

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Humangenetik

Prof. Dr. med. Christian Kubisch

Alterskorrelationen und Entstehungsmechanismen X-chromosomaler Aneuploidien in Lymphozytenkulturen von 42 Patientinnen mit habituellen Aborten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Nikolas Sebastian Kahlke
aus Heidelberg

Hamburg 2017

Angenommen
von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 06.03.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Karsten Held

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Christian Bamberg

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung.....	6
1.1 Gesellschaftlicher Kontext: Alter der Mütter bei einer Geburt.....	7
1.2 Habituelle Aborte: Definition und Häufigkeit	9
1.3 Psychische Belastung durch habituelle Aborte	11
1.4 Ursachen habitueller Aborte	12
1.4.1 Nicht-chromosomale Ursachen habitueller Aborte.....	12
1.4.2 Infektionen als Ursache habitueller Aborte.....	12
1.4.3 Endokrine Störungen als Ursache habitueller Aborte,.....	13
1.4.4 Lutealphasen -Defekt	14
1.4.5 Syndrom der Polyzystische Ovarien (PCOS), LH-Hypersekretion, Hyperprolaktinämie.....	15
1.4.6 Koagulopathien und immunologische Ursachen habitueller Aborte	16
1.4.7 Autoimmunstörungen.....	16
1.4.8 Alloimmun-Störungen.....	17
1.4.9 Anatomische Ursachen habitueller Aborte	18
1.4.10 Weitere nicht-chromosomale Ursachen	20
1.5 Chromosomale Ursachen habitueller Aborte:.....	21
1.5.1 Elterliche chromosomale Aberrationen.....	21
1.5.2 Reziproke Translokationen	22
1.5.3 Robertson'sche Translokationen	23
1.5.4 Inversionen.....	24
1.5.6 Habituelle Aborte bei Frauen mit Triple-X-Syndrom oder Turner-Syndrom	25
1.6 Chromosomale Mosaik.....	26
1.6.1 Chromosomale Mosaik in Embryonen.....	29
1.6.2 Mosaik der X-Chromosomen als Ursache habitueller Aborte	30
1.6.3 Mosaik der X-Chromosomen und Nondisjunktion-Risiko	30
1.6.4 Mosaik der X-Chromosomen und ovarielle Störungen.....	31
1.6.5 Mosaik der X-Chromosomen und Turner-Syndrom-ähnliche Störungen bei Patientinnen mit habituellen Aborten.....	32
1.6.6 Zweifel an der Hypothese eines Zusammenhangs zwischen gonosomalen Mosaiken und habituellen Aborten in der aktuellen Literatur	34
1.7 Chromosomale Ursachen habitueller Aborte: Aneuploidien in Oozyten und Spermien	36
1.7.1 Aneuploidien in Aborten.....	38

1.7.2 Trisomien in Aborten	38
1.7.3 Monosomien in Aborten	39
1.7.4 Strukturelle Aberrationen in Aborten.....	40
1.8 Aneuploidie und mütterliches Alter	40
1.9 Gonosomale Mosaik: Diagnostik	43
1.9.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	45
1.9.2 Mit FISH untersuchte Gewebe.....	46
2. Material und Methoden	48
2.1. Patientinnen.....	48
2.2. Lymphozytenkulturen	49
2.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	49
2.3.1 Durchführung	50
2.3.2 Chemikalien:	52
2.4 Auswertung	52
2.4.1 Kriterien Interphasekerne.....	53
2.4.2 Kriterien Metaphasen	53
3. Ergebnisse	54
3.1 Übersichts-Tabelle Analyseergebnisse	55
3.2 Vergleich von Interphase- und Metaphase-Diagnostik.....	57
3.2.1. Durchschnittswerte gonosomal aneuploider Mitosen und Interphasekerne	57
3.2.2 Verhältnis von gonosomal-aneuploiden Interphase-Kernen und Mitosen...	58
3.3 Korrelationen von Metaphase-.....	62
und Interphasediagnostik	62
3.4 Art und Ausprägung der gonosomalen Mosaik:.....	66
3.4.1 Verhältnis von hypoploiden zu hyperploiden Zellreihen.....	70
bei den gemischten Mosaiken	70
3.4.2 Prozentuale Anteile der aneuploiden Zelllinien.....	71
3.5 Alterskorrelationen X-chromosomal aneuploider Interphasekerne und Mitosen	74
3.5.1 Alter der Patientinnen und Häufigkeit gonosomal-aneuploider Mitosen ...	75
3.5.2 Alter der Patientinnen und Häufigkeit der gonosomal-aneuploiden Interphase-Kerne	76
4. Diskussion	84
4.1 Methodenkritik	86
4.1.1 Effizienz von FISH	86
4.1.2 Störfaktor Lymphozytenkultur.....	89

4.2 Vergleich von Interphase- und Metaphasediagnostik	90
4.2.1. Verhältnis von X-chromosomal aneuploiden.....	90
4.3 Alterskorrelation von X-chromosomalen Aneuploidien.....	93
4.3.1 Alterskorrelation des Verlustes von X-Chromosomen	94
4.3.2 Alterskorrelation X-chromosomaler Hyperploidien	98
4.3.3 Verhältnisse von hypoploiden zu hyperploiden Interphasekernen, Mitosen und Zellreihen bei den gemischten Mosaiken.....	102
4.4 X-Chromosomale Mosaik und habituelle Aborte	104
5. Zusammenfassung.....	109
5.1 Summary	111
6. Abkürzungsverzeichnis	113
7. Literaturverzeichnis.....	114
8. Danksagung.....	124
9. Lebenslauf.....	125
10. Eidesstattliche Erklärung	126

1. Einführung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit fanden statt zwischen April 1994 und Februar 1995. In der Humangenetischen Sprechstunde des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden zu dieser Zeit Blutproben genommen von Frauen, die für eine humangenetische Abklärung ihrer habituellen Aborte vorgestellt wurden. Strukturelle Chromosomensatz-Untersuchungen waren durchgeführt worden und hatten sich als unauffällig dargestellt. Bei der Untersuchung einer größeren Anzahl von Mitosen waren Mosaik der X-Chromosomen gesehen worden. Daher sollte der Frage nachgegangen werden, welche Rolle diese X-chromosomalen Mosaik im Zusammenhang mit der Entwicklung Habituelle Aborte einnehmen könnten.

Aufgrund der damaligen Forschungsschwerpunkte wurden Untersuchungen der X-Chromosomen mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung angestrebt. Durch diese Methode war es in den Jahren zuvor möglich geworden, mit einem vertretbaren Aufwand eine große Anzahl an Mitosen und auch Interphasekerne zu untersuchen. Eine der damaligen Fragestellungen innerhalb des Instituts war die nach der Häufigkeit der X-chromosomalen Mosaik in den Lymphozytenkulturen der Patientinnen.

Im Rahmen meiner Untersuchungen fanden sich dann Hinweise auf das Vorliegen von zwei unterschiedlichen Mechanismen in der Entstehung der gonosomalen Aneuploidien: Anaphase-Lag und Nondisjunktion, deren Zusammenhang mit dem Alter der Patientinnen statistisch signifikante Unterschiede aufwies. Meine Untersuchungen zu X-chromosomalen Aneuploidien in Lymphozytenkulturen von Frauen mit habituellen Aborten, beschäftigten sich daher mit der Frage der Vergleichbarkeit von Interphase- und Metaphasediagnostik, der Frage der Alterskorrelation von X-chromosomalen Aneuploidien und den möglichen zugrundeliegenden Mechanismen.

1.1 Gesellschaftlicher Kontext: Alter der Mütter bei einer Geburt

Angesichts des immer weiter steigenden Anteils älterer Mütter beziehungsweise Paare, zeichnete sich schon vor den neunziger Jahren der Altersbezug möglicher Risikofaktoren von Habituellen Aborte als wichtiger Aspekt der Forschung und humangenetischen Beratung ab.

Auch heute, gut zwanzig Jahre nach Beginn der Untersuchungen, gewinnt der Themenkomplex Alter/Schwangerschaft/Geburten weiter an Bedeutung. So berichtete das Bundesministerium für Familie, Senioren, Frauen und Jugend (BMFSJ, 2014) aufgrund von Zahlen des statistische Bundesamts, das durchschnittliche Alter bei Geburt des ersten Kindes sei in den letzten vier Jahrzehnten von 24,9 auf 29,2 Jahre gestiegen und zwar in allen europäischen Ländern. In Deutschland sei dieser Trend noch nicht zum Stillstand gekommen. Hätten 2001 die Mütter im Alter von 29 Jahren und jünger noch 47% der Geburten gestellt, so sank dieser Anteil auf 38% im Jahr 2010 und umgekehrt wuchs der Anteil an den Geburten der Mütter, die das 30. Lebensjahr erreicht haben oder älter sind, von 43 auf 52%. Dazu berichtet das Statistische Bundesamt (Statistisches Bundesamt, 2017) von einem ansteigenden Durchschnittsalter der Mütter von 30,6 in 2011 und 31,0 Jahren in 2015.

Angesichts der Alterspyramide drehen sich viele demographische Fragen um den Aspekt Geburtenraten. Hierzu sagte wiederum das Statistische Bundesamt, dass, um weiterhin eine stabile Kinderzahl zu haben, zwei Dinge erforderlich wären: Frauen im höheren gebärfähigen Alter müssten viel mehr Geburten nachholen, als dies bis jetzt der Fall sei. Außerdem müssten sich die Abstände zwischen den einzelnen Geburten verringern. Der Abstand zwischen zwei Geburten habe von 2009 bis 2012 konstant etwas mehr als sieben Jahre betragen (Statistisches Bundesamt, 2012).

Darüber hinaus berichtete das Statistische Bundesamt auf seiner Internetseite dass die Anzahl der Lebendgeborenen mit über 40jährigen Müttern in Deutschland von 25.936 im Jahr 2007 auf 28.455 im Jahr 2012 gestiegen sei (Statistisches Bundesamt, 2012). Interessanter Weise ist es zwischen 2011 und 2015 in Bezug auf die Zahl der Neugeborenen in den Deutschland zu einer Trendwende

gekommen. Die Zahl der Neugeborenen stieg zwischen 2011 und 2015 um etwa 75 000 auf rund 738 000. Dies sei der höchste Wert seit der Jahrtausendwende (767 000 Lebendgeborene). Dieser Geburtenanstieg ginge im Wesentlichen zurück auf den Anstieg der potenziellen Mütter im Alter zwischen 25 und 39 Jahren um 344 000, dazu habe die Zuwanderung und auch eine relativ günstige Altersstruktur beigetragen, da die in den späten 1970er und den 1980er-Jahren geborenen Frauen als Kinder der Babyboomer den geburtenstärkeren Jahrgängen angehörten (Statistisches Bundesamt, 2017). BMFSFJ (2014) wie auch Statistisches Bundesamt (2012) schlossen dennoch aus diesen und anderen Beobachtungen, dass im Sinne einer gesamtgesellschaftlichen Aufgabe Hindernisse auf dem Weg zu Geburten in allen Altersgruppen beseitigt werden sollten. Es sei von Interesse, die psychischen Ursachen ebenso wie die Folgen von ungewollter Kinderlosigkeit, Fehlgeburten oder habitueller Aborte in Bezug auf Kinderwunsch aber auch Stabilität der Partnerschaften zu betrachten, damit problematische Entwicklungen mit ungewünschten Auswirkungen auf die Demographie, beeinflusst werden können. Denn nur dann könne es gelingen, die Entwicklungspotentiale in Bezug auf Stabilität oder Wachstum der Geburtenzahlen zu nutzen. Auch auf der aktuellen Internetseite des Bundesfamilienministeriums bleibt dieses Thema präsent und wird sehr differenziert behandelt (informationsportal-kinderwunsch.de des Bundesfamilienministeriums, 2017).

Es liegt auf der Hand, dass dafür neben wissenschaftlichen Erkenntnissen über die Ursachen und Risiken auch die psychischen Belastungen im Zusammenhang mit späten ersten Geburten und komplizierten Schwangerschaftsanamnesen abgebaut werden sollten.

Wiederholte Fehlgeburten (habituelle Aborte) betreffen etwa 1-2% aller Partnerschaften. Strukturelle und numerische chromosomale Veränderungen stellen einen großen Anteil an den Ursachen dar (Voigt et al. 2004).

Die vorliegende Arbeit untersucht X-chromosomale Aneuploidien in Lymphozytenkulturen von 42 Patientinnen, die mit der Diagnose „Habitueller Aborte“ zur zytogenetischen Untersuchung und humangenetischen Beratung der Abteilung für Zytogenetik des Humangenetischen Instituts der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf im Zeitraum von März 1993 bis Februar 1995 vorgestellt wurden.

1.2 Habituelle Aborte: Definition und Häufigkeit

Nach der Definition der WHO wird als Abort jede Unterbrechung einer Schwangerschaft mit Verlust eines Embryos von 500 g oder weniger entsprechend dem Zeitpunkt der 20-22 Woche bezeichnet. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da die Lebensfähigkeit eines ungeborenen Kindes zu diesem Termin mit größter Sicherheit auszuschließen und somit eine deutliche Unterscheidung von Tot- oder Fehlgeburten gegeben ist.

Die Fehlgeburt ist die häufigste Schwangerschaftskomplikation (Rai et al. 2006; Salker et al. 2010). Es wird davon ausgegangen, dass ungefähr die Hälfte (Edmonds 1982, Rai et al. 2006) bis dreiviertel (Coonen et al. 2004) aller befruchteter Eizellen bzw. Zygoten verloren gehen. Andere Autoren differenzieren hier noch in einen Anteil von ca. 30% aller befruchteter Eizellen, die vor der Implantation verloren gehen und ca. 30% aller befruchteter Eizellen, die danach verloren gehen (Macklon et al. 2002). Von den klinisch bemerkten Schwangerschaften sollen immer noch 10-20% als sogenannte Spontanaborte missglücken (Rai et al. 2006).

Folgen mehrere dieser Spontanaborte aufeinander, spricht man von habituellen Aborten. Sind Frauen betroffen, die noch keine Lebendgeburten hatten, spricht man von primären habituellen Aborten, bei Patientinnen mit vorangegangenen Geburten von sekundären habituellen Aborten.

Über 80% der Spontanaborte finden in den ersten 12 Wochen statt, mehr als die Hälfte aufgrund chromosomaler Aberrationen (Chung und Yeko 1996; Clifford et al. 1994; Kalousek 1994). Aborte im zweiten Trimester weisen nur zu 10-20% chromosomale Aberrationen auf (Stirrat 1990, Kalousek et al. 1992).

Die für die Diagnose habituelle Aborte geforderte Anzahl an Spontanaborten wird mit zwei angegeben (Stirrat 1990; Del Fabro et al. 2011), teils auch mit drei oder mehr (Jauniaux et al., 2006).

Bei einem Vergleich von Patientinnen-Gruppen mit zwei oder drei Aborten fand Coulam (1991) keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Ursachen der Aborte.

Während Edmonds et al. (1982) noch davon ausgingen, dass ca. 90% der Aborte von den Müttern unbemerkt blieben, konnten dann in den folgenden Jahren mit Hilfe hochsensitiver Schwangerschafts-Tests Konzeptionen zum Zeitpunkt der erwarteten Regelblutung durch die Frauen selber erkannt werden. Ein zunehmend größerer Anteil der früher unbemerkten Aborte wurde dann nicht mehr als eventuell stärkere, verspätete Menstruation gedeutet, sondern als Spontanabort (Cook und Pridham 1995).

Die rechnerische Wahrscheinlichkeit einer Folge von drei klinisch bemerkten Spontanaborten wird mit 0,3-0,8% angegeben. Unter den Paaren mit Kinderwunsch beträgt sie jedoch 1-5%. Daher wird auf eine Häufung von Risikofaktoren innerhalb dieser Gruppe geschlossen (Rai und Regan 2006; Rai, Clifford, Regan 1996; Stephenson 1996; Cook und Pridham 1995; Stray-Pedersen und Stray-Pedersen 1984).

Deutlicher noch wird diese These durch folgende Zahlen gestützt: Für die in Studien untersuchten Patientinnen steigt das Risiko weiterer Aborte nach jedem Spontanabort weiter an (Stirrat 1990; Berry et al.1995). Nach dem ersten soll dieses Risiko 16-24%, nach dem zweiten 25- 26%, nach dreien 32-45% und nach vier Spontanaborten 40-54% betragen. Diese Zahlen weichen stark ab von den nach Stirrat (1990) durchschnittlich zu erwartenden 2,3%, 0,34% und 0,05% Wahrscheinlichkeit für einen zweiten, dritten und vierten Abort in Folge.

Ein erhöhtes Spontanabort-Risiko findet sich bei älteren Frauen. Ab dem 40. Lebensjahr liegt es bei 40-60% (Chung und Yeko 1996; Berry et al. 1995). Es kommen dann zu deutlich mehr chromosomal abnormen Aborten, vor allem Trisomien (Hassold and Hunt, 2006; Cowchock et al.1993).

Patientinnen, bei denen die Chromosomenanalyse des Abortmaterials einen Normalbefund zeigt, haben ein höheres Risiko weiterer Aborte im Vergleich zu Patientinnen, deren Aborte durch Aberrationen erklärbar sind (Cowchock et al.1993, Hasegawa et al.1996, Stern et al.1995).

1.3 Psychische Belastung durch habituelle Aborte

Psychischen Belastungen durch Angst vor Fehlgeburten oder habituellen Aborten oder durch eine missglückte psychische Verarbeitung dieser Ereignisse mit Entwicklung depressiver Symptome haben nicht nur im Kontext der oben erwähnten demographischen Situation eine große Bedeutung. Sie sind aber erst in der letzten Dekade Gegenstand eines wachsenden Forschungsaufkommens geworden (Geller et al. 2004). Dabei wird von den Autoren bemerkt, dass eine fachlich eigentlich angemessene Differenzierung in Störungen aus dem depressiven Spektrum und aus dem Bereich der Angststörungen erst allmählich voranschreitet. Rai und Regan (2006) halten fest, dass eine psychologische Morbidität besteht und es in der Zusammenarbeit von Patientinnen und Behandlern häufig zu Frustrationen kommt. So würden auch ein Drittel der Patientinnen, die die Hilfe von Spezialkliniken in Anspruch nähmen, Anzeichen einer Depression zeigen.

In ihrer Studie zeigten Fertl et al. (2009) eine Korrelation zwischen schwangerschaftsbedingter Angst und Schwangerschaftskomplikationen wie vaginalen Blutungen, Erschöpfung, stationären Krankenhausaufnahmen, Wunsch nach Kaiserschnitt und abnormalem APGAR-Score. Sie berichten außerdem, früher geäußerte Vermutungen und Beobachtungen, schwangerschaftsbezogene Angst durch einen oder mehrere habituelle Aborte sei ein protektiver Faktor durch eine bewusstere und intensivere Nutzung der Vorsorge, seien nicht bestätigt worden. Die Ursache für Komplikationen vermuten die Autoren in bio-psychischen, psycho-neuro-endokrinen oder psycho-immunologischen Effekten.

Letztlich habe sich gezeigt, dass ein genaues Wissen um die Ursachen des oder der vorangegangenen Aborte und die Risikofaktoren weiterer Aborte, Ansatzpunkt seien für die Reduktion der schwangerschaftsbezogenen Ängste. Diese Reduktion gelänge durch gezielte Aufklärung und auch Einzel- bzw. Gruppenpsychotherapeutische Methoden. Dadurch seien körperliche wie psychische Komplikationen abzuschwächen (Fertl et al. 2009)

1.4 Ursachen habitueller Aborte

In ungefähr der Hälfte der Fälle lassen sich für habituelle Aborte auch heutzutage keine eindeutigen Ursachen finden (Toth et al. 2010, Stirrat 1990, Jauniaux et al. 2006, Clifford et al. 1994; Stephenson 1996; Stray-Pedersen und Stray-Pedersen 1983). Diese Gruppe wird als idiopathischer Genese klassifiziert. Es ist anzunehmen, dass diese Gruppe sehr heterogen und wahrscheinlich jeweils nicht nur ein Pathomechanismus für die habituellen Aborte ursächlich ist (Stirrat 1990). Die sinkenden Geburtenraten in Westeuropa werden von Toth et al. (2010) in ihrem Review zu Diagnose und Behandlung der habituellen Aborte als Ursache des wachsenden Angebots an umfangreichen diagnostischen Abläufen gesehen.

1.4.1 Nicht-chromosomale Ursachen habitueller Aborte

Als nicht-chromosomale Ursachen habitueller Aborte werden angesehen endokrine Störungen, mütterliche erworbene oder angeborene Koagulopathien bzw. Thrombophilien, immunologische Faktoren, mütterliche Infektionen und anatomische Fehlbildungen (Jauniaux et al. 2006, Rai und Regan 2006, Toth et al. 2010).

1.4.2 Infektionen als Ursache habitueller Aborte

In manchen älteren Studien galten Infektionen bei einem nicht geringen Anteil der Patientinnen als Ursache der habituellen Aborte. Stray-Pedersen und Stray-Pedersen (1983) sahen die bei 15% der Patientinnen gefundenen Ureaplasma- und Toxoplasma-Infektionen des Endometriums als Grund der Aborte. Andere Autoren stellen aufgrund theoretischer Überlegungen einen so hohen Anteil in Frage:

Von Rai et al. (1996) wurden diejenigen Infektionen als Ursache habitueller Aborte ausgeschlossen, die nicht längere Zeit bestehen könnten oder aber stärkere Symptome verursachten und somit nur selten unbehandelt bzw. unentdeckt blieben (z.B. Herpes genitalis, Röteln, Listeriose, Cytomegalie). Cook und Pridham (1995) wiesen auf die Möglichkeit chronischer, gehäufter Infektionen bei Patientinnen mit Störungen der Immunabwehr, vor allem durch AIDS, hin.

Rai blieb dann gut 10 Jahre später in seinem Review zusammen mit Regan (2006) im Wesentlichen bei seiner Ansicht, erwähnte aber auch, dass es Hinweise auf die Wirksamkeit entsprechender Screening-Programme gibt. Auch Toth et al. (2010) sprechen sich für ein Screening vaginaler Infekte und pH-Wert-Messungen aus, um aufsteigenden Infektionen, Beeinflussungen des lokalen Prostaglandin-haushalts, konsekutiver Zervixinsuffizienz oder später Fehlgeburt vorzubeugen.

Neben diesen theoretischen Überlegungen fanden sich auch direkte Untersuchungen zu einzelnen möglichen Erregern, nach denen Chlamydien- oder Listerien-Infektionen keine Ursache habitueller Aborte zu sein scheinen (Rai et al. 1994). Toxoplasmose oder die bakterielle Vaginose, als Störung der Vaginalflora mit Vorkommen von unter anderem Ureaplasma urealytikum, wurden auch direkt mit habituellen Aborten in Verbindung gebracht. Als Voraussetzung dafür, eine Infektion als Ursache diagnostizieren zu können, fordert Stephenson (Stephenson 1996) den zweimaligen Nachweis von Plasmazellen in der Endometrium-Biopsie als Zeichen einer chronischen Infektion mit z.B. Ureaplasma urealytikum oder Mykoplasma hominis. In ihrer eigenen Studie war dies nur bei einer von 197 Patientinnen (0,5%) der Fall.

1.4.3 Endokrine Störungen als Ursache habitueller Aborte, Diabetes mellitus und Schilddrüsenfunktionsstörungen

Bei schlecht eingestelltem Diabetes sind durch embryotoxische Effekte der Hyperglykämie spontaner Aborte, die auch in Folge als habituelle Aborte auftreten können, mit höherer Wahrscheinlichkeit zu erwarten (Berry et al. 1995). In ihrem Artikel zum Thema „Risiken der späten Mutterschaft“ erwähnen Ritzinger et al. (2012), ein 2,3fach erhöhte Risiko der Mütter über 35 Jahren mit Typ-II-Diabetes oder Gestationsdiabetes.

Toth et al. (2010) sprechen sich daher neben dem Screening auf erhöhte HbA1c-Werte auch für ein Screening des TSH-basal-Spiegels aus, um schon vor möglichen Schwangerschaften Schilddrüsenfunktionsstörungen aufzudecken, da diese Ursache habitueller Aborte werden könnten. Auch seien Zusammenhänge

mit Hyperprolaktinämie bekannt, dann müssten auch Hypophysentumore ausgeschlossen werden.

Gut behandelt stellten Diabetes mellitus und Schilddrüsenunterfunktion keinen Grund für habituelle Aborte dar (Stirrat 1990, Berry 1995, Jauniaux 2006, Ritzinger et al. 2012).

Die im Zusammenhang mit Schilddrüsen-Erkrankungen beobachteten Autoantikörper gegen thyreoidales Gewebe schienen für manche Autoren nicht durch mögliche endokrine Funktionsstörungen mit habituellen Aborten in Verbindung zu stehen, sondern wurden als Zeichen einer fehlerhaften Immunregulation mit potentieller Störung der fötalen Entwicklung gedeutet (Cook und Pridham 1995; Rai et al. 1996). Der Nachweis dieser Autoantikörper sei vergleichbar mit dem Nachweis von Anticardiolipin als Hinweis auf eine Autoimmunstörung. Im Gegensatz dazu zeigten Ticconi et al. (2011) in ihrer Case-Control-Studie an 160 Patientinnen mit habituellen Aborten einen höheren Anteil an Patientinnen mit Anti-Thyreoidalen-Autoantikörpern in der Patientinnengruppe.

1.4.4 Lutealphasen -Defekt

Während unter anderem Rai et al. (1996), Clifford et al. (1994) und Coulam und Stern (1994) den Standpunkt vertraten, die inadäquate Progesteronsekretion des Corpus luteum sei nicht in einen sinnvollen Zusammenhang mit habituellen Aborten zu bringen, hatten Stray-Pedersen und Stray-Pedersen (1983) sechs ihrer insgesamt 195 Patientinnen aufgrund dieser Diagnose mit hCG-Gaben behandelt und hatten bei allen Erfolg.

Auch andere Autoren sehen, unter der Annahme einer Störung der hypothalamisch-hypophysären-ovariellen Achse, in der genannten Therapie, der Gabe von Gonadotropin-Releasing-Hormon oder der direkten Gabe von Progesteron eine sinnvolle Behandlungsmaßnahme. Ziel sei, eine fehlerhafte Reifung des Endometriums auszugleichen (Cook und Pridham 1995), oder die immunmodulierende Wirkung des Progesterons auf verschiedene Zytokine zu nutzen (Rai und Regan, 2006).

1.4.5 Syndrom der Polyzystische Ovarien (PCOS), LH-Hypersekretion, Hyperprolaktinämie

Bis zu 10-22% aller Frauen im gebärfähigen Alter seien vom PCOS betroffen, in der Gruppe der Patientinnen mit habituellen Aborten soll dieser Anteil auf 40% steigen (Rai und Regan 2006).

Bei der Hypersekretion von LH in Verbindung mit polyzystischen Ovarien und Spontanaborten, so Rai et al. (1996), galt ein Zusammenhang zu habituellen Aborten als gesichert. Allerdings sei der genaue Mechanismus, über den die Aborte ausgelöst würden, noch unklar. Denkbar sei erstens eine vorzeitige Wiederaufnahme der ersten meiotischen Reifeteilung der Oozyten mit dem Ergebnis einer vorgealterten Eizelle, oder zweitens ein direkter Einfluss des LH auf das Endometrium, mit der Folge einer erschwerten Nidation. Als sicher scheinend wurde genannt, dass Frauen mit polyzystischen Ovarien, LH-Hypersekretion oder anamnestischen Menstruationsunregelmäßigkeiten eher chromosomal normale Aborte haben, als Patientinnen ohne diese endokrinen Störungen, so berichteten Hasegawa et al. (1996).

Die Therapie erhöhter LH-Werte durch Suppression der endogenen LH-Produktion mit LH-Releasing-Hormon sei in ihrem Erfolg umstritten, berichteten Clifford et al. (1994).

Pearce und Hamid (1994) wiesen in einem randomisierten Doppelblindversuch bei 191 Patientinnen mit habituellen Aborten signifikant niedrigere Abortraten sowohl bei Patientinnen mit polycystischen Ovarien als auch mit LH-Hypersekretion durch die Behandlung mit hCG nach. Clifford et al. (1996) fanden keinen Hinweis auf Vorteile durch die Suppression erhöhter LH-Werte und wiesen auf die bei Ihren 56 unbehandelten Patientinnen exzellente Schwangerschafts- und Lebendgeburtenrate hin.

Toth et al. berichteten dann 2010, in den Thessaloniki Guidelines von 2008 finde sich schließlich für die Frauen mit Polyzystischen Ovarien ein klarer Konsensus in Bezug auf die Stufendiagnostik und Therapie der damit verbundenen Infertilität. Die Behandlung einer Hyperprolaktinämie durch Bromocriptin reduziere die Rate an Aborten (Rai und Regan 2006).

1.4.6 Koagulopathien und immunologische Ursachen habitueller Aborte

Cook und Pridham berichteten schon 1995, immunologische Ursachen habitueller Aborte seien Objekt intensiver Forschung. Sie würden zweckmäßig unterteilt in Autoimmunstörungen und Alloimmunstörungen.

1.4.7 Autoimmunstörungen

Zu den klassischen Verfahren, diese Störungen als mögliche Ursache habitueller Aborte zu erkennen, gehöre der Nachweis von Antiphospholipid-Antikörpern durch ELISA oder indirekt durch Abänderungen von Gerinnungs-Tests (Cook und Pridham 1995), zum Beispiel eine durch Normalplasma nicht korrigierbare verlängerte aPTT.

Untersucht werden sollten sowohl das Lupus-Antikoagulanz, als auch Anticardiolipin-Antikörper oder andere Antiphospholipid-Antikörper (Antikörper gegen Phosphatidylserin, -Inositol, -Ethanolamin u.a.) und Kofaktoren wie β 2-Glycoproteine (Cook und Pridham 1995; Berry et al. 1995; Toth et al. 2010).

Auch positive ANA-Titer und klinische Zeichen rheumatischer Erkrankungen wurden in einem Zusammenhang zu den Aborten gesehen (Stephenson 1996).

Verantwortliche Mechanismen seien Störungen der Blutgerinnung in Form von Hyperkoagulabilität und Hemmung der Fibrinolyse. Vermittler dieser pathologischen Reaktionen, so die Autoren, könnten die Bindung der Antikörper an auf Zellmembranen sitzende Phospholipide sein, die gerinnungshemmende Wirkung hätten (z. B. Protein C oder S).

Aktueller berichteten Toth et al (2010), mittlerweile seien mehr Details bekannt, welche immunologischen Prozesse in die erfolgreiche Implantation des Embryos mit einbezogen seien. Eine Anpassung der mütterlichen Immunantwort sei der Schlüsselprozess in der Entstehung der fetoplazentaren Einheit. Habituelle Aborte seien somit auch die Folge unangemessener humoraler oder zellulärer Abwehrreaktionen gegen den Embryo.

Das Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom spiele bei 15% der Patienten mit habituellen Aborten eine Rolle. Die Behandlung habe durch Aspirin und niedermolekulare Heparine zu erfolgen (Toth et al. 2010).

An weiteren Störungen wurden genannt die hereditären Thrombophilien Faktor V Leiden-Mutation, aktivierte Protein C-Resistenz, Prothrombin G20210A- sowie Protein S-Mangel. Bei fehlenden randomisierten kontrollierten Studien wird hier der Einsatz von Acetylsalicylsäure und Heparinen diskutiert (Jauniaux 2006, Toth et al. 2010).

Zuvor waren in den Neunziger Jahren Hinweise auf pathophysiologische Zusammenhänge der oben genannten Antikörper und bestimmten bei Frauen mit habituellen Aborten vermehrt vorkommenden aktivierten Monozyten bzw. Natürlichen Killerzellen und bestimmten B-Lymphocyten gesehen worden (Cook und Pridham 1995).

1.4.8 Alloimmun-Störungen

Das Konzept der immunologisch privilegierten Stellung fötalen Gewebes als Semi-Allograft im mütterlichen Uterus besteht seit den 50iger Jahren (Ecker et al.1993). Störungen der mütterlichen zellulären und humoralen Immunantwort werden für einen Großteil der ungefähr 50% ungeklärten Aborte der Patientinnen mit habituellen Aborten verantwortlich gemacht (Cook und Pridham 1995).

In einer Untersuchung von Salker et al. (2010) wurde eine gestörte Selektion von Embryonen durch eine fehlerhafte zyklusabhängige Differenzierung von Endometrium-Stromazellen in spezialisierte Dezidua-Zellen gesehen. Die untersuchten Patientinnen mit habituellen Aborten zeigten zunächst eine erhöhte Fertilität durch eine angenommenerweise erleichterte Implantation nicht lebensfähiger Embryonen, die aber im Verlauf dann als habituelle Aborte klinisch auffallen würden.

In früheren Studien mit diesem Ansatz wurde die Rolle einer vermehrten Übereinstimmung elterlicher HLA-Haplotypen oder die fehlerhafte Produktion blockierender Antikörper durch das mütterliche Immunsystem untersucht (Stirrat 1990; Berry et al. 1995; Rai et al.1996).

Durch Untersuchungen zu Faktoren wie Subklassen und Zusammenspiel der B- und T-Lymphozyten, Makrophagen oder Natürlichen Killerzellen, ebenso wie zu der Rolle verschiedener Untereinheiten des HLA-Systems, Regionen des Klasse I und II-Major-Histocompatibility-Complex (MHC) und löslicher Botenstoffe des Immunsystems bzw. embryotoxische Faktoren werden allerdings diese etwas älteren Theorien teils bestätigt, teils auch in Frage gestellt (Ecker et al. 1993, Cook und Pridham 1995, Rai und Regan, 2006).

Als Therapie der gestörten Immunantwort wurden sowohl die Gabe von Immunglobulinen als auch eine Immunisierung mit Partner-Lymphozyten diskutiert und angewandt, beide mit dem Ziel, eine Immunakzeptanz des fötalen Gewebes zu erreichen, durch zum Beispiel eine erhöhte Produktion der blockierenden Antikörper (Cook und Pridham 1995, Rai et al. 1996, Makino et al. 1992). Nach Toth et al. (2010) besteht für dieses Verfahren weiterhin Unsicherheit in Bezug auf einen in Metaanalysen nachweisbaren Effekt. Möglicherweise existieren aber profitierende Subgruppen an Patienten/Paaren.

Stern et al. (1995) weisen darauf hin, dass als Marker für ein wahrscheinliches Ansprechen auf Immunglobuline im Rahmen einer Immuntherapie die Werte für CD56+-Zellen und Anti-Phospholipid-Antikörper dienen könnten.

Jauniaux et al. (2006) kamen zu dem Schluss, dass sich unter Berücksichtigung der vorhandenen Studien für die Gabe von intravenösen Immunglobulinen oder Glukokortikoiden sowie auch für die Gabe von Partner-Leukozyten keine Auswahlkriterien für möglicherweise profitierende Patientinnengruppen finden lassen. Auch Hinweise auf eine Abnahme der Abortrate würden fehlen. Toth et al. (2010) gingen wie erwähnt davon aus, dass profitierende Subgruppen identifizierbar seien.

1.4.9 Anatomische Ursachen habitueller Aborte

Welche anatomische Defekte des Uterus Ursache habitueller Aborte sein könnten, ist umstritten. Dies gilt sowohl für die kongenitalen Anomalien der Müller'schen Gänge, wie auch für die Zervix-Insuffizienz (Stirrat 1990, Rai et al. 1996).

Stray-Pedersen und Stray-Pedersen (1983) werteten auch die bei ihren Patientinnen gefundenen fixierten Retroversionen und Adhäsionen des Uterus als ursächlich.

Von Stephenson (1996) werden der Uterus arcuatus und mäßige Adhäsionen nicht als signifikante Ursachen betrachtet, wohingegen diese von Toth et al. (2010) in einem Zusammenhang zu habituellen Aborten gesehen werden, so beim erworbenen Asherman-Syndrom.

In einer Studie mit 500 Patientinnen fanden Clifford et al. (1994) durch Becken-Sonographien Uterusanomalien bei 9 Patientinnen (1,8%), die nachfolgend durch Hysteroskopie oder -graphie bestätigt wurden. Die gefundene Häufigkeit entspricht der von Frauen mit normaler Schwangerschaftsanamnese (Rai et al. 1996).

Bei vier der neun Patientinnen fanden sich erhöhte LH-Werte als mögliche Ursache und weitere vier hatten schon erfolgreiche Schwangerschaften hinter sich.

Makino et al. (1992) fanden unter 1000 Patientinnen 147 Uterusanomalien durch Hysterosalpingographien und stellten eine Methode zur Einteilung der Befunde vor, die die Länge des Septums zur Länge der Uterus-Höhle in Relation setze und so eine Trennung in Uterus arcuatus, partiell und komplett septierten Uterus ermögliche. Die Häufigkeiten betragen 65%, 28% und 5%, ein Uterus unicornis fand sich bei 3%. Die Anzahl der stattgefundenen Aborte bei den vier Gruppen war gleich. Für eine chirurgische Intervention spräche die Tatsache, dass das Septum des Uterus mangelhaft durchblutet würde und eine Implantation dort nicht erfolgreich verlaufen könne. Sie fanden nach der bei 50 dieser Patientinnen durchgeführten modifizierten Metroplastie eine Geburtsrate von 85% im Vergleich zu dem vorangegangenen Abortrisiko von 98,8%.

Berry et al. (1995) nennen als Methode der Wahl die hysteroskopische Resektion des Septum.

Rai et al. (1996) weisen darauf hin, ein Uterus-Septum sei nur als Ursache habitueller Aborte denkbar, wenn mehrere Implantationen in Folge dort stattfänden, was unwahrscheinlich sei.

Wie schon erwähnt, ist die Diagnose der Zervix-Insuffizienz als Ursache der habituellen Aborte ebenso umstritten wie die Therapie in Form der Cerklage (Rai et al.1996, Berry et al. 1995).

Neben einer Anamnese von Zweit-Trimester Aborten durch vorzeitige Ruptur der Membranen werden als diagnostische Möglichkeiten erwähnt: ein im Hysterosalpingogramm gefundener Durchmesser des Ostium internum von 10 mm, der Hegar-Test, Hysteroskopie mit problemlosem Einführen eines Nr.17-Pratt-Dilatators und sonographische Kontrollen in der folgenden Schwangerschaft (Stephenson 1996, Rai et al. 1996, Berry et al.1995).

1.4.10 Weitere nicht-chromosomale Ursachen

Berry et al. (1995) und Jauniaux et al. (2006) erwähnen als seltene mögliche Ursache die Stoffwechselstörungen Morbus Wilson und die Homocystinämie sowie deren als Methionin-Intoleranz beschriebene heterozygote Form.

Clifford et al. (1994) und Jauniaux et al. (2006) weisen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Übergewicht und habituellen Aborten hin. Sie empfehlen, diese Patientinnen mit Hilfe von Diätassistenten oder Selbsthilfegruppen zur Gewichtsreduktion zu motivieren,

In einer Studie mit 79 Paaren, für deren habituelle Aborte keine Ursache erkennbar war, konnten Christiansen et al. (1992) nachweisen, dass das Geburtsgewicht der Partnerinnen gegenüber dem von Frauen einer Kontrollgruppe signifikant niedriger gewesen sei. Sie vermuteten einen nur in den Patientinnen präsenten immunologischen oder genetischen Faktor.

Der Anteil der Patientinnen mit habituellen Aborten, für die sich keine Ursachen finden lassen ist groß. Er wird mit ungefähr 50% veranschlagt. Für diese Gruppe von Patientinnen wiesen sowohl Stray-Pedersen und Stray-Pedersen (1983) mit einer als "tender-loving-care" bezeichneten Betreuung, bestehend aus regelmäßigen Kontrollen und besonderer psychologischer Unterstützung, als auch Rai et al. (1996) mit einem ähnlichen Programm, erfolgreiche Schwangerschaften bei 86% bzw. 75% der betreuten Patientinnen nach. Für 24 unbetretete

Patientinnen ohne bekannte Ursache der Spontanaborte zeigte sich bei Stray-Pedersen und Stray-Pedersen (1983) hingegen nur eine Schwangerschaftsrate von 33%.

1.5 Chromosomale Ursachen habitueller Aborte:

Untersuchungen an fötalem Gewebe haben gezeigt, dass in ungefähr der Hälfte der Aborte chromosomale Ursachen zu finden sind (Stern et al. 1995, DeFabro et al. 2011). In den nachfolgenden Abschnitten unterteile ich in elterliche chromosomale Aberrationen, chromosomale Aberrationen in Oozyten und Spermien und chromosomale Aberrationen in fötalem Gewebe.

1.5.1 Elterliche chromosomale Aberrationen

Niedriges mütterliches Alter bei einem zweiten Abort, drei oder mehr Aborten in der Anamnese, sowie zwei oder mehr Aborte bei leiblichen Geschwistern oder den biologischen Eltern, sind Hinweise auf eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass elterliche chromosomale Störungen ursächlich für die habituellen Aborte sein könnten (Jauniaux et al. 2006).

Die Häufigkeit, mit der habituelle Aborte auf chromosomale Aberrationen der Eltern zurückzuführen sind, wird im Durchschnitt mit 3 bis 6% angegeben (Toth et al. 2010, Rai und Regan 2006, Makino et al.1992, Cook und Pridham 1995, Stirrat 1990).

Die Zahlen schwanken aber zwischen 2,9 und 11%, je nachdem welche Aberrationen als Ursachen gezählt werden (Tharapel et al.1985, Diedrich et al.1983, Sachs et al.1985).

Nach Ansicht dieser Autoren sind balancierte reziproke Translokationen, Robertson'sche Translokationen und Inversionen unumstrittene Ursachen. In einer Übersichtsstudie fanden DeBraekeleer und Dao (1990) diese Aberrationen in balanciertem Zustand um das 6- bis 26-fache erhöht bei Paaren mit habituellen Aborten im Vergleich zu den bei Neugeborenen gefundenen Häufigkeiten. Die

Träger dieser balancierten Aberrationen sind phänotypisch normal, aber die Gameten, im Weiteren dann auch die entstehenden Embryonen, sind in 50 bis 70% der Fälle unbalanciert.

Auch X-Chromosomale Erbkrankheiten mit niedriger Überlebenswahrscheinlichkeit besonders der männlichen Embryonen kommen als mögliche Ursache habitueller Aborte in Frage. Beispiele dafür sind Incontinentia pigmenti, das Aicardi Syndrom, Chondrodysplasia punctata, die fokale dermale Hypoplasie und das Rett-Syndrom.

Viele Autoren betrachteten außerdem schon seit Beginn der 70er Jahre gonosomale Mosaik, Marker-Chromosomen oder gonosomale Aneuploidien der Eltern als sogenannte "Major-Abnormalities" (Clifford et al.1994, DeBraekeleer und Dao 1990, Bourrouillou et al.1986, Hecht et al. 1984, Michels-VV et al.1982, Singh et al. 1980, Ward-EB et al.1980, Hsu et al. 1972).

Frauen werden häufiger als Trägerinnen der Aberrationen diagnostiziert als Männer, was eventuell auf eine verminderte Zeugungsfähigkeit männlicher Träger chromosomaler Aberrationen im balancierten Zustand zurückzuführen ist (Sachs et al. 1985, Bourrouillou et al.1986, Tharapel et al.1985, Portnoi et al.1988, DeBraekeleer und Dao 1990, Stoll 1981).

1.5.2 Reziproke Translokationen

Sie entstehen durch den Austausch von Chromosomensegmenten zwischen nicht homologen Chromosomen. Durch diesen Fehler geht für den heterozygoten Träger kein genetisches Material verloren, so dass auch keine phänotypischen Auffälligkeiten entstehen. Also bleiben die Translokationen unbemerkt, bis sie nach Erreichen des fortpflanzungsfähigen Alters eventuell als Infertilität, Subfertilität, Geburt eines chromosomal geschädigten Kindes oder durch Aborte und habituelle Aborte auffallen (Tharapel et al. 1985).

Es sind aber natürlich auch normal verlaufende Schwangerschaften denkbar, da Gameten von Trägern balancierter, reziproker Translokationen chromosomal normal sein können und weitere beide rearrangierten Chromosomen enthalten,

also kein genetisches Defizit übertragen. Bei weiteren Gameten liegt jedoch ein Verlust oder Überschuss genetischen Materials vor. Die Folge für die Schwangerschaft - Abort, Totgeburt oder Geburt eines chromosomal geschädigten Kindes - hängt jedoch von Art und Umfang der Translokation ab (Tharapel et al. 1985, DeBraekeleer und Dao 1990).

Portnoi et al. (1988) wiesen darauf hin, dass Translokationen bei Patientinnen mit habituellen Aborten und ihren Partnern vor allem die Chromosomen 1, 2, 4, 6, und 7 betreffen, bei chromosomal geschädigten Kindern häufiger die Chromosomen 4, 9, 21 und 22. Ähnliche Beobachtungen machten auch DeBraekeleer und Dao (1990), sie fanden generell eine Häufung der Translokationen in den Chromosomen 2, 5, 7, 12, 13, 17, 18 und 22, bei Eltern von geschädigten Kindern waren jedoch eher Chromosom 4, 7, 9, 11, 18, 21 und 22 betroffen. Auch sie gehen von einer erhöhten intrauterinen Letalität bestimmter Translokationen aus.

1.5.3 Robertson'sche Translokationen

Diese auch als zentrische Fusionen bezeichneten Aberrationen betreffen die akrozentrischen Chromosomenpaare 13, 14, 15, 21 und 22. Dabei verbinden sich die langen Arme von entweder homologen oder nicht-homologen Chromosomenpaaren im Zentromerbereich. Obwohl alle möglichen Variationen dieser Translokationen beobachtet wurden, ist mit Abstand am häufigsten die Variante $t(13q;14q)$ mit 64% gefolgt von $t(14q;21q)$ mit 8% (Tharapel et al. 1985, DeBraekeleer und Dao 1990).

Unterschiede bestehen in der Bildung der Gameten. Träger balancierter homologer Translokationen bilden zwei Arten, nämlich für das betroffene Chromosom disome und nullisome Keimzellen. Falls diese nun von normalen Keimzellen befruchtet werden, entstehen chromosomal geschädigte Föten, von denen im Allgemeinen nur solche mit einer Trisomie 21 lebensfähig sind. Ausnahmen sind eventuell Fälle mit uniparenteraler Disomie, wobei entweder die Befruchtung mit einer entsprechend nullisomen Gamete erfolgen, oder ein früher postzygotischer Verlust des überzähligen Chromosoms eintreten müsste.

Die Träger balancierter, nicht-homologer Translokationen bilden sechs unterschiedliche Gameten: Zwei genetisch balancierte, die bei Befruchtung durch normale Gameten entweder zu normalen oder Zygoten mit der selben balancierten Translokation führen. Die anderen vier Gameten sind entweder disom oder nullisom für jeweils eines der von der Fusion betroffenen Chromosomen mit entsprechenden Folgen für den Fötus. Die Mehrzahl dieser Konzeptionen würden zu Aborten führen, auch von habituellen Aborten könnten die Partner betroffen sein (Tharapel et al.1985).

1.5.4 Inversionen

Von dieser strukturellen Aberration unterscheidet man wiederum zwei Arten, die parazentrische und die perizentrische Inversionen, je nach dem, ob die durch zwei Brüche und umgekehrte Verschmelzung entstandene Inversion innerhalb eines Armes oder um das Zentromer des betroffenen Chromosoms herum erfolgt. Heterozygote Träger sind im allgemeinen unauffällig, während der Meiose können aber durch die veränderte Struktur der Chromosomen genetisch unbalancierte Gameten entstehen. Folgen können auch hier Aborte, Totgeburten oder chromosomal geschädigte Kinder sein. Auch hier sind nach DeBraekeleer und Dao (1990) nicht alle Chromosomen gleich oft betroffen, sondern die Chromosomen 2, 5, 7 und 10 häufiger als erwartet und Nr.18, 21 und 22 überhaupt nicht.

Als Normvarianten werden von einigen Autoren gewertet die perizentrischen Inversionen heterochromatischer Regionen von Chromosom 1, 9 und 16, sowie die des Y-Chromosoms (Tharapel et al. 1985, Portnoi et al.1988, Castle und Bernstein 1988).

1.5.5 Marker-Chromosomen

Marker-Chromosomen sind kleine überzählige Chromosomen, meist unbekannter Herkunft und Dignität. Form und genetischer Inhalt variieren und letzterer bestimmt auch die Folgen für ihren Träger. Sie entstehen de novo, oder werden innerhalb einer Familie vererbt, mit oder ohne bemerkte Folgen. Die Rate des

Auftretens von Markerchromosomen bei Neugeborenen wird mit 0,043% angegeben. Daraus ergeben sich Schätzungen von 2,5 Millionen Menschen weltweit und 35.000 Betroffenen in Deutschland. Menschliche Markerchromosomen können aus jedem der 24 menschlichen Chromosomen entstehen. Etwa 60% der Fälle treten neu auf, 40% sind familiär vererbt. Durch die Entwicklung zunehmend genauerer Analysemöglichkeiten, wurden die Folgen immer genauer vorhersagbar, auch für ungeborene Kinder, deren Marker-Chromosom bei Fruchtwasseruntersuchungen mit Karyotypisierung entdeckt wird. Eine Charakterisierung ist heute beispielsweise mit hochauflösender Fluoreszenz in situ Hybridisierung möglich. Markerchromosomen, die kleiner sind als das menschliche Chromosom 20, werden auch als kleine überzählige Markerchromosomen oder mit der entsprechenden englischen Abkürzung sSMC (für: small supernumerary marker chromosomes) bezeichnet.

Generelle Aussagen über einen möglichen Zusammenhang mit eventuellen habituellen Aborten bei Trägern von Marker-Chromosomen lassen sich nicht machen, solange der genetische Gehalt der Chromosomen unbekannt ist. Die Entstehung hypo- oder hyper-haploider Gameten ist aber denkbar (Tharapel et al.1985).

DeBraekeleer und Dao (1990) fanden in ihrer Literaturübersicht keine Unterschiede in der Häufigkeit von Marker-Chromosomen bei Patienten mit habituellen Aborten und der Normalbevölkerung.

1.5.6 Habituelle Aborte bei Frauen mit Triple-X-Syndrom oder Turner-Syndrom

In verschiedenen Untersuchungen an Kollektiven mit habituellen Aborten finden sich dort Eltern mit dem Genotyp 47,XXX (Tripple X) oder 47,XYY nicht häufiger als in der Normalbevölkerung (Bourrouillou et al.1986, DeBraekeleer et al.1990, Tharapel 1985). Ihre Fortpflanzungsfähigkeit und das Risiko chromosomal geschädigter Kinder wird als dem Durchschnitt entsprechend beschrieben. Vermutungen über ein erhöhtes Aneuploidie-Risiko der eigenen Nachkommen sollen nicht repräsentativ sein, sondern werden als auf zufälligen Einzelfällen beruhend beschrieben (Linden et al. 1996, Dewhurst 1978, Tharapel 1985, Cockwell et al. 1991).

Der Anteil von Eltern mit 45,X oder 47,XXY an den Patienten mit habituellen Aborten sei extrem gering, da diese im Allgemeinen infertil seien und somit keine habituellen Aborte entstehen könnten (DeBraekeleer und Dao 1990).

Es sind Schwangerschaften bei Patientinnen mit 45,X (Turner-Syndrom) beschrieben worden, allerdings wird davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Patientinnen um Träger einer zweiten, eventuell nicht entdeckten Zelllinie mit 46,XX handelt (Dewhurst 1978, McCorquodale und Bowdle 1985, Linden et al.1996, Varela et al.1996). Nach Varela (Varela et al.1996) ist für diese Patienten ein erhöhtes Risiko aneuploider Nachkommen und damit vielleicht auch habitueller Aborte nicht auszuschließen.

So wird auch von einigen Autoren vermutet, dass der Genotyp 45,X nicht lebensfähig ist, sondern zumindest während bestimmter Abschnitte der Entwicklung bis zur eventuellen Selektion der euploiden Zelllinie, bzw. eines fehlerhaften X-Chromosoms, oder in nicht untersuchten Geweben ein zweites X-Chromosom oder Teile davon bei den Turner-Patientinnen lebensnotwendig sind (Larsen et al.1995, Held et al.1992, Varela et al.1991, Fernández et al.1985, McCoquodale und Bowdle 1985).

1.6 Chromosomale Mosaik

Als chromosomales Mosaik wird das Vorhandensein von zwei oder mehr genetisch unterschiedlichen Zellreihen innerhalb des Organismus bezeichnet.

Unter den chromosomalen Mosaiken haben die der Geschlechtschromosomen einen überproportional großen Anteil (Hsu und Perlis 1984, Robinson et al.1995). Schätzungen über die Häufigkeit gonosomaler Mosaik in der Normalbevölkerung beruhen auf großen Studien an Amnion-Flüssigkeits-Untersuchungen (Hsu und Perlis 1984, Tabor und Philip 1987, Højbjerg-Gravholt et al.1996, Hsu et al.1996) und Screeningprogrammen bei Neugeborenen (Højbjerg-Gravholt et al.1996, Nielsen und Wohlert 1991). Danach wird die

Häufigkeit gonosomaler Mosaik bei Neugeborenen mit ungefähr 0,1% veranschlagt.

Hsu et al. (1996) fanden unter 179663 Amniozentesen 555 mit einem chromosomalen Mosaik. Von diesen 0,3% der Gesamtzahl entfielen 42,7% auf numerische Mosaik der Gonosomen, entsprechend 0,12% aller Amniozentesen.

Zur Entstehung der Mosaik als Nebeneinander von zwei oder mehr genetisch unterschiedlicher Zelllinien wurden verschiedene Theorien formuliert:

Durch Nondisjunktion und Anaphase-Lag in der frühen Embryogenese entstehen Mosaik mit einem höheren prozentualen Anteil, erfolgen Nondisjunktion oder Anaphase-Lag zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt oder auch postnatal, fällt der prozentuale Anteil innerhalb des betroffenen Organismus entsprechend geringer aus (Wise et al.2009).

Coonen et al. (2004) fanden an ihrer Studie an 299 Embryos, dass die Entstehung von Mosaiken im Blastula-Stadium sehr häufig zu sein scheint und Anaphase-Lag dabei häufiger vorkommt als Nondisjunktion, wobei die X-Chromosomen häufiger Nondisjunktion aufwiesen, als das untersuchte Chromosom 18 (Coonen et al. 2004) .

Nach Kalousek et al. (1992) und auch Los, Van Obstal und van den Berg (2004) entstehen Mosaik durch Nondisjunktion, Anaphase-Lag oder strukturelle Rearrangements in den postzygotischen Teilungen. Die Verteilung im Organismus und das Ausmaß der Aneuploidie seien dann abhängig von Zeitpunkt, betroffener Zelllinie und Lebensfähigkeit der Mutation.

Nach Gravholt et al. (1991) können Nondisjunktion und Anaphase-Lag in den ersten Zellteilungen euploider Zygoten des Genotyps 46,XX zu Mosaiken mit 45,X/46,XX/47,XXX beziehungsweise 45,X/46,XX führen. Postzygotischer Verlust von überzähligen Chromosomen aus aneuploiden oder euploiden Zelllinien bzw. Zygoten hätten Mosaik des Genotyps 46,XX/47,XXX und 45,X/46,XX zur Folge. Für letztere käme auch die Entstehung durch eine Uniparentalen Disomie des X-Chromosoms bei ursprünglich hypoploiden Zygoten mit 45,X in Frage.

Kalousek (1994) beschrieb die Möglichkeit von auf bestimmte Gewebearten beschränkten Mosaiken durch Verteilungsfehler in deren embryonalen Vorstufen. Durch molekulare Studien an Patienten mit Turner-Mosaiken konnten Robinson et al. (1995) in 45,X/46,XX-Mosaiken sowohl den postzygotischen Verlust von X-Chromosomen nachweisen, wie auch die Duplikation eines X-Chromosoms in einer ursprünglich wohl hypoploiden Zygote, bekannt als Uniparentale Disomie. Kämen sowohl hypoploide (45,X) wie auch hyperploide (47,XXX) Zellen neben den euploiden (46,XX) vor, sei dies auf eine postzygotische Nondisjunktion zurückzuführen.

Neben dem Vorgang der Nondisjunktion wurde als Ursache hypoploider Zellen mit 45,X die Bildung von Mikronukleoli diskutiert, die bevorzugt Gonosomen enthalten sollen (Guttenbach et al. 1994). Sie berichteten, der Anteil der Lymphozyten, die in ihrer Studie dadurch ein X-Chromosomen verloren, habe jedoch bei unter 0,1% der untersuchten Zellen gelegen.

Ford et al. (1988) sahen in diesem Vorgang die Erklärung für das beobachtete Überwiegen hypoploider über hyperploide Lymphozyten, sie fanden einen solchen Chromosomen-Verlust durch Anaphase-Lag bei durchschnittlich 2,43% der Lymphozyten. Wie häufig X-Chromosomen davon betroffen waren, wurde von ihnen nicht untersucht.

In ihrem Review von 2011 berichteten van Echten-Arends et al. (2011), von 815 Embryonen sei nur ein Viertel euploid gewesen, der Rest habe einen Mosaikstatus gezeigt. Weiterhin berichten sie, dass bis zum 8-Zell-Stadium die Teilungen vollständig abhängig seien von mütterlichen Genprodukten und Proteinen aus der Eizelle. Hier sei möglicherweise eine Verbindung zu sehen zur abnehmenden Qualität der Eizellen bei steigendem mütterlichen Alter.

Chromosomale Mosaik werden in Zusammenhang gebracht mit der genetischen Vielfalt des Menschen, verschiedenen Erbkrankheiten, Alterungseffekten, der frühen pränatalen Hirnentwicklung (Iourov et al. 2008), Autismus und Schizophrenie (Yurov et al. 2007) und Autoimmunerkrankungen (Invernizzi et al. 2005).

Hulten et al. (2008) formulierten nach Untersuchungen an fötalen Ovarien mittels FISH die Hypothese, bei Müttern mit Trisomie 21-Kindern sei ein chromosomales Mosaik der Ovarien mit einer Trisomie 21-Zellreihe ursächlich. Dies erkläre auch das erhöhte Risiko einer erneuten Trisomie bei der nächsten Schwangerschaft gerade bei besonders jungen Müttern. Diese hätten kein altersbedingtes Nondisjunktion-Risiko, sondern wahrscheinlich ein höhergradiges Ovarial-Mosaik.

Das mit dem Alter zunehmende Risiko für Trisomie 21-Schwangerschaften sei durch ein verändertes Reifungsverhalten der Trisomie 21-Oozyten erklärt. Auch für andere Trisomien gehen die Autoren davon aus, dass entsprechende Mosaik in den Gonaden ursächlich sein könnten (Hulten et al. 2008).

1.6.1 Chromosomale Mosaik in Embryonen

Ein Großteil der heutigen Erkenntnisse über die Entstehung chromosomaler Mosaik, resultiert aus der Untersuchung menschlicher Embryonen.

Wie van Echten-Arends et al. (2011) berichten, hat die Etablierung der IVF sehr schnell einen großen Wissenszuwachs über das Ausmaß an chromosomalen Mosaiken in menschlichen Embryonen nach sich gezogen. Erstbeschreiber seien 1993 Delhanty et al. gewesen, nachfolgende Studien hätten Mosaikraten bis 90% gezeigt (Daphnis et al. 2005), in ihrer Literaturübersicht hätten sich bei den eingeschlossenen 36 Studien im Durchschnitt bei den untersuchten insgesamt 815 Embryonen in 73% chromosomale Mosaik gezeigt. Hier unterscheiden die Autoren noch weiter in diploid-aneuploide Mosaik (59% aller Embryonen) und rein aneuploide Mosaik (15% aller Embryonen), je nach dem, ob eine euploide Zelllinie vorhanden war oder nicht.

In Bezug auf die offensichtlich gesteuerte Entwicklung euploider Zelllinien der betroffenen Embryonen erwähnen van Echten-Arends et al. (2011) ebenso wie Los, Van Obstal und van den Berg (2004) den mitotischen Arrest der aneuploiden Zellen, bzw. Zellwanderungen innerhalb des Embryos, Zelltod der aneuploiden Zellen oder das Anaphase-Lag aneuploider Zellen - Prozesse, die zusammen mit der Übernahme der Zellteilungssteuerung durch das Genom der Embryonen stattfänden.

1.6.2 Mosaik der X-Chromosomen als Ursache habitueller Aborte

Mosaik der Geschlechts-Chromosomen sind in vielen Studien mit habituellen Aborten in Zusammenhang gebracht worden (Hsu et al.1972, Kim et al.1975, Dewhurst 1978, Singh et al.1980, Ward et al.1980, Hecht 1982, Hecht et al.1984, Diedrich et al.1983, Staessen et al.1983, Holzgreve et al.1984, Tharapel et al.1985, Sachs et al.1985, Bourrouillou et al.1986, Toncheva et al.1994, Cook und Pridham 1995, Linden et al.1996, Kuo und Guo, 2004).

Dewhurst (1978), Singh et al. (1980) und Tharapel et al. (1985) wiesen auch auf einen möglicherweise hohen Anteil chromosomal geschädigter Nachkommen dieser Patientinnen hin.

Der Anteil unter den Patientinnen mit habituellen Aborten wird sehr unterschiedlich angegeben und reicht von 0,1% (Bourrouillou et al.1986) bis 10% (Hecht et al.1984) für größere Patientenkollektive.

1.6.3 Mosaik der X-Chromosomen und Nondisjunktion-Risiko

Wie Hsu et al. (1972) formulierten, könnten gonosomale Mosaik Hinweis auf eine mitotischer Instabilität und ein hohes Nondisjunktion-Risiko sein mit der Folge aneuploider Zygoten und Aborte.

Sie gingen, wie auch viele andere Autoren (Singh et al.1980, Staessen et al.1983, Holzgreve et al.1984, Hecht et al. 1985, Toncheva et al.1994) nicht davon aus, dass die Mosaik lediglich als ein Alterseffekt zu betrachten seien, da das Durchschnittsalter der betroffenen Patientinnen weit unter der Grenze läge, ab der ein solcher Effekt für Frauen mit normaler Schwangerschaftsanamnese nachgewiesen worden sei.

Auch Staessen et al. (1983) vertraten die Ansicht, dass bei den Patientinnen eine Störung der Chromosomen-Verteilung in den Gameten vorläge, die zu trisomen Kindern oder Aborten führt. Durch ähnliche Entstehungsmechanismen der mitotischen und meiotischen Nondisjunktion sei diese Störung durch Untersuchungen auf gonosomale Mosaik in Lymphozytenkulturen diagnostizierbar, so auch bei den Patienten ihrer Studie.

Hecht (1982) und Hecht et al. (1985) sahen in den gonosomalen Mosaiken ebenfalls einen Hinweis auf eine höhere Nondisjunktion-Rate mit hohem Aneuploidie-Risiko der Gameten und Zygoten dieser Patienten, mit nachfolgenden habituellen Aborten aufgrund unterschiedlicher Aneuploidien. Dabei könnten die Aneuploidien, die zu Aborten führen, sowohl autosomal als auch gonosomal sein. Da Mitose und Meiose teilweise einen identischen genetischen Kontrollmechanismus hätten, würden Mosaik in Lymphozyten-Kulturen, die durch mitotische Nondisjunktion entstanden wären, für das Risiko einer meiotischen Nondisjunktion repräsentativ seien.

Auch wenn man die Frage außer acht lässt, ob mitotische Nondisjunktion ein Hinweis auf meiotisches Nondisjunktionrisiko sein kann, weisen Novak et al. (1995) darauf hin, dass Mosaik in Lymphozytenkulturen auch deshalb auf Mosaik im Ovarialstroma hinweisen könnten, da beide Gewebe gleichen embryonalen Ursprungs seien.

1.6.4 Mosaik der X-Chromosomen und ovarielle Störungen

Neben diesen die Chromosomenverteilung betreffenden Theorien, wurden aber auch andere Ansätze formuliert:

Nach Diedrich et al. (1983) wäre bei Patientinnen mit X-chromosomalen Mosaiken in Lymphozyten und entsprechender Häufung von meiotischen Chromosomen-Verteilungsstörungen in den Ovarien auch die Entstehung von Oozyten des Genotyps 45,X mit nachfolgendem Abort eines 45,X-Fötus, für die allgemein eine Abortrate von 99% angenommen wird, denkbar. Die Aborte von Patientinnen mit hyperploiden (47,XXX) Zellen ließen sich dadurch allerdings nicht erklären (Hecht et al.1985).

Andere Hypothesen betrafen ovarielle Funktionsstörungen im Zusammenhang mit den gonosomalen Mosaiken: Ebenfalls nach Dietrich et al. (1983) könnten sich die gonosomalen Mosaik der Patientinnen negativ auf die Funktion von Ovarialstroma, Uterus oder Hypothalamus/Hypophyse auswirken und damit den

Abort chromosomal normaler Föten durch eine ovariell-plazentare Dysfunktion verursachen. Bestimmte Gen-Loci auf dem zweiten X-Chromosom, wie zum Beispiel der für die Steroid-Sulphatase, die nicht inaktiviert werden, könnten für diesen Zusammenhang verantwortlich sein.

Auch Hsu et al. (1972) fanden bei 27 von 101 Patientinnen mit dem Genotyps 47,XXX Hinweise auf eine (nicht näher definierte) ovarielle Dysfunktion, die ihrer Ansicht nach auch bei einem Mosaikstatus für diese Aberration vorliegen und Aborte verursachen könnte.

1.6.5 Mosaik der X-Chromosomen und Turner-Syndrom-ähnliche Störungen bei Patientinnen mit habituellen Aborten

Ein anderer Ansatz bezieht sich auf denkbare Zusammenhänge zwischen Körpergröße und habituellen Aborten: Christiansen et al. (1992) berichten über eine Studie, in der sie das Geburtsgewicht von Paaren mit habituellen Geburten mit einer Kontrollgruppe verglichen. Sie konnten zeigen, dass die Frauen mit habituellen Aborten ihrer Studie selber bei Geburt ein unterdurchschnittliches Gewicht zeigten. Die Autoren stellen einen Zusammenhang her mit einer anzunehmenden Veränderung im mütterlichen Erbgut, die sowohl das geringere Geburtsgewicht begründe, als auch die späteren habituellen Aborte der Frauen.

Homer et al. (2010) fanden eine geringere Körpergröße bei den Frauen mit habituellen Aborten in ihrer Studie, die ein höhergradiges X-chromosomales gonosomales Mosaik in Lymphozytenkulturen zeigten. Die Autoren sahen dies als Parallele zu klinischen Auffälligkeiten von Turner-Patientinnen.

In ihrer prospektiven Studie an 720 Patientinnen mit habituellen Aborten fanden Kuo und Guo (2004) bei 23 ein gonosomales Mosaik. Aufgrund der gefundenen Ausprägungen der aneuploiden Zelllinien, legten die Autoren einen Cut-Off-Wert von 3% für 45,X und 2% für 47,XXX-Zellen fest. Die hypohaploiden 45,X-Linien überwogen sowohl in der Kontroll- als auch in der Mosaik-Gruppe. Im Vergleich zu den Kontrollen fanden sich in der Patientinnengruppe mehr aneuploide Zelllinien. Dabei zeigten zwei Patientinnen ein 45,X/46,XX-Mosaik, 14 ein

45,X/46,XX/47,XXX-Mosaik und zwei ein 46,XX/47,XXX-Mosaik. Als Risikofaktoren der Mosaik-Gruppe, die zu den habituellen Aborten geführt haben könnten, werteten die Autoren die Kriterien einer DOR (diminished ovarian reserve, erhöhtes FSH) und Uterusfehlbildungen.

Für die Patientinnen mit gonosomalen Mosaiken wurde eine Abortrate von 44,1% ohne und 68,6% mit DOR gefunden. Die Autoren sahen diese Abortraten durch das prospektive Design zum einen höher als die für die Normalbevölkerung berichteten 10-15%, aber auch höher als die in vorangegangenen Studien von u.a. Singh (1980).

Die Autoren bringen die Risikofaktoren DOR und Uterusfehlbildungen in Zusammenhang mit den 45,X-Zelllinien der Patientinnen-Gruppe, im Sinne einer schwachen Ausprägung von für das Turner-Syndrom typischen Veränderungen.

Als weiteren Zusammenhang zwischen den habituellen Aborten und dem gonosomalen Mosaik sehen die Autoren die Möglichkeit einer 45,X-Zelllinie in den Ovarien und damit zusammenhängenden Funktionsstörungen in Analogie zu Frauen mit Turner-Syndrom. Auch die 47,XXX-Zelllinien seien mit einer verschlechterten Oozytenqualität in Zusammenhang zu bringen.

Dafür formulieren die Autoren drei denkbare Mechanismen, die die habituellen Aborte erklären könnten: Störungen der Oozytenqualität durch fehlerhafte Genprodukte, aberrante Chromosomenpaarungen mit vorzeitigem Keimzelltod, oder drittens eine gestörte Regulation der Chromosomenteilung mit nachfolgender Nondisjunktion, die in X-chromosomalen Mosaiken Ausdruck finden. Die zugrundeliegende Störung innerhalb der Steuerung von Meiose und Mitose führe dann zu Schädigungen der Gonaden, aberranten Meiosen und Atresie der Oozyten. So hätten dann die betroffenen Frauen mit gonosomalen Mosaiken eine vorzeitige Menopause und habituelle Aborte (Kuo und Guo, 2004).

Baronchelli et al. (2011) sehen ebenso Premature Ovarian Failure (POF), eine andere Bezeichnung für DOR, und damit ein alterskorreliertes Aneuploidierisiko in direktem Zusammenhang zu Mosaiken der X-Chromosomen. Sie stellen heraus, dass numerische X-Chromosomale Störungen unter den Erbkrankheiten

die häufigste Ursache für POF darstellen. Für eine normale Funktion der Ovarien würden offensichtlich zwei intakte X-Chromosomen benötigt.

Homer et al. (2010) berichten in ihrer klinischen Studie über 71 Patientinnen mit 45,X/46,XX-Mosaiken. Ab einem prozentualen Anteil von 6% der gonosomalen Aneuploidie, seien klinische Zeichen des Turner-Syndroms gefunden worden, wie eine geringere Körperlänge. Sie fanden außerdem eine Korrelation von BMI und Ausprägungsgrad des Mosaiks und einen Zusammenhang mit Aborten im ersten Trimenon.

Gersak und Veble (2011) berichten schließlich in ihrem Artikel, dass bei Frauen mit prämaturer Ovarialinsuffizienz Mosaik der X-Chromosomen gefunden würden. Sie stellen Überlegungen an, ob dabei die auf dem X-Chromosom gelegenen Gene zur Regelung der Ovarialfunktion eine Rolle spielen könnten.

1.6.6 Zweifel an der Hypothese eines Zusammenhangs zwischen gonosomalen Mosaiken und habituellen Aborten in der aktuellen Literatur

Mögliche Zusammenhänge von gonosomalen Mosaiken in peripheren Blutzellen und habituellen Aborten wurden aber auch angezweifelt, so unter anderem von Michels et al.1982, Stoll 1981, DeBraekeleer und Dao 1990, Horsman et al.1987, Nowinski et al.1990, Castle und Berstein 1988, Stone und Sandberg 1995 und Madan und Lundberg, 2015.

Als Gründe werden folgende Vermutungen genannt:

Die X-chromosomalen Mosaik könnten auf Grund von Nondisjunktion als physiologischem Alterseffekt entstehen (Michels et al.1982, Castle und Bernstein 1988, Stone und Sandberg 1995), oder sie seien als in-vitro-Effekt zu betrachten, abhängig von zum Beispiel dem Kulturmedium (Horsman et al. 1987).

Auch der Vorgang der Mikronukleoli-Bildung mit Ausschluss von Gonosomen könnte eine Erklärung für hypoploide Lymphozyten der Patientinnen sein (Ford et al.1988, Guttenbach et al.1994).

Andere Autoren berichten, sie hätten keinen Unterschied in der Anzahl gonosomal aneuploider Lymphozyten zwischen Patientinnen mit habituellen Aborten und

unterschiedlich strukturierter Kontrollgruppen gefunden (Nowinski et al.1990, Castle und Bernstein 1988).

Die genannten Kritikpunkte beziehen sich besonders auf geringgradige gonosomale Mosaik.

Russell et al. (2007) fanden in ihrer Studie an 655 Patientinnen mit oder ohne bekannte habituelle Aborte eine deutliche Altersabhängigkeit der aber auch schon bei jungen Patientinnen vorhandenen gering ausgeprägte Zelllinie mit 45,X in Lymphozytenkulturen. Es seien keine Unterschiede zwischen den beiden Patientinnen-Gruppen in der Ausprägung dieser Zelllinie gefunden worden. Daraus schließen sie, dass es keinen Zusammenhang geben könne zwischen habituellen Aborten und gonosomalen Mosaiken in Lymphozytenkulturen. Die Häufigkeit von Zelllinien mit 47,XXX oder höhergradig hyperploiden Lymphozyten wurde nicht gezählt. In der Gruppe mit habituellen Aborten befanden sich auch Patientinnen mit nur einem Abort in der Vorgeschichte.

Diese Studie wird schließlich 2015 auch von Madan und Lundberg zitiert, in ihrem Newsletter, der sich mit der Frage der klinischen Bedeutung geringgradiger X-chromosomaler Mosaik in der Beratung von Frauen mit habituellen Aborten beschäftigt. Sie fassen zusammen, dass aufgrund der bisherigen Datenlage X-chromosomale Aneuploidien eine deutliche Alterskorrelation zeigten, auch bei jüngeren Patienten vorkämen, aber in bisherigen Studien keine statistischen Auffälligkeiten bei Frauen mit habituellen Aborte gefunden worden seien. Dabei kritisieren sie die fehlende Berücksichtigung hyperploider Aneuploidien durch Russell et al., kommen selber aber auch zu der Empfehlung, geringgradige Mosaik in der humangenetischen Beratung dieser Patientinnengruppe nicht zu erwähnen, wenn bestimmte prozentuale Anteile (6% bei Dreißigjährigen, 9% bei Vierzigjährigen) nicht überschritten würden, sollte nach Finden fehlender oder überzähliger X-Chromosomen bei Auszählen von fünf Zellen die Anzahl auf 30 erhöht worden sein (Madan und Lundberg, 2015). Ab höheren Prozentualen Anteilen (über 15%) könne ein echtes Mosaik angenommen werden.

1.7 Chromosomale Ursachen habitueller Aborte: Aneuploidien in Oozyten und Spermien

Chromosomale Störungen haben einen großen Anteil an den Ursachen der geringen Überlebensrate menschlicher Embryonen. Diese Störungen können während der Entwicklung der Gameten stattfinden, bei der Bildung der Zygote oder in der embryonalen Entwicklung.

Garcia-Cruz et al. (2010) berichten, die Erkenntnisse aus molekulargenetischen Studien über die Herkunft überzähliger Chromosomen wiesen darauf hin, dass die meisten Aneuploidien zurück zu führen seien auf Fehler in der Entwicklung der Oozyten durch Störungen der Chromosomen-Segregation, also Nondisjunktion. In ihren Untersuchungen sei es mit Ausnahme der Trisomie 18 und dem 47,XXY-Status während der Meiose I zur Nondisjunktion gekommen. Mit zunehmendem mütterlichen Alter erhöhe sich die Wahrscheinlichkeit von Nondisjunktion-Ereignissen, wobei das Ausmaß des Alterseffektes für Aneuploidien verschiedener Chromosomen unterschiedlich sei.

Vekemans (2006) berichtet, die zu geringe Häufigkeit und die Fehlverteilung des meiotischen Austauschs zwischen den Chromosomenpaaren sei ausschlaggebend für das Risiko, dass sich aufgrund von Fehlern in der Meiose I eine Trisomie entwickle. Dies betreffe die Trisomien 15, 16, 18, 21 und die Geschlechtschromosomalen Polyploidien, die aufgrund einer mütterlichen Nondisjunktion entstünden und die Fälle von Trisomie 21, die väterlichen Ursprung seien.

Im Gegensatz dazu sei bei der Trisomie 21, die aufgrund eines mütterlichen Meiose II-Fehlers entstanden sei, eine Zunahme perizentrischer Austausche zu beobachten.

Pellestor et al. (2002) fanden in einer Studie mit Karyotypisierung von 1397 in-vitro-fertilisierten Oozyten bei 22,1% chromosomale Aberrationen. Die Häufigkeit bei Spermien betrage 10-13%. Die Hälfte der Aberrationen in den Oozyten entfielen auf Aneuploidien, dabei seien insgesamt 5,4% der Oozyten hypohaploid, 4,1% hyperhaploid, 5,4% diploid und 2,1% zeigten strukturelle Aberrationen. Aneuploidien fanden sich in allen Chromosomengruppen, wobei

die Gruppen E und G häufiger betroffen gewesen seien und die Gruppen A und B seltener.

Nach Martin et al. (1991) zeigen 10% der Spermien chromosomale Aberrationen, wobei weniger als die Hälfte davon Aneuploidien seien. Anders in den Oozyten: dort wurden bei 20% chromosomale Aberrationen gefunden, die zu 90% aus Aneuploidien bestehen. Numerische Aberrationen kämen in über 50% der Fälle als autosomale Trisomie vor. Bis auf die Trisomie 1 wären schon Trisomien aller Autosomen in Abortmaterial gefunden worden, wobei die Trisomie 16 den größten Anteil habe, jedoch im Gegensatz zu den Trisomien 13, 18, 21 und denen der Gonosomen nicht überlebensfähig sei.

Ford und MacCormac (1995) konnten an einer Studie von 1000 Aborten zeigen, dass der Anteil der Trisomien von unter 15% bei Patientinnen jünger als 25 Jahre, auf 33% in der Gruppe der 30 bis 35jährigen bzw. auf über 65% bei den über 40jährigen Patientinnen ansteige.

In ihrer Studie an 104 Oozyten von 544 Paaren - mit den Merkmalen: älter als 39 Jahre, wiederholtem Scheitern von IVF oder habituelle Aborte - und Untersuchung der ersten Polarkörperchen als „Spiegelbild“ der Eizelle, zeigten Gianaroli et al. (2010), dass die Anzahl aneuploider Oozyten mit dem Alter zunähme, aber auch korreliere mit anderen Gründen für die weibliche Infertilität bei den untersuchten Paaren, wie Endometriose, früherer Aborte und Störungen der Ovulation. Ein wiederholtes Scheitern von IVF war ebenso mit Aneuploidien der Polarkörperchen assoziiert.

In der Kontrollgruppe dieser Studie, die definiert war als „ohne schlechte Prognose“-Indikation zur Untersuchung, habe sich eine Aneuploidie-Rate von 43% der Oozyten für die sechs untersuchten Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22 gezeigt. Diesen Wert sahen sie in Übereinstimmung mit den in anderen Studien gefundenen Raten numerischen Chromosomen-Aberrationen in Gameten aus natürlichen Zyklen.

1.7.1 Aneuploidien in Aborten

Das frühe Embryonalstadium wird als der kritischste Zeitraum in Bezug auf die Entstehung von chromosomalen Aberrationen angesehen aufgrund des logarithmischen Anstiegs der stattfindenden Zellteilungen. Die Annahme, dass damit auch ein erhöhter Grad an mitotischen Mutationen einhergeht, wird als durch experimentelle Studien bestätigt angesehen (Iourov et al. 2010)

Ungefähr 50% aller Aborte weisen chromosomale Aberrationen auf (Kalousek et al. 1991, Ford und MacCormac 1995). Es wird davon ausgegangen, dass nahezu alle diese Aborte durch die gefundenen Aberrationen zu erklären sind (Stern et al. 1996, Cowchock et al. 1993, Hasegawa et al. 1996).

Als Hauptrisikofaktoren für chromosomale Aberrationen der Aborte gelten vorangegangene Trisomien, vor allem aber das mütterliche Alter (Cowchock et al. 1993, Ford und MacCormac 1995, Stern et al. 1996, Hasegawa et al. 1996, Sancken et al. 2004, Hassold und Hunt 2009, Gianaroli et al. 2010).

1.7.2 Trisomien in Aborten

Nach Vekemans (2006) läge bei klinisch bemerkten Aborten eine Rate an Trisomien von 26,1% vor, damit seien Trisomien äußerst normal beim Menschen. Die Trisomien in Aborten würden im Gegensatz zu denen bei Todgeburten oder Lebendgeburten andere Chromosomen betreffen, bei letzteren überwiegen die Trisomie 21 und die gonosomalen Polyploidien (47,XXX; 47,XXY; 47,XYY). In den Aborten fände man dahingegen in einem Drittel der Fälle Trisomie 16.

Der genaue Pathomechanismus, durch den die dritte Kopie der Gene die Entwicklung des Organismus störe, sei unbekannt, berichtet Vekemans (2006). Es werde davon ausgegangen, dass die richtige Balance der Genexpression in essentiellen Steuerungsabläufen über die fehlerhafte Dosierung durch das überzählige Genmaterial gestört würde. Dies bezeichnete er als „developmental-instability“-Hypothese. Eine andere Hypothese gehe davon aus, dass diese Imbalance spezifische Gene oder Gruppen von Genen und damit deren Produkte betreffe.

Sancken, Burfeind und Engel (2005) gehen von einer eindeutigen Abhängigkeit der Trisomien 13, 18 und 21 vom Alter der Mutter aus.

Tharapel et al. (1985) berichten, gonosomale Trisomien hätten nur einen geringen Anteil an den Aborten. Gonosomale Aneuploidien, Monosomien und Trisomien (ohne Mosaik), schienen meist auf Aberrationen der Spermien zurückzugehen.

16% der chromosomalen Aberrationen seien Polyploidien, die als Tri- oder Tetraploidien beobachtet werden. Sie entstünden durch Dispermie, fehlerhafte erste Reifeteilung der Gameten oder seltener durch Einbezug eines Polarkörperchens oder ausbleibender Trennung der Chromosomen in der ersten Teilung der Zygote (Tharapel et al. 1985).

1.7.3 Monosomien in Aborten

Nach Tharapel et al. (1985) läge bei ungefähr 20% der Aborte eine Monosomie X vor, welche damit die häufigste numerische Aberration darstelle.

Sancken, Burfeind und Engel (2005) legen sich in ihrem Übersichtsartikel zur Bedeutung des mütterlichen Alters für die Entstehung numerischer Chromosomenaberrationen fest, dass die Monosomie X definitiv altersunabhängig auftrete, dies hätten schon Warbuton et al. gezeigt (Warbuton et al. 1980).

Letztlich finden sich Überlegungen zur Entstehung von Monosomien aber auch schon in einem Artikel aus dem Jahr 1979 von Kajii und Ohama (1979): Da es im Falle der Nondisjunktion als Ursache - ebenso häufig wie bei der Monosomie X - Fälle von 47,XXX oder 47,XXY geben müsste und diese aber nicht beschrieben seien, komme als Ursache der Monosomie X dann das Anaphase-Lag in Betracht.

Nach Handyside (2012) ist die Monosomie X genauso häufig, wie die häufigste Trisomie, die des Chromosoms 16. Ursache für die Monosomie sei der postzygotische Verlust, beispielsweise durch Anaphase-Lag.

1.7.4 Strukturelle Aberrationen in Aborten

Die Veränderungen der Chromosomen-Struktur mit unbalancierter Duplikation oder Deletion genetischen Materials werden bei 4% der Aborten entdeckt (Tharapel et al.1985).

Sie entstanden meist de novo oder aus einer balancierten Translokation eines Elternteils (DeBraekeleer und Dao 1990). Zu 80% seien die de novo entstandenen Aberrationen väterlichen Ursprungs (Martin et al.1991).

Führen die entstandenen strukturellen Aberrationen zu Aborten, so sind deutlich andere Chromosomen betroffen, als bei denen, die zur Geburt eines missgebildeten Kindes führen. Auch Inhalt und Art des duplizierten oder defizienten genetischen Materials bestimmen die Folgen für Zygote bzw. Neugeborenes (DeBraekeleer und Dao 1990).

1.8 Aneuploidie und mütterliches Alter

In den Ovarien erreichen die weiblichen Keimzellen schon weit vor der Geburt, während der Embryonalphase im ersten Schwangerschaftstrimester, die Prophase I der Meiose I im Zusammenspiel mit Meiose-spezifischen Zytokinen. In den folgenden Wochen werden dann die folgenden Phasen durchlaufen: Leptotän mit beginnender Kondensierung der Chromosomen, Zygotän mit Paarung der homologen Chromosomen, Pachytän mit dem Austausch homologer Chromatiden-Abschnitte, dann Diplotän mit der Trennung der homologen Chromosomen und dem Übergang in das Diaktyotän, der Arrest-Phase, die dann nach der Geburt mehrere Jahrzehnte anhalten kann, bis im Falle einiger Oozyten im Rahmen des Menstruationszyklus der Eisprung vorbereitet wird und es zur Ovulation kommt. Dabei wird dann eine dieser Oozyten die erste meiotische Reifeteilung vollenden und die zweite meiotische Reifeteilung mit Trennung der Schwester-Chromatiden beginnen und im Falle einer Befruchtung auch abschließen.

Die Oozyte verweilt die meiste Zeit in ihrer Entwicklung in dem Prophase-Arrest. In diesem Zusammenhang sehen Hassold und Hunt (2009) Störungen innerhalb

dieses Stadiums auch als Hauptursache des Alterseffekts der Aneuploidien bei Embryonen.

Kline et al. (2000) kamen durch ihre Untersuchungen zu dem Schluss, dass Schwangerschaften mit Trisomien mit einem früheren Eintritt der betroffenen Mütter in die Menopause korrelieren aufgrund eines schwindenden Oozyten-Pools oder eines damit in Zusammenhang stehenden Rückgangs der Anzahl an Oozyten. Dadurch sei dann entsprechend auch die Alterskorrelation der Aneuploidien zu erklären, die Ausdruck sei des biologischen, aber nicht des chronologischen Alters, bzw. Alterns.

Vekemans (2006) berichtete, der rapide Anstieg von Trisomien beginne um das 35. Lebensjahr der Mütter. So fänden sich bei 20jährigen Müttern in 2% aller klinisch bemerkter Schwangerschaften eine Trisomie, bei den über 40jährigen hingegen seien es schon 35%. Darüber hinaus zeige sich dieser Alterseffekt auch nochmals unterschiedlich in Bezug auf die betroffenen Chromosomen: ausgeprägt bei der Trisomie der kleinen Chromosomen und fehlend bei den großen. Außerdem läge für die Trisomie 16 eine interessante Ausnahme vor, hier sei keine exponentielle Alterskorrelation zu sehen, sondern die einzige mit einem linearen Altersverlauf.

Zur Alterskorrelation berichtet er von dem Modell, dass mindestens zwei Ereignisse für die Entstehung der altersbedingten Trisomie notwendig seien. Das erste sei eigentlich altersunabhängig, nämlich die Entwicklung anfälliger Bivalente in den Ovarien des Fötus und das zweite Ereignis sei altersabhängig, nämlich das gestörte Verhalten dieser Bivalente in der Metaphase I im Ovar der erwachsenen Frau. Dieses wiederum sei zurückzuführen auf entweder Fehler der Oozytenreifung, einer Störung des hormonellen Milieus oder eine Veränderung der für die Chromosomentrennung verantwortlichen Proteine und Zellapparate.

Keefe und Marquard stellen in ihrem Artikel aus dem Jahr 2007 dar, warum sie den Telomeren eine Schlüsselstellung zuschreiben in dem Prozess, der ausgehend vom steigenden mütterlichen Alter zu einer nachlassenden Fruchtbarkeit, Aborten oder Neugeborenen mit Aneuploidien führt. Damit präzisieren sie auch Ansatzpunkte für Erklärungen des Unterschieds zur stabileren,

altersunabhängigeren Keimzellbildung bei Männern, nämlich die Telomeraseaktivität in den Stammzellen. Experimentelle Studien hätten gezeigt, dass die absolute Länge der Telomere in Oozyten in einem positiven Zusammenhang stehe zur zu erwartenden Schwangerschaftswahrscheinlichkeit. Dieser Parameter sei in seiner Vorhersagefähigkeit sogar höher anzusiedeln, als das Alter der Mütter (Keefe und Marquard, 2007).

Hulten et al. (2008) formulieren ebenfalls, aus ihrer Sicht würden die Erschöpfung des Oozytenpools, Störungen der Chromosomen-Kohäsion, Störungen des Spindelapparates, die Störung dessen Anlagerung und fehlerhafte Spindelcheckpoints die wesentlichen Faktoren sein, mit denen die Alterskorrelation des Nondisjunktion-Risikos einherginge.

Auch Gianaroli et al. (2010) sehen eine wachsende Evidenz für die Annahme, dass jedes Vorkommen von Aneuploidie von einer Gruppe von Variablen abhängig sei.

Sancken et al. (2010) berichten, es müsse von chromosomenspezifischen Entstehungsprozessen der Aneuploidien ausgegangen werden, so lägen Ursachen teils in der Meiose I, teils in der Meiose II. Auch scheine es „anfällige“ Chromosomen zu geben und auch die Korrelation zum Alter zeige unterschiedliche Muster. Die Entstehung aneuploider Zygoten sei den aktuellen Studien nach zurückzuführen auf die Reifung aneuploider und damit „belasteter“ Eizellen, die erst im Zusammenhang mit der anstehenden Menopause heranreifen würden. Diese Reifung der aneuploiden Eizellen sei ein Vorbote der Menopause in einem feststehenden zeitlichen Ablauf: Die Anzahl der Oozyten bestimme den Zeitpunkt der Menopause, nicht das chronologische Alter. Der Anstieg des Aneuploidie-Risikos finde somit auch zu unterschiedlichen, nämlich individuellen Zeitpunkten statt.

Handyside et al. (2012) erwähnen neben dem Alter als weiteren Risikofaktor für Aneuploidien die gestörten oder verminderten Rekombinationen zwischen den Schwesterchromosomen und -chromatiden. Weiter erwähnen sie in dem Zusammenhang dieser Rekombinationsstörungen drei abgrenzbare Stadien in der Entwicklung der weiblichen Eizelle/Gameten: Zunächst eine pränatale Phase, in

der die Rekombination beeinflusst wird vor dem Arrest in der Prophase der Metaphase-I, danach altersabhängige Veränderungen während der Follikelreifung und abschließend die Wiederaufnahme und der Abschluss der Meiose unmittelbar vor der Ovulation und Befruchtung, was erst Jahrzehnte später stattfindet.

Kalmbach et al. (2013) erweitern den Blick auf die Telomere: sie weisen auf den Zusammenhang von Telomerlänge und Langlebigkeit hin und den Zusammenhang von Langlebigkeit und einem erst später eintretenden Verlust der Fruchtbarkeit bei Frauen. Die nachteiligen Effekte gealterter Eizellen, wie verminderte Anzahl an Chiasmata, vermehrter meiotischer und mitotischer Nondisjunktion, Spindeldysmorphologie und Fehlgeburten, ließen sich vollständig ausgleichen, wenn den älteren Frauen Eizellen jüngerer Frauen gespendet würden. Die Verkürzung der Telomere in den Eizellen beginne schon während der fötalen Eizellentwicklung. Später im Leben, während der Phase der nachlassenden Fruchtbarkeit, fänden sich deutliche Korrelationen zwischen Telomerlänge und einerseits Aneuploidie der Embryonen und andererseits prämaturer Ovarialinsuffizienz. Sie weisen auch darauf hin, dass die Telomerlänge in Lymphozyten korreliere mit dem Reproduktionsalter und auch mit dem Auftreten von habituellen Aborten oder Trisomien.

1.9 Gonosomale Mosaikdiagnostik

Durch die Methode der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung bei Interphasekernen hat sich in der Mosaikdiagnostik eine sehr effiziente Methode ergeben. Nach Yurov et al. seien dadurch auch aneuploide Zelllinien zu detektieren, die einen Anteil von unter einem Prozent ausmachten (Yurov et al.2007).

Vor der Etablierung dieser Methode wurden verschiedene Probleme in Bezug auf die Diagnostik von Mosaiken beschrieben:

So wurden laut Gravholt et al. (1991) in ihrer Studie mit 34910 Neugeborenen durch das Screening mit nur 5 Metaphasen aus Lymphozytenkulturen lediglich 41% der Mosaikdiagnostik mit über 10%iger zweiter Zelllinie bei 95% Sicherheit gefunden, unter Berufung auf Berechnungen von Hook (1977).

Nach Hook (1977) ließen sich keine Grenzen bestimmen, unterhalb derer Mosaik als Artefakte anzusehen seien. Um geringgradige Mosaik auszuschließen, müssten mehr Lymphozyten analysiert werden, als das in den umfangreicheren Screeningprogrammen und Studien der Fall war (Hook 1977).

Er weist auch auf die eingeschränkte Repräsentativität eines einzelnen Gewebes für den gesamten Organismus hin. Selbst das untersuchte Gewebe würde nicht mit Sicherheit anhand der analysierten Zellen beschrieben werden können.

Auch Ferrier et al.(1970), Held et al.(1992) und Kalousek et al.(1992) weisen darauf hin, dass bei der Suche nach einer zweiten Zellreihe durch die Untersuchungen an mehreren Geweben Vorteile entstehen.

Von Held et al.(1992) und Fernandez et al.(1996) werden ebenfalls Voraussetzungen zum Nachweis von Mosaiken formuliert, nach denen neben Art und Zahl der untersuchten Geweben sowie der Empfindlichkeit der angewandten Technik auch die Möglichkeit der Selektion von bestimmten Zelllinien bedacht werden sollte.

So fanden Gravholt et al.(1991) eine Zunahme der euploiden Zelllinie im Laufe der Zeit bei 39 Kindern mit bei der Geburt festgestellten Mosaiken.

Mit der Entwicklung neuer Analysemethoden wie single-nucleotide-polymorphism-microarray, SNP, hat sich der Blick auf die Thematik X-chromosomaler Mosaik enorm verändert. Im Rahmen der „cancer genome-wide association studies“ (GWAS) analysierten Machiela et al. (2016) bei 38.303 Frauen die single-nucleotide-polymorphism-microarray-Intensität und fanden bei 97 Frauen insgesamt 124 X-chromosomale Mosaikformen mit einer Größe über 2Mb. Die Anzahl der Mosaikformen übersteigt die der betroffenen Frauen, da bei 15 Frauen mehr als eine Mosaikform gefunden wurde. Es fanden sich 59 hypoploide und 22 hyperploide Mosaik. Bei 33 Frauen wurde mittels Methylation-Array gezeigt, dass das inaktive X-Chromosom sowohl bevorzugt vom Verlust betroffen war wie auch vom Zugewinn.

Die Mosaik fanden sich signifikant häufiger in Material aus Wangenabstrichen im Vergleich zu Leukozyten. Die X-chromosomalen Mosaik waren viermal häufiger als autosomale, aber seltener als Y- chromosomale Mosaik. Sie betrafen häufiger das ganze Chromosom und es zeigte sich auch eine Korrelation mit autosomalen Mosaiken. Der prozentuale Anteil der betroffenen Zellreihen war im

Durchschnitt geringer als bei autosomalen Mosaiken. Es zeigte sich ein Alterseffekt mit einem Anteil von 0,11% bei unter 50jährigen und 0,45% bei über 75jährigen.

Die Autoren sehen in diesen Befunden einen möglichen Ausdruck chromosomen-spezifischer Mechanismen der Replikation oder auch des alterskorreliert nachlassenden Schutzes vor DNA-Schäden. (Machiela, M.J. et al. 2016).

1.9.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in der Mosaik-Diagnostik

Grundprinzip der Methode ist die kontrolliert erfolgende Vereinigung einer bekannten, markierten und denaturierten Sonden-DNA mit den homologen Sequenzen der denaturierten DNA fixierter Chromosomen.

Bei der Denaturierung werden die DNA-Stränge durch Erhitzen oder Alkaliebehandlung aufgetrennt und durch Kälte oder rasches Trocknen die selbständige Vereinigung unterbunden. Dann werden Sonden-DNA und zu untersuchende Chromosomen unter bestimmten Bedingungen zusammengebracht, so dass eine Vereinigung von in Überschuss vorhandener Sonden-DNA und der DNA der Zielorte auf den Chromosomen erfolgt. Ungebundene Sonden-DNA muss durch Waschen von den Präparaten entfernt werden.

In den nächsten Schritten wird die markierte Sonden-DNA sichtbar gemacht.

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wird eine Markierung der Sonden-DNA durch Biotin oder Digoxigenin benutzt. Durch wiederum fluoreszenzmarkierte Antikörper mit hoher spezifischer Bindung an Biotin oder Digoxigenin lässt sich schließlich die an die jeweiligen Chromosomenabschnitte gebundene Probe darstellen.

Durch sogenannte Sandwich-Techniken lassen sich die im Fluoreszenz-Mikroskop erkennbaren Signale ohne großen Aufwand erheblich verbessern. Prinzip dieser Technik sind gegen die an die Sonden-DNA gebundenen Antikörper gerichtete, ebenfalls fluoreszenzmarkierte Antikörper.

Routinemäßig gelang der Nachweis repetitiver DNA-Sonden, mit höherem Aufwand auch für einfach im Genom vorkommende Genproben (Viegas-Pequinot et al.1989).

Untersucht werden konnten Chromosomen aus sich teilende Zellen der Metaphase (metaphase cytogenetics, Pinkel et al.1986) oder Chromosomen in Interphasezellen (interphase cytogenetics, Cremer et al.1986), sowohl in Hinblick auf strukturelle, wie auch auf numerische Aberrationen (Pinkel et al.1988).

Die in der vorliegenden Studie benutzte α -Satelliten-DNA-Sonde eignet sich besonders zur Identifikation einzelner Chromosomen.

Ungefähr 0,75% des menschlichen Genoms werden durch diese α -Satteliten ausgemacht. Es handelt sich dabei um hundert bis tausendfach in den Zentromeren angesiedelten, für jedes Chromosom unterschiedlich gestalteten Monomeren von bis zu 170 bp (Basenpaare) (Bartsch und Schwinger 1991).

1.9.2 Mit FISH untersuchte Gewebe

In der Mosaikdiagnostik wurde die Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung angewandt bei Lymphozyten aus Blutproben in der Metaphase oder Interphase (Bartsch und Schwinger 1991, Schliephacke et al.1996, Fernández et al.1996, Novak et al.1995), kultiviertem oder unkultiviertem fötalem oder plazentarem Gewebe (Lomax et al.1994, Park et al.1995), oder Paraffin-fixiertem Gewebe aus Ovarien (Novak et al.1995).

Nach Pellestor et al. (2005) war die FISH eine entscheidende Verbesserung in der Untersuchung von Oozyten auf Aneuploidien, da das Problem der Chromosomen-Spreitung entfallt und auch Paralleluntersuchungen, so von primärem und sekundärem Polarkörperchen möglich geworden sei. Bis zu neun Proben habe man bisher im Multicolor-FISH einsetzen können. Die Kombination von Satelliten-DNA-Sonden und Lokus-spezifischen Sonden habe die in Karyotypisierung gefundenen Hinweise auf die Koexistenz von Nondisjunktion ganzer Chromosomen und die Chromatid-Predivision als Mechanismen der Aneuploidie in Oozyten bestätigen können.

Auch aktuell unterliegt die Methode kontinuierlichen Weiterentwicklungen. So nutzten Garzia-Cruz et al. (2010) für ihre Untersuchungen zu Aneuploidien in Oozyten einen 24farbigen Probensatz.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung kann weiterhin als eine der geeignetsten Methoden gelten, mit der chromosomale Mosaike in Zellen und Geweben nachzuweisen sind (Gersak und Veble, 2011).

2. Material und Methoden

2.1. Patientinnen

Die 42 Patientinnen der vorliegenden Studie wurden der Abteilung für Zytogenetik des humangenetischen Instituts der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf mit der Diagnose "Habituelle Aborte" überwiesen im Zeitraum von März 1993 bis Februar 1995 zur Zytogenetischen Untersuchung und humangenetischen Beratung. Die Überweisung wurde sowohl von niedergelassenen Gynäkologen als auch von der Universitäts-Frauenklinik veranlasst.

Unter den 42 Patientinnen fand sich folgende Altersverteilung:

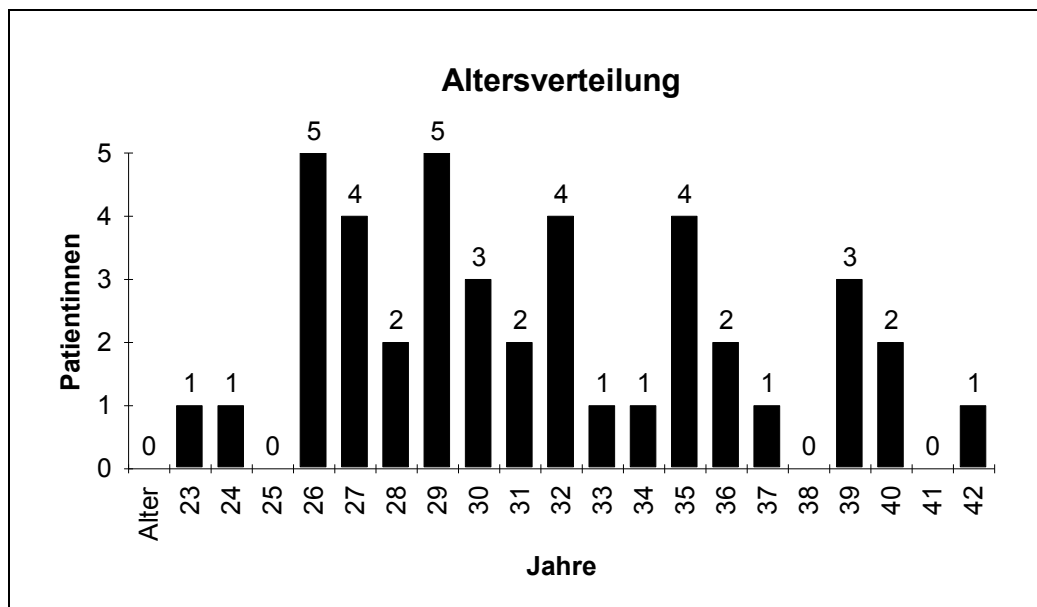


Abb.2.1: Altersverteilung der Patientinnen

2.2. Lymphozytenkulturen

Die untersuchten Präparate wurden aus tiefgefrorenem Sediment aus, zur zytogenetischen Routine-Diagnostik gewonnenen, Phytohämagglutinin-stimulierten Lymphozytenkulturen erstellt:

- 0,3 ml Heparin-Blut
 - in 10 ml 5A Mc-Coy-Medium
 - für 72 Stunden im 37°C.-Wasserbad
 - zufügen von 0,2 ml Colcimit
 - nach 45 Minuten für 10 Minuten bei 1000rpm zentrifugieren
 - Überstand absaugen
 - auf dem Rüttler zufügen einer 37°C warmen Kalium-Chlorid-Lösung (Konzentration 2,795 mg auf 500 ml Aqua dest.)
 - 8 bis 10 Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad
 - bei 800-1000 rpm 10 Minuten zentrifugieren
 - Überstand absaugen
- den folgenden Schritt dreimal wiederholen:
- mit 5 ml einer Methanol/Eisessig- Lösung (3:1) waschen
 - bei 800-1000 rpm 10 Minuten zentrifugieren
 - Überstand absaugen

Die so gewonnene Suspension wird zur Gewährleistung einer geeigneten Verteilung und Spreitung der Metaphase-Lymphozyten aus 60-80 cm Höhe auf den um 45 Grad geneigten, fettfreien Objektträger aufgetropft und luftgetrocknet oder 30-50 Sekunden bei 95°C fixiert.

2.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die in dieser Studie angewandte Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung orientiert sich an der von Bartsch und Schwinger (1991) beschriebenen Methode, wurde jedoch modifiziert.

Zur Hybridisierung wurde die bereits Digoxigenin-markierte, im Handel erhältliche alpha-Satelliten DNA-Sonde für den Locus DXZ1 (X-Zentromer) verwendet.

2.3.1 Durchführung

- 100 ml 70%iges Formamid in geschlossener Flasche im Wasserbad auf 65°C erhitzen (Abzug)
- währenddessen die Präparate in einer Küvette mit 4xSSC+Tween 20 auf dem Rütteltisch
schwenken für 10 Minuten
- danach die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe ziehen: eiskaltes Ethanol 70%, 80%, 99% für je eine Minute
- Präparate vor dem Ventilator trocknen

Denaturierung der Präparate:

- Präparate für 3 Minuten bei 65°C in 70%igem Formamid denaturieren
- Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe ziehen: eiskalte Ethanol 70%, 80%, 99%
je eine Minute
- Präparate vor dem Ventilator trocknen

Denaturierung der Sonden-DNA:

- Hybridisierungslösung in einem Eppendorf cap ansetzen:
1 µl Sonden-DNA + 29 µl Hybrisol (Oncor Kit) je Objektträger
- Hybridisierungslösung bei 95°C 5 Minuten erhitzen und sofort auf 4°C abkühlen (PCR-Gerät oder Wasserbad und Eis)
- kurz hochtourig abzentrifugieren

Hybridisierung:

- 30 µl Hybridisierungslösung (entspricht 10 ng Sonden-DNA) auf jedes Präparat geben, Deckglas luftblasenfrei auflegen, mit Fixogumm abdichten
- Präparate in einer feuchten Kammer 2,5- 24 Stunden bei 37°C inkubieren

Waschen:

- Flasche mit 65% Formamid in einem Wasserbad auf 45°C erhitzen (Abzug)
- Fixogumm vorsichtig von den Präparaten entfernen und Deckgläschen in 4xSSC/0,1Tween abschwimmen lassen, für 5 Minuten in ein anderes 4xSSC/0,1Tween Fläschchen stellen und auf einem langsam eingestelltem Rütteltisch schwenken

- Präparate für 20 Minuten in 45°C warmes 65%iges Formamid stellen
- für 5 Minuten in 4xSSC/0,1 Tween waschen
- dann 20 Minuten in 4xSSC/0,1 Tween mit 3% bovinem Serum-Albumin (BSA) schwenken
- kurz abspülen in 4xSSC/0,1 Tween

Digoxigenin-Nachweis:

- pro Präparat 30-50 µl einer 1: 500 verdünnten Lösung von Schaf-Anti-Digoxigenin-Antikörpern in 4xSSC/0,1 Tween + 1% BSA in Eppendorf cap pipettieren und
- für eine Minute bei 12.000 rpm zentrifugieren
- auf die Präparate geben und mit Deckglas in feuchter Kammer für 30 Minuten bei 37°C inkubieren
- Deckgläschen in 4xSSC/0,1 Tween abschwimmen lassen und zweimal je 10 Minuten in 4xSSC/0,1 Tween waschen

Verstärkung:

- je Präparat 30 µl einer frischen FITC (Fluoreszin-Isothiozyanat)-Anti-Schaf-Antikörperlösung vom Kaninchen 1:100 (entsprechend einer Konzentration von 15 µg/ml) bei 12.000 rpm eine Minute zentrifugieren und auf die Präparate geben
- mit Deckgläschen 30 Minuten bei 37°C inkubieren in einer feuchten Kammer
- Deckgläschen in 4xSSC/0,1 Tween abschwimmen lassen
- in 4xSSC/0,1 Tween zweimal je 10 Minuten abspülen

2. Verstärkung:

- je Präparat 30 µl einer frischen FITC-Anti-Kaninchen-Antikörperlösung 1:100 (entsprechend einer Konzentration von 15 µg/ml) bei 12.000 rpm eine Minute zentrifugieren und auf die Präparate geben
- mit Deckgläschen 30 Minuten bei 37°C inkubieren in einer feuchten Kammer
- in 4xSSC/0,1 Tween zweimal je 10 Minuten abspülen

3.Färbung:

- Präparate in Propidiumjodid 10-15 Minuten färben, zweimal kurz in Aqua dest. abspülen
- mit Antifading eindeckeln und überschüssiges Antifading in Pressbuch entfernen

2.3.2 Chemikalien:

Es wird deionisiertes Formamid verwendet

- 70% Formamid (70 ml Formamid + 10 ml 20xSSC + 20 ml Aqua bidest.)
- 65% Formamid (65 ml Formamid + 10 ml 20xSSC + 25 ml Aqua bidest.)
- 20xSSC pH 7,0 (175,3 g 3 M NaCl + 88,2 g 0,3 M Trinatriumcitrat-Dihydrat + 1000 ml Aqua demin.)
- 4xSSC/0,1 Tween (mit Aqua demin. verdünntes 20xSSC mit 0,1% Tween 20)
- 3% BSA (pulverisiertes bovines Serum-Albumin in Aqua demin.gelöst)
- Propidiumjodid (Stammlösung + 100 ml 4xSSC/0,1Tween)
- Hybridlösung (50% Formamid + 2% Dextransulfat + 100 µg Hering-Sperma-DNA in 2xSSC)

2.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenz-Photomikroskop (Zeiss, Leitz). Pro Patientin wurden jeweils 100 Mitosen und 100 Interphasekerne ausgewertet. Da die Qualität der Präparate, der Hybridisierung und der Antikörperbindungen sowie auch die Morphologie der kultivierten Interphase-Lymphozyten zum Teil stärkeren Schwankungen unterworfen sind, erwies es sich schon bei Vorversuchen zur Erprobung der Methode als notwendig, einheitliche Maßstäbe zur Auswertung der Ergebnisse zu entwickeln.

Kriterien zur Auswertung insbesondere der Interphasekerne wurden von Ward et al.(1993) übernommen und ergänzt, um nachvollziehbare Ergebnisse zu erhalten.

2.4.1 Kriterien Interphasekerne

Gewertet wurden Interphasekerne mit folgenden Eigenschaften:

- Kerne, die dem mittleren und unteren Größendurchschnitt entsprechen
- kreisrunde Form
- gut angefärbt
- scharf begrenzt
- solitäre Lage

Nicht gewertet wurden Interphasekerne mit folgenden Eigenschaften:

- direkter Kontakt zu anderen Kernen
- direkter Kontakt zu oder komplette Lage in Verunreinigungen
- direkter Kontakt zu oder komplette Lage in Mitosen, bzw. Chromosomenansammlungen

Durch die dreidimensionale Form der Kerne kommt es bekannterweise auch zu Überlagerungsphänomenen der Signale (Schliephacke et al. 1996, Lomax et al. 1994, Ward et al. 1993) und dadurch zu Fehlern bei der Interpretation der beobachteten Signalhäufigkeit. Deshalb wurden folgende die Signale in den Interphasekernen betreffenden Kriterien formuliert:

- gleiche Größe der Signale innerhalb eines Kerns
- deutliche Trennung der Signale innerhalb eines Kerns
- Signalgröße, Singalstärke und Breite-Längen-Relation innerhalb des Durchschnitts des jeweiligen Präparates
- deutliche Signalgrenze, keine aufgefiederten Signale

2.4.2 Kriterien Metaphasen

- Solitäre Lage, übersichtliche Aufspreitung der Chromosomen
- Vollständigkeit, das heißt 44 signalfreie Chromosomen zusätzlich zu den/dem markierten X-Chromosom(en)
- frei von Verunreinigungen, Hintergrund oder Interphasekernen
- Markierte Chromosomen entsprechen ihrer Größe nach den Chromosomen der C-Klasse und sind submetazentrisch

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil hat folgende Gliederung:

- Übersichtstabelle der Analyseergebnisse
- Vergleich von Interphase- und Metaphasediagnostik
- Differenzierung der gefundenen X-chromosomalen Mosaik
- Alterskorrelationen der X-chromosomal aneuploiden Interphasekerne und Mitosen.

Von den Lymphozyten-Kulturen der 42 Blutproben der Patientinnen wurden nach oben beschriebenen Methoden 2 Präparate erstellt und fluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Pro Patientin wurden immer die ersten verwertbaren 100 Metaphasen und 100 Interphase-Kerne ausgewertet. Diese wurden den im vorangegangenen Abschnitt angeführten Kriterien entsprechend ausgewählt, um eine Verzerrung der Ergebnisse durch Artefakte zu verhindern.

Bei der durchschnittlichen Qualität und Mitosedichte der angewandten Materialien, waren die 100 Interphase-Kerne und Mitosen bis auf wenige Ausnahmen schon nach einem Präparat ausgewertet. Um eine Beeinflussung der Auswertung zu verhindern, wurden abwechselnd von Präparat zu Präparat zuerst Interphasekerne oder Mitosen ausgewertet. Der Zeitbedarf für das Auswerten der Interphasekerne war dabei deutlich geringer, er betrug im Durchschnitt 10-20 Minuten im Vergleich zu 1-4 Stunden, die zum Auszählen von 100 verwertbaren Mitosen benötigt wurden.

Zum Zeitpunkt der Auswertung war das Alter der Patientin nicht bekannt. Dies wurde später anhand der Präparate-Nummer ermittelt.

Sämtliche statistischen Auswertungen erfolgten 1994/95 im Rahmen einer Beratung durch Prof. Dr. Jürgen Berger, Leiter Abteilung für Biomathematik des UKE.

3.1 Übersichtstabelle Analyseergebnisse

In der folgenden Tabelle ist die Auflistung aller gewonnenen Daten zu sehen. In den einzelnen Spalten finden sich:

- das Alter der Patientin, aufsteigend sortiert
- die Anzahl der Mitosen mit einem, zwei, respektive drei X-Chromosomen. (bei einer 40jährigen Patientin fanden sich bei einer der 100 ausgezählten Mitosen fünf X-Chromosomen)
- die Anzahl der Interphasekerne mit einem, zwei oder drei Signalen
- die Summe der gonosomal-aneuploiden Mitosen und
- die Summe der gonosomal-aneuploiden Interphasekerne

In der nachfolgenden Tabelle sind die Einzelergebnisse der Auszählungen für jede Patientin dargestellt. Diese Zahlen sind die Basis aller weiteren Diagramme dieser Arbeit.

Alter	M: 45,X	M: 46 XX	M: 47 XXX	M: 49, XXXXX	1Signal	2Signale	3Signale	X- chrom.- aneupl. Mitosen	X- chrom.- e upl. Mitosen	X-chrom.- aneupl. Interphase- kerne	X-chrom.- eupl. Interphase- kerne
23	2	98	0		4	96	0	2	98	4	96
24	0	100	0		2	98	0	0	100	2	98
26	0	100	0		2	98	0	0	100	2	98
26	0	100	0		0	100	0	0	100	0	100
26	0	100	0		2	98	0	0	100	2	98
26	0	100	0		1	98	1	0	100	2	98
26	0	100	0		1	99	0	0	100	1	99
27	0	100	0		1	99	0	0	100	1	99
27	0	100	0		1	97	2	0	100	3	97
27	1	99	0		4	96	0	1	99	4	96
27	2	98	0		2	98	0	2	98	2	98
28	0	98	2		2	98	0	2	98	2	98
28	0	100	0		0	100	0	0	100	0	100
29	0	100	0		2	98	0	0	100	2	98
29	0	100	0		2	98	0	0	100	2	98
29	0	100	0		0	100	0	0	100	0	100
29	1	99	0		2	98	0	1	99	2	98
29	2	96	2		2	96	2	4	96	4	96
30	0	99	1		0	100	0	1	99	0	100
30	0	100	0		0	100	0	0	100	0	100
30	0	100	0		2	97	1	0	100	3	97
31	0	100	0		1	97	2	0	100	3	97
31	0	100	0		0	99	1	0	100	1	99
32	0	99	1		0	100	0	1	99	0	100
32	0	100	0		2	98	0	0	100	2	98
32	1	99	0		2	97	1	1	99	3	97
32	2	98	0		2	98	0	2	98	2	98
33	0	100	0		0	100	0	0	100	0	100
34	0	100	0		1	99	0	0	100	1	99
35	0	100	0		1	99	0	0	100	1	99
35	0	100	0		2	96	2	0	100	4	96
35	2	98	0		2	98	0	2	98	2	98
35	7	88	5		10	86	4	12	88	14	86
36	1	95	4		2	95	3	5	95	5	95
36	2	96	2		3	94	3	4	96	6	94
37	0	100	0		1	99	0	0	100	1	99
39	0	98	2		2	97	1	2	98	3	97
39	0	100	0		2	98	0	0	100	2	98
39	1	98	1		1	98	1	2	98	2	98
40	4	92	4		5	92	3	8	92	8	92
40	4	94	1	1	5	92	3	6	94	8	92
42	0	100	0		0	100	0	0	100	0	100
Summe:	32		26		76		30	58		106	

Tabelle 1: Ergebnisse der Auszählung von 100 Mitosen und 100 Interphasekerne je Patientin.

3.2 Vergleich von Interphase- und Metaphase-Diagnostik

3.2.1. Durchschnittswerte gonosomal aneuploider Mitosen und Interphasekerne

Insgesamt wurden 4200 Mitosen und 4200 Interphasekerne ausgewertet, die den beschriebenen Auswahlkriterien entsprachen. 4142 Mitosen zeigten zwei durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit Sonde markierte X-Chromosomen, das entsprach 98,62%. Als X-chromosomal aneuploid wurden 58 Mitosen gewertet, 32 Mitosen wiesen ein X-Chromosom auf, 25 Mitosen drei, in einem Fall fünf X-Chromosomen. Der Anteil dieser gonosomal-aneuploiden Mitosen betrug somit 1,38 %

In 4094 Interphasekernen waren zwei Signale zu unterscheiden, dies entsprach 97,48 % X-chromosomal euploiden Interphasekerne.

Mit einem oder drei Signalen wurde der Interphasekern als X-chromosomal aneuploid gewertet, das war bei 106 der Interphase-Kerne der Fall, entsprechend 2,52 %. 76 Interphasekerne zeigten ein und 30 Interphasekerne drei Signale.

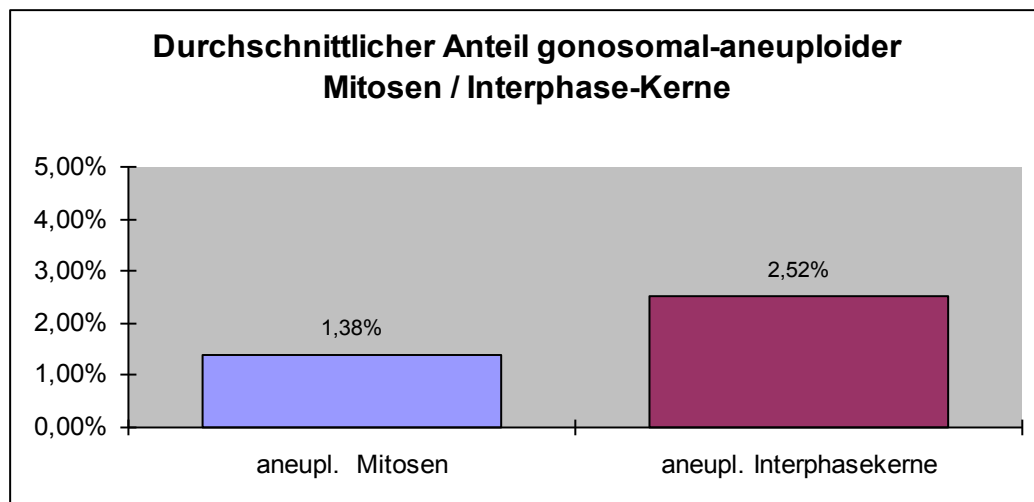


Abb.3.1: Durchschnittliche Häufigkeit von gonosomal-aneuploiden Mitosen und Interphasekernen

3.2.2 Verhältnis von gonosomal-aneuploiden Interphase-Kernen und Mitosen

Bei 26 Patientinnen und damit der Mehrzahl der 42 Patientinnen, fanden sich mehr X-chromosomal aneuploide Interphasekerne als gonosomal-aneuploide Mitosen. Bei 14 der 42 Patientinnen entsprach die Anzahl der gonosomal-aneuploiden Interphasekerne genau der Anzahl an gonosomal-aneuploiden Mitosen. Bei zwei der Patientinnen lag die Anzahl gonosomal-aneuploider Interphase Kerne unter der Anzahl der gonosomal-aneuploiden Mitosen. Mit dem Vorzeichentest berechnet, ist das Überwiegen der gonosomal-aneuploiden Interphase-Kerne über die Mitosen hoch signifikant ($p < 0,001$).

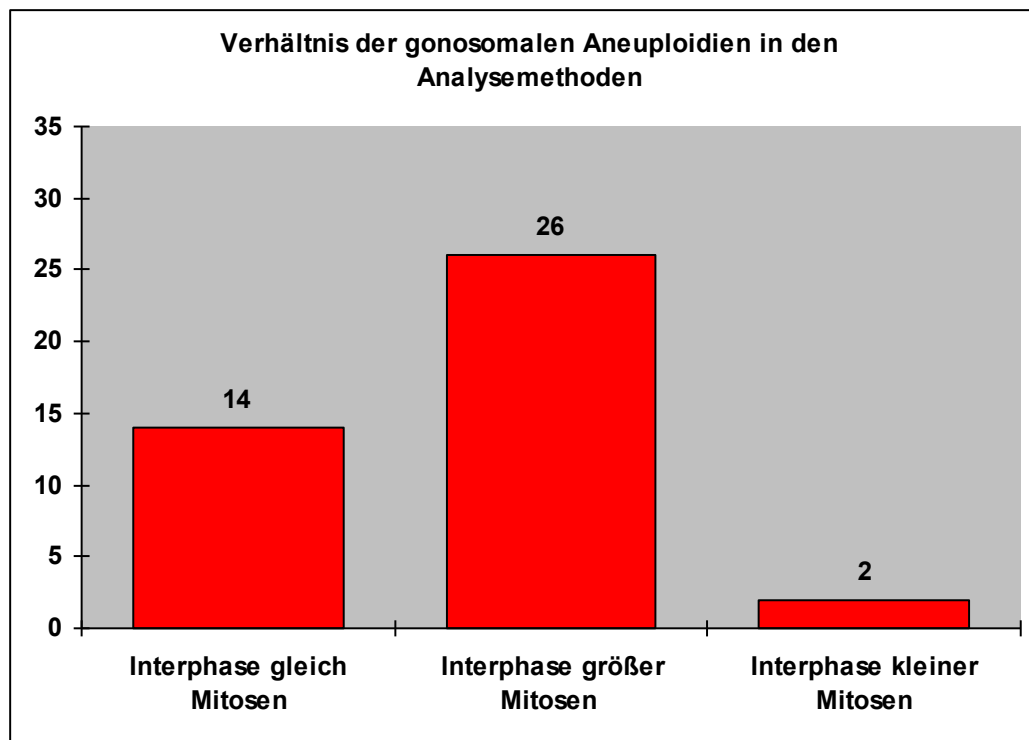


Abb.3.2: Verhältnis der Anzahl an gonosomal-aneuploiden Interphasekernen und Mitosen der einzelnen Patientinnen

In der nachfolgenden Graphik wird nochmals deutlich, dass es Unterscheidungen der Ergebnisse der Interphase-Diagnostik und der Metaphase-Diagnostik gab. So fanden sich bei 18 Patientinnen X-chromosomal aneuploide Interphasekerne, aber keine aneuploiden Mitosen. Andersherum gab es nur 2 Patientinnen, die X-chromosomal aneuploide Mitosen zeigten, bei denen aber in allen 100 gewerteten Interphasekernen zwei Signale zu finden waren. Bei 6 Patientinnen waren weder in der Interphase-Diagnostik noch in der Metaphase-Diagnostik X-chromosomale Mitosen, bzw. Interphase-Kerne zu finden.

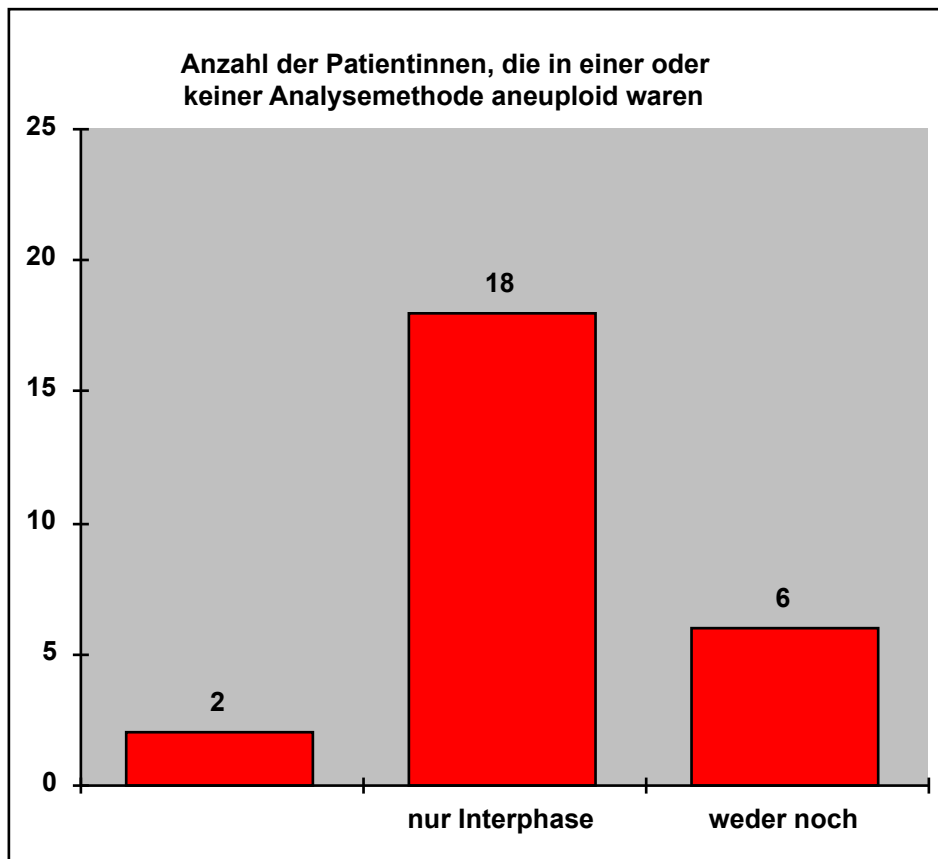


Abb.3.3: Anzahl der Patientinnen, bei denen sich die Aneuploidie nur in der Metaphasediagnostik oder nur in der Interphasediagnostik oder weder in der Metaphase- noch in der Interphasediagnostik zeigt

Dennoch besteht statistisch eine hoch signifikante Übereinstimmung der Analyse-Ergebnisse aus der Interphase-Diagnostik und der Metaphase-Diagnostik. Berechnet mit dem Spearman'schen Korrelationskoeffizienten findet sich ein rho 0.596 und ein $p < 0,001$.

Die Erklärung dafür liegt in folgendem Umstand: Die Abweichungen in der Anzahl der gefundenen gonosomalen Aneuploidien war prozentual nur sehr gering ausgefallen, wie das nachfolgende Diagramm verdeutlicht:

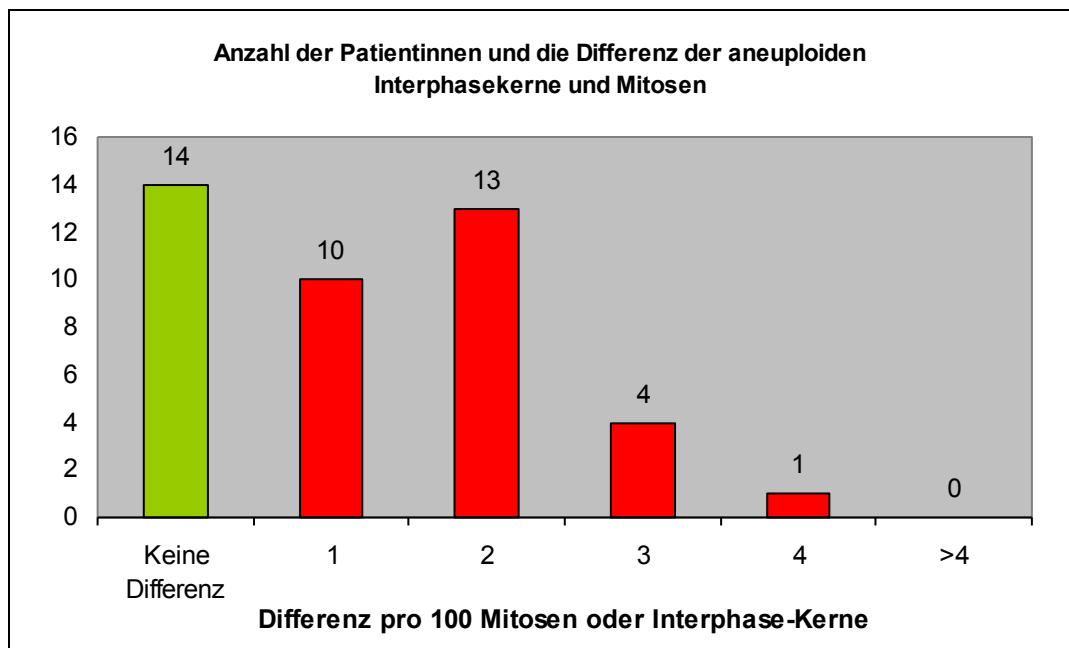


Abb. 3.4: Anzahl an Patientinnen ohne Differenz zwischen den beiden Methoden und Anzahl der Patientinnen mit einer Differenz von 1, 2, 3 oder 4 Mitosen/ Interphase-Kernen

Bei 14 Patientinnen bestand keine Differenz zwischen den Ergebnissen in der Interphase-Diagnostik und der Metaphase-Diagnostik. Bei 28 Patientinnen bestand eine Differenz, wobei diese bei 10 Patientinnen lediglich in 1 und bei 13 Patientinnen in 2 von 100 Interphasekernen bzw. Mitosen bestand. Bei keiner Patientin war die Differenz größer als 4 von 100 Interphase-Kernen oder Mitosen.

Die Mehrzahl der Unterschiede zwischen den Analyse-Methoden entstanden dadurch, dass sich in der Interphase-Diagnostik mehr Interphase-Kerne mit einem Signal zeigten als entsprechende Mitosen mit 45,X. Das nachfolgende Diagramm gibt hierüber einen Überblick. Es zeigt, dass 9 Patientinnen weder Interphasekerne mit nur einem Signal, noch Mitosen mit 45,X zeigten, bei 19 Patientinnen keine aneuploiden Mitosen, aber Interphasekerne gefunden wurden., bei 9 Patientinnen hypoploide Interphasekerne und Mitosen gefunden wurden, aber die Interphasekerne überwogen und zuletzt, dass bei 5 Patientinnen aneuploide Interphasekerne und Mitosen gefunden wurden in gleich großem Anteil.

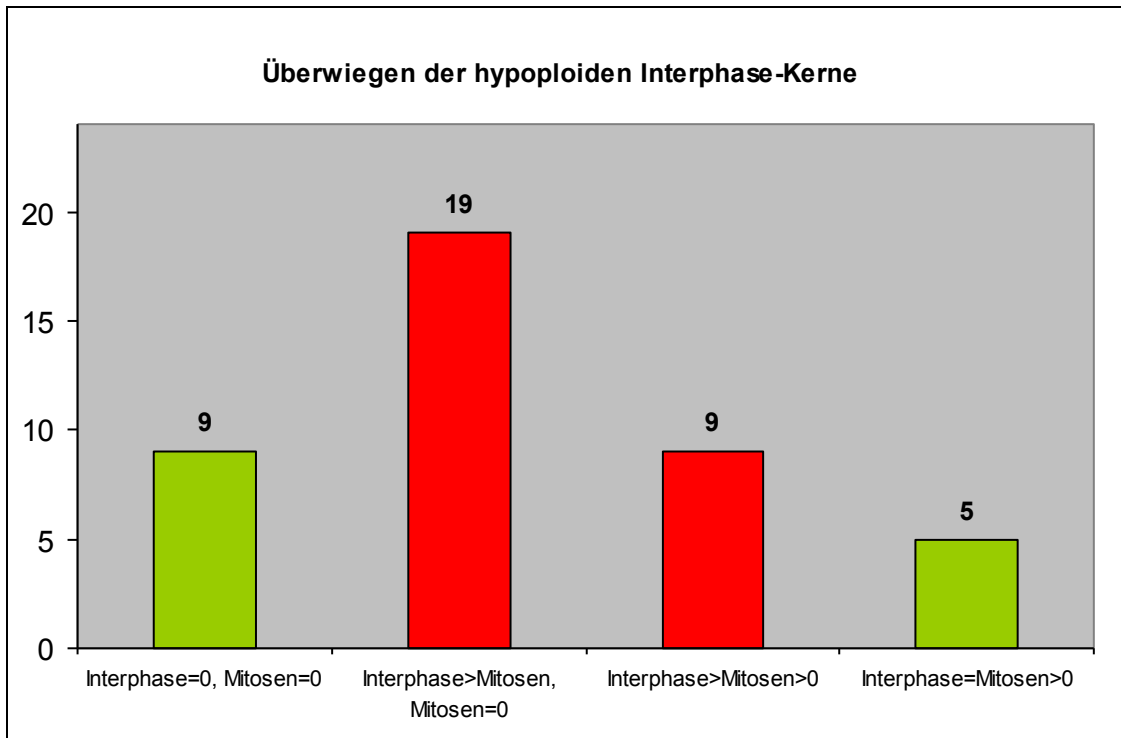


Abb.3.5: Mit den roten Balken dargestellt sind die Patientinnen, bei denen die Anzahl der gonosomal-hypoploiden Interphase-Kernen mit 1 Signal größer war, als die entsprechende Anzahl an Mitosen mit 45,X

3.3 Korrelationen von Metaphase- und Interphasediagnostik

In den folgenden Abbildungen wird die Korrelation der Ergebnisse der Interphase- und der Metaphase-Diagnostik dargestellt. Hierfür wurde zur Berechnung der Spearman'sche-Rangkorrelations-Test verwendet. Diese Methode bot sich an aufgrund der ausreichend großen Anzahl an Patientinnen. Daneben waren die zu korrelierenden Größen quantitativ diskret skaliert, es lagen im Sinne der Paarbildung unabhängige Beobachtungspaare vor und der untersuchte Zusammenhang war monoton. Außerdem hat sie den Vorteil der fehlenden Abhängigkeit von für die ebenso zur Korrelationsberechnung geeignete Methode nach Pearson vorauszusetzenden linearen Abhängigkeiten der ermittelten Größen. Im Fall der wie hier in den vorliegenden Daten nicht normalen Verteilungen würde außerdem der Korrelationskoeffizient nach Pearson zu falschen Ergebnissen führen. Eine Lösung für diese Situation lag in der Verwendung der Spearman'schen Rangkorrelation r_s (nachfolgend: ρ). Der p-Wert verdeutlicht die Signifikanz der gefundenen Korrelationen.

In den Diagrammen zu den Korrelationen sind Werte-Paare, die mehrfach vorkamen, durch die entsprechend zunehmende Größe der Punkte gekennzeichnet zu klareren Beurteilbarkeit der Punktwolke. Die genauen Häufigkeiten lassen sich der Übersichts-Tabelle am Anfang des Abschnittes entnehmen.

Es zeigten sich im Durchschnitt mehr gonosomal-aneuploide Interphasekerne als gonosomal-aneuploiden Mitosen. Dieses Überwiegen der 106 X-chromosomal aneuploiden Interphasekerne über die 58 X-chromosomal aneuploiden Mitosen wurde bereits in der Abbildung 3.1 bis 3.5 verdeutlicht.

Mit dem Spearmanschen Rangkorrelations-Koeffizienten zeigte sich jedoch ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen der Häufigkeit gonosomal-aneuploider Metaphasen und Häufigkeit gonosomal-aneuploider Interphasekerne bei den Patientinnen, d.h. Patientinnen mit aneuploiden Interphasekernen hatten auch aneuploide Mitosen in vergleichbarer Anzahl. Dadurch ergab sich trotz des Unterschiedes in der Summe in der Verteilung eine deutliche Korrelation mit $\rho = 0,6$, der p-Wert ist $< 0,001$.

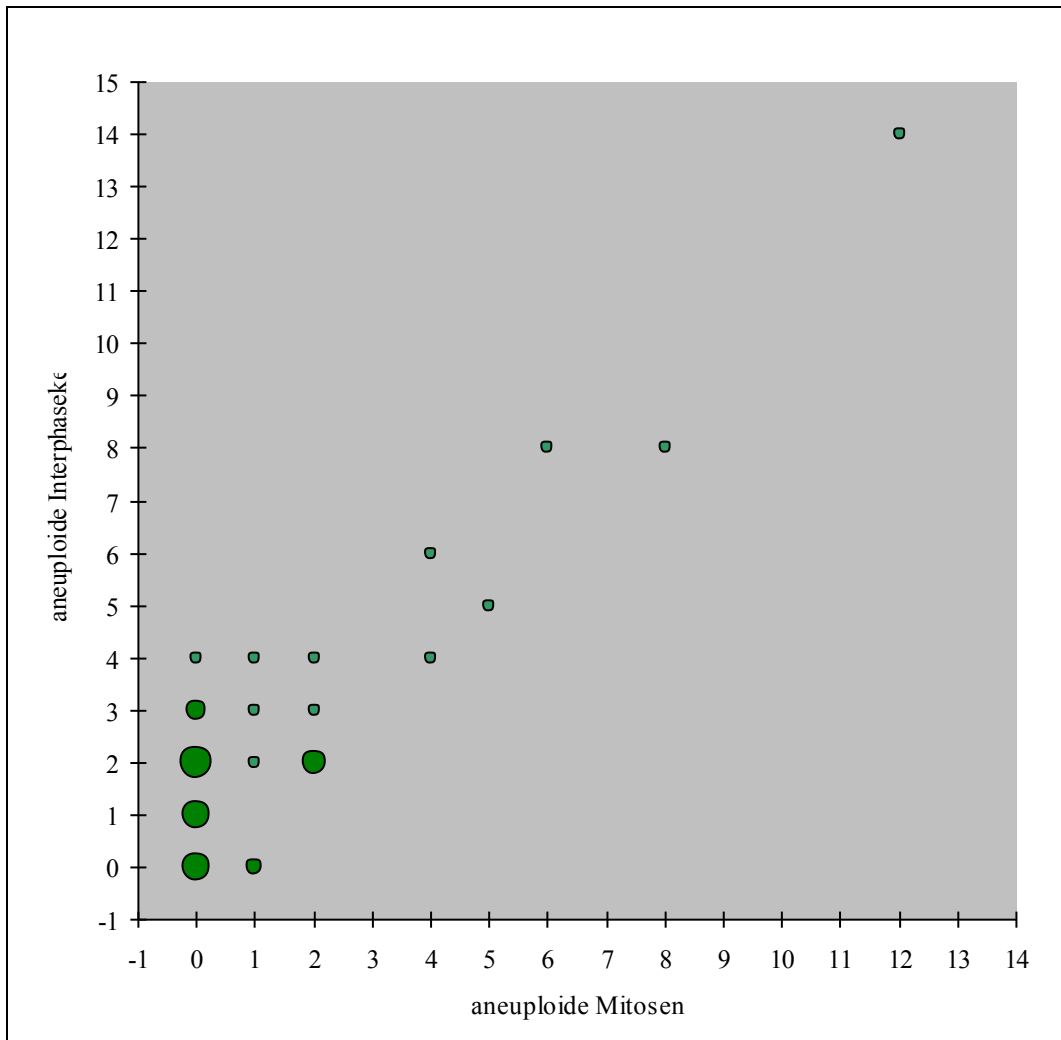


Abb. 3.6 Korrelation der Häufigkeit von aneuploide Interphasekernen und aneuploiden Mitosen ($\rho = 0,6$; $p < 0,001$). Werte-Paare, die mehrfach vorkamen, sind durch die entsprechend zunehmende Größe der Punkte gekennzeichnet

Ebenso fanden sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen den Ergebnissen für die Interphase-Kerne mit einem Signal und den Mitosen mit 45,X.

In der folgenden Abbildung geht es um die Korrelation von Mitosen mit nur einem X-Chromosmen (45-X) und Interphasekernen mit nur einem Signal. Hier zeigte sich der Wert $\rho = 0,663$ und der p-Wert $< 0,001$.

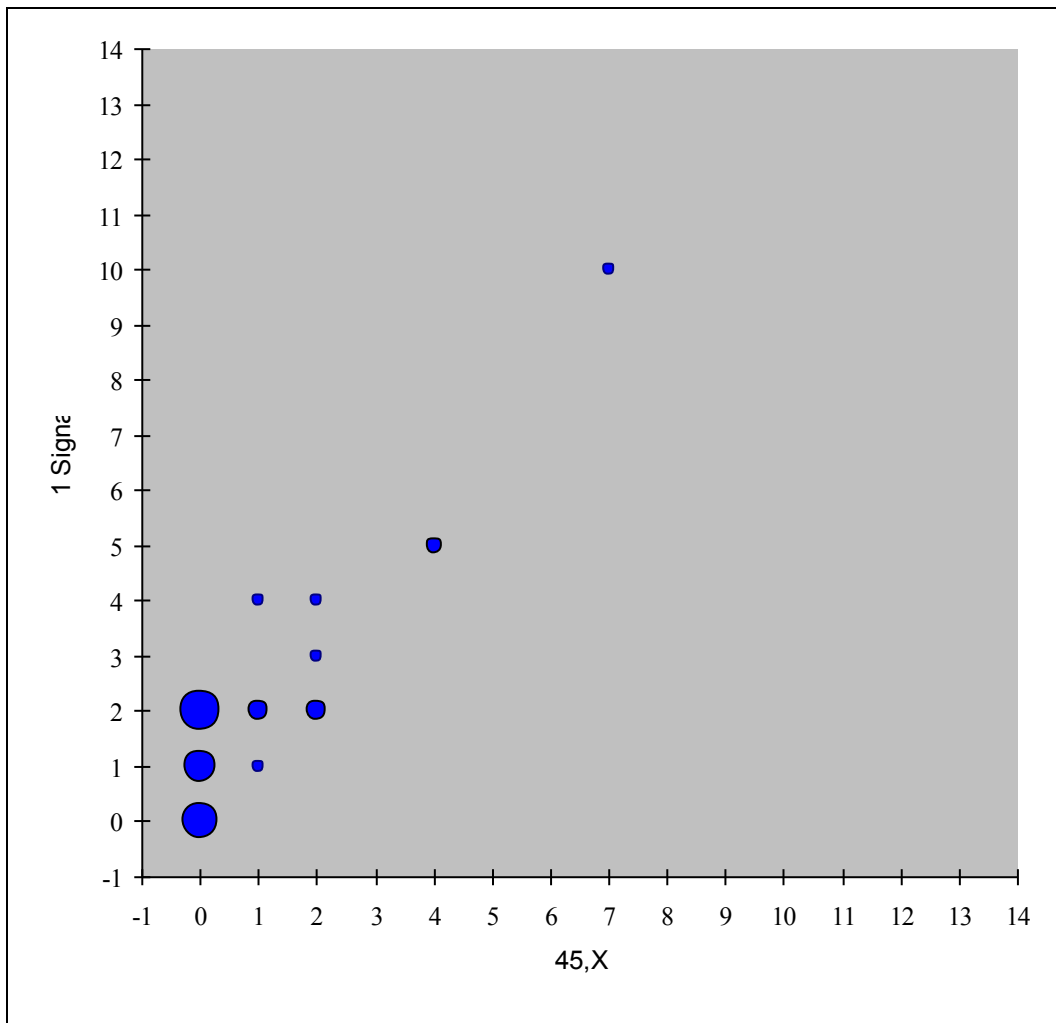


Abb. 3.7: Korrelation gonosomal hypoploide Interphasekerne/Mitosen ($\rho = 0,663$, p-Wert = 0,000). Werte-Paare, die mehrfach vorkamen, sind durch die entsprechend zunehmende Größe der Punkte gekennzeichnet

An der Abbildung 3.7 lässt sich auch nochmals ablesen, dass sich bei vielen Patientinnen keine Mitosen mit 45,X (Wert 0 der X-Achse) zeigten, bei vielen

dieser Patientinnen aber 1 oder 2 Interphase-Kerne mit nur 1 Signal gefunden wurden (Werte 1 und 2 der Y-Achse).

Die Korrelation zwischen den gonosomal-hyperploiden Mitosen mit 3 X-Chromosomen (47,XXX) und den Interphasekerne mit 3 Signalen bei den Patientinnen zeigte sich ebenfalls als höchst signifikant ($\rho = 0,588$, $p\text{-Wert} < 0,001$). Dabei war jedoch die mit Abstand häufigste Konstellation 0 hyperploide Interphasekerne und 0 hyperploide Mitosen.

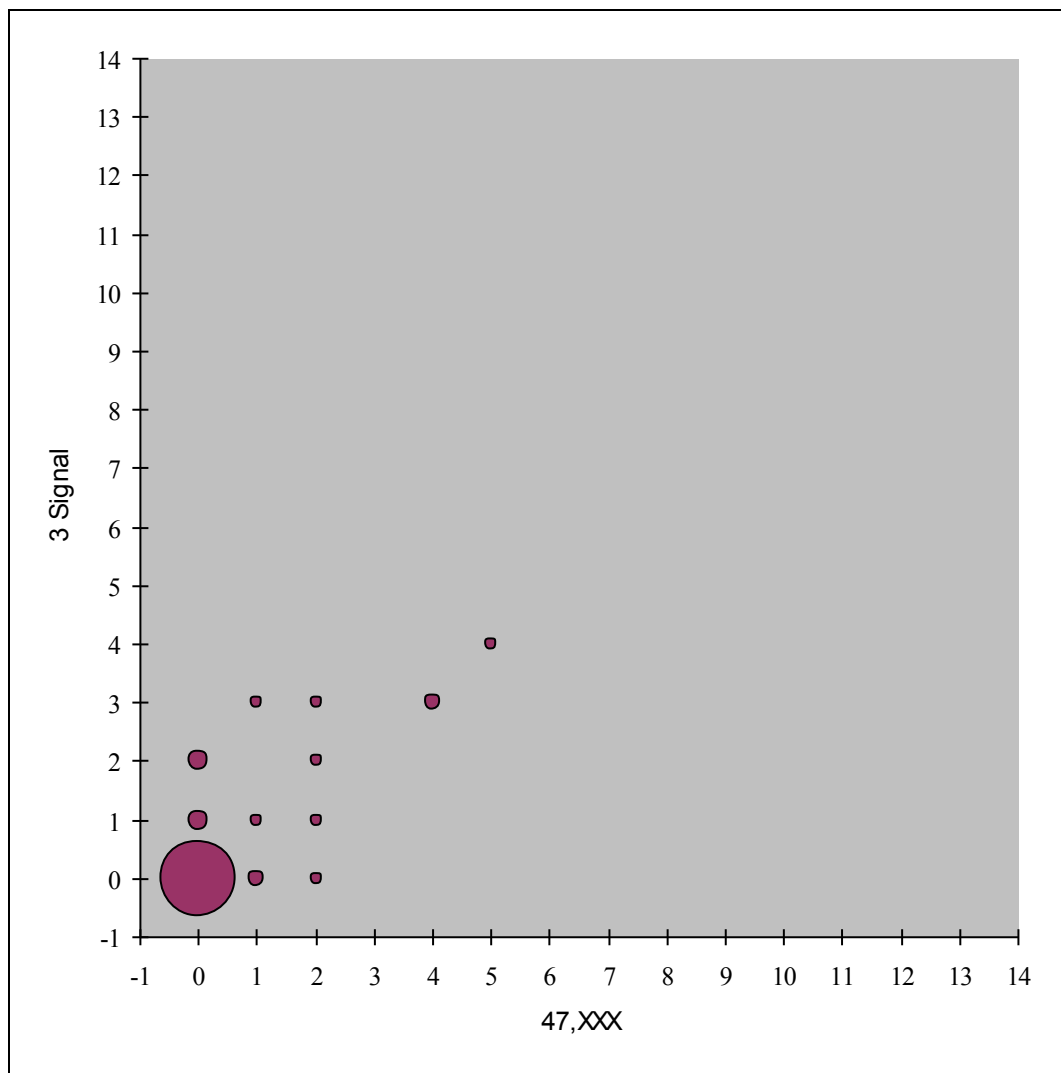


Abb.3.8: Korrelation gonosomal-hyperploide Interphasekerne/Mitosen ($\rho = 0,588$, $p\text{-Wert} < 0,001$). Werte-Paare, die mehrfach vorkamen, sind durch die entsprechend zunehmende Größe der Punkte gekennzeichnet

3.4 Art und Ausprägung der gonosomalen Mosaik:

Als chromosomales Mosaik wird das Vorhandensein von zwei oder mehr genetisch unterschiedlichen Zellreihen innerhalb des Organismus bezeichnet.

Durch Nondisjunktion und Anaphase-Lag in der frühen Embryogenese entstehen Mosaik mit einem höheren prozentualen Anteil, erfolgen Nondisjunktion oder Anaphase-Lag zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt oder auch postnatal, fällt der prozentuale Anteil innerhalb des betroffenen Organismus entsprechend geringer aus (Wise et al.2006).

Neben der gonosomal euploiden Zelllinie 46,XX wurden bei 18 Patientinnen in Metaphasendiagnostik und bei 34 Patientinnen in der Interphasediagnostik eine oder zwei X-chromosomal aneuploide Zelllinien gefunden, so dass dem Analyseergebnis nach ein Mosaik vorlag.

Je nach Kombination der Zelllinien waren diese Mosaik euploid-hypoploid, euploid-hyperploid oder gemischt euploid-hypoploid-hyperploid.

Bei den euploid-hypoploiden Mosaiken fand sich neben der Zellreihe mit 46,XX oder 2 Signalen, eine meist sehr gering ausgeprägte Zellreihe mit 45,X bzw. einem Signal. Bei den euploid-hyperploiden Mosaiken lag entsprechend eine zweite Zellreihe vor mit 47, XXX, bzw. 3 Signalen. Bei den euploid-hypoploid-hyperploiden Mosaiken fanden sich schließlich alle drei Zellreihen.

In der Interphasediagnostik fand sich in der Mehrzahl der Fälle neben den X-chromosomal euploiden Zellen eine geringgradig ausgeprägte gonosomal-hypoploide Zellreihe, nämlich bei 19 der 42 Patientinnen. Diese Konstellation war häufiger als rein euploide Lymphozyten-Kulturen, die sich in der Interphasediagnostik nur bei acht Patientinnen finden ließ. Bei 14 Patientinnen fanden sich Interphase-Kerne mit einem, zwei und drei Signalen, also euploid-hypoploid-hyperploid gemischte Mosaik und bei einer Patientin fand sich neben den euploiden Interphase-Kernen lediglich eine gonosomal-hyperploide Zellreihe.

In der Metaphasendiagnostik waren bei den meisten Patientinnen nur euploide Zellen zu finden (24 von 42), jedoch waren auch hier alle drei Mosaiktypen vertreten. Bei sieben Patientinnen fanden sich neben den gonosomal-euploiden auch hypoploide Mitosen und ebenfalls bei sieben Patientinnen hypo- und hyperploide Mitosen. Bei vier Patientinnen fanden sich neben den euploiden Mitosen gonosomal-hyperploide Mitosen mit drei X-Chromosomen.

Diese Zahlen finden sich in der folgenden Abbildung graphisch dargestellt:

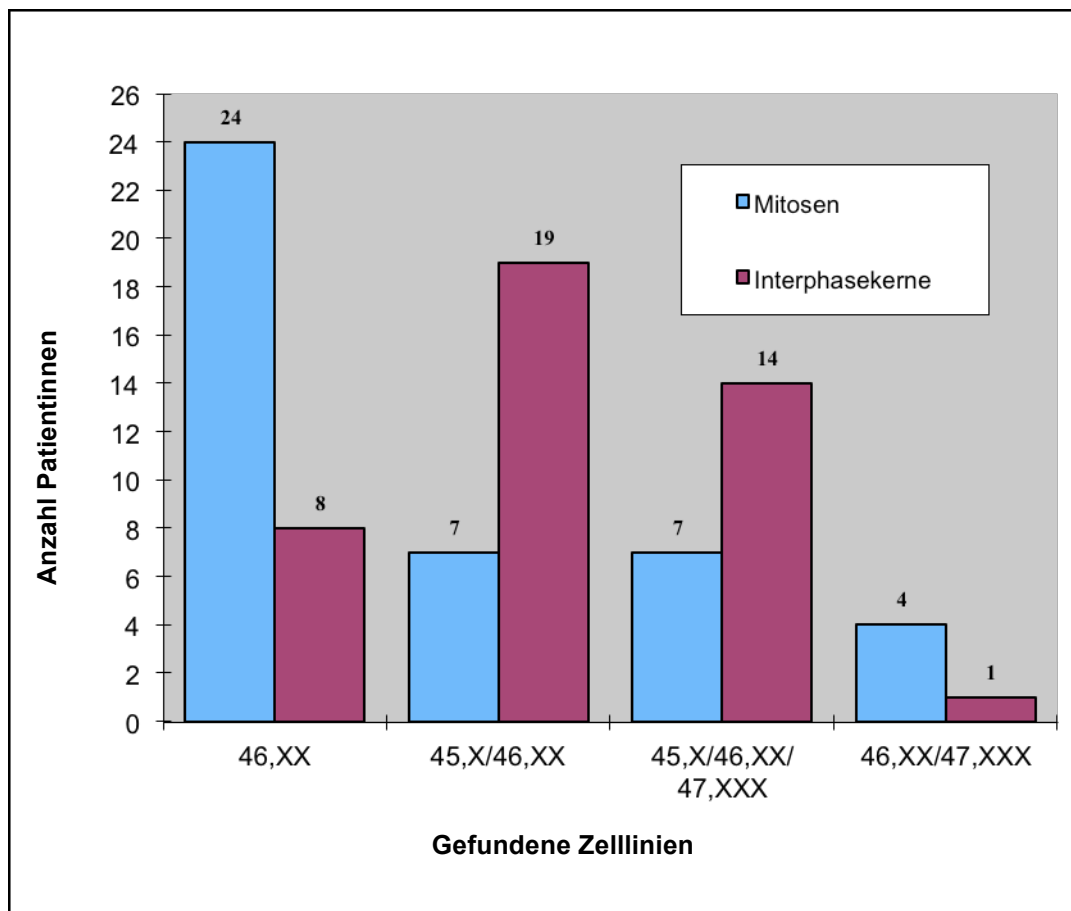


Abb. 3.9: Mosaiktypen in Interphase- und Metaphasediagnostik

Die dargestellten Verhältnisse der drei möglichen Mosaikformen (45,X/46,XX; 45,X/46,XX/47,XXX; 46,XX/47,XXX) sind somit nicht ausgewogen. Gerade bei der Interphase-Diagnostik dominieren die hypoploiden Mosaikformen mit 45,X/46,XX deutlich gegenüber den hyperploiden mit 46,XX/47,XXX.

Dieses Überwiegen in der Interphasediagnostik ließe sich mit dem 3D-Effekt der erklären.

In der Metaphasediagnostik überwiegen aber ebenso die hypoploiden Mosaikzellen über die hyperploiden. Diese Beobachtung kann erklärt werden damit, dass es neben dem Effekt der Nondisjunktion, die zu einem ausgewogenen Verhältnis von Hypoploidie und Hyperploidie führen sollte, noch einen weiteren Mechanismus gibt. Dieser, ausschließlich zu hypoploiden Zellen führende Effekt ist das Anaphase-Lag.

Alle drei Effekte, die zu gonosomal-aneuploiden Analyse-Ergebnissen führen können, sind hier im Folgenden graphisch dargestellt.

3D-Effekt:

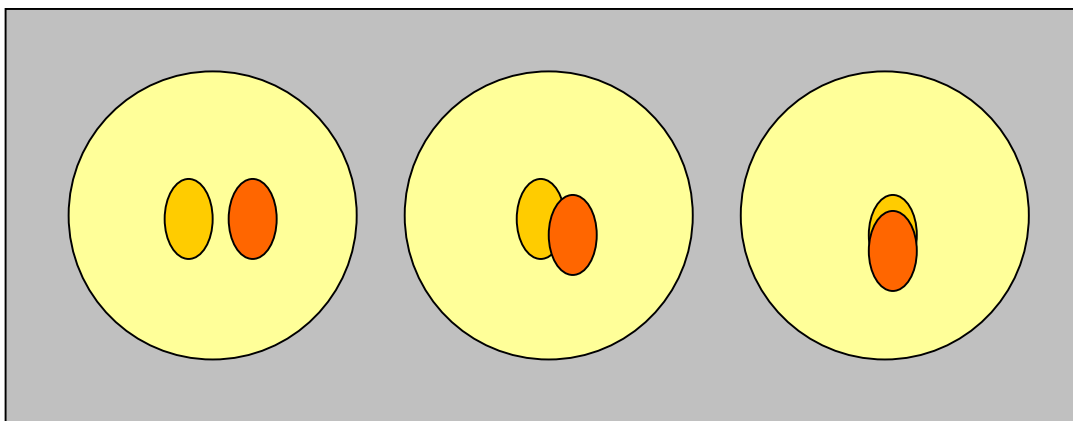


Abb.3.10: Darstellung zweier Signale, die sich durch Änderung der Perspektive überlagern können

Nondisjunktion:

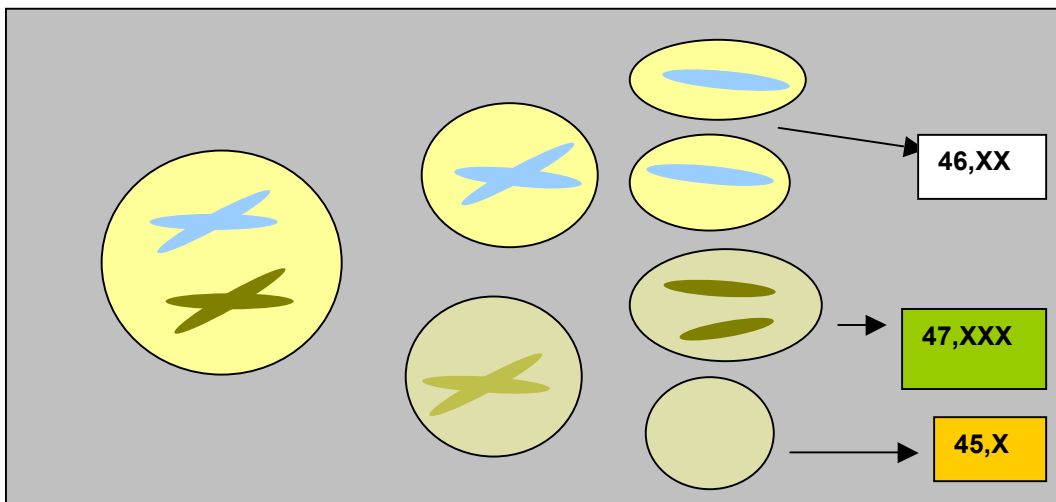


Abb.3.11: Nondisjunktion (hier in Meiose II) führt zu gonosomaler Aneuploidie, es entstehen hyper- und hypoploide Zellen und Zellen mit normalem Chromosomensatz.

Anaphase-Lag:

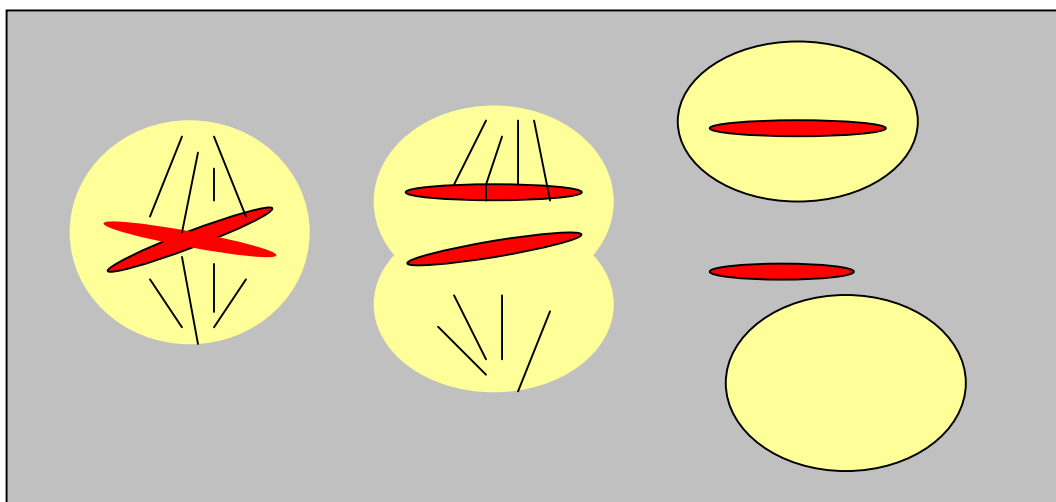


Abb. 3.12: Anaphase-Lag führt zu Aneuploidie: Es entsteht eine euploide und eine hypoploide Zelle.

3.4.1 Verhältnis von hypoploiden zu hyperploiden Zellreihen bei den gemischten Mosaiken

Gemischten Mosaiken mit 45,X/46,XX/47,XXX bei den Mitosen oder einem, zwei und drei Signalen in den Interphasekernen lagen wie erwähnt bei 8 Patientinnen in der Metaphasediagnostik und bei 14 Patientinnen in der Interphasediagnostik vor. In der Interphase-Diagnostik fand sich bei 6 Patientinnen ein Überwiegen der hypoploiden Zellreihe mit einem Signal über die hyperploide Zellreihe mit drei Signalen. Gleich stark ausgeprägt waren die beiden gonosomal-aneuploiden Zellreihen bei 5 Patientinnen und bei 3 Patientinnen überwog die hyperploide Zellreihe.

In der Metaphasediagnostik war ein Überwiegen der 45,X-Linie über die 47,XXX-Linie bei 3 Patientinnen zu finden, ausgeglichen war die Ausprägung bei 4 Patientinnen und bei nur einer Patientin fanden sich mehr Mitosen mit 47,XXX als Mitosen mit 45,X.

So finden sich auch hier Befunde, nämlich das Überwiegen hypoploider Zelllinien, die sich mit dem gleichzeitigen Auftreten von Nondisjunktion und Anaphase-Lag erklären lassen können.

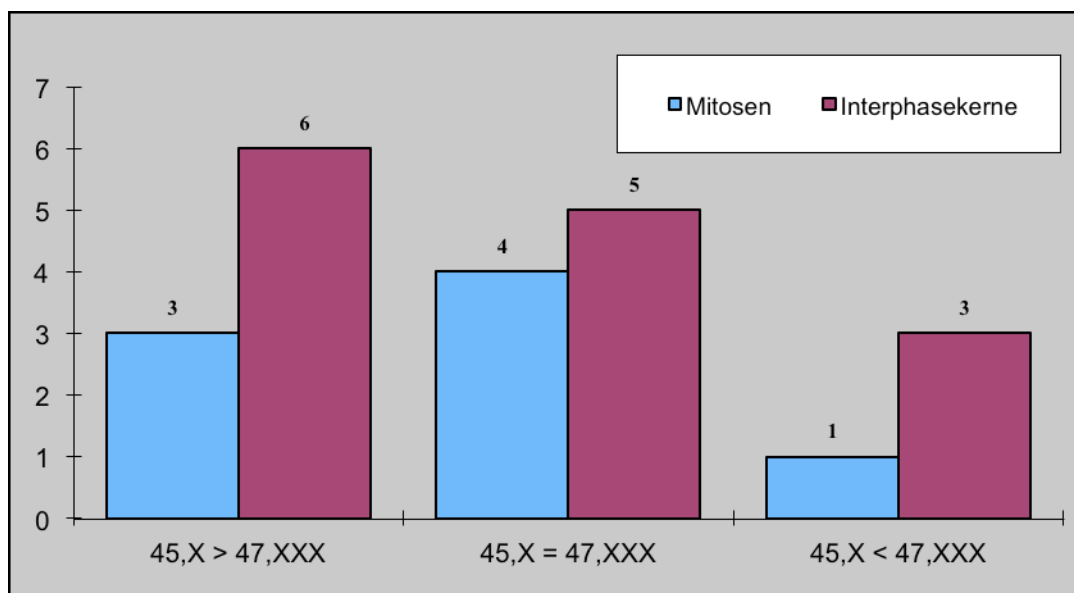


Abb.3.13: Differenzierung der gemischten Mosaiken in überwiegend hypoploide oder hyperploide und ausgeglichener Ausprägung der aneuploiden Zellreihen.

3.4.2 Prozentuale Anteile der aneuploiden Zelllinien

Die klinische Relevanz gonosomaler Mosaik-Verhältnisse wird seit langem kontrovers beurteilt. Wiederholt wurde versucht, sich diesem Thema über quantitative Betrachtungen zu nähern.

Kuo und Guo (2004) fanden in ihrer prospektiven Fall-kontrollierten Studie in einer Kontrollgruppe ohne habituelle Aborte X-chromosomal hypoploide Mitosen mit 1,2% und hyperploide Mitosen mit 0,4% durchschnittlicher Ausprägung. Daraus bildeten sie einen cut-off-Wert von 3% bzw. 2% und bestimmten dann aus einer Patientinnengruppe von 720 Frauen mit habituellen Aborten eine Untergruppe von 23 Patientinnen (3,2% der Patientinnengruppe), deren X-chromosomalen Aneuploidien über diesen cut-offs lagen. Für 18 Patientinnen werteten sie die X-chromosomalen Mosaik-Verhältnisse aus. 14 zeigten gemischt hypo- hyperploide Mosaik-Verhältnisse, zwei hypoploide und zwei hyperploide Mosaik-Verhältnisse.

Die nachfolgende Darstellung zeigt für die drei Mosaik-Typen mit 45,X/46,XX, 46,XX/47,XXX und 45,X/46,XX/47,XXX, bei wie vielen Patientinnen die Ausprägung der aneuploiden Zelllinien 1, 2, 3, 4, oder mehr Prozent ausgemacht hat und dies getrennt für Mitosen und Interphase-Kerne. Für die „einfachen“, also rein hypo- oder hyperploiden Mosaik-Verhältnisse mit nur einer zusätzlichen 45,X- oder 47,XXX-Reihe waren die aneuploiden Zelllinien mit einem oder zwei Prozent niedrig ausgeprägt, linke Seite und Mitte des Diagramms.

Bei den gemischten Mosaiken mit 45,X- und 47,XXX-Reihe neben den euploiden Mitosen und Interphasekernen auf der rechten Seite des Diagramms lagen die Anteile der aneuploiden Zelllinien höher. Bei 4 Patientinnen in der Metaphasediagnostik sowie bei 5 Patientinnen in der Interphasediagnostik fanden sich aneuploide Zelllinien, die einen größeren Anteil hatten als 4%, in Anlehnung an die cut-off-Werte von Kuo und Guo (2004).

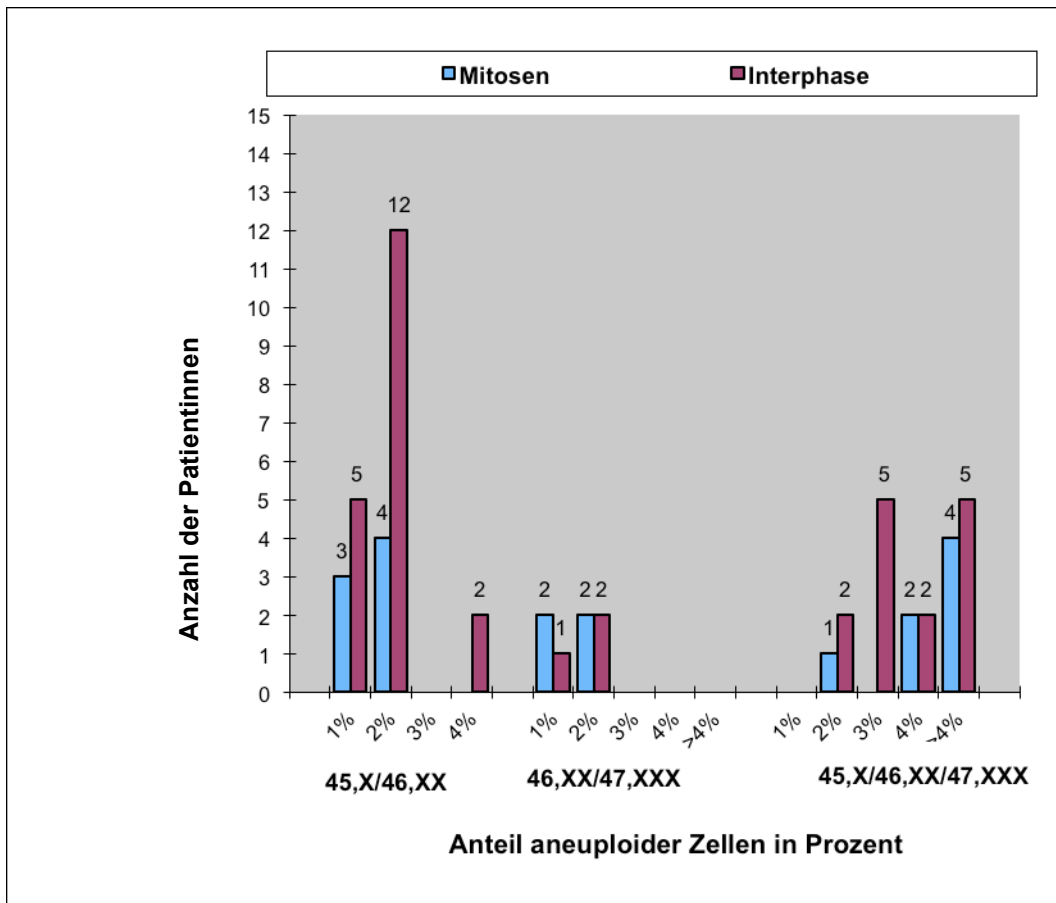


Abb.3.14: Prozentuale Anteile der aneuploiden Zelllinien bei den 3 verschiedenen Mosaiktypen

Die genannten Patientinnen mit den höhergradigen Mosaiken sind hier nachfolgend nochmals mit ihrem Alter und den prozentualen Anteilen der Mosaik aufgeführt. Bei einer der beiden 40jährigen Patientinnen fand sich in einer der 100 ausgewerteten Mitosen eine mit 49,XXXXX.

Es lässt sich nun an der folgenden Darstellung in Abb. 3.15 erkennen, dass die Werte für die aneuploiden Interphase-Kerne und Mitosen stark übereinstimmen. Diese fünf Patientinnen gehörten auch zu den ältesten in der untersuchten Patientinnen-Gruppe.

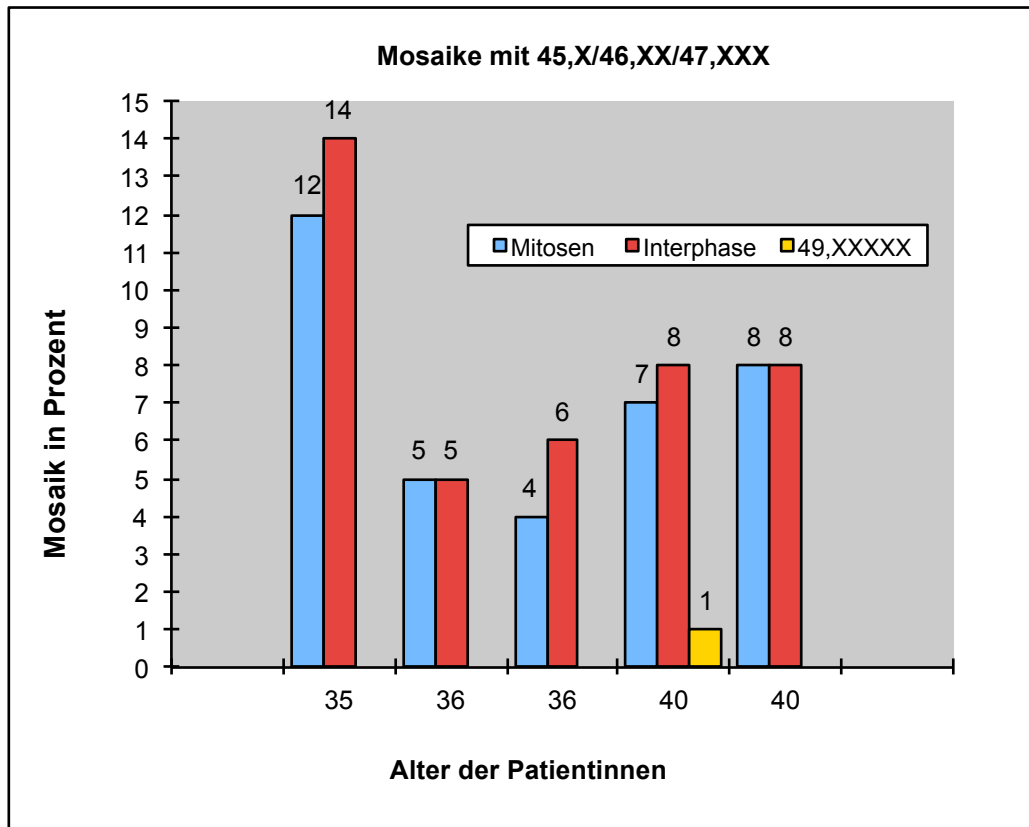


Abb.3.15: Prozentuale Anteile der gonosomal-aneuploiden Zelllinien in Verbindung mit dem Alter der betroffenen Patientinnen.

3.5 Alterskorrelationen X-chromosomal aneuploider Interphasekerne und Mitosen

Im folgenden Abschnitt werden die Korrelationen von Alter und den gonosomal-aneuploiden Mitosen und Interphasekerne dargestellt. Dabei werden sowohl für die Interphase-Diagnostik, wie auch für die Metaphase-Diagnostik zunächst die Anzahl der gonosomal-aneuploiden Mitosen, respektive Interphase-Kerne berücksichtigt und dann die der gonosomal-hypoploiden und die der gonosomal-hyperploiden Mitosen, bzw. Interphase-Kerne. Die Berechnung der Korrelation erfolgte erneut mit dem Spearman'schen Rangkorrelations-Koeffizienten r_s , bzw. ρ und der Berechnung des p-Wertes.

In den Diagrammen zu den Korrelationen sind Werte-Paare, die mehrfach vorkamen, durch die entsprechend zunehmende Größe der Punkte in den Diagrammen gekennzeichnet zu klareren Beurteilbarkeit.

Abbildung 3.16 zeigt nochmals die Altersverteilung der Patientinnen. Die Altersspanne lag zwischen 23 und 42 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 31,5 Jahre mit einer Standardabweichung von 4,9 Jahren.

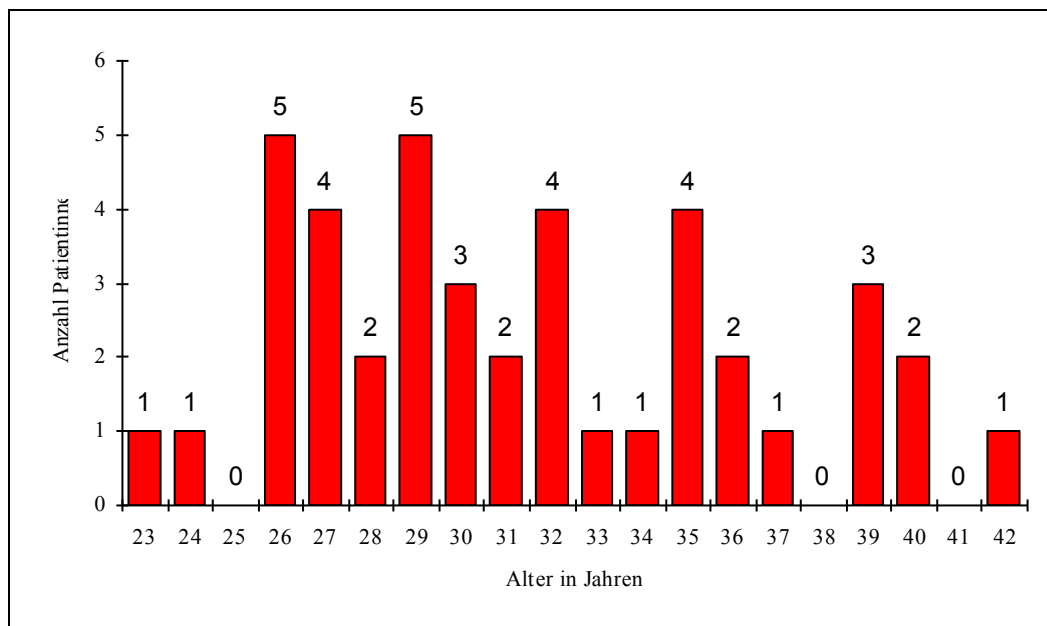


Abb.3.16: Altersverteilung der Patientinnen

3.5.1 Alter der Patientinnen und Häufigkeit gonosomal-aneuploider Mitosen

In dieser Abbildung wird für jede Patientin die Anzahl der gonosomal-aneuploiden Mitosen gezeigt. Auf der X-Achse hat jede Patientin eine Spalte, die Sortierung erfolgt nach dem Alter der Patientinnen. Die blauen Balken geben die gonosomal-hypoploiden Mitosen mit 45,X, die roten Balken die gonosomal-hyperploiden Mitosen mit 47,XXX wieder. Eine Patientin, Alter 40 Jahre, zeigte in einer Mitose fünf X-Chromosomen, also 49,XXXXX, diese ist als gelber Balken dargestellt.

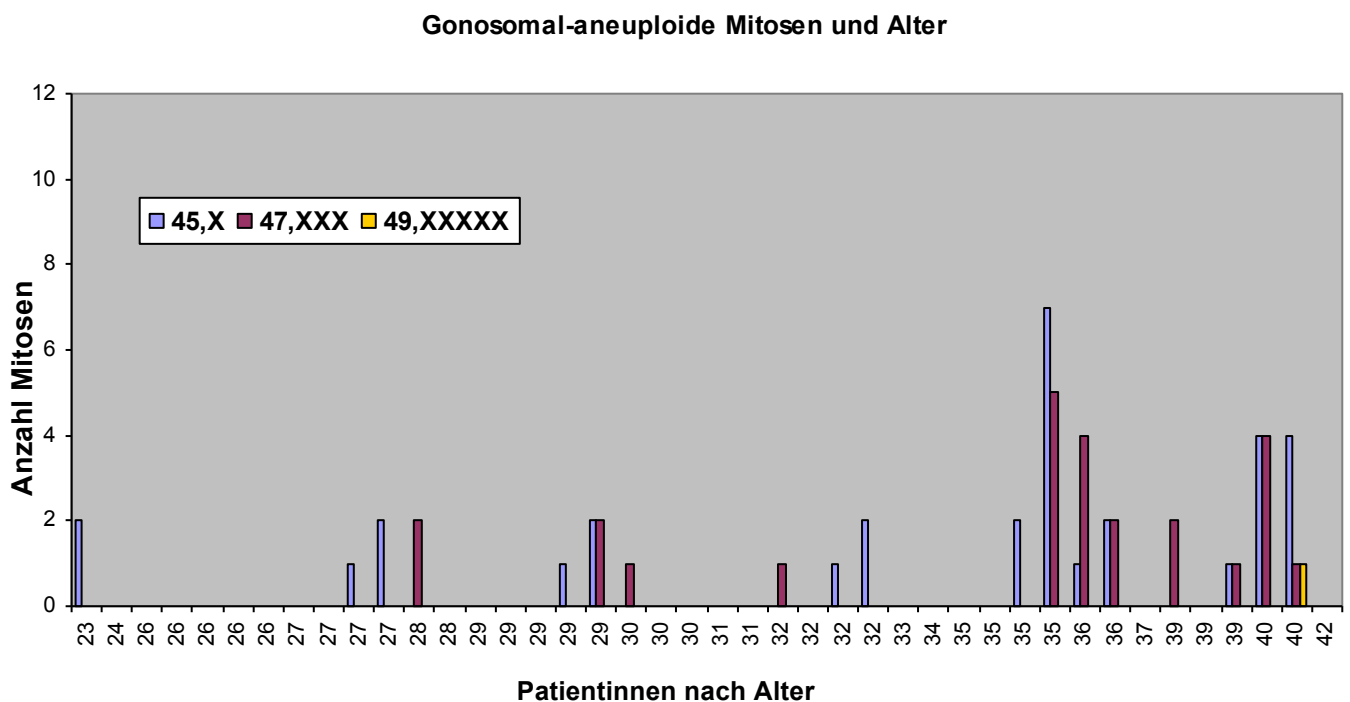


Abb. 3.17: Jede Patientin ist in der X-Achse mit ihrem Alter aufgeführt, in der Y-Achse die Anzahl der Mitosen mit 45,X (blau) und die Anzahl der Mitosen mit 47,XXX (rot), in einem Fall mit 49,XXXXX (gelb).

An dieser Darstellung lässt sich erkennen, dass X-chromosomal aneuploide Mitosen gehäuft bei den älteren Patientinnen zu finden zu sein scheinen. Auf die Alterskorrelation nach dem Spearman'schen Korrelationskoeffizienten wird weiter unten noch ausführlich eingegangen.

3.5.2 Alter der Patientinnen und Häufigkeit der gonosomal-aneuploiden Interphase-Kerne

In dieser Abbildung wird für jede Patientin die Anzahl der gonosomal-aneuploiden Interphase-Kerne gezeigt. Die Sortierung auf der X-Achse erfolgte nach dem Alter der Patientin. Die blauen Balken geben die gonosomal-hypoploiden Interphase-Kerne an mit einem Signal, die roten Balken die gonosomal-hyperploiden Interphase-Kerne mit drei Signalen.

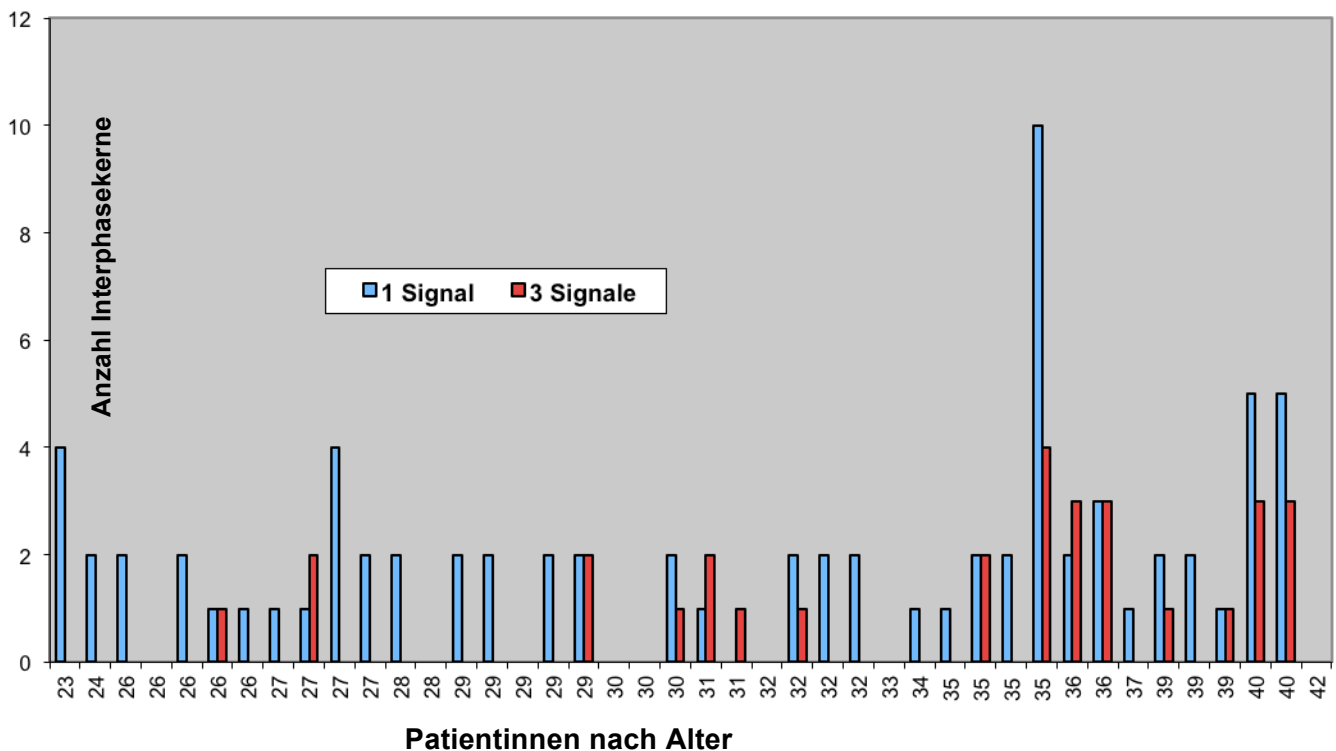


Abb. 3.18: Jede Patientin ist in der X-Achse mit ihrem Alter aufgeführt, in der Y-Achse die Anzahl der Interphase-Kerne mit einem Signal (blau) und mit drei Signalen (rot).

In dieser Abbildung erkennt man, dass die Verteilung der Interphase-Kerne mit nur einem Signal nicht auf die älteren Patientinnen begrenzt ist. Anders sieht es bei den Interphase-Kernen mit drei Signalen aus. Diese zeigen offensichtlich eine Häufung bei den älteren Patientinnen. Auch auf die Alterskorrelation der gonosomal-aneuploiden Interphase-Kerne nach dem Spearman'schen Korrelationskoeffizienten wird weiter unten noch ausführlich eingegangen.

Zwischen dem Alter der Patientinnen und der Summe der gonosomal-aneuploiden Interphasekerne (Interphasekerne mit 1 Signal und 3 Signalen) bestand statistisch kein signifikanter Zusammenhang ($\rho=0,17$, $p\text{-Wert}=0,263$).

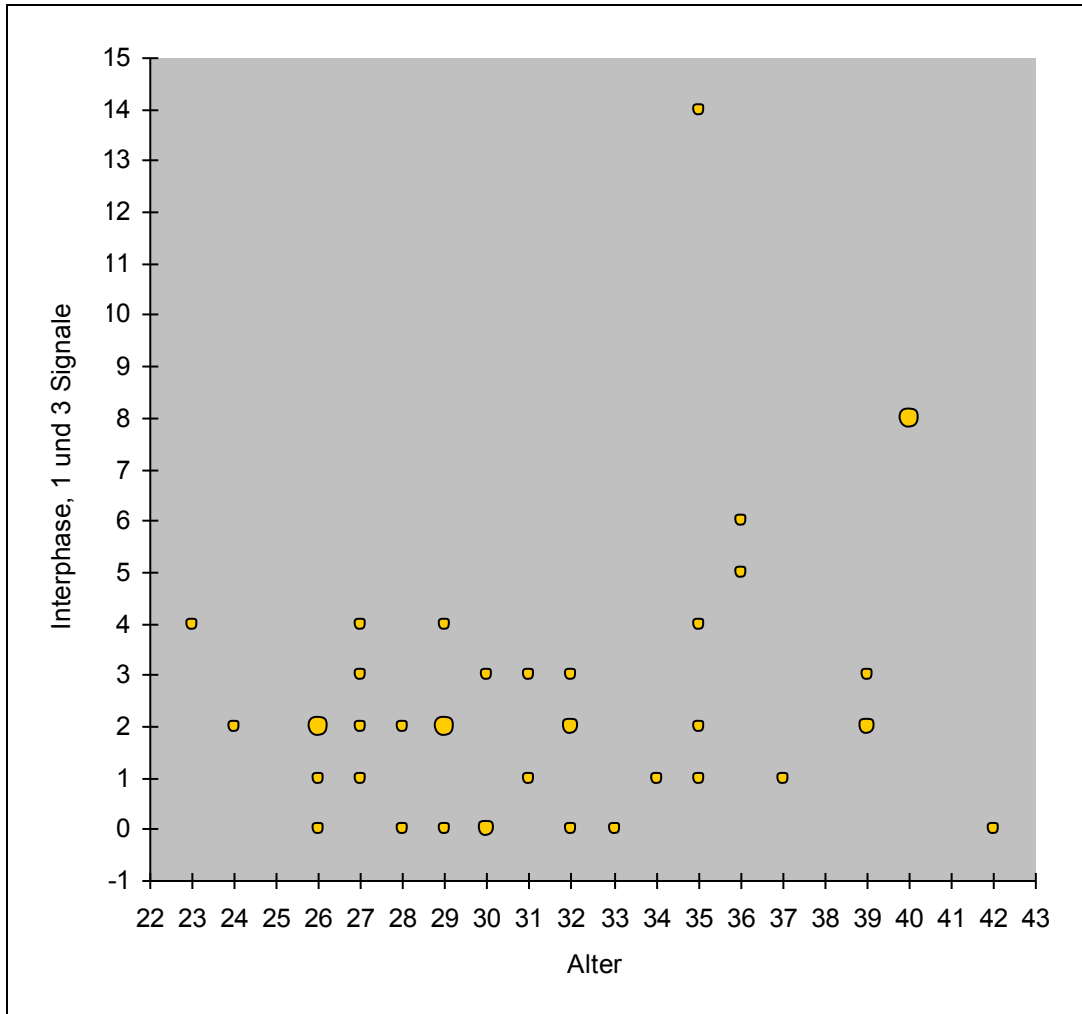


Abb.3.19: Korrelation von gonosomal-aneuploiden Interphasekernen und Alter ($\rho=0,17$, $p\text{-Wert}=0,263$). Werte-Paare, die mehrfach vorkamen, sind durch die entsprechend zunehmende Größe der Punkte gekennzeichnet

Betrachtete man die Interphase-Kerne mit einem Signal allein, so zeigte sich ebenfalls kein Zusammenhang zum Alter ($\rho = 0,094$, $p = 0,552$). Die Interphase-Kerne mit einem Signal, also 45,X kommen also bei allen Patientinnen vor, unabhängig vom Alter.

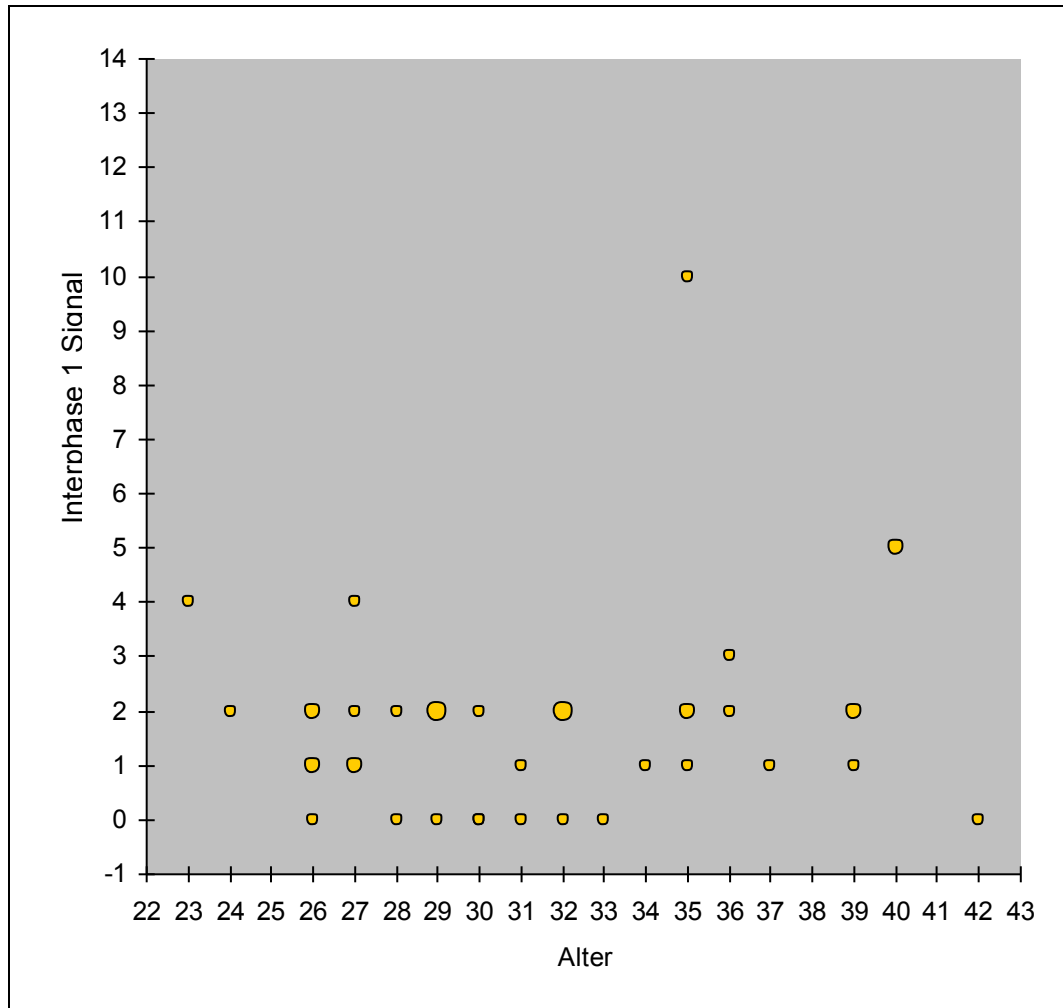


Abb.3.20: Korrelation gonosomal-hypoploider Interphasekerne und Alter ($\rho = 0,094$, $p\text{-Wert} = 0,552$). Werte-Paare, die mehrfach vorkamen, sind durch die entsprechend zunehmende Größe der Punkte gekennzeichnet

Im Gegensatz dazu waren gonosomal-hyperploide Interphasekernen mit drei Signalen hochsignifikant häufiger bei den älteren Patientinnen zu finden ($\rho=0,400$, $p=0,009$).

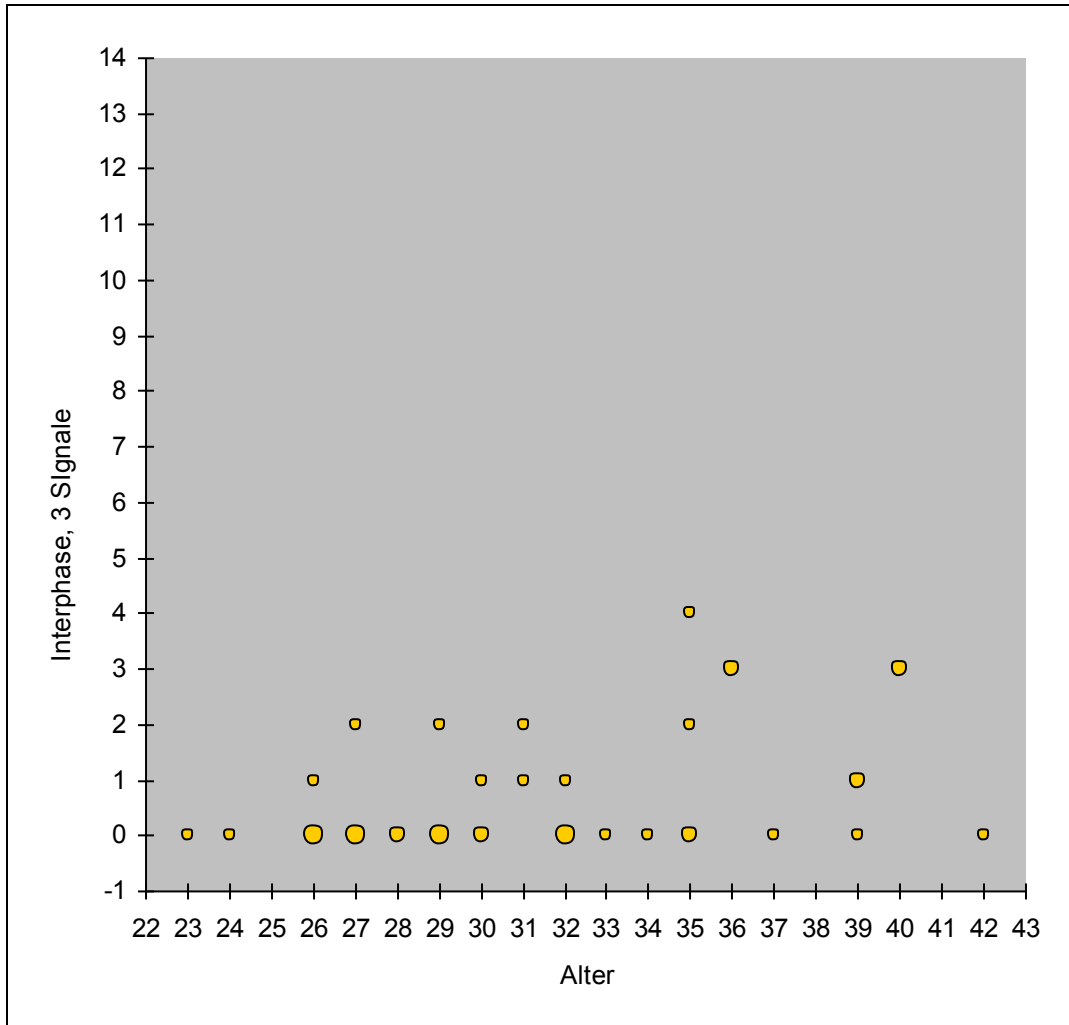


Abb.3.21: Korrelation von gonosomal-hyperploiden Interphasekernen und Alter. Wertepaare, die mehrfach vorkamen, sind durch die entsprechend zunehmende Größe der Punkte gekennzeichnet

Daraus lässt sich erkennen, dass der Mechanismus, der zu einem Zugewinn von X-Chromosomen in Interphase-Kernen von Lymphozyten führt, altersabhängig sein könnte, der Mechanismus, der zu einem Verlust von X-Chromosomen führt und somit zu nur einem Signal in den Interphase-Kernen, hingegen nicht.

In dem nachfolgenden Diagramm wird das Alter der Patientinnen und die jeweilige Anzahl der gonosomal-aneuploiden Mitosen dargestellt, die sich bei den Patientinnen des jeweiligen Alters fanden. Zwischen dem Alter der Patientinnen und der Summe gonosomal-aneuploider Mitosen (45-X u.47-XXX) fand sich ein mäßig signifikanter Zusammenhang ($\rho=0,33$, $p=0,031$).

Das bedeutet, dass sich mit zunehmendem Alter der Patientinnen eine wachsende Anzahl an gonosomal-aneuploiden Mitosen finden ließ.

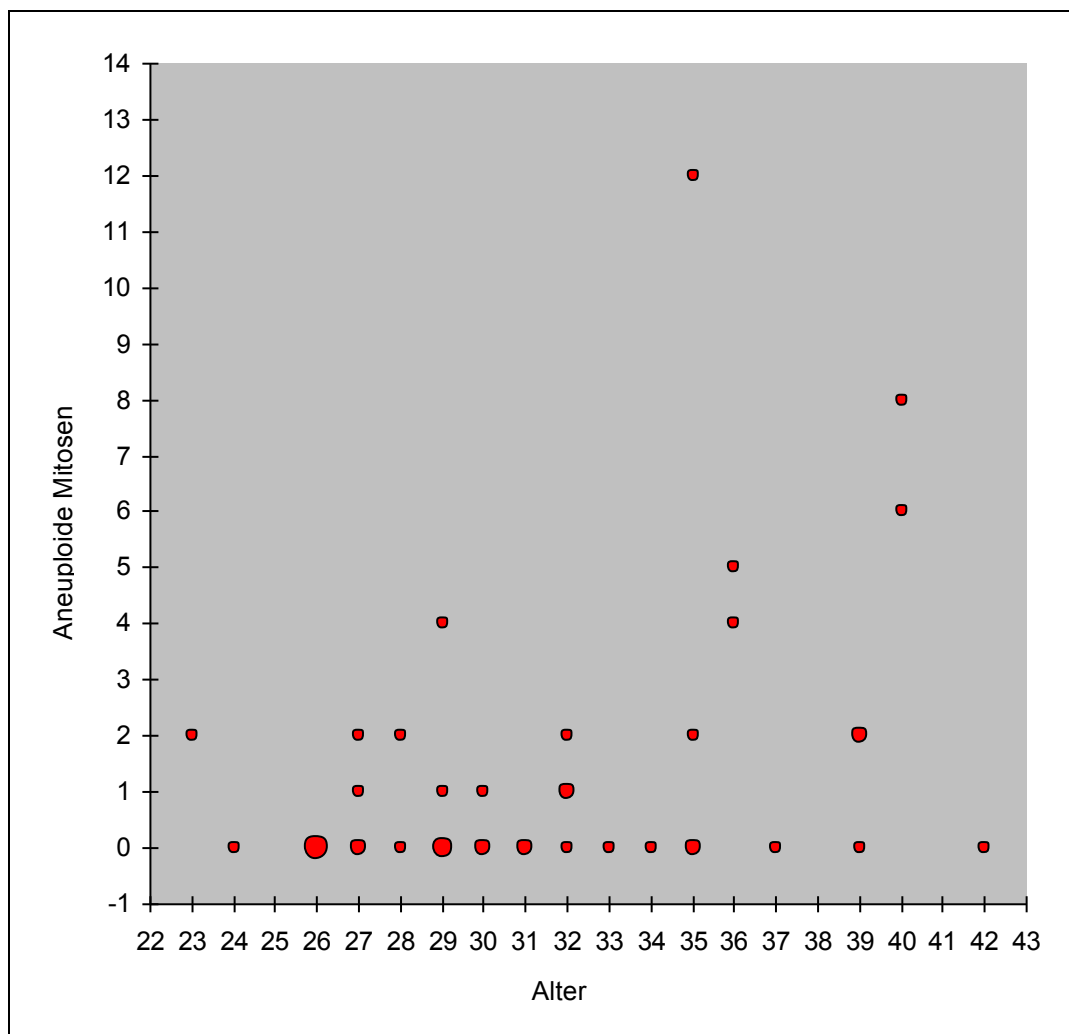


Abb.3.22: Korrelation von gonosomal-aneuploiden Mitosen und Alter ($\rho=0,33$, $p=0,031$). Werte-Paare, die mehrfach vorkamen, sind durch die entsprechend zunehmende Größe der Punkte gekennzeichnet

Zwischen dem Alter der Patientinnen und den gonosomal-hypoploiden Mitosen (45-X) fand sich kein signifikanter Zusammenhang ($\rho=0,249$, p-Wert= 0,111)

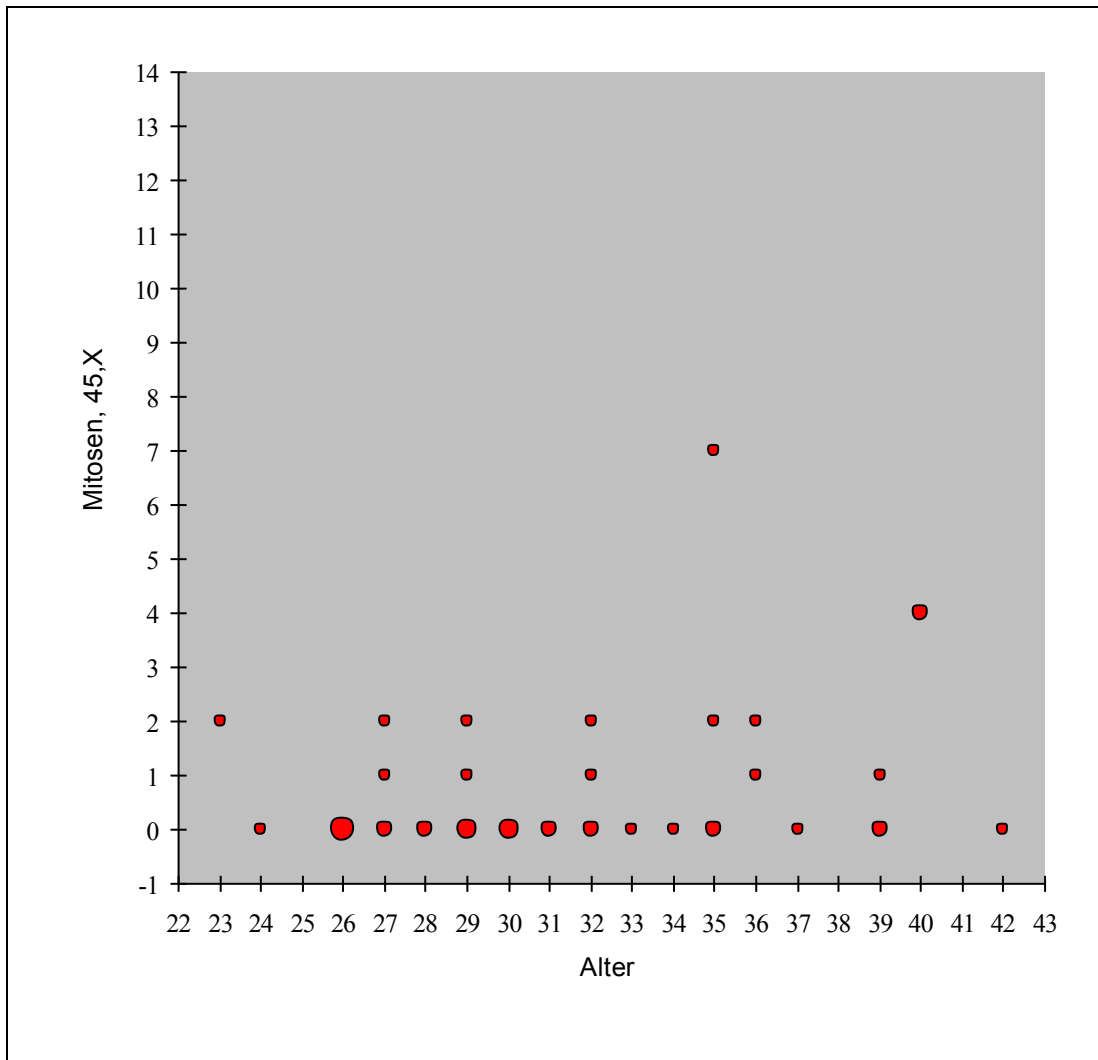


Abb.3.23: Korrelation von gonosomal-hypoploiden Mitosen und Alter ($\rho=0,249$, p-Wert= 0,111). Werte-Paare, die mehrfach vorkamen, sind durch die entsprechend zunehmende Größe der Punkte gekennzeichnet

Für die gonosomal-hyperploiden Mitosen ließ sich ein deutlich signifikanter Zusammenhang mit dem Alter der Patientinnen finden. In der folgenden Darstellung findet sich auch die eine Mitose mit 49,XXXXX, die sich bei einer 40jährigen Patientin fand. Sie ist mit dem gelben Quadrat dargestellt. ($\rho = 0,438$, $p = 0,004$).

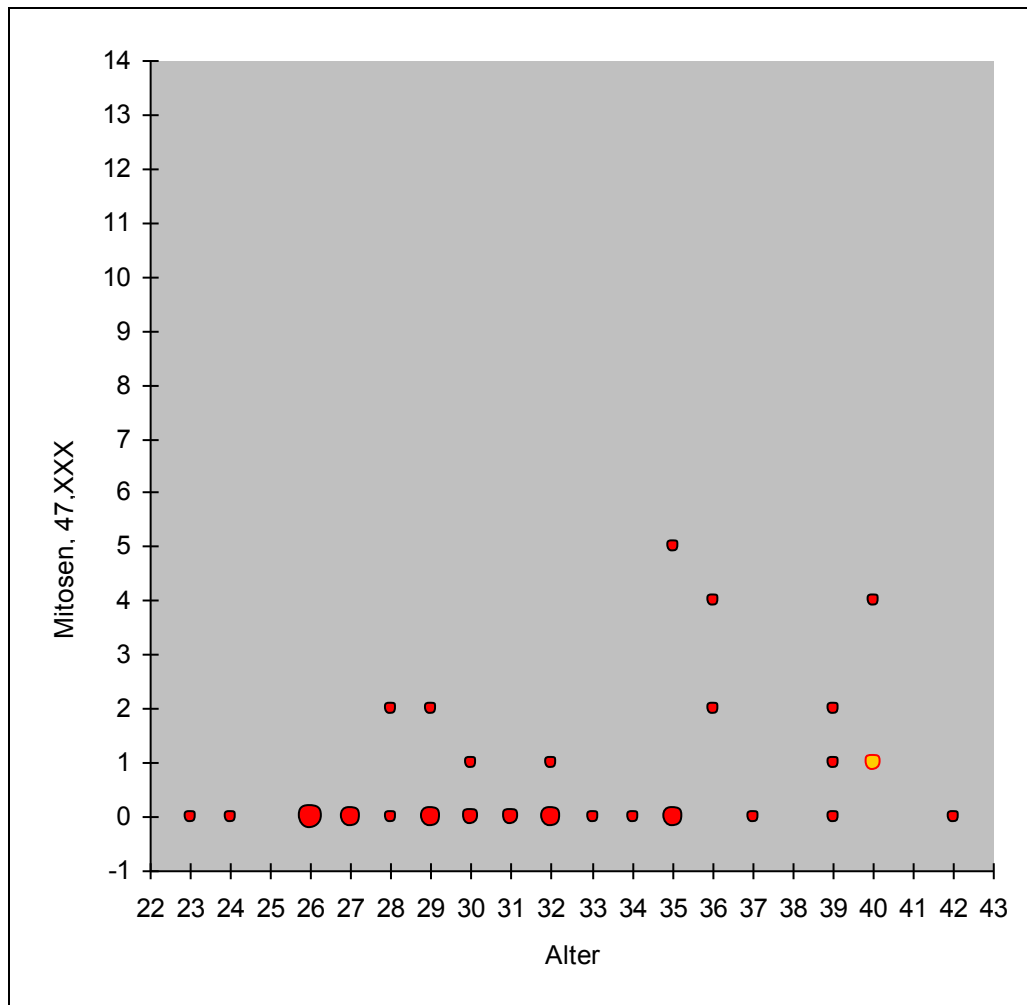


Abb.3.24: Korrelation gonosomal-hyperploider Mitosen und Alter ($\rho = 0,438$, p -Wert= $0,004$). Werte-Paare, die mehrfach vorkamen, sind durch die entsprechend zunehmende Größe der Punkte gekennzeichnet

Übersichtstabelle: Ergebnisse der Auszählung:

Alter	M: 45, X	M: 46,X X	M: 47,XXX	48	49	I: 1Signal	I: 2Signale	I: 3Signale	aneupl. Mitose n	eupl. Mitose n	aneupl. Interphase- kerne	eupl. Interphase- kerne
23	2	98	0			4	96	0	2	98	4	96
24	0	100	0			2	98	0	0	100	2	98
26	0	100	0			2	98	0	0	100	2	98
26	0	100	0			0	100	0	0	100	0	100
26	0	100	0			2	98	0	0	100	2	98
26	0	100	0			1	98	1	0	100	2	98
26	0	100	0			1	99	0	0	100	1	99
27	0	100	0			1	99	0	0	100	1	99
27	0	100	0			1	97	2	0	100	3	97
27	1	99	0			4	96	0	1	99	4	96
27	2	98	0			2	98	0	2	98	2	98
28	0	98	2			2	98	0	2	98	2	98
28	0	100	0			0	100	0	0	100	0	100
29	0	100	0			2	98	0	0	100	2	98
29	0	100	0			2	98	0	0	100	2	98
29	0	100	0			0	100	0	0	100	0	100
29	1	99	0			2	98	0	1	99	2	98
29	2	96	2			2	96	2	4	96	4	96
30	0	99	1			0	100	0	1	99	0	100
30	0	100	0			0	100	0	0	100	0	100
30	0	100	0			2	97	1	0	100	3	97
31	0	100	0			1	97	2	0	100	3	97
31	0	100	0			0	99	1	0	100	1	99
32	0	99	1			0	100	0	1	99	0	100
32	0	100	0			2	98	0	0	100	2	98
32	1	99	0			2	97	1	1	99	3	97
32	2	98	0			2	98	0	2	98	2	98
33	0	100	0			0	100	0	0	100	0	100
34	0	100	0			1	99	0	0	100	1	99
35	0	100	0			1	99	0	0	100	1	99
35	0	100	0			2	96	2	0	100	4	96
35	2	98	0			2	98	0	2	98	2	98
35	7	88	5			10	86	4	12	88	14	86
36	1	95	4			2	95	3	5	95	5	95
36	2	96	2			3	94	3	4	96	6	94
37	0	100	0			1	99	0	0	100	1	99
39	0	98	2			2	97	1	2	98	3	97
39	0	100	0			2	98	0	0	100	2	98
39	1	98	1			1	98	1	2	98	2	98
40	4	92	4			5	92	3	8	92	8	92
40	4	94	1	0	1	5	92	3	6	94	8	92
42	0	100	0			0	100	0	0	100	0	100

4. Diskussion

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit fanden statt zwischen April 1994 und Februar 1995. Die in der vorliegenden Studie angewandte Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung orientierte sich an der von Bartsch et al. (1991) beschriebenen Methode, wurde jedoch modifiziert: Da schwache Signale der markierten X-Chromosomen eine Fehlerquelle darstellen (Ruangvutilert et al. 2000), wurde für die vorliegende Untersuchung eine Sandwich-Technik entwickelt, um stärkere Signale zu erhalten. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung kann weiterhin als eine der geeignetsten Methoden gelten, mit der chromosomale Mosaik in Zellen und Geweben nachzuweisen sind (Gersak und Veble, 2011).

Meine Untersuchungen zu X-chromosomalen Aneuploidien in Lymphozytenkulturen von Frauen mit habituellen Aborten beschäftigten sich mit folgenden Aspekten:

- Vergleichbarkeit von Interphase- und Metaphasediagnostik
- Alterskorrelation von X-chromosomalen Aneuploidien
- Mögliche zugrundeliegende Mechanismen:
 - Alterskorrelation von Anaphase-Lag
 - Alterskorrelation von Nondisjunktion

Die älteste mir vorliegende Arbeit zu diesem Thema war die von Hsu et al. (1972) über hypo- und hyperploide X-chromosomale Mosaik in Wangenabstrichen, Fibroblasten- und Lymphozytenkulturen von zwei Frauen mit habituellen Aborten. Die Autoren gingen damals von Zusammenhängen aus zwischen ovariellen Funktionsstörungen, Alter und einer mitotischen Instabilität, die zu Nondisjunktion führen könne.

Zum Zeitpunkt des Beginns meiner Untersuchungen 1994 waren diese Theorien aus den siebziger Jahren allesamt weiterentwickelt worden (z.B. Dietrich et al 1983, Hecht 1984, Novak et al. 1995, Linden et al. 1996).

Der Anteil X-chromosomaler Mosaik bei Frauen mit habituellen Aborten wurde mit sehr unterschiedlichen Häufigkeiten von 0,1% (Bourrouillou et al.1986) bis 10% (Hecht et al.1984) auch für größere Patientenkollektive angegeben.

Erst in den letzten Jahren allerdings finden sich Studien und Theorien, die durch fundierte wissenschaftliche Erkenntnisse über zelluläre Alterung und Zellteilung die schon von Hsu et al. 1972 formulierten Überlegungen erklärbar machen. Diese sind Erkenntnisse über unter anderem die Bedeutung von X-chromosomalem Erbmaterial für die ovarielle Funktion, der Zusammenhang zwischen X-chromosomalen Mosaiken und prämaturer Ovarialinsuffizienz und die Rolle der Telomere in der Entstehung von Aneuploidien und den Besonderheiten der Alterung von Eizellen.

Aktuell ergibt sich eine differenziertere Betrachtungsweise der Thematik auch durch die Untersuchungen von Machiela et al. (2016). Sie analysierten im Rahmen der „cancer genome-wide association studies“ (GWAS) bei 38.303 Frauen die Single-Nucleotide-Polymorphism-Microarray-Intensität und fanden bei 97 Frauen insgesamt 124 X-chromosomale Mosaikformen mit einer Größe über 2Mb. Die Anzahl der Mosaikformen übersteigt die der betroffenen Frauen, da bei 15 Frauen mehr als eine Mosaikform gefunden wurde. Es fanden sich 59 hypoploide und 22 hyperploide Mosaikformen.

Bei 33 Frauen wurde mittels Methylation-Array gezeigt, dass das inaktive X-Chromosom sowohl bevorzugt vom Verlust betroffen war, wie auch vom Zugewinn. Aus diesen Beobachtungen ergeben sich im Zusammenhang mit der in der vorliegenden Untersuchung festgestellten unterschiedlichen Alterskorrelation von Verlust und Zugewinn natürlich weitere Fragen zu den Mechanismen von X-Inaktivierung und Anaphase-Lag.

In meiner Studie ergeben sich Hinweise auf unterschiedliche Alterskorrelationen der beiden bekannten zugrundeliegenden Mechanismen Nondisjunktion und Anaphase-Lag durch die differenzierte Auswertung der Alterseffekte von Verlust oder Zugewinn von X-Chromosomen im Sinne von Hypo- und Hyperploidien.

In zwei der häufiger zitierten Studien zur Bedeutung X-chromosomaler Mosaikformen im Zusammenhang mit habituellen Aborten, wurde diese Differenzierung nicht vorgenommen. Dies sind die von Russell et al., 2007 sowie Guttenbach et al., 1995. Andere Autoren kommen zu dem Ergebnis, der Unsicherheit bezüglich der Bewertung gefundener X-chromosomaler Mosaikformen in der Humangenetik.

Beratung könne durch die Benennung von cut-off-Werten begegnet werden, zum Beispiel Kuo und Guo, 2004 und Madan und Lundberg, 2015.

Letztere formulieren in ihrem Newsletter auf dieser Grundlage praktische Handlungsempfehlungen für den Umgang mit Aneuploidien im Rahmen zytogenetischer Untersuchungen zum Beispiel zur Abklärung ungewollter Kinderlosigkeit oder habitueller Aborte (Madan und Lundberg, 2015).

Da sich durch die Vorgänge der Inaktivierung eines X-Chromosoms auch starke strukturelle, räumliche Veränderungen abspielen (M. Engreitz et al. 2013), ist es nicht auszuschließen, dass hierdurch weitere Zusammenhänge zu Anaphase Lag und Nondisjunktion bestehen.

Aufgrund der in meiner Untersuchung gefundenen Hinweise auf die unterschiedlichen Alterskorrelationen der zugrundeliegenden Mechanismen Anaphase-Lag und Nondisjunktion, halte ich die in der genannten Literatur zu findenden Empfehlungen zur Bewertung X-chromosomaler Mosaikie innerhalb humangenetischer Beratung für überdenkenswert.

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Effizienz von FISH

Für die Diagnostik von Aneuploidien oder Mosaiken in Metaphase wie Interphase, ist durch die Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ein nicht mehr wegzudenkender Fortschritt eingetreten. Methodenspezifisch existieren jedoch auch klare Schwachpunkte, die es erforderlich machen, Analyseergebnisse immer auch kritisch zu betrachten. Mit dieser Thematik beschäftigten sich die Wissenschaftler seit Entwicklung der Methoden. So schrieben Philip et al. (1994), dass damals FISH als Ergänzung zur konventionellen zytogenetischen Analytik eingesetzt wurde. Sie sahen in FISH eher einen Screening-Test als eine Untersuchung, mit der klare Diagnosen gestellt werden könnten und auch nur als Ergänzung könne sich die Methode behaupten (Philip et al., 1994).

Auch Evans et al. (1999) kamen in ihrer internationalen Studie über Pränataldiagnostik in fünf Jahren an acht großen Zentren der Pränataldiagnostik mit 146.000 Karyotypisierungen zu dem Schluss, dass lediglich bestenfalls 70% der Aberrationen durch FISH als alleiniger Methode entdeckbar gewesen wären. Sie sahen daher FISH als Ergänzung der damaligen Möglichkeiten, die aber einer Weiterentwicklung bedürfe.

Ruangvutilert et al. (2000) gehen in Bezug auf die Fragestellung der Effizienz von FISH mehr in die Details der Analyseergebnisse und berichten in ihrer Studie mit FISH an Fibroblastenkulturen von trisomen Föten ohne Mosaikstatus und Lymphozyten gesunder Männer, dass die zu erwartenden Ergebnisse in der Metaphase-Diagnostik zu hundert Prozent gefunden worden seien bei insgesamt 31 bis 96 untersuchten Metaphasen. In der Untersuchung von 1.957 bis 3.819 Interphasekernen, fanden sie bei keiner ihrer Proben in allen Zellkernen das zu erwartende Ergebnis. Das führten die Autoren vor allem auf die mögliche Überlappung der Signale in den Interphasekernen zurück, was ich bereits als 3D-Effekt beschrieben habe, aber erwähnten auch mögliche Schwachpunkte in dem technischen Ablauf der Hybridisierung, vor allem im Falle der Trisomie 18, bei der die Signale in den Kernen sehr diffus gewesen seien mit einem dadurch erhöhten Risiko von Überlappungen.

Der deutlich geringere Zeitbedarf der Interphasediagnostik wird auch in der aktuelleren Literatur abgewogen gegenüber den methodischen Schwächen dieses Verfahrens (Ruangvutilert et al. 2000, Toutain et al. 2010).

Die methodischen Schwächen bringen so auch van Echteren-Arends et al. (2011) zu der Einschätzung, dass FISH eine Genauigkeit von 92 bis 99% habe. Daraus ergebe sich zum Beispiel beim Einsatz eines Multi-Probe-Panel entsprechend ein noch höheres Risiko von Fehldiagnosen. Hier sei die Hoffnung auf zum Beispiel die Array-Technologie zu setzen.

In ihrem Review berichten Benn et al. (2013), dass die aktuelle Entwicklung der NIPT (noninvasive prenatal testing) für Aneuploidien durch Untersuchung fötaler, nicht zellgebundener DNA in mütterlichem Serum einerseits die hier vorangehend genannten methodischen Schwachpunkte der FISH in vielen Aspekten überwindet, aber besonders im Zusammenhang mit den gonosomalen Mosaiken

erneut eine problematische Situation entsteht. So beziehen sie sich auf mehrere auch in dieser Arbeit schon genannte Studien, die sich mit gonosomalen Mosaiken sowohl bei den Müttern, wie auch den Embryonen beschäftigen (Holzgreve et al. 1984, Hassold und Hunt 2009, Russell et al. 2007). Dadurch ergäben sich für diese sehr junge Methode große Probleme, fötale X-Chromosomale Aberrationen auf dem Boden von Verzerrungen durch mögliche X-chromosomale Mosaik der Mütter nachweisen zu können.

Die in der vorliegenden Studie angewandte Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung orientierte sich an der von Bartsch et al. (1991) beschriebenen Methode, wurde jedoch modifiziert: Da schwache Signale der markierten X-Chromosomen eine Fehlerquelle darstellen (Ruangvutilert et al. 2000), wurde für die vorliegende Untersuchung eine Sandwich-Technik entwickelt, um stärkere Signale zu erhalten. Dieses „Sandwich“ bestand aus drei Schichten von Antikörpern: Anti-Digoxigenin-AK vom Schaf, FITC-Anti-Schaf-AK vom Kaninchen und zuletzt FITC-Anti-Kaninchen-AK. Die dadurch erzielte Signalqualität zeigte sich in Voruntersuchungen als deutlich die Auswertung erleichternd.

Jedoch bleibt selbst bei Signalen von hoher Intensität das Problem, dass sich diese Signale überlagern können (van Echteren-Arends et al. 2011, Ruangvutilert et al. 2000, Schliephacke et al. 1996, Hopman et al. 1991, Lomax et al. 1994, Ward et al. 1993).

Daher wurden Kriterien zur Auswertung insbesondere der Interphasekerne von den Autoren Ward et al. (1993) und Hopman et al. (1990) übernommen und ergänzt, um nachvollziehbare Ergebnisse zu erhalten. Diese Kriterien finden sich im Material und Methoden-Teil (2.4.1 und 2.4.2.)

4.1.2 Störfaktor Lymphozytenkultur

Schon Diedrich et al. (1983) berichteten von der Möglichkeit, dass durch den Vorgang der Kultivierung und Blockung der Lymphozyten Fehler auftreten könnten, wie zum Beispiel der Verlust von Chromosomen. Auch Ford et al. (1988) wiesen darauf hin, dass in Lymphozytenkulturen ca. 2% der Lymphozyten Chromosomen in Mikronukleoli verlieren könnten. In vielen anderen Studien werden technische Artefakte als Ursache von Aneuploidien jedoch zurückgestellt, da z.B. signifikante Alterseffekte (Russell et al. 2007) oder Zusammenhänge mit der Schwangerschaftsanamnese (Voigt et al. 2004) nachweisbar seien und daher die Sensitivität der Diagnosemethode in diesen Studien nicht signifikant beeinträchtigt gewesen sein könne.

Guttenberg et al. (1995) fanden in ihrer eigenen Studie zur Häufigkeit X-chromosomaler Aneuploidien bei gesunden Frauen verschiedener Altersgruppen keine Unterschiede für die Gonosomen in kultivierten Lymphozyten und unterschieden dabei nach direkter Analyse, sowie zwei oder drei Tage dauernder Kultivierung.

In diesem Zusammenhang können auch Beobachtungen von Bedeutung sein, die Kalmbach et al. (2013) formulierten, dass nämlich die Telomere in Lymphozyten von Frauen mit unerklärten habituellen Aborten kürzer seien. Auch für diese Autoren steht außer Frage, dass Ergebnisse aus Lymphozytenkulturen repräsentative, aussagekräftige Ergebnisse über biologische Prozesse liefern können, die in den Ovarien stattfinden (Kalmbach et al., 2013).

4.2 Vergleich von Interphase- und Metaphasediagnostik

4.2.1. Verhältnis von X-chromosomal aneuploiden Interphase-Kernen und Mitosen

Bei 26 Patientinnen und damit der Mehrzahl der 42 Patientinnen, fanden sich mehr X-chromosomal aneuploide Interphasekerne als X-chromosomal aneuploide Mitosen. Bei 14 der 42 Patientinnen entsprach die Anzahl der gonosomal-aneuploiden Interphasekerne genau der Anzahl an gonosomal-aneuploiden Mitosen. Bei zwei der Patientinnen lag die Anzahl gonosomal-aneuploider Interphasekerne unter der Anzahl der gonosomal-aneuploiden Mitosen. Mit dem Vorzeichentest berechnet, ist das Überwiegen der gonosomal-aneuploiden Interphasekerne über die Mitosen hoch signifikant ($p < 0,001$). Dies zeigt auch die Abbildung 3.2.

Dennoch besteht statistisch eine signifikante Übereinstimmung der Analyse-Ergebnisse aus der Interphase-Diagnostik und der Metaphase-Diagnostik. Berechnet mit dem Spearman'schen Rangkorrelations-Koeffizienten findet sich ein rho von 0.6 und ein $p < 0,001$ (Abbildung 3.6).

Die Erklärung dafür liegt in folgendem Umstand: Die Abweichungen in der Anzahl der gefundenen gonosomalen Aneuploidien ist prozentual nur sehr gering, wie in Abbildung 3.4 verdeutlicht wird. Bei 14 Patientinnen bestand keine Differenz zwischen den Ergebnissen in der Interphase-Diagnostik und der Metaphase-Diagnostik. Bei 28 Patientinnen bestand eine Differenz, wobei diese bei 10 Patientinnen lediglich in 1 und bei 13 Patientinnen in 2 von 100 Interphasekernen bzw. Mitosen bestand. Bei keiner Patientin war die Differenz größer als 4 von 100 Interphasekernen oder Mitosen.

Die Mehrzahl der Unterschiede zwischen den Analyse-Methoden entstanden dadurch, dass sich in der Diagnostik mehr Interphasekerne mit einem Signal zeigten als entsprechende Mitosen mit 45,X. Abbildung 3.5 gibt hierüber einen Überblick. Sie zeigt, dass 9 Patientinnen weder X-chromosomal aneuploide Interphasekerne, noch Mitosen zeigten, bei 19 Patientinnen keine aneuploiden

Mitosen, aber Interphasekerne gefunden wurden., bei 9 Patientinnen aneuploide Interphasekerne und Mitosen gefunden wurden, aber die Interphasekerne überwogen und zuletzt, dass bei 5 Patientinnen in gleich großem Anteil aneuploide Interphasekerne und Mitosen gefunden wurden.

Es kam also überdurchschnittlich häufig zu X-chromosomal hypoploiden Interphasekernen, während in der Metaphasediagnostik keine X-chromosomal hypoploiden Mitosen gefunden wurden.

Daraus ergibt sich die Frage, ob es sich bei einem Teil der Interphasekerne mit einem Signal um Artefakte handelt. Bereits Lomax et al. (1994) empfahlen die Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung zum Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte und somit auch der Aneuploidien in Interphasekernen. Sie erwähnten jedoch auch Fehlerquellen der Interphase-Diagnostik wie z.B. mangelhaftes Eindringen der Sonden-DNA in den Kern und die Überlagerung der beiden Signale durch 3D-Effekte, so dass die vorhandenen zwei Signale nur als ein 1 Signal erscheinen.

Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt, ist dies auch in aktuelleren Arbeiten eine als nicht unproblematisch eingeschätzter Umstand, so äußern sich zum Beispiel van Echteren-Arends et al. (2011). Diesem Nachteil der Interphasediagnostik setzen Guttenbach et al. (1995) entgegen, dass durch die Präparation der Chromosomen in der Metaphasediagnostik falsche Ergebnisse erzeugt werden könnten und auch der große Zeitaufwand mit dem Risiko einhergehe, Aneuploidien zu übersehen, da in der Regel keine großen Mengen an Mitosen in den vorangegangenen Studien ausgezählt worden seien.

In meinen Untersuchungen fand sich neben der Übereinstimmung der Aneuploidien insgesamt, auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Interphasekernen mit einem Signal und den Mitosen mit 45,X. Hier zeigte sich der Wert $\rho = 0,663$ und der p-Wert $< 0,001$ (siehe Abb. 3.7).

An der Abbildung 3.7 lässt sich auch nochmals ablesen, dass sich bei der Mehrzahl der Patientinnen keine Mitosen mit 45,X (Wert 0 der X-Achse) zeigten, bei vielen dieser Patientinnen aber 1 oder 2 Interphase-Kerne mit nur 1 Signal gefunden wurden (Werte 1 und 2 der Y-Achse). Das spricht erneut für die Möglichkeit des 3D-Effektes, der zusätzlich zu den tatsächlich X-chromosomal

hypoploiden Interphasekernen nochmals in nicht vorhersehbarem Umfang Kerne mit nur einem sichtbaren Signal erzeugt. In der Literatur wird dieser Effekt mehrfach beschrieben, wie bereits erwähnt wurde (van Echteren-Arends et al. 2011, Ruangvutilert et al. 2000, Schliephacke et al. 1996, Hopman et al. 1991, Lomax et al. 1994, Ward et al. 1993).

Die Korrelation zwischen den gonosomal-hyperploiden Mitosen mit 3 X-Chromosomen (47,XXX) und den Interphasekerne mit 3 Signalen bei den Patientinnen zeigte sich ebenfalls als hoch signifikant ($\rho = 0,588$, p-Wert < 0,001).

Nimmt man im Falle der X-chromosomal hyperploiden Interphasekerne jetzt auch Bezug auf den 3D-Effekt, wäre theoretisch denkbar, dass einige der Interphasekerne, die drei X-Chromosomen enthalten, in der Aufsicht auf das Präparat durch eine Überlagerung der Signale nur zwei davon zeigen. Dennoch kommen etwas mehr hyperploide Interphasekerne (30) vor als Mitosen (26), was aber aufgrund der geringen Gesamtzahl der hyperploiden Mitosen und Interphasekerne statistisch nicht signifikant ist.

Ein weiterer Beleg für die Übereinstimmung von Interphase- und Metaphasediagnostik in meinen Ergebnissen findet sich, wenn man die fünf Patientinnen betrachtet, deren Anteil an X-chromosomal aneuploiden Zellen bei 4% und mehr liegt.

Bei 5 Patientinnen fanden sich aneuploide Zelllinien in der Metaphasediagnostik und in der Interphasediagnostik, die einen Anteil hatten von 4% und mehr, in Anlehnung an die von Kuo und Guo (2004) benannten „cut-off“-Werte für die von den Autoren so genannten „gonosomalen low-level-Mosaik“.

Bei einem Vergleich lässt sich in Abbildung 3.15 erkennen, dass die Werte für die aneuploiden Interphase-Kerne und Mitosen stark übereinstimmen.

Daneben fällt auf, dass diese fünf Patientinnen auch zu den ältesten Patientinnen in der von mir untersuchten Gruppe gehörten.

4.3 Alterskorrelation von X-chromosomalen Aneuploidien

Im Ergebnisteil meiner Arbeit habe ich die Korrelationen von Alter und den gonosomal-aneuploiden Mitosen und Interphasekerne dargestellt (Abb. 3.17 und 3.18). Danach wurden sowohl für die Interphase-Diagnostik, als auch für die Metaphase-Diagnostik zunächst die gesamte Anzahl der gonosomal-aneuploiden Interphase-Kerne, respektive Mitosen berücksichtigt und dann die der X-chromosomal hypo- und hyperploiden Interphasekerne bzw. Mitosen.

Die Berechnung der Korrelation erfolgte erneut mit dem Spearman'schen Rangkorrelations-Koeffizienten r_s , bzw. ρ und der Berechnung des p-Wertes.

Zwischen dem Alter der Patientinnen und der Summe der gonosomal-aneuploiden Interphasekerne (Interphasekerne mit 1 Signal und 3 Signalen) bestand statistisch kein signifikanter Zusammenhang ($\rho=0,17$, p-Wert= 0,263).

Betrachtete man nur die Interphasekerne mit einem Signal, so zeigte sich ebenfalls kein Zusammenhang zum Alter ($\rho=0,094$, p=0,552). Die Interphase-Kerne mit einem Signal, entsprechend 45,X, fanden sich also bei allen Patientinnen, unabhängig vom Alter.

Im Gegensatz dazu waren gonosomal-hyperploide Interphasekernen mit drei Signalen hochsignifikant häufiger bei den älteren Patientinnen zu finden ($\rho=0,400$, p= 0,009).

Zwischen dem Alter der Patientinnen und der Summe gonosomal-aneuploider Mitosen (45-X und 47-XXX) fand sich ein mäßig signifikanter Zusammenhang ($\rho=0,33$, p= 0,031).

Das bedeutet, dass sich mit zunehmendem Alter der Patientinnen eine wachsende Anzahl an gonosomal-aneuploiden Mitosen finden ließ.

Zwischen dem Alter der Patientinnen und den gonosomal-hypoploiden Mitosen (45-X) fand sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang ($\rho=0,249$, p-Wert= 0,111).

Für die gonosomal-hyperploiden Mitosen ließ sich dagegen ein deutlich signifikanter Zusammenhang mit dem Alter der Patientinnen finden ($\rho=0,438$, p= 0,004).

Diese Beobachtung einer fehlenden Alterskorrelation in Interphase- wie auch Metaphasediagnostik für den Verlust von X-Chromosomen und einer deutlichen Alterskorrelation für das Auftreten von drei X-Chromosomen, führte zu weiteren Überlegungen:

4.3.1 Alterskorrelation des Verlustes von X-Chromosomen

X-chromosomaler Verlust kann durch Anaphase-Lag entstehen, dann resultiert neben der euploiden Zelllinie eine Zelllinie mit 45,X.

X-chromosomaler Verlust kann daneben entstehen durch Nondisjunktion, dann entstehen neben der euploiden Zelllinie zwei aneuploide mit 45,X und 47,XXX. In den betroffenen Geweben sollten die beiden durch Nondisjunktion entstandenen Zelllinien sich zahlenmäßig entsprechen (Zijno et al. 1996, Wise et al. 2009).

Es ist anzunehmen, dass die beiden Mechanismen Anaphase-Lag und Nondisjunktion auch in den Lymphozytenkulturen der Patientinnen der vorliegenden Studie aufgetreten sind.

Wenn nun zwei verschiedene Mechanismen an der Entstehung von 45,X-Zelllinien beteiligt waren, muss es somit zwei Gruppen von hypoploiden Mitosen geben: einen Teil, der durch Anaphase-Lag entstand und einen, der durch Nondisjunktion entstand.

Bei den Interphasekernen genauso, aber hier ist, wie ich schon beschrieben habe, durch den 3D-Effekt davon auszugehen, dass ein weiterer Anteil als hypoploide Interphasekernen gesehen wurde, der eigentlich euploid war.

Möchte man nun die wichtige Rolle von Alterseffekten im Zusammenhang mit habituellen Aborten und Aneuploidien differenziert untersuchen, scheint es sinnvoll, die Effekte von Anaphase-Lag und Nondisjunktion getrennt zu betrachten. Dazu folgender Abschnitt:

Zwischen dem Alter der Patientinnen und der Summe der gonosomal-aneuploiden Interphasekerne (Interphasekerne mit 1 Signal und 3 Signalen) bestand statistisch kein signifikanter Zusammenhang ($\rho=0,17$, $p\text{-Wert}=0,263$).

Betrachtete ich in meinen Ergebnissen die Interphasekerne mit einem Signal, so zeigt sich kein Zusammenhang zum Alter ($\rho = 0,094$, $p = 0,552$). Interphasekerne mit einem Signal, also 45,X, kommen bei allen Patientinnen vor, unabhängig vom Alter. Bei 18 Patientinnen fand sich ein Anteil von 2%, bei 9 Patientinnen von 1% hypoploide Interphasekerne. Von den 5 Patientinnen mit 4% und mehr Anteil 45,X-Interphasekerne, gehörten 2 sogar zu den jüngsten Patientinnen der untersuchten Gruppe (Abb. 3.18).

In der Metaphasediagnostik stellt sich eine vergleichbare Situation dar: Zwischen dem Alter der Patientinnen und der Summe gonosomal-aneuploider Mitosen (45-X und 47-XXX) fand sich nur ein mäßig signifikanter Zusammenhang ($\rho = 0,33$, $p = 0,031$). Betrachte ich hingegen nur die gonosomal-hypoploiden Mitosen (45-X), fand sich kein signifikanter Zusammenhang mehr ($\rho = 0,249$, p -Wert = 0,111).

Dieser fehlende Alterseffekt der X-chromosomalen Hypoploidien könnte bei erster Betrachtung im Kontrast stehen zur Literatur:

Russell et al. (2007) fanden in ihrer Studie an 655 Patientinnen mit oder ohne bekannten habituellen Aborten eine deutliche Altersabhängigkeit der auch schon bei jungen Patientinnen vorhandenen gering ausgeprägte Zelllinie mit 45,X in Lymphozytenkulturen. Es sei kein Zusammenhang gefunden worden zwischen der Schwangerschaftsanamnese in Bezug auf Aborte und der Ausprägung dieser Zelllinie. Daraus schließen sie, dass es keinen Zusammenhang geben könne zwischen habituellen Aborten und gonosomalen Mosaiken in Lymphozytenkulturen.

Diesen Rückschluss möchte ich in zwei Punkten hinterfragen: Wie ich oben beschrieben habe, besteht kein Zweifel daran, dass Aneuploidien auf verschieden Weisen entstehen: Durch Anaphase-Lag entstehen Hypoploidien und durch Nondisjunktion entstehen Hypo- und Hyperploiden. Es wurde in dieser häufig zitierten Studie von Russell et al. (2007) jedoch die Häufigkeit von Zelllinien mit 47,XXX oder höhergradig hyperploiden Lymphozyten nicht gezählt. Daher erscheinen für mich Rückschlüsse auf eine Alterskorrelation nicht mehr möglich, denn es kann so nicht differenziert werden, ob ein Teil der hypoploiden Zelllinien

nicht auch durch Nondisjunktion entstanden ist und für diesen Anteil der hypoploiden Zelllinie eine andere Alterskorrelation gegeben ist als für den durch Anaphase-Lag entstandenen Anteil.

Nur durch die zusätzliche Berücksichtigung des Auftretens hyperploider Zellen wären unterschiedliche Alterskorrelationen von Verlust und Gewinn von X-Chromosomen zu erkennen gewesen, diese können nicht von vornherein ausgeschlossen werden.

Zweitens fällt an der Studie auf, dass sich in der Gruppe mit „habituellen Aborten“ auch Patientinnen mit nur einem Abort in der Vorgeschichte befanden. Daher ist eine Korrelation mit habituellen Aborten nicht gerechtfertigt, da die WHO-Definition habitueller Aborte nicht erfüllt wird.

Zusammengenommen ist daher aus meiner Sicht nicht belegt, dass die von den Autoren gefundenen Ergebnisse für einen fehlende Zusammenhang von X-chromosomal aneuploiden Lymphozyten und habituellen Aborten sprechen.

In einer der weiteren häufig zitierten Studie zu dem Thema „X-Chromosomale Verluste und habituelle Aborte“ von Guttenbach et al. (1995), berichten diese Autoren ebenso wie Rusell et al. (2007) von einem klaren Anstieg des Verlustes von X-Chromosomen mit dem Alter. Sie zählten 1.000 Lymphozyten bei 90 Frauen. Trotz verschiedener statistischer Berechnungen kommen die Autoren zu dem Ergebnis, dass der altersbedingte Anstieg von 45,X in Lymphozyten erst ab dem 50. Lebensjahr stattzufinden scheine. Aber auch sie zählten keine Zellen mit mehr als zwei Signalen, so dass Aussagen über möglicherweise verschiedene zugrundeliegende Mechanismen (Anaphase-Lag und Nondisjunktion) nicht getroffen werden können.

Weiterhin halte ich an der Studie von Guttenbach et al. folgendes für bedenkenswert: Sollte generell X-chromosomale Aneuploidie von Lymphozyten in einen Zusammenhang gebracht werden zu der Aneuploidie von Keimzellen und Embryogenese, so wäre das Alter ab 50 Jahren schon weit über dem Zeitraum, ab dem allgemein ein Anstieg von Nondisjunktion-bedingten Aneuploidien, also auch der Verlust von X-Chromosomen, als erwiesen gilt.

So stellt sich die Frage, warum in der Studie von Guttenbach et al. (1995) dieser allgemein unstrittige altersbedingte Anstieg von Hypoploidien durch Nondisjunktion erst weit über der genannten Altersgrenze signifikant wird.

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse meiner eigenen Untersuchung finde ich dafür folgende Erklärungsmöglichkeit:

Der von den Autoren gefundene und erst ab dem 50. Lebensjahr signifikante Anstieg könnte sich daraus ergeben haben, dass es neben dem altersbedingten Verlust durch Nondisjunktion auch den hier beschriebenen altersunabhängigen Verlust von X-Chromosomen durch Anaphase-Lag gab, der entsprechend alle Altersgruppen der Studie betraf und der sich mit dem Effekt der altersbedingten Nondisjunktion vermischte und diesen insoweit (rechnerisch) überdeckte, dass letzterer erst in den höheren Altersgruppen als signifikant nachweisbar wurde. Dieses Denkmodell habe ich jedoch nicht mathematisch überprüft.

In meiner Arbeit konnte ich keinen Hinweis auf eine Alterskorrelation für den Verlust von X-Chromosomen feststellen. Erst dadurch, dass ich anders - als die Autoren Guttenbach et al. und Russel et al. - gleichzeitig Verlust und Hinzugewinn von X-Chromosomen untersucht habe, ist eine Differenzierung von Alterseffekten auf Zugewinn und Verlust möglich gewesen.

Diese differenzierte Betrachtung der Aneuploidien folgt auch den wachsenden, wenn auch weiterhin noch sehr rudimentären Erkenntnissen über zugrundeliegende Mechanismen von Anaphase-Lag, das möglicherweise vor allem durch bestimmte Unterformen der Merotelie verursacht sein könnte (Thompson und Compton, 2011).

Daneben ergeben sich wie schon erwähnt Fragen über die Mechanismen der X-Inaktivierung, die in der schon genannten Studie von Machiela et al. (2016) bevorzugt das inaktive X-Chromosom betrafen.

4.3.2 Alterskorrelation X-chromosomaler Hyperploidien

Die Korrelation zwischen Trisomien und Alter ist seit Jahrzehnten bekannt (Hassold und Hunt, 2009, neben vielen anderen Autoren).

Für die Entstehung der 47,XXX-Zelllinien wird in der Literatur im Wesentlichen Nondisjunktion als Ursache gesehen - im Gegensatz zur Entstehung der 45,X-Zelllinien, die einerseits durch Anaphase-Lag und andererseits durch Nondisjunktion entstehen können.

Im Gegensatz zu den im vorigen Abschnitt diskutierten Befunden für die 45,X-Zelllinien, für die keine Alterskorrelation bestand, fand ich die X-chromosomal hyperploide Interphasekernen mit drei Signalen hochsignifikant häufiger bei den älteren Patientinnen ($\rho = 0,400$, $p = 0,009$).

Für die 47,XXX-Mitosen ließ sich ein noch deutlicherer Zusammenhang mit dem Alter der Patientinnen finden. ($\rho = 0,438$, $p = 0,004$).

Bei einer der beiden 40jährigen Patientinnen fand sich in einer der 100 ausgewerteten Mitosen eine mit 49,XXXXX.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit der Literatur zu diesem Thema in den letzten Jahrzehnten. Die von Hsu et al. (1972) geäußerten Vermutungen über die Bedeutungen hypo- und hyperploiden X-chromosomale Mosaiken im Zusammenhang mit ovariellen Funktionsstörungen, Alter und einer mitotischen Instabilität, die zu Nondisjunktion führen könne, werden in den letzten Jahren durch fundierte wissenschaftliche Erkenntnisse über zelluläre Alterung und Zellteilung gestützt. Diese sind die Zusammenhänge von Erbmaterial auf den X-Chromosomen und der Steuerung ovarieller Funktionen, von X-chromosomalen Mosaiken und prämaturer Ovarialinsuffizienz und die über die Rolle der Telomere auch in Lymphozyten bei den Besonderheiten der Alterung von Eizellen:

Kline et al. (2000) kamen durch ihre Untersuchungen zu dem Schluss, dass Schwangerschaften mit Trisomien mit einem früheren Eintritt der betroffenen Mütter in die Menopause korrelieren aufgrund eines schwindenden Oozyten-Pools oder eines damit in Zusammenhang stehenden Rückgangs der Anzahl an Oozyten. Dadurch sei dann entsprechend auch die Alterskorrelation der Aneuploidien zu

erklären, die Ausdruck sei des biologischen, aber nicht des chronologischen Alters, bzw. Alterns.

Vekemans (2006) berichtete, der rapide Anstieg von Trisomien beginne um das 35. Lebensjahr der Mütter. So fänden sich bei 20jährigen Müttern in 2% aller klinisch bemerkter Schwangerschaften eine Trisomie, bei den über 40jährigen hingegen seien es schon 35%. Darüber hinaus zeige sich dieser Alterseffekt auch nochmals unterschiedlich in Bezug auf die betroffenen Chromosomen: ausgeprägt bei der Trisomie der kleinen Chromosomen und fehlend bei den großen. Außerdem läge für die Trisomie 16 eine interessante Ausnahme vor, hier sei keine exponentielle Alterskorrelation zu sehen, sondern die einzige mit einem linearen Altersverlauf.

Zur Alterskorrelation berichtet er von dem Modell, dass mindestens zwei Ereignisse für die Entstehung der altersbedingten Trisomie notwendig seien. Das erste sei eigentlich altersunabhängig, nämlich die Entwicklung anfälliger Bivalente in den Ovarien des Fötus und das zweite Ereignis sei altersabhängig, nämlich das gestörte Verhalten dieser Bivalente in der Metaphase I im Ovar der erwachsenen Frau. Dieses wiederum sei zurückzuführen auf entweder Fehler der Oozytenreifung, einer Störung des hormonellen Milieus oder eine Veränderung der für die Chromosomentrennung verantwortlichen Proteine und Zellapparate.

Keefe, Liu und Marquard stellen in ihrem Artikel aus dem Jahr 2007 dar, warum sie den Telomeren eine Schlüsselstellung zuschreiben in dem Prozess, der ausgehend vom steigenden mütterlichen Alter zu einer nachlassenden Fruchtbarkeit, Aborten oder Neugeborenen mit Aneuploidien führt. Damit präzisieren sie auch Ansatzpunkte für Erklärungen für den Unterschied zur stabileren, altersunabhängigeren Keimzellbildung bei Männern, nämlich die Telomeraseaktivität in den Stammzellen. Experimentelle Studien hätten gezeigt, dass die absolute Länge der Telomere in Oozyten in einem positiven Zusammenhang stehe zur zu erwartenden Schwangerschaftswahrscheinlichkeit. Dieser Parameter sei in seiner Vorhersagefähigkeit sogar höher anzusiedeln, als das Alter der Mütter (Keefe und Marquard 2007).

Hulten et al. (2008) formulieren ebenfalls, aus ihrer Sicht würden die Erschöpfung des Oozytenpools, Störungen der Chromosomen-Kohäsion, Störungen des Spindelapparates, die Störung dessen Anlagerung, oder fehlerhafte Spindelcheckpoints die wesentlichen Faktoren sein, mit denen die Alterskorrelation des Nondisjunktion-Risikos einherginge.

Sancken et al. (2010) berichten, es müsse von chromosomenspezifischen Entstehungsprozessen der Aneuploidien ausgegangen werden, so lägen Ursachen teils in der Meiose I, teils in der Meiose II. Auch scheine es „anfällige“ Chromosomen zu geben und auch die Korrelation zum Alter zeige unterschiedliche Muster. Die Entstehung aneuploider Zygoten sei den aktuellen Studien nach zurückzuführen auf die Reifung aneuploider und damit „belasteter“ Eizellen, die erst im Zusammenhang mit der anstehenden Menopause heranreifen würden. Diese Reifung der aneuploiden Eizellen sei ein Vorbote der Menopause in einem feststehenden zeitlichen Ablauf: Die Anzahl der Oozyten bestimme den Zeitpunkt der Menopause, nicht das chronologische Alter. Der Anstieg des Aneuploidie-Risikos finde somit auch zu unterschiedlichen, nämlich individuellen Zeitpunkten statt.

Kurahashi et al. (2012) sehen in dem Verlust von Cohesin zwischen den homologen Chromosomen in der langen Prophase der Meiose I einen wesentlichen Faktor des mütterlichen altersabhängigen Aneuploidie-Risikos durch dadurch begünstigte Nondisjunktion- und Predivison-Ereignisse. Schwer erklärbar sei aber weiterhin, warum unter anderem das X-Chromosom besonders von diesem altersabhängigen Effekt betroffen sei.

Handyside et al. (2012) beschreiben als Risikofaktor für Aneuploidien die gestörten oder verminderten Rekombinationen zwischen den Schwesterchromosomen und -chromatiden. Weiter erwähnen sie in dem Zusammenhang dieser Rekombinationsstörungen drei abgrenzbare Stadien in der Entwicklung der weiblichen Eizelle/Gameten: Zunächst eine pränatale Phase, in der die Rekombination beeinflussbar ist vor dem Arrest in der Prophase der Metaphase-I, danach altersabhängige Veränderungen während der Follikelreifung und

abschließend die Wiederaufnahme und der Abschluss der Meiose unmittelbar vor der Ovulation und Befruchtung, was auch noch Jahrzehnte später stattfindet.

Kalmbach et al. (2013) erweitern den Blick auf die Telomere: sie weisen auf den Zusammenhang von Telomerlänge und Langlebigkeit hin und den Zusammenhang von Langlebigkeit und einem erst später eintretenden Verlust der Fruchtbarkeit bei Frauen. Die nachteiligen Effekte gealterter Eizellen, wie verminderte Anzahl an Chiasmata, vermehrter meiotischer und mitotischer Nondisjunktion, Spindeldysmorphologie und Fehlgeburten, ließen sich vollständig ausgleichen, wenn den älteren Frauen Eizellen jüngerer Frauen gespendet würden. Die Verkürzung der Telomere in den Eizellen beginne schon während der fötalen Eizellentwicklung. Später im Leben, während der Phase der nachlassenden Fruchtbarkeit, fänden sich deutliche Korrelationen zwischen Telomerlänge und einerseits Aneuploidie der Embryonen und andererseits prämaturer Ovarialinsuffizienz. Sie weisen auch darauf hin, dass die Telomerlänge in Lymphozyten mit dem Reproduktionsalter und auch mit dem Auftreten von habituellen Aborten oder Trisomien korreliere.

Die genannten Erkenntnisse aus diesen Studien zeigen, dass die Steuerung von meiotischer und mitotischer Zellteilung ein hoch komplexer Prozess ist, der auf unterschiedlichen zellulären und molekularen Ebenen fehleranfällig ist. Dazu passen meine Ergebnisse, die zeigen, dass Verlust und Zugewinn von X-Chromosomen Unterschiede in ihrer Alterskorrelationen haben und entsprechend differenziert betrachtet werden müssen.

Nach dem gegenwärtigen Stand der Wissenschaft sind denkbare Grundlagen für die unterschiedliche Alterskorrelationen von Anaphase-Lag und Nondisjunktion jeweils verschiedene oder verschieden ausgeprägte Steuerungsmechanismen, zum Beispiel auf Ebene der Telomere oder auch des Cohäsins sowie im Zusammenhang mit der X-Inaktivierung.

4.3.3 Verhältnisse von hypoploiden zu hyperploiden Interphasekernen, Mitosen und Zellreihen bei den gemischten Mosaiken

Im folgenden Abschnitt gehe ich ein auf das Verhältnis von hypoploiden zu hyperploiden Interphasekernen und Mitosen sowie die Zusammensetzung der in den Lymphozytenkulturen gefundenen Mosaiken, die ein weiterer Hinweis sein können auf unterschiedliche Entstehung und Alterskorrelation von Hypo- und Hyperploiden von X-Chromosomen.

Gemischte Mosaiken mit 45,X/46,XX/47,XXX bei den Mitosen oder einem, zwei und drei Signalen in den Interphase-Kernen lagen wie erwähnt bei 8 Patientinnen in der Metaphasediagnostik und bei 14 Patientinnen in der Interphasediagnostik vor.

In der Interphase-Diagnostik fand sich bei 6 Patientinnen ein Überwiegen der hypoploiden Zellreihe mit einem Signal über die hyperploide Zellreihe mit drei Signalen. Ein ausgeglichenes Verhältnis von gonosomal-aneuploiden Zellreihen fand ich bei 5 Patientinnen und bei 3 Patientinnen überwog die hyperploide Zellreihe.

In der Metaphasediagnostik war bei den Mosaiken ein Überwiegen der 45,X-Linie über die 47,XXX-Linie bei 3 Patientinnen zu finden, ausgeglichen war die Ausprägung bei 4 Patientinnen und bei nur einer Patientin fanden sich mehr Mitosen mit 47,XXX als Mitosen mit 45,X.

Dieser Trend eines Überwiegens der hypoploiden Zelllinien passt zu Befunden, die Pellestor et al. in einem Review zeigten (Pellestor et al. 2005). In 33 zytogenetischen Untersuchungen mit Chromosomen-Fixation nach Tarkowski habe die durchschnittliche Rate an Chromosomenaberrationen bei 35,9% gelegen, wobei 26,4% Aneuploidien gewesen seien, darin enthalten 15,5% Hypoploidien, 7,3% Hyperploiden, 3,6% komplexe Aneuploidien. In diesen Studien gab es große Abweichungen in Bezug auf Art und Ausprägung der Aberrationen, die sich den Autoren nach mit der geringen Anzahl der jeweils untersuchten Oozyten erklären ließen.

Auch sahen sie ein bis zu dreifaches Überwiegen der Hypoploidien in der Tarkowski-Fixation begründet, die den artifiziellen Verlust von Chromosomen

begünstige. Auf die Möglichkeit, dass hier Anaphase-Lag zugrunde liegen könnte, wird von den Autoren nicht eingegangen.

In der bereits erwähnten Studie untersuchten Machiela et al. (2016) bei 38.303 Frauen die Single-Nucleotide-Polymorphism-Microarray-Intensität und fanden bei 97 Frauen insgesamt 124 X-chromosomale Mosaikformen mit einer Größe über 2Mb. Es fanden sich wie erwähnt 59 hypoploide und 22 hyperploide Mosaikformen, vorwiegend war das inaktivierte X-Chromosom betroffen.

Die Autoren sehen in diesen Befunden einen möglichen Ausdruck chromosomenspezifischer Mechanismen der Replikation oder auch des alterskorreliert nachlassenden Schutzes vor DNA-Schäden. (Machiela, M.J. et al. 2016).

Die genannten Befunde zeigen ebenso wie meine Ergebnisse ein Überwiegen der hypo- im Vergleich zu den hyperploiden Mosaiken.

Die Betrachtung der Mosaikformen hinsichtlich der Ausprägung von hypoploiden und hyperploiden Zelllinien führt also zu Ergebnissen, die mit dem gleichzeitigen Auftreten von Nondisjunktion und Anaphase-Lag vereinbar wären: Es zeigt sich ein tendenzielles Überwiegen der hypoploiden Zelllinien, da diese zusätzlich durch Anaphase-Lag entsteht, wobei Nondisjunktion als alleinige Ursache der Aneuploidien zu ausgeglichenen Werten führen müsste.

4.4 X-Chromosomale Mosaik und habituelle Aborte

Wie schon in der Einleitung erwähnt, besteht in der von mir gesichteten Literatur kein Konsens in der Frage, wie die gering ausgeprägten gonosomalen Mosaik in Lymphozytenkulturen zu bewerten sind. Es werden verschiedene cut-off-Werte berichtet, die zwischen „echten“ und „low-level“-Mosaiken unterscheiden sollen (z.B. Kuo und Guo, 2004). Es existiert aber auch keine allgemeine Definition, unterhalb welcher Grenze X-chromosomale Mosaik als nicht pathogen zu sehen sind.

In meinen Untersuchungen konnte ich neben der gonosomal euploiden Zelllinie 46,XX bei 18 der 42 Patientinnen in Metaphasendiagnostik (43%) und bei 34 der 42 Patientinnen in der Interphasediagnostik (80%) eine oder zwei X-chromosomal aneuploide Zelllinien finden, so dass dem Analyseergebnis nach ein Mosaik vorlag. Je nach Kombination der Zelllinien waren diese Mosaik euploid-hypoploid, euploid-hyperploid oder gemischt euploid-hypoploid-hyperploid.

Bei den euploid-hypoploiden Mosaiken fand sich neben der anteilig absolut überwiegenden Zellreihe mit 46,XX oder 2 Signalen, eine meist sehr gering ausgeprägte Zellreihe mit 45,X oder einem Signal. Bei den euploid-hyperploiden Mosaiken lag entsprechend eine zweite Zellreihe vor mit 47, XXX, bzw. 3 Signalen. Bei den gemischten, euploid-hypoploid-hyperploiden Mosaiken fanden sich schließlich alle drei Zellreihen.

In der Interphasediagnostik fand sich in der Mehrzahl der Fälle neben den X-chromosomal euploiden Zellen eine geringgradig ausgeprägte gonosomal-hypoploide Zellreihe, nämlich bei 19 der 42 Patientinnen (45%). Diese Konstellation war häufiger als rein euploide Lymphozyten-Kulturen, die sich in der Interphasediagnostik nur bei acht Patientinnen finden ließ. Bei 14 Patientinnen fanden sich Interphase-Kerne mit einem, zwei und drei Signalen, also euploid-hypoploid-hyperploid gemischte Mosaik und bei einer Patientin fand sich neben den euploiden Interphase-Kernen lediglich eine gonosomal-hyperploide Zellreihe.

In der Metaphasendiagnostik waren bei den meisten, nämlich 24 von 42 Patientinnen nur euploide Zellen zu finden, entsprechend 57%. Jedoch waren

auch hier alle drei Mosaiktypen vertreten. Bei sieben Patientinnen fanden sich neben den gonosomal-euploiden auch hypoploide Mitosen und ebenfalls bei sieben Patientinnen hypo- und hyperploide Mitosen. Bei vier Patientinnen fanden sich neben den euploiden Mitosen gonosomal-hyperploide Mitosen mit drei X-Chromosomen.

Bei 5 Patientinnen fanden sich in der Metaphasediagnostik und in der Interphasediagnostik aneuploide Zelllinien, die jeweils einen Anteil von 4% und mehr hatten.

Beim Vergleich der Werte lässt sich in Abbildung 3.15 erkennen, dass die Werte für die aneuploiden Interphase-Kerne und Mitosen stark übereinstimmen.

Daneben fällt auf, dass diese fünf Patientinnen auch zu den ältesten in der untersuchten Patientinnen-Gruppe gehörten.

Diese Ergebnisse sind im folgenden Kontext zu sehen:

Durch Nondisjunktion und Anaphase-Lag in der frühen Embryogenese können Mosaik mit einem höheren prozentualen Anteil entstehen, erfolgen Nondisjunktion oder Anaphase-Lag zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt oder auch postnatal, fällt der prozentuale Anteil innerhalb des betroffenen Organismus entsprechend geringer aus (Wise et al.2009).

Mosaik der Geschlechts-Chromosomen sind in vielen Studien mit habituellen Aborten in Zusammenhang gebracht worden (Hsu et al.1972, Kim et al.1975, Dewhurst 1978, Singh et al.1980, Ward et al.1980, Hecht 1982, Hecht et al.1984, Diedrich et al.1983, Staessen et al.1983, Holzgreve et al.1984, Tharapel et al.1985, Sachs et al.1985, Bourrouillou et al.1986, Toncheva et al.1994, Cook und Pridham 1995, Linden et al.1996, Kuo und Guo 2004).

Bereits Dewhurst (1978), Singh et al. (1980) und Tharapel et al. (1985) wiesen auch auf einen möglicherweise erhöhten Anteil chromosomal geschädigter Nachkommen dieser Patientinnen hin.

1972 formulierten Hsu et al. die Vermutung, dass X-chromosomale Mosaik Zeichen einer mitotischen Instabilität seien und es auch Hinweise gäbe auf

ovarielle Funktionsstörungen bei den betroffenen Frauen. Hecht et al. (1982, 1984) sahen die X-Chromosomalen Mosaik als Ausdruck eines erhöhten Nondisjunktion-Risikos.

In ihrer prospektiven Studie an 720 Patientinnen mit habituellen Aborten fanden Kuo und Guo (2004) bei 23 ein gonosomales Mosaik. Aufgrund der gefundenen Ausprägungen der aneuploiden Zelllinien, legten die Autoren einen Cut-Off-Wert fest von 3% für 45,X und 2% für 47,XXX-Zellen. Die hypohaploiden 45,X-Linien überwogen sowohl in der Kontroll- als auch in der Mosaik-Gruppe. Im Vergleich zu den Kontrollen fanden sich in der Patientinnengruppe mehr aneuploide Zelllinien. Dabei zeigten zwei Patientinnen nur ein 45,X/46,XX-Mosaik, 14 ein 45,X/46,XX/47,XXX-Mosaik und zwei ein 46,XX/47,XXX-Mosaik. Als Risikofaktoren der Mosaik-Gruppe werteten die Autoren die Kriterien einer DOR (Diminished Ovarian Reserve), also prämaturnen Ovarialinsuffizienz im Sinne eines erhöhten FSH und Uterusfehlbildungen. Für die Patientinnen mit gonosomalen Mosaiken wurde eine Abortrate von 44,1% gefunden, wenn keine DOR vorlag und eine Abortrate von 68,6% mit DOR.

Die Risikofaktoren DOR und Uterusfehlbildungen werden von den Autoren in Zusammenhang gebracht mit den 45,X-Zelllinien. Beides seien für das Turner-Syndrom typische Veränderungen in schwacher Ausprägung.

Als weiteren Zusammenhang zwischen den habituellen Aborten und einem gonosomalen Mosaik sehen die Autoren die Möglichkeit einer 45,X-Zelllinie in den Ovarien und damit zusammenhängenden Funktionsstörungen in Analogie zu Frauen mit Turner-Syndrom. Auch die 47,XXX-Zelllinien seien mit einer verschlechterten Oozytenqualität in Zusammenhang zu bringen. Dafür formulieren die Autoren drei Hypothesen: Aberrante Chromosomenpaarung mit vorzeitigem Keimzelltod, Störungen der Oozytenqualität durch fehlerhafte Genprodukte oder als dritte Hypothese, dass X-chromosomale Mosaik Ausdruck seien einer gestörten Regulation der Chromosomenteilung mit nachfolgender Nondisjunktion. Die zugrundeliegende Störung innerhalb der Steuerung von Meiose und Mitose führe dann zu Schädigungen der Gonaden, zu aberranten

Meiosen und Atresie der Oozyten. So hätten dann die betroffenen Frauen mit gonosomalen Mosaiken eine vorzeitige Menopause und habituelle Aborte.

Voigt et al. (2004) fanden unter 891 Patientinnen in einer Studie an Paaren vor ICSI aufgrund von Infertilität der männlichen Partner bei 35 Frauen (3,93%) ein gering ausgeprägtes X-chromosomales Mosaik, jedoch kam es bei dieser Patientinnengruppe nicht zu schlechteren Ergebnissen in Bezug auf die im weiteren Behandlungsverlauf geglückten Schwangerschaftsraten. Bei der Vergleichsgruppe von 294 Frauen mit habituellen Aborten fanden sich bei 25 (8,5%) gonosomale Mosaik. Diese signifikant höhere Rate bringen die Autoren in einen Zusammenhang zu chromosomalen Aneuploidien durch Nondisjunktion.

Homer et al. (2010) berichten in ihrer klinischen Studie über 71 Patientinnen mit 45,X/46,XX-Mosaiken. Ab einem prozentualen Anteil von 6% der gonosomalen Aneuploidie, seien klinische Zeichen des Turner-Syndroms gefunden worden wie eine geringere Körperlänge, sowie eine Korrelation von BMI und Ausprägungsgrad des Mosaiks. Keinen Zusammenhang fanden die Autoren zur Funktion und Reserve der Ovarien. Aber es fand sich ein Zusammenhang mit Aborten im ersten Trimenon.

Der Anteil X-chromosomaler Mosaik bei Frauen mit habituellen Aborten wurde sehr unterschiedlich von 0,1% (Bourrouillou et al.1986) bis 10% (Hecht et al.1984) für größere Patienten-kollektive angegeben.

In der Allgemeinbevölkerung fanden Guttenbach et al. 1995 einen Anteil von 3,1 % Frauen mit einer 45,X-Zelllinie.

Wie die Arbeiten von Kuo und Guo (2004), Homer et al. (2010) sowie Gersak und Veble (2011) zeigen, besteht Anlass zur Vermutung, dass als Folge der X-chromosomalen Mosaik oder aufgrund gemeinsamer zugrundeliegender Regulationsstörungen, Störungen der ovariellen Funktion wie prämatüre Ovarialinsuffizienz bestehen und diese mit einem erhöhten Risiko für chromosomale Aberrationen in Embryonen einhergehen, die als habituelle Aborte klinisch auffallen.

In meiner Arbeit konnte ich diese X-chromosomalen Mosaik auch in den untersuchten Lymphozytenkulturen der Frauen mit habituellen Aborten nachweisen.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht Ausprägungsgrad und Alterskorrelation X-chromosomaler Aneuploidien in Lymphozytenkulturen von 42 Patientinnen, die mit der Diagnose "Habituelle Aborte" im Zeitraum von März 1993 bis Februar 1995 zur zytogenetischen Untersuchung und humangenetischen Beratung der Abteilung für Zytogenetik des Humangenetischen Instituts der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf überwiesen wurden. Die angewandte Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit einer alpha-Satelliten DNA-Sonde für den Locus DXZ1 (X-Zentromer), modifiziert die von Bartsch et al. (1991). Die Auswertung von jeweils 100 Mitosen und 100 Interphasekernen auf das Vorliegen X-chromosomaler Aneuploidien erfolgte zwischen April 1994 und Februar 1995 an einem Fluoreszenz-Photomikroskop (Zeiss, Leitz). Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Vorzeichentest und der Berechnung des Spearmanschen Korrelations-Koeffizienten.

Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl gonosomal-aneuploider Interphasekerne und Mitosen ($\rho = 0,6$, $p = 0,001$) und eine signifikante Alterskorrelation der gonosomal-hyperploiden (47-XXX) Mitosen ($\rho = 0,438$, $p = 0,004$) und Interphasekerne mit 3 Signalen ($\rho = 0,400$, $p = 0,009$), aber keine Alterskorrelation der gonosomal-hypoploiden (45-X) Mitosen ($\rho = 0,249$, $p = 0,111$) und Interphasekernen mit 1 Signal ($\rho = 0,094$, $p = 0,552$).

Wie in der Literatur beschrieben (Pellestor et al., 2005, Machiela et al., 2016), zeigte sich ein tendenzielles Überwiegen der hypoploiden Zelllinien. Während Nondisjunktion als alleinige Ursache zu ausgeglichenen Werten führen müsste (Zijno et al. 1996, Wise et al. 2009), könnte Anaphase-Lag die Erklärung für das Überwiegen der hypoploiden Zelllinien sein.

Die vorliegenden Ergebnisse stützen Hypothesen, dass Anaphase-Lag eine altersunabhängige Ursache von gonosomalen Hypoploiden ist (Sancken, Burfeind und Engel, 2005; Warbuton et al., 1980), während Nondisjunktion altersabhängig Hypo- und Hyperploiden verursacht (Hassold und Hunt, 2009; Madan und Lundberg, 2015). In meiner Arbeit konnte ich keinen Hinweis auf eine Korrelation für X-Chromosomen-Verlust und Alter feststellen. Dies widerspricht den häufig zitierten Studien der Autoren Guttenbach et al (1994) und Russel et al. (2007). Im Gegensatz zu diesen Autoren wurde in meiner Studie neben Verlust

auch Hinzugewinn von X-Chromosomen beachtet. Erst dadurch wurde eine Differenzierung von Alterseffekten auf Zugewinn und Verlust möglich.

Aktuelle Empfehlungen zur Bewertung X-chromosomaler Mosaik innerhalb genetischer Beratungen, wie zum Beispiel von Kuo und Guo (2004) und Madan und Lundberg (2015), beruhen auf den genannten Studien, die keine Differenzierung der Alterseffekte vorgenommen haben. Meine Ergebnisse stimmen überein mit aktuellen Forschungsergebnissen zu X-Inaktivierung, Cohäsion oder Merotelie, dass möglicherweise sehr unterschiedliche Ursachen mit entsprechend unterschiedlichen Alterskorrelationen für Nondisjunktion und Anaphase-Lag der X-Chromosomen verantwortlich sind (Keefe und Marquard, 2007; Thompson und Compton, 2011; Kalmbach et al., 2013).

Während weitere Studien dazu notwendig sind, sollten die Handlungsempfehlungen zur genetischen Beratung diesen wachsenden Wissensstand berücksichtigen und die Hinweise auf unterschiedliche Alterskorrelationen von Nondisjunktion und Anaphase-Lag berücksichtigen.

5.1 Summary

This study explores severity and age correlation of x-chromosomal aneuploidy in lymphocyte cultures of 42 female patients who presented between March 1993 and February 1995 with diagnoses of habitual abortions for cytogenetic examination and genetic counseling to the Cytogenetics Department of the Hamburg-Eppendorf University Medical Center's Institute of Human Genetics. The fluorescence in-situ hybridization procedure with an alpha-satellite DNA probe for the DXZ1 locus (the chromosome x centromere) employed in this study modifies the technique described by Bartsch et al. (1991). 100 mitoses and 100 interphase nuclei were examined using a fluorescence photomicroscope (Zeiss, Leitz). Statistical analysis was performed by employing the sign test and determining Spearman correlation coefficients. There was a significant correlation between the number of interphase nuclei that showed gonosomal aneuploidy and the number of mitoses ($\rho=0.6$, $p=0.001$), and there was a significant correlation with the patients' age both in the rate of mitoses with 47-XXX gonosomal hyperploidy ($\rho=0.438$, $p=0.004$) and in the number of interphase nuclei with 3 signals ($\rho=0.400$, $p=0.009$). There was no correlation with the patients' age, however, in the number of mitoses with 45-X gonosomal hypoploidy ($\rho=0.249$, $p=0.111$) nor in the number of interphase nuclei with 1 signal ($\rho=0.094$, $p=0.552$). As described in the literature (Pellestor et al. 2005, Machiela-MJ et al. 2016), hypoploid cell lines tended to be prevalent. As nondisjunction alone would be expected to produce balanced numbers (Zijno et al. 1996, Wise et al. 2009), anaphase lag is a possible explanation for the prevalence of hypoploid cell lines. The results support hypotheses that state that anaphase lag is an age-independent mechanism of gonosomal hypoploidy (Sancken, Burfeind and Engel 2005; Warbuton et al., 1980) while nondisjunction is an age-dependent cause of hypoploidy and hyperploidy (Hassold und Hunt, 2009, Madan und Lundberg, 2015). This study did not find any indication of a correlation between X chromosome loss and ageing. This contradicts frequently cited studies by Guttenbach et al. (1994) and Russel et al. (2007). In contrast to these authors,

however, this study examined not only the loss, but also the gain of X chromosomes, facilitating a differentiation of age effects on both loss and gain of X chromosomes. The current guidelines for genetic counseling in situations of X chromosome mosaicism (e. g., Kuo and Guo 2004; Madan and Lundberg 2015) rely on studies that did not differentiate age effects. However, the results of this study agree with current research on X-inactivation, cohesin or merotelic attachment that very different causes with correspondingly different age dependencies may be responsible for nondisjunction and anaphase lag of X chromosomes (Keefe and Marquard 2007; Thompson and Compton 2011; Kalmbach et al. 2013). While more research is warranted, genetic counseling guidelines should incorporate this growing body of research and reflect these indications of different age effects on different X chromosome pathologies.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
aPTT	Aktivierete partielle Thromboplastinzeit
BMFSFJ	Bundesministerium für Familie Senioren Frauen und Jugend
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serum-Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
DNA	Desoxyribonucleic acid
DOR	Diminished ovarian reserve
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Et al.	Et alia
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GWAS	Genome-wide association study
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HLA	Human Leukocyte Antigen
IVF	In vitro Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
Mb	Mbp, Mega base pairs
NIPT	Noninvasive prenatal testing
POF	Premature Ovarian Failure
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Saline sodium citrate
TSH	Thyreoida stimulierendes Hormon
UKE	Universitätskrankenhaus Hamburg Eppendorf

7. Literaturverzeichnis

Baronchelli-S, Conconi-D, Panzeri-E et al.: Cytogenetics of premature ovarian failure: an investigation on 269 affected women: *J of Biomedicine and biotechnology*(2011)Article ID 370195, doi:10.1155/2011/370195

Bartsch-O, Schwinger-E: A simplified protocol for fluorescence in situ hybridization with repetitive DNA probes and its use in clinical cytogenetics; *Clinical Genetocs*(1991);40:47-56

Benn-P, Cuckle-H, Pergament-E: Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol.* (2013);42(1):15-33. doi: 10.1002/uog.12513.

Berry-CW, Brambati-B, Eskes-TK, et al.: The Euro-Team Early Pregnancy (ETEP) protocol for recurrent miscarriage. *Hum Reprod.*(1995)10(6):1516-20.

Bourrouillou-G, Colombies-P, Dastugue-N: Chromosome studies in 2136 couples with spontaneous abortions; *Hum Genet* (1986)74:399-401

Bui-TH, Iselius-L, Lindsten-J: European collaborative study on prenatal diagnosis: mosaicism, pseudomosaicism and single abnormal cells in amnion fluid cell cultures; *Prenat.Diagn.*(1984)4,145-162

BMFSJ 2014, PDF-Anlagen: Geburten und Geburtenverhalten in Deutschland, September 2012, <https://www.bmfsfj.de/blob/75090/7a1ebb08b6be4f49607ad3bdbefda302/geburten-und-geburtenverhalten-in-d-data.pdf>. Stand: 27.08.2017, 12:00 Uhr.

Castle-D, Bernstein-R: Cytogenetic analysis of 688 couples experiencing multiple spontaneous abortions; *Am-J-Med-Gen* (1988)29:549-556

Christiansen-OB, Mathiesen-O, Lauritzen-JG et al.: Study of the birthweight of parents expiriencing unexplained recurrent miscarriages; *British-J-Obstet-Gynecol.*(1992)99,408-411

Chung-PH, Yeko-TR Recurrent miscarriage: causes and management; *Hosp Pract* (1995);31(5):157-64.

Clifford-K, Rai-R, Watson-H, Regan-L:An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum Reprod.* (1994);9(7):1328-32.

Cockwell-A, MacKenzie-M, Youings-S, et al.: A cytogenetic and molecular study of a series of 45,X fetuses and their parents; *J-Med-Genet.*(1991); 28: 151-155

Cook-CL, Pridham-DD: Recurrent pregnancy loss. *Curr Opin Obstet Gynecol.*(1995);7(5):357-66.

Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JC, et al.: Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos; Hum Reprod.(2004)19(2):316-24.

Coulam-CB : Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. Am-J-Reprod-Immunol. 1991; 26(1): 23-7

Cowchock-FS, Gibas-Z, Jackson-LG: Chromosome errors as a cause of spontaneous abortion: the relative importance of maternal age and obstetric history. Fertil Steril(1993)59(5):1011-4.

Cremer-T, Landegent-J, Brückner-A: Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84: Human Genetics(1986)74(4)346-352

Daphnis-DD, Delhanty-JDA, Jerkovic-S et al.: Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy: Hum Reprod(2005);20(1)129-137

De Braekeleer-M, Dao-TN: Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. Hum Reprod.(1990);5(5):519-28.

Del Fabro-A, Driul-L, Anis-O: Fetal gender ratio in recurrent miscarriage. International Journal of Women's Health(2011); 3:213-217

Dewhurst-Sir J: Fertility in 47,XXX and 45,X patients; J-Med-Genet (1978);15:132-135

Diedrich-U, Hansmann-I, Janke-D et al.: Chromosome anomalies in 136 couples with a history of recurrent abortions; Hum-Genet(1983)65:48-52

Ecker-JL, Laufer-MR, Hill-JA: Measurement of embryotoxic factors is predictive of pregnancy outcome in women with a history of recurrent abortion; Obstet-Gynecol (1993);81:84-87

Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, Williamson E, Wood PJ. Early embryonic mortality in women. Fertility and sterility 1982;38(4):447-453

Engreitz JM et al. The Xist lncRNA Exploits Three-Dimensional Genome Architecture to Spread Across the X Chromosome. DOI: 10.1126/science. Science (2013) 341: 1237973 1-8

Evans-MI, Henry-GP, Miller-WA, et al.: International, collaborative assessment of 146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used. HumReprod.(1999)14(5):1213-216.

Fernandez-R, Mendez-J, Pasaro-P : Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism;Hum-Genet (1996);98:29-35

Ferrier-PE, Ferrier-SA, Kelley-VC: Sex chromosomal mosaicism in disorders of sexual differentiation:

Incidence in various tissues; *J-Pediatr*(1970);76:739-744

Fertl-KI, Bergner-A, Beyer-R et al.: Levels and effects of different forms of anxiety during pregnancy after prior miscarriage: *ejogrb*(2009);142:23-29

Ford-JH, Schultz-CJ, Correll-AT: Chromosome elimination in micronuclei: a common cause of hypoploidy; *Am-J-Hum-Genet.*(1988);43:733-740

Garcia-Cruz-R, Casanovas-A, Brieno-Enriques-M et al.: Cytogenetic analyses of human oocytes provide new data on non-disjunction mechanisms and the origin of trisomy 16. *Hum. Reprod.* (2010) 25 (1): 179-191.

Geller-PA, Kerns-D, Klier-CM: Anxiety following miscarriage and the subsequent pregnancy. A review of the literature and future directions; *Journal of Psychosomatic research* (2004); 56: 35-45

Gersak-K, Veble-A: Low-level X chromosome mosaicism in women with sporadic premature ovarian failure: *Reproductive BioMedicine Online*; doi:10.1016/j.rbmo.2011.01.002

Gianaroli-L et al.: Predicting aneuploidy in human oocytes: key factors which affect the meiotic process; *Hum Reprod.* (2010); 25 (9): 2374-2386

Gravholt-CH, Juul-S, Weis Neraa-R et al.: Prenatal and postnatal prevalence of Turner's syndrome: a registry study; *British-Med-J* (1996);312:16-21

Gravholt-CH, Friedrich-U, Nielsen-J: Chromosomal mosaicism: a follow-up study of 39 unselected children found at birth; *Hum-Genet* (1991) 88: 49-52

Guttenbach-M, Schakowski-R, Schmid-M: Aneuploidie and aging: sex chromosome exclusion into micronuclei; *Hum-Genet*(1994)94: 295-298

Handyside-AH, Montag-M, Magli-MC et al.: Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilization; *Eur J Hum Genet.*(2012)20(7): 742-747

Hasegawa-I, Imai-T, Tanaka-K et al.: Studies on the cytogenetic and endocrinologic background of spontaneous abortion. *Fertility and Sterility*(1996)65(1):52-54

Hassold-T, Hunt-P: To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy: *Nature*(2001)2:280-291

Hassold-T, Hunt-P: Maternal Age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. *Curr.OpinPediatr.*(2009);21(6):703-708R203-208

Hassold-T, Hall-H, Hunt-P: The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics* (2007)16:R203-206

Hassold-T, Pettay-D, Robinson-A, et al.: Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptus; *Hum-Genet*(1992)89:647-652

Hecht-F: Unexpected encounter in cytogenetics: repeated abortions and Parenteral sex chromosome mosaicism may indicate risk of nondisjunction, Editorial: *Am-J-Hum-Genet*(1984)34:514-515

Hecht-F, Hecht-BK, Berger-CS: Aneuploidie in recurrent spontaneous aborters: the tendency to parenteral nondisjunction; *Clin-Genet*(1984)26:43-45

Held-KR, Kerber-S, Kaminsky-E, et al.: Mosaicism in 45,X Turner syndrom. does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes ?; *Hum-Genet*(1992)88:288-294

Højberg Gravholt-C, Juul-S, Weis Naeraa et al.: Prenatal and postnatal prevalence of Turner's syndrome: a registry study; *BMJ*(1996)312:16-21

Homer-L, Le Martelot-MT, Morel-F et al.: 45,X/46,XX mosaicism below 30% of aneuploidy: clinical implications in adult women from a reproductive medicine unit. *Eur J Endocrinol.* (2010);162(3):617-23. doi: 10.1530/EJE-09-0750. Epub 2009 Dec 8-

Holzgreve-W, Schonberg-SA, Douglas-RG et al.: X-chromosome hyperploidy in couples with multiple spontaneous abortions; *Obstet-Gynecol*(1984)63:237-240

Hook-EB : Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95%, and 99% confidence limits and comments on use: *Am-J-Hum-Genet*(1977),29:94-97

Hook-EB, Warbuton-D: The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism; *Hum-Genet*(1983)64:24-27

Horsmann-DE, Dill-FJ, McGillivray-BC, Kalousek-DK: X chromosome aneuploidy in lymphocyte culture from women with recurrent spontaneous abortions: *Am J Med Gen* (1987)28:981-987

Hopman-AH, Moesker-O, Smeets-AW, et al.: Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. *Cancer Res.* (1991);51(2):644-51.

Hsu-LYF, Perlis-TE: United states survey on chromosome mosaicism and pseudomosaicism in prenatal diagnosis; *Prenat-Diagnosis*(1984)4:97-130

Hsu-LYF, Garcia-FEP, Grossman-D et al.: Fetal wastage and maternal mosaicism; *Obstet-Gynecol*(1972)40:98-103

Hsu-LY, Yu-MT, Richkind-KE et al.: Incidence and significance of chromosome mosaicism involving an autosomal structural abnormality diagnosed prenatally through amniocentesis: a collaborative study: *Prenat Diagn.*(1996)16(1):1-28.

Hulten-MA, Suketu-D, Tankimanova-M: On the origin of trisomy 21 Down syndrome: *Molecular Cytogenetics* (2008)1:21

Informationsportal-kinderwunsch.de: <https://www.informationsportal-kinderwunsch.de/startseite/> (Stand: 27.08.2017, 12:00 Uhr)

Invernizzi-p, Miozzo-M, Selmi-C et al.: X chromosome monosomy: a common mechanism of autoimmune diseases. *J Immunol* (2005), 175:575-578.

Iourov-IY, Vorsanova-SG, Yurov-YB: Somatik Genome Variations in Helth and Disease;*Current Genomics*(2010)11:387-396

Iourov-IY, Vorsanova-SG, Yurov-YB:Chromosomal mosaicism goes global; *Molecular Cytogenetics* (2008)1:26

Jauniaux-E, Farquharson-RG, Christiansen-OB, Exalto-N: Evidence-based guidelines for the investigation an medical treatment of recurrent miscarriage; *Human reproduction* (2006)21;9:2216-2222

Juberg-R, Knops-J, Mowrey-PN: Increased frequency of lymphocytic mitotic non-disjunction in reccurent spontaneous aborters. *Journal of Medical Genetics*(1985)22:32-35

Kalmbach-KH, Fontes Antunes-DM, Draxler-RC et al.: Telomeres and human reproduction. *Fertil Steril.* (2013);99(1):23-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.039.

Kalousek-DK: Current topic: confined placental mosaicism and intrauterine fetal development; *Placenta*(1994)15:219-230

Kalousek-DK, Barret-IJ, Gärtner-AB: Spontaneous abortion and confined chromosomal mosaicism *Hum-Genet*(1992)88:642-646

Keefe-DL, Liu-L, Marquard-K: Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women: *Cell Mol Life Sci*(2007)64:139-143

Kim-HY, Hsu-LYF, Paciuc-S et al.:Cytogenetics of fetal wastage;*N-Engl-J-Med*(1975)293:844-847

Kline-J et al.: Trisomic Pregnancy and Earlier Age at Menopause; *Am J Hum Genet.*(2000)67(2):395-404

Kuo-PL, Guo-HR: Mechanism of recurrent spontaneous abortion in women with mosaicism of X-chromosome aneuploidies: *fertnster*(2004)82(6):1594-1601

- Kurahashi-H, Tsutsumi-M, Nishiyama-S et al.: Molecular basis of maternal age-related increase in oocyte aneuploidy: *Congenital Anomalies* (2012)52:8-15. doi:10.1111/j.1741-4520.2011.00350.x;
- Larsen-T, Gravholt-CH, Tillebeck-A et al.: Parental origin of the X-Chromosome, X-Chromosome mosaicism and screening for "hidden" Y chromosome in 45,X Turner syndrome ascertained cytogenetically; *Clin-Genet*(1995)48:6-11
- Linden-MG, Bender-BG, Robinson-A: Intrauterine diagnosis of sex chromosome aneuploidy; *Obstet-Gynecol*(1996)87:468-475
- Lockwood-DH, Neu-RL: Cytogenetic analysis of 1375 amniotic fluid specimens from pregnancies with gestational age less than 14 weeks; *Prenat-Diagnosis*(1993)13:801-805
- Lomax-BL, Kalousek-DK, Kuchinka-BD et al.: The utilisation of interphase cytogenetic analysis for the detection of mosaicism; *Hum-Genet*(1994)93:243-247
- Los-FJ, Van Opstal-D, van den Berg-C: The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model: *Hum Reprod Update*(2004)10(1):79-94
- Machiela-MJ et al. Female chromosome X mosaicism is age-related and preferentially affects the inactivated X chromosome. *Nat. Commun.* 7:11843 doi: 10.1038/ncomms11843, 2016)
- Macklon-NS, Geraedts-JP, Fauser-BC: Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* (2002)8(4):333-43.
- Madan-K, Lundberg-ES: Low grade mosaicism for X aneuploidy in women referred for recurrent abortions: *European Cytogeneticists Association Newsletter* No.35 January 2015: 9-12
- Makino-T, Hara-T, Oka-C et al.: Survey of 1120 Japanese women with a history of recurrent spontaneous abortions; *Eur-J-Obstet-Gynecol-Reprod-Biol.*(1992)44:123-130
- Martin-RH, Ko-E, Rademaker-A: Distribution of Aneuploidie in human gametes: comparison between human sperm and oocytes; *Am-J-Med-Genet*(1991)39:321-331
- McCorquodale-MM, Bowdle-FC: Two pregnancies and the loss of the 46,XX cell line in a 45,X/46,XX Turner mosaic patient; *Fertil-Steril*(1985)43:229-233
- Michels-VV, Medrano-C, Venne-VL et al.: Chromosome translocations in couples with multiple spontaneous abortions; *Am-J-Hum-Genet*(1982)34:507-513
- Miny-P, Hammer-P, Gerlach-B et al.: Mosaicism and accuracy of prenatal cytogenetic diagnoses after chorionic villus sampling and placental biopsy; *Prenat-Diagnosis*(1991)11:581-589

- Mishell-DR Jr : Recurrent abortion. *J-Reprod-Med* 1993; 38(4): 250-9
- Neu-RL, Entes-K, Bannerman-RM: Chromosome analysis in cases with repeated spontaneous abortions; *Obstet-Gynecol*(1979)53:373-375
- Nielsen-J, Wohlerlert-M : Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children: result from a 13-year incidence study in Århus, Denmark; *Hum-Genet*(1991)87:81-83
- Novak-AZ, Kokai-GK, Popvic-VP et al.: Interphase cytogeetics on paraffin-embedded sections of ovari for detection of genomic constitution in a patient with Turner's syndrome and chromosomal mosaicism; *Hum-Genet*(1995)95:293-298
- Nowinski-GP, Van Dyke-DI, Tilley-BC et al.: The frequency of aneuploidy in cultured lymphocytes is correlated with age and gender but not with reproductive history; *J Hum Gen*(1990)46:1101-1111
- Park-VM, Bravo-RR, Shulman-LP: Double non-disjunktion in maternal meiosis II giving rise to a fetus with 48,XXX,+21; *J-Med-Genet*(1995)32:650-653
- Pearce-JM, Hamid-RI: Randomised controlled trial of the use of human chorionic gonadotrophin in recurrent miscarriage associated with polycystic ovaries. *Br J Obstet Gynaecol*(1994 Aug)101(8):685-8
- Pellestor-F, Andreo-B, Arnal-F et al.: Mechanism of non-disjunktion in female meiosis; *Human Reproduction* (2002)17:2134-2145
- Pellestor-F, Anahory-T, Hamamah-S: The chromosomal analysis of human oocytes. *Human Reproduktion Update*(2005)11:15-32
- Philip-J, Bryndorf-T, Christensen-B: Prenatal aneuploidy detection in interphase cells by fluorescence in situ hybridization (FISH): *Prenat Diagn.*(1994);14(13):1203-15.
- Pinkel-D, Landegent-J, Collins-C et al.: Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4; *Proc-Natl_Acad-Sci-USA*(1988)85:9138-9142
- Pinkel-D, Straume-T, Gray-JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridisation *Proc-Natl-Acad-Sci-USA*(1986)83:2934-2938
- Portnoi-MF, Joye-N, van den Akker-J et al.: Karyotypes of 1142 Couples with reccurent abortion; *Obstet-Gynecol*(1988)72:31-34
- Rai-R, Clifford-K, Regan-L: The modern preventative treatment of recurrent miscarriage; *Brit-J-Obstet-Gynecol*(1996)103:106-110

- Rai-R, Regan-L, Recurrent miscarriage, *Lancet*, 2006;368(9535): 601-611
- Ritzinger-P, Dudenhausen-JW, Holzgreve-W: Späte Mutterschaft und deren Risiken, *J Reproduktionsmed Endokrinol*, 2011;8(2):112-122
- Robinson-WP, Binkert-F, Bernasconi-F et al.: Molecular studies of chromosomal mosaicism: relative frequency of chromosome gain or loss and possible role of cell selection; *Am-J-Hum-Genet*(1995)56:444-451
- Ruangvutilert-P, Delhanty-JDA, Rodeck-CH et al.: Relative efficiency of FISH on metaphase and interphase nuclei from non-mosaic trisomic or triploid fibroblast cultures; *Prenat Diagn*(2000);20:159-162
- Russell-LM, Strike-P, Browne-CE et al.: X-Chromosome loss and aging. *Cytogenet Genome Res* (2007)116:181-185
- Sachs-ES, Jahoda-MGJ, van Hemel-JO et al.: Chromosome studies of 500 couple with two or more abortions; *Obstet-Gynecol*(1985)65:375-378
- Salker-M, Teklenburg-G, Molokhia-M: Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One*. 2010 Apr 21;5(4):e10287. doi: 10.1371/journal.pone.0010287.
- Sancken-U, Burfeind-P, Engel-W: Die Bedeutung des mütterlichen Alters für die Entstehung von numerischen Chromosomenaberrationen: *J Reproduktionsmed Endokrinol* (2005); 2 (2): 109–114.
- Schliephacke-M, Maier-CIM, Majlinger-G et al.: The evaluation of gonosomal mosaics: lymphocyte interphase nuclei analyzed by FISH; *Clin Genet*(1996)50:99-102
- Shalev-E, Zalel-Y, Weiner-E et al.: The role of cordocentesis in assessment of mosaicism found in amniotic fluid cell culture; *Acta-Obstet-Gynecol-Scand*(1994)73:119-122
- Singh-DN, Hara-S, Foster-HW et al.: Reproduktive performance in women with sex chromosome mosaicism; *Obstet-Gynecol*(1980)5:608-611
- Staessen-C, Maes-AM, Kirsch-Volders-M et al.: Is there a predisposition for meiotic nondisjunktion that may be detected by mitotic hyperploidie?; *Clin-Genet*(1983)24:184-190
- Statistisches Bundesamt, 2012:
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Bevoelkerung/Geburt en/Geburten.html> (Stand: 21.01.2014, 15:00 Uhr)
- Statistisches Bundesamt, 2017:
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Bevoelkerung/Geburt en/Geburten.html>. (Stand: 27.08.2017, 12:00 Uhr)

Stephenson-MD: Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril* (1996)66(1):24-9.

Stern-JJ, Cerillo-M, Dorfmann-AD et al.: Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertility and Sterility*(1995)65(2):250-253

Stirrat-GM: Recurrent miscarriage: definition und epidemiology. *Lancet*(1990)336:673-675

Stoll-C : Cytogenetic findings in 122 Couples with reccurent abortions; *Hum Genet* (1981)57:101-103

Stone-JF, Sandberg-AA: Sex chromosome aneuploidy and aging; *Mut Res*(1995)338:107-113

Stray-Pedersen-B, Stray-Pedersen-S : Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion; *Am-J-Obstet-Gynecol*(1984)148:140-146

Tabor-A, Philip-J: Incidence of fetal chromosome abnormalities in 2264 low-risk women; *Prenat-Diagnosis*(1987)7:355-362

Tharapel-AT, Tharapel-SA, Bannerman-RM: recurrent pregnancy losses and parental chromosome abnormalities: a review: *B J Obst Gyn*(1985);92:899-914

Ticconi-C et al.: Thyroid autoimmunity and recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* (2011);66: 452-459

Thompson-SL und Compton DA: Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore–microtubule attachment errors (2011) www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1109720108

Toncheva-D, Ilieva-P, Mavrudieva-M : Detection of low-level sex-chromosomal mosaicism; *Genet-Couciling*(1994)5:565-367

Toth-B, Jeschke-U, Rogenhofer-N et al.: Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment: *journal of reproductive immunology* (2010);8:25-32

Toutain-J, Epiney-M, Begorre-M, et al.: First-trimester prenatal diagnosis performed on pregnant women with fetal ultrasound abnormalities: the reliability of interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) on mesenchymal core for the main aneuploidies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* (2010);149(2):143-6. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.12.015. Epub 2010 Jan 4.

Van Echten-Arends-J, Mastenbroek-S, Sikkema-Raddatz-B et al.: Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review: *HumRepUpdate*(2011);17(5):620-627

Varela-M, Shapira-E, Hyman-DB: Ullrich-Turner Syndrom in mother and daughter: prenatal diagnosis of a 46,X,del(X)(p21) offspring from a 45,X mother with low-level mosaicism for the del(X)(p21) in one ovary; *AM-J-Med-Genet*(1991)39:411-412

Vekemans, M. 2006. Trisomy. doi: 10.1038/npg.els.0005544

Viegas-Pequignot-E, Dutrillaux-B, Magdelenat-H et al.: Mapping of single-copy DANN sequences on human chromosomes by in situ hybridization with biotinylated probes: Enhancement of detection sensitivity by intensified-fluorescence digital-imaging microscopy; *Proc-Natl-Acad-Sci-USA*(1989)86:582-586

Voigt-R et al.: Low-Level Gonosomal Mosaicism in Women Undergoing ICSI Cycles; *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (2004)21(5):149-155
Ward-EB, Henry-GP, Robinson-A: Cytogenetic studies in 100 couples with recurrent spontaneous abortions; *Am-J-Hum-Genet*(1980)32:549-554

Wise-JL, Crout-RJ, McNeil-DW et al.(2009)Cryptic Subtelomeric Rearrangements and X-Chromosomal Mosaicism: A Study of 565 Apparently Normal Individuals with Fluorescence In Situ Hybridisation. *PLoS ONE* 4(6):e5855.

Yurov-YB, Vorsanova-SG, Iourov-IY et al.: Unexplained autism is frequently associated with low-level mosaic aneuploidy;*JMedGenet*(2007):44:521-525.

Zijno-A, Leopardi-P, Marcon-F, et al.: Sex chromosome loss and non-disjunction in women: analysis of chromosomal segregation in binucleated lymphocytes. *Chromosoma*. (1996);104(6):461-7.

8. Danksagung

Ich danke Prof. Karsten Held für die verlässliche und kritische Begleitung für einen so langen Zeitraum, trotz wechselnder Positionen und Aufgaben. Mein Dank geht auch an Prof. Andreas Gal, dessen Unterstützung mir sehr wertvoll war.

Mein größter Dank geht natürlich an meine Familie, besonders an meinen Vater, mit seinem einmaligen Gespür für die richtigen Momente und Formen der Motivation. Meiner Frau Barbara und meinen Kindern danke ich für ihre Geduld, ihr Verständnis und auch ihre Ermutigungen.

Sie kannten ja keinen anderen Zustand mehr bei mir, als mal mehr mal weniger mit einer unabgeschlossenen Dissertation beschäftigt zu sein. Das hat nun ein gutes Ende genommen und ein neues Kapitel kann beginnen.

9. Lebenslauf

in der online-Version entfernt

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: Nikolas Kahlke