

Aus dem Institut für Humangenetik
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Molekularzytogenetische Untersuchung zum altersabhängigen Auftreten einer
Mosaiktrisomie 7 in Mundschleimhautzellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

Vorgelegt von: Swati Foerster
Geb. am: 14. Oktober 1978 in Pune / Indien

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
1. Zusammenfassung	8
1.1 Deutsch	8
1.2 Englisch	9
2. Einleitung	10
2.1 Aufbau und Organisation des menschlichen Chromosomensatzes	10
2.1.1 Störungen bei der Kernteilung	10
2.2 Konstitutionelle Veränderungen der Chromosomenzahl	11
2.2.1 Numerische Aberrationen von Autosomen	12
2.2.2 Numerische Aberrationen der Gonosomen	13
2.3 Somatische Veränderungen der Chromosomenzahl durch mitotische Fehlverteilung	14
2.4 Das Chromosom 7 und die Mosaiktrisomie 7	14
2.4.1 Proliferationsfördernde Gene auf Chromosom 7	15
2.4.2 Vorkommen einer Mosaik-Trisomie 7 in bösartigen Tumoren	15
2.4.3 Vorkommen einer Trisomie 7 in gutartigen Tumoren	16
2.4.4 Vorkommen einer Trisomie 7 in pathologisch verändertem nicht tumorösem Gewebe	16
2.4.5 Vorkommen einer Trisomie 7 in scheinbar normalem Gewebe	17
2.5 Numerische Chromosomen-Aberrationen in der Mundschleimhaut	17
2.6 Mögliche Bedeutung der Mosaik-Trisomie 7	17
2.7 Fragestellung der Arbeit	19
3. Material und Methodik	22
3.1 Untersuchungsmaterial	22
3.1.1 Mundschleimhaut	22
3.1.2 Anfertigung der Mundschleimhautabstriche	22
3.2 Probanden	23
3.2.1 Kollektiv A	24
3.2.2 Kollektiv B	24
3.3 Methode der Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung	25
3.4 Kontrollchromosomen für die FISH-Analyse	29
3.4.1 Das Chromosom 8, Heraushebung bestimmter Gene, Vorkommen von Trisomien	30

3.4.2	Das Chromosom 10, Heraushebung bestimmter Gene, Vorkommen von Trisomien	30
3.4.3	Das Chromosom 12, Heraushebung bestimmter Gene, Vorkommen von Trisomien	31
3.5	FISH-Sonden	32
3.5.1	Sondenherstellung	32
3.5.2	Sondenmarkierung mit Nicktranslation	33
3.6	FISH-Arbeitsprotokoll	34
3.6.1	Vorbehandlung der Ausstrichpräparate	34
3.6.2	DNA-Denaturierung und Hybridisierung	35
3.6.3	Posthybridisierungswaschung (stringente Waschung)	36
3.6.4	Sondendetektion	36
3.7	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	37
3.8	Statistische Auswertung	39
4.	Ergebnisse	41
4.1	Ergebnisse der Chromosom 7-FISH für das Kollektiv A	41
4.1.1	vergleichende Analyse weiblicher versus männlicher Probanden im Kollektiv A	43
4.1.2	Ergebnisse in Abhängigkeit vom Rauchverhalten im Kollektiv A	44
4.2	Ergebnisse der Chromosom 7-FISH für das Kollektiv B	45
4.2.1	vergleichende Analyse weiblicher versus männlicher Probanden im Kollektiv B	47
4.2.2	Ergebnisse in Abhängigkeit vom Rauchverhalten im Kollektiv B	48
4.3	Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse der Kollektive A und B	48
4.3.1	Vergleichende Auswertung der Ergebnisse der Kollektive A und B bezüglich des Probandenalters	51
4.3.2	Vergleich der Ergebnisse bezüglich Rauchverhalten (Kollektive A und B)	51
4.3.3	Analyse der Ergebnisse hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede (Kollektive A und B)	52
4.3.4	Betrachtung der Ergebnisse hinsichtlich einer Gewebsspezifität	53
4.4.	Analyse der Chromosom 8-, 10- und 12-FISH	53
4.4.1	Zusammenfassung der FISH-Analysen für die Chromosomen 7, 8, 10 und 12	54

5. Diskussion	55
5.1 Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich der Hypothese einer Altersabhängigkeit der Mosaik-Trisomie 7	55
5.1.1 Qualitative Analyse der FISH Untersuchung (Vergleichende Analyse der Trisomie 7-Inzidenz)	56
5.1.2 Quantitative Analyse (Vergleichende Analyse des prozentualen Trisomie 7-Mosaikanteils) der FISH-Untersuchung	57
5.1.3 Vergleich der Chromosom 7-FISH mit Ergebnissen der FISH bezüglich Chromosom 8, 10 und 12 (Kollektiv B)	59
5.2 Mögliche Entstehung der Trisomie 7 bzw. Überlegungen für die altersabhängige Zunahme des prozentualen Mosaik-Trisomie 7-Anteils	60
5.3 Möglicher Einfluß des Geschlechts auf das Auftreten einer Mosaik-Trisomie 7	61
5.4 Möglicher Einfluß des Rauchens auf das Auftreten einer Mosaiktrisomie 7	62
5.5 Mögliche Gewebetypspezifität einer Trisomie 7	62
5.6 Möglicher Entstehungsmechanismus der Mosaik-Trisomie 7	63
5.7 Proliferativer Selektionsvorteil der Mosaik-Trisomie 7	64
5.8 Andere mögliche Ursachen einer Chromosomenveränderung	65
5.9 Bewertung der Nachweismethode	67
5.9.1 Mundschleimhaut	67
5.9.2 Interphase-FISH	68
6. Literaturverzeichnis	72
7. Danksagung	85
8. Lebenslauf	86
Anhang	
Bildtafel	87
Abbildungsnachweis	90
Tabellen	95

Abkürzungen

ALK	activin receptor-like kinase 1
AML	Akute myeloische Leukämie
A. dest	Aqua destillata
Bio	Biotin
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
d.h.	das heißt
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleic acid oder Desoxyribonukleinsäure
EGFR	epidermal growth factor
entspr.	entspricht
et al.	et alii, und andere
FA	Formamid
FGFR 1	fibroblast growth factor receptor 1
FGF	Fibroblast growth factor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
ggf.	gegebenenfalls
g	Gramm
G1	gap 1
G2	gap 2
Gelegenheitsr.	Gelegenheitsraucher
HCL	Chlorwasserstoffsäure
HER	human epidermal growth factor receptor
HGF	hepatocyte growth factor
HGFR	hepatocyte growth factor receptor
HPV	Humanes Papillom-Virus
Hybridmix	Hybridisierungsgemisch inklusive markierter Sonden-DANN
i.d.R	in der Regel
IGF 1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin

J	Jahre
JRA	Juvenile Rheumatoide Arthritis
kDa	Kilodalton
LB Medium	lysogeny broth-Medium
Lfn	Laufende Nummer
M	Molar
m	männlich
Mastermix	Stocklösung des Hybridisierungsgemisches
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Min / min	Minuten
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplifikation
N	Number, Anzahl
N	Normal
Na	Natrium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NR	Nichtraucher
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
o.g.	oben genannte
OT	Objektträger
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor beta
PFA	Paraformaldehyd
PFGE	Pulsed-field Gel Elektrophorese
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PRCA	Papillary renal cell carcinoma
PVNS	Pigmentierte villonoduläre Synovitis
QBT- Puffer	Equilibrungspuffer
QC- Puffer	Waschpufferlösung
RNA	Ribonucleic acid oder Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SPSS	Statistical Package of the Social Sciences
SSC	saline sodium citrat- Puffer
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
vgl.	vergleiche
w	weiblich
Wcp	whole chromosome painting
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1. Zusammenfassung

1.1

Numerische Veränderungen einzelner Chromosomen sind vor allem bei Tumorerkrankungen ein häufiges Phänomen. Ein gehäuftes Auftreten einer Mosaik-Trisomie 7 in Tumoren und entzündlich verändertem Gewebe war bereits aus verschiedenen Studien bekannt. In einer Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe war in einem kleinen Kollektiv alter Individuen das Vorkommen der Mosaik-Trisomie 7 in verschiedenen normalen Geweben untersucht worden. Hier zeigte sich ein gehäuftes Auftreten der Mosaik-Trisomie 7 in Zellen der Mundschleimhaut. Eine pathogenetische Wertigkeit dieser Trisomie war hier nicht bekannt, da es sich um scheinbar normale Gewebe von zumindest im Mund- und Rachenbereich gesunden Probanden handelte. Auf der Basis dieser Vorergebnisse sollte bei der hier vorliegenden Arbeit überprüft werden, inwieweit eine Mosaik-Trisomie 7 in Zellen der normalen Mundschleimhaut ggf. ein altersassoziiertes Phänomen darstellt. Dazu wurden orale Plattenepithelzellen eines Kollektivs von 39 bezüglich Veränderungen der Mundschleimhaut unauffälligen sehr alten Probanden (75 - 103 Jahre) mit einem Kollektiv von 24 jüngeren gesunden Probanden (25 - 56 Jahre) verglichen. Die Zellen der Mundschleimhaut wurden mit der Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) hinsichtlich des Vorkommens von Trisomie 7 im Vergleich zu Chromosom 10 untersucht. Die Chromosomen 8 und 12 dienten als zusätzliche Kontrollen. Als zusätzliche Kontrollen dienten die Chromosomen 8 und 12. Im Kollektiv der älteren Probanden trat die Trisomie 7 in ~ 28% ($\leq 20\%$ der Zellen) und bei den jüngeren Probanden in ~ 38% ($\leq 6,8\%$) der Fälle auf. Die Kontrollen (Chromosom 8, 10 und 12) zeigten nur in zwei Fällen (je einmal für Chromosom 8 und 10) Trisomiebefunde über dem „cut off“ level. Das mögliche Auftreten einer Mosaik-Trisomie 7 in ansonsten unauffälliger Mundschleimhaut insgesamt ist statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß das erhöhte Lebensalter tendenziell für die Ausprägung der Trisomie 7 in normaler Mundschleimhaut bedeutsam sein kann. Dennoch ist die Trisomie 7 kein generelles Altersphänomen, sondern tritt altersassoziiert nur in einzelnen Individuen auf, so daß zusätzliche individualspezifischen Faktoren angenommen werden müssen.

1.2

Numerical chromosomal aberrations are common in tumors. These changes are however not restricted to malignancy. Mosaic trisomy of chromosome 7 ("mosaic trisomy 7") has been seen in both, tumors and inflammatory conditions. A pilot study has therefore been conducted to determine the possible occurrence of mosaic trisomy 7 in various tissue types in elderly individuals. The results were suggestive of the oral mucosa being among the possible hotspots. The significance of this finding was unknown as in the oropharynx mosaic trisomy 7 does not clearly relate to disease. It was considered physiological as mosaic trisomy 7 seems to occur in otherwise healthy individuals. Investigations were warranted to indicate whether this is merely associated with age or rather an epiphenomenon. The present study was therefore carried out to examine whether the occurrence of mosaic trisomy 7 in the oral mucosa correlates with age. Oral squamous epithelial cells that were brushed from the oral mucosa of thirty-nine 75 to 103 year-old males and females with a seemingly healthy oropharyngeal mucosa were hence compared with those obtained from twenty-four 25 to 56 year-olds. Fluorescent-in-situ-hybridisation (FISH) was carried out to determine the number of signals attributable to the chromosomes 7 and 10. Chromosome 8 and 12 served as additional controls. Trisomy 7 was found in ~ 28% of the elderly individuals ($\leq 20\%$ of the cells) and in ~ 38% of the young ($\leq 6.8\%$). Only two individuals had trisomic findings above cut off level for the controls (chromosomes 8 and 10). The possible overall occurrence of mosaic trisomy 7 in the otherwise inconspicuous oral mucosa is not statistically significant. There is a tendency towards age playing a role in the occurrence of trisomy 7 in the otherwise inconspicuous oral mucosa, but additional factors specific to each individual seem to however be necessary to generate such chromosomal triplets.

2. Einleitung

2.1 Aufbau und Organisation des menschlichen Chromosomensatzes

Das menschliche Genom ist in Form von 24 unterschiedlichen Chromosomen organisiert, die im Zellkern lokalisiert sind. Der normale Chromosomensatz besteht aus 22 Paaren jeweils gleicher Autosomen (Nicht-Geschlechts-Chromosomen) und einem Gonosomenpaar (beim Mann X- und Y-, bei der Frau zwei X-Chromosomen), so daß der entsprechende Karyotyp für Männer 46,XY und für Frauen 46,XX lautet. Jeweils die Hälfte des Chromosomensatzes stammt von väterlicher Seite und die andere Hälfte von mütterlicher Seite. Die Chromosomen werden nach Größe, der Lage des Zentromers und des bei Bänderungsfärbung erzeugten charakteristischen Bandenmusters unterschieden. Aufgrund der Position des Zentromers in Relation zu den Chromosomenarmen erfolgt eine Einteilung in metazentrische, submetazentrische und akrozentrische Chromosomen. Unter Einbeziehung von Größe und Lage des Zentromers ordnet man die Chromosomen in sieben Gruppen (Gruppe A - G). Im Gegensatz zu eigenständig vermehrter mitochondrialer DNA befinden sich die Chromosomen im Zellkern, der von den anderen Zellbestandteilen durch die Kernmembran abgetrennt ist, und werden abhängig vom Zellzyklus im Rahmen der Zellteilung vermehrt. Zentraler Bestandteil der Chromosomen ist die genetische Information substanziiell in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die DNA-Doppelhelix ist mit basischen Histonproteinen zu komplexen Einheiten, dem Chromatin verpackt. In der Interphase der Zellteilung sind die Chromosomen weitgehend dekondensiert und damit für das Lichtmikroskop nicht zu differenzieren. Zu Beginn der Zellteilung nach Durchlaufen der S-Phase liegen die Chromosomen in der Metaphase hochkondensiert vor. In dieser Form können sie nach Auflösung der Kernmembran im Lichtmikroskop als Chromosomen entsprechend den klassischen zytogenetischen Kriterien erfaßt und beurteilt werden.

2.1.1 Störungen bei der Kernteilung

Der Prozeß der Kernteilung ist für die Teilung der Zelle notwendig und ist damit wesentliche Grundlage für das Wachstum des Organismus, die Zellregeneration oder die Bildung von Keimzellen. Man unterscheidet zwischen der Mitose, die als sog.

somatische Zellteilung, zur Zellvermehrung unter Erhalt des Chromosomensatzes dient, und der Meiose, die mit einer Halbierung des Chromosomensatzes einhergeht und die Keimzellen bildet. Die Kernteilung läuft in vier Phasen ab, während derer sich die Chromosomen kondensieren und durch den ausgebildeten Spindelapparat geteilt werden. Zu Chromosomenverteilungsstörungen kann es sowohl bei der Meiose als auch bei der Mitose kommen. Das Resultat hiervon sind numerische, d.h. die Anzahl betreffende Chromosomenstörungen z.B. Trisomien (überzähliges Vorliegen einzelner Chromosomen) oder Monosomien (Fehlen einzelner Chromosomen). Man unterscheidet zwischen konstitutionellen und somatischen Störungen, je nachdem, ob die Chromosomenanomalie bereits angeboren vorliegt (konstitutionell) oder erst später im Rahmen einer Körperzellteilung (somatisch) im Laufe des Lebens neu auftritt. Konstitutionelle Chromosomenanomalien können entweder den gesamten Organismus durchgehend betreffen oder bei Auftreten in einer der frühen Vermehrungsteilungen des Embryos nur in einem Teil der Körperzellen vorliegen. Im letztgenannten Fall spricht man von einem konstitutionellen Mosaik. Ist eine Chromosomenfehlverteilung erst nachgeburtlich als somatische Störung aufgetreten, so sind ebenfalls im Mosaik nur einzelne Zellen des betreffenden Ursprungsgewebes betroffen.

2.2 Konstitutionelle Veränderungen der Chromosomenzahl

Veränderungen der Chromosomenzahl, die den gesamten Organismus betreffen, entstehen in der Meiose einer der elterlichen Keimzellen. Entstehen sie in der frühen Embryonalphase, betreffen sie nur einen Teil der Zellen, dann entsteht ein chromosomales Mosaik. Nur wenige numerische Chromosomenstörungen sind mit einer Embryonal- oder Fetalentwicklung vereinbar. Trisomien von Autosomen werden als konstitutionelle Anomalien nur bei einzelnen bestimmten Chromosomen beobachtet. Die Monosomie einzelner Autosomen ist zu einem frühen Zeitpunkt letal bzw. negativ selektiert und wird auch in Abortgewebe nicht beobachtet. Bei Gonosomen kann als konstitutionelle Störung eine Monosomie X (es liegt nur ein Geschlechtschromosom X vor) beobachtet werden. Nach heutiger Kenntnis handelt es sich auch hier praktisch immer um eine postzygotisch entstandene Veränderung, wobei ein Mosaikstatus postuliert werden muß. Tri- oder Polysomien der Gonosomen

kommen auch als Folge einer meiotischen Verteilungsstörung durchgehend mit u.U. vergleichsweise geringer klinischer Beeinträchtigung vor.

Für den Krankheitswert bei Trisomien kann es zusätzlich zu der rein quantitativen Aberration entscheidend sein, ob das überzählige Chromosom von maternaler oder paternaler Seite weitervererbt wird⁶².

2.2.1 Numerische Aberrationen von Autosomen

Bei Tieren, zum Beispiel Goldfischen (*Carassius auratus auratus*⁶⁴) und Pflanzen, zum Beispiel Zuckerrüben (*beta altissima*²⁴), sind polyploide Formen (Amplifikation nicht einzelner Chromosomen, sondern des Chromosomensatzes) häufig mit dem Leben vereinbar oder werden sogar bewußt gezüchtet. Dagegen sind beim Menschen Abweichungen des gesamten Chromosomensatzes (Polyploidien), die den ganzen Organismus betreffen, nicht mit dem Leben vereinbar. Interessanterweise können jedoch Zellen einzelner Gewebe, wie z.B. Leberzellen, polyploid sein⁵. Hier ist organspezifisch ein funktioneller Vorteil im Sinne der normalen Physiologie anzunehmen. Dies ist auch für die somatische Vermehrung einzelner Chromosomen in bestimmten Geweben grundsätzlich denkbar. Umgekehrt, im Sinne einer krankheitsassoziierten Störung findet man dagegen auch in vielen Tumoren eine Vermehrung oder Verluste von Chromosomen^{43, 63}.

Konstitutionelle Aberrationen von Autosomen führen generell zu schwerwiegender körperlicher und geistiger Beeinträchtigung. Bei lebend geborenen Kindern sind durchgehende Trisomien von Autosomen nur für die Chromosomen 13, 18 und 21 bekannt. Eine konstitutionelle Trisomie eines dieser Chromosomen führt aber auch hier zu schweren Fehlbildungen, Dysmorphien und/oder geistiger Retardierung. Für das Down Syndrom, die Trisomie 21, als vergleichsweise mildeste numerische Autosomenstörung sind allerdings verschiedene Schweregrade der Ausprägung bekannt; die Lebenserwartung der Betroffenen ist trotz inzwischen gesteigener durchschnittlicher Lebenszeit zumeist verringert. Kinder mit durchgehender Trisomie 13 oder 18 haben dagegen eine außerordentlich schlechte Prognose; die meisten versterben innerhalb des ersten Lebensjahres; i.d.R. bestehen multiple angeborene Organfehlbildungen und schwerste psychomotorische Retardierung⁴⁷. Autosomale Monosomien, die den ganzen Organismus betreffen, kommen beim Menschen nicht vor. In Form von Mosaik-Trisomien oder -monosomien können Störungen der

Chromosomenzahl konstitutionell und/oder somatisch erworben durchaus vorkommen. Bei konstitutionellen Aberrationen sind auch hier je nach Chromosomentyp und Mosaikanteil und betroffenem Gewebe Beeinträchtigungen in der geistigen und/oder körperlichen Entwicklung zu finden. Als konstitutionelle Mosaik ansonsten letaler Trisomien, wurden z.B. eine Mosaik-Trisomie 8 oder Mosaik-Trisomie 9 wiederholt auch bei lebend geborenen Kindern beschrieben^{22, 103}.

Trisomien einzelner Chromosomen können in seltenen Fällen auch kombiniert mit einer weiteren Trisomie auftreten, wie zum Beispiel die Trisomie 21 und die Trisomie 18 oder 13²⁰.

Bei einem Teil der Patienten mit konstitutionellen chromosomalen Mosaiken ist der Nachweis der Chromosomenstörung erschwert, da die Chromosomenstörung in Blutzellen, z.B. Lymphozyten nicht zwingend vorliegt. Eine auffällige arealbegrenzte Pigmentierung oder Hypopigmentierung der Haut (Hypomelanoses Ito) kann auf ein konstitutionelles chromosomales Mosaik hinweisen. Oftmals bestehen körperliche Dysmorphien oder eine variabel ausgeprägt mentale Einschränkung³³. Letzteres beides muß allerdings nicht immer vorliegen und hängt sicher von Anteil und Art der Mosaikzelllinie ab. Beispielhaft kann z.B. eine Mosaik-Trisomie 20 mit Hyperpigmentierungen, aber normaler intellektueller Entwicklung einhergehen.

2.2.2 Numerische Veränderungen der Gonosomen

Die Gonosomen zeigen eine höhere Toleranz für numerische Abweichungen. So ist zum Beispiel für das Ullrich-Turner-Syndrom (Karyotyp 45,X) das Fehlen eines der beiden Geschlechtschromosomen bei weiblichen Individuen typisch. Die Veränderung kann damit als einzige durchgängige konstitutionelle Monosomie bezeichnet werden, die mit dem Leben vereinbar ist. Auch Polysomien kommen bei den Gonosomen häufiger vor, z. B. das Klinefelter-Syndrom (47,XXY) oder das Triplo-X-Syndrom (47,XXX). Numerische Störungen der Geschlechtschromosomen sind im Gegensatz zu Störungen der Anzahl der Autosomen im Wesentlichen mit einer Fertilitätsstörung und lediglich geringer oder keiner intellektuellen Beeinträchtigung verbunden. Insbesondere höhergradige Polysomien mit mehr als drei Geschlechtschromosomen (z.B. 48,XXXY-Karyotyp) gehen häufig mit einer deutlicher ausgeprägten geistigen Einschränkung oder Behinderung einher.

2.3 Somatische Veränderungen der Chromosomenzahl durch mitotische Fehlverteilung

Im Gegensatz zu diesen konstitutionellen Veränderungen gibt es eine Vielzahl somatischer Chromosomenstörungen, die im Rahmen postnataler mitotischer Teilungen entstanden sind. Informationen zu somatischen Chromosomenanomalien stammen i.d.R. aus zytogenetischen Untersuchungen, die überwiegend an Tumorzellen oder seltener in anderen krankhaften Gewebekonditionen durchgeführt wurden. Bei systematischen Analysen verschiedener Tumortypen konnten eine Reihe tumorspezifischer numerischer und/oder auch struktureller Chromosomenveränderungen belegt werden. Beispiele sind z.B. der Verlust des Chromosoms 22 bei Meningeomen⁸¹ oder die Trisomie 7 in Nierenzellkarzinomen und Gehirntumoren. Eine Trisomie 7 wurde sowohl als einzige Aberration als auch in Kombination mit anderen typischen chromosomalen Veränderungen auch in einer Reihe weiterer unterschiedlicher Tumore und sonstiger Organkonditionen beobachtet (siehe unter 2.4).

2.4 Das Chromosom 7 und die Mosaik-Trisomie 7

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorliegen einer Mosaik-Trisomie des Chromosoms 7 in der Mundschleimhaut untersucht. Das Chromosom 7 gehört in die Gruppe C, der mittelgroßen metazentrischen Chromosomen. Es befinden sich etwas mehr als 1500 Gene darauf. Relativ häufig findet man Gene für Proteinkomplexe, wie zum Beispiel Zinkfingerproteine und Enzyme. Gene für Kanalproteine und Rezeptoren sind dagegen vergleichsweise selten. Interessanterweise beherbergt Chromosom 7 einige wachstums- bzw. proliferations-assoziierte sowie in Entzündungsprozessen relevante Gene wie z.B. den Rezeptor für den epidermal growth factor EGFR, hepatocyte growth factor HGF oder Interleukin 6 (siehe 2.4.1).

Die Trisomie 7 bzw. Mosaik-Trisomie 7 ist als zytogenetisches Phänomen bekannt, das bei sehr unterschiedlichen Veränderungen auftritt⁵⁷. Eine durchgehende konstitutionelle Trisomie 7 ist letal und führt zum frühen Abort³². In trisomiebedingten Spontanaborten konnte die Trisomie 7 wiederholt nachgewiesen werden¹⁰².

Da es nur wenige Fälle von lebendgeborenen Kindern mit einer konstitutionellen Mosaik-Trisomie 7 gibt, sind Angaben zu einem spezifischen Phänotyp nur begrenzt. Renale Veränderungen im Sinne einer anlagebedingten Nierendysplasie wurden

allerdings wiederholt berichtet⁹⁵. Im Falle einer Mosaik-Trisomie 7 der Plazenta wurden bezüglich Größe, Struktur und Funktion der Plazenta keine Auffälligkeiten festgestellt⁹⁷.

Eine somatische Mosaik-Trisomie 7 wurde dagegen schon häufig in verschiedenen Geweben nachgewiesen: Eine Mosaik-Trisomie 7 wurde beschrieben bei unterschiedlichen malignen oder benignen Tumoren, in Geweben verschiedener chronisch entzündlicher Erkrankungen und auch in scheinbar normalen Geweben (z.T. aus der Nachbarschaft von Tumoren) (siehe 2.4.3-2.4.5).

2.4.1 Proliferationsfördernde Gene auf Chromosom 7

Das Chromosom 7 beherbergt eine Reihe von Genen, die mit Zellwachstum und Proliferation assoziiert sind.

Der epidermal growth factor-Rezeptor EGFR ist eine Rezeptor Tyrosinkinase, ein 170-kDa schweres transmembranäres Glykoprotein, das von dem EGFR1/HER1 Gen kodiert wird²⁵. EGFR ist ein Mitglied der ErbB-Familie, eine Unterfamilie von vier eng verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen: EGFR1/HER1 (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4). Die chromosomale Lokalisation von EGFR1 ist auf Chromosom 7 zwischen der Region p13 und q22⁵³. Der EGFR gehört zu den Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und wird oft in Zellen von malignen Tumoren hochreguliert, was das schnelle unkontrollierte Wachstum mitbewirken kann. Eine vermehrte EGFR-Expression wurde in Korrelation zum Zugewinn von Chromosom 7 Kopien (z.B. Trisomie 7) zum Beispiel im malignen Melanom⁵⁴, im Prostata-Karzinom⁹⁰, aber auch in nicht-malignen Läsionen, beispielsweise dem Barrett Ösophagus⁴¹ beschrieben.

2.4.2 Vorkommen einer Mosaik-Trisomie 7 in bösartigen Tumoren

Eine Mosaik-Trisomie 7 ist ein sehr häufiges Phänomen in verschiedenen zytogenetisch analysierten soliden Tumoren. Eine Mosaik-Trisomie 7 ist beschrieben u.a. in Karzinomen der Niere, Gehirn, Darm, Brustdrüse, Schilddrüse und Zervix. Weiterhin wurde eine Mosaik-Trisomie 7 in malignen Melanomen und malignen Histiozytomen dokumentiert. In Glioblastomen wie auch Nierenzellkarzinomen wird eine Mosaik-Trisomie 7 als tumorzytogenetisches Charakteristikum gefunden. Im

Harnblasenkarzinom⁶⁷ oder dem Prostatakarzinom^{2, 26} kann das Chromosom 7 in dreifacher Anzahl vorkommen. Die Häufigkeit einer veränderten Chromosomenzahl, insbesondere einer Trisomie des Chromosoms 7, steigt in Prostata-Karzinomen mit zunehmender Tumorgröße⁹⁰. Dies korreliert mit der Zeitdauer des Wachstums. In follikulären Schilddrüsenkarzinomen wurde ebenfalls eine Trisomie 7 gefunden. Numerische Aberrationen in normalem Schilddrüsengewebe wurden nicht beobachtet⁸⁴. In einer Studie aus dem Jahre 1999 wurde ein zusätzliches Chromosom 7 in bis 60% der seinerzeit analysierten Mammakarzinompräparate gefunden⁸⁶. Ein ähnliches Bild fand sich in Glioblastomen (hierbei sowohl mit als auch ohne Amplifikation des EGFR Gens)⁸³. Auch in malignen fibrösen Histiocyten kann es zu einer Trisomie 7 kommen¹⁴. In Fällen einer Infektion der Cervix uteri mit HPV wurde nach maligner Transformation infizierter Plattenepithelverbände eine relative Zunahme einer Trisomie 7 in squamös differenzierten zellulären Elementen nachgewiesen⁷⁰.

2.4.3 Vorkommen einer Trisomie 7 in gutartigen Tumoren

Neben malignen Tumoren konnte eine Mosaik-Trisomie 7 ebenso in einer Reihe gutartiger Tumore nachgewiesen werden, wie z.B. dem papillären Nierenadenomen (PRCA)⁵¹, dem follikulären Schilddrüsenadenomen und bei benigner Schilddrüsenhyperplasie¹¹, sowie in benignen epithelialen Schilddrüsenadenomen³⁵. Im Einzelfall wurde eine Mosaik-Trisomie 7 auch in einem benignen Karzinoid-Tumor der Lunge festgestellt⁹⁴. Weitere benigne Tumore, in denen von einer Mosaik-Trisomie 7 berichtet wurde, sind Adenome des Kolons (Trisomie 7 in Epithelzellen)⁸ oder Onkozytome der Speicheldrüsen⁶⁵. Auch in zentralen Neurozytomen, einer seltenen gutartigen Form von Hirntumoren, konnten in über 30% der untersuchten Fälle Zellen mit einer Trisomie 7 nachgewiesen werden⁹³.

2.4.4 Vorkommen einer Trisomie 7 in pathologisch verändertem nicht tumorösem Gewebe

Zusätzlich zu Berichten über Mosaik-Trisomie 7 als tumorzytogenetischem Phänomen wurde eine Mosaik-Trisomie 7 auch in nicht tumorösen, anderen krankhaften Gewebeveränderungen beschrieben, so zum Beispiel in der fokalen

Steatosis hepatis⁹, in arteriosklerotischen Plaques^{19, 68}, in Nierengewebe bei chronischer Glomerulonephritis, in fibroblastoiden Zellen aus Dupuytren'schen Kontrakturen, sowie in entzündlich veränderter Synovia bei Patienten mit Osteoarthritis, Rheumatoider Arthritis¹⁶ und pigmentierter villonodulärer Synovitis (PVNS)⁷⁸. In einer Studie wurde z.B. Synoviagewebe eines kleinen Kollektivs von Patienten mit Osteoarthritis untersucht und dabei in fast 90% der Kulturen aus Synovia bzw Osteophyten eine Trisomie des Chromosoms 7 festgestellt⁶⁹. Auch in entzündlich verändertem Gewebe wie in chronischer Gastritis kann es zu einer Trisomie der Chromosomen 7 und/oder 8 kommen⁴². Zusammenfassend zeigte sich eine Mosaik-Trisomie 7 in nicht tumorösen Geweben, die im Rahmen chronisch entzündlicher Veränderungen oder wie z.B. im Falle von Rheuma-Synovia entzündlich proliferativer Veränderungen alteriert waren. In Synovialgewebe wurde wie in der zitierten Studie bei chronischer Gastritis neben einer Häufung von Mosaik-Trisomie 7 auch wiederholt das Auftreten von Mosaik-Trisomie 8 beobachtet. Ebenso wie Chromosom 7 scheint Chromosom 8 mit Zellproliferation assoziiert zu sein.

2.4.5 Mosaik-Trisomie 7 in scheinbar normalem Gewebe

In einzelnen zytogenetisch analysierten scheinbar normalen Geweben (z.B. Hirngewebe, Nierengewebe) konnten ebenfalls Zellen mit Trisomie 7 im Sinne einer Mosaik-Trisomie 7 nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich allerdings häufig um tumornahe Gewebe, die im Rahmen einer Tumorbiopsie miterfasst wurden, so daß eine zugrundeliegende Gewebepathologie hier nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

2.5 Numerische Chromosomen-Aberrationen in der Mundschleimhaut

In der Mundschleimhaut wurde in verschiedenen Arbeiten das Vorliegen numerischer Chromosomen-Mosaik beschrieben. U.a. wurde auch das Vorkommen von Mosaik-Trisomie 7 berichtet. Neben der hier untersuchten Mosaik-Trisomie des Chromosoms 7 gibt es noch weitere Trisomien, die in der Mundschleimhaut nachgewiesen werden konnten. In der Literatur sind an Zellen der Mundschleimhaut Mosaik-Trisomien, z.B. von Chromosom X, 17 und 20 berichtet; allerdings liegen bislang nur sehr wenige Daten zu Chromosomenstörungen an Mundschleimhautgewebe vor. Die publizierten

Berichte beziehen sich weitgehend auf Ergebnisse, die durch gezielte FISH-Analyse mit Chromosomen-spezifischen Sonden erzielt wurden^{37,60}.

2.6 Mögliche Bedeutung der Mosaik-Trisomie 7

Die Zusammenschau der vielfältigen Beobachtung der Mosaik-Trisomie 7 in so unterschiedlichen Konditionen macht die Bewertung hinsichtlich einer ätiopathologischen Bedeutung, z.B. im Rahmen des Tumorgeschehens schwierig und wirft die Fragen nach **einem möglichen krankheitsunabhängigen Epiphänomen** auf. Da die Mosaik-Trisomie 7 andererseits in bestimmten Tumoren wie z.B. Hirntumoren und Nierenzellkarzinomen einen **essenziellen tumorzytogenetischen Befund** darstellt, ist es möglich, daß die Trisomie 7 in unterschiedlichen Erkrankungen bzw. Konditionen hinsichtlich ihrer Bedeutung unterschiedlich zu interpretieren ist.

Da die meisten Patienten in tumorzytogenetischen Studien sowie in zytogenetischen Studien an Synovia bei Rheumatoider Arthritis oder Osteoarthritis aufgrund der natürlichen Altersverteilung bei diesen Krankheitsentitäten in höherem Lebensalter waren, entstand die Hypothese einer möglichen **Altersabhängigkeit der Mosaik-Trisomie 7**. Bei einer Metastudie (Mitelman Database of Chromosome Aberration in Cancer, Mitelman et al. 2000) über das Vorkommen von Trisomie 7 in Tumoren (Mamma, Kolon, Lunge, Haut und Niere) wuchs die Nachweishäufigkeit einer Trisomie 7 mit dem zunehmenden Alter der Patienten¹⁷. Nur bei Tumoren des Gehirns und der Schilddrüse trat die Trisomie 7 häufiger bei jungen Menschen auf. Die Tumore wurden unabhängig von klinischem Stadium oder histologischer Differenzierung untersucht. Um eine vermutete Altersabhängigkeit zu überprüfen, wurden Synovialzellen eines Kollektivs von gesunden älteren Probanden und eines Kollektivs von jungen Probanden mit juveniler Rheumatoider Arthritis (JRA) bezüglich Trisomie 7 untersucht und miteinander verglichen. Hierbei wurde erstaunlicher Weise Trisomie 7 auch in normaler Synovia in der Hälfte (5/10) der gesunden älteren Probanden mit zum Teil 50%igem Anteil und in der anderen Hälfte zumindest vereinzelt gefunden, wohingegen im Kollektiv der jungen Patienten mit JRA lediglich einer von 10 eine Mosaik-Trisomie 7 aufwies¹⁷.

Aus Analysen von konventionell zytogenetisch analysierten Lymphozyten ist als altersabhängige chromosomale Veränderung bisher im Wesentlichen die Aneusomie⁷², z.B. der Verlust der Geschlechtschromosomen⁴⁴ bekannt. Abgesehen

von konstitutionellen Mosaiken ist eine somatische Mosaik-Trisomie 7 an Lymphozyten gesunder Individuen nicht als wiederkehrendes Phänomen bekannt. Die meisten zytogenetischen Blutzell-Analysen erfolgen allerdings bei jüngeren Individuen. In einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe wurde bei einem kleinen Kollektiv über 75-jähriger, im Wesentlichen gesunder Individuen, in Lymphozyten keine Mosaik-Trisomie 7 festgestellt. Letztendlich ergibt sich aus der Zusammenschau der dargestellten Aspekte auch die Möglichkeit eines **gewebespezifischen Auftretens** einer Mosaik-Trisomie 7

Eine mögliche funktionelle Bedeutung, die das Vorkommen der Trisomie 7 in Geweben haben kann, liegt in dem erhöhten Proliferationsindex, der in vitro nachgewiesen werden kann³⁸. Dadurch gewinnt die Zelle einen Proliferationsvorteil⁶⁹, der sowohl im Rahmen tumoröser Erkrankungen wie auch ggf. bei Geweben mit erhöhter Regenerationsrate grundsätzlich bedeutsam bzw. von Vorteil sein könnte. Das Vorliegen einer Trisomie 7 kann ein Wachstumsvorteil sein, verhindert aber nicht die Zellalterung⁷².

2.7 Fragestellung der Arbeit

Die Trisomie 7 war aus Tumoren, in entzündlichem und nicht pathologisch verändertem Gewebe bereits bekannt. Neuere Daten gaben Anhalt für eine Mosaik-Trisomie 7 auch in bestimmten gesunden Geweben wie z.B. der Synovia. Die Wertigkeit der Trisomie 7 in Bezug auf ein fraglich krankheitsauslösendes Potential ist bislang nicht einheitlich geklärt bzw. nicht bekannt. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Hypothese eines möglicherweise altersabhängigen Epiphänomens.

In einer unpublizierten Pilotstudie zur Frage einer möglichen Altersabhängigkeit und Gewebespezifität einer Mosaik-Trisomie 7 wurden eine FISH Untersuchung an Lymphozyten, Haarwurzeln und Zellen der Mundschleimhaut eines kleinen Kollektivs (n = 16) gesunder über 75-jähriger Probanden durchgeführt. Dabei fanden sich ausschließlich in Zellen der Mundschleimhaut mit einem variablem Mosaikanteil von > 2 - 12,5% trisome Zellen bezüglich des Chromosom 7 (6/16 Probanden, entspricht 37,5%). An Blutzellen des gleichen Probandenkollektivs konnte dagegen keine relevante Trisomie 7 identifiziert werden. Diese Vorbefunde ließen eine mögliche Gewebespezifität der Mosaik-Trisomie 7 vermuten, allerdings aufgrund der

geringen Probandenzahl nicht statistisch signifikant belegen. Eine Altersabhängigkeit des Phänomens konnte hier mangels jüngerer Kontrollprobanden weiterhin nicht von einer gewebespezifischen Erscheinung abgegrenzt werden.

Im Wesentlichen fokussieren die Fragen zur Bedeutung der Trisomie 7 drei Hypothesen:

1. Die Mosaik-Trisomie 7 wurde am häufigsten in pathologisch verändertem Gewebe nachgewiesen, daher kann es sich um eine **krankheitsassoziierte** oder krankheitsbegünstigende Veränderung handeln.

2. Besonders bei älteren z.T. auch gesunden Individuen wurde eine Mosaik-Trisomie 7 gefunden. Daher kann es sich um ein unspezifisches **altersabhängiges** Phänomen handeln, das nicht mit krankhaften Veränderungen zusammenhängt. Bisher sind keine Studien zum möglichen Auftreten und Nutzen eines zusätzlichen Chromosoms im Bezug zum Alter bekannt.

3. Das Auftreten der Mosaik-Trisomie 7 in bestimmten Gewebetypen kann auf eine **gewebsspezifische** Veränderung hindeuten. Auch hierbei ist ein Nutzen oder Schaden für das Individuum bisher nicht bekannt.

Vor diesem Hintergrund soll die vorliegende Arbeit bezüglich der Mosaik-Trisomie 7 die Frage einer reinen Gewebespezifität versus eines gewebetypischen Altersphänomens an Zellen der Mundschleimhaut überprüfen.

Zur Beantwortung der Frage einer Altersabhängigkeit und der Gewebespezifität wurde ein Kollektiv sehr alter, weitgehend gesunder Probanden (n = 39) im Vergleich zu einem Kollektiv jüngerer gesunder Probanden (n = 24) untersucht. Die Einschlusskriterien für die Zuteilung zur Gruppe jüngerer bzw. alter Individuen waren das erreichte Erwachsenenalter von ≥ 25 Jahren bis zur Obergrenze von maximal 60 Jahren (jüngere Probanden); die obere Altersgrenze orientiert sich an der durchschnittlichen Obergrenze des beruflich aktiven Lebensalters; es wurden überwiegend Probanden im mittleren Alter von 30 - 45 Jahren rekrutiert, bzw. ein Alter von ≥ 75 Jahren (d.h. das erreichte höhere Seniorenalter mit deutlichem

Abstand zum Kollektiv jüngerer Probanden). Naturgemäß waren im Kollektiv älterer Probanden alterstypische Begleiterkrankungen meist vorhanden, bzw. nicht ausgeschlossen; zur Vermeidung eines schwereren Bias wurde allerdings hinsichtlich einer im Wesentlichen guten Grundgesundheit selektiert. Anamnestisch bekannte Erkrankungen im Mund- und Rachenbereich wurden im Speziellen als absolutes Ausschlußkriterium betrachtet.

In beiden Gruppen wurden Zellen aus Mundschleimhautabstrichen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bezüglich der Anzahl der Chromosomen 7 untersucht. Die Chromosom 7-FISH-Analyse wurde als Kohybridisierung mit internen Kontrollsonden für die Chromosom 10 als repräsentativem Vergleichschromosom ohne bekannte erhöhte mitotische Instabilität durchgeführt.

Da in Studien an normaler Synovia neben Mosaik-Trisomie 7 auch Mosaik-Trisomie 8 wiederholt beobachtet wurde, wurde im Kollektiv der jüngeren Probanden zusätzlich eine FISH-Analyse der Chromosom 8-Anzahl durch Kohybridisierung von Sonden für die Chromosomen 8 und Kontrollsonden für die Chromosomen 12 durchgeführt. (Bei den Probanden des Kollektivs A mit sehr hohem Alter war diese Zusatzuntersuchung aufgrund beschränkter Zellausbeute nicht für alle durchführbar).

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Mundschleimhaut

Zellen der Mundschleimhaut sind als Probenmaterial sehr einfach zu gewinnen. Zudem ist die Gewinnung schmerzfrei und ohne gesundheitlichen Nachteil für den Probanden. Da es sich bei Zellen der Mundschleimhaut weitgehend um Interphasezellen handelt, ist allerdings eine direkte konventionelle Chromosomenanalyse nicht möglich. Die Mundhöhle ist von mehrschichtigem unverhorntem Plattenepithel ausgekleidet, das im Bereich der Lippen in ein verhorntes Plattenepithel übergeht. Eine Verhornung im Bereich der Mundhöhle ist immer pathologisch. Im Alter treten im Bereich der Mundhöhle verstärkt Atrophien der Mundschleimhaut und auch präneoplastische Läsionen wie die Leukoplakie oder aber bösartige Tumoren wie Plattenepithelkarzinome auf. In der Mundhöhle kommen als gutartige Veränderung am häufigsten Fibrome vor, aber auch vorübergehende Aphten, die durch lokale Traumen und Irritationen oder Viren ausgelöst werden können⁷⁵. Die Mundschleimhaut hat eine hohe Proliferationsrate bei der sich innerhalb von wenigen Tagen die Zellen nach einer Schädigung regenerieren. Bei den hier untersuchten Probanden waren keine Erkrankungen der Mundhöhle bekannt.

3.1.2 Anfertigung der Mundschleimhautabstriche

Vor der Probenentnahme führten die Probanden eine Mundspülung mit Leitungswasser durch, um Verunreinigungen zu reduzieren. Die Zellen der Mundschleimhaut wurden mit einem unsterilen Holzspatel von der Mitte der Wangeninnenseite entnommen (siehe Abbildung 1) und auf Glasobjektträger ausgestrichen. Um Zellverluste zu minimieren wurden Silan- beschichtete Objektträger verwendet. Es wurden pro Proband mindestens drei Abstriche angefertigt.

Die luftgetrockneten OT wurden in -20 °C kaltem Methanol für 10 Minuten fixiert und nach Abdampfen der alkoholischen Bestandteile bei -20 °C gelagert.

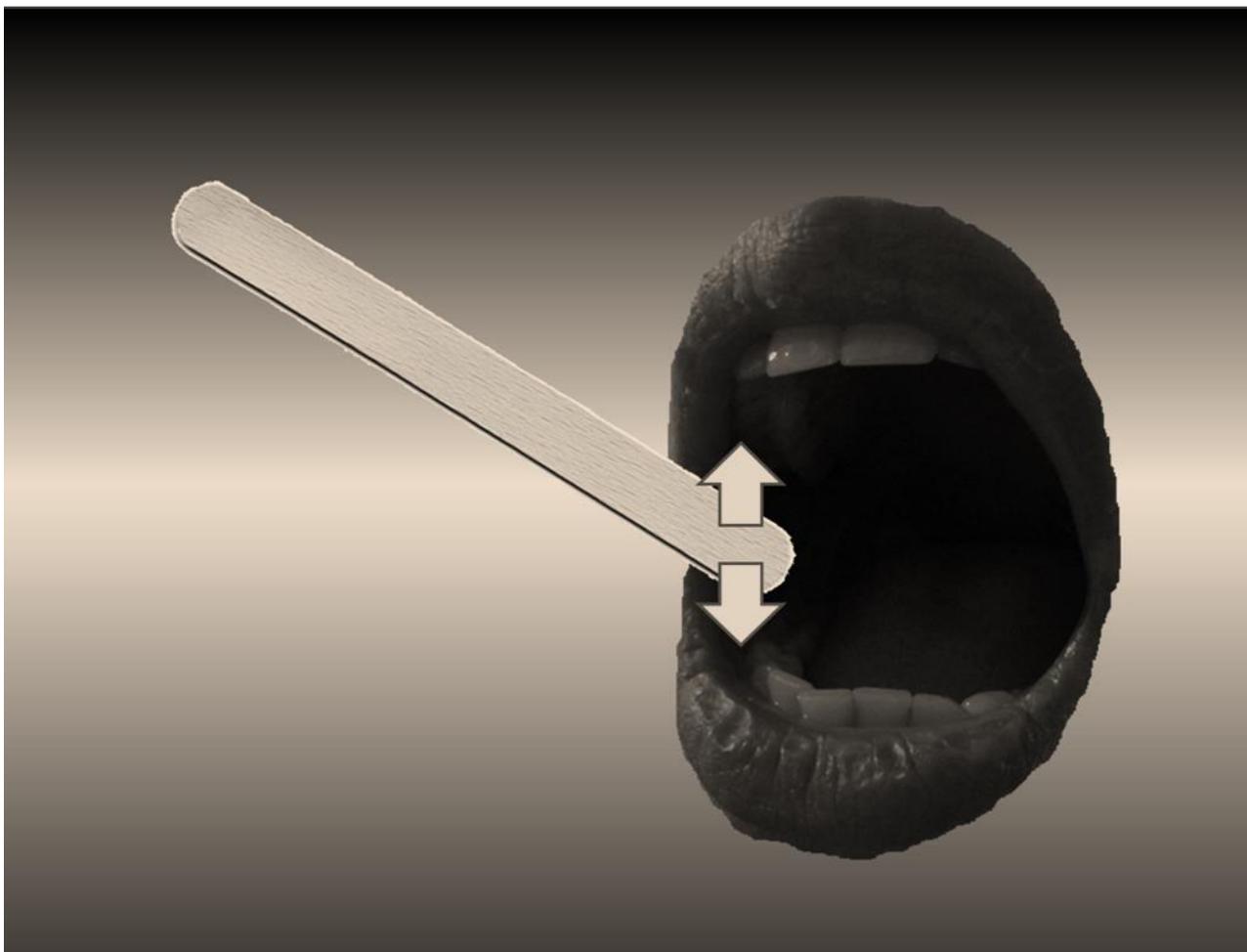


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entnahme eines Mundschleimhautabstriches mit einem Holzspatel an der Wangeninnenseite. Die Repräsentation des Spatels entstammt <http://www.logobeda.de/media/catalog/product/cache/1/image/800x800/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/h/o/holzspatel.jpg>.

3.2 Probanden

Kollektive aus verschiedenen Altersgruppen (verschiedene Geschlechtszusammensetzungen) wurden untersucht. Aus logistischen Gründen konnten allerdings nur von einem Teil der Patienten Angaben zum Rauchverhalten erhoben werden. Zur Kontrolle einer möglichen Altersspezifität einer Mosaik-Trisomie 7 wurden vergleichend eine Gruppe (sehr) alter (Kollektiv A) und eine Gruppe jüngerer gesunder Probanden (Kollektiv B) analysiert.

3.2.1 Kollektiv A (älteres Probandenkollektiv)

Das Kollektiv A bestand aus 39 im Wesentlichen gesunden Probanden im Alter zwischen 75 und 103 Jahren. Das Durchschnittsalter lag hier bei 81,0 Jahren. Es handelte sich um 17 männliche und 22 weibliche Individuen. Zwei Probanden wurden im privaten Umfeld der Doktorandin gefunden, die anderen waren Bewohner eines Altenheims sowie Patienten, die zur Behandlung in die Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes kamen. Bezüglich des Rauchverhaltens waren nur von einem Teil der Probanden Angaben verfügbar. Die eben beschriebene Gruppe setzte sich zusammen aus zwei Rauchern, 25 Nichtrauchern und 12 Probanden mit unbekanntem Rauchverhalten. Wesentliche nicht-alterstypische schwere Grunderkrankungen lagen bei keinem der Probanden vor. Insbesondere waren jeweils keine Erkrankungen im Bereich der Mundhöhle oder Mundschleimhaut bekannt.

3.2.2 Kollektiv B (jüngeres Probandenkollektiv)

Das Kollektiv B umfasste eine Gruppe von 24 gesunden jüngeren Probanden zwischen 25 und 56 Jahren mit einem durchschnittlichen Alter von 38,7 Jahren. Dabei handelte es sich um Mitarbeiter des Universitätsklinikums des Saarlandes. Es handelte sich um 10 männliche und 14 weibliche Individuen. Davon waren 20 Nichtraucher und 4 Raucher.

Bei keinem der in Kollektiv A oder B untersuchten Probanden lag eine bekannte Erkrankung der Mundhöhle vor. Typische im Alter häufig vorkommende Erkrankungen, wie Arthrose, Diabetes mellitus oder Hypertonie gingen nicht mit in die Untersuchungen ein. Eine elaborierte und auf das Einwirken von karzinogenen Substanzen bezogene Berufsanamnese konnte nur in einem Teil der Fällen erhoben werden und konnte daher nicht in die Studie mit einbezogen werden.

Die Kollektive A und B wurden bezüglich Mosaik-Trisomie 7 (Chromosom 7-spezifische FISH-Analyse mit Chromosom 10-Kontrollsonde) untersucht. Die zusätzliche Untersuchung bezüglich fraglicher Mosaik-Trisomie 8 (Chromosom 8-spezifische-FISH-Analyse mit Chromosom 12-Kontrollsonde) wurde lediglich im Kollektiv B der jüngeren Probanden durchgeführt. Grund hierfür war die bei Kollektiv A deutlich eingeschränkte Zellausbeute bei der Erstellung der

Mundschleimhautabstriche und die fehlende Möglichkeit zur Nacherfassung der Probanden.

3.3 Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Methode der In situ- Hybridisierung von Nukleinsäuren wurde von Pardue und Gall 1969⁷⁹ und unabhängig davon, im selben Jahr von John et al. entwickelt⁴⁸.

Zuvor erlaubte das Lichtmikroskop bereits einen Überblick über das chromosomale Genom. Mit der konventionellen zytogenetischen Analyse sind sowohl numerische als auch strukturelle Chromosomenaberrationen erfassbar. Allerdings ist diese Analyse auch mit der höchsten Auflösung auf strukturelle Veränderungen von einer Ausdehnung oberhalb 20 Millionen Basenpaare limitiert. Zudem ist die klassische oder konventionelle Zytogenetik nur an vitalen d.h. kultivierten Zellen möglich. Eine Aussage auf der DNA Sequenz-Ebene ist hiermit nicht möglich.

Die DNA des Menschen ist doppelsträngig und besteht aus zwei zueinander komplementären Nukleotidsträngen, die aus sterischen Gründen umeinander gewunden eine helicale Form ergeben. Die kleinste Einheit eines Nukleotidstranges, das sogenannte Mononukleotid, besteht aus einem Monosaccharid, der Ribose, einer Base und einem Phosphatrest⁵⁵. Es binden immer zwei zueinander komplementäre Basen über Wasserstoffbrücken. Im Zellkern liegt die DNA in kondensierter Form vor. Sie ist dort mit Histonproteinen assoziiert und in Form der Chromosomen organisiert. Während der Replikation und Transkription muß sich diese Struktur auflösen.

Die In situ-Hybridisierung erlaubt als Mittler zwischen Molekular- und Zytogenetik den Nachweis und die Lokalisierung bestimmter DNA- oder RNA- Sequenzen direkt, d.h. in situ, am Ort ihres Vorkommens am Chromosom, am intakten Zellkern, in ganzen Zellen sowie an Zellen im Gewebeverband. Nachdem anfänglich radioaktive Markierungen verwandt wurden, etablierte sich im Weiteren die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) als inzwischen gebräuchlichste Anwendungsform⁵⁸. Die Vorteile von fluoreszenter Markierung gegenüber der radioaktiven sind bei gleicher Sensitivität zum Beispiel die Geschwindigkeit der mikroskopischen Analyse, die Sicherheit bezüglich des Strahlenrisikos, die verringerte Hybridisierungszeit und die einfachere Handhabung.

Die FISH dient dem Nachweis von Basensequenzen mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe. Es kann auch die Anwesenheit bakterieller oder viraler DNA oder RNA überprüft werden. Der wesentliche Vorteil der FISH entgegen molekulargenetischer Analysen ist, daß sie an nativer Nukleinsäure in Chromosomen, Zellkernen und Geweben im morphologischen Kontext angewendet werden kann, so daß Einzelzellanalysen, Aussagen zur Lokalisation und morphologische Assoziationen möglich sind.

Es ist ein qualitativer sowie quantitativer Nachweis möglich. Im qualitativen Nachweis erfolgt die Darstellung und Lokalisierung von Sequenzen auf der Grundlage ihrer molekularen Sequenz. Mittels der FISH können DNA Sequenzen von > 1000 Basenpaaren identifiziert werden. Im quantitativen Nachweis läßt sich feststellen, wie häufig eine gesuchte Sequenz vorhanden ist. Für diesen Nachweis wird DNA im Untersuchungsmaterial zunächst denaturiert und dann im Einzelstrangzustand mit einer spezifisch hergestellten komplementären DNA, einer sogenannten Sonden-DNA, hybridisiert.

Je nach Fragestellung können unterschiedliche Sondentypen verwendet werden (z.B. single copy-Sonden, genspezifische Sonden, Zentromer-Sonden, whole-chromosome sog. painting-Sonden). Mit den whole chromosome painting (wcp) Sonden können Markierungen eines ganzen Chromosoms durchgeführt werden. Diese Technik wird bei der Darstellung von Translokationen eingesetzt. Die Chromosomen-Arm-spezifischen painting-Sonden dienen dem Auffinden kleinerer struktureller Auffälligkeiten. Weiterhin zu nennen sind die Single copy-Sonden, die mit einzelnen, nicht repetitiven DNA Abschnitten reagieren. Mit ihnen kann ein Gewinn oder Verlust einzelner Sequenzen bzw. Gene, die chromosomale Lokalisation einer Sequenz oder eines Gens oder auch eine Translokation erfaßt werden.

Für die numerische Analyse von Chromosomen ist die FISH-Analyse mit Zentromersonden besonders geeignet. Dabei wird eine künstlich hergestellte DNA benützt, die zu repetitiven chromosomenspezifischen Sequenzen in Zentromernähe komplementär ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden perizentromerische Repeat-DNA-Sonden, kurz Zentromersonden, für die Chromosome 7, 8, 10 und 12 verwendet.

Zentromerische DNA Repeats sind weitgehend chromosomenspezifisch; allerdings bestehen z.T. relativ hohe Homologien zwischen Zentromerrepeats verschiedener

Chromosomen. Aufgrund der relativ hohen Anzahl, in welcher entsprechende Zentromer-Repeats vorkommen, sind i.d.R. selbst bei suboptimalen Bedingungen kräftige und somit eindeutige Hybridisierungssignale zu erzielen. Da zentromernahe Repeats auch im Interphasekern weitgehend kondensiert vorliegen, sind entsprechende Signale typischerweise klar und distinkt, was eine numerische Auswertung am Interphasekern erleichtert.

Um die Hybridisierung durchzuführen, ist es erforderlich, die Untersuchungs-DNA und die Sonden-DNA zu denaturieren. Dazu werden beide mittels thermischer und chemischer Verfahren in Einzelstränge gespalten. Um Kreuzhybridisierungen und unspezifische Bindungen zu reduzieren, verwendet man erarbeitete Stringenzbedingungen bei der Zusammensetzung des Hybridisierungsgemisches und den Posthybridisierungs-waschungen. Zu der Hybridisierungssonde kann weiterhin Blockungs-DNA zugesetzt werden.

Um die Hybridisierung nachweisen zu können ist eine Markierung der Sonden-DNA erforderlich. Grundsätzlich kann eine direkte oder indirekte Sondenmarkierung verwendet werden. Bei direkter Markierung werden in das Sondenmolekül einzelne Fluorochrom-markierte Nukleotide eingebaut. Bei indirekter Markierung trägt das Sondenmolekül einzelne mit einem Reporter-Molekül (z.B. Biotin, z.B. Digoxigenin) markierte Nukleotide; das Reportermolekül muß hier im Anschluß an die Hybridisierung durch gezielte z.B. immunologische Nachweis-Verfahren mit Fluorochrom-markierten Nachweismolekülen detektiert werden. Zur eindeutigen Zuordnung der FISH-Signale ist eine DNA-Gegenfärbung mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (z.B. DAPI oder Propidiumiodid) erforderlich.

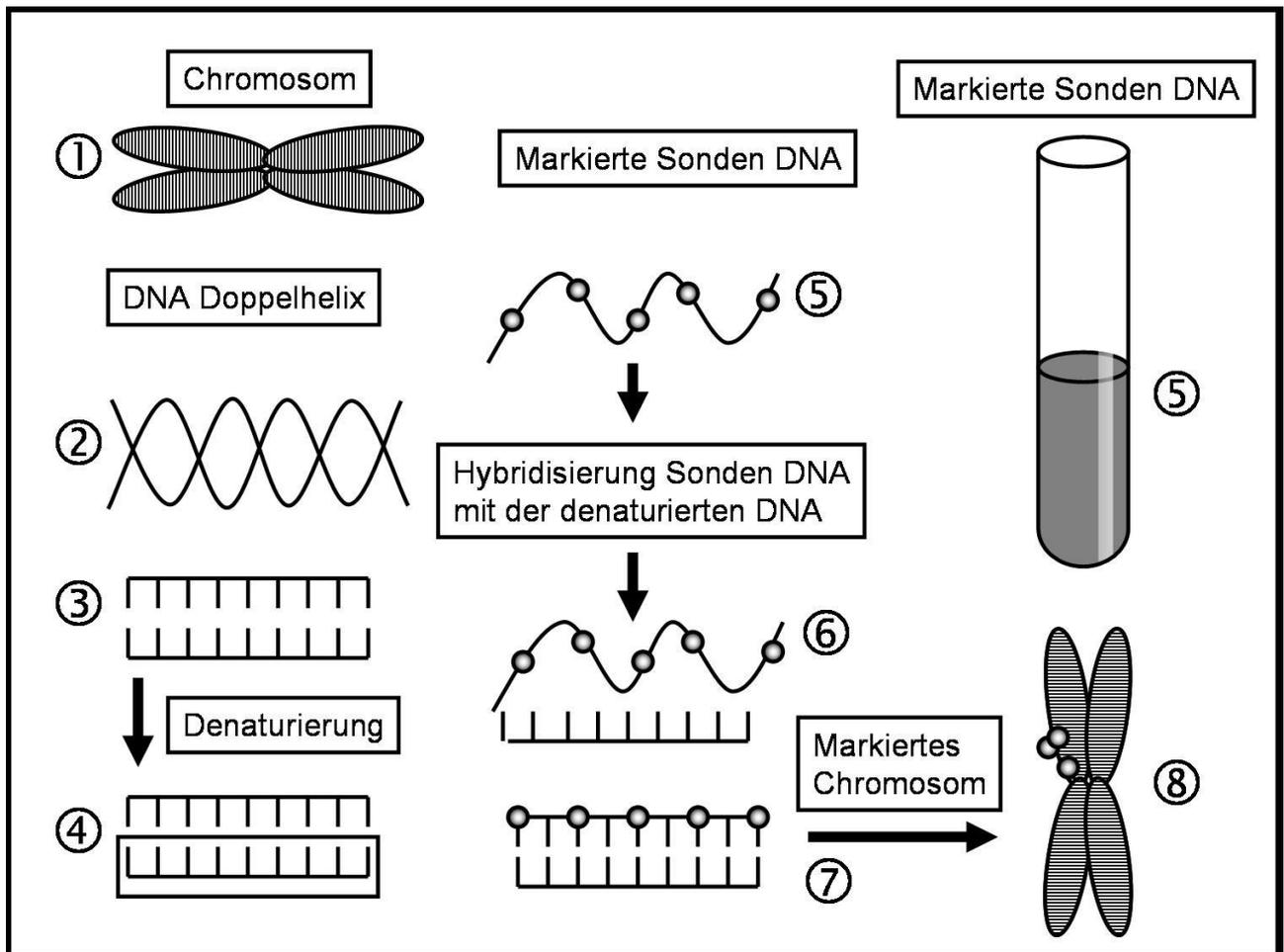


Abbildung 2: ① Chromosom, ② Doppelhelix im Entspiralisierungsprozeß, ③ völlig entspiralisierte DNA, ④ Denaturierung, das heißt Aufspaltung in zwei Doppelstränge, ⑤ markierte denaturierte Sonden DNA, ⑥ markierte denaturierte Sonden DNA mit Ziel DNA, ⑦ Sonden DNA und Ziel DNA haben sich entsprechend der komplementären Basenpaare hybridisiert, ⑧ markiertes Chromosom

Die Auswertung der FISH erfolgt am Fluoreszenzmikroskop. Je nach eingesetzten Fluorochromen werden verschiedene selektive Bandpassfilter eingesetzt. Die Abbildung 3 zeigt einen normalen Zellekern mit jeweils zwei Signalen für zwei beliebige homologe Chromosomen, zwei grüne Signale und zwei rote Signale.

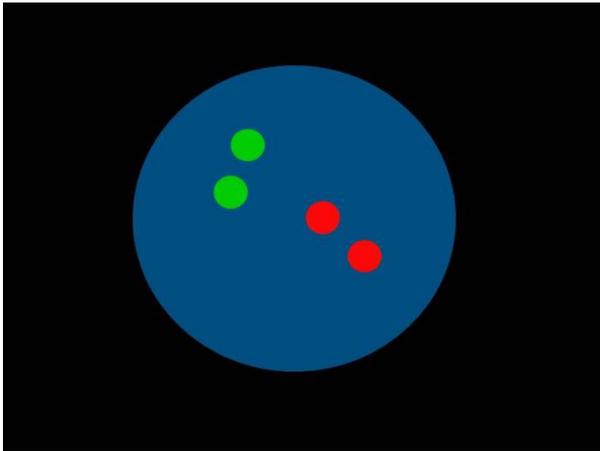


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Chromosom Dual-Color-FISH mit differenziell markierten alpha-Satellit-DNA-Sonden. Darstellung eines Zellkerns mit jeweils zwei Zentromersignalen für je zwei homologe Chromosomen, zwei rote Signale und zwei grüne Signale (Bildtafel Abbildung 15).

3.4 Kontrollchromosomen für die FISH-Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurden neben Sonden für die Chromosomen 7 auch Sonden bzw. als Kontrolle eingesetzte Sonden für die Chromosome 8, 10 und 12 eingesetzt. Dies diente der Überprüfung der Hybridisierungsqualität (Hybridisierungseffizienz) genauso wie der Bedeutungszumessung des Ergebnisses. Für Chromosom 8 sind ähnlich wie für Chromosom 7 somatische Mosaik-Trisomien in unterschiedlichen z.T. krankheitsassoziiert analysierten Geweben beschrieben.

Im Gegensatz zu den Chromosomen 7 und 8 sind die Chromosomen 10 und 12 - beide ebenfalls ähnlich große Chromosomen der C-Gruppe - vergleichsweise selten und wenn, dann beschränkt auf maligne Tumorerkrankungen in somatische numerische Aberrationen involviert. Numerische Aberrationen von Chromosom 10 und 12 aus nicht tumorösen oder gar normalen Gewebezellen sind dagegen nicht als wiederkehrendes häufiges Phänomen bekannt. Aus diesem Grund wurden diese beiden Chromosomen als methodische interne Kontrollen für die Chromosom 7- bzw. Chromosom 8-FISH-Analyse herangezogen.

3.4.1 Das Chromosom 8, Heraushebung bestimmter Gene, Vorkommen von Trisomien

Das Chromosom 8 besteht aus über 145 Millionen Basenpaaren und beinhaltet zwischen 700 und 1000 Genen⁷⁷.

Analog zum Chromosom 7 sind auch auf dem Chromosom 8 viele das Wachstum fördernde oder modulierende Faktoren zu finden.

Der FGFR 1, der fibroblast growth factor rezeptor 1, ist ein Rezeptor, der den fibroblast growth factor, einen Wachstumsfaktor bindet und dessen Gen auf dem Chromosom 8 lokalisiert⁵².

Angiopoietin ist ein Wachstumsfaktor für Gefäße, hierbei gibt es einen Agonisten, das Angiopoietin 1 und den Antagonisten, das Angiopoietin 2. Der Genlocus für das Angiopoietin - Gen 1 und 2 ist in der Region 8q22 bis 8q23.1^{23,56}.

Anders als für Chromosom 7, 10 und 12 sind für Chromosom 8 auch Fälle von konstitutioneller Mosaik-Trisomie 8 beschrieben. Diese Chromosomenkonstitution ist mit dem Namen Warkany-Syndrom als eigenes syndromales Krankheitsbild bekannt. Zu den Symptomen zählen neben fazialen Dysmorphien unter anderem Minderbegabung bzw. geistige Behinderung, Makrosomie, Gelenkkontrakturen, fehlende oder dysplastische Patella und ein enges Becken^{73,82}.

Ansonsten wird eine Mosaik-Trisomie 8 überwiegend bei malignen Tumoren wie z.B. dem Burkitt-Lymphom, der Chronisch lymphatischen Leukämie CLL⁵⁹ soliden Tumoren wie dem Prostatakarzinom⁷¹ oder Brustkrebs¹⁸ beschrieben.

Im pleomorphen Adenom als benigner Tumorerkrankung wurde ein häufiges Vorkommen einer Mosaiktrisomie 8 beschrieben⁶⁶. Hierbei handelt es sich um einen gutartigen Tumor der Speicheldrüsen.

Auch in fibroblastoiden Zellen bei gutartigen Läsionen wie z.B. der Dupuytrenscher Kontraktur oder in rheumatisch veränderter Synovia wurden neben Zellen mit Trisomie 7 auch das Vorkommen von Mosaik-Trisomie 8 beschrieben^{29,99}.

3.4.2 Das Chromosom 10, Heraushebung bestimmter Gene, Vorkommen von Trisomien

Das Chromosom 10 enthält etwa 135 Millionen Basenpaare und damit etwa 4% der menschlichen DNA.

Der Fibroblast growth factor 8 ist ein Wachstumsfaktor aus der großen Familie der FGFs. Das ihn kodierende Gen liegt auf Chromosom 10 in der Region 10q24⁸⁰. Der Fibroblast growth factor 8 fördert das Wachstum von Brustkrebszellen indem er den Zellzyklus stimuliert und gegen den Zelltod schützt⁷⁶.

Das Fibroblast Growth Factor Receptor Gen 2 liegt ebenfalls auf dem Chromosom 10 in der Region 10q26³⁰ und ist im Falle einer Mutation für das Apert-Syndrom verantwortlich⁷

Eine konstitutionelle Trisomie 10 ist nicht mit dem Leben vereinbar; eine konstitutionelle Mosaik-Trisomie 10 ist bei lebendgeborenen Kindern äußerst selten⁴⁵ und geht mit schweren Fehlbildung einher.

Eine somatische Mosaik-Trisomie 10 wird selten bei der akuten Form der myeloischen Leukämie⁹⁸ und in Nierenkarzinomen gefunden²⁸.

3.4.3 Das Chromosom 12, Heraushebung bestimmter Gene, Vorkommen von Trisomien

Das Chromosom 12 gehört wie Chromosom 7, 8 und 10 zur Gruppe C, den mittelgroßen metazentrischen und submetazentrischen Chromosomen. Es besteht aus 132 Millionen Basenpaaren und trägt zwischen 1200 und 1400 Gene⁸⁷

In der Literatur werden mindestens 27 Fälle eines vorgeburtlichen Nachweises eines Trisomie 12-Mosaiks beschrieben. 13 Schwangerschaften wurden abgebrochen, davon zeigten zwei Embryos mehrere Anomalien. Von den 12 Lebendgeborenen waren sieben völlig gesund und fünf zeigten Auffälligkeiten⁹¹ u.a. wurden bei konstitutionellem Trisomie 12-Mosaik Dysmorphien und Wachstumsretardierungen beschrieben¹³.

An Wachstumsfaktoren liegt das Insulin-like growth factor 1 (IGF 1) Gen in etwa in der Region 12q23⁷⁴, es handelt sich um einen starken Wachstumsfaktor, der hauptsächlich in der Leber produziert wird. In Vitro und im Tiermodell schien ein Zusatz des IGF 1 in der Behandlung regionaler Knorpeldefekte und der Osteoarthritis⁴⁰ von Vorteil zu sein.

Eine somatische Trisomie 12 ist als tumorassoziierte Veränderung bei chronisch myeloischer Leukämie beschrieben⁴.

Die im Folgenden beschriebenen methodischen Ansätze wurden für die Chromosomen 7, 8, 10 und 12 in jeweils gleichartiger Weise durchgeführt. Aus diesem Grund wird die entsprechende Beschreibung hierfür zusammengefaßt. Dort, wo sich Abweichungen von der allgemeinen Schilderung ergeben, werden diese gesondert aufgeführt.

3.5 FISH-Sonden

3.5.1 Sondenherstellung

Es wurden nicht kommerziell hergestellte α -Satellit-DNA-Sonden verwendet. Die Chromosomenspezifität der Sonde wurde an Metaphasepräparationen von Lymphozyten überprüft (siehe Anhang Abbildungsnachweis Abbildung 22 und 23). Die chromosomenspezifische α -Satellit-DNA war in Plasmidvektoren inkloniert. Und wurde über bakterielle Plasmidvermehrung und anschließende Plasmidextraktion gewonnen und nachfolgend als Sonde mittels Nicktranslation markiert.

Um die Kultur anzusetzen wurde ein Nährmedium hergestellt, indem LB Medium Tabletten (L-7275500 Sigma ®) à 1,1 g in 50 ml A. dest. aufgelöst und autoklaviert wurden.

In einem sterilen Gefäß wird die Vorkultur hergestellt, indem man 5 ml autoklaviertes LB Medium, 3 μ l Bakterienstocklösung (plasmidvektorhaltige Bakterien) und 25 μ l Ampicillinstocklösung (c = 10 mg/ml) ansetzt und bei 37 °C und ca. 200 U/min mindestens acht Stunden inkubiert. Im Anschluß wurde die Vorkultur in 175 ml LB-Medium mit 875 μ l Ampicillinstocklösung überführt und über Nacht bei 37 °C auf dem Rüttler inkubiert.

Die Präparation der Plasmide wurde wie folgt mit dem Plasmid Kit Mini (25) Qiagen® durchgeführt.

Die Bakterienkultur wurde bei 4 °C und 6000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Pellet wurde in 10 ml Puffer 1 (RNAse Resuspensionspuffer) aufgelöst, mit dem Vortex-Gerät aufgemischt und mit steriler Pipette in ein 50 ml-Falcon-Gefäß gefüllt.

Dann wurden 10 ml Puffer 2 (Lysis SDS Puffer) zugefügt und 5 Min. bei RT inkubiert, dann wurde mit 10 ml Puffer P3 (Neutralisationspuffer) neutralisiert.

Die Qiagen-Säule wurde mit 10 ml QBT Puffer (Equilibrationspuffer) equilibriert. Das aufgelöste Pellet wurde in einer Spritze aufgenommen und über der Säule platziert. Nach 10 Min. war der Inhalt der Spritze entleert. In diesem Zusammenhang wurde die Arbeitshypothese vertreten, daß die ausgefällten Bakterienrückstände in der Spritze und die DNA in der Filter-Säule verbleiben würden. Der Vorgang kann mit QC Puffer (Waschpuffer) wiederholt werden.

Zum Lösen der DNA aus dem Filter wurde die Säule auf ein neues Falcon-Gefäß platziert und mit 15 ml QF Puffer (Lösungspuffer) versetzt. Die DNA-Fällung erfolgte mit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Isopropanol. 10,5 ml Isopropanol wurden zugesetzt und anschließend bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 10000 U/min 30 Min. zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde die DNA mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen, anschließend 10 Min. bei 10000 U/min zentrifugiert und nach Dekantieren des Überstandes luftgetrocknet. Das Pellet wurde in ca. 400 μl A. dest. aufgelöst und die DNA-Konzentration im Photometer bei 260 nm gemessen.

3.5.2 Sondenmarkierung durch Nick Translation

Die nach dem bereits beschriebenen Verfahren gewonnenen Plasmide aus transformierter bakterieller Kultur, wurden für den Einsatz als Sonde durch den Einbau von Reportermolekülen (Biotin und Digoxigenin) indirekt markiert. Diese Markierung der Plasmide erfolgt mittels der sogenannten "Nick Translation", bei der jedes 20. - 25. Nukleotid des DNA-Stranges durch ein markiertes Nukleotid in der neuen doppelsträngigen Plasmid-DNA ersetzt wird. Die Sondenmarkierung erfolgte durch Digoxigenin bzw. Biotin mithilfe des Digoxigenin- bzw. Biotin- Nick-Translations-Kit (Biotin-Nick Translation Mix 1 745 824, Dig-Nick Translation Mix 1 745 816).

Durch DNase I Aktivität erfolgt hier der Einbau des Biotins bzw. Digoxigenins. Dazu werden zufällige Einzelstrangbrüche (sog. „Nicks“) erzeugt, an denen die in Teilkonzentration zugesetzten Hapten markierten Nukleotide durch DNase I komplementär zum bestehenden DNA -Einzelstrang aufgefüllt werden.

Die Erzeugung von Nicks, den Einzelstrangbrüchen, erfolgt durch DNase I bei niedriger Enzymkonzentration. Anschließend synthetisiert die DNA-Polymerase I in 5' 3' Richtung einen neuen DNA Strang unter Verwendung der Hapten markierten Nukleotide. Die Effizienz der Hybridisierung ist abhängig von der Sonden-

Fragmentlänge. Günstig sind Sondenfragmentierungen mit Fragmentlängen von 200 - 500 Nukleotiden. Bei größeren Fragmenten kann die Penetration zur Ziel-DNA erschwert sein. Im Rahmen der Nicktranslation kommt es im Rahmen des Markierungsvorganges zu einer hierfür erwünschten Fragmentierung der Sonden-DNA.

Für den Standardansatz, der zur Markierung von maximal 1 µg DNA in maximal 16 µl A. dest. verwendet wird, werden pro 20 µl Volumen 4 µl Nick Translationsmix Bio/Dig (enthält DNase1 und teil-markiertes Nukleotidgemisch) mit 1 µg Sonden DNA (je nach Plasmidpräparation unterschiedliche DNA-Konzentrationen) in 16 µl A. dest eingesetzt. Der Ansatz wurde bei 15 °C 90 Min. im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wird durch eine Alkohol / Salz-Fällung beendet. Direkt vor der Fällung gibt man zum Blocken 1 µg unmarkierte DNA aus Heringssperma hinzu. Die DNA-Fällung wurde unter Zugabe von 1/10 des Volumens an 3 M Na Acetat (pH 5,2) und 2,2-fachem Volumen an 100% Ethanol (-20 °C) bei -20 °C (>2 Stunden bzw. über Nacht) durchgeführt.

Dann wurde die DNA durch Zentrifugation bei 4 °C und 14000 U/min 30 Min. pelletiert und der Überstand dekantiert. Die DNA wurde mit 70% eiskaltem (-20 °C) Ethanol gewaschen, nochmals bei 4 °C für 5 Min. bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das getrocknete Pellet wurde dann in 50 µl A. dest zu einer Endkonzentration von näherungsweise 20 ng/µl (unter der Annahme der primär eingesetzten 1 µg Sonden-DNA) resuspendiert.

Zur Kohybridisierung zweier Zentromer-Sonden (Chromosom 7 bzw. 8-Sonden in Kombination jeweils mit einer Kontrollsonde für Chromosom 10 bzw. 12) wurden differenziell Biotin- bzw. Digoxigenin- markierte Sonden mittels Nicktanslation hergestellt.

Die Sonden für die Chromosomen 7 und 8 wurden jeweils mit Digoxigenin markiert, die Sonden für die Chromosomen 10 und 12 wurden jeweils mit Biotin markiert.

3.6 FISH-Arbeitsprotokoll

3.6.1 Vorbehandlung der Ausstrichpräparate

Um die Penetration der Sonde in den Zellkern zu erleichtern wurden die Präparate einer proteolytischen Vorbehandlung in 0,005% Pepsin / 0,01 N HCl 25 Min. bei

37 °C unterzogen. Nach einer kurzen Aequilibrierung in 1 x PBS für 5 Min. bei RT erfolgt eine Postfixierung in 0,1% PFA/PBS für 10 Min. bei RT.

Um die noch vorhandenen wässrigen Lösungsrückstände zu entfernen, wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 99%, je 2 Min. bei RT) dehydriert.

3.6.2 DNA-Denaturierung und Hybridisierung

DNA-Denaturierung von Sonden- und Target- DNA:

Die getrockneten OT wurden mit 21 µl Hybridisierungsgemisch (siehe unten) pro OT überschichtet, anschließend durch ein mit einem ablösbaren Fotokleber (Fixogum) versiegeltes Deckglas (20 x 50 mm) abgedeckt. Nach dem Antrocknen des Fotoklebers erfolgte die simultane Denaturierung von Sonden- und Target-DNA für 5 Min. bei 80 °C auf der Heizplatte. In vorangehenden Experimenten hatte sich herausgestellt, daß sich eine simultane Denaturierung vorteilhaft auf die Effizienz der Hybridisierung und die Zellmorphologie auswirkt, sowie unter den gewählten Hybridierungsbedingungen Kreuzhybridisierungen vermindert. Die Anlagerung der Sonde erfolgt in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Wärmeschrank in einem Zeitraum von > 8 Stunden (bis maximal 24 Stunden).

Hybridisierungsgemisch:

Pro Objektträger wurden 21 µl Hybridisierungsgemisch eingesetzt. Das Hybridisierungsgemisch wurde zusammengestellt aus je 2 µl Chromosom 7 bzw. Chromosom 8 α -Satelliten-Sonde (ca. 20 ng/ µl), 2 µl Chromosom 10 bzw. Chromosom 12 α -Satelliten Sonde (ca. 20 ng/µl), 1µl humane cot DNA (1 µg/µl) zum Blocken von Repeatkreuzhybridisierungen und 16 µl Hybridisierungsstockpuffer (Mastermix 2.1: 73% FA/ 1,3 x SSC/ 12% Dextranulphat) verwendet. Damit ergeben sich im Hybridisierungsgemisch folgende Endkonzentrationen: 60% Formamid (FA), 10,5% Dextranulphat, 1,04 x SSC.; die markierten Sonden wurden jeweils in einer Konzentration von ca. 2 ng/µl, die humane cot-DNA war im Hybridisierungsgemisch in einer Konzentration von ca. 50 (47) ng/µl zugesetzte; die bei der DNA-Fällung nach Nick-Translation der Sonde zugesetzte Heringssperma-DNA war im Hybridisierungsgemisch in einer Endkonzentration von 20 ng/ µl enthalten.

Um eine differenzielle Darstellung und Analyse der markierten Chromosomen zu ermöglichen, wurden jeweils differenziell markierte Sonden und Kontrollsonden gemeinsam eingesetzt.

3.6.3 Posthybridisierungswaschung (Stringente Waschung)

Der Fotokleber wird abgezogen und die OT werden zum Lösen der Deckgläser bei RT in 2 x SSC gestellt. Anschließend erfolgt eine stringente Waschung in 50% FA/ 2 x SSC bei 42 °C für 2 x 20 Min. und nachfolgend eine Waschung in 2 x SSC/ 0,1% Tween für 2 x 10 Min. bei 42 °C, um überschüssige und die nicht spezifisch hybridisierte Sondenmoleküle zu entfernen.

3.6.4 Sondendetektion

Die indirekt markierten Sondenmoleküle wurden durch Immunfluoreszenzmarkierung bzw. mit fluorochrom gekoppelten spezifisch bindenden Detektionsreagenzien detektiert.

Zur Verhinderung unspezifischer Proteinanlagerung der Detektionsantikörper bzw.-Reagenzien wurde vor Zugabe der Detektionsreagenzien eine Proteinblockung mit 3% BSA in 4 x SSC durchgeführt. Hierfür wurde jeder OT mit 100 µl 4 x SSC/ 3% BSA-Blockungslösung überschichtet, mit Plastik-Folie abgedeckt und 15 Min. in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Die Detektion von Digoxigenin und Biotin erfolgt gleichzeitig durch kombinierte Zugabe spezifischer Detektionsreagenzien. Für die Detektion von Digoxigenin (Steroid) wurde ein FITC (Fluorescein-isothiocyanat; grüne Fluoreszenz)- gekoppelter Anti-Digoxigenin Antikörper (Schaf-anti-digoxigenin/FITC) mit einer Endkonzentration von 5 µg/ml verwendet. Für die Detektion der Biotin (Vitamin B1)-Markierung wurde das ebenso spezifisch bindende Protein Avidin mit TexasRed (Sulforhodamin, rote Fluoreszenz) -Konjugierung in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml in 4 x SSC/ 1% BSA eingesetzt. Dazu wurden auf jedes Präparat 60 µl Detektionsgemisch aufgetragen, mit Folie abgedeckt und in einer feuchten Kammer unter Lichtschutz bei 37 °C eine Stunde im Wärmeschrank inkubiert.

Anschließend erfolgte eine dreifache Waschung in 4 x SSC/ 0,1% Tween bei 37 °C für jeweils 5 Min. zur Ablösung des nicht gebundenen Detektionsgemisches. Nach

einer einfachen Waschung von 1 Min. in A. dest. bei RT zur Entfernung von Salzurückständen erfolgt die DNA-Gegenfärbung mit DAPI. Dazu wurde die OT unter Lichtschutz luftgetrocknet und dann mit je 35 µl DAPI/Antifade Fluoreszenz-Eindeckmedium bei einer Konzentration von 1,1 µg DAPI pro ml Antifade (Vectashield, kommerzielles Eindeckmedium zur Vermeidung von vorzeitiger Fluoreszenzabblassung) eingedeckt und mindestens 30 Min. bei 4 °C bis zur Auswertung aufbewahrt. DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol, ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an DNA bindet und bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau fluoresziert. Es diente hier zur Markierung der Zellkerne.

3.7 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Die Auswertung der FISH erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Olympus Provis AX70). Die sondenmarkierten perizentromerischen Chromosomenregionen (zentromerische Repeats) kommen als distinkte meist punktförmige Fluoreszenz-Signale zur Darstellung. Die Chromosomen 7, bzw. Chromosom 8- Zentromersignale waren gemäß der FITC-Detektion im grünen Fluoreszenzspektrum (Filter 39484 U-T41001 FITC/EGFP/Bodipy/Fluo 3/Dio: U-HQ480/40x (339020), U-Q505LP, U-HQ535/50m), die Signale der Chromosomen 10 (bzw. 12) gemäß der Texas-Red-Detektion im roten Fluoreszenzspektrum (Filter 39497 U-T41021 Cy3.5: U-HQ565/30x (339071), U-Q585LP, U-HQ620/60m (339031)) zu beobachten. Die DAPI-Markierung der Zellkerne war im blauen Fluoreszenzspektrum (Filter 39588 U-T31000 DAPI/Hoechst/AMCA: U-D350/50x (339201), 400DCLP, U-D460/50m) zu sehen. Es wurden pro Fall mindestens 200 intakte Zellkerne ausgewertet.

Für die Analyse der FISH wurden klare Bewertungs- bzw. Ausschluß-Kriterien definiert. In die Analyse einbezogen wurden lediglich intakte, nicht überlappende und nicht fragmentierte Kerne. Da die Chromosomen im Rahmen der FISH-Darstellung nur indirekt sichtbar sind, kann es zu Fehlinterpretationen durch uneindeutige Signalebewertung kommen. Auch bei intaktem Zellkern, kann es durch Überlagerung von Signalen in der Blickachse zu scheinbarem Signalverlust kommen. Bei Zellen, die die S-Phase durchlaufen haben kann es zu gedoppelten Signalen (sog. split spots) kommen, die hier die bereits verdoppelten Chromatiden eines einzelnen Chromosoms darstellen. Klare Bewertungsindikatoren für ein solches split-spot-

Phänomen sind sichtbare feinfädige Verbindungen zwischen den beiden z.T. weiter getrennt liegende Signalteilen; weiterhin hinweisend kann eine etwa halbierte Größe der beiden gedoppelten Signalkomponenten und das Auftreten von split-spot-Konstellation in allen markierten Kernsignalen sein. Eine Abgrenzung eines unspezifischen Autofluoreszenz-Spots von einem spezifischen FISH-Signal kann schwierig sein; häufig ist hier allerdings eine Fluoreszenz auch in erweitertem Wellenlängenspektrum vorhanden, weshalb die Autofluoreszenz als unspezifisch auch in anderen Filtern zur Darstellung kommt. Ein in mehreren nicht Markierungsspezifischen Farbfiltern fluoreszierendes Signal wurde von der Bewertung ausgeschlossen.

Bei einem, die Chromosomenzahl betreffend unauffälligen Zellkern, sieht man zwei grüne Signale für das Chromosom 7 oder 8 zwei rote Signale für das Chromosom 10 oder 12 (siehe Abbildung 4 Anhang Bildtafel).

Abbildung 3 (s.o.), sowie die Abbildungen 4 – 9 (Anhang Bildtafel) zeigen in schematisch idealisierter Darstellung typische FISH- Befunde an Einzelzellen. Sie entsprechen den realen digitalen Bildern im Bildanhang. Wichtig ist hierzu, daß die Zellkerne real eine dreidimensionale Ausdehnung haben, welche in der schematischen Darstellung ebenso wie in der digitalen Photographie einer fokussierten Bildebene nicht zur Darstellung kommt.

Bei der Interphase-FISH-Analyse bezüglich numerischer Chromosomenanomalien handelt es sich um eine indirekte Nachweis-Methode, da hier die Chromosomen nicht direkt sichtbar sind, sondern nur mittels der FISH Methode die Zentrome angefärbt werden. Bei der Bewertung der FISH-Ergebnisse wurde bezüglich Zellen mit erhöhter Anzahl von FISH-Signalen ein cut off level eingeführt, oberhalb dessen eine tatsächliche Trisomie 7 angenommen werden kann. Dies war daher erforderlich, da bei der indirekten Analyse der Chromosomenzahl anhand der FISH-Signale methodisch bedingt eine geringe Fehlerwahrscheinlichkeit für falsch-negative wie auch in geringem Maße falsch-positive Ergebnisse besteht. Die Festsetzung eines cut off levels ist erforderlich, da keine andere Möglichkeit der Überprüfung der Werte und zum Ausschluß methodischer Fehler besteht.

Für intakte Lymphozytenkerne wurden für die FISH mit Zentromer-Sonden entsprechende Cut-off-Level ermittelt. Zum Beleg einer Trisomie wurden hier

Prozentwerte auffälliger Zellen von $> 2\%$ als sinnvoll betrachtet und stellen für die FISH an Lymphozytenkernen einen gängigen Standard dar. Da für Zellen der Mundschleimhaut entsprechende cut-off-Level nicht vorliegen (und mangels parallel durchführbarer Metaphase-Analyse wohl schwer ermittelbar sind), wurden die cut-off-Werte der Lymphozyten-FISH in der vorliegenden Studie auch für die FISH-Analyse an Zellen der Mundschleimhaut übernommen. Demnach wurde als Mosaik-Trisomie lediglich ein Anteil von drei-signaltragenden Zellen von $> 2\%$ gewertet.

Meistens ist der cut off level ein empirisch festgelegter Wert. Der cut off level hängt von der Prävalenz des untersuchten Merkmals und der Verteilung der Werte in der gesunden und kranken Population ab. Er sollte einen möglichst hohen positiven prädiktiven Wert haben und einen möglichst niedrigen falsch positiven Wert. Fehlermöglichkeiten liegen in Unter- oder Überbewertung des Merkmals (Signale falsch positiv / falsch negativ), die methodisch bedingt sind, zum Beispiel in der Effizienz der Hybridisierung oder falscher Interpretation von split spot Signalen.

Nicht gezählt wurden Kerne ohne Signale oder mit nur einer Signalfarbe (siehe Abbildung 5 Anhang Bildtafel), da hier von einer unzureichenden Hybridisierung ausgegangen werden muß. Sich überlappende Chromosomensignale, fragmentierte Kerne (Abbildung 7 Anhang Bildtafel), überlappende Kerne sowie mechanisch zerstörte Kerne wurden ebenfalls nicht ausgewertet.

Bei der Hybridisierung von Kernen, welche die S-Phase durchlaufen haben, kann es zum sogenannten Phänomen eines „split spot“-Signals kommen. Hierbei handelt es sich um gedoppelte Signale, die den Signalen der gedoppelten Chromatiden eines Chromosoms entsprechen und dadurch nicht als einzelnes Signal, sondern als durch einen „Faden“ verbunden erscheinen. Ein nach oben genannten Kriterien als split-spot zugeordnetes Signal-Doppel wurde als ein Signal gewertet (siehe Abbildung 6 Anhang Bildtafel).

3.8 Statistische Auswertung

Die ermittelte Anzahl der Fälle mit nachgewiesener Mosaik-Trisomie 7 ebenso wie die prozentualen Anteile einer belegten Mosaik-Trisomie 7 wurden innerhalb der jeweils untersuchten Kollektive sowie vergleichend zwischen beiden

Untersuchungskollektiven bezogen auf die jeweilige Fragestellung ins Verhältnis gesetzt.

Zur Überprüfung der Zusammenhänge zwischen dem Auftreten einer Trisomie 7, dem Alter (siehe Tabelle 7.0) und dem Geschlecht (siehe Tabelle 5.0 und 6.0) der Probanden wurde ein Chi-Quadrat-Test nach Fisher durchgeführt.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnten Mundschleimhautabstriche eines Kollektivs von insgesamt 63 Probanden, die nach Lebensalter in die zwei Hauptgruppen A (n = 39) und B (n = 24) unterteilt wurden, bezüglich des Vorkommens einer Mosaik-Trisomie 7 untersucht werden. Zum Vergleich wurde auch die Chromosomen 10 bzw. im Kollektiv B auch die Chromosomen 8 und 12 ausgezählt.

4.1 Ergebnisse der Chromosom 7/10-FISH für das Kollektiv A

Als „relevante“ Mosaik-Trisomie 7 bezeichnet wurden FISH-Befunde mit einer Anzahl drei-Signal-tragender Zellen oberhalb des zugrundegelegten FISH-cut-off-levels von 2% (siehe Methodenteil). In der Gesamtheit der 39 Probanden zeigten 11 von 39 (~ 28%) eine relevante Mosaik-Trisomie 7 in unterschiedlich starker Ausprägung, wobei die ermittelten prozentualen Werte 7-trisomer Zellen zwischen 2,5 und 20% variierten. Der durchschnittliche prozentuale Anteil 7-trisomer Zellen lag hier bei 5,8%, die Schwankungsbereich bei 5,24% (siehe Anhang Tabelle 1.0). In 28 von 39 Fällen (knapp 72%) wurde mittels FISH keine Mosaik-Trisomie 7 gesichert. Eine Mosaik-Trisomie des Chromosoms 10 konnte bei keinem der untersuchten Probanden des Kollektivs A nachgewiesen werden.

Unter den Trisomie-7-positiven Fällen zeigte sich eine relativ inhomogene Situation, wobei drei Probanden mit deutlich hohen Trisomie 7-Raten auffielen.

Aufgrund der großen Verteilungsbreite der ermittelten Trisomie 7-Raten erschien eine Subklassifizierung der Fälle sinnvoll. Es wurden nun drei Gruppen etabliert entsprechend Fällen ohne belegte Mosaik-Trisomie 7 (Werte unterhalb des cut-off-levels von $\leq 2\%$) = Gruppe 1, Fälle mit einer Mosaik-Trisomie 7 mit niedrigem prozentualen Anteil von $\leq 5\%$ = Gruppe 2 und Fälle mit auffällig hohen Werten einer Mosaik-Trisomie 7 $> 5\%$ = Gruppe 3 (siehe Abbildung 10).

Die **Gruppe 1**, umfaßt die Fälle unterhalb des cut off levels, das heißt mit negativem Befund. Auch wenn der cut off level eine angenommene Größe ist und diese Gruppe in die Wertung nicht einging, wurden die Ergebnisse doch individuell betrachtet. Die entsprechenden Probanden hatten in der FISH-Analyse unauffällige

Signalkonstellationen für Chromosom 7 entsprechend einer durchgängig disomen Konstellation. Diese Gruppe ist mit 28 Fällen (~ 72% der Probanden) die größte. Durchschnittlich zeigten 0,66% der untersuchten Zellen 3 FISH-Signale für Chromosom 7 (Standardabweichung 0,77% und Schwankungsbereich 0 bis 2%; siehe Anhang Tabelle 1.1). Bemerkenswert ist, dass bei 12 Probanden der Gruppe 1 in keinem der analysierten Kerne eine über 2% erhöhte Signalzahl für Chromosom 7 gefunden wurde. Das entspricht 30,7% des gesamten Kollektivs A. Die jüngste Probandin mit 75 Jahren hatte eine Rate von Zellen mit 3 Chromosom 7-Signalen von 1,0%, die älteste Probandin mit 103 Jahren von 1,5% bezüglich des Chromosom 7. In dieser Gruppe befanden sich zwei Raucher (2/28 entspricht ca. 8%). Die Gruppe 1 wurde im Gesamtbefund nur erwähnt; die hier dokumentierten „Trisomie-Raten“ wurden nicht als tatsächliche Mosaik-Trisomie-Befunde bewertet.

Bei **Gruppe 2**, handelt es sich um den low level Bereich der Mosaik-Trisomie 7 mit prozentualen Werten oberhalb des cut-off-levels (< 2% bis zu 5%). Es wurden 8 Fälle (~ 20% der Probanden) der Gruppe 2 zugeordnet. Durchschnittlich zeigten hier 3,3% der Zellen eine Mosaik-Trisomie 7 (Standardabweichung 0,59 und Schwankungsbereich 2,5 bis 4%; siehe Anhang Tabelle 1.2). Bei den Individuen handelt es sich tendenziell um relativ jüngere Individuen des Kollektivs A mit einem Durchschnittsalter von 79,6 Jahren im Vergleich zum Gesamtdurchschnittsalter des Kollektivs A von 81,2 Jahren. In dieser Gruppe befanden sich keine Raucher.

In der **Gruppe 3**, wurden die Fälle mit einem Mosaik-Trisomie 7-Anteil > 5% erfaßt. Es handelte sich um drei Probanden (~ 8% des Gesamtkollektivs A) mit durchschnittlich 12,5% trisomen Zellen für das Chromosom 7 (Standardabweichung 6,6%). Der Schwankungsbereich lag zwischen 7,5% und 20% (siehe Anhang Tabelle 1.3). Der jüngste der drei Probanden zeigte hier mit 78 Jahren den niedrigsten Trisomie-7-Wert von 7,5%, während die zwei älteren Probanden mit jeweils 89 Jahren 10% bzw. 20% 7-trisomer Zellen in der FISH-Analyse aufwiesen. In der Gruppe 3 befanden sich keine Raucher.

Im Kollektiv A konnte zusammenfassend ein regelhaftes Auftreten einer Mosaik-Trisomie 7 nicht beobachtet werden, wohl aber unterscheiden sich einzelne Individuen erheblich in den Trisomie 7-Werten von anderen. Der Anteil der

Probanden mit auffälligen Werten im Sinne einer Mosaik-Trisomie 7 lag bei ~ 28%, ergibt sich aus den Gruppen 2 und 3.

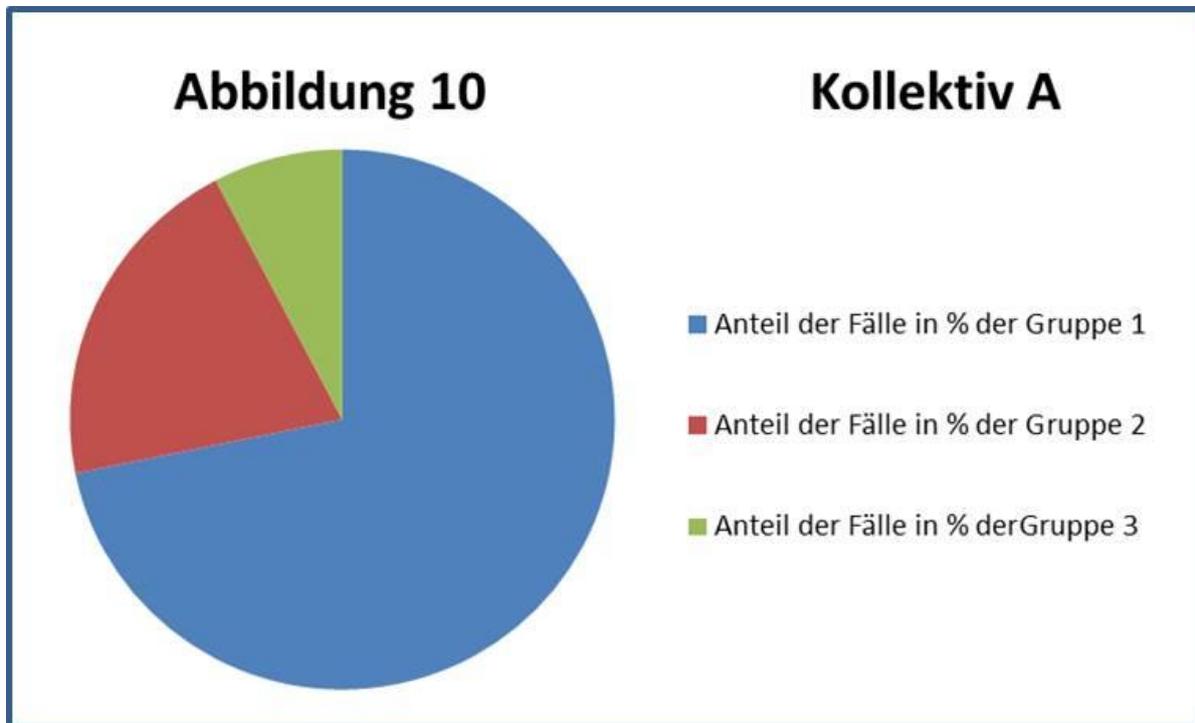


Abbildung 10: Prozentualer Anteil der einzelnen Gruppen des Kollektiv A der älteren Probanden; Gruppe 1 = Trisomie 7-negativ (72%); Gruppe 2 = niedriggradige Mosaikrisomie $7 > 2\% < 5\%$ mit ~ 20%; Gruppe 3= höhergradige Mosaik-Trisomie $7 > 5\%$ mit ~ 8%. Daraus ergibt sich der Anteil der gewerteten Probanden, die eine Mosaik-Trisomie des Chromosoms $7 > 2\%$ hatten mit ~ 28%, entspricht Gruppe 2 und 3.

4.1.1 Vergleichende Analyse weiblicher versus männlicher Probanden im Kollektiv A

Betrachtet man die Gruppen 2 und 3 des Kollektivs A, so kann bei insgesamt sehr kleinen Fallzahlen kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Alters und des Geschlechts gefunden werden (siehe Anhang Tabelle 5.0). Von den 17 männlichen Probanden hatten 47,0% eine über dem cut off level liegende Mosaik-Trisomie-7-Rate (Mittelwert 6,6%, Standardabweichung 7,51%, Schwankungsbereich zwischen 2,5% und 20%). Bei den 22 weiblichen Probanden waren es 36,0% (Mittelwert 5,16%, Schwankungsbereich 2,93%, Schwankungsbereich zwischen

2,5% und 10%). Eine mathematische Auswertung war im Nachhinein aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht möglich. Eine absolute Geschlechtsspezifität konnte nicht festgestellt werden. Trotz des relativ kleinen Kollektivs weisen die Befunde allerdings auf ein relatives Übergewicht der Beobachtung im männlichen Geschlecht. Dies ergibt ein tendenziell häufigeres Vorkommen einer Mosaik-Trisomie 7 im hohen Alter bei Männern gegenüber Frauen (Tab. 1.4 Männer und 1.5 Frauen).

Kollektiv A	Geschlecht		Gesamt
	männlich	weiblich	
Trisomie ≤ 2%	12 (42,9%)	16 (57,1%)	28
> 2%	5 (45,5%)	6 (54,5%)	11
Gesamt	17 (43,6%)	22 (56,4%)	39

Tabelle 5.0: Tabellarische Gegenüberstellung der älteren Probanden deren FISH-Signalkonstellationen bezüglich Chromosom 7 oberhalb des cut off levels lagen, geordnet nach Geschlecht. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern vor.

4.1.2 Ergebnisse in Abhängigkeit vom Rauchverhalten im Kollektiv A

Es befanden sich nur zwei aktive Raucher im untersuchten Kollektiv, beide mit relativ niedrigem Konsum. Im Gegensatz zu 37 Nichtrauchern, von denen vier ehemals Raucher waren, die seit 1 - 25 Jahren nicht mehr geraucht hatten. Hierbei lagen elf Nichtraucher hinsichtlich einer Mosaik-Trisomie 7 über dem cut off level mit einem Mittelwert von 5,82% (Standardabweichung 5,24% und Schwankungsbereich 2,5% bis 20%).

Die beiden Raucher hatten Trisomie-7-Werte unterhalb des cut off levels. Von den 4 ehemaligen Rauchern waren die Trisomie-7-Raten von zwei Probanden, deren vormaliger Konsum bis zu 15 *pack years* betrug, ebenfalls unterhalb des cut off levels, ein Proband lag mit einer Mosaik-Trisomie 7-Rate von 2,5% in der Gruppe 2 und einer mit Mosaik-Trisomie 7-Rate von 20% in Gruppe 3. Der letztgenannte stellte den Probanden mit der in der Gesamtstudie höchsten ermittelten Trisomie-7-Rate dar (siehe Anhang Tabelle 1.6 Nichtraucher und 1.7 Raucher). In Anbetracht des geringen Anteils aktiver und ehemaliger Raucher in Kollektiv A war letztlich keine statistische Auswertung bezüglich des Einflusses des Rauchverhalten als exogene Noxe auf die Entstehung und Prävalenz einer Mosaik-Trisomie 7 möglich. Die einerseits unauffälligen bzw. grenzwertig positiven Befunde bei 5/6 der (Ex-)

Rauchern und andererseits die Zuordnung des Probanden mit ausgeprägt hoher Mosaik-Trisomie 7-Rate zum Raucherkollektiv, lassen auch bei individueller Einzelfallbetrachtung keine eindeutige Aussage zu.

4.2 Ergebnisse der Chromosom 7-FISH für das Kollektiv B

Zur Überprüfung der Altersspezifität der Mosaik-Trisomie 7 wurde ein Kollektiv jüngerer Probanden zwischen 25 und 56 Jahren (Durchschnittliches Alter 38,7 Jahre) untersucht. Mit 10 männlichen und 14 weiblichen Probanden ist das Geschlechterverhältnis dem der älteren Probanden vergleichbar (siehe Abbildung 11).

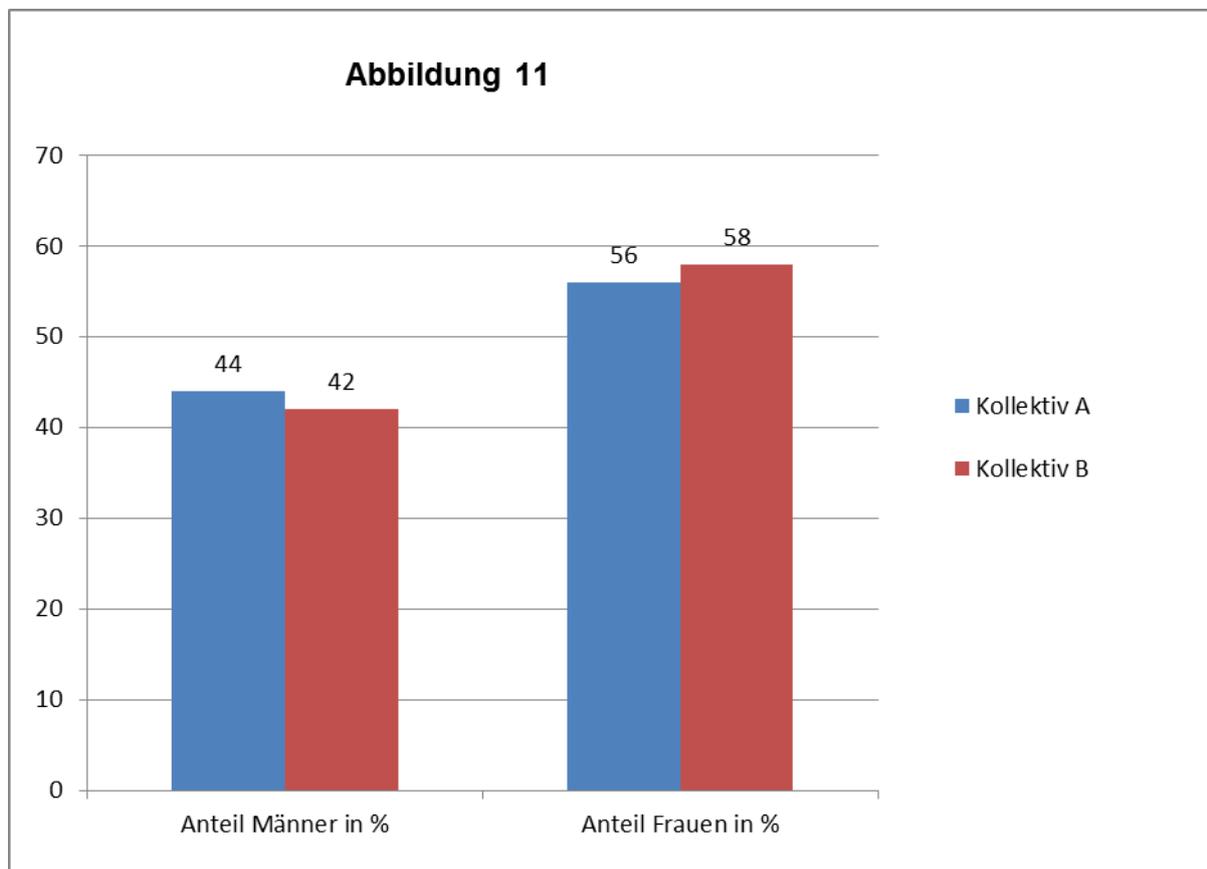


Abbildung 11: Verhältnis der männlichen und weiblichen Probanden der Kollektive A und B im Vergleich. Ersichtlich wird, daß die Geschlechteranteile in beiden Kollektiven nahezu gleich sind.

In der Gesamtheit der 24 jüngeren Probanden zeigten 9 von 24 (~ 38%) eine relevante Mosaik-Trisomie 7 in prozentual unterschiedlich starker Ausprägung (Schwankungsbreite 2,3 - 6,8%). Der durchschnittliche Anteil 7-trisomer Zellen lag bei 3,7%, die Schwankungsbereich bei 1,69%. Fast zwei Drittel (~ 62%, 15 Fälle) zeigten keine Mosaik-Trisomie 7 (siehe Anhang Tabelle 2.0).

Es ließ sich eine dem Kollektiv A identische Gruppeneinteilung vornehmen (siehe Abbildung 12).

Die **Gruppe 1**, umfaßt die Fälle unterhalb des cut off levels, das heißt mit negativem Befund hinsichtlich Mosaik-Trisomie 7. Sie ist mit 15 von insgesamt 24 Fällen (~ 62%) die größte, es wurden hier durchschnittlich 1,1% der Zellen mit 3-Chromosom 7-FISH-Signalen erfaßt (Standardabweichung 0,74% und Schwankungsbereich 0% bis 2% (siehe Anhang Tabelle 2.1). In dieser Gruppe befanden sich vier Raucher. Die jüngste Probandin mit 25 Jahren zeigte in 2% trisome (3-signaltragende) Zellen, der älteste mit 53 Jahren 0,8% trisome (3-signaltragende) Zellen bezüglich Chromosom 7. Die Gruppe 1 wurde - wie im Kollektiv A- im Gesamtbefund nur erwähnt; die hier dokumentierten „Trisomie-Raten“ wurden nicht als tatsächliche Mosaik-Trisomie-Befunde bewertet.

In der **Gruppe 2**, handelt es sich um den low level Bereich der Mosaik-Trisomie 7 mit prozentualen Werten oberhalb des cut-off-levels (< 2%) bis zu 5%. Es wurden 7 Fälle (~ 30% der Probanden) der Gruppe 2 zugeordnet. Durchschnittlich wurden 2,9% 7-trisomer Zellen nachgewiesen (Standardabweichung 0,4%). Der Schwankungsbereich lag zwischen 2,3% und 2,4% (siehe Anhang Tabelle 2.2). In dieser Gruppe befanden sich keine Raucher.

In der **Gruppe 3**, die für die Fälle mit Mosaik-Trisomie 7 über 5% definiert war, fielen 2 Probanden (~ 8% der Gesamtprobanden) mit individuellen Trisomie 7-Raten von 6,5% und 6,8%, durchschnittlich 6,6% (Standardabweichung 0,21% und Schwankungsbereich 6,5% bis 6,8%; (siehe Anhang Tabelle 2.3). In dieser Gruppe befanden sich keine Raucher.

Die Gruppe B ist altersbezogen eine relativ inhomogene Gruppe. Es ließen sich keine relevanten Schlüsse ziehen, was das Auftreten einer Mosaik-Trisomie 7

bezogen auf das Alter und das Geschlecht anbetraf. Im Gegensatz zum Kollektiv A gab es insgesamt keine einzelnen Fälle von gleichartig hohen Trisomie 7-Prozentraten, allerdings war das grundsätzliche Phänomen einer Mosaik-Trisomie 7 etwas häufiger. Der Anteil der Probanden mit auffälligen Werten entsprechend einer Mosaik-Trisomie 7 lag hier bei ~ 38% (versus ~ 28% in Kollektiv A).

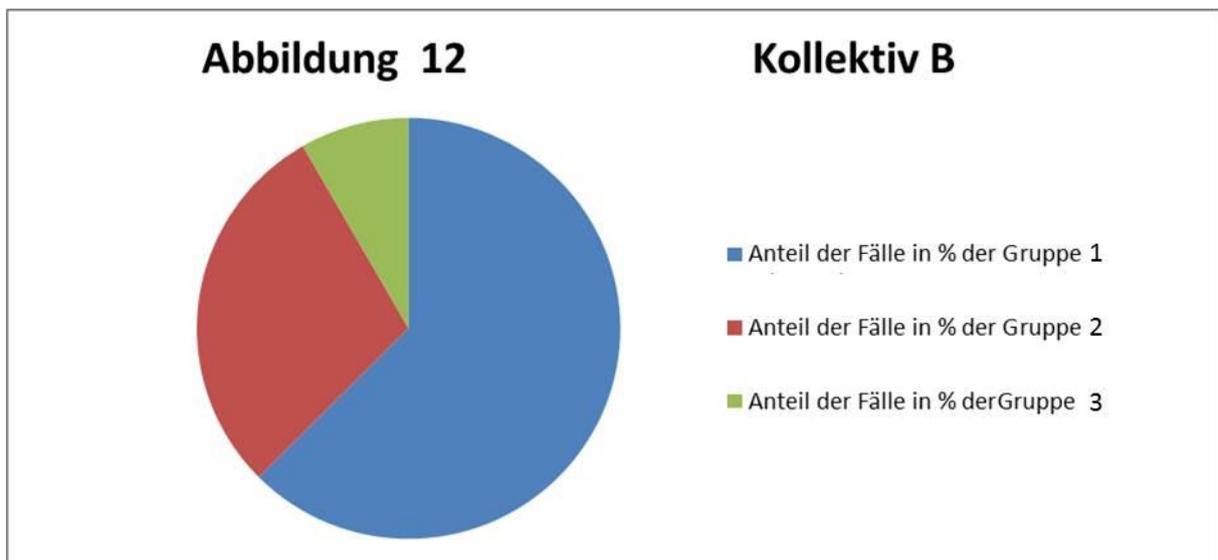


Abbildung 12: Prozentualer Anteil der einzelnen Gruppen des Kollektiv B der jüngeren Probanden; Gruppe 1 = Trisomie 7-negativ (62%); Gruppe 2 = niedriggradige Mosaiktrisomie 7 > 2% < 5% mit ~ 30%; Gruppe 3 = höhergradige Mosaik-Trisomie 7 > 5% mit ~ 8%. Daraus ergibt sich der Anteil der Probanden, die eine Mosaik-Trisomie des Chromosoms 7 oberhalb des cut off levels ($\leq 2\%$) hatten, mit ~ 38%, entsprechend Gruppen 2 und 3.

4.2.1 vergleichende Analyse weiblicher versus männlicher Probanden im Kollektiv B

Es ließ sich keine absolute Geschlechtsspezifität feststellen (siehe Anhang Tabelle 6.0). Von den 10 männlichen Probanden hatten 20,0% eine über dem cut off level liegende Mosaik-Trisomierate (Mittelwert 4,75%, Standardabweichung 2,47%, im Schwankungsbereich fanden sich nur die beiden Werte 3,0% und 6,5%). Bei den 14 weiblichen Probanden waren es 50,0% (Mittelwert 3,44%, Standardabweichung 1,53%, Schwankungsbereich 2,3% bis 6,8%). Im Kollektiv der jüngeren Probanden wurde ein tendenzielles Übergewicht des Phänomens der Mosaik-Trisomie 7 im

weiblichen Geschlecht beobachtet. Dies ergibt ein tendenziell häufigeres Vorkommen einer Mosaik-Trisomie 7 bei Frauen gegenüber Männern im mittleren bzw. jüngeren Alter (siehe Anhang Tabelle 2.4 Männer und 2.5 Frauen).

Kollektiv B		Geschlecht		Gesamt
		männlich	weiblich	
Trisomie	≤ 2%	8 (53,3%)	7 (46,7%)	15
	> 2%	2 (22,2%)	7 (77,8%)	9
Gesamt		10 (41,7%)	14 (58,3%)	24

Tabelle 6.0: Tabellarische Gegenüberstellung der jüngeren Probanden deren FISH-Signalkonstellationen bezüglich Chromosom 7 oberhalb des cut off levels lagen, geordnet nach Geschlecht. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern vor.

4.2.2 Ergebnisse in Abhängigkeit vom Rauchverhalten im Kollektiv B

Bei den Nichtrauchern der jüngeren Probanden (Gruppe B) oberhalb des cut off levels ($n = 9$), lag die durchschnittliche Trisomie-7- Rate bei 3,7% der ausgezählten Zellen (Standardabweichung 1,69%, Schwankungsbereich 2,3% bis 6,8%). Von den Rauchern ($n = 4$) des Kollektivs B lagen alle unterhalb des cut off levels (siehe Anhang Tabelle 2.6 und 2.7). Obwohl aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Auswertung möglich ist, weisen die Einzelbeobachtungen in Hinblick auf die Rauchgewohnheit der jeweiligen Probanden im jüngeren Probandenkollektiv nicht auf einen kausalen Einfluß des Rauchens auf die Entstehung einer Mosaik-Trisomie 7 in Zellen der Mundschleimhaut hin.

4.3 Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse der Kollektive A und B

Bezogen auf die Gesamtheit der jeweiligen Kollektive zeigen sich Unterschiede im Auftreten der Mosaik-Trisomie 7, die jedoch nicht signifikant sind. So zeigten bei den jüngeren Probanden prozentual mehr Individuen eine Mosaik-Trisomie 7.

In dem Kollektiv der ≥ 75 jährigen Individuen (A) wurde eine Mosaik-Trisomie 7 bei $\sim 28\%$ der Probanden nachgewiesen. Im Kollektiv der jüngeren Probanden (< 60 Jahre; Kollektiv B) wurde eine Mosaik-Trisomie 7 bei $\sim 38\%$ der Probanden nachgewiesen (siehe Abbildung 13). Eine Darstellung der absoluten Fallzahlen für jede Gruppe beider Kollektive gibt Abbildung 14. Für das Kontrollchromosom 10

wurde nur in einem von 63 Fällen (Kollektive A und B zusammen) eine Mosaik-Trisomie mit FISH-Werten $> 2\%$, nämlich $2,7\%$, für Chromosom 10 belegt; dies entspricht $1,6\%$ der Probanden (siehe Anhang Tabelle 2.0 Fallnummer 55). Ebenso ließ sich im diesbezüglich analysierten Kollektiv B (in Kollektiv A wurde aufgrund limitierten Probenmaterials und geringer Zellausbeute keine Chromosom 8- und keine Chromosom 12-FISH-Analyse durchgeführt) ein Fall einer Mosaik-Trisomie 8 nachweisen mit $2,4\%$ igem Mosaikanteil; dies entspricht ebenso $1,6\%$ der Probanden (siehe Anhang Tabelle 2.0 Fallnummer 71). *In einem Fall (Fallnummer 13) zeigte sich eine Unterrepräsentation an FISH-Signalen („Monosomie“) der Chromosomen 7 und 10. Da beide Chromosomen betroffen sind kann eher von einer unzureichenden Hybridisierungseffizienz ausgegangen werden.*

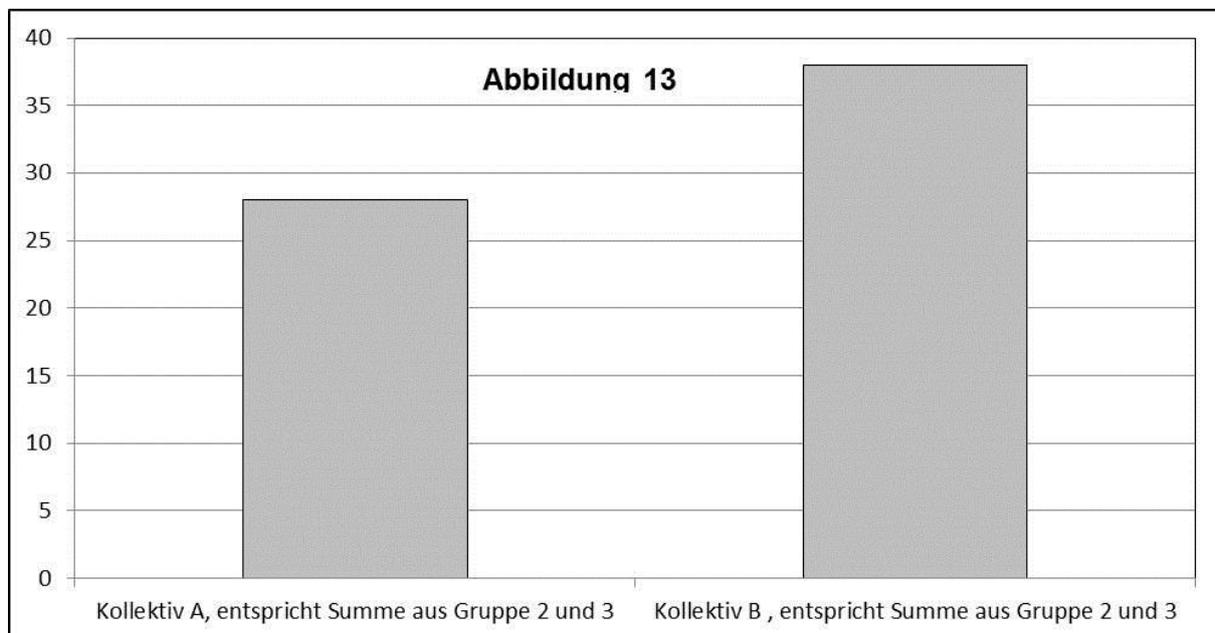


Abbildung 13: Prozentualer Anteil der Probanden mit durch FISH-Analyse belegter Mosaik-Trisomie 7 in Zellen der Mundschleimhaut, aufgeteilt in Kollektiv A (ältere Probanden) $\sim 28\%$ und Kollektiv B (jüngere Probanden) $\sim 38\%$. Diese Werte ergeben sich jeweils aus den Summen der Prozentangaben der Gruppen 2 und 3 vom Gesamtkollektiv.

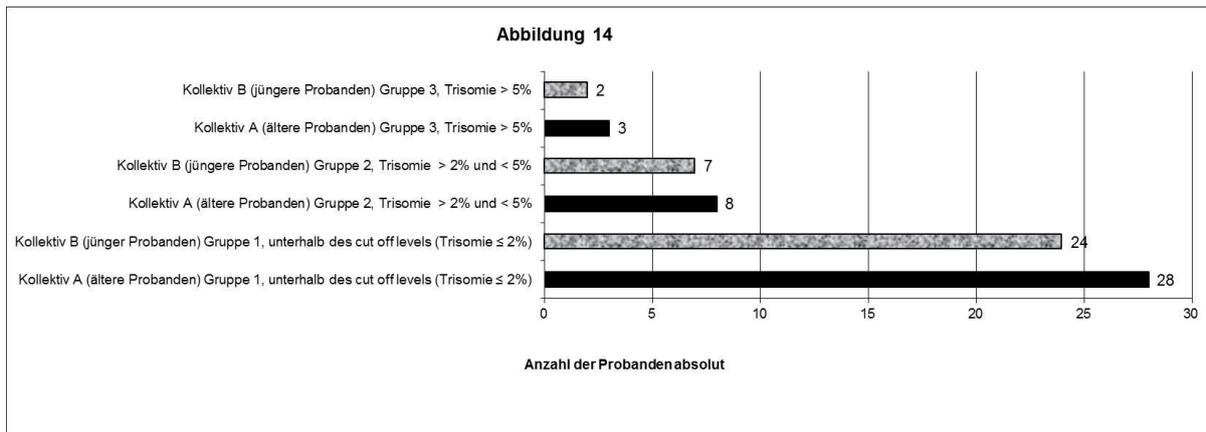


Abbildung 14: Absolute Fallzahlen der Kollektive A (ältere Probanden) und B (jüngere Probanden) jeweils aufgeteilt in die Gruppen 1 - 3 entsprechend den durch FISH ermittelten Mosaik-Trisomieraten bezüglich Chromosom 7 in der Mundschleimhaut. *Die Probanden der Gruppen 1 mit „Mosaik-Trisomie 7“-Werten unterhalb des cut off levels werden als bezüglich Mosaik-Trisomie 7 negative Fälle bewertet.*

Somit lässt sich bezogen auf die Häufigkeit des Auftretens von Mosaik-Trisomie 7 die Hypothese eines altersabhängig auftretenden Phänomens nicht belegen; die Prozentzahlen sprechen bei erster Betrachtung - rein hinsichtlich des qualitativen Vorkommens der Mosaik-Trisomie 7- sogar umgekehrt für eine höhere Prävalenz unter den jüngeren Probanden. Aus den vorliegenden Befunden geht allerdings hervor, dass bei den ≥ 75 jährigen Individuen (A) bei Vorliegen einer Mosaik-Trisomie 7 eine Tendenz zu prozentual höheren Trisomie-7-Werten vorliegt. Während bei den Mosaik-Trisomie 7-positiven jüngeren Probanden des Kollektivs B die Mosaik-Trisomie 7 durchschnittlich prozentual nur 3,7% (Schwankungsbereich 1,69%) der Zellen betraf, lag der entsprechende prozentuale Anteil im Kollektiv A der sehr alten Individuen bei 5,8% (Schwankungsbereich 5,24%). Vergleicht man die absoluten Werte der Kollektive A und B miteinander, so ist zu erkennen, daß die Trisomie-7-Rate der älteren Probanden immer über derjenigen der jüngeren liegt. Dies ist besonders bei der Gruppe 3 deutlich, bei der die älteren Probanden der Gruppe A fast doppelt so hohe Werte aufwiesen als die der Gruppe 3 aus Kollektiv B.

4.3.1 Vergleichende Auswertung der Ergebnisse der Kollektive A und B bezüglich des Probandenalters

Um festzustellen, ob die Anzahl der Signale im Rahmen der FISH-Analyse von Chromosom 7 altersabhängigen Schwankungen unterzogen ist, wurde mittels SPSS Programm ein Chi-Quadrat-Test nach Pearson erstellt.

Die Nullhypothese war, daß es einen Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden und dem Auftreten einer Mosaik-Trisomie 7 in Zellen der Mundschleimhaut gibt. Der p-Wert für den Chi-Quadrat-Test ist 0,72, damit wird die Nullhypothese abgelehnt, d.h. Trisomie und Alter sind voneinander unabhängig (siehe Anhang Tabelle 7.0). Das heißt, es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden und dem Auftreten einer Mosaik-Trisomie 7 in Zellen der Mundschleimhaut.

Vergleicht man die Geschlechtsverteilung der Trisomie 7 in Zellen der Mundschleimhaut mit gleichem statistischen Vorgehen, so findet man bei den männlichen Individuen lediglich geringe Unterschiede (siehe Anhang Tabelle 5.0 und 6.0).

Insgesamt ist die Anzahl der untersuchten Fälle allerdings zu gering um eine validierte Aussage treffen zu können.

		Alter		Gesamt
		Kollektiv B	Kollektiv A	
Trisomie	≤ 2%	15 (34,9%)	28 (65,1%)	43
	2-5%	7 (46,7%)	8 (53,3%)	15
	> 5%	2 (40%)	3 (60%)	5
Gesamt		24 (38,1%)	39 (61,9%)	63

Tabelle 7.0: Tabellarische Gegenüberstellung der Probanden deren FISH Signalkonstellationen bezüglich Chromosom 7 oberhalb des cut off levels lagen, geordnet nach Alter im Kollektiv A und B. Es liegt kein signifikanter Unterschied bezüglich des Alters vor.

4.3.2 Vergleich der Ergebnisse bezüglich Rauchverhalten (Kollektive A und B)

Bei dem Kollektiv älterer Probanden waren elf Nichtraucher (Mittelwert 5,82%, Standardabweichung 5,24% und Schwankungsbereich 2,5% bis 20%) über dem cut off level, aber keiner der beiden einzigen Raucher des Kollektivs A.

Bei dem Kollektiv jüngerer Probanden waren neun Nichtraucher (Mittelwert 3,73%, Standardabweichung 1,69% und Schwankungsbereich 2,3% bis 6,8%) über dem cut off level, aber ebenfalls keiner der vier Raucher des Kollektivs B.

Eine Gegenüberstellung der Gesamtgruppe der Raucher aus beiden Kollektiven (n = 6) versus der Gesamtgruppe der Nichtraucher aus beiden Kollektiven (n = 20) zeigte, dass sämtliche Raucher unterhalb des cut off levels für eine Mosaik-Trisomie 7 lagen. Eine mathematische Gegenüberstellung war aufgrund der niedrigen Fallzahlen der Raucher nicht möglich. Bemerkenswert war dennoch, dass ein ehemaliger, explizit langjährig sehr starker Raucher (25 pack years) im Kollektiv A die höchsten Werte von Mosaik-Trisomie 7 aufwies (siehe Anhang Tabelle 1.6, 1.7, 2.6 und 2.7).

4.3.3 Analyse der Ergebnisse hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede (Kollektive A und B)

Eine absolute Geschlechtsabhängigkeit bezüglich des Auftretens von Mosaik-Trisomie 7 konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Anhang Tabelle 5.0 und 6.0). Bei den älteren Männern zeigten 29,4% (5 von 17) eine Mosaik-Trisomie-7-Rate über dem cut off level, während es bei den jüngeren 20% (2 von 10) waren. Betrachtet man die Männer beider Kollektive gemeinsam, so zeigten 7 von 27 Männern, das heißt 25,9%, eine relevante Trisomie 7.

Auffällig sind die Werte für die weiblichen Individuen. Hier findet man bei den älteren Probandinnen 27,2% (6 von 22) mit einer Mosaik-Trisomie-7-Rate über dem cut off level. Im Gegensatz dazu zeigten 50% (7 von 14) der jüngeren Probandinnen eine entsprechende Mosaik-Trisomie 7. Bei Gesamtbetrachtung der weiblichen Probanden beider Kollektive wurde bei 13 der 36, entsprechend 36,1%, der untersuchten Probandinnen eine Mosaik-Trisomie 7.

Speziell bei jüngeren Frauen wurde das Phänomen der Mosaik-Trisomie 7 in Zellen der Mundschleimhaut somit absolut wie auch relativ (zu älteren weiblichen sowie älteren und jüngeren männlichen Probanden) auffällig häufig beobachtet.

Das Gesamtkollektiv männlicher und das Gesamtkollektiv weiblicher Probanden zeigten im Vergleich relativ ähnliche Nachweishäufigkeiten für eine Mosaik-Trisomie 7 allerdings mit tendenziell höherer Nachweisrate beim weiblichen Geschlecht

(25,9% der untersuchten Männer versus 36,1% der untersuchten Frauen zeigten eine Mosaik-Trisomie 7).

4.3.4 Betrachtung der Ergebnisse hinsichtlich einer Gewebsspezifität

Über eine Gewebsspezifität des Auftretens einer Mosaik-Trisomie 7 lässt sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nur spekulieren. Aus Vorbefunden einer anderen Arbeit unserer Arbeitsgruppe (Siehe Promotionsarbeit von Carmen Fromberg) ließ sich bei intraindividuell vergleichender Analyse von Lymphozyten, Zellen aus Haarwurzeln und Zellen der Mundschleimhaut ableiten, dass bezüglich des Vorkommens von Mosaik-Trisomie 7 eine deutliche Präferenz bei Zellen der Mundschleimhaut besteht. Da in der aktuell vorliegenden Arbeit der Fokus auf eine mögliche Altersabhängigkeit gelegt wurde, beschränkten sich die Untersuchungen nur auf diesen Zelltyp. Abgesehen von der Tatsache des qualitativen Vorkommens von Mosaik-Trisomie 7 in normaler Mundschleimhaut lässt sich somit anhand der vorgestellten Daten keine Aussage hinsichtlich einer sonstigen fraglichen Gewebespezifität ableiten.

4.4. Analyse der Chromosom 8-, 10- und 12-FISH

Auch für Chromosomen 8, 10 und 12 konnten eindeutige Signale in der FISH-Analyse ausgewertet werden; die Chromosomen 8 und 12 wurden lediglich im Kollektiv B analysiert (siehe Abbildung 21 Anhang Bildtafel). Bei Gesamt-Analyse der Kollektive A und B ergab sich dabei in nahezu allen analysierten Fällen für jedes der untersuchten Kontrollchromosome ein unauffälliger Befund ohne Nachweis einer Mosaik-Trisomie oberhalb des postulierten cut off levels.

Für das Chromosom 10 ergab sich nur in einem Fall eine Mosaik-Trisomie. Dabei handelte es sich um eine 51 jährige Frau (Kollektiv B). Bei ihr ergab sich ein grenzwertiger Wert von 2,7% an Chromosom 10-trisomen Zellen (siehe Anhang Tabelle 2 Fallnummer 55).

Es gab ebenfalls nur einen Probanden, der eine Mosaik-Trisomie des Chromosoms 8 oberhalb des cut off levels aufwies. Diese lag - auch hier grenzwertig - bei 2,4% (Fallnummer 71). Es handelt es sich um einen mit 34 Jahren eher zu den jüngeren

Probanden zählenden Mann aus Kollektiv B. Eine Trisomie des Chromosoms 12 wurde nicht beobachtet.

Ca. 95,4% der in der FISH-Analyse untersuchten Zellen des Kollektivs A zeigten FISH-Ergebnisse entsprechend einer disomen Chromosomenanzahl bezogen auf Chromosom 10 (Standardabweichung 4,0% und Schwankungsbereich 88,1 -100%).

Ca. 83,0% der in der FISH-Analyse untersuchten Zellen des Kollektivs B zeigten FISH-Ergebnisse entsprechend einer disomen Chromosomenanzahl bezogen auf Chromosom 8 und 12 (Standardabweichung 9,5% und Schwankungsbereich 51 - 99%).

Aufgrund der jeweils singulären Befunde einer Mosaik-Trisomie der jeweiligen Kontrollchromosomen erscheint eine statistische Auswertung sowie eine Gruppeneinteilung nicht sinnvoll.

4.4.1 Zusammenfassung der FISH-Analysen für die Chromosomen 7, 8, 10 und 12

Eine Mosaik-Trisomie, der in dieser Studie an Mundschleimhaut untersuchten Chromosomen 7, 8, 10 bzw. 12, wurde nahezu ausschließlich für Chromosom 7 beobachtet. Eine Altersabhängigkeit, ein Zusammenhang mit dem Rauchverhalten oder eine Geschlechtsspezifität konnte mathematisch nicht als statistisch signifikant nachgewiesen werden. Wesentlichster Grund für diese Einschränkung waren dabei die relativ geringen Probandenzahlen. Bemerkenswert sind die zum Teil deutlich auffälligen Ergebnisse mit hohem prozentuaalem Anteil an Mosaik-Trisomie 7 bis zu im Einzelfall 20% einzelner Individuen, hierbei mit deutlich höheren Werten bei einzelnen älteren Probanden.

5. Diskussion

5.1 Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich der Hypothese einer Altersabhängigkeit der Mosaik-Trisomie 7

Das Auftreten einer Mosaik-Trisomie 7 bzw. der Nachweis von Zellen mit einer Trisomie 7 ist ein bekanntes Phänomen, das in einer Vielzahl von unterschiedlichen Gewebetypen und Gewebekonditionen belegt ist. Das Spektrum reicht hierbei von bösartigen Tumoren über gutartige Tumore bis hin zu chronisch entzündlichen Erkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis) und schließt zudem Einzelberichte bezüglich scheinbar unauffälliger normaler Gewebekonditionen ein. Eine Bewertung des Phänomens hinsichtlich seiner Bedeutung wird hierbei weiterhin erschwert, da es sowohl Hinweise für eine streng krankheitsassoziierte Bedeutung (z.B. Auftreten in Hirntumoren) als auch für die gegenteilige Annahme eines möglicherweise zufällig erfassten Epiphänomens gibt. Neben einer Reihe unterschiedlicher Interpretationsansätze wurde die Hypothese der Trisomie 7 als rein altersassoziierte Veränderung erstellt. Hinweisend in diese Richtung sind z.T. metanalytisch ermittelte Daten, die darauf hinweisen, daß die Beobachtung einer Mosaik-Trisomie 7 unabhängig von der jeweiligen Grunderkrankung umso häufiger ist, je älter die entsprechenden Individuen sind (Broberg et al.).

Vor diesem Hintergrund wurden in der dargestellten Arbeit Untersuchungen zum Auftreten der Mosaik-Trisomie 7 in Zellen der Mundschleimhaut sehr alter weitgehend gesunder Individuen im Vergleich zu jüngeren gesunden Individuen durchgeführt. Anlaß für die Auswahl der Mundschleimhaut als Untersuchungsgewebe waren Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe, die bei einer relativ kleinen Fallzahl von Individuen auf das Auftreten von Mosaik-Trisomie 7 in diesem Gewebe hinwiesen.

Zunächst sollte das aus Voruntersuchungen vermutete Gewebetyp-spezifische Auftreten der Mosaik-Trisomie 7 in normalen Zellen der Mundschleimhaut belegt werden.

Die weitergehende Bewertung hinsichtlich einer hypothetisch angenommenen Altersabhängigkeit wurde dabei sowohl qualitativ als auch quantitativ vergleichend durchgeführt. Das bedeutet, daß zum einen das generelle Auftreten einer Mosaik-

Trisomie 7 als auch zum anderen der prozentuale Anteil der 7-trisomen Zellen, d.h. das Ausmaß der Mosaik-Trisomie 7 bewertet wurden.

Die vorgelegte Studie konnte das Auftreten von Mosaik-Trisomie 7 in normaler Mundschleimhaut grundsätzlich belegen. Bei insgesamt 63 untersuchten Fällen (Gesamtanalyse jüngerer und älterer Probanden) konnte eine Mosaik-Trisomie 7 (oberhalb des methodisch postulierten cut-off-levels von 2% analysierter Zellen) in insgesamt 20 Fällen entsprechend 31,7% nachgewiesen werden und stellt somit ein relativ häufiges Phänomen dar, was nicht als zufälliges Einzelereignis zu bewerten ist.

5.1.1 Qualitative Analyse der FISH-Untersuchung (Vergleichende Analyse der Mosaik-Trisomie 7-Inzidenz)

Bei rein **qualitativem** Vergleich des Auftretens von Mosaik-Trisomie 7 zwischen den Kollektiven A (n = 39) der sehr alten Individuen und B (n = 24) der jüngeren Individuen ergab sich mit einer prozentualen Inzidenz von ~ 38% im Kollektiv der jüngeren Probanden (B) unerwartet ein sogar höherer Wert als im Kollektiv der sehr alten Probanden (A) mit ~ 28%. Diese Diskrepanz stellt allerdings keinen statistisch signifikanten Unterschied dar. Das grundsätzliche Auftreten einer Mosaik-Trisomie 7 lediglich bei sehr alten oder tendenziell älteren Individuen im Sinne der oben genannten Altershypothese konnte somit nicht belegt werden. Die Altersverteilung im Kollektiv B umfasste bei relativ geringer Fallzahl eine relativ große Altersspanne von 25 - 56 Jahren.

Ein möglicher Einfluß des Lebensalters der Individuen innerhalb der jüngeren Probandengruppe könnte grundsätzlich zu einer Nivellierung des Ergebnisses beigetragen haben. Bei Einzelbetrachtung der Fälle mit positivem Mosaik-Trisomie 7-Nachweis innerhalb der Gruppe B konnte – gleichsinnig wie bei der Gesamtbetrachtung der Gruppen - ebenfalls kein offensichtlicher Bezug zum tendenziell höheren Lebensalter gezeigt werden.

Bei differenzierter Analyse der Probanden mit und ohne Mosaik-Trisomie 7 innerhalb der beiden Untersuchungskollektive ließ sich allerdings im Kollektiv der jüngeren Probanden (B) ein doch deutlicher Altersunterschied feststellen. So liegt das

durchschnittliche Lebensalter der Probanden mit Mosaik-Trisomie 7 (über dem cut off level) mit 41,7 Jahren ca. 5 Jahre höher als das derjenigen mit bezüglich Mosaik-Trisomie 7 negativem FISH-Befund (unter dem cut off level) mit 36,8 Jahren. Dieser Altersunterschied ist zwar nicht statistisch signifikant, aber als tendenzanzeigende Beobachtung doch bemerkenswert. Beim Kollektiv A sind die Alterswerte dieser beiden Untergruppen nahezu identisch mit 81,18 Jahren Mosaik-Trisomie 7-positiver gegenüber 81,14 Jahren Mosaik-Trisomie 7-negativer Probanden. Dies lässt sich unter Umständen durch das in diesem Kollektiv deutlich homogenere Altersspektrum erklären. Andererseits könnten diese abweichenden Befunde dafür stehen, daß eine im Verlauf des Lebens einmal entstandene Mosaik-Trisomie 7 durch Zunahme des Mosaik-Anteils mit ansteigendem Lebensalter innerhalb eines begrenzten Zeitraumes über die diagnostische Nachweisgrenze (siehe unten) gelangt, der Effekt der altersabhängigen Nachweisbarkeit aber bei sehr hohem Lebensalter wieder nivelliert wird.

Zusammenfassend ließ sich durch die hier durchgeführte Studie ein statistisch signifikanter altersabhängiger Anstieg der Inzidenz von Mosaik-Trisomie 7 (als rein **qualitatives** Phänomen) an Zellen der Mundschleimhaut gesunder Individuen – trotz Beobachtung tendenzieller Unterschiede - **nicht** belegen. Die zur Frage stehende Altershypothese zur Inzidenz einer Mosaik-Trisomie 7 ließ sich anhand der erhobenen Daten somit nicht bestätigen.

5.1.2 Quantitative Analyse (Vergleichende Analyse des prozentualen Trisomie 7-Mosaikanteils) der FISH-Untersuchung

Bei erweiterter Betrachtung unter Einbeziehung des **quantitativen** Aspektes (prozentualer Anteil 7-trisomer Zellen bei Mosaik-Nachweis) konnte allerdings gezeigt werden, daß bei Individuen mit belegter Mosaik-Trisomie 7 die durchschnittlichen Trisomie-Raten im älteren Kollektiv A mit 5,8% höher lagen als im jüngeren Kollektiv B mit hier 3,7%. Dementsprechend wurden in Kollektiv A insbesondere Einzelfälle mit ausgesprochen hohem Anteil von Mosaik-Trisomie 7 mit Werten bis zu 20,5% gefunden, wohingegen die höchsten ermittelten Anteile von Mosaik-Trisomie 7 im Kollektiv B in zwei Einzelfällen mit unter 7% (6,5 bzw. 6,8%) ermittelt wurden.

Die Ergebnisse zeigen zum einen, daß das Phänomen der Mosaik-Trisomie 7 grundsätzlich ohne erkennbare Pathologie in scheinbar normaler Mundschleimhaut in nicht unbeträchtlicher Häufigkeit bei etwa knapp einem Drittel der Individuen vorkommt (31,7%, entsprechend Gruppe 2 und 3 beider Kollektive), welches allerdings kein generelles Phänomen darstellt. Weiterhin belegen die Ergebnisse im Rahmen der statistischen Limitierung (aufgrund der relativ kleinen Kollektivgrößen), daß das Grundphänomen einer Mosaik-Trisomie 7 als qualitatives Phänomen in der Mundschleimhaut **nicht** in Abhängigkeit vom Lebensalter auftritt. Allerdings weisen die quantitativen Untersuchungen des Mosaik-Anteils darauf hin, daß es mit zunehmendem Lebensalter zu einer prozentualen Zunahme bzw. Ausweitung einer eventuell vorbestehenden Mosaik-Trisomie 7 kommen kann.

Die Erfassung einer Mosaik-Trisomie im Rahmen zytogenetischer oder molekularzytogenetischer Diagnostik ist umso wahrscheinlicher, je größer der Mosaik-Anteil ist. Geringprozentuale oder Einzelzell-Mosaik werden je nach Untersuchungsmethode nur schwer bzw. nicht erfasst. Die im Hinblick auf die Altershypothese belegte größere Häufigkeit des Phänomens einer Mosaik-Trisomie 7 bei älteren Patienten in einzelnen publizierten Berichten¹⁷ könnte daher auch die Erfassung tendenziell höherprozentualer Mosaik widerspiegeln.

Die altersabhängige Zunahme von Chromosom 7-trisomen Zellen könnte entweder durch eine kumulative Anhäufung bei stetem regelmäßigem Neuentstehen der Trisomie 7 oder durch eine relative Zunahme aufgrund eines selektiven Vorteils der Trisomie 7 bedingt sein.

Letztlich belegt die hier vorgestellte Studie zumindest für die nicht nachweislich krankhaft veränderte Mundschleimhaut, daß eine Mosaik-Trisomie 7 als qualitatives Phänomen im Rahmen des untersuchten Alterspektrums im Erwachsenenalter weitgehend unabhängig vom Lebensalter vorkommt. Die erhobenen Daten lassen dabei eine altersabhängige Zunahme des prozentualen Mosaik-Anteils annehmen. Ob die Mosaik-Trisomie 7 der Mundschleimhaut allerdings bereits im Kindesalter vorkommt, bleibt weiteren Studien zur Überprüfung vorbehalten.

5.1.3 Vergleich der Chromosom 7-FISH mit Ergebnissen der FISH bezüglich Chromosom 8, 10 und 12

Um das Phänomen der Mosaik-Trisomie 7 gegenüber einer ggf. allgemein erhöhten ungerichteten chromosomalen Instabilität in Zellen der Mundschleimhaut abzugrenzen, wurde vergleichend zur Mosaik-Trisomie 7 das Auftreten numerischer Deviationen auch der Chromosomen 8, 10 und 12 überprüft (Analysen der Chromosomen 8 und 12 dabei lediglich im Kollektiv jüngerer Probanden B).

Die Ergebnisse des Kollektivs B zeigen, daß die Mosaik-Trisomie 7, das weitab häufigste nachweisbare Phänomen war. In 9 von 24 Fällen (~ 38%) wurde diese Trisomie gefunden, während eine Mosaik-Trisomie oder gar weitere Vermehrung (z.B. im Sinne einer Tetrasomie) der anderen Chromosomen **nicht** (bezüglich Chromosom 12), bzw. lediglich in zwei Einzelfällen (1x Mosaik-Trisomie 8 mit Mosaikanteil von 2,4%, 1x Mosaik-Trisomie 10 mit Mosaikanteil von 2,7%) beobachtet wurde. Dies bestätigt unpublizierte Vorbefunde aus der Arbeitsgruppe (siehe Promotionsarbeit Dr. med. Carmen Fromberg) mit einer kleinerer Fallzahl. Hierbei wurden in untersuchten Zellen der Mundschleimhaut signifikante Trisomieraten ausschließlich für Chromosom 7 und ebenfalls nur in einem Einzelfall für Chromosom 8 gefunden. Eine Mosaik-Trisomie des Chromosoms 8 wurde in publizierten Berichten bereits häufiger beschrieben, hauptsächlich in Tumoren wie zum Beispiel der AML, hierbei ist es die am häufigsten vorkommende Mosaik-Trisomie⁴⁹. Interessant ist, daß die konstitutionelle Mosaik-Trisomie 8 als eine der wenigen konstitutionellen Autosomentrisomien mit einer lebensfähigen Kondition der betroffenen Individuen ohne wesentliche Organbeeinträchtigungen bekannt ist²¹. Eines der assoziierten Symptome ist dabei eine relative Makrosomie, was hier für einen gewissen Wachstumsvorteil durch die Mosaik-Trisomie 8 spricht. Im Bereich des Mund- Rachenraumes wurde eine Mosaik-Trisomie 8 als somatische Veränderung jedoch bisher nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde wie in der Vorstudie eine Mosaik-Trisomie 8 bei einem Probanden nachgewiesen, allerdings in quantitativ geringprozentualer Ausprägung. Hierbei scheint es sich, was die Mundschleimhaut angeht, eher um einen Zufallsbefund zu handeln. Dasselbe gilt für das Chromosom 12, für das in keinem der analysierten Probanden eine Mosaik-Trisomie in der Mundschleimhaut gefunden wurde. Für Chromosom 10 und 8 wurde nur in jeweils einem Fall eine Mosaik-Trisomie oberhalb des cut off level nachgewiesen. Dies bestätigt die spezielle Bedeutung der Trisomie 7 als

individuelles Phänomen in der Mundschleimhaut, entgegen einer ungerichtet allgemein erhöhten chromosomalen Instabilität.

5.2 Mögliche Entstehung der Trisomie 7 bzw. Überlegungen für die altersabhängige Zunahme des prozentualen Mosaik-Trisomie 7-Anteils

Eine Mosaik-Trisomie 7 kann ein klonales Geschehen darstellen, wobei sich alle trisomen Zellen von einer einzelnen auffälligen Zelle ableiten (monoklonal). Es ist aber auch möglich, daß die 7-trisomen Zellen unterschiedlicher (polyklonaler) Herkunft sind, wobei in verschiedenen Zellen jeweils unabhängig voneinander ein überzähliges Chromosom 7 aufgetreten ist. An Synovialgewebe, in dem eine Mosaik-Trisomie 7 ebenfalls als häufiges Phänomen beschrieben ist, wurden von Broberg et al bzw. Dahlen et al. Studien zur Frage eines monoklonalen versus polyklonalen Ursprungs durchgeführt. Die Ergebnisse sprachen hier gegen eine monoklonale Entstehung und für einen polyklonalen Ursprung der Trisomie 7 in Synovia; Broberg K. et al.¹⁵ und Dahlen et al²⁷. Bei Annahme eines gleichen Entstehungsmechanismus wäre auch in der Mundschleimhaut eine polyklonale Genese 7-trisomer Zellen wahrscheinlich.

Ursächlich für die überzufällig häufige Beobachtung von Mosaik-Trisomie 7 in der Mundschleimhaut gegenüber anderen Chromosomen-Trisomien oder –Aberrationen könnte zum einen eine selektive Endoreduplikation von Chromosom 7 sein. Eine andere Form der selektiven Begünstigung einer bestimmten Chromosomenanomalie, hier speziell von Trisomie 7, könnte in einer u.U. gewebespezifisch höheren Akzeptanz quoad vitam dieser Chromosomenanomalie liegen. Beide hier genannten Möglichkeiten wären mit einem über die Zeit vermehrten Neuauftreten 7-trisomer Zellen vereinbar. Belege für die eine oder andere These konnten hier nicht erbracht werden. Auf der Basis der eingangserwähnten Literaturlage kann eine Arbeitshypothese formuliert werden, nach der gewebespezifisch bestimmte chromosomale Aberrationen bevorzugt selektiert werden. Das Fehlen regelhafter numerischer Aberrationen zumindest der Chromosomen 8, 10 und 12 in der Mundschleimhaut konnte anhand der Kontroll-FISH-Ergebnisse der präsentierten Studie gut dargestellt werden.

Wesentlich für die Bedeutung der Mosaik-Trisomie 7 in der „normalen“ Mundschleimhaut ist, daß sie sowohl bei jungen als auch bei alten Individuen zwar

mit einer Inzidenz von ~ 28% (A) bzw. ~ 38% (B) gefunden wurde. Es steht daher zu vermuten, daß sie keineswegs ein generelles Phänomen darstellt. In der hier vorgelegten Arbeit wurden als mögliche kausale Faktoren, die das Auftreten der Mosaik-Trisomie begünstigen könnten, zum einen das Probanden- Geschlecht, zum anderen das Rauchen als eine häufige, bekannte kanzerogene Noxe in Erwägung gezogen und hinsichtlich ihres möglichen Einflusses auf die Studienergebnisse betrachtet. *Eine statistisch aussagefähige Betrachtung des möglichen Einflusses von Tabakrauchen konnte allerdings nicht erfolgen, da - anders als initial geplant - das Rauchverhalten nicht in allen Probanden-Fällen erfaßbar war und zum anderen ein unproportional kleiner Anteil von Rauchern im Kollektiv - insbesondere der schwer aquirierbaren hochbetagten Probanden - gegeben war.*

5.3 Möglicher Einfluß des Geschlechts auf das Auftreten einer Mosaik-Trisomie 7

Von verschiedenen gesundheitlichen Störungen wie auch physiologischen Grundcharakteristika ist bekannt, daß geschlechtsspezifische Einflußfaktoren vorliegen. In der hier vorliegenden Studie wurden in beiden Kollektiven weibliche und männliche Probanden in annähernd gleichen Anteilen einbezogen. Bei der Gesamtanalyse der männlichen versus weiblichen Probanden ließen sich *keine statistisch signifikanten generellen geschlechtsspezifischen Unterschiede* bezüglich Trisomie 7-Häufigkeit und Trisomie 7-Raten erkennen. Bei der Gesamtzahl der Männer (n = 27) ergaben sich 25,9% mit einer Trisomie 7 in Zellen der Mundschleimhaut, bei den Frauen (n = 36) 36,1%. Bei den älteren Probanden erscheint zwar die durchschnittliche Trisomie-7-Rate bei den männlichen Probanden höher, dies beruht allerdings auf einem einzigen männlichen Probanden, der mit 20% bezüglich Chromosom 7- trisomer Zellen deutlich überdurchschnittlich war.

5.4 Möglicher Einfluß des Rauchens auf das Auftreten einer Mosaik-Trisomie 7

Zigaretten enthalten viele Inhaltstoffe, die auf die Zellen in unterschiedlicher Weise wirken. Zudem entstehen im Rahmen der Verbrennung kanzerogene d.h. mutagene Substanzen. Auch die Aufnahme dieser Stoffe, die hauptsächlich über die Schleimhaut der Atemwege und Mundhöhle erfolgt, ist variabel zwischen den

Individuen. Sie könnte zu chromosomalen Veränderungen führen. Auch denkbar ist, daß durch die Noxen des Tabakrauches häufiger Zellen absterben und durch regenerative Zellteilung neue Zellen entstehen. In einer Untersuchung an gesunden Rauchern wurden im Bronchialepithel u.a. Zellen mit einer Trisomie 7 nachgewiesen, dahingegen waren in der Vergleichsgruppe der Nichtraucher keine derartigen Zellen vorhanden⁶¹. Dies spricht für eine mit dem Rauchverhalten einhergehende Veränderung der Zellen, die zu einer Trisomie 7 führen kann. In der vorliegenden Arbeit waren jedoch zu wenige Raucher eingeschlossen, um eine validierte Aussage zum ursächlichen Zusammenhang zwischen Auftreten und Häufigkeit der Trisomie 7 und der Zigarettenrauch-exposition treffen zu können.

Die ursprünglich geplante Einschätzung der Einflußnahme des Rauchens (Zigaretten- und Zigarrenrauchen) auf das Vorliegen einer Trisomie 7 konnte wegen mangelnder Anzahl an Rauchern nicht mit verwertbarer Aussagekraft durchgeführt werden. Beschränkte Einzelbeobachtungen zu diesem Aspekt wurden allerdings erhoben. Bei den zwei bekannten Rauchern des Kollektivs alter Probanden lag das „Trisomie-7-Niveau“ unterhalb des cut off levels, d.h. es wurde keine Mosaik-Trisomie 7 nachgewiesen. Bei dem Kollektiv jüngerer Probanden waren nur vier Raucher vertreten, deren Werte alle ebenfalls unterhalb des cut off levels lagen.

Das Individuum mit den höchsten Trisomie-7-Werten (20%) war männlich, 89 Jahre alt und hatte 25 Jahren zuvor mit dem Rauchen aufgehört. Hier sind mit größerer Wahrscheinlichkeit andere ursächliche Faktoren für das Auftreten und die quantitative Ausprägung der Mosaik-Trisomie 7 anzunehmen. Denkbar wäre im konkreten Einzelfall grundsätzlich auch, daß es im Prozeß der Regeneration nach Beendigung des Rauchens bzw. Nikotinkonsums zu diesen hohen Werten gekommen ist.

Die konkreten Beobachtungen im Einzelfall der Mundschleimhautstudie konnten die erhobenen Befunde aus publizierten Berichten (siehe oben) an Bronchial-Epithelien nicht belegen.

5.5 Mögliche Gewebetypspezifität einer Trisomie 7

In zwei kleineren Studien der eigenen Arbeitsgruppe an sehr alten gesunden Individuen (> 75 Jahre) konnte jeweils in Blutzellen das Phänomen der Mosaik-

Trisomie 7 in keinem Fall nachgewiesen werden. Bei vergleichender Analyse von drei verschiedenen Gewebetypen (Blutzellen, Haarwurzeln und Zellen der Mundschleimhaut) in einer Studie, wurde bei 15 sehr alten Individuen (> 75 Jahre) nur in Zellen der Mundschleimhaut, aber nicht in Blutzellen eine Trisomie 7 gefunden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die Trisomie 7 in unterschiedlichen Gewebetypen (z.B. Synovia, Mundschleimhaut, Lymphozyten) eine unterschiedliche Akzeptanz erfährt bzw. positiv oder im umgekehrten Fall (z.B. Lymphozyten) u.U. auch negativ selektiert wird. Als umgekehrtes Phänomen an prämaligen weißen Blutzellen findet man eine Monosomie von Chromosom 7 bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (eine Leukämievorstufe) als regelmäßige Beobachtung^{1, 100}.

5.6 Möglicher Entstehungsmechanismus der Mosaik-Trisomie 7

Die Mosaik-Trisomie des Chromosoms 7 ist ein vielfältiges Phänomen, das in unterschiedlichen Geweben und Konditionen beobachtet wurde. Hierbei sind maligne wie benigne veränderte Gewebe an erster Stelle zu nennen. In Blutzellen kann eine Monosomie 7 in verschiedenen malignen oder prämaligen Konditionen gefunden werden (siehe oben). Eine Trisomie 7 ist dagegen auch bei Leukämien nicht bekannt, was die o.g. internen Ergebnisse dahingehend bestätigt, daß weiße Blutzellen offensichtlich nicht „anfällig“ sind für eine Trisomie 7 oder, daß diese dort negativ selektiert wird. Bei bestimmten malignen Tumoren z.B. Hirntumoren und Nierenzellkarzinomen scheint die Trisomie 7 dagegen pathognomonisch.

Im Rahmen der mitotischen Trisomie 7-Entstehung im Rahmen eines Non-Disjunction ist grundsätzlich auch die Entstehung einer 7-monosomen Zelle zu postulieren. In unserer FISH-Studie wurde im Vergleich zum jeweiligen Kontrollchromosom auch in Fällen mit relativ hoher Mosaik-Trisomie -7-Rate umgekehrt keine Häufung von Zellen mit lediglich einem Chromosom 7-Signal im Sinne einer Monosomie 7 beobachtet. Dies wäre mit der Genese über eine selektive Endoreduplikation von Chromosom 7 ebenso vereinbar wie mit einer gewebetypspezifisch negativen Selektion bezüglich Monosomie 7 in der Mundschleimhaut (also genau umgekehrt wie in der obigen Hypothese zum Auftreten von Monosomie bzw. Trisomie 7 in weißen Blutzellen).

Aus der Zusammenschau der Vielzahl an Daten ist es möglich, daß einer Mosaik-Trisomie 7 u.U. unterschiedliche Bedeutung in bestimmten Zustandsformen von Geweben zukommt. In nicht maligne veränderten Geweben könnte z.B. ein gewebespezifischer selektiver Vorteil die Ausweitung und Vermehrung 7-trisomer Zellen begünstigen. Auch in normalen Geweben kann- ggf. unter speziellen Umständen wie z.B. einem chronischem Reizzustand- ein erhöhter selektiver Druck bestehen. Für die Mundschleimhaut, ein über die Lebenszeit anhaltend hoch regeneratives Gewebe, wären solche Selektionsfaktoren allein schon durch die hohe basale Regenerationsleistung gegeben. In diesem Rahmen könnte sowohl die basale Neuentstehungsrate somatischer Chromosomenstörungen gesteigert, als auch eine Selektion einer bereits entstandenen Chromosomenanomalie begünstigt werden. Weitere individuelle Provokationsfaktoren könnten zusätzlich einwirken.

Fazit, da die Mosaik-Trisomie 7 in einer Vielzahl unterschiedlicher Zell- und Gewebetypen beobachtet wird, kann im engeren Sinne keine Gewebetypspezifität für Zellen der Mundschleimhaut vorliegen. Im erweiterten Sinne läßt sich allerdings über ein nur in bestimmten Geweben auftretendes Phänomen im Sinne einer *Gewebepräferenz* für einzelne oder mehrere Gewebetypen nachdenken. Der Grund hierfür ist noch nicht bekannt. Es wird auf mögliche Ursachen in den folgenden Punkten eingegangen. Ein Phänomen, das reproduzierbar immerhin bei einem Drittel der untersuchten Probanden vorkommt, ist zu häufig um es als zufälliges Ereignis anzusehen.

5.7 Proliferativer Selektionsvorteil der Mosaik-Trisomie 7

Da in vielen tumorösen Geweben eine Trisomie 7 gefunden wird, genau wie in nichtneoplastischen Geweben, die bezüglich einer erhöhten Proliferationstendenz Ähnlichkeiten mit malignen Geweben haben (z.B. rheumatisches Pannusgewebe³⁸), ist es denkbar, daß eine Trisomie 7 einen Wachstumsvorteil für das Gewebe beziehungsweise einen Proliferationsvorteil für eine Zelle darstellt. Insbesondere im Rahmen chronisch entzündlicher Vorgänge bzw. bei Konditionen mit erhöhter Zellproliferation (z.B. Keloide, arthrotische Plaques und proliferativer rheumatischer Pannus- alles Konditionen, bei welchen bereits das Vorkommen der Mosaik-Trisomie 7 beschrieben wurde) könnte ein selektiver Vorteil für 7-trisome Zellen bestehen.

Auf Chromosom 7 ist eine Reihe von Genen lokalisiert, die mit Zellwachstum oder Entzündungsvorgängen assoziiert sind, wie z.B. Epidermal growth factor EGFR, hepatocyte growth factor receptor HGFR⁵⁰, platelet derived growth factor beta PDGF⁶, Interleukin 6 IL6³⁹.

Im Rahmen einer Trisomie 7 wurde nachgewiesen, daß auch die Expression z.B. von EGFR gemäß der erhöhten Kopienzahl zunimmt, was einen zusätzlichen Wachstumsvorteil verursacht. Letzteres konnte insbesondere für Zellen in späten Stadien der Tumorgenese belegt werden⁵⁴. Allerdings muß eine numerische Veränderung des Chromosom 7 in Tumoren nicht unbedingt mit einer erhöhten Genkopienzahl des EGFR Gens einhergehen^{3, 12, 86}. An Abortgewebe mit reiner Trisomie 7 konnte gezeigt werden, daß die DNA-Syntheserate und die zelluläre Proliferation gesteigert waren¹⁰¹. In einer Studie mit Hautfibroblasten eines hundertjährigen Probanden wurden verschiedene numerische Chromosomenanomalien gefunden, hierbei wiederum am häufigsten die Trisomie 7⁷². Die Zellen überholten im in vitro Versuch die disomen Zellen an Wachstum. Diese Fallstudie bestätigt den Verdacht auf eine Altersassoziation und einen postulierten Selektionsvorteil der Mosaik-Trisomie 7, der auch hier ein vielbeanspruchtes Gewebe betrifft.

In menschlichen neuralen Progenitorzellen (human neural progenitor cells) wurde neben einer Mosaik-Trisomie des Chromosoms 19 auch in 24% der Zelllinien eine Mosaik-Trisomie des Chromosoms 7 festgestellt, die in vitro zu einer erhöhten EGFR Expression führte. Weiterhin waren auch andere für das Wachstum bzw. die Zellalterung verantwortliche Mechanismen verstärkt aktiv wie zum Beispiel die Telomerase-Aktivität. Eine verstärkte Proliferation und Überlebenszeit der betroffenen Zellen war zu beobachten. Die Unterdrückung des endothelial derived factors bewirkte ein verstärktes Vorkommen einer Trisomie 7 in ehemals disomen Zelllinien⁸⁵.

5.8 Andere mögliche Ursachen einer Chromosomenveränderung

Es ist denkbar, daß viele Faktoren grundsätzlich die Mutationsrate und Zellproliferation in der Mundhöhle beeinflussen können, so zum Beispiel die Temperatur der Nahrung, Nahrungszusätze wie z.B. Konservierungsmittel oder Farbstoffe, Gewürze oder auch die Konsistenz. Wichtig wäre auch die Auslöser eines

vermehrten Zellverlustes (mechanische Abschilferung oder Apoptose) und damit einer erhöhten Neubildung zu untersuchen. Mögliche relevante Aspekte in der Mundhöhle wären z.B. eine vermehrte mechanische Belastung mit Abrieb u.a. bei scharfkantigen Zähnen oder Zahnprothesen (siehe unten) oder der u.U. zytotoxische oder mutagene Einfluß besonders heißen oder scharfen Essens, des Alkoholkonsums oder des Tabakrauchens.

Durch äußere, insbesondere chronische Einwirkungen, sei es durch wiederholte Verletzungen, Piercings oder auch durch den Druck einer Tabakpfeife, die immer an der gleichen Stelle liegt, kann es zu genetischen Veränderungen u.a. auch zu Chromosomenstörungen kommen^{10,36}.

Auch andere, die natürliche Situation in der Mundhöhle verändernde Faktoren, wie ein Prothese oder eine Zahnspange bei sehr jungen Probanden sollten berücksichtigt werden. Hieraus ließen sich unter Umständen Hinweise auf eine erhöhte Abschilferung und damit vermehrte Zell-Neubildung ableiten. Eine Aufteilung in Prothesenträger und solche, die keine Prothese haben, erfolgte in der dargestellten Arbeit nicht. Andererseits wäre im älteren Kollektiv A in weitaus höherem Umfang mit dem Tragen einer Prothese zu rechnen, während dies im jüngeren Kollektiv nicht zu erwarten war. Der Alkoholkonsum sowie Essensgewohnheiten gingen nicht in die Studie ein, da die Datenerhebung im Rahmen der Probengewinnung aus praktischen Aspekten der Durchführung eingeschränkt war.

Krankhafte Prozesse, die zu Entzündungen im Mundbereich führen, könnten grundsätzlich auch die Mutationsrate erhöhen. Dies konnten wir bei unseren Probanden ausschließen.

Auch in Zellen aus fibrösen artherosklerotischen Plaques wurden in Zellkulturen einzelne Zellklone gefunden, die eine Trisomie 7 z.T. in Kombination mit dem Verlust des Y Chromosoms oder mit einer Trisomie 10 und Trisomie 18 aufwiesen. Casalone et al. gehen davon aus, daß mechanische oder biologische Veränderungen zunächst zur Ausbildung der Plaques führen und diese dann sekundär eine erhöhte Tendenz zur chromosomalen Instabilität und somit Chromosomenanomalien entwickeln¹⁹.

Weitere theoretisch kausative Faktoren bei der Entstehung einer Mosaik-Trisomie 7 wäre ggf. auch die Kontamination von Nahrungsmitteln, etwa durch Isotope⁸⁸ oder ggf. mutagene Substanzen⁸⁹.

Entsprechende individuelle Risikofaktoren lassen sich mithilfe des hier vorgestellten Studiendesigns allerdings nicht geeignet statistisch abbilden. Das etwaige Vorkommen einer diskreten Erhöhung der Trisomie-7-Raten bei Personen höheren Alters mag unter Umständen auch durch vielfältige derartige individuelle Faktoren der Lebensführung erklärbar sein. Individuelle biologische Faktoren, die mit einer erhöhten chromosomalen Instabilität einhergehen, sind in jedem Falle möglich.

Auch am Arbeitsplatz können Stoffe zur Entstehung von zellulären genetischen Veränderungen beigetragen haben³⁴. Verschiedene Erkrankungen der Mundhöhle, zum Beispiel Parodontose, können u.a. mittels Laser behandelt werden³¹. Hierbei ist es denkbar, daß sich durch diese physikalische Reizung chromosomale Veränderungen ergeben. Letztlich könnte auch die individuelle bakterielle Mundflora mit mehr oder weniger entzündlicher Aktivität eine individuelle Variable in diesem Zusammenhang darstellen.

Insgesamt ist die Mundhöhle einer Vielzahl von schädigenden Stoffen ausgesetzt. Jedoch nicht bei jedem Menschen in gleicher Menge, Konzentration und Dauer, daher kann auch eine starke individuelle Komponente mitwirken, die bei dem einen Probanden eher zum Auftreten einer Mutation führte als bei einem anderen. Jeder der genannten Aspekte könnte in weitergehender Untersuchung auf die Möglichkeit eines kausalen Einflusses mit Bezug auf die Entstehung von Chromosomenanomalien speziell der Mosaik-Trisomie 7 untersucht werden.

5.9 Bewertung der Nachweismethode

5.9.1 Mundschleimhautabstrich

Das Probenmaterial wurde, wie oben erwähnt aus der Wangenschleimhaut gewonnen. Bei im Mosaik vorliegenden Veränderungen, gerade im Rahmen eines klonalen Ereignisses, ist es möglich, daß bei der Anfertigung des Mundschleimhautabstrichs regional fokussiert vorliegende Areale mit hoher Trisomie 7-Rate erfasst wurden. Dies könnte im Einzelfall sehr hohe Trisomie-7-Raten wie auch in dieser Studie bei einzelnen Probanden beobachtet verursachen.

Andererseits bietet die Methode der Interphase-Analyse an direkt ausgestrichenen unkultivierten Zellen die Vermeidung möglicher Selektionsartefakte, die im Rahmen von Zellkultivierung entstehen können.

5.9.2 Interphase-FISH

Es gibt unterschiedliche methodische Möglichkeiten um DNA-Sequenzen oder vollständige Gene quantitativ oder qualitativ nachzuweisen. Hierzu zählen u.a. Southern-Blot-Analyse, PCR-Analysen, die Pulsed-field Gel Elektrophorese (PFGE) und die **Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplifikation (MLPA)** und auch die **Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**⁹².

Die eindeutigen Vorteile der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Gegensatz zu den rein molekulargenetischen DNA-Nachweisverfahren liegen darin, daß die Untersuchung in situ und somit auf Einzelzellebene und ohne Amplifikation der untersuchten DNA-Sequenzen erfolgt. Im Gegensatz zur konventionellen zytogenetischen Analyse ist mittels FISH die Analyse chromosomaler Anteile auch an teilungsinaktiven oder fixierten Interphasezellen möglich. Die Sensitivität ist hoch, so daß auch kleine DNA-Abschnitte zuverlässig nachgewiesen werden können⁹⁶. Weiterhin ist die Interphase-FISH eine kulturunabhängige Methode. Eine Kultivierung der Zellen zur Präparation der Chromosomen wie bei der konventionellen Karyotypisierung ist bei Interphase-Analysen nicht erforderlich. Allerdings ist eine Selektion der analysierten Zellen im Rahmen der Zellkultivierung ausgeschlossen.

Einerseits von Vorteil, bietet allerdings der indirekte Chromosomennachweis mittels FISH an Interphasekernen auch Fehler-Potential. In Abhängigkeit von der SONDENSPEZIFITÄT und eingesetzten Stringenzbedingungen im Rahmen der Hybridisierung kann es zu Kreuzhybridisierung mit sequenzähnlichen DNA-Abschnitten kommen. Da es bei der FISH-Analyse an Interphasekernen zur Auswertung lediglich der Fluoreszenzsignale kommt, ohne daß die chromosomalen Strukturen sichtbar zugeordnet werden können, besteht hier die Gefahr falsch-positiver bzw. Anzahl-überschätzender Befunde. Um dieses methodisch bedingte Fehlerpotential so gering wie möglich zu halten, wurden durch Vorversuche an Lymphozyten die Hybridisierungsbedingungen (Stringenzbedingungen) für die eingesetzten Sonden so etabliert, daß eine hochspezifische Hybridisierung bei limitierter Kreuzhybridisierung erzielt wurde.

Neben der Gefahr von Kreuzhybridisierungen bestehen insbesondere bei Hybridisierung an Interphasekernen mögliche Probleme bei der Signalinterpretation. Bei FISH an Zellkernen nach Durchlaufen der S-Phase können z.B. die zentromernahen Repeat-Areale (Zielsequenzen der hier verwendeten Satelliten-DNA-Sonden), als sog. Split-Spots gedoppelt zur Darstellung kommen. Hier besteht

die Gefahr einer zahlenmäßigen Überwertung von FISH-Signalen. In Sichtebeine übereinander lokalisierte Zentromersignale zweier Chromosomen können dagegen u.U. nicht differenziert werden, was zur Unterbewertung der Signalzahl führt⁴⁶. Zur Begrenzung entsprechender methodisch bedingter Auswertungsfehler wurden dabei empirisch entwickelte Auswertungskriterien (siehe Material und Methoden Abschnitt 3.5) etabliert und angewandt. Bei unzureichender Hybridisierungseffizienz könnte es ggf. zu einer Signalreduktion mit Erfassung relativ geringerer Chromosomenanzahl im Sinne falsch-negativer Ergebnisse kommen. Die Kohybridisierung mit Sonden für jeweils ein Kontrollchromosom diente – neben dem inhaltlich erwünschten Informationsgewinn zu numerischer Abweichung anderer Chromosomen als Chromosom 7- als interne Kontrolle von sowohl Hybridisierungseffizienz als auch Auswertungsfehlern. Da Trisomien der Chromosomen 8 und 12 bekanntermaßen selten sind und bisher in Mundschleimhautabstrichen nicht beschrieben sind, verwundern die niedrigen Prozentwerte der ermittelten Mosaik-Trisomie-Raten nicht und spiegeln die Verlässlichkeit der Untersuchungsmethode wieder. Einzelne, nicht auszuschließende Signal-Fehlinterpretationen wurden mithilfe des eingesetzten cut-off-levels nivelliert. Letzterer wurde aus Daten der Interphase-FISH an Lymphozyten übernommen, wo der Falsch-positiv/negativ-Effekt der FISH durch die parallele Analyse von Metaphasechromosomen ermittelt werden konnte.

Schlußfolgerung

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß eine Mosaik-Trisomie des Chromosoms 7 in Zellen der Mundschleimhaut vorkommt und ein häufiges Ereignis darstellt. Eine Krankheitsassoziation konnte nicht festgestellt werden, da bei den Probanden per Einschlußkriterium keine gemeinsamen Erkrankungen vorlagen und keiner der Probanden Erkrankungen im Mund- und Rachenraum hatte. In der Literatur wird die Mosaik-Trisomie 7 verschiedenen Geweben bzw. Gewebekonditionen zugeordnet. Sie tritt in malignen oder benignen Tumoren wie in entzündlich verändertem Gewebe oder auch in scheinbar nicht verändertem Gewebe auf, hierzu zählt auch die Mundschleimhaut. Warum wird diese Abweichung von der Norm nicht wie viele andere durch sofortige Apoptose der Zelle gestoppt? Häufig ist ein Proliferationsvorteil in vitro nachgewiesen, meist durch erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren. Das betroffene Gewebe hat also Vorteile durch die Mutation.

Welcher Art diese Vorteile im konkreten Fall der Trisomie 7 sind, darüber kann man derzeit nur spekulieren. Durch die vielen wachstumsassoziierten Gene, die auf Chromosom 7 lokalisiert sind und die hiermit verbundenen Proliferationsvorteile, könnte bei Schädigung von Zellen durch äußere Faktoren (z.B. mechanische, thermische oder chemische Einflüsse in der Mundhöhle) durch 7-trisome Zellen eine schnellere Regeneration des Gewebes gewährleistet werden.

Für die Mosaik-Trisomie-7 wurde bisher keine Gewebespezifität nachgewiesen. Es gibt Gewebetypen, in denen eine Trisomie 7 bisher nur von unserer Arbeitsgruppe publiziert wurde, wie beispielsweise in der Mundschleimhaut gesunder Probanden. Den normalen Geweben, in denen die Mosaik-Trisomie 7 nachgewiesen werden konnte, ist folgendes Charakteristikum gemeinsam: eine hohe mechanische, chemische oder physikalische Belastung oder eine physiologisch hohe proliferative Tendenz und damit ein erhöhtes Mutationsrisiko genau wie erhöhte Regenerations- oder Proliferationsraten.

Die Mosaik-Trisomie des Chromosoms 7 in Zellen der Mundschleimhaut kommt sowohl bei jungen als auch bei älteren Probanden häufig vor. Bisher nicht bekannt ist ob ein Auftreten in Zellen der Mundschleimhaut bei Kindern existiert. Eine quantitative oder qualitative Altersabhängigkeit bezogen auf den prozentualen Mosaik-Anteil konnte in den beiden untersuchten Probandenkollektiven für die Mundschleimhaut nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Anzahl hinsichtlich Chromosom 7 trisomer Zellen pro Individuum lag bei den sehr alten Individuen (Kollektiv A) tendenziell etwas höher als bei den relativ jüngeren Probanden (Kollektiv B). Letztere zeigten jedoch gegenüber Kollektiv A häufiger das generelle Phänomen der Mosaik-Trisomie 7.

Als potentielle Ursache für die erhöhten prozentualen Anteile von Trisomie 7-Zellen bei den sehr alten Probanden erscheinen selektive oder kumulative Faktoren möglich. Die primäre Ursache des qualitativen Phänomens der Mosaik-Trisomie 7 ist ungeklärt. Besonders bestimmte einzelne Individuen scheinen zu einer hohen Rate an 7-trisomen Zellen zu neigen. Neben einer gewebetypischen Selektion sind daher darüber hinaus wesentliche, bislang nicht erfasste individualspezifische Gründe zu postulieren. In Anbetracht des im Rahmen der Studienbedingungen speziell im alten Kollektiv guten Gesundheitszustandes und fehlender sichtbarer Erkrankungen der Mundschleimhaut der Probanden scheint die Mosaik-Trisomie 7 der Mundschleimhaut ohne belegten Krankheitswert zu sein. Möglicherweise spiegelt die

Mosaik-Trisomie 7 ein kumulatives Phänomen nach vorangegangener Entstehung unter individualspezifischen Bedingungen und selektivem Regenerationsdruck in besonders beanspruchtem Gewebe wieder. Weitere Studien sind erforderlich um dies zu klären.

6. Literatur

- [1] Aktas D, Tuncbilek E (2006) Myelodysplastic syndrome associated with monosomy 7 in childhood: a retrospective study. *Cancer Genet Cytogenet* 171: 72-5
- [2] Alcaraz A, Barranco MA, Corral JM, Ribal MJ, Carrio A, Mallofre C, Llopis J, Cetina A, Alvarez-Vijande R (2001) High-grade prostate intraepithelial neoplasia shares cytogenetic alterations with invasive prostate cancer. *Prostate* 47: 29-35
- [3] Amare Kadam PS, Varghese C, Bharde SH, Narasimhamoorthy NK, Desai S, Advani SH, Havaladar R, Kulkarni JN (2001) Proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor receptor (EGFR) status in renal cell carcinoma patients with polysomy of chromosome 7. *Cancer Genet Cytogenet* 125: 139-46
- [4] Amiel A, Leopold L, Gronich N, Yukla M, Fejgin MD, Lishner M (2006) The influence of different chromosomal aberrations on molecular cytogenetic parameters in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 167: 145-9
- [5] Anatskaya OV, Vinogradov AE (2007) Genome multiplication as adaptation to tissue survival: evidence from gene expression in mammalian heart and liver. *Genomics* 89: 70-80
- [6] Antoniades HN (1991) PDGF: a multifunctional growth factor. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 5: 595-613
- [7] Athanasiadis AP, Zafrakas M, Polychronou P, Florentin-Arar L, Papasozomenou P, Norbury G, Bontis JN (2008) Apert syndrome: the current role of prenatal ultrasound and genetic analysis in diagnosis and counseling. *Fetal Diagn Ther* 24: 495-8
- [8] Bardi G, Pandis N, Fenger C, Heim S (1995) Trisomy 7 as the sole cytogenetic aberration in the epithelial component of a colonic adenoma. *Cancer Genet Cytogenet* 82: 82-84

- [9] Bardi G, Johansson B, Pandis N, Heim S, Mandahl N, Holmin T, Andren-Sandberg A, Hagerstrand I, Mitelman F (1992) Trisomy 7 in nonneoplastic focal steatosis of the liver. *Cancer Genet Cytogenet* 63: 22-4
- [10] Baric JM, Alman JE, Feldman RS, Chauncey HH (1982) Influence of cigarette, pipe, and cigar smoking, removable partial dentures, and age on oral leukoplakia. *J Surg Oral Med Oral Pathol* 54: 424-9
- [11] Belge G, Roque L, Thode B, Fonseca E, Soares J, Clode A, Bartnitzke S, Castedo S, Bullerdiek J (1997) Cytogenetic changes in benign thyroid gland hyperplasias and adenomas correlated with histology. *Verh Dtsch Ges Pathol* 81: 151-6
- [12] Bigner SH, Wong AJ, Mark J, Muhlbaier LH, Kinzler KW, Vogelstein B, Bigner DD (1987) Relationship between gene amplification and chromosomal deviations in malignant human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 29: 165-70
- [13] Boulard S, Diene G, Barat R, Oliver I, Pienkowski C, Lacombe D, Vincent MC, Bourrouillou G, Tauber M (2006) A case of trisomy 12 mosaicism with pituitary malformation and polycystic ovary syndrome. *Genet Couns* 17: 173-83
- [14] Bridge JA, Sanger WG, Shaffer B, Neff JR (1987) Cytogenetic findings in malignant fibrous histiocytoma. *Cancer Genet Cytogenet* 29: 97-102
- [15] Broberg K, Hoglund M, Lindstrand A, Toksvig-Larsen S, Mandahl N, Mertens F (1998) Polyclonal expansion of cells with trisomy 7 in synovia from patients with osteoarthritis. *Cytogenet Cell Genet* 83: 30-4
- [16] Broberg K, Limon J, Palsson E, Lindstrand A, Toksvig-Larsen S, Mandahl N, Mertens F (1997) Clonal chromosome aberrations are present in vivo in synovia and osteophytes from patients with osteoarthritis. *Hum Genet* 101: 295-8
- [17] Broberg K, Toksvig-Larsen S, Lindstrand A, Mertens F (2001) Trisomy 7 accumulates with age in solid tumors and non-neoplastic synovia. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 310-5

- [18] Bullerdiek J, Leuschner E, Taquia E, Bonk U, Bartnitzke S Trisomy 8 as a recurrent clonal abnormality in breast cancer? (1993) *Cancer Genet Cytogenet* 65: 64-7
- [19] Casalone R, Granata P, Minelli E, Portentoso P, Giudici A, Righi R, Castelli P, Socrate A, Frigerio B (1991) Cytogenetic analysis reveals clonal proliferation of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques. *Hum Genet* 87: 139-43
- [20] Castel Y, Le Marec B, Toudic L, Lemarchand M Cosson JP (1983) Association of trisomy 21 and gonosomal trisomy. Apropos of 2 cases. *Pediatric* 38: 235-41
- [21] Chandley AC, Hargreave TB, Fletcher JM, Soos M, Axworthy D, Price WH (1980) Trisomy 8. Report of a mosaic human male with near-normal phenotype and normal IQ, ascertained through infertility. *Hum Genet* 55: 31-8
- [22] Chen CP, Chen M, Pan YJ, Su YN, Chern SR, Tsai FJ, Chen YT, Wang W (2011) Prenatal diagnosis of mosaic trisomy 8: clinical report and literature review. *Taiwan J Obstet Gynecol* 50: 331-8
- [23] Cheung AH, Stewart RJ, Marsden PA (1998) Endothelial Tie2/Tek ligands angiopoietin-1 (ANGPT1) and angiopoietin-2 (ANGPT2): regional localization of the human genes to 8q22.3-q23 and 8p23. *Genomics* 48: 389-91
- [24] Chuhunkova TV, Lial'ko II, Dubrovna OV (2006) Cytogenetical peculiarities of tetraploid sugar beet pollinators. *Tsitol Genet* 40: 37-42
- [25] Corzo C, Tusquets I, Salido M, Corominas JM, Bellet M, Suarez M, Baro T, Fabregat X, Serrano S, Sole F (2005) Characterization of HER1 (c-erbB1) status in locally advanced breast cancer using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Tumour Biol* 26: 25-30
- [26] Cui J, Deubler DA, Rohr LR, Zhu XL, Maxwell TM, Changus JE, Brothman AR (1998) Chromosome 7 abnormalities in prostate cancer detected by

- dual-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 107: 51-60
- [27] Dahlen A, Broberg K, Domanski HA, Toksvig-Larsen S, Lindstrand A, Mandahl N, Mertens F (2001) Analysis of the distribution and frequency of trisomy 7 in vivo in synovia from patients with osteoarthritis and pigmented villonodular synovitis. *Cancer Genet Cytogenet* 131: 19-24
- [28] Dal Cin P, Aly MS, Delaie J, Ceuppens JL, Van Gool S, Van Damme B, Baert L, Van Poppel H, Can den Berghe H (1992) Trisomy 7 and trisomy 10 characterize subpopulations of tumor-infiltration lymphocytes in kidney tumors and in the surrounding kidney tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9744-8
- [29] Dal Cin P, De Smet L, Sciot R, Van Damme B, Van den Berghe H (1999) Trisomy 7 and trisomy 8 in dividing and non-dividing tumor cells in Dupuytren's disease. *Cancer Genet Cytogenet* 108: 137-40
- [30] Dalben Gda S, das Neves LT, Gomide MR (2006) Oral findings in patients with Apert syndrome. *J Appl Oral Sci* 14: 465-9
- [31] Damante CA, Greggi SL, Sant'Ana AC, Passanezi E, Taga R (2004) Histomorphometric study of the healing of human oral mucosa after gingivoplasty and low-level laser therapy. *Lasers Surg Med* 35: 377-84
- [32] Del Mazo J, Abrisqueta JA (1979) Maternal origin of a trisomy 7 in a spontaneous abortus. *Obstet Gynecol* 53: 18-20
- [33] Dereser-Dennl M, Brude E, König R (2000) Hypomelanosis Ito in translocation trisomy 9/mosaicism (46,XX/46,XX,t (9;9) (p24;p24)). Spontaneous remission in childhood. *Hautarzt* 51: 688-92
- [34] Deschamps F, Barouh M, Deslee G, Prevost A, Munck JN (2006) Estimates of work-related cancers in workers exposed to carcinogens. *Occup Med (Lond)* 56: 204-9
- [35] Drieschner N, Belge G, Rippe V, Meiboom M, Loeschke S, Bullerdiek J (2006) Evidence for a 3p25 breakpoint hot spot region in thyroid tumors of follicular origin. *Thyroid* 16: 1091-6

- [36] El-Hakim IE, Uthman MA (1999) Squamous cell carcinoma and keratoacanthoma of the lower lip associated with "Goza" and "Shisha" smoking. *Int J Dermatol* 38: 108-10
- [37] Ensenauer RE, Shaughnessy WJ, Jalal SM, Dawson DB, Courteau LK, Ellison JW (2005) Trisomy 20 mosaicism caused by a maternal meiosis II error is associated with normal intellect but multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet A* 134: 202-6
- [38] Ermis A, Henn W, Remberger K, Hopf C, Hopf T, Zang KD (1995) Proliferation enhancement by spontaneous multiplication of chromosome 7 in rheumatic synovial cells in vitro. *Hum Genet* 96: 651-54
- [39] Fiedler W, Weh HJ, Suciu E, Wittlief C, Stocking C, Hossfeld DK (1990) The IL-6 gene but not the IL-6 receptor gene is occasionally rearranged in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 4: 462-5
- [40] Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ (2011) The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 469: 2706-15
- [41] Garewal H, Meltzer P, Trent J, Prabhala R, Sampliner R, Korc M (1990) Epidermal growth factor receptor overexpression and trisomy 7 in a case of Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 35: 1115-1120
- [42] Gobbo César AC, de Freitas Calmon M, Cury PM, Caetano A, Borim AA, Silva AE (2006) Genetic alterations in benign lesions: chronic gastritis and gastric ulcer. *World J Gastroenterol* 12: 625-9
- [43] Gunawan B, Bergmann F, Braun S, Hemmerlein B, Ringert RH, Jakse G, Fuzesi L (1999) Polyploidization and losses of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, and 17 in three cases of chromophobe renal cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 110: 57-61
- [44] Guttenbach M, Koschorz B, Bernthaler U, Grimm T, Schmid M (1995) Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *Am J Hum Genet* 57: 1143-50

- [45] Hahnemann JM, Nir M, Friberg M, Engel U, Bugge M (2005) Trisomy 10 mosaicism and maternal uniparental disomy 10 in a liveborn infant with severe congenital malformations. *Am J Med Genet A* 138: 150-4
- [46] Higgins RA, Gunn SR, Robetorye RS (2008) Clinical application of array-based comparative genomic hybridization for the identification of prognostically important genetic alterations in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Diagn Ther* 12: 271-80
- [47] Janvier A, Farlow B, Wilfond BS (2012) The experience of families with children with trisomy 13 and 18 in social networks. *Pediatrics* 130: 293-8
- [48] John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 582-79
- [49] Jones L, Wei G, Sevcikova S, Phan V, Jain S, Shieh A, Wong JC, Li M, Dubansky J, Maunakea ML, Ochoa R, Zhu G, Tennant TR, Shannon KM, Lowe SW, Le Beau MM, Kogan SC (2010) Gain of MYC underlies recurrent trisomy of the MYC chromosome in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med* 207: 2581-94
- [50] Jücker M, Günther A, Gradl G, Fonatsch C, Krueger G, Diehl V, Tesch H (1994) The Met/hepatocyte growth factor receptor (HGFR) gene is overexpressed in some cases of human leukemia and lymphoma. *Leuk Res* 18: 7-16
- [51] Kattar MM, Grignon DJ, Wallis T, Haas GP, Sakr WA, Pontes JE, Visscher DW (1997) Clinicopathologic and interphase cytogenetic analysis of papillary (chromophilic) renal cell carcinoma. *Mod Pathol* 10: 1143-50
- [52] Keegan K, Rooke L, Hayman M, Spurr NK (1993) The fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) is assigned to human chromosome 4. *Cytogenet Cell Genet* 62: 172-5
- [53] Kondo I, Shimizu N (1983) Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13 leads to q22 region of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet* 35: 9-14

- [54] Koprowski H, Herlyn M, Balaban G, Parmiter A, Ross A, Nowell P (1985) Expression of the receptor for epidermal growth factor correlates with increased dosage of chromosome 7 in malignant melanoma. *Somat Cell Mol Genet* 11: 297-302
- [55] Kornberg RD, Lorch Y (1992) Chromatin structure and transcription. *Annu Cell Biol* 8: 563-587
- [56] Kukk E, Wartiovaara U, Gunji Y, Kaukonen J, Bühring HJ, Rappold I, Matikainen MT, Vihko P, Partanen J, Palotie A, Alitalo K, Alitalo R (1997) Analysis of Tie receptor tyrosine kinase in haemopoietic progenitor and leukaemia cells. *Br J Haematol* 98: 195–203
- [57] Kuliev AM, Kukhareno VI, Grinberg KN, Vasileysky SS, Terskikh VV, Stepanova LG (1973) Morphological, autoradiographic, immunochemical and cytochemical investigation of a cell strain with trisomy 7 from a spontaneous abortus. *Humangenetik* 17: 285-96
- [58] Landegent JE, Jasen in de Wal N, Baan RA, Hoeijmakers JH, Van der Ploeg M (1984) 2-Acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences. *Exp Cell Res* 153: 61-72
- [59] Lau LC, Kee SK, Tien SL, Koh Mickey BC (2007) Trisomy 8 as sole cytogenetic abnormality in a case of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 172: 66-9
- [60] Leach NT, Rehder C, Jensen K, Holt S, Jackson-Cook C (2004) Human chromosomes with shorter telomeres and large heterochromatin regions have a higher frequency of acquired somatic cell aneuploidy. *Mech Ageing Dev* 125: 563-73
- [61] Lechner JF, Neft RE, Gilliland FD, Crowell RE, Auckley DH, Temes RT, Belinsky SA (1998) Individuals at high risk for lung cancer have airway epithelial cells with chromosome aberrations frequently found in lung tumor cells. *In Vivo* 12: 23-6

- [62] Ledbetter DH, Engel E (1995) Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Human Molecular Genetics* 4: 1757-1764
- [63] Li X, Galipeau PC, Sanchez CA, Blount PL, Maley CC, Arnaudo J, Peiffer DA, Pokholok D, Gunderson KL, Reid BJ (2008) Single nucleotide polymorphism-based genome-wide chromosome copy change, loss of heterozygosity, and aneuploidy in Barrett's esophagus neoplastic progression. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* 1: 413-23
- [64] Luo J, Stadler PF, He S, Meyer A (2007) PCR survey of hox genes in the goldfish *Carassius auratus auratus*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308: 250-8
- [65] Mark J, Dahlenfors R, Havel G, Bockmann P (1991) Benign parotid oncocytoma with the chromosomal abnormality trisomy 7. *Anticancer Res* 11: 1735-7
- [66] Mark J, Dahlenfors R (1986) Cytogenetical observations in 100 human benign pleomorphic adenomas: specificity of the chromosomal aberrations and their relationship to sites of localized oncogenes. *Anticancer Res* 6: 299-308
- [67] Matsuyama H, Bergerheim US, Nilsson I, Pan Y, Skoog L, Tribukait B, Ekman P (1994) Nonrandom numerical aberrations of chromosomes 7, 9, and 10 in DNA-diploid bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 77: 118-24
- [68] Maturri L, Cazzullo A, Turconi P, Lavezzi AM, Vandone PL, Gabrielli L, Fernandez Alonso Grana D, Milei J (2001) Chromosomal alterations in atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 154: 755-61
- [69] Mertens F, Palsson E, Lindstrand A, Toksvig-Larsen S, Knuutila S, Larramendy ML, el-Rifai W, Limon J, Mitelman F, Mandahl N (1996) Evidence of somatic mutations in osteoarthritis. *Hum Genet* 98: 651-6
- [70] Mian C, Bancher D, Kohlberger P, Kainz C, Haitel A, Czerwenka K, Stani J, Breitenecker G, Wiener H (1999) Fluorescence in situ hybridization in

cervical smears: detection of numerical aberrations of chromosomes 7, 3, and X and relationship to HPV infection. *Gynecol Oncol* 75: 41-6

- [71] Micale MA, Sanford JS, Powell IJ, Sakr WA, Wolman SR (1993) Defining the extent and nature of cytogenetic events in prostatic adenocarcinoma: paraffin FISH vs metaphase analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 69: 7-12
- [72] Mondello C, Moralli D, Franceschi C, Nuzzo F (1999) Occurrence and expansion of trisomy 7 in a fibroblast strain from a centenarian individual. *Exp Gerontol* 34: 715-19
- [73] Morava E, Varga L, Czakó M, Decsi T (2002) Maternal toxoplasma infection and mosaic trisomy 8 syndrome. *Orv Hetil* 143: 563-5
- [74] Mullis PE, Patel MS, Brickell PM, Hindmarsh PC, Brook CG (1991) Growth characteristics and response to growth hormone therapy in patients with hypochondroplasia: genetic linkage of the insulin-like growth factor I gene at chromosome 12q23 to the disease in a subgroup of these patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 34: 265-74
- [75] Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE *Oral and Maxillofacial Pathology (Second Edition)*, WB Saunders Company, Philadelphia, London, New York, 2002
- [76] Nilsson EM, Brokken LJ, Härkönen PL (2010) Fibroblast growth factor 8 increases breast cancer cell growth by promoting cell cycle progression and by protecting against cell death. *Exp Cell Res* 316: 800-12
- [77] Nusbaum C, Mikkelsen TS, Zody MC, Asakawa S, Taudien S, Garber M, Kodira CD, Schueler MG, Shimizu A, Whittaker CA, Chang JL, Cuomo CA, Dewar K, FitzGerald MG, Yang X, Allen NR, Anderson S, Asakawa T, Blechschmidt K, Bloom T, Borowsky ML, Butler J, Cook A, Corum B, DeArellano K, DeCaprio D, Dooley KT, Dorris L 3rd, Engels R, Glöckner G, Hafez N, Hagopian DS, Hall JL, Ishikawa SK, Jaffe DB, Kamat A, Kudoh J, Lehmann R, Lokitsang T, Macdonald P, Major JE, Matthews CD, Mauceli E, Menzel U, Mihalev AH, Minoshima S, Murayama Y, Naylor JW, Nicol R, Nguyen C, O'Leary SB, O'Neill K, Parker SC, Polley A, Raymond CK, Reichwald K, Rodriguez J, Sasaki T, Schilhabel M, Siddiqui R, Smith

- CL, Sneddon TP, Talamas JA, Tenzin P, Topham K, Venkataraman V, Wen G, Yamazaki S, Young SK, Zeng Q, Zimmer AR, Rosenthal A, Birren BW, Platzer M, Shimizu N, Lander ES (2006) DNA sequence and analysis of human chromosome 8. *Nature* 439: 331-5
- [78] Ohjimi Y, Iwasaki H, Ishiguro M, Kaneko Y, Tashiro H, Emoto G, Ogata K, Kikuchi M (1996) Short arm of chromosome 1 aberration recurrently found in pigmented villonodular synovitis. *Cancer Genet Cytogenet* 90: 80-5
- [79] Pardue ML, Gall JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations *Proc Natl Acad Sci U S A* 64: 600-4
- [80] Payson RA, Wu J, Liu Y, Chiu IM (1996) The human FGF-8 gene localizes on chromosome 10q24 and is subjected to induction by androgen in breast cancer cells. *Oncogene* 13: 47-53
- [81] Prowald A, Wemmert S, Biehl C, Storck S, Martin T, Henn W, Ketter R, Meese E, Zang KD, Steudel WI, Urbschat S (2005) Interstitial loss and gain of sequences on chromosome 22 in meningiomas with normal karyotype. *Int J Oncol* 26: 385-93
- [82] Riccardi VM (1977) Trisomy 8: an international study of 70 patients. *Birth Defects Orig Artic Ser* 13: 171-84
- [83] Rodriguez FJ, Scheithauer BW, Giannini C, Bryant SC, Jenkins RB (2008) Epithelial and pseudoepithelial differentiation in glioblastoma and gliosarcoma: a comparative morphologic and molecular genetic study. *Cancer* 113: 2779-89
- [84] Roque L, Serpa A, Clode A, Castedo S, Soares J (1999) Significance of trisomy 7 and 12 in thyroid lesions with follicular differentiation: a cytogenetic and in situ hybridization study. *Lab Invest* 79: 369-78
- [85] Sareen D, McMillan E, Ebert AD, Shelley BC, Johnson JA, Meisner LF, Svendsen CN (2009) Chromosome 7 and 19 trisomy in cultured human neural progenitor cells. *PLoS One* 4: e7630
- [86] Sauer T, Beraki K, Jebsen PW, Naess O (1999) Numerical abnormalities of chromosome 7 in interphase cell nuclei of breast carcinoma have no

impact on immunohistochemically determined EGFR status. *APMIS* 107: 211-6

- [87] Scherer SE, Muzny DM, Buhay CJ, Chen R, Cree A, Ding Y, Dugan-Rocha S, Gill R, Gunaratne P, Harris RA, Hawes AC, Hernandez J, Hodgson AV, Hume J, Jackson A, Khan ZM, Kovar-Smith C, Lewis LR, Lozado RJ, Metzker ML, Milosavljevic A, Miner GR, Montgomery KT, Morgan MB, Nazareth LV, Scott G, Sodergren E, Song XZ, Steffen D, Lovering RC, Wheeler DA, Worley KC, Yuan Y, Zhang Z, Adams CQ, Ansari-Lari MA, Ayele M, Brown MJ, Chen G, Chen Z, Clerc-Blankenburg KP, Davis C, Delgado O, Dinh HH, Draper H, Gonzalez-Garay ML, Havlak P, Jackson LR, Jacob LS, Kelly SH, Li L, Li Z, Liu J, Liu W, Lu J, Maheshwari M, Nguyen BV, Okwuonu GO, Pasternak S, Perez LM, Plopper FJ, Santibanez J, Shen H, Tabor PE, Verduzco D, Waldron L, Wang Q, Williams GA, Zhang J, Zhou J, Allen CC, Amin AG, Anyalebechi V, Bailey M, Barbaria JA, Bimage KE, Bryant NP, Burch PE, Burkett CE, Burrell KL, Calderon E, Cardenas V, Carter K, Casias K, Cavazos I, Cavazos SR, Ceasar H, Chacko J, Chan SN, Chavez D, Christopoulos C, Chu J, Cockrell R, Cox CD, Dang M, Dathorne SR, David R, Davis CM, Davy-Carroll L, Deshazo DR, Donlin JE, D'Souza L, Eaves KA, Egan A, Emery-Cohen AJ, Escotto M, Flagg N, Forbes LD, Gabisi AM, Garza M, Hamilton C, Henderson N, Hernandez O, Hines S, Hogues ME, Huang M, Idlebird DG, Johnson R, Jolivet A, Jones S, Kagan R, King LM, Leal B, Lebow H, Lee S, LeVan JM, Lewis LC, London P, Lorensuhewa LM, Loulseged H, Lovett DA, Lucier A, Lucier RL, Ma J, Madu RC, Mapua P, Martindale AD, Martinez E, Massey E, Mawhiney S, Meador MG, Mendez S, Mercado C, Mercado IC, Merritt CE, Miner ZL, Minja E, Mitchell T, Mohabbat F, Mohabbat K, Montgomery B, Moore N, Morris S, Munidasa M, Ngo RN, Nguyen NB, Nickerson E, Nwaokemeh OO, Nwokenkwo S, Obregon M, Oguh M, Oragunye N, Oviedo RJ, Parish BJ, Parker DN, Parrish J, Parks KL, Paul HA, Payton BA, Perez A, Perrin W, Pickens A, Primus EL, Pu LL, Puazo M, Quiles MM, Quiroz JB, Rabata D, Reeves K, Ruiz SJ, Shao H, Sisson I, Sonaike T, Sorelle RP, Sutton AE, Svatek AF, Svetz LA, Tamerisa KS, Taylor TR, Teague B, Thomas N, Thorn RD, Trejos ZY, Trevino BK, Ukegbu ON, Urban JB, Vasquez LI, Vera VA,

- Villasana DM, Wang L, Ward-Moore S, Warren JT, Wei X, White F, Williamson AL, Wleczyk R, Wooden HS, Wooden SH, Yen J, Yoon L, Yoon V, Zorrilla SE, Nelson D, Kucherlapati R, Weinstock G, Gibbs RA; Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center Sequence Production Team (2006) The finished DNA sequence of human chromosome 12. *Nature* 440: 346-51
- [88] Simon SL, Bouville A (2002) Radiation doses to local populations near nuclear weapons test sites worldwide. *Health Phys* 82: 706-25
- [89] Singh H, Singh J, Singh S, Bajwa BS (2008) Regional variations pattern of indoor radon levels in some areas of Punjab and Haryana. *Radiat Prot Dosimetry* 130: 257-63
- [90] Skacel M, Ormsby AH, Pettay JD, Tsiftsakis EK, Liou LS, Klein EA, Levin HS, Zippe CD, Tubbs RR (2001) Aneusomy of chromosomes 7, 8, and 17 and amplification of HER-2/neu and epidermal growth factor receptor in Gleason score 7 prostate carcinoma: a differential fluorescent in situ hybridization study of Gleason pattern 3 and 4 using tissue microarray. *Hum Pathol* 32: 1392-7
- [91] Staals JE, Schrandt-Stumpel CT, Hamers G, Fryns JP (2003) Prenatal diagnosis of trisomy 12 mosaicism: normal development of a 3 years old female child. *Genet Couns* 14: 233-37
- [92] Stankiewicz P, Lupski JR (2006) The genomic basis of disease, mechanisms and assays for genomic disorders. *Genome Dyn* 1: 1-16
- [93] Taruscio D, Danesi R, Montaldi A, Cerasoli S, Cenacchi G, Giangaspero F (1997) Nonrandom gain of chromosome 7 in central neurocytoma: a chromosomal analysis and fluorescence in situ hybridization study. *Virchows Arch* 430: 47-51
- [94] Teyssier JR, Sadrin R, Nou JM, Bureau G, Adnet JJ, Bajolle F, Pigeon F (1985) Trisomy 7 in a lung carcinoid tumor: precocious index of malignant transformation? *Cancer Genet Cytogenet* 1985 Feb 15;15 (3-4) : 277-82

- [95] Verp MS, Amarose AP, Esterly JR, Moawad AH (1987) Mosaic trisomy 7 and renal dysplasia. *Am J Med Genet* 26: 139-43
- [96] Volpi EV, Bridger JM (2008) FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques* 45: 385-6
- [97] Watt AJ, Devereux FJ, Monk NA, Myers CJ, Gardner RJ (1991) The phenotype in placental trisomy 7. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 31: 246-8
- [98] Wong KF, So CC (2001) Acute myeloid leukemia with concomitant trisomies 4 and 10: a distinctive form of myeloid leukemia? *Cancer Genet Cytogenet* 127: 74-6
- [99] Wurster-Hill DH, Brown F, Park JP, Gibson SH (1988) Cytogenetic studies in Dupuytren contracture. *Am J Hum Genet* 43: 285-92
- [100] Yilmaz Z, Sahin FI, Kizilkilic E, Karakus S, Boga C, Ozdogu H (2005) Conventional and molecular cytogenetic findings of myelodysplastic syndrome patients. *Clin Exp Med* 5: 55-9
- [101] Yurov YB (1978) Replication of chromosomal DNA in cultured abnormal human cells. *Hum Genet* 43: 47-52
- [102] Zaragoza MV, Millie E, Redline RW, Hassold TJ (1998) Studies of non-disjunction in trisomies 2, 7, 15, and 22: does the parental origin of trisomy influence placental morphology? *J Med Genet* 35: 924-31
- [103] Zen PR, Rosa RF, Rosa RC, Graziadio C, Paskulin GA (2011) New report of two patients with mosaic trisomy 9 presenting unusual features and longer survival. *Sao Paulo Med J* 129: 428-32

7. Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. med. Yasmin Mehraein und dem ehemaligen Institutsleiter Prof. Dr. Klaus D. Zang für das freundliche Überlassen des Themas. Frau Mehraein gilt außerdem mein besonderer Dank für die Einführung in das Arbeiten im Labor und die Korrekturhilfen beim Erstellen der schriftlichen Ausführungen, sowie sämtliche kulinarische und moralische Unterstützung im Laufe der letzten Jahre.

Auch allen Mitarbeitern im Labor möchte ich danken, die mir Tipps gaben oder bei der Einarbeitung behilflich waren. Sowie Frau Dr. med. Dagmar Zang für die Hilfe beim Gewinnen eines Teils der Abstriche und PD Dr. med. Stefan Gräber für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung.

Weiterhin gilt mein Dank den Probanden, die durch ihre vertrauensvolle Einwilligung die Durchführung der vorliegenden Arbeit erst möglich gemacht haben.

Auch meinen langjährigen Schulfreunden Birke, Kerstin und Thomas und meiner Klavierfreundin Reinhild gebührt mein Dank, da sie immer an mich geglaubt haben und ich mich nie von ihnen unter Druck gesetzt gefühlt habe.

Explizit möchte ich noch meinem Lebensgefährten Mathias für seine Geduld und sein Verständnis danken wenn ich Zeit mit meiner Promotionsarbeit verbringen wollte.

8. Lebenslauf

[Redacted]

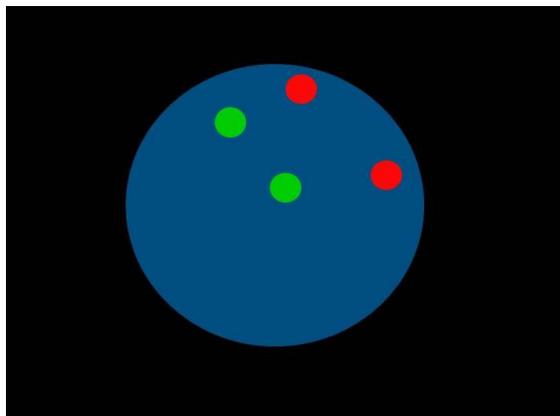
Bildtafel:

Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Chromosom 7/10-Dual-Color-FISH mit Chromosom 7 und Chromosom 10-spezifischen alpha-Satellit-DNA-Sonden. Ein Zellkern mit je zwei Signalen, die Chromosomen 7 (grün) und 10 (rot) repräsentierten (vgl. Farbtafel Abbildung 15). Dies entspricht dem Ideal-Abbildung eines Normalbefundes mit disomer Konstellation beider Chromosomen-Typen.

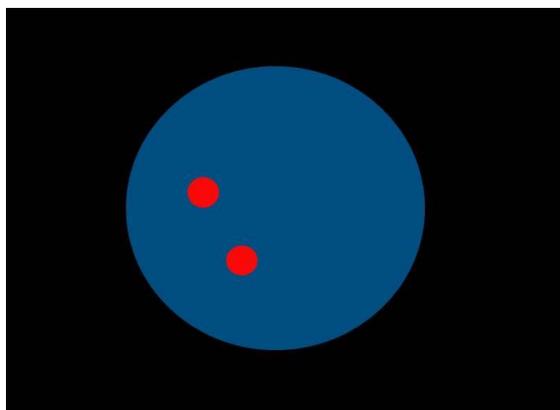


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Chromosom 7/10-Dual-Color-FISH mit Chromosom 7 und Chromosom 10-spezifischen alpha-Satellit-DNA-Sonden. Ein Zellkern mit zwei roten Zentromersignalen für das Kontrollchromosom 10 (vgl. Farbtafel Abbildung 16). Die Signale für die Chromosomen 7 (grün) fehlen. Nullisomie oder mangelhafte Hybridisierungseffizienz für Chromosom 7.

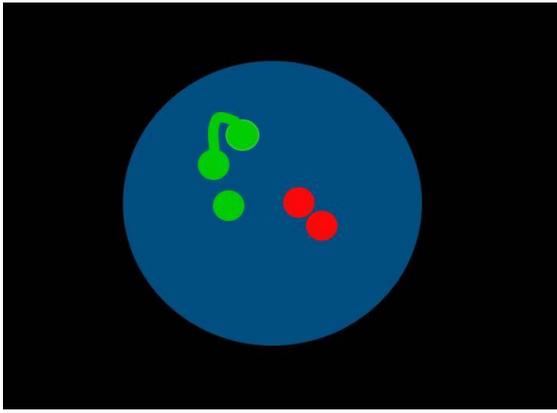


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Chromosom 7/10-Dual-Color-FISH mit Chromosom 7 und Chromosom 10-spezifischen alpha-Satellit-DNA-Sonden. Exemplarische Darstellung eines Zellkerns mit zwei Signalen („split spot“; vgl. Farbtafel Abbildung 18) infolge der Markierung beider Chromatiden (der Kern hat die S-Phase durchlaufen). Ein derartiges split-spot-Signal wurde im Rahmen der Studie jeweils als singuläres Signal interpretiert, wenn z.B. die beiden Signalteile bei Fokussierung mit der Mikrometerschraube in einer Ebene eine fädige Verbindung zeigten, sehr nahe lokalisiert waren oder beide Einzelsignale in der Intensität gegenüber der üblichen Signalintensität eines Einzelsignals in etwa halbiert oder vermindert waren. Da i.d.R. alle Chromosomen nach Durchlauf der S-Phase dupliziert vorliegen, betreffen split-spots dann auch alle Signale eines Kernes.

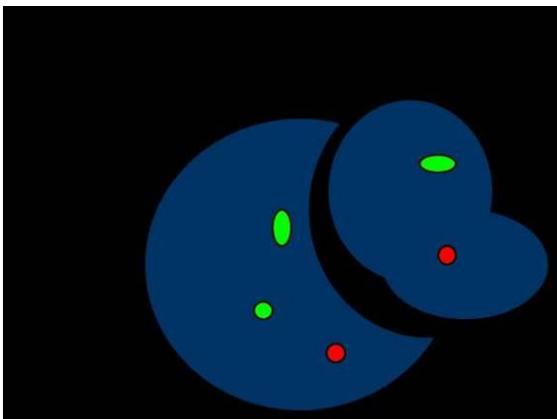


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Chromosom 7/10-Dual-Color-FISH mit Chromosom 7 und Chromosom 10-spezifischen alpha-Satellit-DNA-Sonden. Fragmentierter Zellkern mit separiert

gelegenen Kernanteilen und Signalen. Derartige Signalanordnungen stellten ein weiteres Ausschlusskriterium dar.

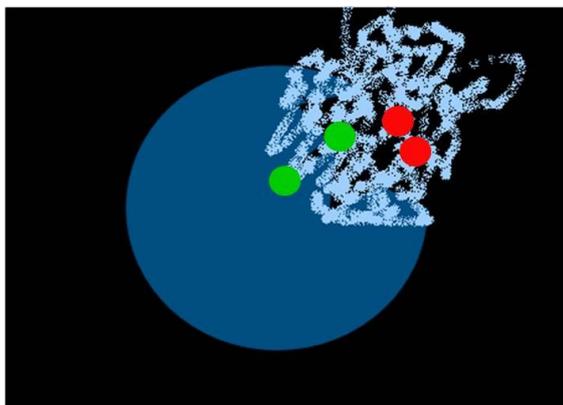


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Chromosom 7/10-Dual-Color-FISH mit Chromosom 7 und Chromosom 10-spezifischen alpha-Satellit-DNA-Sonden. Mechanisch fragmentierter Zellkern mit extranucleär gelegenen Kernanteilen und Signalen (Ausstrichartefakt). Derartige Signalanordnungen stellten ebenfalls ein Ausschlusskriterium dar.

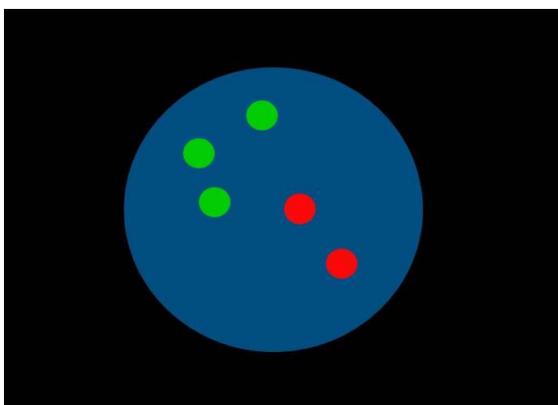


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Chromosom 7/10-Dual-Color-FISH mit Chromosom 7 und Chromosom 10-spezifischen alpha-Satellit-DNA-Sonden. Ein Zellkern mit drei grünen Signalen für Chromosom 7 und zwei roten Signalen für Chromosom 10 (vgl. Farbtafel Abbildung 19) entsprechend einer Trisomie 7 (disome Konstellation für Chromosom 10).

Abbildungsnachweis:

FISH-Untersuchung von Plattenepithelzellen von buccalen Abstrichen menschlicher Mundschleimhaut. Kohybridisierung von Sonden für die Chromosomen 7 und 10. Die durch FITC grün fluoreszierenden Signale markieren das Zentromer von Chromosom 7, während die durch Texas-Red rot aufleuchtenden Signale das Zentromer von Chromosom 10 anzeigen.

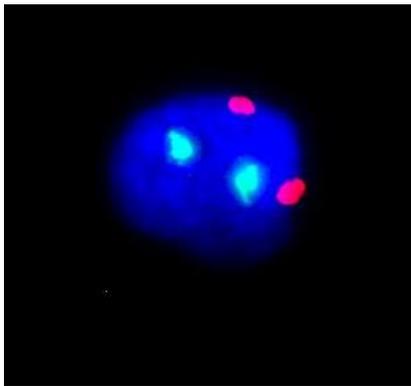


Abbildung 15: Chromosom 7/10-FISH an Plattenepithelzellen der Mundschleimhaut. Zellkern mit zwei grünen Signalen für Chromosom 7 und zwei roten Signalen für Chromosom 10 entsprechend einer disomen Konstellation beider Chromosomen-Typen.

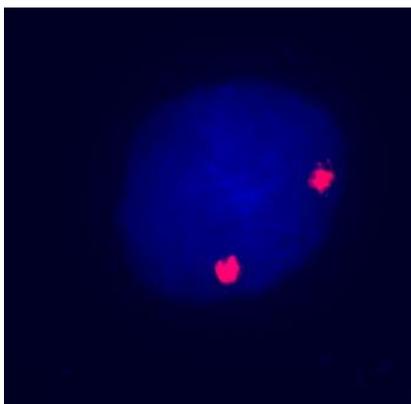


Abbildung 16: Chromosom 7/10-FISH an Plattenepithelzellen der Mundschleimhaut. Zellkern mit zwei roten Signalen für Chromosom 10. Kein Signal für Chromosom 7 (fehlende grüne Fluoreszenzmarkierung) entsprechend einer disomen Konstellation für Chromosom 10 und Nullisomie oder mangelhafte Hybridierung für Chromosom 7.

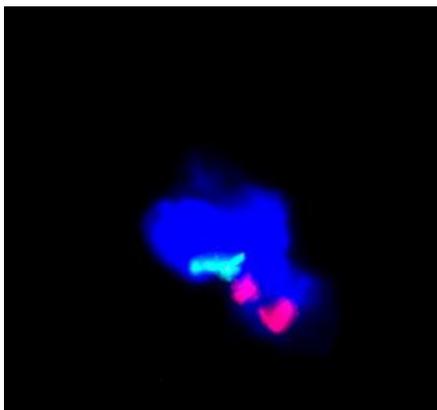


Abbildung 17: Chromosom 7/10-FISH an Plattenepithelzellen der Mundschleimhaut. Mechanisch alterierter Zellkern mit zwei roten Signalen für Chromosom 10 und einem grünen Signal für Chromosom 7 entsprechend einer disomen Konstellation für Chromosom 10 und Monosomie für Chromosom 7.

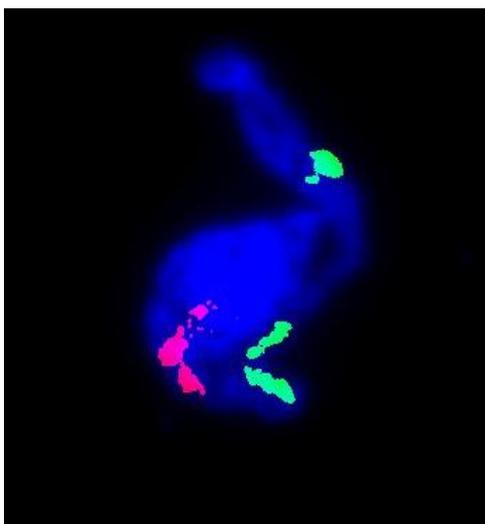


Abbildung 18: Chromosom 7/10-FISH an Plattenepithelzellen der Mundschleimhaut. Zellkern mit gedoppelten Chromatid-Signalen für die Chromosomen 7 (grüne Signale) und 10 (rote Signale); sog. split spot-Signale. Typischerweise zeigen alle Signale eines betroffenen Zellkerns das split-spot-Phänomen. Der Zellkern ist deutlich alteriert, vermutlich handelt es sich um eine Folge des mechanischen Ausstrichs.

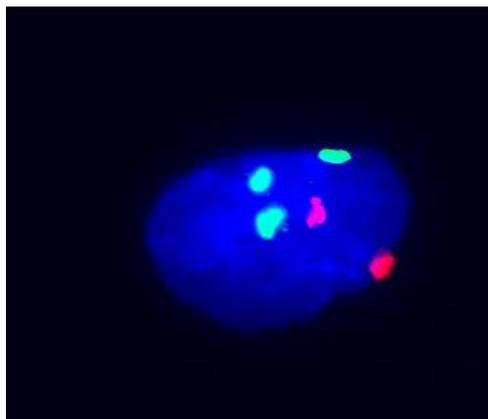


Abbildung 19: Chromosom 7/10-FISH an Plattenepithelzellen der Mundschleimhaut. Zellkern mit drei grünen Signalen für Chromosomen 7 und zwei roten Signalen für Chromosom 10. Diese Signalkonstellation entspricht grundsätzlich dem Befund einer Trisomie 7 (disome Konstellation für Chromosom 10).

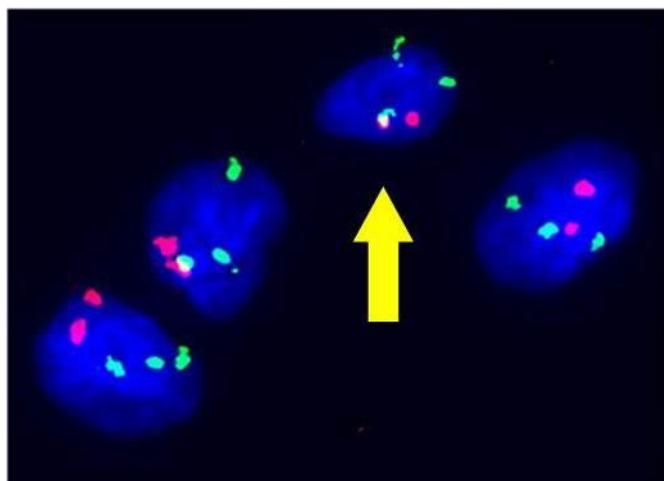


Abbildung 20: Chromosom 7/10-FISH an Plattenepithelzellen der Mundschleimhaut. Mehrere Zellkerne mit jeweils drei grünen Signalen für Chromosom 7 und zwei roten Signalen für Chromosom 10 entsprechend einer Trisomie 7. In dem mit gelbem Pfeil markierten Zellkern sind je ein grünes und ein rotes Signal in der z-Achse übereinander projiziert.

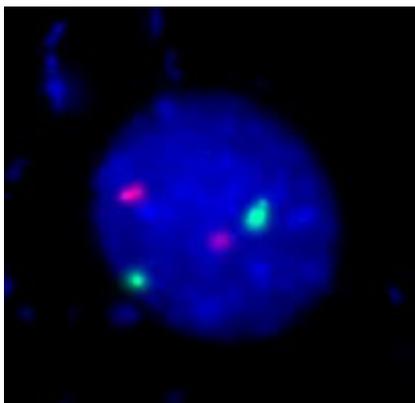


Abbildung 21: Chromosom 8/12-FISH an Plattenepithelzellen der Mundschleimhaut. Zellkern mit zwei grünen Signalen für Chromosom 8 und zwei roten Signalen für Chromosom 12 entsprechend einer disomen Konstellation beider Chromosomen-Typen.

Zwei-Farben-FISH an Metaphasechromosomen von humanen Blutlymphozyten zum Beleg und Etablierung der geeigneten Sondenspezifität. Die durch FITC grün fluoreszierenden Signale markieren das Zentromer von Chromosom 7 bzw. 8, während die durch Texas-Red rot aufleuchtenden Signale die Zentromere von Chromosom 10 bzw. 12 anzeigen.

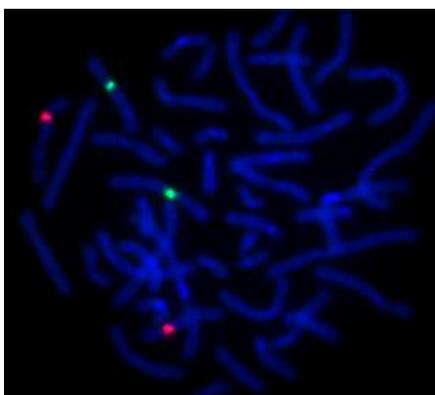


Abbildung 22: Chromosom 7/10-FISH an Metaphasechromosomen von Blutlymphozyten mit zwei roten Signalen für Chromosom 10 und zwei grünen Signalen für Chromosom 7. Es sind keine unspezifischen Kreuzhybridisierungen zu erkennen. Die spezifischen Signale markieren die im DAPI-Banding identifizierbaren Chromosomen 7 und 10.

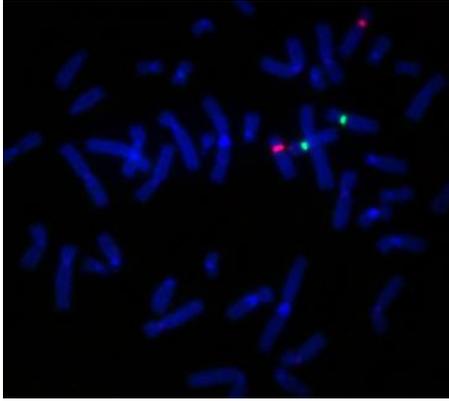


Abbildung 23: Chromosom 8/12-FISH an Metaphasechromosomen von Blutlymphozyten mit zwei grünen Signalen für Chromosom 8 und zwei roten Signalen für Chromosom 12. Es sind keine unspezifischen Kreuzhybridisierungen zu erkennen. Die spezifischen Signale markieren die im DAPI-Banding identifizierbaren Chromosomen 8 und 12.

Tabelle 1.0: Gesamt-Kollektiv A: Detaillierte Darstellung der Probanden mit entsprechenden Resultaten der Chromosom 7/10-FISH-Analyse

Lfn.:	Name	Geschlecht	Alter	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 2/1 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 1/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Rauchverhalten
1	A. A.	w	76	99	4	3,5	0	
2	B. D.	w	75	96	1	1	0	
4	F. H.-R.	m	91	97,5	0	0,5	2	Nichtraucher bis vor 7 Jahren seltener Zigarrenraucher
5	F. M.	w	84	99,5	0	0,5	0	Nichtraucher bis vor 20 Jahren Zigaretten
6	H. E.	w	103	95	1,5	1,5	1,5	
7	H. H.	w	81	95	0	2,3	1,9	
8	H. O.	m	77	88,1	0,8	3	0,4	
9	H. I.	w	80	97,5	0	1,5	0	
10	K. H.	w	90	95	2	2	0	
13	S. E.	w	80	88,3	0,8	2,2	3,5	
15	Sch. H.	w	81	97,5	0	1	0,5	
21	F. W.	m	76	92	3	1,5	2	
22	W. W.	m	80	98,5	0	0	1,5	
25	G. E.	m	80	94	2	1,5	1,5	
26	H. H.	m	89	79	20	1	0	Nichtraucher seit 25 Jahren
27	H. E.	m	78	97	0,5	0,5	1	Nichtraucher
28	K. J.	w	83	97,5	0,5	2	1	Nichtraucher
29	K. E.	m	81	98,5	0	2	1	Zigarrenraucher
30	K	m	83	92,5	1,5	2	0	Nichtraucher
31	M. H.	m	78	95	2	1,5	1,5	Nichtraucher
32	O. L.	w	81	99	0,5	0	0,5	Nichtraucher
33	O. A.	w	75	98	0,5	0	1	Nichtraucher
34	Sch. Ch.	w	80	99,5	0,5	0	0	Gelegenheitsr. 4-5/d

35	Sp.	w	89	90	10	0	0	Nichtraucher
36	F. A.	w	80	96,5	2	1	0,5	Nichtraucher
37	F. L.	w	78	91	7,5	1	0,5	Nichtraucher
38	J. E.	w	79	96	3,5	0	0,5	Nichtraucher
39	M. A.	w	84	95	3,5	0,5	1,5	Nichtraucher
40	M. K.	m	82	95	4	0,5	1,5	Nichtraucher
41	P. L.	m	78	95,5	3,5	0	1	Nichtraucher
42	Kl. E.	m	79	100	0	0	0	Nichtraucher
43	K. I.	w	77	94,5	2,5	0,5	1,5	Nichtraucher
44	K. H.	w	78	98	0	0,5	1,5	Nichtraucher
45	K. E.	m	78	98,5	0	1	0,5	Nichtraucher
46	R. H.	m	79	99,5	0,5	0	0	Nichtraucher
47	S. H.	m	81	94	2	3	1	Nichtraucher
48	St. L.	w	79	95	0	3	1	Nichtraucher
49	St.	w	77	97,5	0	1	1,5	Nichtraucher
50	W. H.	m	85	96,5	2,5	0	0,5	Nichtraucher seit 2003
		Mittelwert	81,1538462	95,4205128	2,11794872	1,1025641	0,86666667	
		Standardabweichung	5,33379721	4,02166367	3,62679152	0,99960181	0,79018097	
		Schwankungsbreite	75-103	88,1-100	0-20	0-3,5	0-2	

Tabelle 1.0: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs älterer Probanden (Kollektiv A). Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7 und 10 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7, gefolgt von jener von Chromosom 10. Geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2) und monosomen (2/1 und 1/2) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 1.0.1: Kollektiv A, Gruppen 2 u. 3: Probanden mit FISH-Nachweis einer Mosaik-Trisomie 7 und Resultate der Chromosom 7/10-FISH-Analyse

Lfn:	Name	Geschlecht	Alter	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 2/1 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 1/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Rauchverhalten
------	------	------------	-------	------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------	----------------

1	A. A.	w	76	99	4	3,5	0	
21	F. W.	m	76	92	3	1,5	2	
26	H. H.	m	89	79	20	1	0	Nichtraucher seit 25 Jahren
35	Sp.	w	89	90	10	0	0	Nichtraucher
37	F. L.	w	78	91	7,5	1	0,5	Nichtraucher
38	J. E.	w	79	96	3,5	0	0,5	Nichtraucher
39	M. A.	w	84	95	3,5	0,5	1,5	Nichtraucher
40	M. K.	m	82	95	4	0,5	1,5	Nichtraucher
41	P. L.	m	78	95,5	3,5	0	1	Nichtraucher
43	K. I.	w	77	94,5	2,5	0,5	1,5	Nichtraucher
50	W. H.	m	85	96,5	2,5	0	0,5	Nichtraucher seit 2003
		Mittelwert	81,1818182	93,0454545	5,81818182	0,77272727	0,81818182	
		Standardabweichung	4,91565218	5,32660561	5,23580332	1,03352882	0,71668428	
		Schwankungsbreite	76-89	79-96,5	0-20	0-3,5	0-2	

Tabelle 1.0.1: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs älterer Probanden (Kollektiv A), deren Ergebnisse oberhalb des cut off levels lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7 und 10 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7, gefolgt von jener von Chromosom 10. Geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2) und monosomen (2/1 und 1/2) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 1.1: Kollektiv A, Gruppe 1: Probanden ohne Nachweis einer Mosaik-Trisomie 7 und Resultate der Chromosom 7/10-FISH-Analyse

Lfn.:	Name	Geschlecht	Alter	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 2/1 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 1/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Rauchverhalten
2	B. D.	w	75	96	1	1	0	
4	F. H.-R.	m	91	97,5	0	0,5	2	seltener Zigarrenraucher bis vor 7 Jahren
5	F. M.	w	84	99,5	0	0,5	0	Raucher bis vor 20 Jahren
6	H. E.	w	103	95	1,5	1,5	1,5	
7	H. H.	w	81	95	0	2,3	1,9	

8	H. O.	m	77	88,1	0,8	3	0,4	
9	H. I.	w	80	97,5	0	1,5	0	
10	K. H.	w	90	95	2	2	0	
13	S. E.	w	80	88,3	0,8	2,2	3,5	
15	Sch. H.	w	81	97,5	0	1	0,5	
22	W. W.	m	80	98,5	0	0	1,5	
25	G. E.	m	80	94	2	1,5	1,5	
27	H. E.	m	78	97	0,5	0,5	1	NR
28	K. J.	w	83	97,5	0,5	2	1	NR
29	K. E.	m	81	98,5	0	2	1	Zigarrenraucher
30	K	m	83	92,5	1,5	2	0	NR
31	M. H.	m	78	95	2	1,5	1,5	NR
32	O. L.	w	81	99	0,5	0	0,5	NR
33	O. A.	w	75	98	0,5	0	1	NR
34	Sch. Ch.	w	80	99,5	0,5	0	0	Gelegenheitsr. 4-5/d
36	F. A.	w	80	96,5	2	1	0,5	NR
42	Kl. E.	m	79	100	0	0	0	NR
44	K. H.	w	78	98	0	0,5	1,5	NR
45	K. E.	m	78	98,5	0	1	0,5	NR
46	R. H.	m	79	99,5	0,5	0	0	NR
47	S. H.	m	81	94	2	3	1	NR
48	St. L.	w	79	95	0	3	1	NR
49	St.	w	77	97,5	0	1	1,5	NR
		Mittelwert	81,1428571	96,3535714	0,66428571	1,23214286	0,88571429	
		Standardabweichung	5,575836	3,00893511	0,7679768	0,97412965	0,82897272	
		Schwankungsbereich	75-103	88,1-100	0-2	0-3	0-3,5	

Tabelle 1.1: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs älterer Probanden (Kollektiv A), deren Ergebnisse unterhalb des cut off levels lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7 und 10 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7, gefolgt von jener von Chromosom 10. Geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2) und monosomen (2/1 und 1/2) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 1.2: Kollektiv A Gruppe 2: Probanden mit FISH-Nachweis einer **Mosaik-Trisomie 7 mit < 5 %-Mosaikanteil** und Resultate der Chromosom 7/10-FISH-Analyse

Lfn:	Name	Geschlecht	Alter	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 2/1 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 1/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Rauchverhalten
1	A. A.	w	76	99	4	3,5	0	
21	F. W.	m	76	92	3	1,5	2	
38	J. E.	w	79	96	3,5	0	0,5	NR
39	M. A.	w	84	95	3,5	0,5	1,5	NR
40	M. K.	m	82	95	4	0,5	1,5	NR
41	P. L.	m	78	95,5	3,5	0	1	NR
43	K. I.	w	77	94,5	2,5	0,5	1,5	NR
50	W. H.	m	85	96,5	2,5	0	0,5	NR seit 2003
		Mittelwert	79,625	95,4375	3,3125	0,8125	1,0625	
		Standardabweichung	3,5831949	1,97190082	0,59386747	1,1933596	0,67810134	
		Schwankungsbereich	76-85	92-99	2,5-4	0-3,5	0-2	

Tabelle 1.2: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs älterer Probanden (Kollektiv A), deren Ergebnisse oberhalb des cut off levels, aber unterhalb von 5% lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7 und 10 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7, gefolgt von jener von Chromosom 10. Geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2) und monosomen (2/1 und 1/2) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 1.3: Kollektiv A Gruppe 3: Probanden mit FISH-Nachweis einer **Mosaik-Trisomie 7 mit > 5 %-Mosaikanteil** und Resultate der Chromosom 7/10-FISH-Analyse

Lfn:	Name	Geschlecht	Alter	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 2/1 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 1/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Rauchverhalten
26	H. H.	m	89	79	20	1	0	NR seit 25 Jahren

35	Sp.	w	89	90	10	0	0	NR
37	F. L.	w	78	91	7,5	1	0,5	NR
		Mittelwert	85,3333333	86,6666667	12,5	0,6666667	0,1666667	
		Standardabweichung	6,35085296	6,65832812	6,61437828	0,57735027	0,28867513	
		Schwankungsbereich	98-78	79-91	7,5-20	0-1	0-0,5	

Tabelle 1.3: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs älterer Probanden (Kollektiv A), deren Ergebnisse oberhalb von 5% lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7 und 10 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7, gefolgt von jener von Chromosom 10. Geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2) und monosomen (2/1 und 1/2) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 1.4: Kollektiv A, **männliche** Probanden mit FISH-Nachweis einer Mosaik-Trisomie 7 und Resultate der Chromosom 7/10-FISH-Analyse

Lfn:	Name	Geschlecht	Alter	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 2/1 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 1/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Rauchverhalten
21	F. W.	m	76	92	3	1,5	2	
26	H. H.	m	89	79	20	1	0	NR seit 25 Jahren
40	M. K.	m	82	95	4	0,5	1,5	NR
41	P. L.	m	78	95,5	3,5	0	1	NR
50	W. H.	m	85	96,5	2,5	0	0,5	NR seit 2003
		Mittelwert	82	91,6	6,6	0,6	1	
		Standardabweichung	5,24404424	7,24051103	7,51165761	0,65192024	0,79056942	
		Schwankungsbreite	76-89	79-96,5	2,5-20	0-1,5	0-2	

Tabelle 1.4: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs männlichen älterer Probanden, deren Ergebnisse oberhalb des cut off levels lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7 und 10 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7, gefolgt von jener von Chromosom 10. Geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2) und monosomen (2/1 und 1/2) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 1.5: Kollektiv A, **weibliche** Probanden mit FISH-Nachweis einer Mosaik-Trisomie 7 und Resultate der Chromosom 7/10-FISH-Analyse

Lfn:	Name	Geschlecht	Alter	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom	Signalkonstellation 2/1 für Chromosom	Signalkonstellation 1/2 für Chromosom	Rauchverhalten
------	------	------------	-------	---------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	----------------

				7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	
1	A. A.	w	76	99	4	3,5	0	
35	Sp.	w	89	90	10	0	0	NR
37	F. L.	w	78	91	7,5	1	0,5	NR
38	J. E.	w	79	96	3,5	0	0,5	NR
39	M. A.	w	84	95	3,5	0,5	1,5	NR
43	K. I.	w	77	94,5	2,5	0,5	1,5	NR
		Mittelwert	80,5	94,25	5,16666667	0,91666667	0,66666667	
		Standardabweichung	5,00999002	3,31285375	2,92688686	1,31972219	0,68313005	
		Schwankungsbreite	76-89	90-99	2,5-10	0-3,5	0-1,5	

Tabelle 1.5: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs weiblicher älterer Probanden, deren Ergebnisse oberhalb des cut off levels lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7 und 10 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7, gefolgt von jener von Chromosom 10. Geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2) und monosomen (2/1 und 1/2) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 1.6: Kollektiv A, Nichtraucher mit FISH-Nachweis einer Mosaik-Trisomie 7 und Resultate der Chromosom 7/10-FISH-Analyse

Lfn:	Name	Geschlecht	Alter	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 2/1 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 1/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Rauchverhalten
1	A. A.	w	76	99	4	3,5	0	
21	F. W.	m	76	92	3	1,5	2	
26	H. H.	m	89	79	20	1	0	Nichtraucher seit 25 Jahren
35	Sp.	w	89	90	10	0	0	Nichtraucher
37	F. L.	w	78	91	7,5	1	0,5	Nichtraucher
38	J. E.	w	79	96	3,5	0	0,5	Nichtraucher
39	M. A.	w	84	95	3,5	0,5	1,5	Nichtraucher
40	M. K.	m	82	95	4	0,5	1,5	Nichtraucher
41	P. L.	m	78	95,5	3,5	0	1	Nichtraucher
43	K. I.	w	77	94,5	2,5	0,5	1,5	Nichtraucher

50	W. H.	m	85	96,5	2,5	0	0,5	Nichtraucher seit 2003
		Mittelwert	81,1818182	93,0454545	5,81818182	0,77272727	0,81818182	
		Standardabweichung	4,91565218	5,32660561	5,23580332	1,03352882	0,71668428	
		Schwankungsbreite	76-89	79-99	2,5-20	0-3,5	0-2	

Tabelle 1.6: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs älterer Nichtraucher, deren Ergebnisse oberhalb des cut off levels lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7 und 10 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7, gefolgt von jener von Chromosom 10. Geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2) und monosomen (2/1 und 1/2) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 1.7: Kollektiv A Raucher mit FISH-Nachweis einer Mosaik-Trisomie 7 und Resultate der Chromosom 7/10-FISH-Analyse

Lfn:	Name	Geschlecht	Alter	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 2/1 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Signalkonstellation 1/2 für Chromosom 7/10 bei Analyse von ~ 200 Kernen in %	Rauchverhalten
29	K. E.	m	81	98,5	0	2	1	Zigarrenraucher
34	Sch. Ch.	w	80	99,5	0,5	0	0	Gelegenheitsraucher 4-5/d
		Mittelwert	80,5	99	0,25	1	0,5	
		Standardabweichung	0,70710678	0,70710678	0,35355339	1,41421356	0,70710678	
		Schwankungsbreite		89,5-99,5	0-0,5	0-2	0-1	

Tabelle 1.7: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs älterer Raucher. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7 und 10 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7, gefolgt von jener von Chromosom 10. Geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2) und monosomen (2/1 und 1/2) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 2.0: Gesamt-Kollektiv B: Detaillierte Darstellung der Probanden mit entsprechenden Resultaten der Chromosom 7/10 und 8/12-FISH-Analyse

Lfn.	Name	Geschlecht	Alter (J)	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 7/10 (%)	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 7/10 (%)	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 7/10 (%)	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 8/12 (%)	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 8/12 (%)	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 8/12 (%)	Rauchverhalten
51	J. V.	m	35	87,5	1,5	1,5	92	0	0	Raucher
52	K. G.	w	51	92,5	0,5	1	99	0,5	0	Raucher
53	K. A.	w	25	85	2	0,5	87	0	1	NR
54	K. R.	m	27	87	2	1,5	86,5	1	0,5	NR
55	L. U.	w	51	82,4	3,4	2,7	89,2	1,8	0	NR
56	M. J.	m	33	93	0,5	0,5	88	0	0,5	NR
57	M. T.	m	40	85,5	3	2	86,5	0,5	0,5	NR
58	M. Y.	w	40	90	0,5	0,5	89,5	0	1	NR
59	R. S.	w	35	90,1	2	0	91	0	0	NR
60	U. S.	w	38	87,5	3	1	92,5	0	1	NR
61	W. G.	m	33	86,5	6,5	1	85	0,5	2	NR
62	B. U.	w	46	83,1	1,4	0,9	75,8	1,4	1,4	NR
63	C. N.	w	33	81,8	0,5	0,9	78,9	1,3	0,4	NR früher 2,5 Zigaretten / d
64	D. U.	w	56	77,8	3,3	0,5	81	1	1	NR
65	D. C.	w	43	84,9	2,8	0	74,6	1	0	NR
66	D. T.	m	30	86,6	0	0,5	82,2	1,4	1,8	NR
67	F. U.	w	37	86,6	2,5	1	74	1,4	1,4	NR
68	F. I.	w	43	73,4	6,8	1	86,9	0	0	NR
69	G. A.	w	36	78,4	2	2	51	0	2	NR
70	K. B.	m	29	91,7	0,5	0,5	76,4	1,9	1,9	NR
71	L. V.	m	34	88	1,9	1	76,9	2,4	1,9	Raucher
72	P. A.	w	35	83,7	2,3	1,9	79,3	1,7	1,7	NR
73	S. V.	m	45	78,7	0,4	0,9	78,8	0,4	1,7	Raucher
74	W. C.	m	53	98,8	0,8	0,4	85,5	0	0	NR

		Mittelwert	38,6666667	85,8541667	2,0875	0,9875	82,5347826	0,75833333	0,90416667	
		Standardabweichung	8,35446596	5,57229007	1,73964327	0,66221795	9,48786827	0,75694849	0,76469896	
		Schwankungsbereich	25 – 56	73,4-98,8	0-6,8	0-2,7	51-99	0-2,4	0-1,9	

Tabelle 2.0: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs jüngerer Probanden (aus Kollektiv B). Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7, 10, 8 und 12 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7 und 10, gefolgt von jener von Chromosom 8 und 12 geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2 und 2/3) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 2.0.1: Kollektiv B, Gruppen 2 u. 3: Probanden mit FISH-Nachweis einer Mosaik-Trisomie 7 und Resultate der Chromosom 7/10 und 8/12-FISH-Analyse

Lfn.	Name	Geschlecht	Alter (J)	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 7/10 in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 7/10 in %	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 7/10 in %	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 8/12 in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 8/12 in %	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 8/12 in %	Rauchverhalten
55	L. U.	w	51	82,4	3,4	2,7	89,2	1,8	0	NR
57	M. T.	m	40	85,5	3	2	86,5	0,5	0,5	NR
60	U. S.	w	38	87,5	3	1	92,5	0	1	NR
61	W. G.	m	33	86,5	6,5	1	85	0,5	2	NR
64	D. U.	w	56	77,8	3,3	0,5	81	1	1	NR
65	D. C.	w	43	84,9	2,8	0	74,6	1	0	NR
67	F. U.	w	37	86,6	2,5	1	74	1,4	1,4	NR
68	F. I.	w	43	73,4	6,8	1	86,9	0	0	NR
72	P. A.	w	35	83,7	2,3	1,9	79,3	1,7	1,7	NR
		Mittelwert	41,7777778	83,1444444	3,73333333	1,23333333	82,475	0,87777778	0,84444444	
		Standardabweichung	7,52957133	4,67950615	1,69115345	0,82613558	6,4226719	0,67597666	0,76503449	
		Schwankungsbereich	25-56	73,4-98,8	0-6,8	0-2,7	51-99	0-2,4	0-1,9	

Tabelle 2.0.1: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs jüngerer Probanden (aus Kollektiv B), deren Ergebnisse oberhalb des cut off levels lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7, 10, 8 und 12 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7 und 10, gefolgt von jener von Chromosom 8 und 12 geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2 und 2/3) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 2.1: Kollektiv B, Gruppe 1: Probanden ohne Nachweis einer Mosaik-Trisomie 7 und Resultate der Chromosom 7/10 und 8/12-FISH-Analyse

Lfn.	Name	Geschlecht	Alter (J)	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 7/10 in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 7/10 in %	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 7/10 in %	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 8/12 in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 8/12 in %	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 8/12 in %	Rauchverhalten
51	J. V.	m	35	87,5	1,5	1,5	92	0	0	Raucher
52	K. G.	w	51	92,5	0,5	1	99	0,5	0	Raucher
53	K. A.	w	25	85	2	0,5	87	0	1	NR
54	K. R.	m	27	87	2	1,5	86,5	1	0,5	NR
56	M. J.	m	33	93	0,5	0,5	88	0	0,5	NR
58	M. Y.	w	40	90	0,5	0,5	89,5	0	1	NR
59	R. S.	w	35	90,1	2	0	91	0	0	NR
62	B. U.	w	46	83,1	1,4	0,9	75,8	1,4	1,4	NR
63	C. N.	w	33	81,8	0,5	0,9	78,9	1,3	0,4	NR früher 2,5
66	D. T.	m	30	86,6	0	0,5	82,2	1,4	1,8	NR
69	G. A.	w	36	78,4	2	2	51	0	2	NR
70	K. B.	m	29	91,7	0,5	0,5	76,4	1,9	1,9	NR
71	L. V.	m	34	88	1,9	1	76,9	2,4	1,9	Raucher
73	S. V.	m	45	78,7	0,4	0,9	78,8	0,4	1,7	Raucher
74	W. C.	m	53	98,8	0,8	0,4	85,5	0	0	NR
		Mittelwert	36,8	87,48	1,1	0,84	82,5666667	0,68666667	0,94	
		Standardabweichung	8,50378067	5,56291291	0,74258237	0,51796304	10,9923133	0,81579643	0,78903196	
		Schwankungsbereich	25 - 53	78,4-98,8	0-2	0-2	51 - 99	0 - 2,4	0 - 2	

Tabelle 2.1: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs jüngerer Probanden (aus Kollektiv B), deren Ergebnisse unterhalb des cut off levels lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7, 10, 8 und 12 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7 und 10, gefolgt von jener von Chromosom 8 und 12 geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2 und 2/3) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

		Mittelwert	38	79,95	6,65	1	85,95	0,25	1	
		Standardabweichung	7,07106781	9,26309883	0,21213203	0	1,34350288	0,35355339	1,41421356	
		Schwankungsbereich		73,4-86,5	6,5-6,8	1	85 - 86,9	0 - 0,5	0 - 2	

Tabelle 2.3: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs jüngerer Probanden (aus Kollektiv B), deren Ergebnisse oberhalb von 5% lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7, 10, 8 und 12 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7 und 10, gefolgt von jener von Chromosom 8 und 12 geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2 und 2/3) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 2.4: Kollektiv B, **männliche** Probanden mit FISH-Nachweis einer Mosaik-Trisomie 7 und Resultate der Chromosom 7/10 und 8/12-FISH-Analyse

Lfn.	Name	Geschlecht	Alter (J)	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 7/10 in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 7/10 in %	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 7/10 in %	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 8/12 in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 8/12 in %	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 8/12 in %	Rauchverhalten
57	M. T.	m	40	85,5	3	2	86,5	0,5	0,5	NR
61	W. G.	m	33	86,5	6,5	1	85	0,5	2	NR
		Mittelwert	36,5	86	4,75	1,5	85,75	0,5	1,25	
		Standardabweichung	4,94974747	0,70710678	2,47487373	0,70710678	1,06066017	0	1,06066017	
		Schwankungsbereich								

Tabelle 2.4: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs männlichen jüngerer Probanden (aus Kollektiv B), deren Ergebnisse oberhalb des cut off levels lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7, 10, 8 und 12 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7 und 10, gefolgt von jener von Chromosom 8 und 12 geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2 und 2/3) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 2.5: Kollektiv B, **weibliche** Probanden mit FISH-Nachweis einer Mosaik-Trisomie 7 und Resultate der Chromosom 7/10 und 8/12-FISH-Analyse

Lfn.	Name	Geschlecht	Alter (J)	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 7/10 in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 7/10 in %	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 7/10 in %	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 8/12 in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 8/12 in %	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 8/12 in %	Rauchverhalten
55	L. U.	w	51	82,4	3,4	2,7	89,2	1,8	0	Nichtraucher
60	U. S.	w	38	87,5	3	1	92,5	0	1	Nichtraucher

64	D. U.	w	56	77,8	3,3	0,5	81	1	1	Nichtraucher
65	D. C.	w	43	84,9	2,8	0	74,6	1	0	Nichtraucher
67	F. U.	w	37	86,6	2,5	1	74	1,4	1,4	Nichtraucher
68	F. I.	w	43	73,4	6,8	1	86,9	0	0	Nichtraucher
72	P. A.	w	35	83,7	2,3	1,9	79,3	1,7	1,7	Nichtraucher
		Mittelwert	43,2857143	82,3285714	3,44285714	1,15714286	81,3833333	0,98571429	0,72857143	
		Standardabweichung	7,71825295	5,06152621	1,53281565	0,89229506	7,19761535	0,74033454	0,72275926	
		Schwankungsbereich	35-51	73,4 - 87,5	2,3-6,8	0 - 2,7	89,2-92,5	0 - 1,8	0 - 1,7	

Tabelle 2.5: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs weiblicher jüngerer Probanden (aus Kollektiv B), deren Ergebnisse oberhalb des cut off levels lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7, 10, 8 und 12 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7 und 10, gefolgt von jener von Chromosom 8 und 12 geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2 und 2/3) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 2.6: Kollektiv B, Nichtraucher mit FISH-Nachweis einer Mosaik-Trisomie 7 und Resultate der Chromosom 7/10 und 8/12-FISH-Analyse

Lfn.	Name	Geschlecht	Alter (J)	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 7/10 in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 7/10 in %	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 7/10 in %	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 8/12 in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 8/12 in %	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 8/12 in %	Rauchverhalten
55	L. U.	w	51	82,4	3,4	2,7	89,2	1,8	0	NR
57	M. T.	m	40	85,5	3	2	86,5	0,5	0,5	NR
60	U. S.	w	38	87,5	3	1	92,5	0	1	NR
61	W. G.	m	33	86,5	6,5	1	85	0,5	2	NR
64	D. U.	w	56	77,8	3,3	0,5	81	1	1	NR
65	D. C.	w	43	84,9	2,8	0	74,6	1	0	NR
67	F. U.	w	37	86,6	2,5	1	74	1,4	1,4	NR
68	F. I.	w	43	73,4	6,8	1	86,9	0	0	NR
72	P. A.	w	35	83,7	2,3	1,9	79,3	1,7	1,7	NR
		Mittelwert	41,7777778	83,1444444	3,73333333	1,23333333	83,2222222	0,87777778	0,84444444	
		Standardabweichung	7,52957133	4,67950615	1,69115345	0,82613558	6,4124445	0,67597666	0,76503449	

Schwankungsbereich	33-51	73,4-90,1	2,3-6,8	0,0-2,7	74-92,5	0,0-1,8	0-2
--------------------	-------	-----------	---------	---------	---------	---------	-----

Tabelle 2.6: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs jüngerer Nichtraucher (aus Kollektiv B), deren Ergebnisse oberhalb des cut off levels lagen. Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7, 10, 8 und 12 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7 und 10, gefolgt von jener von Chromosom 8 und 12 geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2 und 2/3) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.

Tabelle 2.7: Kollektiv B Raucher mit FISH-Nachweis einer Mosaik-Trisomie 7 und Resultate der Chromosom 7/10 und 8/12-FISH-Analyse

Lfn.	Name	Geschlecht	Alter (J)	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 7/10 in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 7/10 in %	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 7 /10 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 7/10 in %	Signalkonstellation 2/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/2 # 8/12 in %	Signalkonstellation 3/2 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 3/2 # 8/12 in %	Signalkonstellation 2/3 für Chromosom 8 /12 bei Analyse von 200 Kernen 2/3 # 8/12 in %	Rauchverhalten
51	K. G.	w	51	92,5	0,5	1	99	0,5	0	Raucher
52	J. V.	m	35	87,5	1,5	1,5	92	0	0	Raucher
71	L. V.	m	34	88	1,9	1	76,9	2,4	1,9	Raucher
73	S. V.	m	45	78,7	0,4	0,9	78,8	0,4	1,7	Raucher
		Mittelwert	41,25	86,675	1,075	1,1	86,675	0,825	0,9	
		Standardabweichung	8,18026079	5,77256442	0,7410578	0,27080128	10,6117466	1,07199192	1,04243305	
		Schwankungsbereich	34-51	78,7-98,8	0,4-1,9	0,9-1,5	76,4-99	0-2,4	0-1,9	

Tabelle 2.7: Tabellarische Darstellung der internen Fallnummern, der Initialen, des Geschlechts, des Alters und des Nikotinkonsums des Kollektivs jüngerer Raucher (aus Kollektiv B). Die quantitativen Daten zur Kopienanzahl der Chromosomen 7, 10, 8 und 12 (ausgezählt in mindestens 200 Zellkernen) entsprechen Angaben in Prozent. An erster Stelle aufgeführt ist die Kopienanzahl von Chromosom 7 und 10, gefolgt von jener von Chromosom 8 und 12 geordnet nach disomen (2/2), trisomen (3/2 und 2/3) Signalkombinationen. Weiterhin sind der Mittelwert, die Standardabweichung und die Schwankungsbreite angegeben.