

Stephanie Simone Karch

Dr.med.

Untersuchungen zur Translokationsrate des aktiven und inaktiven X-Chromosoms menschlicher Lymphozyten nach Bestrahlung, erfaßt mittels chromosome painting

Geboren am 15.12.1972 in Düsseldorf

Reifeprüfung am 19.05.1992

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/93 bis WS 1998/99

Physikum am 29.08.1994 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 05.05.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik

Doktorvater: Prof. Dr. med. T. Cremer

Die chromosomale in situ Suppressions-(CISS) Hybridisierung mit chromosomenspezifischen DNA-Sonden ermöglicht die Darstellung ganzer individueller Chromosomen. Sie eignet sich damit in besonderem Maße für die qualitative und quantitative Analyse strahleninduzierter Translokationen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Translokationsraten des aktiven und inaktiven X-Chromosoms menschlicher Lymphozyten nach Bestrahlung miteinander verglichen. Es wurde geprüft, ob die Aberrationshäufigkeit eines Chromosoms von seiner dreidimensionalen Struktur beeinflusst wird.

Neuere Untersuchungen zu den Chromosomenterritorien der beiden X-Chromosomen haben ergeben, daß die Oberfläche des Xa-Territoriums signifikant größer als die des Xi-Territoriums ist. Die Hypothese, daß die Größe der Oberfläche des Chromosomenterritoriums die Translokationshäufigkeit beeinflusst, da Translokationen zwischen zwei Chromosomen nur innerhalb eines Chromatinbereichs an der Territoriumsperipherie möglich sind, wurde durch einen Vergleich der Translokationsraten des Xa und des Xi getestet. Gleichzeitig wurden die Translokationsraten der Chromosomen 7 und 8 bestimmt, welche einen annähernd gleichen DNA-Gehalt wie das X-Chromosom (DNA-Gehalt der Chromosomen 7, 8 und X: 5,3%, 4,8% und 5,08%) und eine vergleichbare Oberflächengröße wie das aktive X-Chromosom besitzen und somit ähnliche Translokationsraten aufweisen sollten.

Zur Unterscheidung zwischen den aktiven und inaktiven X-Chromosomen wurde das verspätete Eintreten des inaktiven X-Chromosoms in die S-Phase des Zellzyklus für eine spezifische Replikationsbänderung genutzt. Die Lymphozyten wurden einer ¹³⁷Cs-gamma Strahlung von 662 keV und einer Bestrahlungsdosis von 7 Gy ausgesetzt. Sie wurden insgesamt 72 Stunden kultiviert, während der letzten acht Stunden unter Zugabe des Thymidin-analogs BrdU. Durch die Inkorporation von BrdU in die Lymphozyten-DNA, anschließender Hoechst 33258-Färbung und UV-Bestrahlung wurde eine Differenzierung der beiden X-Chromosomen auf Metaphasepräparaten der in vitro bestrahlten Lymphozyten

ermöglicht. Es folgte eine Doppelhybridisierung der Chromosomen X und 7 bzw. X und 8 mit den chromosomenspezifischen Plasmid-DNA-Bibliotheken, so daß durch einen Fluoreszenznachweis alle vier Chromosomen dargestellt und gleichzeitig eine Unterscheidung zwischen den aktiven und inaktiven X-Chromosomen getroffen werden konnte. Die Translokationen der spezifisch hybridisierten Chromosomen wurden anschließend mit Hilfe der Zweifarben-CISS-Hybridisierungstechnik (qualitativ und quantitativ) analysiert.

Für die Chromosomen 7 und 8 ergaben sich Translokationsraten von 28,3% bzw. 31,3%, und für das X-Chromosom (ohne Differenzierung zwischen Xa und Xi) wurde ein Wert von 30,3% berechnet. Die für das aktive X-Chromosom ermittelte Translokationshäufigkeit betrug 24,9%, für das inaktive X-Chromosom 32,5%.

Die Translokationsraten der Chromosomen 7, 8 und X wurden miteinander verglichen und es stellte sich heraus, daß sich die Translokationshäufigkeiten für diese drei Chromosomen umgekehrt proportional zu ihrem DNA-Gehalt verhalten.

Außerdem zeigte sich, daß das inaktive X-Chromosom mit seiner kleineren Oberflächenausdehnung eine signifikant größere Translokationsrate als das aktive X-Chromosom aufweist.

Diese Experimente lassen die Schlußfolgerung zu, daß zwischen der Chromosomenlänge bzw. der Größe der chromosomalen Territoriumsfläche und der spezifischen Translokationshäufigkeit eines Chromosoms keine einfache Korrelation besteht.

Erklärungsmöglichkeiten dafür wurden diskutiert. Z.B. könnte ein direkter Zusammenhang zwischen DNA-Reparatur und Transkription zu einer eingeschränkten Aktivität der DNA-Reparaturprozesse des inaktiven X-Chromosoms führen. Die durch die Bestrahlung induzierten Doppelstrangbrüche könnten von dem inaktiven X-Chromosom nicht effizient repariert werden, sondern sich an der Bildung einer Translokation beteiligen. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß eine klonale Selektion von Lymphozyten mit translozierten inaktiven oder aktiven X-Chromosomen stattfindet, d.h. Zellen mit einem aberranten Xa- oder Xi-Chromosom während der Zellteilungen bevorzugt eliminiert werden. Dies würde auch für eine Abhängigkeit der analysierbaren Translokationsraten von der Dauer der Zellkultivierung verantwortlich sein.

Weitere Untersuchungen könnten auf allgemeine Faktoren, die an der Entstehung einer Translokation mitwirken, wie z.B. die klonale Selektion oder o.g. Reparaturmechanismen fokussieren.