensierungen auf. Gleichzeitig blieb die Wachstumsrate weitgehend unbeeinträchtigt. Nachdem das spontane Auftreten von Mikronuklei im Bereich von 1-5 pro 1000 untersuchten Zellkernen liegt, wurden in jeder Altersgruppe nur einige Kontrollpräparate zum orientierenden Vergleich ausgewertet.

### 3.1.1 Auswertungskriterien

Wie eingangs erwähnt, sind Mikronuklei wesentlich kleinere Teile von Zellkernen, die einzelne Chromosomen oder möglicherweise Bruchstücke enthalten. Sie besitzen eine Kernmembran. Nach dem bisherigen Kenntnisstand handelt es sich um Kernmaterial, das während der Mitose nicht in die Tochterzellkerne integriert wurde (Heddle et al. 1978 und 1978b). Insgesamt wurden von jeder Versuchsperson 2000 Zellkerne auf Mikronuklei untersucht. Alle Präparate wurden anonymisiert und ohne Wissen um das Alter oder Geschlecht des Probanden ausgewertet. Um weitgehend gleiche Bedingungen zu schaffen, bestanden folgende Auswertungskriterien:

1. Zur Kontrolle der Wachstumsrate wurde der Mitoseindex bestimmt. Auf 100 ausgewertete Zellkerne mußten zwei bis fünf Metaphasen vorliegen (d.h., ein Mitoseindex von 2-5%), damit die Zellkultur gewertet werden konnte.
2. 50% der Metaphasen mußten mindestens eine sichtbare Hypokondensierung der Chromosomen 1, 9, 15, 16 und Y in der Giemsa-Standardfärbung aufweisen. Diese Kontrolle sollte die Wirkung von 5-Azadeoxycytidin auf die Lymphozytenkultur nachweisen.
3. Färbung und Struktur der Mikronuklei mußten den Tochterzellkernen ähneln.
4. Die Größe des Mikronukleus durfte  $\frac{1}{4}$  der Größe des benachbarten Zellkerns nicht überschreiten.

5. Der Mikronukleus durfte nicht mehr als einen Kerndurchmesser vom benachbarten Zellkern entfernt sein, dessen fehlendes Kernmaterial er beinhaltet. Bei noch sichtbarem Zytoplasma wurde auf eine Zytoplasmabrücke geachtet.

Zur Wertung und anschließenden Hybridisierung kamen nur einwandfreie Präparate die alle oben stehenden Bedingungen erfüllten. In Zweifelsfällen wurde ein zweiter Betrachter hinzugezogen und bei fortbestehender Unsicherheit das Präparat nicht gewertet.

### 3.1.2 Die Mikronuklei-Rate bei Frauen und Männern

Von den mit 5-Azadeoxycytidin behandelten Präparaten wurden 2000 Zellkerne ausgezählt und auf Mikronuklei geachtet. Zur besseren Übersicht wird hier das Ergebnis graphisch dargestellt. Bei den Frauen ergab sich folgende Verteilung:

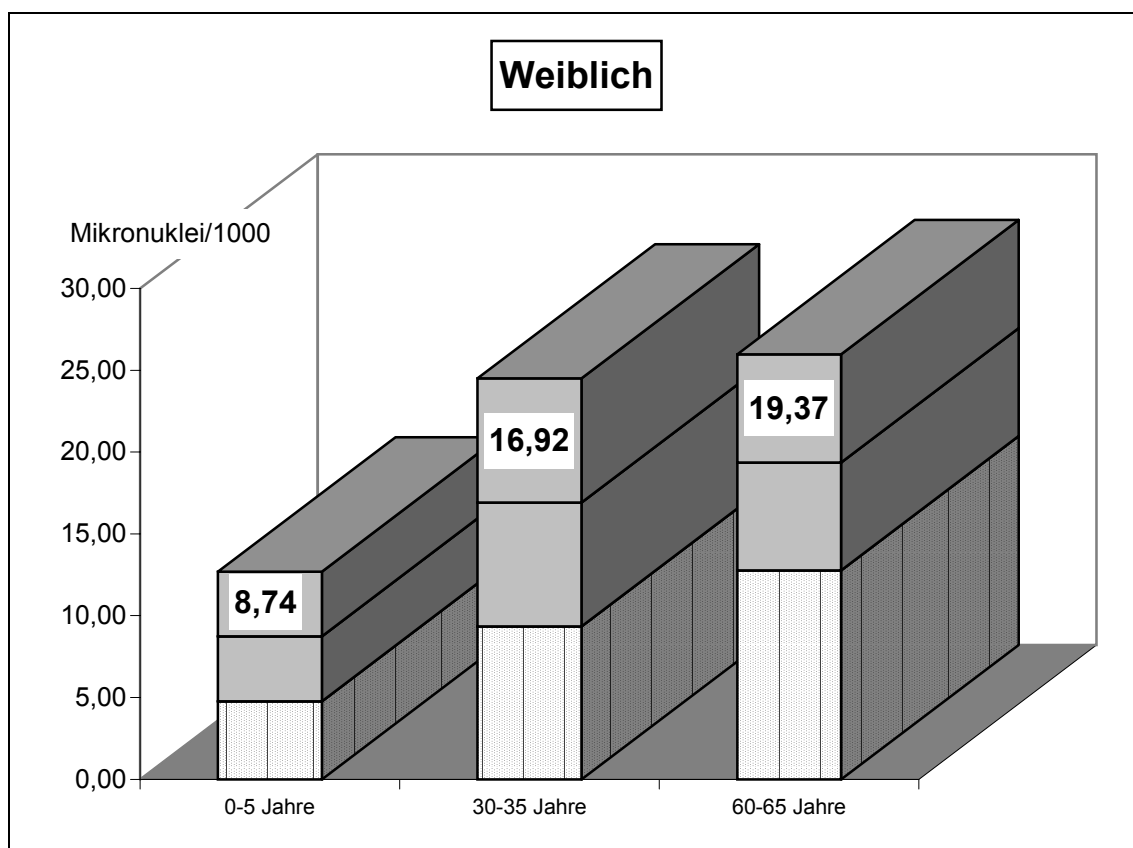


Abbildung 2: Die Mikronuklei-Rate bei Frauen in den drei Altersstufen, bezogen auf 1000 Zellkerne. Der grau schraffierte Bereich markiert das Intervall  $\pm$  eine Standardabweichung um den Mittelwert. Einzelwerte im Anhang: Tabellen Nr. 1-3, Seite [67-69](#)

In der Altersgruppe von 0-5 Jahren traten bei weiblichen Versuchspersonen durchschnittlich 8,74 Mikronuklei bezogen auf 1000 Kerne auf. Die Standardabweichung betrug 3,94%. Der grau schraffierte Bereich in [Abbildung 2](#) kennzeichnet das Intervall von einer Standardabweichung nach oben und unten um den Mittelwert, in dem 68% der Werte liegen. Verglichen mit den Werten für das spontane Auftreten von Mikronuklei aus eigenen Kontrollen und zu denen, die [Guttenbach](#) und Mitarbeiter 1994 untersuchten, entsprach dies einer Erhöhung auf das 2,9 bis 8,4fache.

Bei den 30 bis 35jährigen Frauen stieg die Rate sehr deutlich an, mit einem Mittelwert von 16,92‰ bezogen auf 1000 ausgezählte Lymphozytenkerne (8,5 mal mehr als in den Kontrollkulturen). Allerdings ergab sich auch eine höhere Standardabweichung von 7,58%. Damit lagen also mehr als zwei Drittel der Werte in dem Intervall zwischen 9,34 und 24,50‰ (grau schraffierter Bereich um den Mittelwert).

Bei gleicher Methode erhöhte sich der Mittelwert für die 60 bis 65jährigen Frauen auf 19,37‰. Hier streuten die Einzelwerte von 12,77 bis 25,97‰ innerhalb einer Standardabweichung nach oben bzw. nach unten. Verglichen mit der Steigerung der Mikronuklei-Rate, die wir zwischen den Altersgruppen 0-5 und 30-35 Jahre beobachtet haben, fällt dieser Anstieg deutlich geringer aus. Hinsichtlich der Streuung um den Mittelwert besteht offensichtlich ein großer Überlappungsbereich mit den Werten der 30 bis 35jährigen Frauen. Es ergab sich somit kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Altersstufen. Trotzdem setzte sich der Trend zu einer höheren Mikronuklei-Rate im Alter fort, indem der Mittelwert von 16,9 auf 19,4‰ (gerundet) anstieg. Die Wirkung von 5-Azadeoxycytidin erhöhte die Mikronuklei-Rate um das 4,4 bis 5,3fache gegenüber unbehandelten Kontrollen in dieser Altersstufe ([Guttenbach et al. 1994](#)).

Bei den männlichen Versuchspersonen ergab sich folgende Altersverteilung:



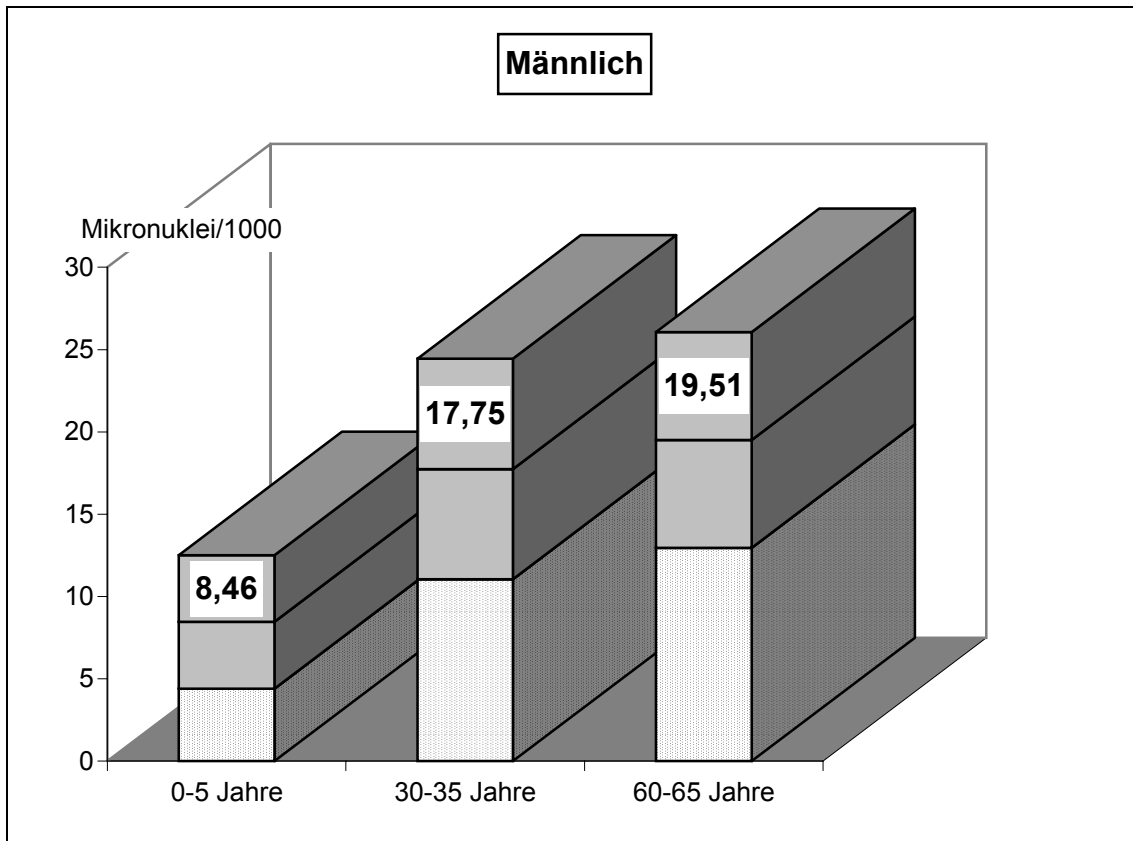


Abbildung 3: Die Mikronuklei-Rate bei Männern in den drei Altersstufen, bezogen auf 1000 Zellkerne. Der grau schraffierte Bereich markiert das Intervall  $\pm$  eine Standardabweichung um den Mittelwert. Einzelwerte im Anhang: Tabellen Nr. 4-6 , Seite [70-72](#)

Erstaunlicherweise zeichnete sich bei den männlichen Probanden ein ganz ähnliches Bild wie bei den Frauen ab. So lag der Wert für die Neugeborenen und bis 5jährigen mit 8,46‰ fast genauso niedrig wie bei den Frauen. Auch die Streuung im Bereich von 4,42 bis 12,50‰, innerhalb des Intervalls einer Standardabweichung um den Mittelwert, entsprach mehr oder weniger der weiblichen. Im Vergleich zu den eigenen, un-behandelten Kulturen und gegenüber den Literaturangaben, hat sich hier der Wert ebenfalls um das 3,3 bis 4,2fache erhöht ([Guttenbach et al. 1994](#)).

Auch hier konnte wiederum bei den 30 bis 35jährigen Männern ein recht starker Anstieg der Mikronuklei-Rate beobachtet werden. Der Mittelwert betrug 17,75‰, mit einer Streuung von 11,05 bis 24,45‰ innerhalb der ersten Standardabweichung. Durch 5-Azadeoxycytidin traten bis zu 10,7mal mehr Mikronuklei auf als in den eigenen Kontrollkulturen.

Mit 19,51‰ verlief die Entwicklung bei den 60 bis 65jährigen männlichen Versuchspersonen ähnlich wie die in der weiblichen Altersgruppe. Auch die Standardabweichung war nahezu identisch. Im Intervall zwischen 12,96 und 26,06‰ lagen wieder mehr als zwei Drittel der Werte. Folglich hat sich auch hier durch Zugabe von 5-Azadeoxycytidin die Rate für das Auftreten von Mikronuklei um das 4,1fache im Vergleich zu anderen Studien ([Guttenbach et al. 1994](#)) und um das 5,6fache im Vergleich zu den eigenen Kontrollen erhöht.

Die Bewertung der Kontrollkulturen war allerdings problematisch. Die Ergebnisse konnten wegen der geringen Anzahl von Mikronuklei lediglich als Orientierungspunkt dienen, da beim mikroskopischen Auswerten ein Mehr oder Weniger von beispielsweise zwei Mikronuklei auf 1000 Kerne die Ergebnisse bereits stark veränderte. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch im Vergleich mit der Studie von [Guttenbach et al. \(1994b\)](#) standen jedoch eine Erhöhung der Mikronuklei-Rate auf das 2,9 bis 10,7fache durch 5-Azadeoxycytidin außer Frage.

### 3.1.3 Der direkte Vergleich innerhalb der Altersgruppen

Bereits durch den Vergleich von [Abbildung 2](#) und [3](#) wird sichtbar, daß die Mikronuklei-Rate bei beiden Geschlechtern anscheinend auf ähnliche Weise mit dem Alter ansteigt. Zur besseren Beurteilbarkeit werden hier nochmals die Werte der jeweiligen Altersgruppen direkt nebeneinander dargestellt. Zuerst die Altersgruppe der Neugeborenen und bis zu 5 Jahre alten Probanden:

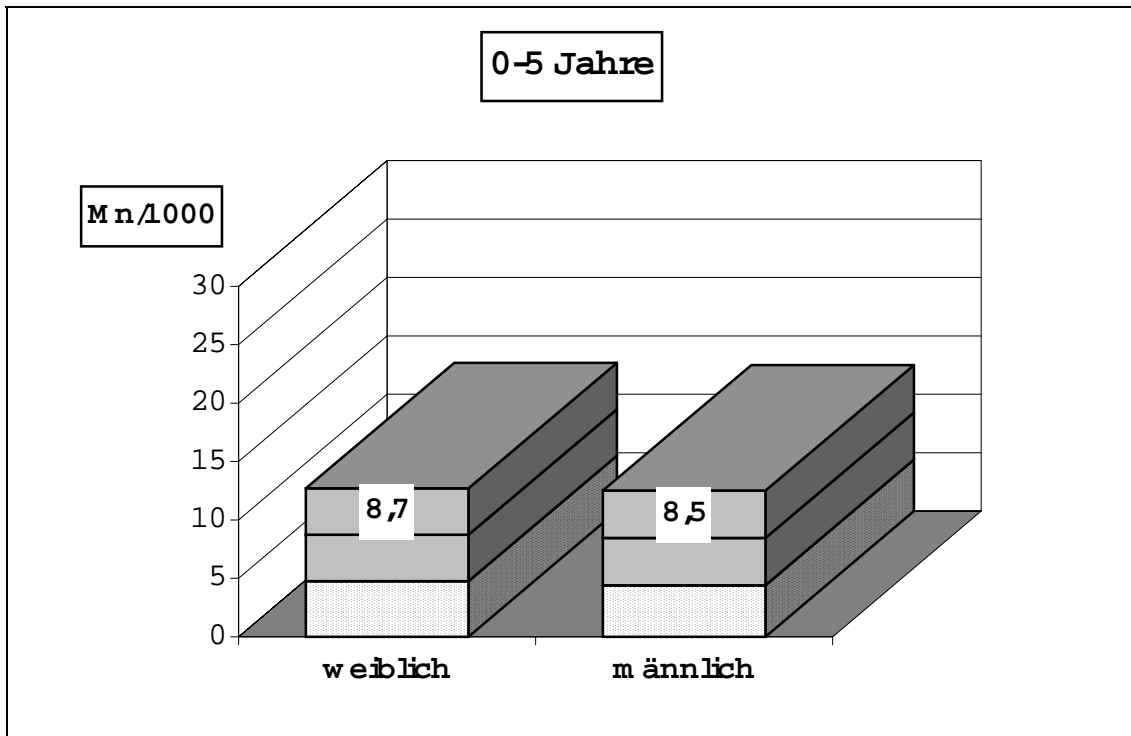


Abbildung 4: Die Mikronuklei-Rate bei Frauen und Männern in der Altersstufe 0-5 Jahre, bezogen auf 1000 Zellkerne. Der grau schraffierte Bereich markiert das Intervall  $\pm$  eine Standardabweichung um den Mittelwert. Die Werte sind auf eine Dezimalstelle gerundet; Mn = Mikronuklei. Einzelwerte im Anhang: Tabelle Nr. 1 und 4, Seite [67](#) und [70](#)

Sowohl der Mittelwert als auch der grau schraffierte Streuungsbereich von einer Standardabweichung erscheinen identisch. Im t-Test fand sich kein signifikanter Unterschied. Die Werte in dieser Abbildung wurden auf eine Stelle hinter dem Komma gerundet.

Mit geringen Unterschieden fiel der Vergleich innerhalb der 30 bis 35jährigen Probanden aus:

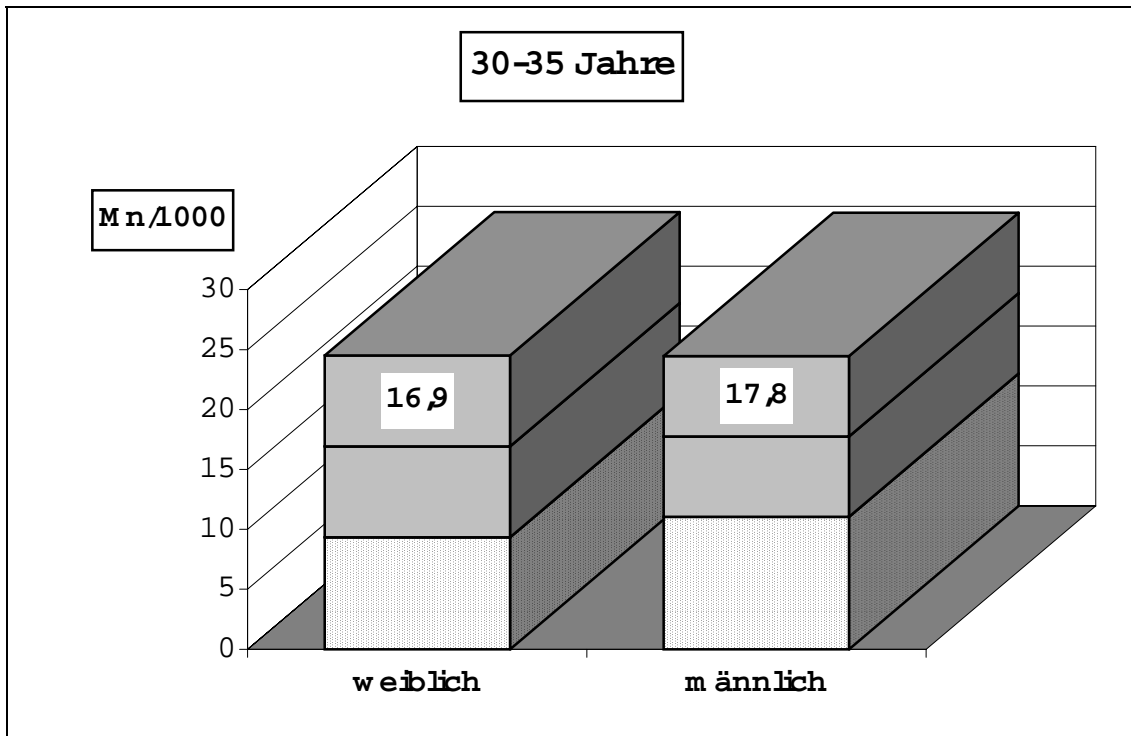


Abbildung 5: Die Mikronuklei-Rate bei Frauen und Männern in der Altersstufe 30-35 Jahre, bezogen auf 1000 Zellkerne. Der grau schraffierte Bereich markiert das Intervall  $\pm$  eine Standardabweichung um den Mittelwert. Die Werte sind auf eine Dezimalstelle gerundet; Mn = Mikronuklei. Einzelwerte im Anhang: Tabelle Nr. 2 und 5, Seite [68](#) und [71](#)

Die beiden Mittelwerte unterschieden sich nur um 0,9 %, auch der Streubereich deckte sich weitgehend: für Frauen ist er mit den Werten zwischen 9,3 und 24,5% ein wenig größer als bei den Männern, mit Werten bei 11,1 bis 24,5%. Die größere Standardabweichung bei den Frauen könnte die leichte Differenz beim Mittelwert erklären. Statistisch fand sich im t-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten.

Offensichtliche Übereinstimmung ergab sich erneut bei den 60 bis 65jährigen Probanden:

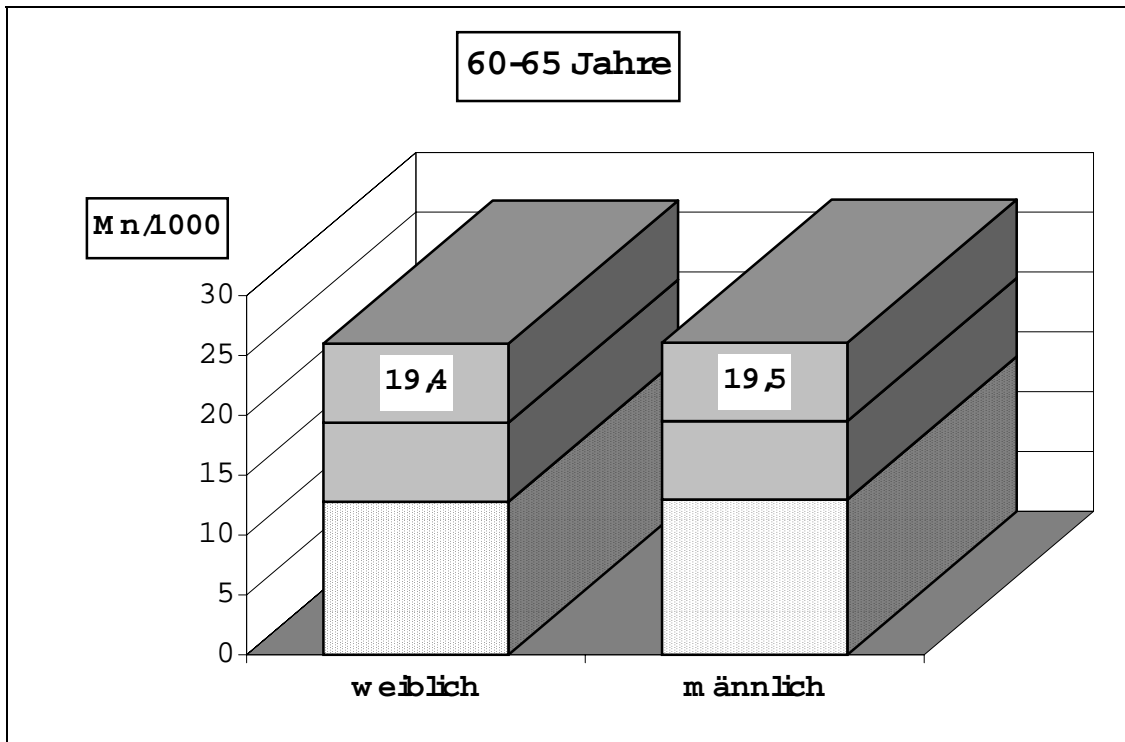


Abbildung 6: Die Mikronuklei-Rate bei Frauen und Männern in der Altersstufe 60-65 Jahre, bezogen auf 1000 Zellkerne. Der grau schraffierte Bereich markiert das Intervall  $\pm$  eine Standardabweichung um den Mittelwert. Die Werte sind auf eine Dezimalstelle gerundet; Mn = Mikronuklei. Einzelwerte im Anhang: Tabelle Nr. 3 und 6, Seite [69](#) und [72](#)

Aus Abbildung 6 ist ersichtlich, daß die Mittelwerte sehr geringfügig, nämlich nur um 0,14%, voneinander abwichen. Bei der Standardabweichung betrug die Differenz sogar nur 0,05.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß kaum Unterschiede hinsichtlich des Mikronuklei-Werts innerhalb einer Altersgruppe bestanden. Der bisher in der Literatur postulierte Unterschied zwischen Frauen und Männern konnte in dieser Arbeit unter Wirkung von 5-Azadeoxycytidin nicht nachvollzogen werden. Anhaltspunkte für eine höhere Mikronuklei-Rate bei Frauen traten nicht auf und bestätigten damit die Ergebnisse von [Guttenbach et al. \(1994\)](#).

### 3.1.4 Das verstärkte Auftreten von Mikronuklei im höheren Lebensalter

Mit zunehmendem Lebensalter stieg die Rate an Mikronuklei. Bei beiden Geschlechtern bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den 0 bis 5jährigen und beiden älteren Altersstufen, also sowohl gegenüber den 30 bis 35jährigen als auch den 60 bis 65jährigen. In beiden Vergleichen kann im t-Test die Wahrscheinlichkeit  $p < 0,001$  nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, daß sich die Mittelwerte signifikant unterscheiden. Der Sprung von den 30 bis 35jährigen zu den 60 bis 65jährigen fiel dann allerdings mit einem Zuwachs von 2,45‰ bzw. 1,76‰ geringer aus und erreichte das Signifikanzniveau nicht. Trotzdem blieb auch hier der Trend erkennbar. Läßt man einmal probenhalber die Geschlechtsunterschiede außer acht und zählt Werte von Frauen und Männern zusammen, so beträgt der Wert der 30-35jährigen 17,34‰ und steigt auf durchschnittlich 19,44‰ bei den 60-65jährigen. Das Signifikanzniveau erreicht jedoch lediglich  $p \leq 0,17$ . Gewißheit wäre möglicherweise nur durch die Untersuchung einer noch größeren Zahl von Probanden oder einer weiteren Altersstufe, beispielsweise von 80-85jährigen, zustande gekommen.

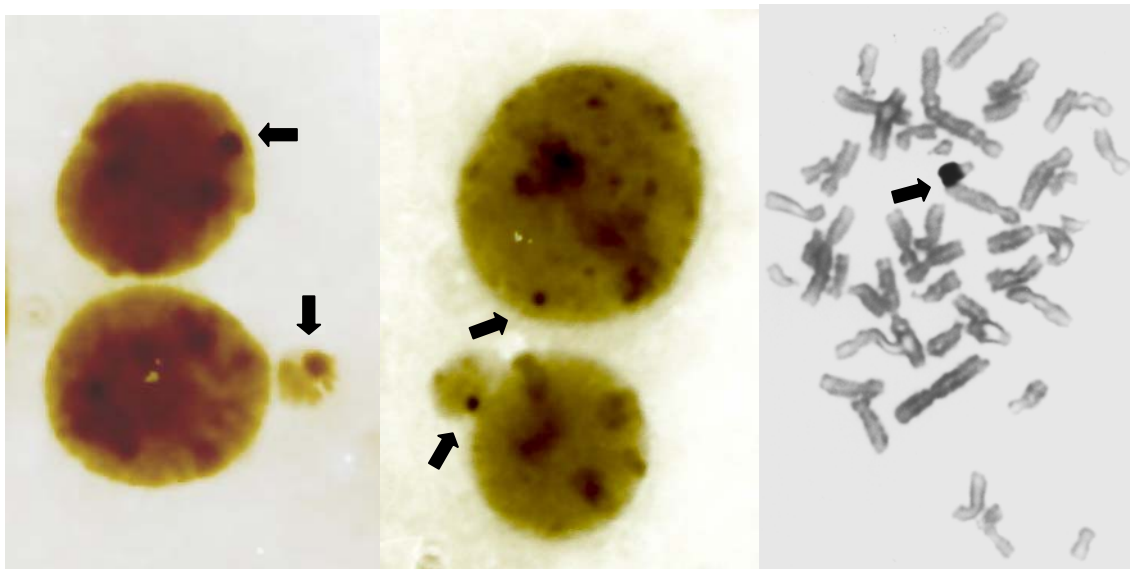
## 3.2 Der Anteil der Mikronuklei mit Hybridisierungssignal

Nachdem mit 5-Azadeoxycytidin die Anzahl der Mikronuklei gesteigert werden konnte, wurde in einem zweiten Schritt deren Inhalt untersucht. Mit X- bzw. Y-spezifischen Gensonden sollte das Vorhandensein von Geschlechtschromosomen nachgewiesen werden.

### 3.2.1 Auswertungskriterien

Die Auswertung erfolgte am Phasenkontrast-Mikroskop, wodurch die braunen Hybridisierungssignale noch deutlicher hervortraten. Insgesamt wurden mindestens 4000 Zellkerne pro Proband untersucht und ausgezählt. Zusätzlich zu den unter [3.1.1](#) angeführten

Kriterien, wurden nur Präparate gewertet, deren Kerne gleichmäßig hybridisiert waren. Das ließ sich auch an den Signalen in den Metaphasen überprüfen. Bei starker Kreuzhybridisierung mit anderen Chromosomen, was insbesondere bei den X-Sonden vereinzelt vorkommen konnte, wurden die Präparate verworfen und neue angefertigt. Bei Mikronuklei mit Signal wurde selbstverständlich auf die umliegenden Kerne geachtet. Nur wenn diese regelrecht hybridisiert waren, konnte der Mikronukleus in die Statistik aufgenommen werden. Alle Mikronuklei mit Signal wurden fotografiert (Abb. 7-9).



Abbildungen 7 bis 9: Beispiele mit Zellkernen, Mikronuklei und Chromosomen; die Hybridisierungssignale sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

### 3.2.2 Der Nachweis des X-Chromosoms in den Mikronuklei der Frauen

Von insgesamt 581 ausgewerteten Mikronuklei aller weiblichen Probandinnen wiesen 32 ein Signal auf. Das entspricht einem Anteil von 5,51 % (Einzelwerte finden sich im Anhang, Tabellen Nr. 7 und 8, Seite 73 und 74). Jeweils dreimal trat ein Mikronukleus mit 2 Signalen auf. Einmal waren im benachbarten Zellkern ebenfalls zwei Signale nachweisbar, in den beiden anderen Fällen nicht. In der statistischen Auswertung wurden die oben genannten Fälle einfach als Mikronukleus mit Signal gewertet. Aufgeschlüsselt nach den einzelnen Altersgruppen stellt sich die Situation der Mikronuklei mit X-Chromosomen auf folgende Art dar:

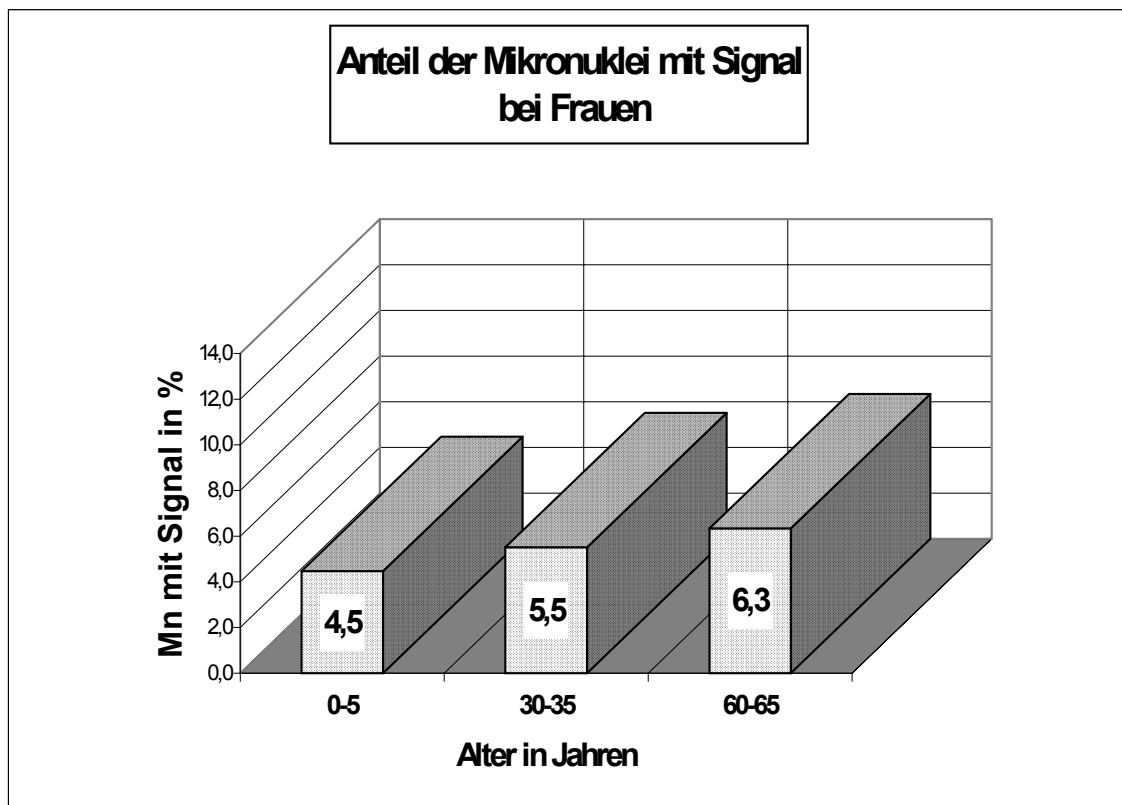


Abbildung Nr. 10: der Nachweis des X-Chromosoms in den Mikronuklei der Frauen, bezogen auf 100 Mikronuklei; Mn = Mikronuklei; Einzelwerte im Anhang, Tabelle Nr. 7 und 8, Seite [73-74](#)

Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit wurde hier in der Abbildung der gleiche Maßstab wie bei der nachfolgenden Auswertung der männlichen Präparate gewählt. Obwohl sich im Diagramm eine leichte Zunahme der Hybridisierungssignale mit höherem Alter anzudeuten scheint, ist dieser Trend statistisch nicht signifikant. Bei durchschnittlich 194 ausgewerteten Mikronuklei pro Altersstufe, von denen im Schnitt jeweils 11 ein Signal enthielten, ergäbe ein Mehr von beispielsweise zwei Mikronuklei mit Signal schon eine Erhöhung des Anteils von 1,0% innerhalb der Altersgruppe. Im Vergleich der einzelnen Präparate untereinander fand sich eine Streubreite von 0 bis 4 Mikronuklei mit Signal (bzw. entsprechend 0 bis 9,76% anteilig). Die mittlere Standardabweichung von 1,125 bei den Mikronuklei mit Signal bedeutet - in Prozentwerte umgerechnet - Schwankungen von  $\pm 2,9\%$  im Anteil. Diese Angaben beziehen sich auf durchschnittlich 38,7 ausgewertete Mikronuklei pro Präparat. Das bedeutet, daß der Anteil mit Signal zwischen 2,6% (gerundet) und 8,4% variieren kann.



Einen Anstieg des Anteils an X-Chromosomen in Mikronuklei ließ sich somit in dieser Studie für das höhere Alter nicht schlüssig nachweisen.

### 3.2.3 Der Nachweis des Y-Chromosoms in den Mikronuklei der Männer

In den Präparaten der männlichen Probanden konnten 726 Mikronuklei mit insgesamt 78 Hybridisierungssignalen für das Y-Chromosom ausgewertet werden. Der Anteil der Mikronuklei mit Signal lag bei insgesamt 10,74% und damit deutlich höher als bei den Frauen. Nach Altersgruppen aufgeschlüsselt ergab sich das folgende Bild:

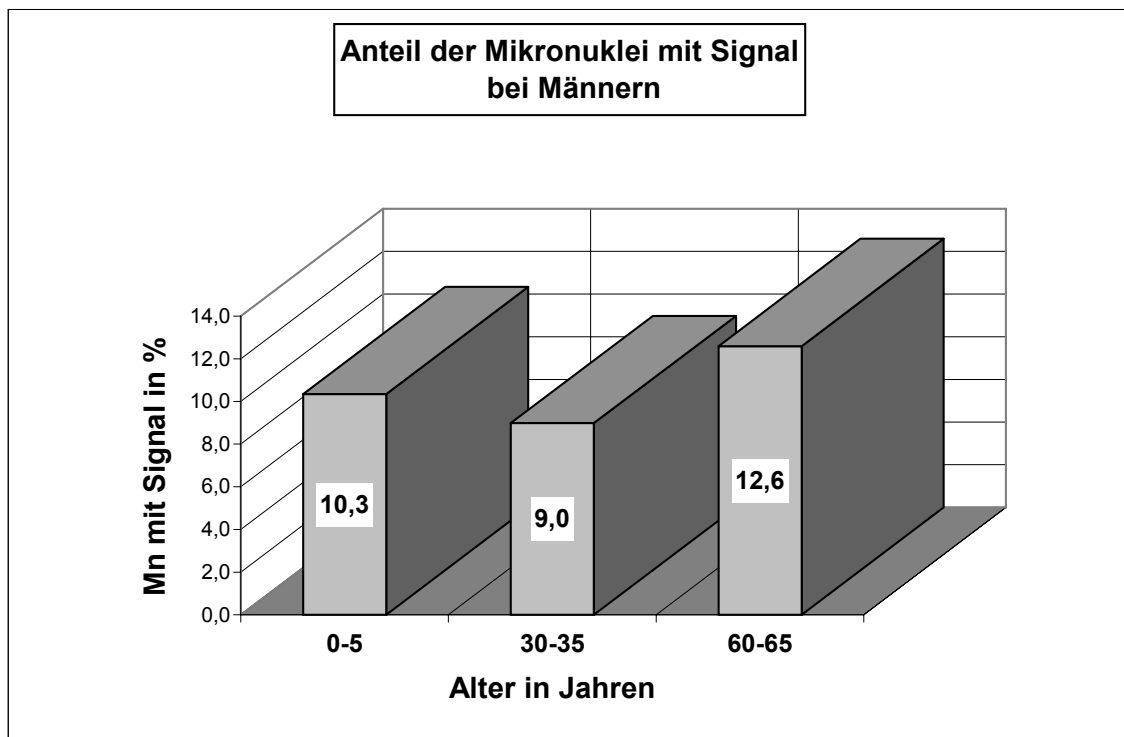


Abbildung Nr. 11: der Nachweis des Y-Chromosoms in den Mikronuklei der Männer, bezogen auf 100 Mikronuklei; Mn = Mikronuklei; Einzelwerte finden sich im Anhang, Tabelle Nr. 9 und 10, Seite [75-76](#)

In der Altersgruppe der 30 bis 35jährigen Männer fand sich mit knapp 9 % der niedrigste Anteil von Mikronuklei mit Signal. Auch hier war die Streubreite zwischen den einzelnen Präparaten groß. Die Standardabweichung von 2,484 Mikronuklei mit Signal betrug umgerechnet 5,13% (bei 48,4 auswertbaren Mikronuklei pro Präparat).

Damit variierte der Anteil von 5,6% bis 15,9% für  $\pm$  eine Standardabweichung um den Mittelwert. Die Schwankungen zwischen den oben aufgeführten Werten der verschiedenen Altersstufen lagen erneut in den gegenseitigen Streuungsbereichen und waren damit statistisch nicht signifikant. In dieser Studie konnte deshalb ein Ansteigen von Y-Chromosomen in den Mikronuklei der älteren Probanden unter Einwirkung von 5-Azadeoxytidin nicht schlüssig bewiesen werden.

### 3.3 Der Anteil aller hybridisierten Mikronuklei im direkten Vergleich zwischen den Geschlechtern

Beim direkten Vergleich zwischen Frauen und Männer ergab sich ein überraschendes Bild. In der Abbildung Nr. 12 wurden alle Werte ohne Berücksichtigung der verschiedenen Altersstufen zusammengefaßt:

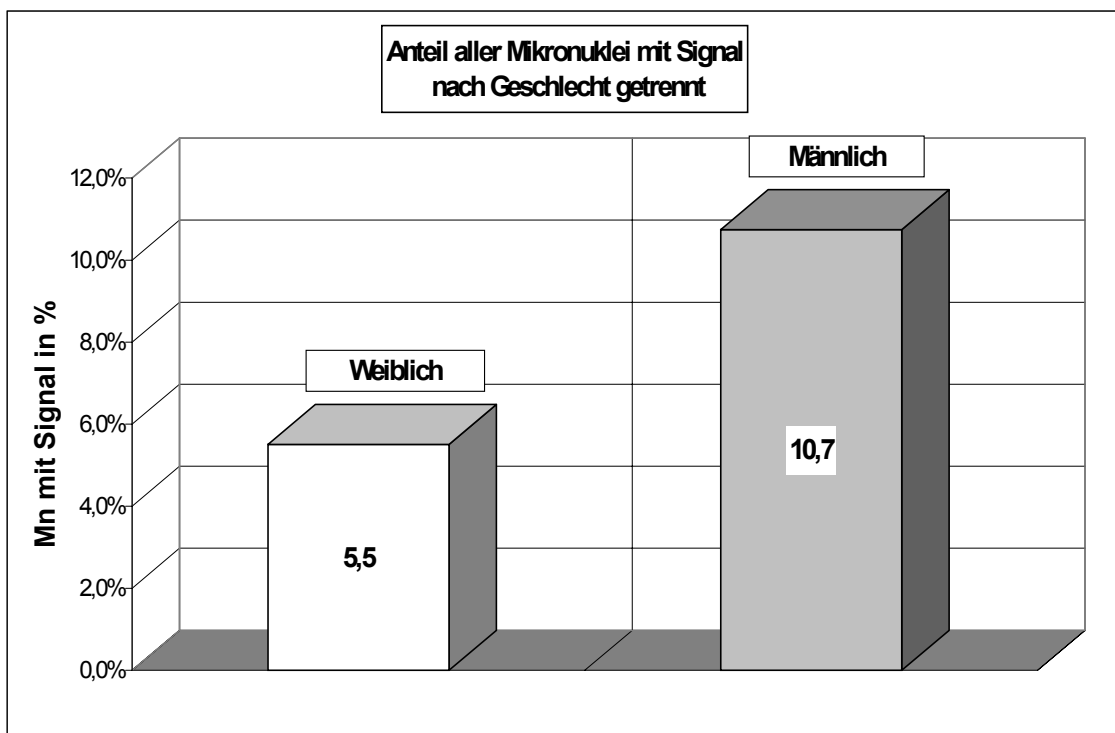


Abbildung Nr. 12: der Anteil aller hybridisierten Mikronuklei im direkten Vergleich zwischen beiden Geschlechtern, bezogen auf 100 Mikronuklei; Mn = Mikronuklei; Einzelwerte und eine Aufschlüsselung nach Altersgruppen finden sich im Anhang, Tabelle Nr. 7 und 9, Seite [73](#) und [75](#)

Auf den ersten Blick fällt auf, daß der Anteil der Mikronuklei mit Hybridisierungssignal bei den Männern nahezu doppelt so hoch ist wie bei den Frauen. Dies ist verblüffend, da in den Zellkernen der Männer nur ein Y-Chromosom vorliegt. Im Gegensatz dazu enthalten die Kerne der Frauen jedoch zwei X-Chromosomen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Aneuploidierate in Blutlymphozyten im Alterungsprozeß

Seit 1961 [Jacobs](#) und Mitarbeiter zum ersten Mal postulierten, daß der Anteil der aneuploiden Zellkerne in Lymphozyten mit dem Alter ansteigen würde, ist man diesem Phänomen auf der Spur. Eine genaue Identifikation der fehlenden Chromosomen war damals nicht möglich. Vor allem im Alter zwischen 45 und 64 Jahren fehlte bei Männern häufig ein Chromosom aus der G-Gruppe, bei Frauen aus der C-Gruppe. Als Erklärungsmodell konnte zu diesem Zeitpunkt nur über den Verlust von Geschlechtschromosomen spekuliert werden.

Erneuten Auftrieb erhielt die Diskussion, nachdem mit den Bänderungstechniken Methoden zur eindeutigen Identifikation von Chromosomen verfügbar waren. [Fitzgerald](#) und [McEwan](#) (1977) sowie [Galloway](#) und [Buckton](#) (1978) ermittelten als eine der ersten Forschungsgruppen eine Häufung hypoploider Zellen nach dem 55. Lebensjahr. Besonders häufig fehlte ein Gonosom. Bei Männern handelte es sich dabei um das Y-Chromosom, bei Frauen um das – vermutlich inaktive – X-Chromosom. Die Auswertung von Karyogrammen erwies sich jedoch als störanfällig. Auffallend oft gingen gerade die kleinen, akrozentrischen Chromosomen verloren, die beim Auftropfen auf den Objektträger leicht versprengt werden können. Aufgrund dieser Kritik an der Auswertung hielten [Wenger](#) und Mitarbeiter (1984) die Hypoploidie für ein reines „in vitro Ereignis“, bei dem bevorzugt kleine Chromosomen für die Auswertung verloren gingen. Allerdings trifft diese Eigenschaft jedoch für das mittelgroße X-Chromosom nicht zu. Wenger analysierte in ihrer Arbeit retrospektiv insgesamt 1 500 klinische Fälle und dabei im Durchschnitt jeweils nur 19 Metaphasen pro Fall. Das Durchschnittsalter betrug neun Jahre, das mediane Alter war vier Jahre. Angesichts dieser Angaben und der vergleichsweise geringen Rate an Mikronuklei in dieser Altersstufe von 8,5 bis 8,7 Promille (gerundet, siehe [Abbildung 4](#), S. 31), wie sie in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, konnte Wenger nur zu diesem verfälschten Ergebnis gelangen. Eine

Hypoploidie der Gonosomen mit zunehmendem Alter kann heutzutage nicht mehr ernsthaft abgestritten werden.

#### 4.2 Der Chromosomenverlust durch Mikronuklei erhöht sich im Alter

[Fenech](#) und [Morley](#) (1985) beobachteten, daß es mit zunehmendem Alter unter DNA-schädigenden Einflüssen, wie Röntgenstrahlen oder Mitomycin, zu einer erhöhten Rate von Mikronuklei kommt. Damals fanden die Forscher einen ungefähr vierfach erhöhten Anstieg von Mikronuklei in der Lymphozytenkultur eines 80jährigen Mannes im direkten Vergleich zu der eines Neugeborenen. Das Maximum an Mikronuklei zeigte sich nach 72 bis 96 Stunden Inkubationszeit. Bei zu starker Schädigung oder verminderter Wachstumsrate sank die Anzahl wieder. Um die Entstehung der Mikronuklei erklären zu können, diskutierten die Forscher ein fehlerhaftes Anheften des Spindelapparats an das Zentromer. Dies, so [Fenech](#) und [Morley](#), könnte das Zurückbleiben – im Englischen „lagging“ – von Chromosomen während der Anaphase bedeuten und zur Bildung eines Mikronukleus führen. Das Resultat wäre ein Chromosomenverlust. Seit langem ist bekannt, daß eine Veränderung der Anzahl der Chromosomen in der Zelle die Entstehung von malignen Tumoren begünstigen kann ([Yunis](#) 1983). Somit bestünde möglicherweise ein direkter Zusammenhang zwischen erhöhter Krebswahrscheinlichkeit und dem Verlust von Chromosomen mit zunehmendem Alter.

Inzwischen hat sich der sogenannte Mikronukleus-Assay in Zusammenhang mit der CREST-Färbung und der Fluoreszenz in situ Hybridisierung als standardisierte Methode zur Testung mutagener Substanzen etabliert ([Miller](#) und [Nüsse](#) 1993; [Schuler](#) et al. 1997). Das Auftreten von Mikronuklei steht in unmittelbarem Zusammenhang mit Chromosomenaberrationen oder beeinträchtigten DNA-Reparaturmechanismen, die sich anscheinend im höheren Alter verstärken. Vergleichende Arbeiten zeigten eine gute Korrelation zwischen dem Mikronuklei-Assay und der Untersuchung auf Chromosomenaberrationen ([Miller](#) et al. 1997). Die Mikronuklei-Rate stellt deshalb ein wertvolles Maß zur Messung der Gentoxizität einer Substanz dar.

Die erhöhte Rate an hypoploiden Zellkernen im Alter ist sicherlich teilweise die Folge des Chromosomenverlusts über Mikronuklei während vorausgegangener Zellteilungen. Weiterhin spielt im höheren Lebensalter – wie bereits erwähnt – eine verminderte Fähigkeit zur Reparatur der DNA eine wichtige Rolle. Unter dem Einfluß des mutagenen 5-Azadeoxycytidins kommt es zu einer Verstärkung und dem vermehrten Auftreten von Mikronuklei. Bei beiden Geschlechtern fand sich in der Analyse ein deutlicher Anstieg der Mikronuklei-Rate zwischen den 0-5jährigen und den beiden älteren Altersstufen (s. [Abbildung 2](#) und [3](#), Seite [27](#) und [29](#) im Ergebnisteil). In allen Fällen wies der t-Test darauf hin, daß sich die Mittelwerte hoch signifikant voneinander unterscheiden. Zwischen den 30-35jährigen und den 60-65jährigen fiel der Zuwachs an Mikronuklei mit einem Anstieg von 16,9 auf 19,4‰ bzw. von 17,8 auf 19,5‰ geringer aus. Statistisch gesehen war dieser Anstieg aufgrund der relativ großen Standardabweichung jedoch nicht signifikant. Trotzdem blieb auch hier der Trend erkennbar und setzte sich tendenziell fort. Letzte Gewißheit könnte möglicherweise durch die Untersuchung einer größeren Zahl von Probanden oder einer höheren Altersstufe, beispielsweise der 80-85jährigen, zustande kommen. Die Überprüfung dieser Hypothese muß einer nachfolgenden Arbeit überlassen bleiben. Zusätzlich sollte hier erwähnt werden, daß die Wachstumsrate, kenntlich am Mitoseindex, im Alter durchschnittlich niedriger liegt, wie größere Studien zeigten ([Bani 1993](#)). Bei einer geringeren Wachstumsrate treten jedoch weniger Mikronuklei auf. Somit wird die Rate an Mikronuklei im höheren Alter unterschätzt. Trotzdem fand sich in dieser Studie eine höhere Verlustrate zwischen der jeweils jüngeren und der jeweils älteren Altersstufe. Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Daten daher für eine erhöhte Verlustrate im Alter. Folglich resultiert die gonosomale Hypoploidie nicht allein aus einem gleichmäßigen Verlust über Jahre hinweg und der Summation dieser gleichmäßig verteilten Verlustereignisse, sondern auch direkt durch das verstärkte Auftreten von Mikronuklei. Das könnte durch zunehmend inkompetente Reparaturmechanismen der DNA verursacht sein.

#### 4.3 Mögliche Ursachen für das überproportionale Fehlen der Geschlechtschromosomen im Alter

Mehrere Arbeiten stellten das Fehlen der Geschlechtschromosomen im Alter fest. Das wirft die Frage auf, ob eine Selektion stattfindet, die zu diesem Ergebnis führt. Beispielsweise wäre es möglich, daß alle Chromosomen gleich häufig verlorengehen, der Verlust eines großen Autosoms allerdings zum Zelltod führen würde. Folglich würden nur diejenigen Zellen überleben, die kleine Chromosomen verloren hätten oder Chromosomen, die für den jeweiligen Zelltyp nur wenig relevante genetische Informationen enthielten. Es leuchtet ein, daß ein Blutlymphozyt den Verlust eines X- oder Y-Chromosoms leichter kompensieren könnte, als den Verlust eines großen Autosoms. Das Chromosom 1 enthält beispielsweise etwa 20% der genetischen Information im menschlichen Genom. Das menschliche Y-Chromosom beinhaltet aber nur eine geringe Anzahl von Genen, wie das Gen für den Testis determinierenden Faktor (Su und Lau 1993) in der SRY-Region (sex determining region of the Y-chromosome), das Gen für das H-Y-Antigen und andere in der pseudoautosomalen Region. Keines davon scheint für den Lymphozyten überlebenswichtig zu sein.

Für den bevorzugten Verlust des X-Chromosoms hat es bereits mehrere Thesen gegeben. [Abbruzzo](#) und Mitarbeiter behaupteten 1985, daß es sich bei dem verlorenen X überwiegend um das inaktive handeln würde. Um dies festzustellen, wurde der Replikationsstatus des X-Chromosoms mittels einer modifizierten Labeltechnik mit 5-Bromodeoxyuridin bestimmt. Von den 36 X-hypoploiden Zellen bei 1 244 ausgewerteten Zellen, enthielten 33 das aktive X-Chromosom. Das entspräche 91,7% aller X-hypoploiden Zellen. Außerdem fanden sich 22 Zellen mit dem Karyotyp 47,XXX von denen 17 (77,3%) zwei inaktive X aufwiesen. Als Erklärung für das beobachtete Phänomen kam aus Sicht der Autoren Nondisjunction und die sogenannte „premature centromere division“, also die verfrühte Aufteilung des Zentromers in der Metaphase, in Frage. Diese Vermutung stammte von [Fitzgerald](#) und McEwan (1977), die eine fehlende Einschnürung bzw. ein Auseinanderstehen zwischen den beiden Chromatiden des X-Chromosoms bemerkten hatten und somit auf ein fehlerhaftes Zentromer schlossen. Nach dieser Theorie soll die verfrühte Aufteilung zum „Liegenbleiben“ eines

Chromatids mit nachfolgender Fehlverteilung oder zum vollständigen Verlust des X-Chromosoms führen. Im letzteren Fall entstünde dann ein Mikronukleus. Die Fehlfunktion des Zentromers würde sich mit zunehmendem Alter stärker ausprägen. Verantwortlich dafür könnte möglicherweise das, um das Zentromer gelegene, Heterochromatin sein, insbesondere beim inaktiven X-Chromosom. Bei der Untersuchung von X-Chromosomen mittels Cd-Bänderungstechnik wurden vor allem bei älteren Frauen verstärkt defekte, d.h. Cd-negative, Zentromere gefunden (Nagakome et al. 1984). Bei Männern hingegen nicht. Damit schlossen die Autoren auf das inaktive X. Eine zweite, elegante Methode benutzte Tucker et al. (1996). Er wertete die Lymphozytenkulturen von zwei Frauen aus, die beide eine balancierte Translokation zwischen dem Chromosom 9 und dem X-Chromosom aufwiesen. Die Frauen waren phänotypisch unauffällig, bei beiden war das X mit der Translokation das aktive Chromosom. In der Auswertung enthielten 44,2% aller aufgetretenen Mikronuklei ein X, davon beinhalteten wieder über 83% das inaktive X-Chromosom. Mittels in situ Hybridisierung für den translozierten Teil des Chromosoms 9 und für das X konnte er nämlich das aktive X im Zellkern nachweisen. Es ist jedoch sicherlich nicht zulässig, von diesem Spezialfall auf den Regelfall zu schließen. Wahrscheinlich war wegen des Gendosiseffekts das Überleben der Zelle nur durch Aufrechterhaltung der balancierten Translokation möglich. Unter dieser Annahme konnten also nur Zellen weiterleben, bei denen das inaktive X verloren ging. Weiterhin muß kritisiert werden, daß die Forschungsgruppe das Zellgift Cytochalasin B in den Zellkulturen benützte, das den Mechanismus der Kernteilung beeinträchtigt.

Etliche Autoren diskutierten auch den Mechanismus der Nondisjunction, der aus der Meiose bekannt ist, als mögliche Ursache für die Fehlverteilung des X-Chromosoms während der Mitose (Fitzgerald und McEwan 1977). Eine Parallele schien plausibel, da Mütter im Alter über 35 Jahre ein erhöhtes Risiko für ein Kind mit Trisomie 21 haben. Nowinski und Mitarbeiter (1990) untersuchten eine große Anzahl von Erwachsenen, Eltern von Kindern mit Trisomien oder mit gehäuften Aborten sowie Verwandte von Patienten mit Down-Syndrom (Trisomie 21). Sie fanden jedoch hinsichtlich der Aneuploidie keine Unterschiede zur Kontrollgruppe aus der Normalbevölkerung. Nondisjunction in der Meiose korrelierte folglich nicht mit der Nondisjunction oder



Aneuploidie in der Mitose. Die Forschergruppe stellte nach Auswertung von 47 361 Metaphasen eine umfassende Analyse aller vorgefundenen Chromosomenaberrationen auf, wobei es sich hauptsächlich um hypodiploide Karyotypen handelte. Der Verlust von Autosomen war gering und korrelierte mit der Größe der Chromosomen dahingehend, daß bevorzugt kleine Chromosomen fehlten. Auffallend war jedoch, daß bei Frauen, im Vergleich zu gleich großen Autosomen der C-Gruppe, wiederum verstärkt das X-Chromosom im Alter vermißt wurde. Dies war aber unabhängig davon, ob die Frau ein Kind mit Trisomie oder häufige Fehlgeburten gehabt hatte. Die Werte für das Y-Chromosom bei den Männern konnten nicht eindeutig interpretiert werden.

Die bisher vorgestellten Theorien konnten die Hypoploidie für das Y-Chromosom nicht ausreichend erklären. Die Arbeitsgruppe um J. Nath (1995) machte dafür fehlerhafte oder fehlende Kinetochore am Y-Chromosom verantwortlich, deren Vorhandensein er mit Antikörpern nachzuprüfen versuchte. Außerdem diskutierte er Defekte im Spindelapparat und Mangel an Tubulin als Ursache für die Entstehung von Mikronuklei und damit den Verlust des Y-Chromosoms. Sowohl diesen als auch allen anderen Erklärungsversuchen ist gemeinsam, daß sie keinen schlüssigen Beweis für eine spezielle Bevorzugung der Geschlechtschromosomen bei der Entstehung von Mikronuklei zu liefern vermögen. Warum sollten ausgerechnet die Gonosomen besonders häufig von Defekten am Zentromer, am Kinetochor und Fehlern im Spindelapparat betroffen sein? In der vorliegenden Arbeit konnte aber durch Zusatz von 5-Azadeoxycytidin die Rate an Mikronuklei mit eingeschlossenem Y-Chromosom überproportional gesteigert werden. Inwiefern veränderte 5-Azadeoxycytidin die Chromosomen und wie entstand der erhöhte Chromosomenverlust?

#### 4.4 Die Wirkung von 5-Azadeoxycytidin auf die Hypoploidie der Geschlechtschromosomen, insbesondere auf das Y-Chromosom

Unter der Annahme, daß alle Chromosomen mit der gleichen Wahrscheinlichkeit zufällig verloren gingen, würde die Wahrscheinlichkeit für den Verlust eines X-

Chromosom 2/46 betragen, da zwei X-Chromosomen bei insgesamt 46 Chromosomen vorhanden sind. Voraussetzung wäre, daß es sowohl zwischen dem aktivem als auch dem inaktivem keinen wesentlichen Unterschied hinsichtlich des Verlustrisikos gäbe. Diesem Gedankengang wird zuerst für die Werte der Frauen nachgegangen. Der rechnerische Erwartungswert wäre 4,35%, das entspräche 25,3 Mikronuklei mit Signal bei 581 ausgewerteten Mikronuklei. Tatsächlich fanden sich jedoch 32 Mikronuklei mit Signal und somit mehr. Bei einer Streubreite von 2,6% bis 8,4% (plus bzw. minus eine Standardabweichung um den Mittelwert von 5,5%) kann hinsichtlich der einzelnen Präparate somit lediglich von einer Tendenz zum bevorzugten Verlust des X-Chromosoms unter Einwirkung von 5-Azadeoxycytidin gesprochen werden. Bei dieser breiten Streuung sind nicht nur der gemeinsame Mittelwert, sondern auch die Werte für die jeweiligen Altersstufen nicht signifikant verschieden vom Erwartungswert 4,35%, wenn die gleiche Standardabweichung vorausgesetzt wird. Es ist statistisch aufgrund der großen Streuung nicht zu beweisen, daß der beobachtete Wert von 5,51% vom Erwartungswert für den zufälligen Verlust des X-Chromosoms (= 4,35%) signifikant verschieden ist.

Für das Y-Chromosom, das nur einmal im Genom vorhanden ist, wäre der Wert für den zufälligen Verlust unter gleichen Voraussetzungen  $1/46$ , folglich 2,17%. Das entspräche 15,8 Mikronuklei mit Signal bei 726 beobachteten Mikronuklei. Auf den ersten Blick fällt auf, daß sich die Situation für die Werte der männlichen Probanden völlig anders darstellt. In dieser Studie wurde ein Wert von 10,74% beobachtet, also 78 Hybridisierungssignale für das Y-Chromosom bei 726 Mikronuklei. Dieses Ergebnis war damit fast fünfmal höher als der hypothetische Erwartungswert für den zufälligen Verlust. Folglich liegt das Y-Chromosom unter dem Einfluß von 5-Azadeoxycytidin überzufällig häufig in Mikronuklei vor.

Li und Mitarbeiter konnten bereits 1970 zeigen, daß sowohl 5-Azacytidin als auch das Nucleosidanalogue 5-Azadeoxycytidin in alle Arten von DNA und RNA eingebaut werden. Der Einbau des Basenanalogs in die DNA erfolgt während der Replikation und ersetzt Cytosin. Wie eingangs erläutert, ist bei Vertebraten Cytosin die einzige Base im DNA-Strang, die von einer zelleigenen Methylase methyliert werden kann. Dabei

wird eine Methylgruppe von 3-Adenosylmethionin auf die Position 5 des Cytosins transferiert (Ehrlich und Wang 1981). Eine einmal gegebene Methylierung wird bei jeder nachfolgenden Replikation an die Tochterzellen weitergegeben (Razin und Riggs 1980). Bei 5-Azadeoxycytidin ist dieser Schritt jedoch unmöglich, da das C-Atom an Position 5 durch ein Stickstoffatom ersetzt wurde. In der Einleitung wurde bereits erwähnt, daß die Zugabe von 5-Azadeoxycytidin zum Kulturmedium etwa sieben Stunden vor Abbruch der Zellkulturen einige sehr spezifische Hypokondensierungen im heterochromatischen Bereich der Chromosomen 1, 9, 15, 16 und Y bewirkt (Schmid et al. 1983 und 1984). Besonders im Bereich des Heterochromatins befindet sich vermehrt Cytosin im DNA-Strang, sie wird deshalb auch als „GC-reiche“ Region bezeichnet. Diese Hypokondensierungen mit 5-Azadeoxycytidin können auch bei veränderter Lokalisation wiedergefunden werden, wenn z. B. die Region durch Rearrangement innerhalb dieser Chromosomen verlagert oder auf andere transloziert wird.

Während der Interphase liegen bekanntlich somatische Paarungen zwischen dem Heterochromatin der Chromosomen 1, 9, 15, 16, und Y im Kern der Lymphozyten vor. Das konstitutive Heterochromatin ist in der Interphase hochkondensiert und muß vor oder während der S-Phase (Replikation) zuerst decondensieren, um überhaupt repliziert werden zu können. Vermutlich besteht in beiden Stadien (Interphase und Replikation) ein enger mechanisch-physikalischer Kontakt, möglicherweise auch nach der Dekondensation. Erst nach der Replikation, wenn das Heterochromatin erneut kondensiert, verliert sich dieser Kontakt durch den Zug des Spindelapparats. Wird aber 5-Azadeoxycytidin zugegeben und in die DNA eingebaut, kann der heterochromatische Bereich genannter Chromosomen nach der Replikation vermutlich nicht mehr kondensieren (Schmid et al. 1983). Damit bleibt die somatische Paarung bis weit in die Metaphase hinein erhalten. Als Ursache wird eine sterische Behinderung von DNA-bindenden Proteinen oder -spezifischen Enzyme diskutiert. Insbesondere der Übergang von B-DNA in Z-DNA wird durch eine Methylierung des Cytosins an der Position 5 erleichtert und damit von 5-Azadeoxycytidin erschwert (Fujii et al. 1982; Hodges-Garcia und Hagerman 1992).

Eine zweite Möglichkeit erschließt sich bei genauerer Betrachtung der Methylierung auf molekularer Ebene. In der DNA der Säugetiere liegen 3-5% des Cytosins in methylierter Form vor (Holliday und Grigg 1993). Dieses Muster der Methylierung scheint eine wichtige Rolle bei der Expression und beim Imprinting der Gene zu spielen. Nach einer These von Stopper und Mitarbeitern (1997) verursacht eine fehlerhafte Methylierung die Dysfunktion einiger DNA-bindender Proteine. Topoisomerasen sind Enzyme, welche die räumliche Struktur der DNA bestimmen und verändern. Es ist bekannt, daß eine Hemmung der Topoisomerase II die Trennung der Chromatiden während der Mitose nachhaltig stört (Downes et al. 1991). Inhibitoren der Topoisomerase II, wie z.B. Etoposid oder Camptothecin, wirken zusammen mit 5-Azadeoxycytidin synergistisch (Lopez-Baena et al. 1998). Es liegt daher der Verdacht nahe, daß durch 5-Azadeoxycytidin und das veränderte Methylierungsmuster die Topoisomerase II gehemmt wird. Diese Inhibition verhindert während der Anaphase die Trennung der Chromatiden in Zellen von Säugetieren und Hefen, unabhängig von anderen Chemotherapeutika (Clarke et al. 1993). Das deckt sich wiederum mit unserer Beobachtung der sogenannten „somatischen Paarung“ für die Chromosomen 1, 9, 15, 16 und Y, die unter Einwirkung von 5-Azadeoxycytidin bis weit in die Metaphase hinein erhalten blieben.

1988 stellten Haaf et al. fest, daß sich mit einer relativ hohen Konzentration von 5-Azadeoxycytidin im Kulturmedium ( $10^{-5}$  M, 2 Stunden vor Kulturabbruch) auch beim inaktiven, spät replizierenden X-Chromosom des Menschen eine Hypokondensation erreichen läßt. Allerdings geschieht dies nur bei etwa 5% aller Metaphasen. Einige Jahre später gelang es, zwischen dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosom genauer zu unterscheiden. Es war überwiegend das inaktive X, dessen Kondensation sich durch 5-Azadeoxycytidin hemmen ließ (Haaf et al. 1993). Bereits damals äußerte Haaf die Vermutung, daß der Grad der Kondensierung etwas mit der Inaktivierung und deren Aufrechterhaltung zu tun haben könnte. Weiterführend kann angenommen werden, daß sich diese Information über die Aktivität des X-Chromosoms auch im Ausmaß der Methylierung ausdrückt.

#### 4.5 Fehlverteilung von Chromosomen durch Hypomethylierung der DNA

Demethylierung des Genoms wird als ein erster Schritt bei der Entstehung von Krebs diskutiert (Fearon und Vogelstein 1990; Laird und Jaenisch 1996). Hypomethylierung der DNA tritt häufig bei Neoplasien und in kultivierten Zellen unter dem Zusatz von karzinogenen Substanzen auf (Spruck et al. 1993). Abwesenheit von Methylgruppen wird mit Aktivität der Genabschnitte in Verbindung gebracht, Hypermethylierung mit Inaktivität. 1992 gelang es einer Arbeitsgruppe um Lee in Brustkrebszellen ein inaktives Gen für Zellwachstum und Differenzierung der S100-Familie durch Zugabe von 5-Azadeoxycytidin wieder zu aktivieren. Veränderungen in der Methylierung scheinen eine der Voraussetzung für die Vielzahl von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen in Krebszellen zu sein.

DNA-Hypomethylierung führt zur strukturellen Veränderung der Chromosomen, im Lichtmikroskop. Dies konnte mit 5-Azadeoxycytidin induziert werden. Andererseits besteht sie beispielsweise auch bei Patienten mit ICF-Syndrom (Immunodeficiency, Centromeric Instability und Facial Abnormalities). Beim ICF-Syndrom entdeckte man 1995 Hypokondensierungen in den heterochromatischen Abschnitten der Chromosomen 1, 9 und 16. Zusätzlich treten bei dieser seltenen Erkrankung gehäuft Mikronuklei auf, die diese Chromosomen enthalten (Stacey et al. 1995). Auch hier fanden sich in der späten Anaphase Chromosomen, die aneinander hafteten, bzw. in der Telophase nicht in die neu entstandenen Tochterzellkerne integriert wurden und einen Mikronukleus bildeten. In der Arbeit von Stacey wurde bereits die Vermutung geäußert, daß in den 77% der Mikronuklei, die kein Signal für die Chromosomen 1,9 und 16 enthielten, möglicherweise die Chromosomen 15, Y oder das inaktive X vorliegen könnten. Ein Jahr früher war ein verändertes Methylierungsmuster im konstitutiven und fakultativen Heterochromatin von ICF Patienten beschrieben worden (Miniou et al. 1994). Diese Beobachtungen deckten sich mit den Ergebnissen von Guttenbach und Mitarbeitern (1994). Sie stellten unter dem Einfluß von 5-Azadeoxycytidin eine Häufung von Mikronuklei fest, in denen sich durch in situ Hybridisierung die Chromosomen 1, 9, 15, 16 und Y nachweisen ließen. Damals stellte die Autorin die These auf, daß eine direkte

Korrelation zwischen hypokondensiertem Heterochromatin und dem Verlustrisiko des Chromosoms mit Einschluß in einen Mikronukleus bestehen müßte.

Die zytogenetischen Erkenntnisse konnten auch auf molekulargenetischer Ebene nachvollzogen werden. In embryonalen Stammzellen der Maus, in denen das Gen für die Methyltransferase homozygot fehlte und dadurch Hypomethylierungen verursachte, stieg die Mutationsrate für zwei beispielhafte Gene signifikant an (Chen et al. 1998). Es handelte sich dabei um das Hprt-Gen (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase) und das Transgen einer integrierten viralen Thymidinkinase. Eine der Hauptursachen der beobachteten Deletionen waren entweder die mitotische Rekombination oder der komplette Chromosomenverlust. Hernandez und Mitarbeiter fanden 1997 im Chromosom 1 unter dem Einfluß von 5-Azadeoxycytidin eine Vielzahl von zytogenetischen Rearrangements, mit teilweise mehrarmigen Chromosomen, Deletionen, Translokationen und Inversionen, vorwiegend in der perizentromerischen Region. Die beobachteten Phänomene erinnerten an das ICF-Syndrom oder an genetische Veränderungen bei der Tumorentstehung. Das Methylierungsmuster der DNA wird bei der Zellteilung normalerweise an die Tochterzelle weitervererbt. Die Maintenance-Methylase methyliert den neu entstanden DNA-Strang entsprechend der Vorlage (Holliday und Grigg 1993). Allgemein liegt die DNA inaktiver Gene in stärker methylierter Form vor. Zusammen mit DNA-bindenden Proteinen scheint die höhergradige Methylierung der DNA eine dauerhafte Inaktivierung zu bewirken und spielt wahrscheinlich auch bei der Kondensierung des weiblichen X-Chromosoms eine wichtige Rolle (Riggs und Pfeifer 1992; Tate und Bird 1993). Desweiteren gibt es Hinweise darauf, daß während der Mitose neben der korrekten Kondensation zusätzlich bestimmte Steuerungsgene notwendig sind, um eine fehlerfreie Trennung der Chromatiden zu gewährleisten (Ouspenski et al. 1999 und 2000). Interessanterweise behindert sowohl ein Mangel bzw. Fehlen als auch eine zu hohe Expression dieser Gene die Aufteilung der Chromosomen in der Anaphase. Damit könnten Veränderungen in der Methylierung genannter Gene - und damit ein zuviel oder zuwenig - die fehlerhafte Aufteilung der Chromosomen und die Bildung von Mikronuklei verstärken.

Daraus ergibt sich die Schlußfolgerung, daß die Stabilität und Funktionsfähigkeit des Genoms in engem Zusammenhang mit der Methylierung des Cytosins in Steuerungsgenen, CG-reichen Abschnitten (Cross und Bird 1995) und Heterochromatin steht. Hypomethylierung führte in dieser Studie zum verstärkten Verlust des Y-Chromosoms, welches einen hohen Gehalt an konstitutivem Heterochromatin aufweist. Durch den Einbau des Nukleosidanalogons 5-Azadeoxycytidin konnte der DNA-Strang nicht mehr methyliert werden. Wahrscheinlich verursachte das die Hemmung DNA-bindender Proteine und der Topoisomerase II, einem Enzym, das während der S-Phase und der Replikation beim „Ein- und Auspacken“ der DNA eine entscheidende Rolle spielt. Als Folge der Inhibition fanden sich in der Metaphase Chromosomen mit Hypokondensierungen im heterochromatischen Bereich. Genau diese Bereiche scheinen bis spät in die Anaphase hinein aneinander zu haften. Dadurch kommt es zum „lagging“, zum Zurückbleiben, von homologen, somatisch gepaarten Chromosomen und nachfolgend zur Fehlverteilung. Der Verlust eines Chromosoms äußert sich dann in der Bildung eines Mikronukleus und einer hypoploiden Tochterzelle. Das Auftreten von hyperploiden Zellen wurde nur selten beobachtet (Galloway und Buckton 1978; Nowinski et al. 1990), so daß der konsekutive Verlust von Chromosomen über Mikronuklei anscheinend im Vordergrund steht. Wahrscheinlich verursachen im höheren Alter zunehmend fehlerhafte Reparaturmechanismen in der Cytosin-reichen DNA den verstärkten Verlust von Chromosomen mit Heterochromatin. Die Folge davon ist, daß sich im Alter gehäuft Mikronuklei und hypoploide Zellen finden.

Das häufigere Fehlen von Geschlechtschromosomen im Alter kann wahrscheinlich durch mehrere Phänomene erklärt werden: beide Chromosomen enthalten Heterochromatin; das inaktive X-Chromosom fakultatives und das Y-Chromosom konstitutives. 5-Azadeoxycytidin verhindert die Methylierung und damit die Kondensation des Heterochromatins. Das gilt besonders für das Y, trifft aber auch für das inaktive X zu. Aus der Arbeitsgruppe um M. Schmid fanden sich Hinweise darauf, daß 5-Azadeoxycytidin auch spezifisch auf das spätreplizierende, inaktive X-Chromosom wirkt (Haaf et al. 1993). Die Arbeiten von Tucker et al. (1996) und Surrallés et al. (1996) haben dies ebenfalls gezeigt. Wir können somit vermuten, daß es sich bei den 5,5% Mikronuklei mit Hybridisierungssignal für das X-Chromosom vorwiegend um inaktive X handelte.

Beweisen läßt sich das im nachhinein nicht. Trotzdem scheint sich die Zugabe von 5-Azadeoxycytidin stärker auf das Y-Chromosom auszuwirken, da bei den Männern der Anteil mit Signal 10,7% beträgt. Die Gründe hierfür liegen möglicherweise am Zeitpunkt der Zugabe und damit am Ausmaß des Einbaus in die DNA. Als weitere Ursache für den bevorzugten Verlust der Gonosomen spielt sicherlich auch Selektion eine Rolle. Beim Y oder im Fall des inaktiven X-Chromosoms handelt es sich um wenig relevante genetische Informationen für den Lymphozyten. Der Verlust größerer Chromosomen wird von der Zelle meist nicht überlebt oder kann bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen ([Hernandez et al. 1997](#)).

Insgesamt entstanden in der vorliegenden Arbeit tendenziell mehr Mikronuklei in den höheren Altersstufen. Dadurch gingen natürlich auch vermehrt Geschlechtschromosomen verloren, die häufiger als erwartet in den Mikronuklei vorlagen. Das traf vor allem auf das heterochromatinreiche Y-Chromosom zu. Ein mit dem Alter ansteigender Prozentsatz von Gonosomen in den Mikronuklei konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann man behaupten: Die Hypoploidie der Geschlechtschromosomen findet sich im Alter häufiger, weil sie in der Mitose aufgrund ihres Gehalts an Heterochromatin, bei fehlerhafter Methylierung und bei zunehmend inkompetenten Reparaturmechanismen, bevorzugt verloren werden. Ihr Fehlen wurde zum anderen, vermutlich wegen ihres relativ geringen Informationsgehalts, von der Zelle besser überlebt.



## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphozytenkulturen gesunder weiblicher und männlicher Probanden aus drei verschiedenen Altersgruppen untersucht. Die Fragestellung war, ob im Alter während der Kernteilung mehr Chromosomen verloren gehen und inwieweit es sich dabei um Geschlechtschromosomen handelt. Unter Einwirkung von 5-Azadeoxycytidin, einem Nukleosidanalogen, ergab sich in den höheren Altersgruppen ein verstärktes Auftreten von Mikronuklei. Mikronuklei besitzen eine Kernmembran und enthalten Chromosomen oder -bruchstücke, die während der Mitose nicht in die Tochterzellkerne integriert wurden und dadurch verlorengehen. Bei der Auswertung der Ergebnisse fanden sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen Frauen und Männern innerhalb der Altersgruppen. Das Auftreten von Mikronuklei erhöhte sich aber durchschnittlich von 8,5 pro 1000 ausgewerteten Zellkernen (= ‰) bei 0-5jährigen männlichen Probanden, über 17,8‰ bei den 30-35jährigen, bis auf 19,5‰ in der Altersgruppe der 60-65jährigen Männer. Bei den Frauen fand sich eine entsprechende Steigerung von 8,7‰ (0-5jährige), über 16,9‰ (30-35jährige), bis hin zu 19,4‰ bei den 60-65jährigen. Somit erklärt sich die Hypoploidie im höheren Lebensalter nicht allein durch die Summe aller Chromosomenverluste während vorausgegangener Zellteilungen sondern auch direkt durch eine erhöhte Verlustrate, ersichtlich im verstärkten Auftreten von Mikronuklei. Als Erklärung dafür kommen zunehmend inkompetente Reparaturmechanismen der DNA in Betracht.

Im zweiten Schritt wurde mittels in situ Hybridisierung der Inhalt der Mikronuklei untersucht, um mit spezifischen DNA-Sonden die Geschlechtschromosomen nachzuweisen. In den Mikronuklei der Frauen fand sich dabei zu 5,5% ein X-Chromosom, bei den Männern mit 10,7% überzufällig häufig ein Y-Chromosom. Zwischen den einzelnen Altersstufen änderte sich der Anteil an Gonosomen nicht wesentlich. Der hohe Prozentsatz von Y-Chromosomen in den Mikronuklei der Männer scheint sich aus dem Zusatz von 5-Azadeoxycytidin zur Lymphozytenkultur zu erklären. Es ist bekannt, daß bei bestimmten Konzentrationen spezifische Hypokondensierungen im Cytosin-reichen, heterochromatischen Bereich der Chromosomen 1, 9, 15, 16 und Y entstehen, die im Lichtmikroskop sichtbar sind. Die Substanz wird als Nukleosidanalogen während der

Replikation in die DNA eingebaut und verhindert deren Methylierung, da das Kohlenstoffatom an Position 5 des Pyrimidinrings durch ein Stickstoffatom substituiert ist. Aus diesem Grund kommt es zur Unter- bzw. Hypomethylierung des DNA-Strangs, was wahrscheinlich eine Hemmung der Topoisomerase II verursacht. Dieses Enzym spielt während der Synthese- und Replikationsphase beim „Aus- und Einpacken“ des DNA-Strangs eine entscheidende Rolle. Als Folge der Hemmung des Enzyms und möglicherweise auch anderer DNA-bindender Proteine, die bei der Kondensation benötigt werden, beobachtet man in der Metaphase Hypokondensierungen in den genannten heterochromatischen Bereichen. Genau in diesen Bereichen haften die Chromosomen bis in die Anaphase aneinander. Das führt zum Zurückbleiben und damit zur Fehlverteilung von homologen, somatisch gepaarten Chromosomen. Der Verlust eines Chromosoms äußert sich dann in der Bildung eines Mikronukleus bzw. einer aneuploiden Tochterzelle. Hypomethylierungen führen folglich zum überproportionalen Verlust von Chromosomen, die Cytosin-reiches Heterochromatin enthalten. In dieser Studie traf das für das sowohl für das Y-Chromosom mit konstitutivem als auch teilweise für das inaktive X-Chromosom mit fakultativem Heterochromatin zu.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kommen zusammenfassend drei mögliche Ursachen für den altersabhängigen Verlust der Geschlechtschromosomen in Betracht. Erstens erhöht sich insgesamt die Rate an Mikronuklei im Alter, vermutlich durch zunehmend inkompetente Reparaturmechanismen. Zweitens sind die Gonosomen deshalb häufiger vom Verlust betroffen, weil sie einen hohen Gehalt an Cytosin im Heterochromatin aufweisen. Bei Fehlern in der Methylierung des Cytosins werden die Topoisomerase II und andere DNA-bindende Proteine gehemmt. Daraus resultiert während der Mitose eine falsche „Verpackung“ bzw. eine fehlerhafte Trennung und ein Aneinanderhaften der Chromosomen, weshalb sie bevorzugt verlorengehen. Als dritte und letzte Ursache muß auch die Selektion genannt werden, da die Zelle das Fehlen der Gonosomen aufgrund ihres relativ geringen Informationsgehalts wahrscheinlich besser überlebt als den Verlust eines großen Autosoms (z.B. der heterochromatinreichen Chromosomen 1, 9, 15 und 16). Die erhöhte Hypoploidierate im Alter kann somit teilweise eine Folge des Verlustes von Geschlechtschromosomen aus vorausgegangenen Mitosen sein.

## 6 Literaturverzeichnis

Abbruzzo MA, Mayer M, Jacobs PA (1985)

Aging und aneuploidy: evidence for the preferential involvement of the inactive X chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 39: 275-278

Ambros PF, Schweizer D (1987)

Non radioactive in situ hybridization and chromosome banding: methods and applications. *Ann Univ Sarav Med* 7: 10-18

Bani BG (1993)

Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors: related to donor's age. *Mutat Res* 295: 135-148

Barr ML, Bertram LF (1949)

A morphological distinction between neurones of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 163: 676-677

Barr ML (1961)

Das Geschlechtschromatin (The Sex Chromatin).

In: *Die Intersexualität: 50 – 73*. Overzier Klaus (Editor), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany 1961

Beutler E, Yeh M, Fairbanks VF (1962)

The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity: studies using the gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency as a marker.

*Proc Natl Acad Sci USA* 48: 9-16

Brown SW

Heterochromatin. *Science* 151: 417-425 (1966)

Brown T, Fox DP, Robertson FW, Bullock I (1983)

Non-random chromosome loss in PHA-stimulated lymphocytes from normal individuals. *Mutat Res* 122: 403-406

- Bull JJ (1983)  
Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin and Cummings  
Publishing Company, Menlo Park USA 1983
- Burgoyne PS (1982)  
Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals.  
Hum Genet 61: 85-90 (1982)
- Burke RD, Szabo P, O'Brien S, Nash WG, Yu L, Smith KD (1985)  
Organization and chromosomal specificity of autosomal homologs of a human Y-  
chromosome repeated DNA. Chromosoma 92: 225-233
- Burns J, Chan VT-W, Jonasson JA, Fleming KA, Taylor S, McGee J (1985)  
A sensitive method for visualising biotinylated probes hybridized in situ: rapid  
sex determination on intact cells. J Clin Pathol 38: 1085-1092
- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R (1998)  
DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. Nature 395: 89-93
- Cihák A (1974)  
Biological effects of 5-Azadeoxycytidine in eucaryotes. Oncology 30: 405-422
- Clarke DJ, Johnson RT, Downes CS (1993)  
Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in  
mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks.  
J Cell Sci 105 (Pt 2): 563-569
- Comings DE (1980)  
Arrangement of chromatin in the nucleus. Hum Genet 53: 131-143
- Cooke HJ, Hindley J (1979)  
Cloning of human satellite III DNA: Different components are on different  
chromosomes. Nucleic Acids Res 5: 3177-3197
- Cooke HJ, Schmidtke J, Gosden JR (1982)  
Characterization of human Y chromosome repeated sequence and related  
sequence in higher primates. Chromosoma 87: 491-502

- Cooke HJ, Fantes J, Green D (1983)  
Structure and evolution of the human Y chromosome DNA.  
Differentiation (Suppl) 23: 48-55
- Creusot F, Acs G, Christman JK (1982)  
Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia  
cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2-deoxycytidine.  
J Biol Chem 257: 2041-2048
- Cross SH, Bird AP (1995)  
CpG islands and genes. Curr Opin Genet Dev 5 (3): 309-14
- Deininger PL, Jolly DJ, Rubin CM, Friedmann T, Schmid CW (1981)  
Base sequence studies of 300 nucleotid denatured repeated human DNA clones.  
J Mol Biol 151: 17-33
- Downes CS, Mullinger AM, Johnson RT (1991)  
Inhibitors of topoisomerase II prevent chromatid separation in mammalian cells  
but do not prevent exit from mitosis. Proc Natl Acad Sci USA 88: 8895-8899
- Ehrlich M, Wang R Y-H (1981)  
5-Methylcytosine in eukariotic DNA. Science 212: 1350-1357
- Fearon ER, Vogelstein BA (1990)  
A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61: 759-767
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983)  
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high  
specific activity. Anal Biochem 132: 6-13
- Feinberg AP, Vogelstein B (1984)  
Addendum: a technique for radiolabeling DNA restriction endonucleases  
fragments to high specific activity. Anal Biochem 137: 266-267
- Fenech M, Morley AA (1985)  
The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei.  
Mutat Res 148: 99-105

- Ferguson-Smith MA (1965)  
Karyotype-phenotype correlations in gonadal dysgenesis and their bearing on the pathogenesis of malformations. *J Med Genet* 2: 142
- Fitzgerald P, McEwan C (1977)  
Total aneuploidy and age related sex chromosome aneuploidy in cultured lymphocytes of normal men and women. *Hum Genet* 39:329-337
- Ford CE, Hamerton JL (1956)  
The chromosome of man. *Nature* 178: 1020-1023
- Ford CE, Miller OJ, Polani PE, de Almeida JC, Brigg HJ (1959)  
A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome) *Lancet* I: 711-713
- Ford JH, Schultz CJ, Correll AT (1988)  
Chromosome elimination in micronuclei: a common cause of hypoploidy. *Am J Hum Genet* 43: 733-740
- Fucík V, Michaelis A, Rieger R (1970)  
On the induction of segment extension and chromatid structural changes in *Vicia Faba* chromosomes after treatment with 5-azadcytidine and 5-azadeoxycytidine. *Mutation Res* 9: 599-606
- Fujii S, Wang AH, van der Marel G, van Boom JH, Rich A (1982)  
Molecular structure of (m<sup>5</sup> dC-dG)<sub>3</sub>: the role of the methyl group on 5-methylcytosine in stabilizing Z-DNA. *Nucleic Acids Res* 10 (23): 7879-7892
- Galloway SM, Buckton KE (1978)  
Aneuploidy and aging: chromosome studies on a random sample of the population using G-banding. *Cytogenet Cell Genet* 20: 78-95
- Galton M, Holt SF (1964)  
DNA replication patterns of the sex chromosome in somatic cells of the Syrian hamster. *Cytogenetics* 3: 97-111

- Goodfellow P, Tippet P (1981)  
A human quantitative polymorphism relates to Xg blood group.  
Nature 289: 404-405
- Goodfellow P, Banting G, Sheer D, Popers HH, Caine A, Ferguson-Smith MA, Povey S, Voss R (1983)  
Genetic evidence that a Y-linked gene in man is homologous to a gene on the X chromosome. Nature 302: 346-349
- Gosden JR, Mitchel AR, Buckland RA, Clayton RP, Evans HJ (1975)  
The location of the four human satellite DNAs on human chromosomes.  
Exp Cell Res 92: 148-158
- Gough NM, Gearing DP, Nicola NA, Baker E, Pritchard M, Callen DF, Sutherland GR (1990)  
Localization of the human GM-CSF receptor gene to the pseudoautosomal region. Nature 345: 734-736
- Grumbach MM, Morishima A (1962)  
Sex chromatin in the sex chromosomes: On the origin of sex chromatin from a single X-chromosome. Acta Cytol 6: 46-60
- Guttenbach M, Schabowski R, Schmid M (1994)  
Aneuploidy and ageing: sex chromosome exclusion into micronuclei.  
Hum Genet 94: 295-298
- Guttenbach M, Schmid M (1994b)  
Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures. Exp Cell Res 211: 127-132
- Haaf T, Ott G, Schmid M (1988)  
Inhibition of condensation in the late-replicating X chromosome induced by 5-azadeoxycytosine in human lymphocyte cultures. Hum Genet 79: 18-23
- Haaf T, Werner P, Schmid M (1993)  
5-Azadeoxycytidine distinguishes between active and inactive X chromosome condensation. Cytogenet Cell Genet 63: 160-168

- Hando JC, Nath J, Tucker JD (1994)  
Sex chromosomes, micronuclei and aging in women.  
*Chromosoma* (1994) 103: 186-192
- Hanka LJ, Evans JS, Mason DJ, Dietz A (1966)  
Microbiological production of 5-azadeoxycytidine. I. Production and biological activity. *Antimicrob. Agents Chemother*: 619-624
- Heddle JA, Lue CB, Saunders EF, Benz RD (1978)  
Sensitivity of five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. *Cancer Res* 1978 Sep; 38(9): 2983-8
- Heddle JA, Benz RD, Countryman PI (1978b)  
Measurement of chromosome breakage in cultured cells by the micronucleus technique. In: Evans, Lloyd, eds.: *Mutagen induced chromosome damage in man* Edinburgh: Edinburgh University Press, 1978: 191-200.
- Hernandez R, Frady A, Zhang X-Y, Varela M, Ehrlich M (1997)  
Preferential induction of chromosome 1 multibranching figures and whole arm deletions in a human pro-B-cell line treated with 5-azacytidine or 5-azadeoxycytidine. *Cytogenet Cell Genet* 76: 196-201
- Hodges-Garcia Y, Hagerman PJ (1992)  
Cytosin methylation can induce local distortions in the structure of duplex DNA. *Biochemistry* 31 (33): 7595-7599
- Holliday R, Grigg GW (1993)  
DNA-methylation and mutation. *Mutat Res* 285: 61-67
- Jacobs PA, Strong JA (1959)  
A case of intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183: 302-303
- Jacobs PA, Court Brown WM (1961)  
Distribution of human chromosomes counts in relation to age. *Nature* 191: 1178-1180



- Jacobs PA, Brunton M, Court Brown WM (1963)  
Change of human chromosome count distributions with age: evidence for a sex difference. *Nature* 197: 1080-1081
- Jones PA, Taylor SM (1981)  
Hemimethylated duplex DNAs prepared from 5-azadeoxycytidine-treated cells. *Nucleic Acids Res* 9: 2933-2947
- Koschorz B (1992)  
Diplomarbeit: Die Aneuploidie des Y-Chromosoms im Laufe des Alterns, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Humangenetik
- Kurnit DM (1979)  
Satellite DNA and heterochromatin variants: the case for unequal mitotic crossing over. *Hum Genet* 54: 69-77
- Laird PW, Jaenisch R (1996)  
The role of DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Annu Rev Genet* 30: 441-464
- Lee SW, Tomasetto C, Swisshelm K, Keyomarsi K, Sager R (1992)  
Down-regulation of a member of the S100 gene family in mammary carcinoma cells and reexpression by azadeoxycytidine treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (6): 2504-8
- Li LH, Olin EJ, Burskirk HH, Reinecke LM (1970)  
Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer Res* 30: 2760-2769 (1979)
- Lopez-Baena M, Mateos S, Pinero J, Trinidad Ortiz, Cortes F (1998)  
Enhanced sensitivity to topoisomerase inhibitors in synchronous CHO cells pretreated with azacytidine. *Mutat Res* 421 (1): 109-116
- Lyon MF (1961)  
Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus*). *Nature* 190: 373-378

- Miller B, Albertini S, Locher F, Tyhbaud V, Lorge E (1997)  
Comparative evaluation for the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience.  
Mutat Res 392(1-2): p45-59, 187-208
- Miller BM, Nüsse M (1993)  
Analysis of micronuclei induced by 2-chlorobenzylidene malonitrile (CS) using fluorescence in situ hybridization with telomeric and centromeric DNA probes and flow cytometry. Mutagenesis 8(1):35-44
- Miniou P, Jeanpierre M, Blanquet V (1994)  
Abnormal methylation pattern in constitutive and facultative (X inactive Chromosome) heterochromatin of ICF patients. Hum Mol Genet 12: 2093-2102
- Mohandas T, Shapiro LJ (1983)  
Factors involved in X-chromosome inactivation. in: Sandberg A. A. (ed) Cytogenetics of the mammalian X chromosome, part A: Basic mechanisms of X chromosome behaviour. Liss, New York, pp271-297
- Moore KL, Barr ML (1953)  
Morphology of the nerve nuclei in mammals with special reference to the sex chromatin. J Comp Neurolog 98: 213-231
- Moses MJ, Counce SJ, Paulson DF (1975)  
Synaptonemal complex complement of man in spreads of spermatocytes, with details of the sex chromosome pair. Science 187: 363-365
- Natarajan AT, Gropp A (1972)  
A fluorescence study of heterochromatin and nucleolar organization in the laboratory and tobacco mouse. Expl Cell Res 74: 245-250
- Nagakome Y, Abe T, Misawa S, Takeshita T, Inuma K (1984)  
The "loss" of centromeres from chromosomes of aged women.  
Am J Hum Genet 36: 398-404

- Nath J, Tucker JD, Hando JC (1995)  
Y-chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and ageing in men.  
*Chromosoma* (1995) 103: 725-731
- Nowinski GP, Van Dyke DL, Tilley BC, Jacobsen G, Babu VR, Worsham MJ, Wilson GN, Lester W (1990)  
The frequency of aneuploidy in cultured lymphocytes is correlated with age and gender but not with reproductive history. *Am J Hum Genet* 46:1101-1111
- Nyce J (1989)  
Drug induced DNA-hypermethylation and drug resistance in human tumors.  
*Cancer Res* 49 (21): 5829-36
- Ohno S, Kaplan WD, Kinoshita R (1959)  
Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp Cell Res* 18: 415-418
- Ohno S (1967)  
Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer Verlag Berlin, Heidelberg; New York 1967
- Ohno S (1969)  
Evolution of sex chromosomes in mammals. *Annu Rev Genet* 3: 495-524
- Ouspenski II, Elledge SJ, Brinkley BR (1999)  
New yeast genes important for chromosome integrity and segregation identified by dosage effects on genome stability. *Nucleic Acid Res* 27 (15): 3001-8
- Ouspenski II, Cabello OA, Brinkley BR (2000)  
Chromosome condensation factor *brn1p* is required for chromatid separation during mitosis. *Mol Biol Cell* 11 (4): 1305-13
- Pfeiffer RA (1974)  
Cell cultures from blood and bone marrow. In: Schwarzbach H. G., Wolf U. (eds) *Methods in human cytogenetics*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 1-37

- Pliml J, Sorm F (1964)  
Synthesis of a 2-deoxy-D-ribofuranosyl-5-azacytidine.  
Coll Czech Chem Comm 29: 2576-2577.
- Razin A, Riggs AD (1980)  
DNA methylation and gene function. Science 210: 604-609
- Riggs AD, Pfeifer GP (1992)  
X-chromosome inactivation and cell memory. Trends Genet 8 (5): 169-74
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)  
Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed.  
Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- Schmid M, Grunert D, Haaf T, Engel W (1983)  
A direct demonstration of somatically paired heterochromatin of human chromosomes. Cytogenet Cell Genet 36: 554-561
- Schmid M, Haaf T, Grunert D (1984)  
5-Azadeoxycytidine-induced undercondensations in human chromosomes.  
Hum Genet (1984) 67: 257-263
- Schmid M, Guttenbach M, Nanda I, Studer R, Epplen JT (1990)  
Organization of DYZ2 repetitive DNA on the human Y chromosome.  
Genomics 6: 212-218
- Schuler M, Rupa DS, Eastmond DA (1997)  
A critical evaluation fo centromeric labeling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vitro. Mutat Res 392(1-2): p81-95
- Smith A, Fraser IS, Elliott G (1979)  
An infantile male with balanced Y;19 translocation: review of Y/autosome translocations. Annals Génét. 22: 189-194
- Solari AJ (1980)  
Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. Chromosoma 81: 315-337

- Spruck CH 3<sup>rd</sup>, Rideout WM 3<sup>rd</sup>, Jones PA (1993)  
DNA-methylation and cancer. In: Jost JP, Saluz HP (eds) DNA-methylation: molecular biology and biological significance. Birkhäuser Basel, pp 487-509
- Stacey M, Bennett MS, Hulten M (1995)  
FISH analysis on spontaneously arising micronuclei in the ICF syndrome.  
J Med Genet (1995) 32: 502-508
- Stearns SC (1987):  
The evolution of sex and its consequences. Birkhäuser Verlag, Basel 1987
- Stopper H, Eckert I, Wagner P, Schulz WA (1997)  
Formation of micronuclei and inhibition of topoisomerase II in the comet assay in mammalian cells with altered DNA methylation.  
In: Müller-Hermelink HK, Neumann H-G, Dekant W (eds) Risk and progression factors in carcinogenesis. Springer, New York 1997.
- Su H, Lau YF (1993)  
Identification of the transcriptional unit, structural organisation and promoter sequence of the human sex-determining region (SRY) Gene, using a reverse genetic approach. Am J Hum Genet 52: 24-38
- Sumner AT, Evans H J, Buckland RA (1971)  
New technique for distinguishing between human chromosomes.  
Nature New Biol 232: 31-32 (1971)
- Surrallés J, Jeppesen P, Morrison H, Natarajan A T (1996)  
Analysis of loss of inactive X chromosomes in interphase cells.  
Am J Hum Genet 59: 1091-1096
- Tate PH, Bird AP (1993)  
Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression.  
Curr Opin Genet Dev 3: 226-231
- Taylor JH (1960)  
Duplication of chromosomes and related events in the cell cycle. In: Cell Physiology of Neoplasia: 547-575 Univ Texas Press, Austin 1960

- Tucker JD, Nath J, Hando JC (1996)  
Activation status of the X chromosome in human micronucleated lymphocytes.  
Hum Genet 97: 471-475
- Viégas-Pequinot E, Dutrillaux B (1976)  
Segmentation of human chromosomes induced by 5-ACR (5-Azadeoxycytidin).  
Hum Genet 37: 247-254
- Viégas-Pequinot E, Dutrillaux B (1981)  
Detection of GC-rich heterochromatin by 5-azadeoxycytidine in mammals.  
Hum Genet 57: 134-137
- Welshorn WJ, Russell LB (1959)  
The Y chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse.  
Proc Natl Acad Sci USA 45: 560-566
- Wenger SL, Golden WL, Deniss SP, Stelle MW (1984)  
Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cells significant?  
Am J Med Genet 19: 715-719
- White MJD (1973)  
Anomal cytology and evolution. 3<sup>rd</sup> Ed., Cambridge Univ. Press, London 1973
- Willard H, Smith K, Sutherland J (1983)  
Isolation and characterization of a major tandem repeat family from the human  
X chromosome. Nucleic Acids Research 11:2017-2033
- Yang TP, Hansen SK, Oishi KK, Ryder OA, Hamkalo BA (1982)  
Characterization of a cloned repetitive DNA sequence concentrated on the  
human X chromosome. Proc Natl Acad Sci USA 79: 6593-6597
- Yunis JJ (1983)  
The chromosomal basis of human neoplasia. Science 221: 227-235
- Yunis JJ, Yasmineh WG (1971)  
Heterochromatin, satellite DNA and cell function. Science 174: 1200-1209

## 7 Anhang: Tabellen und Diagramme

Tabelle Nr. 1

Präparate: weiblich 0-5 Jahre

Mit 5-Azadeoxycytidin      Kontrollen

Präparate-Nr.	Mikronuklei in ‰	Präparate-Nr.	Mikronuklei in ‰
Nr. 170	16,5	Nr. 164	5,0
Nr. 164	15,0	Nr. 162	0,0
Nr. 172	14,5	Nr. 170	2,0
Nr. 100	14,0	Nr. 172	5,0
Nr. 155	12,5		
Nr. 84	11,2		
Nr.174	10,5		
Nr. 23	8,5		
Nr. 87	8,5		
Nr.169	8,0		
Nr. 86	7,5		
Nr. 158	7,0		
Nr. 160	6,0		
Nr. 168	5,5		
Nr. 162	5,5		
Nr. 153	5,5		
Nr. 16	5,0		
Nr. 107	4,5		
Nr. 151	4,5		
Nr. 137	4,5		
<b>Mittelwert</b>	<b>8,74</b>		
<b>Standardabweichung</b>	<b>3,94</b>		

Tabelle Nr. 2

Präparate: weiblich 30-35 Jahre

Mit 5-Azadeoxycytidin      Kontrollen

Präparate-Nr.	Mikronuklei in ‰	Präparate-Nr.	Mikronuklei in ‰
Nr. 37	32,7	Nr. 43	1,0
Nr. 33	32,0	Nr. 31	2,0
Nr. 29	31,4	Nr. 33	3,0
Nr. 105	21,5		
Nr. 108	21,0		
Nr. 102	19,5		
Nr. 82	18,0		
Nr. 35	17,5		
Nr. 123	15,5		
Nr. 15	15,5		
Nr. 98	15,0		
Nr. 59	14,5		
Nr. 65	13,0		
Nr. 97	12,0		
Nr. 51	11,5		
Nr. 43	10,7		
Nr. 57	10,7		
Nr. 89	10,0		
Nr. 58	9,0		
Nr. 31	7,4		
<b>Mittelwert</b>	<b>16,92</b>		
<b>Standardabweichung</b>	<b>7,58</b>		



Tabelle Nr. 3

Präparate: weiblich 60-65 Jahre

Mit 5-Azadeoxycytidin      Kontrollen

Präparate-Nr.	Mikronuklei in ‰	Präparate-Nr.	Mikronuklei in ‰
Nr. 126	36,5	Nr. 116	4,0
Nr. 2	30,0	Nr. 145	2,0
Nr. 145	27,0	Nr. 141	3,0
Nr. 80	24,5	Nr. 149	5,5
Nr. 73	23,5		
Nr. 125	23,5		
Nr. 133	20,5		
Nr. 116	21,0		
Nr. 22	18,3		
Nr. 34	18,0		
Nr. 141	17,0		
Nr. 124	17,0		
Nr. 140	16,0		
Nr. 115	16,0		
Nr. 132	14,5		
Nr. 150	14,0		
Nr. 119	14,0		
Nr. 117	14,0		
Nr. 139	13,5		
Nr. 149	8,5		
<b>Mittelwert</b>	<b>19,37</b>		
<b>Standardabweichung</b>	<b>6,60</b>		

Tabelle Nr. 4

Präparate: männlich 0-5 Jahre

Mit 5-Azadeoxycytidin      Kontrollen

Präparate-Nr.	Mikronuklei in ‰	Präparate-Nr.	Mikronuklei in ‰
Nr. 23	21,4	Nr. 166	5,0
Nr. 159	14,0	Nr. 112	1,0
Nr. 171	11,5	Nr. 106	1,5
Nr. 165	11,0		
Nr. 106	11,0		
Nr. 153	9,5		
Nr. 111	9,0		
Nr. 152	8,5		
Nr. 112	8,5		
Nr. 78	8,0		
Nr. 129	8,0		
Nr. 157	6,5		
Nr. 134	6,5		
Nr. 30	6,3		
Nr. 156	5,5		
Nr. 161	5,5		
Nr. 83	5,0		
Nr. 101	5,0		
Nr. 136	4,5		
Nr. 110	4,0		
<b>Mittelwert</b>	<b>8,46</b>		
<b>Standardabweichung</b>	<b>4,04</b>		

Tabelle Nr. 5

Präparate: männlich 30-35 Jahre

Mit 5-Azadeoxycytidin      Kontrollen

Präparate-Nr.	Mikronuklei in ‰	Präparate-Nr.	Mikronuklei in ‰
Nr. 176	33,5	Nr. 41	1,0
Nr. 36	31,0	Nr. 25	2,0
Nr. 75	25,0	Nr. 36	2,0
Nr. 27	22,5		
Nr. 25	22,0		
Nr. 71	21,5		
Nr. 15	19,0		
Nr. 30	18,0		
Nr. 39	17,8		
Nr. 53	16,5		
Nr. 41	15,7		
Nr. 54	15,5		
Nr. 46	15,3		
Nr. 50	15,0		
Nr. 62	14,0		
Nr. 24	13,7		
Nr. 60	11,5		
Nr. 92	11,0		
Nr. 61	9,0		
Nr. 63	7,5		
<b>Mittelwert</b>	<b>17,75</b>		
<b>Standardabweichung</b>	<b>6,70</b>		

Tabelle Nr. 6

Präparate: männlich 60-65 Jahre

Mit 5-Azadeoxycytidin      Kontrollen

Präparate-Nr.	Mikronuklei in ‰	Präparate-Nr.	Mikronuklei in ‰
Nr. 40	35,3	Nr. 40	5,5
Nr. 103	30,0	Nr. 45	2,0
Nr. 77	26,5	Nr. 64	3,0
Nr. 122	25,5		
Nr. 26	25,0		
Nr. 118	24,5		
Nr. 45	21,9		
Nr. 127	21,0		
Nr. 81	19,5		
Nr. 67	18,5		
Nr. 117	16,5		
Nr. 47	16,4		
Nr. 104	16,0		
Nr. 93	14,5		
Nr. 114	14,5		
Nr. 69	14,0		
Nr. 119	14,0		
Nr. 28	13,5		
Nr. 64	12,0		
Nr. 52	11,0		
<b>Mittelwert</b>	<b>19,51</b>		
<b>Standardabweichung</b>	<b>6,55</b>		

Tabelle Nr. 7

(zu [Abbildung Nr. 10](#) und [Abbildung Nr. 12](#))

zu: [3.2.2](#) Der Nachweis des X-Chromosoms in den Mikronuklei der Frauen

Alter	Präparat Nr.	Mn mit Signal	Mn gesamt	Anteil in %
<b>0-5</b>	16	0	25	0,00%
	162	2	36	5,56%
	164	3	38	7,89%
	170	1	21	4,76%
	174	2	59	3,39%
<b>30-35</b>	29	4	41	9,76%
	31	2	27	7,41%
	35	1	28	3,57%
	37	1	32	3,13%
	38	3	69	4,35%
<b>60-65</b>	34	3	34	8,82%
	116	4	52	7,69%
	117	2	43	4,65%
	141	2	41	4,88%
	149	2	35	5,71%

<b>Summe</b>	32	581	<b>5,51%</b>
Mittelwert	2,133	38,733	
Standardabw.	1,125	13,030	

Mn = Mikronuklei

Tabelle Nr. 8

(zu [Abbildung Nr. 10](#))

zu: [3.2.2](#) Der Nachweis des X-Chromosoms in den Mikronuklei der Frauen  
Aufschlüsselung nach den Altersgruppen: Mikronuklei mit Signal in %  
(bezogen auf die Gesamtanzahl der aufgetretenen Mikronuklei)

Altersgruppe	0-5 Jahre	30-35 Jahre	60-65 Jahre
Mn/1000	8,95	10,37	10,51
Mn mit Signal/ 100 Mn	4,47	5,51	6,34

(Mn = Mikronuklei)

Tabelle Nr. 9

(zu [Abbildung Nr. 11](#) und [Abbildung Nr. 12](#))

zu: [3.2.3](#) Der Nachweis des Y-Chromosoms in den Mikronuklei der Männer

Alter	Präparat Nr.	Mn mit Signal	Mn gesamt	Anteil in %
<b>0-5</b>	30	2	26	7,69%
	106	5	42	11,90%
	110	3	43	6,98%
	111	5	33	15,15%
	112	6	59	10,17%
<b>30-35</b>	24	6	41	14,63%
	25	2	35	5,71%
	27	3	37	8,11%
	36	7	65	10,77%
	41	4	67	5,97%
<b>60-65</b>	26	8	45	17,78%
	28	11	42	26,19%
	40	7	65	10,77%
	122	6	75	8,00%
	104	3	51	5,88%

<b>Summe</b>	78	726	<b>10,74%</b>
Mittelwert	5,200	48,400	
Standabw.	2,484	14,515	

Tabelle Nr. 10

(zu [Abbildung Nr. 11](#))

zu: [3.2.3](#) Der Nachweis des Y-Chromosoms in den Mikronuklei der Männer  
Aufschlüsselung nach den Altersgruppen: Mikronuklei mit Signal in %  
(bezogen auf die Gesamtanzahl der aufgetretenen Mikronuklei)

Altersgruppe	0-5 Jahre	30-35 Jahre	60-65 Jahre
Mn/1000	8,21	10,65	11,93
Mn mit Signal/ 100 Mn	10,34	8,98	12,59

(Mn = Mikronuklei)



## **Lebenslauf**

### **Personalien:**

Name: Andreas Klein  
Anschrift: Pfärrle 10 a  
86152 Augsburg  
Geburtsort: Haunstetten, jetzt Augsburg  
Geburtsdatum: 06.11.1968  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Günter Georg Klein  
Maresa Klein  
Geschwister: Sonja Klein  
Armin Klein

### **Schulbildung:**

1975-1979 Grundschole Westheim  
1979-1988 Justus-von-Liebig-Gymnasium Neusäß  
29.06.1988 Allgemeine Hochschulreife, Durchschnittsnote: 1,2

### **Zivildienst:**

1988-1990 Kinder- und Jugendpsychiatrie, Kinderkrankenhaus  
Josefinum, Kapellenstr. 30, 86154 Augsburg

**Medizinstudium:**

1990-1996	Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1996-1997	Ludwig-Maximilians-Universität München
10.09.1992	Ärztliche Vorprüfung
16.09.1993	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11.04.1996	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05.11.1997	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

<i>Praktisches Jahr:</i>	21.10.96-09.02.97	Chirurgie, II. Chirurgische Klinik Zentralklinikum Augsburg
	10.02.97-01.06.97	Innere Medizin, III. Med. Klinik Zentralklinikum Augsburg
	02.06.97-27.07.97	Pädiatrie, Hospital for Sick Children, Toronto, Kanada
	28.07.97-21.09.97	Janeway Child Health Centre Newfoundland, Kanada

**Berufliche Tätigkeit:**

1998-1999	Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der III. Medizinischen Klinik des Krankenhauszweckverbands Augsburg
seit 01.07.1999	Assistenzarzt in der III. Medizinischen Klinik des Krankenhaus- zweckverbands Augsburg, Chefarzt: Prof. Dr. M. Wienbeck

Augsburg, den 27. Januar 2001

Andreas Klein

## **Danksagung und Erklärung**

Mein besonderer Dank gilt:

Hr. Prof. Dr. Michael Schmid für seine Geduld

Fr. Priv.-Doz. Dr. Martina Guttenbach für die hervorragende Betreuung

Hr. Dr. Indrajit Nanda für Rat und Tat im Labor

Allen Mitarbeitern des Zytogenetiklabors und der Blutroutine für die tatkräftige Unterstützung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation selbst angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe diese Dissertation, vollständig oder teilweise, noch nie einer anderen Fakultät vorgelegt. Bisher habe ich noch keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht, mir wurde außerdem noch kein akademischer Grad entzogen. Zudem erkläre ich, daß gegen mich kein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder ein Disziplinarverfahren eingeleitet wurde.

Augsburg, den 27. Januar 2001

Andreas Klein