

Institut für Pathologie und Rechtsmedizin
Abteilung Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. P. Möller

**Altersabhängige Telomererosion und sporadische
Telomerverlängerungen in peripheren Blutlymphozyten
des Menschen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Susanne Mayer

Nürtingen

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Möller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karin Scharffetter-Kochanek

Tag der Promotion: 14.12.2006

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>1</u>
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>3</u>
<u>Einleitung</u>	<u>4</u>
1. Altern auf zellulärer Ebene	4
2. Telomere und ihre Funktionen	5
3. Dynamik der Telomerlängen	7
4. Ziele	8
<u>Material und Methodik</u>	<u>9</u>
1. Untersuchungsaufbau	9
1.1 Untersuchungsmaterialien	9
1.2 Blutkultur	10
1.3 Chromosomenpräparation	10
1.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	11
1.5 Mikroskopie und Telomerlängenmessung	12
2. Medien und Lösungen	14
3. Statistische Analyse	15
3.1 Statistische Kenngrößen und Formeln	15
3.2 Visuelle Darstellung der Maßzahlen	18
3.3 Statistische Tests	21
3.4 Software	23
<u>Ergebnisse</u>	<u>24</u>
1. Altersgruppenspezifische Telomerverkürzung	24
1.1 Globale Betrachtung der statistischen Kenngrößen	24
1.2 Globale Datenverteilung	26
1.3 Datenverteilung innerhalb der einzelnen Altersgruppen	28
1.4 Differenzierung nach einzelnen Probanden	31
2. Chromosomenspezifische Telomerverkürzung	33
2.1 Parallelität von Mittelwert und Median	33
2.2 Chromosomenspezifische Betrachtung des Medians	35
2.3 Regressionsgeraden der einzelnen Chromosomenarme	37
2.4 Boxplots der Chromosomen	41

3.	Getrennte Betrachtung männlicher und weiblicher Probanden	44
3.1	Betrachtung aller Chromosomen	44
3.2	Vergleich der männlichen und der weiblichen Medianwerte	46
3.3	Chromosomenspezifische Betrachtungen	48
3.4	Regressionsgeraden männlich und weiblich	50
3.5	Boxplots für männliche und weibliche Probanden	55
4.	Phänomen der hohen Fluoreszenzintensitäten	63
4.1	Manifestation verstärkter Telomersignale	63
4.2	Statistische Auswertung hoher T/C-Werte	65
4.3	Endoreduplikation	69
<u>Diskussion</u>		<u>72</u>
1.	Beurteilung der Methodik und der Rohdaten	72
2.	Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Arbeiten	75
2.1	Geschlechtsunabhängige Telomerverkürzung	75
2.2	Geschlechtsabhängige Telomerverkürzung	80
2.3	Chromosomenabhängige Telomerverkürzung	83
2.4	Schiefverteilung und verstärkte Fluoreszenzsignale	85
3.	Telomere im Seneszenzprozess	87
<u>Zusammenfassung</u>		<u>89</u>
<u>Literaturverzeichnis</u>		<u>91</u>
<u>Anhang</u>		<u>103</u>
1.	Abbildungsverzeichnis	103
2.	Boxplots aller Altersgruppen global	105
3.	Boxplots aller Altersgruppen differenziert nach Geschlecht	107

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
cM	Centimorgan
Cy3	Indocarbocyanin
DAPI	Diaminophenylindolhydrochlorid
DNA	desoxyribonucleic acid
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylenether)-N;N,N',N'-Tetraessigsäure
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PCR	polymerase chain reaction
PHA	Phytohemagglutinin
PNA	polyamide nucleic acid
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
Q ₁	erstes Quartil
Q ₃	drittes Quartil
r	Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient nach Pearson
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
STELA	single telomere length analysis
T/C-FISH	Telomer/Centromer-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
TBS	Tris-buffered saline
TRF	Telomer-Restriktions-Fragment
TRIS	Tris(2-Ethylexyl)phosphat
α	Testniveau

Einleitung

1. Altern auf zellulärer Ebene

Altern ist ein komplexer Prozess, der auf dem Zusammenspiel vieler einzelner Faktoren beruht. Neben biologischen und medizinischen spielen auch psychologische und soziale Aspekte eine Rolle, die in ihrer Gesamtheit unausweichliche Veränderungen eines Lebewesens bedingen. Charakteristische Gewebs- und Organveränderungen führen zu einem Nachlassen der körperlichen Leistungsfähigkeit und schließlich zum Tod.

Dieses Phänomens kann bis heute keine allgemein anerkannte Theorie erklären. Dennoch haben einige Erkenntnisse zur Entwicklung einer zellbiologischen Altershypothese geführt.

Bereits 1961 entdeckten L. Hayflick und P. Moorhead, dass bestimmte menschliche Zellen in Gewebekulturen nur zu einer begrenzten Zahl von Zellteilungen in der Lage sind und dann absterben, ein Effekt, der später Hayflick-Limit genannt wurde (32,33). Die Zahl ist dabei umso geringer, je älter der Mensch ist, dem die Zellen entnommen wurden. Hinzu kam die Beschreibung des sogenannten End-Replikations-Problems 1971 durch A. Olovnikov und 1972 durch J. Watson (73,101). Sie wiesen nach, dass die DNA eukaryonter Chromosomen aufgrund ihrer linearen Struktur durch DNA-Polymerasen nur unidirektional verlängert werden kann. Diese inkomplette DNA-Replikation bewirkt, dass immer dann, wenn Zellen sich teilen, Basenpaare verloren gehen. Die Teilungsfähigkeit der Zellen wird mit zunehmender Anzahl der durchlaufenen Zellzyklen immer mehr eingeschränkt, bis es schließlich zur Apoptose kommt. Dies scheint daran zu liegen, dass es mit jeder Mitose zu einer Verkürzung der Telomere kommt, die die Endabschnitte linearer Chromosomen repräsentieren.

2. Telomere und ihre Funktionen

Telomere, die bei allen Vertebraten aus mehreren Kilobasen repetitiver DNA der Sequenz T_2AG_3 bestehen (64,67), haben in menschlichen Zellen zahlreiche unterschiedliche Funktionen.

Im Leptotän fixieren sie jedes Chromosom an der nukleären Lamina, wodurch die Chromosomen regelrecht innerhalb des Kerns positioniert werden (62,100). Sie bilden spezielle Konformationen aus, indem nicht im Doppelstrang fixierte, guaninreiche Enden (105) zu Haarnadelstrukturen zurückgefaltet werden (29). Diese sogenannten T-Loops werden dabei durch verschiedene Proteine, unter anderem TRF 1 und TRF 2, stabilisiert (39,63,95).

Aus den oben genannten Strukturen formen sich vermutlich Quadruplices, komplexe, viersträngige polyG-Regionen, die chromosomale Enden gleichsam versiegeln (70,75). So können intakte von geschädigten Chromosomen, zum Beispiel DNA-Bruchstücken, unterschieden werden, was entscheidend für die Kontrolle des Zellzyklus ist. Die anhand eines dreidimensionalen Modells (74) entstandene Abbildung 1 zeigt das mögliche Aussehen dieser Komplexe. Der komplexe Aufbau dieser Endstrukturen verhindert eine willkürliche Fusion der terminalen DNA unterschiedlicher Chromosomen (89,95). Zudem kann die Erbinformation durch Nukleasen weniger leicht enzymatisch abgebaut werden (82,104).

Es gibt Hinweise darauf, dass Telomere die Transkription subtelomerisch gelegener Gene beeinflussen können (25,48) und mit Regulationsmechanismen innerhalb des Zellzyklus interagieren (82,85,102).

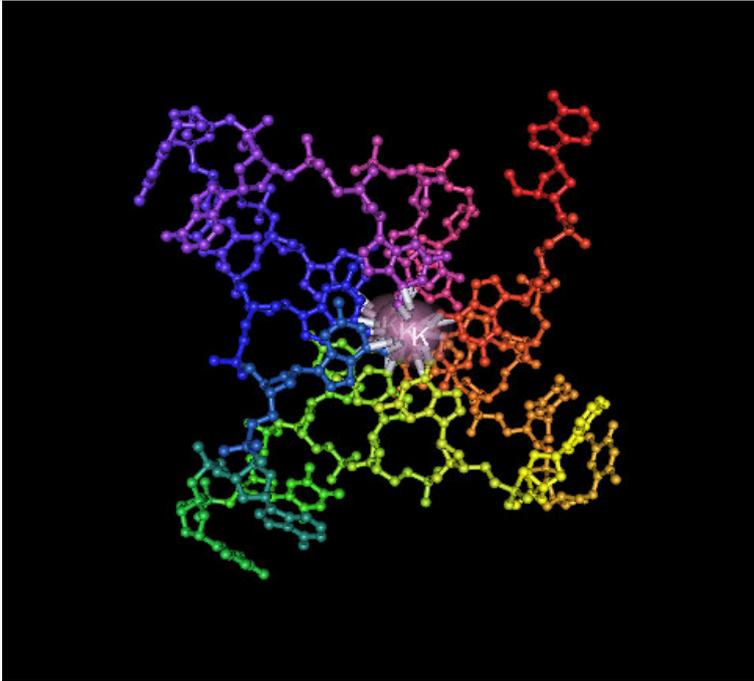


Abbildung 1: Struktur und Faltung menschlicher Telomere

Kristallines Modell eines intramolekularen DNA-Quadruplex aus vier parallel angeordneten Strängen bei einer mit dem Intra-zellularraum vergleichbaren Konzentration an Kaliumionen.

aus (74)

Darüber hinaus spielen Telomere eine wichtige Rolle bei der Replikation der Chromosomenenden. Sie bestehen beim Menschen aus Hexanukleotiden der Sequenz T_2AG_3 und kodieren als Minisatelliten-DNA somit nicht genetische Informationen. Telomere stellen vielmehr eine Art Sicherheitsabstand dar, der verhindert, dass das kodierende Genom bei der Replikation sofort angegriffen wird und verloren geht. Die Integrität des Genoms bleibt hierdurch auch dann gewährleistet, wenn Zellen sich teilen.

Diese Befunde implizieren, dass Telomere im Organismus die Funktion einer biologischen Uhr übernehmen könnten, die sich auf die Seneszenz von Zellen *in vitro* und *in vivo* auswirkt. Daraus ließe sich eine umgekehrte Relation zwischen dem Alter und der Telomerlänge ableiten. Das Altern wäre somit genetisch vorprogrammiert.

3. Dynamik der Telomerlängen

In zahlreichen Studien wurde bereits versucht, einen Bezug zwischen Alter und Telomerlänge herzustellen, um so zu verdeutlichen, dass Telomere am Prozess der Seneszenz beteiligt sind. Dabei stand fast immer die Erosion der Telomere mit zunehmendem Alter im Vordergrund.

Einiges deutet jedoch darauf hin, dass das Phänomen der Telomererosion nicht irreversibel ist. In bestimmten eukaryontischen Zellen existiert eine Telomerase, die als telomerspezifische Polymerase ausschließlich die DNA der Telomere verlängern kann (8,16,27,28,35,96). Die Telomerlänge bleibt in diesen Zellen stabil, es kommt nicht zur Apoptose. Besagter Mechanismus kann sogar dazu führen, dass eine Tumorzelle entsteht. Auch bei Zellen, die Telomerase nicht exprimieren, geht man seit kurzem davon aus, dass sie ihre Telomerlänge konstant halten können. Als potentielle Mechanismen kommen hierbei Rekombination homologer Chromosomen und Genkonversion in Frage (18,44). Überdies wurde ein „rolling-circle-Modell“ beschrieben, bei dem unter Benutzung eines kreisförmigen DNA-Einzelstrangs, der aus repetitiven Telomersequenzen besteht, rekombinante Telomerverlängerungen erfolgen (68).

Da Telomere also dynamischen Veränderungen zu unterliegen scheinen, stellt sich die Frage, ob das Alter von Zellen quantitativ zur Länge ihrer Telomere in Beziehung gesetzt werden kann und ob diese als biologische Uhr allein verantwortlich für den Alterungsprozess sind.

Seneszenz ist ein so vielschichtiger Vorgang, dass ein einzelner Mechanismus wohl nicht in der Lage ist, altersbedingte Veränderungen auf molekularer und physiologischer Ebene zu erklären. Die Telomerlängenhypothese postuliert einen intrinsischen Seneszenzmechanismus, der die Zahl stattgefundener Zellteilungen erkennen kann und nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen die Seneszenz einleitet. Seneszenz kann jedoch auch, unabhängig vom replikativen Alter der Zellen, durchaus vorzeitig auftreten, was von extrinsischen Faktoren wie DNA-Schädigung, zellulärem Stress und Aktivierung von Onkogenen abhängt (51). Zellen scheinen, zumindest in Kultur, ständig biologischen Stressoren

ausgesetzt zu sein, so dass sich schrittweise Zellschäden anhäufen, bis es schließlich zu Seneszenz kommt.

4. Ziele

Im Folgenden soll geklärt werden, ob die Dynamik der Telomerlänge Gesetzmäßigkeiten aufweist und ob diese auf Alterungsprozesse zurückgeführt werden können. Mit Hilfe der T/C-FISH- Methode sollen die einzelnen Chromosomen daraufhin untersucht werden, inwieweit sie sich in Länge und Verlauf unterscheiden. Eine weitere Differenzierung der Daten nach Geschlecht soll Aufschluss darüber geben, ob geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Telomererosion existieren und ob die unterschiedlichen Altersgruppen hiervon gleich stark betroffen sind. Darüber hinaus ist zu klären, ob auch bei menschlichen Chromosomen Telomerverlängerungen eine Rolle spielen und ob diese den Prozess der Seneszenz beeinflussen können.

Material und Methodik

1. Untersuchungsaufbau

1.1 Untersuchungsmaterialien

Gegenstand der Untersuchung waren insgesamt 205 Personen, die zwischen 0 und 100 Jahre alt waren. Das Probandenkollektiv setzte sich wie folgt zusammen:

Es wurden je 5 weibliche und 5 männliche Personen pro Dekade untersucht, wobei die Altersgruppen der Neugeborenen und die der 100-Jährigen Ausnahmen bildeten. Bei den Neugeborenen wurden 53 weibliche und 55 männliche Probanden berücksichtigt, bei den 100-Jährigen gab es zwar 5 weibliche, aber nur 2 männliche Probanden.

Bei den Neugeborenen wurde in Kooperation mit der Abteilung Gynäkologie des Universitätsklinikums Ulm Blut aus der Nabelschnurvene entnommen. Die 10-Jährigen waren freiwillige Probanden. Bei beiden Gruppen lag das Einverständnis der Eltern vor. Das Blut der 20- bis 60-Jährigen wurde aus analytischem Überschussmaterial der Blutspendezentrale Ulm des DRK zur Verfügung gestellt. Die übrigen Altersgruppen bestanden aus Probanden, die sich freiwillig für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt hatten.

Folgende Ein- und Ausschlusskriterien wurden berücksichtigt:

Bei den Neugeborenen lag weder ein pathologischer Schwangerschaftsverlauf noch eine Risikoschwangerschaft vor. Die 10-Jährigen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung gesund. Sie waren, abgesehen von gewöhnlichen Infekten und den üblichen Kinderkrankheiten, nie krank gewesen. Bei den 20- bis 60-Jährigen war das Blut zur Transfusion freigegeben. Die Probanden im Alter von 70 bis 100 Jahren waren ebenfalls gesund und im Laufe ihres Lebens nie schwerwiegend erkrankt. In keinem der untersuchten Fälle wurden chromosomale Aberrationen

gefunden. Dies hätte, ebenso wie schwerwiegende Erkrankungen, zum Ausschluss des betroffenen Probanden geführt.

Die Rohdaten der 0- bis 60-jährigen Personen lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits vor (15,36,77,99). Für diese Probanden wurde, im Gegensatz zu den 70- bis 100-Jährigen, in der vorliegenden Arbeit nur die statistische Analyse durchgeführt.

1.2 Blutkultur

Jedem Probanden wurde ungefähr 5 ml Blut mittels eines Natrium-Heparin-Röhrchens entnommen. Etwa 0,5 ml dieses Vollblutes wurden mit 45 ml Kulturmedium versetzt, in Kulturflaschen (*Falcon, Heidelberg*) überführt und 72 Stunden lang in einem CO₂- Brutschrank (*Labotect, Göttingen*) bei 37°C inkubiert. Einmal am Tag wurden die Flaschen geschüttelt, um sedimentierte Zellen zu resuspendieren. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde für eine Stunde Colcemid (*Fluka, München*) auf eine Endkonzentration von 0,5 µg pro ml Kulturflüssigkeit zugegeben. Dieser Vorgang führte zu einem Arretieren der Zellen im Zellzyklus und zu einer Anreicherung von Metaphasen.

1.3 Chromosomenpräparation

Zur Präparation wurde die Zellsuspension 10 Minuten lang in einer Kühlzentrifuge (*Minifuge T, Heraeus, Hanau*) bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in hypotoner Lösung resuspendiert und auf 50 ml aufgefüllt. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 1200 rpm wurde dieser Schritt wiederholt. Insgesamt betrug die Dauer der hypotonen Behandlung in etwa 20 Minuten. Nun wurde bei 4°C tropfenweise Fixativ zugegeben, bis ein Volumen von 5 ml erreicht war. Dies führte dazu, dass die Zellsuspension fixiert wurde. Anschließend füllte man mit weiteren 10 ml Fixativ langsam auf 15 ml auf und zentrifugierte bei 1000 rpm für 5 Minuten. Dieser Vorgang wurde mindestens ein

weiteres Mal wiederholt, bis das Zellpellet homogen weiß aussah. Die Suspension konnte nun bis zum Herstellen der Präparate bei -20°C aufbewahrt werden. Zwischen 10 und 20 µl Zellsuspension wurde auf einen Objektträger aufgetragen. Nach zehn Sekunden langem Trocknen wurde mit Fixativ nachgewaschen und das Präparat langsam getrocknet. Dieser Vorgang wurde unter einem Phasenkontrastmikroskop (*Axiolab, Zeiss, Jena*) kontrolliert. Um die Objektträger endgültig zu trocknen, wurden sie über einen Zeitraum von 48 Stunden staubfrei bei Raumtemperatur gelagert. Eventuell auf den Präparaten vorhandene Fixativreste wurden in 70-prozentigem Ethanol (*Merck, Darmstadt*) entfernt. So konnten sie, luftdicht verschlossen, bis zur Hybridisierung bei -20°C eingefroren werden.

1.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde die bereits vorbeschriebene T/C-FISH-Methode verwendet (9,76,77). Die Präparate wurden zunächst zwei Mal in TBS gespült und anschließend 10 Minuten mit Proteinase K (*Merck, Darmstadt*) einer Konzentration von 1 : 20 000 in PBS behandelt, um die Zellen anzudauen und permeabel zu machen. Nach erneutem Waschen in TBS wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70% - 85% - 100%) getrocknet. Alle folgenden Arbeitsschritte fanden im Dunkeln statt. Auf jeden Objektträger wurden 7 µl Hybridisierungslösung aufgetragen. Nach Auftragen der PNA-Sonde wurden die Objektträger mit einem Deckglas bedeckt und mit Fixogum (*Marabuwerke, Tamm*) versiegelt. Die Präparate wurden exakt 3 Minuten lang auf einer Heizplatte bei 80°C denaturiert und eine Stunde lang bei Raumtemperatur hybridisiert. In PBS wurden die Deckgläser dann vorsichtig abgelöst, der Objektträger wurde 5 Minuten in TBS mit 0,1% Tween 20 (*Merck, Darmstadt*) bei 65°C im Schüttelbad gewaschen, um PNA-Sonden zu entfernen, die unspezifisch gebunden hatten. Die Präparate wurden mit TBS-Lösung bei Raumtemperatur gewaschen, für 5 Minuten mit DAPI-Lösung gegengefärbt und anschließend zweimalig kurz in Aqua destillata getaucht. Unter Verwendung eines 40 auf 18 mm

großen Deckglases wurden die Präparate zum Schluss mit circa 30 μl Vectashield (*Vector Laboratories, Burlingame, USA*) eingedeckt.

1.5 Mikroskopie und Telomerlängenmessung

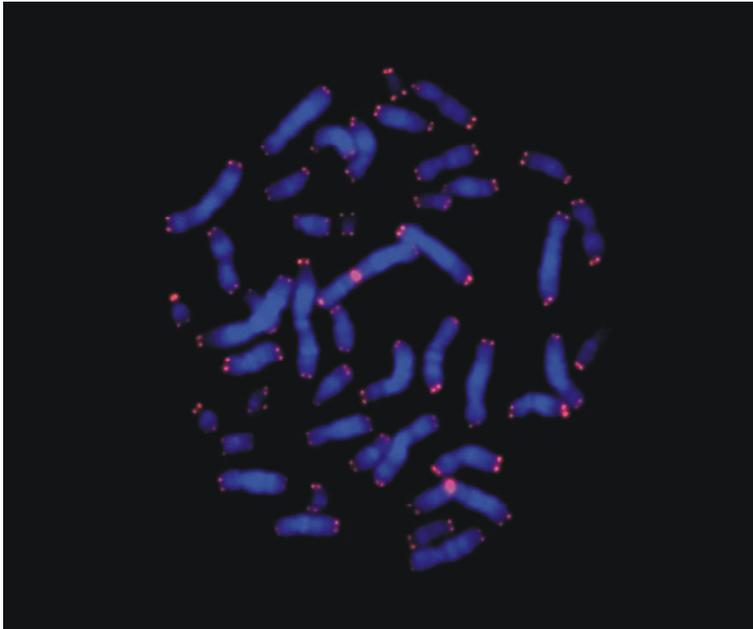


Abbildung 2: Metaphase einer 90jährigen Frau

Die Chromosomen PHA-stimulierter peripherer Blutlymphozyten wurden mit Cy3-markierter Telomersonde und ebenfalls Cy3-markierter Zentromersonde hybridisiert (rot fluoreszierend) und anschließend mit DAPI (blau) gegengefärbt.

Ein Fluoreszenzmikroskop (*Axioscope 2, Zeiss, Jena*) mit separaten Filtern für DAPI und Cy3 diente dazu, zur Messung geeignete Metaphasen aufzusuchen und mit einer CCD-Kamera zu fotografieren. Jedes Fluorochrom wurde als Einzelbild aufgenommen, anschließend wurden beide Bilder mit der Bearbeitungssoftware übereinandergelegt. Das entstandene Bild konnte nachfolgend im Computer digital mittels der Isis-Telomer-Software weiterverarbeitet werden.

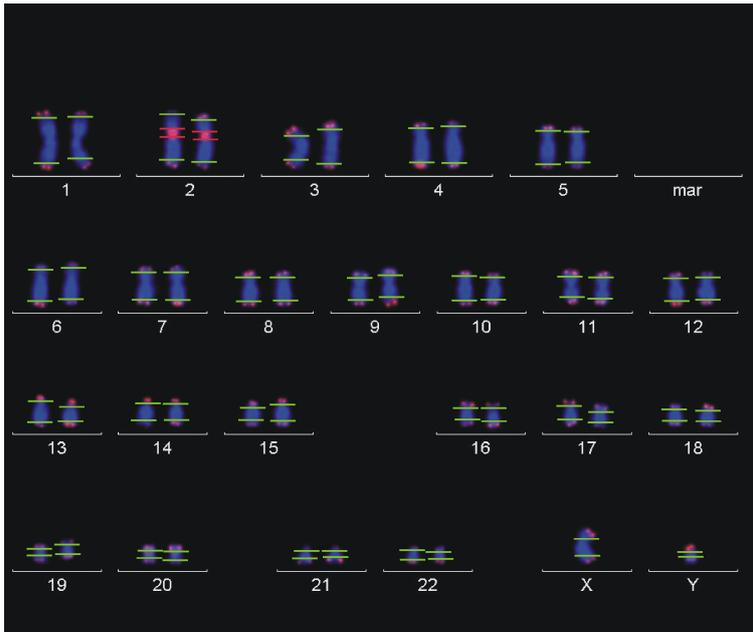


Abbildung 3: Karyogramm eines 70jährigen Probanden

Die Schwellen, die die Telomersignale begrenzen, sind als grüne Balken dargestellt, die Begrenzung für die Zentromere des Chromosoms 2 bilden je zwei rote Balken.

Die Chromosomen wurden getrennt und in ein Karyogramm überführt. An den p- und q-Armen der Chromosomen wurden Telomerschwelle gesetzt, das Zentromer des Chromosoms 2, das als Referenzsignal diente, wurde ebenfalls durch Schwellen eingegrenzt. Das Programm ermittelte zunächst die absoluten Intensitäten für jedes einzelne Chromosomenende und für das Zentromer des Chromosoms 2. Die Fluoreszenzintensität der Zentromere diente als Referenz. Sämtliche Telomerintensitäten der zugehörigen Metaphase wurden dann zu diesem Wert in Verhältnis gesetzt und ergaben relative T/C-Werte, die in Prozent des Zentromers ausgedrückt wurden.

Bei jedem beteiligten Probanden wurden zwischen 20 und 30 Metaphasen aufgenommen. Aus 20 Metaphasen wurden Karyogramme erstellt und die individuellen Fluoreszenzintensitäten für jedes Chromosom ermittelt. Diese Werte bilden den Ausgangspunkt für nachfolgende Berechnungen.

Aus den ermittelten T/C-Werten kann mittels linearer Regression außerdem die korrespondierende Anzahl an Basenpaaren bestimmt werden (76). Die Formel $y = 204x + 2507$ liefert für einen T/C-Wert x die zugehörige Zahl an Basenpaaren y .

2. Medien und Lösungen

Kulturmedium für Blutkulturen

Dieses Medium setzt sich zusammen aus 400 ml RPMI 1640-Medium ohne L-Glutamin (*Gibco, Gaithersberg, USA*), 100 ml fetalem Kälberserum (*Seromed, Berlin*), 10 ml L-Glutamin (*BioWhittaker, Walkersville, USA*) und 5 ml Phytohemagglutinin (*Biochrom, Berlin*). Zusätzlich werden 5 ml Penicillin/Streptomycin (*BioWhittaker, Walkersville, USA*) und 3 ml Amphotericin (*Biochrom, Berlin*) sowie 250 μ l Insulin (*Sigma-Aldrich, Steinheim*) und 200 μ l Heparin (*B. Braun, Melsungen*) hinzugegeben.

Colcemid-Stammlösung

Die Stammlösung enthält 100 μ g Colcemid pro ml TBS und kann bei -20° C aufbewahrt werden.

Tris-Buffered Saline (TBS)

TBS enthält 50 mM TRIS/HCl (entspricht in etwa einer Konzentration von 6,05 g/l) sowie 150 mM NaCl (das heißt etwa 8,76 g/l) und wird auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt.

Hypotone Lösung für Blutkulturen

Diese Lösung enthält jeweils 20 mM KCl (*Fluka, München*), 20 mM HEPES (*Fluka, München*) und 20 mM NH_4Cl (*Fluka, München*) sowie 0,5 mM EGTA (*Serva, Heidelberg*). Sie wird mit KOH (*Merck, Darmstadt*) auf pH 7,0 gebracht.

Fixativ

Das Fixativ zur Chromosomenpräparation setzt sich aus drei Teilen Methanol (*Merck, Darmstadt*) und einem Teil Essigsäure (*Roth, Karlsruhe*) zusammen und wird auf Eis angesetzt. Es kann bei -20 °C gelagert werden.

Hybridisierungslösung

Sie enthält 14,5 ml TRIS eines pHs von 7,2 , 0,5 ml 1% blocking reagent (*Boehringer, Mannheim*) und 35 ml 70% Formamid. Die Endkonzentration der PNA-Suspension beträgt sowohl für die Cy3-markierte PNA-Sonde, die an das Zentromer des Chromosoms 2 bindet, als auch für die PNA-Telomer-Sonde (*beide Dako, Glostrup, Dänemark*) je 2 ng pro µl.

DAPI-Lösung

Die Stammlösung enthält 100 µg Diaminophenylindolhydrochlorid (*Sigma-Aldrich, Steinheim*) pro ml Aqua destillata und wird mit Leitungswasser auf eine Endkonzentration von 50 ng pro ml verdünnt.

3. Statistische Analyse

3.1 Statistische Kenngrößen und Formeln

Um gemessene T/C-Werte zu objektivieren und besser vergleichbar zu machen, wurden einige statistische Kenngrößen ermittelt, die in den Bereich der Lage-, Streuungs- und Formmaße gehören.

1. Lagemaße

Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Der Mittelwert \bar{x} entspricht dem arithmetischen Mittel von n unabhängigen Messungen eines Merkmals x . Er ist kein gegen Ausreißer robustes Lagemaß.

Median

$$\tilde{x} = x_{\left(\frac{n+1}{2}\right)} \quad \text{wenn } n \text{ ungerade}$$

$$\tilde{x} = \frac{1}{2} \left(x_{\left(\frac{n}{2}\right)} + x_{\left(\frac{n+2}{2}\right)} \right) \quad \text{wenn } n \text{ gerade}$$

Der Median \tilde{x} teilt als Zentralwert die Beobachtungen in 2 Abschnitte, bei denen eine Hälfte kleiner, die andere Hälfte größer als der ermittelte Wert ist.

Quantile

Quantile stellen die Grenzen für Abschnitte gleicher Merkmalshäufigkeit dar.

1. Quartil (0,25-Quantil)

$$Q_1 = 0,25 \cdot (x + 1)$$

Begrenzt die unteren 25 Prozent eines Merkmals.

3. Quartil (0,75-Quantil)

$$Q_3 = 0,75 \cdot (x + 1)$$

Begrenzt die oberen 25 Prozent eines Merkmals.

Q_1 , \tilde{x} und Q_3 teilen die Häufigkeitsverteilung des beobachtete Merkmals in 4 Abschnitte.

2. Streuungsmaße

Interquartilsabstand

$$I_{50} = Q_3 - Q_1$$

Der Interquartilsabstand wird aus der Differenz des dritten und des ersten Quartils berechnet und ist ein relativ robustes Maß.

Standardabweichung

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \mu)^2}{N}}$$

Die Standardabweichung σ ist die Quadratwurzel der Varianz σ^2 . Diese bezeichnet die mittlere quadratische Abweichung aller Werte x vom Erwartungswert $E(x) = \mu$ der Grundgesamtheit.

Variationskoeffizient

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100$$

Der Variationskoeffizient drückt die Standardabweichung einer Verteilung in Einheiten des ihr zugrundeliegenden arithmetischen Mittels aus. Er dient als relatives und damit vergleichbares Maß für die Streuung von Verteilungen.

3. Formmaße

Schiefe

$$S = \frac{\sum (X - \mu)^3}{N\sigma^3}$$

Eine Verteilung ist schief, wenn ihre eine Seite länger ist als die andere. Allgemein können Daten linksgipflig, rechtsgipflig oder symmetrisch verteilt sein. Bei einer linksgipfligen Verteilung liegt der höchste Punkt der Verteilung links, der Mittelwert ist größer als der Median, bei rechtsgipfligen Verteilungen ist dies genau umgekehrt. Eine Normalverteilung hat die Schiefe von Null.

Kurtosis

$$kurt = \frac{\sum (X - \mu^4)}{\sigma^4} - 3$$

Die Kurtosis ist ein Maß für die Art der Verteilung an den Rändern. Verteilungen mit hohen Seitenwerten werden leptokurtisch genannt und weisen eine Kurtosis auf, die größer als null ist, Verteilungen mit weniger ausgeprägten Rändern ergeben negative Werte und heißen platykurtisch. Eine Verteilung, die dieselbe Kurtosis wie die Normalverteilung aufweist, wird mesokurtisch genannt, der Wert der Kurtosis ist hier null.

Schiefe und Kurtosis charakterisieren zusammen die Form und den Grad der Symmetrie einer Verteilung.

3.2 Visuelle Darstellung der Maßzahlen

1. Histogramme

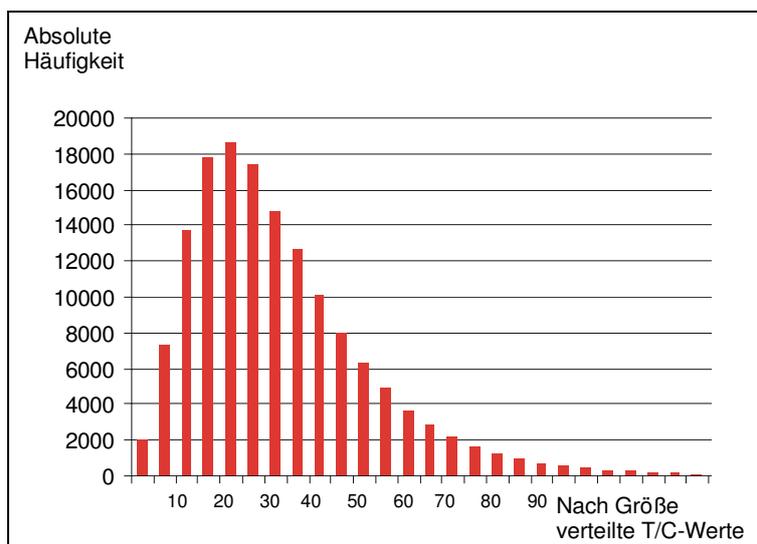


Abbildung 4: Beispiel eines Histogramms

Im Histogramm erfolgt die Einteilung der Daten in bestimmten Schritten und die Ermittlung der Häufigkeiten, mit der die Werte innerhalb der Klassen vorkommen.

Um die Verteilungsform der Daten zu visualisieren, werden Histogramme gebildet. Nach Einteilung der Werte in Klassen werden die Häufigkeiten aufgetragen, mit der Werte innerhalb der Klassen auftreten. Die Fläche der Rechtecke über den Klassen stellt die relative Klassenhäufigkeit dar. Abbildung 4 zeigt ein solches Histogramm.

2. Box und Wiskers Plot

In diesem Plot können die verschiedenen Lagemaße und auch einige Streuungsmaße dargestellt und auf einen Blick abgelesen werden.

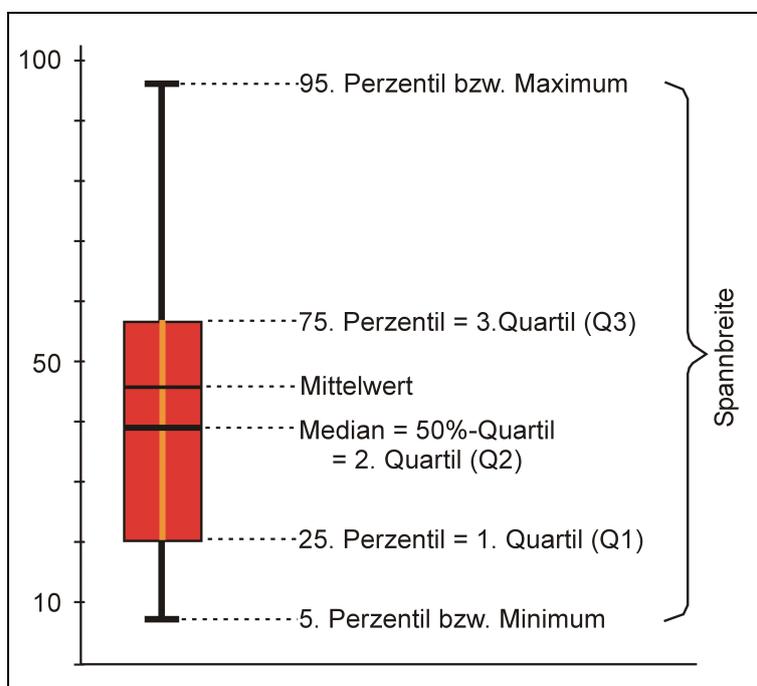


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Boxplots

Median, Q_1 und Q_3 bilden die Boxen. Minimum und Maximum oder auch, je nach Darstellungsform, 5. und 95. Perzentil stellen die Antennen dar. Zusätzlich sind Mittelwert und Spannweite angegeben.

In den Grafiken der vorliegenden Arbeit werden für die Boxen die Maße Median sowie erstes und drittes Quartil verwendet. Die Antennen werden durch Minimum und Maximum repräsentiert. Werte, die einen größeren Abstand zur Box als 1,5

Standardabweichungen aufweisen, werden in dieser Darstellungsform der Übersichtlichkeit wegen für die Antennen nicht berücksichtigt.

3. Normplot

Dieser Plot überprüft graphisch, ob Datensätze einer Normalverteilung unterliegen. Dabei wird eine Stichprobe mit einer Linie verglichen, deren Verlauf nach den Kriterien einer robusten linearen Anpassung errechnet wird. Die Linie beinhaltet das erste und das dritte Quartil der verwendeten Daten und wird bis zu den Enden der Stichprobe hin extrapoliert, um eine mögliche Linearität besser überprüfen zu können.

Sind die einzelnen Messwerte linear, also entsprechend der eingezeichneten linearen Anpassung angeordnet, bedeutet dies, dass die Stichprobe normalverteilt ist. Lassen sie hingegen einen kurvigen Verlauf erkennen, liegt ihnen eine andere Verteilung zugrunde.

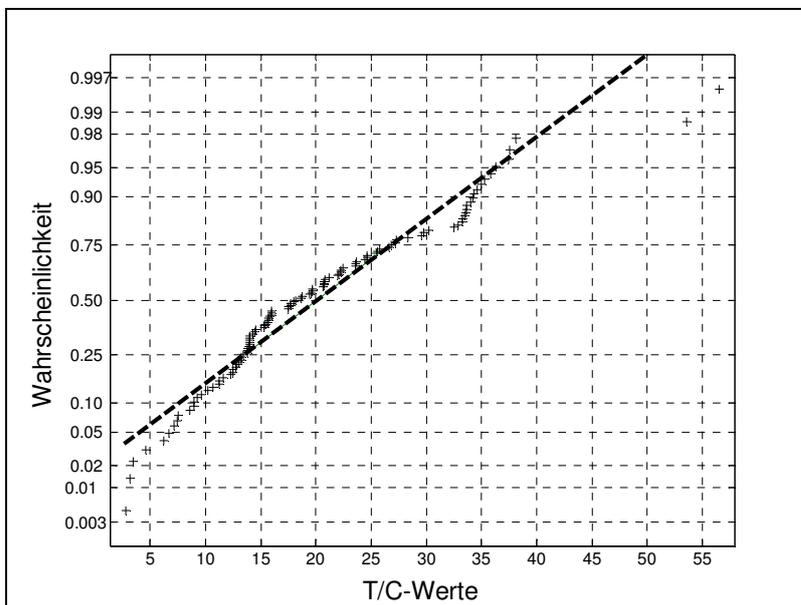


Abbildung 6: Schema einer graphischen Normalverteilungsprüfung

Die Messwerte im Beispiel sind durch Kreuze gekennzeichnet, die lineare Anpassung wird durch eine gestrichelte Linie visualisiert. Man erkennt, dass die einzelnen Messwerte nicht der linearen Anpassung folgen. Hier liegt somit keine Normalverteilung vor.

3.3 Statistische Tests

1. Korrelation

Die Korrelation untersucht den Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen.

Der Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient r nach Pearson berechnet sich nach der Formel

$$r = \frac{s_{xy}}{s_x \cdot s_y} = \frac{SAP}{\sqrt{SAQ_x} \cdot \sqrt{SAQ_y}}$$

SAP ist die Summe der Abweichungsprodukte.

$$SAP = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

SAQ ist die Summe der Abweichungsquadrate.

$$SAQ_x = \sum (x_i - \bar{x})^2$$

x und y stellen die beiden untersuchten Merkmale dar.

Das resultierende r ist dimensionsunabhängig und kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Ein Betrag um null bedeutet keinen oder einen nur sehr schwachen Zusammenhang, ein Betrag nahe 1 einen sehr starken. Ein positives Vorzeichen bedeutet einen gleichsinnigen Zusammenhang der beiden untersuchten Merkmale, ein negatives Vorzeichen eine gegensinnige Beziehung.

Das Bestimmtheitsmaß r^2 berechnet sich aus der Quadrierung des Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten r .

2. Einfache lineare Regression

Die Regression untersucht den Einfluss eines Merkmals auf ein zweites. Die Einflussgröße heißt unabhängige Variable und wird mit X bezeichnet, Y bezeichnet die Zielgröße und damit die abhängige Variable.

Die einfache lineare Regression benutzt dafür die Funktion $Y = a + bX$.

a bezeichnet den Y -Achsenabschnitt für $X = 0$, b die Steigung der Regressionsgeraden und damit den Regressionskoeffizienten.

Der Regressionskoeffizient b berechnet sich wie folgt:

$$b = \frac{s_{xy}}{s_x^2} = \frac{SAP}{SAQ_x}$$

Zur Berechnung des Y -Achsenabschnitts dient die Gleichung

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Jede Gerade geht nämlich durch den Punkt (\bar{x}, \bar{y}) .

Die auf diese Weise ermittelte Regressionsgerade stellt die bestmögliche Anpassung einer Geraden an eine Punktwolke dar.

3. Wilcoxon-Test

Zum Vergleich unterschiedlicher Datenreihen diente in der vorliegenden Arbeit der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben. Bei diesem Test muss keine Normalverteilung vorliegen, da er zu den verteilungsunabhängigen Verfahren gehört.

Vor Beginn der Berechnungen wurde bei den vorliegenden Daten ein Testniveau α von 0,05 festgelegt. Durch den Vergleich von α mit dem durch den Test ermittelten p-Wert, das heißt der Überschreitungswahrscheinlichkeit, wird die Entscheidung zwischen der Null- und der Alternativhypothese getroffen.

Falls der p-Wert kleiner oder gleich α ist, ist der Test signifikant zum Niveau α . Die Nullhypothese, die besagt, dass die beiden Merkmale sich hinsichtlich ihrer Zielgröße nicht unterscheiden, wird verworfen. Stattdessen nimmt man die Alternativhypothese an. Diese geht davon aus, dass beide Merkmale in ihrer Zielgröße differieren. Ist der ermittelte p-Wert aber größer als α , ist der Test nicht signifikant, und die Nullhypothese kann nicht verworfen werden.

4. Lilliefors-Test

Der Lilliefors-Test bewertet die Hypothese, dass ein Datensatz einer Normalverteilung folgt. Dazu wird die empirische Verteilung der Daten mit einer Normalverteilung verglichen, die den gleichen Mittelwert und die gleiche Varianz wie diese besitzt. Das Testresultat gibt an, ob die Hypothese, dass die Daten einer Normalverteilung folgen, verworfen werden kann, oder ob die Nullhypothese beibehalten werden muss. Auch bei diesem Test wurde für das Testniveau α ein Wert von 0,05 festgelegt.

3.4 Software

Die Daten wurden mittels Microsoft Excel 2000 (*Microsoft Corporation*) in Tabellenform überführt. Sämtliche oben beschriebene Rechenoperationen wurden mit MATLAB Version 6.1 (*The MathWorks, Inc.*) durchgeführt. Für die Grafiken wurden neben MATLAB die Programme STATISTICA für Windows Version 6 (*StatSoft, Inc.*) und CorelDRAW Version 8.0 (*Corel Corporation und Corel Corporation Limited*) verwendet.

Ergebnisse

1. Altersgruppenspezifische Telomerverkürzung

1.1 Globale Betrachtung der statistischen Kenngrößen

Um die erhaltenen Daten besser analysieren zu können, wurde zunächst der Aspekt der altersgruppenspezifischen Telomerverkürzung gewählt. Dazu wurden alle Werte, die innerhalb einer Altersgruppe, zum Beispiel innerhalb der Neugeborenen, gemessen wurden, zu charakteristischen Maßzahlen zusammengefasst, in diesem Fall zum Mittelwert, Median und dem ersten und dritten Quartil. Die elf so erhaltenen, jeweils zusammengehörigen Werte wurden als Punktwolke in ein Diagramm eingetragen, zusätzlich wurden das Bestimmtheitsmaß und die Gleichung der Regressionsgeraden ermittelt (siehe Abbildung 7).

Es ergibt sich ein klares Datenverhalten. Sowohl Mittelwert als auch Median nehmen mit zunehmendem Alter mehr und mehr ab. Dies trifft auch für das erste und dritte Quartil zu. Für sämtliche Datengruppen ergibt sich ein Korrelationskoeffizient, der relativ nahe bei eins liegt. Es scheint also ein linearer Zusammenhang zwischen dem Alter und den verwendeten statistischen Größen vorzuliegen. Bei näherer Betrachtung fällt zum einen auf, dass die Regressionsgeraden des Mittelwerts und des Medians nahezu parallel verlaufen, was auch an der vergleichbaren Steigung zu sehen ist. Diese beträgt, auf drei Nachkommastellen gerundet, für den Mittelwert 0,284 und für den Median 0,286. Zum anderen ist der Abstand zwischen dem ersten Quartil und dem Median sehr viel kleiner als zwischen dem Median und dem dritten Quartil, wobei das erste Quartil einen sehr geringen Ausgangswert bei gleichzeitig niedrig negativer Steigung, das dritte Quartil aber einen hohen Ausgangswert bei vergleichsweise hoch negativer Steigung aufweist. Mit zunehmendem Alter laufen diese beiden Regressionsgeraden also mehr und mehr aufeinander zu.

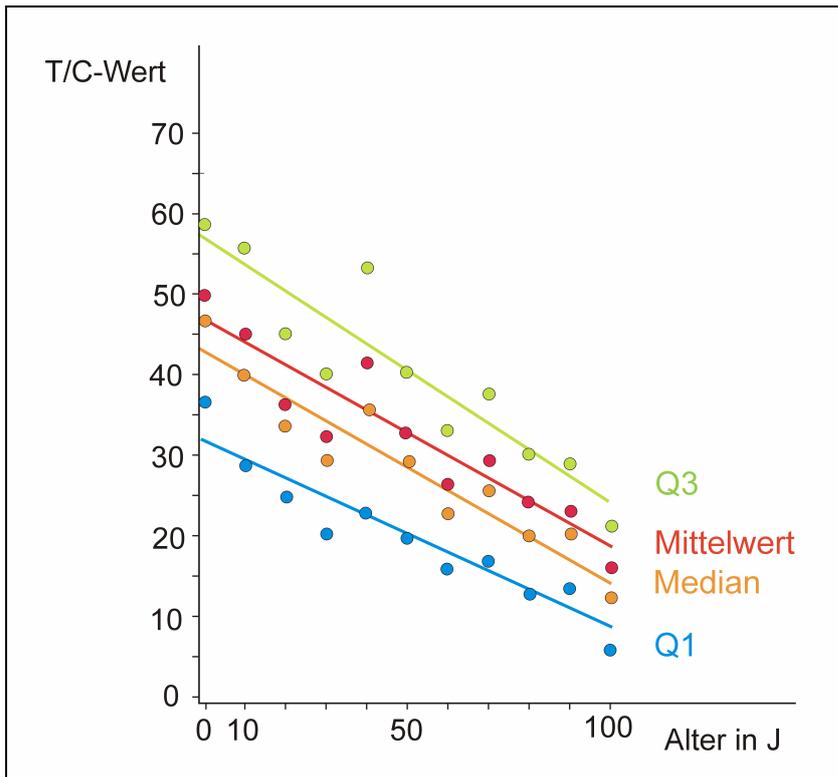


Abbildung 7: Punktwolken verschiedener statistischer Kenngrößen

Zusätzlich zu den Absolutwerten (Punkte) sind die Regressionsgeraden eingezeichnet. Neben den Gleichungen der Regressionsgeraden ist nachfolgend auch der Korrelationskoeffizient angegeben.

Mittelwert:	$y = -0,28x + 46,86$	$r = -0,93$
Median:	$y = -0,29x + 43,04$	$r = -0,94$
Q ₁ :	$y = -0,24x + 32,20$	$r = -0,95$
Q ₃ :	$y = -0,33x + 57,19$	$r = -0,92$

Dies wird in Abbildung 8 noch deutlicher. In den Box und Wiskers Plots für die einzelnen Altersgruppen sind Median, erstes und drittes Quartil sowie Minimum und Maximum enthalten. Es ist ein deutlicher Größenunterschied zwischen der unteren Hälfte der Box, das heißt der Distanz zwischen dem ersten Quartil und dem Median, und der oberen Hälfte, also der Distanz zwischen dem Median und dem dritten Quartil, erkennbar. Die absoluten Distanzen verhalten sich für die einzelnen Altersgruppen natürlich unterschiedlich, aber immer ist der Abstand zwischen dem Median und dem dritten Quartil der größere von beiden. Auch der absolute Abstand zwischen dem ersten und dem dritten Quartil, der an der Länge der farbigen Box zu erkennen ist, wird mit zunehmendem Alter immer geringer.

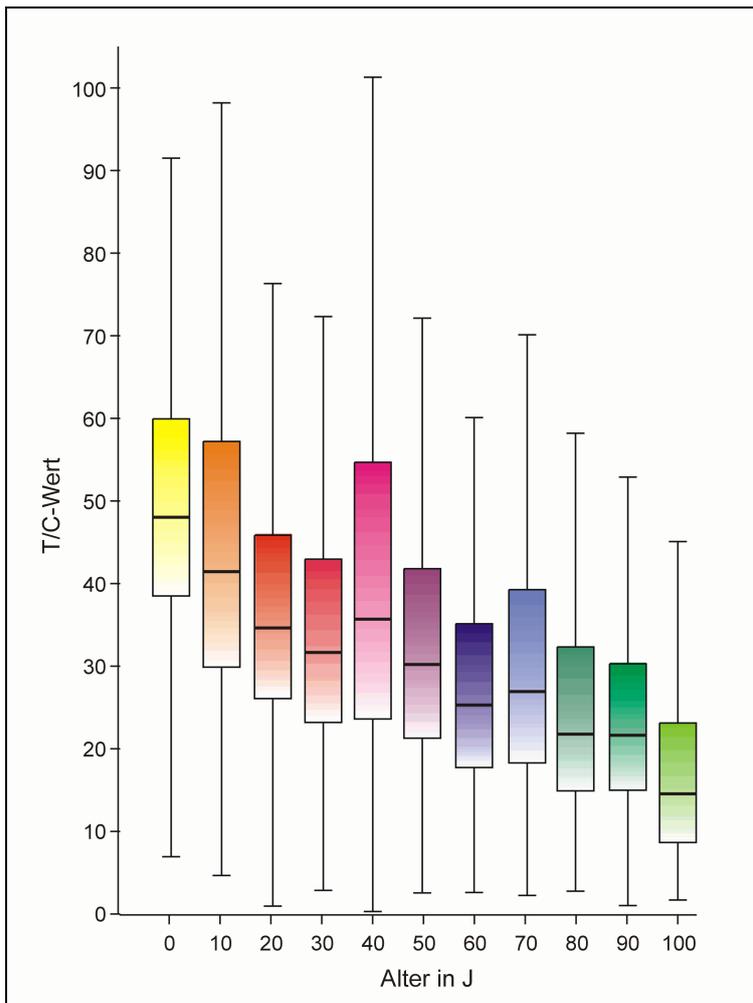


Abbildung 8: Box und Wiskers Plots aller Altersgruppen

Für jede Altersgruppe sind Minimum, Maximum, erstes und drittes Quartil und Median in Form eines Boxplots mit Antennen eingezeichnet.

1.2 Globale Datenverteilung

Die beiden Beobachtungen deuten darauf hin, dass die gemessenen T/C-Werte nicht normalverteilt sind. Objektivierbar wird diese Tatsache durch statistische Verteilungsprüfung.

Die Anwendung des Lilliefors-Tests bestätigt für ein vorgegebenes α von 0,05 die Alternativhypothese. Mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von fünf Prozent kann man also davon ausgehen, dass die vorliegenden Daten nicht normalverteilt sind.

Auch die graphische Überprüfung (Abbildung 9) ist nicht mit einer Normalverteilung vereinbar. Vor allem zu sehr großen, aber auch zu sehr kleinen Werten hin weichen die gemessenen T/C-Werte stark von der vorgegebenen Geraden ab.

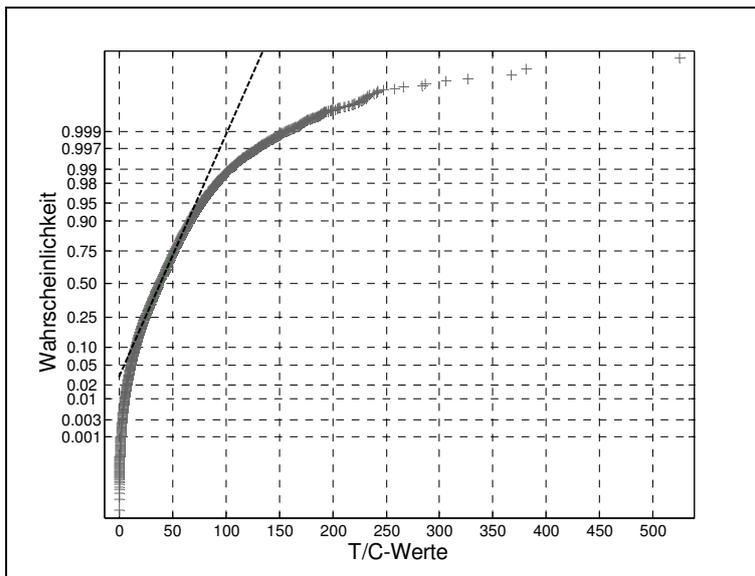


Abbildung 9: Normplot der Globaldaten

Die T/C-Werte sind auf der Abszisse, die Wahrscheinlichkeitsverteilung auf der Ordinate aufgetragen. Die gemessenen T/C-Werte sind als graue Kreuze dargestellt, die Normalverteilung als gestrichelte schwarze Linie.

Die Aussage wird durch ein aus allen gemessenen T/C-Werten ermitteltes Histogramm (Abbildung 10) visualisiert. Hier sind alle T/C-Werte berücksichtigt, die in einem Wertebereich zwischen 0 und 150 liegen. Nach Aufteilung der Werte in 150 Klassen wurde die relative Häufigkeit bestimmt, mit der die Werte innerhalb der einzelnen Klassen auftraten.

Die Abbildung macht deutlich, dass es schon bei kleinen Werten zu einem relativ schnellen Anstieg kommt. Der Verteilungsverlauf der Kurve ist dabei nicht symmetrisch. Anstatt schnell wieder abzufallen, kommen regelmäßig extrem hohe Werte vor. Aufgrund der Menge der ausgewerteten Daten - es gingen über 235 000

Werte in diese Kurve ein - ist diese Linksverschiebung mit größter Wahrscheinlichkeit keine zufällige. Stärkere Ausreißer treten somit weniger nach unten als vielmehr nach oben auf. Die statistische Auswertung der Daten ergab eine Schiefe von 1,22 sowie eine Kurtosis von 5,25 , was in Einklang mit den gemachten Beobachtungen steht.

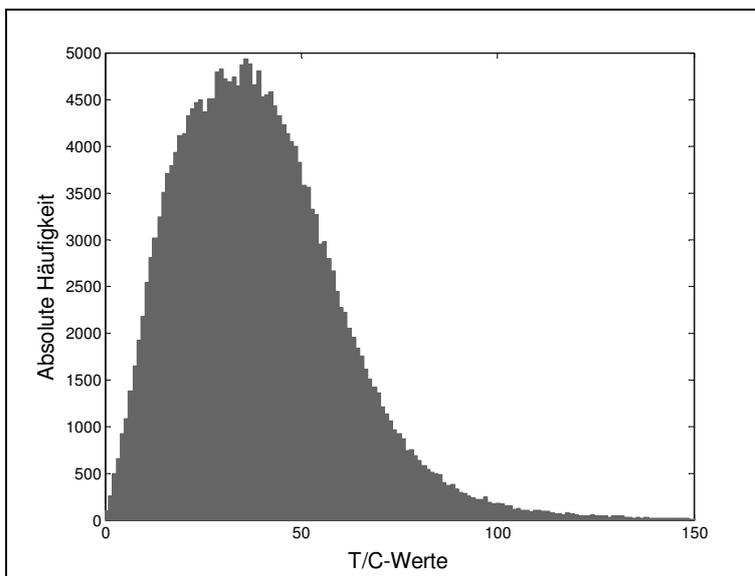


Abbildung 10: Histogramm der Globaldaten

Es sind alle gemessenen T/C-Werte berücksichtigt, die in einem Wertebereich zwischen 0 und 150 liegen. Auf der X-Achse finden sich 500 Klassen, in die die T/C-Werte unterteilt sind. Auf der Y-Achse ist die absolute Klassenhäufigkeit aufgetragen.

1.3 Datenverteilung innerhalb der einzelnen Altersgruppen

Diese Tendenz bestätigt sich auch, wenn man Histogramme der einzelnen Altersgruppen isoliert betrachtet. Der Übersichtlichkeit wegen wurde hier die Form der Kurven durch Näherungsfunktionen bestimmt (Abbildung 11) und auf dieselbe Höhe normiert, da nur die Art der Verteilung von Interesse war.

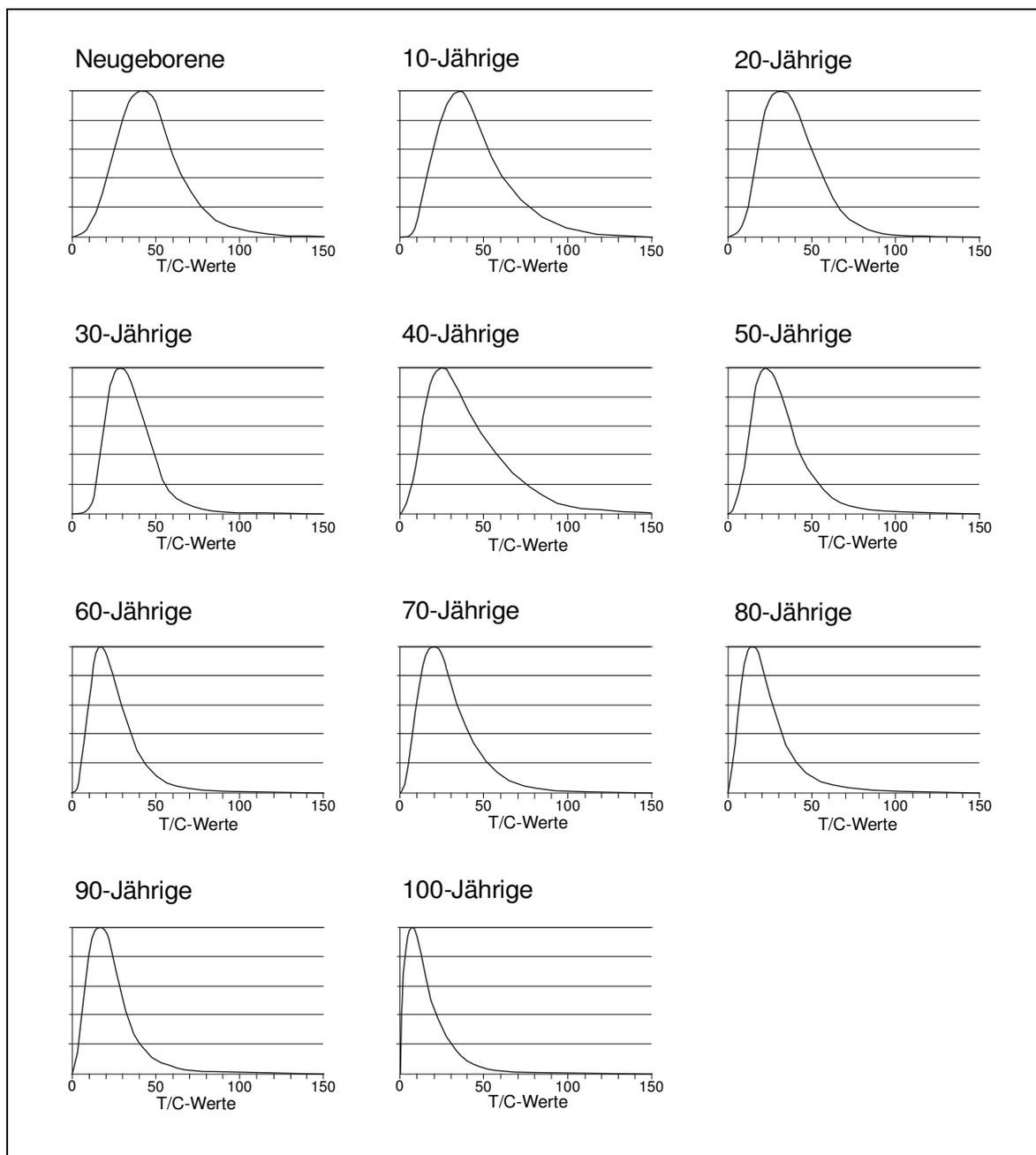


Abbildung 11: Histogramme innerhalb der verschiedenen Altersgruppen

Dargestellt sind Näherungsfunktionen der Histogramme der 0- bis 100-Jährigen. Die Y-Achse trägt keine Einheit, da die Näherungsfunktionen auf dieselbe Höhe normiert sind. Zudem wurde eine seitliche Begrenzung der T/C-Werte bis auf 150 vorgenommen.

Das Maximum der gezeichneten Kurven scheint sich mit zunehmendem Alter immer mehr nach links zu verschieben. Dies wird noch deutlicher, wenn man einige Kurven auswählt und übereinander legt (Abbildung 12).

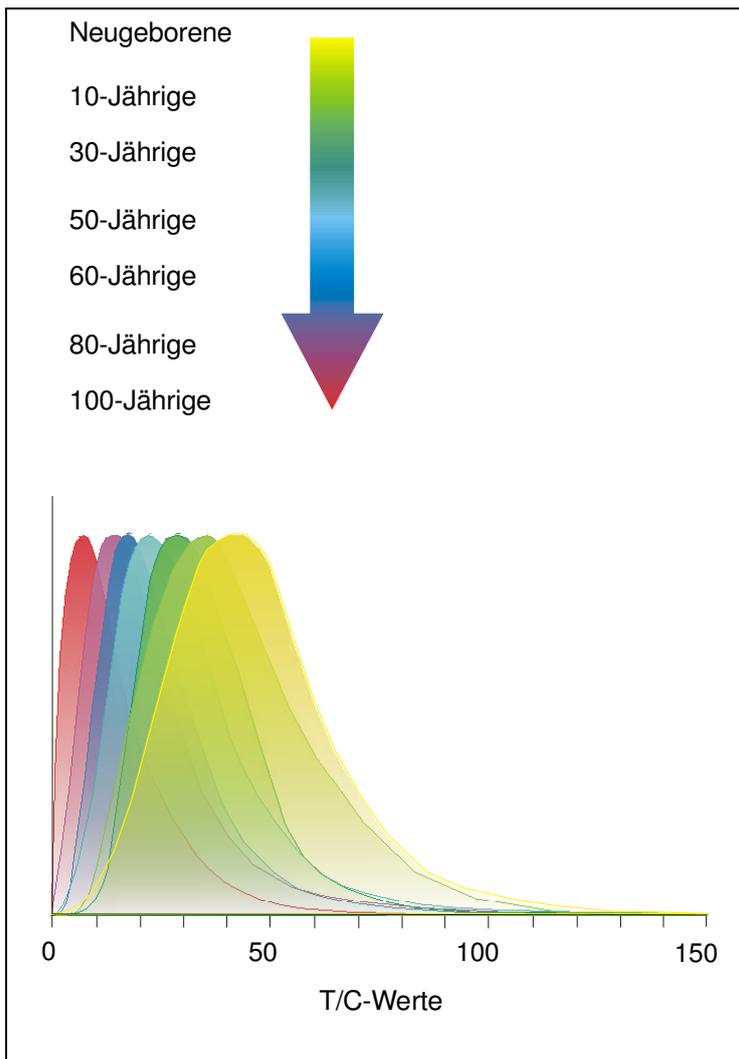


Abbildung 12: Histogrammverlauf mit zunehmendem Alter

Dargestellt sind die Histogramme der Neugeborenen, 10-, 30-, 50-, 60-, 80- und 100-Jährigen. Sie sind jeweils farbkodiert (siehe Legende) und auf dieselbe Höhe normiert.

Eine klare Linksverschiebungstendenz der Kurven ist erkennbar, diese wird mit zunehmendem Alter immer ausgeprägter.

Das beobachtete Phänomen wird ebenfalls deutlich, wenn man die Formmaße in Abbildung 13 betrachtet. Die Schiefe wird mit zunehmendem Alter immer größer, was bedeutet, dass sich das Maximum der Verteilung immer mehr nach links verschiebt. Die Kurtosis nimmt ebenfalls immer mehr zu, die Seitenränder werden also immer ausgeprägter. Dabei korrelieren Alter und Schiefe beziehungsweise Kurtosis gut miteinander.

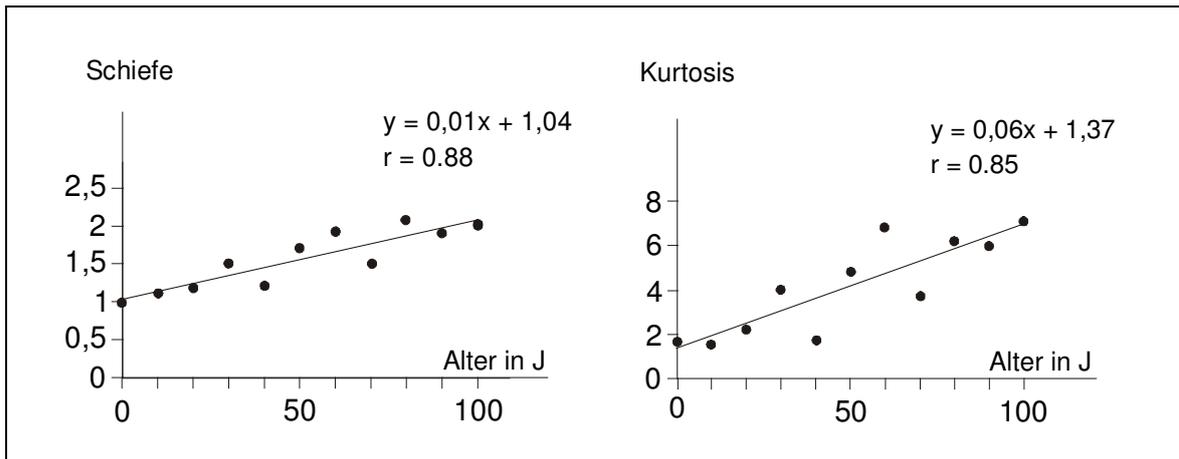


Abbildung 13: Verlauf von Schiefe und Kurtosis in Abhängigkeit vom Alter

Punktwolken für Schiefe und Kurtosis der verschiedenen Altersgruppen mit den dazugehörigen Regressionsgeraden. Die Gleichungen der Geraden sowie der Korrelationskoeffizient r sind angegeben. Es sind nur T/C-Werte bis zu einer Obergrenze von 150 berücksichtigt, um eine mögliche Verfälschung durch Ausreißer zu minimieren.

1.4 Differenzierung nach einzelnen Probanden

Die Tendenzen, die sich aus dem Überblick ergaben, bedurften weiterer Differenzierung. Dies erfolgte durch Auftrennen der Altersgruppen in die einzelnen Probanden, was differenziertere Kurven für die Parameter Mittelwert und Median sowie Q_1 und Q_3 ergab (Abbildung 14).

Sämtliche untersuchten Parameter sind sehr gut mit dem Alter korreliert, und auch der Unterschied zwischen allen Parametern ist statistisch signifikant ($p \ll 0,05$). Da nahezu fünfzigmal mehr Daten als bisher verwendet wurden, ist die Streuung natürlich etwas größer. Für die Korrelationskoeffizienten ergeben sich in diesem Fall niedrigere Werte. Infolge der genaueren Auftrennung weichen auch die Regressionsgeraden in ihrem Verlauf etwas vom Ergebnis der vorangehenden globalen Betrachtung ab. Die bisher gemachten Beobachtungen lassen sich gleichwohl auf diese Untersuchung übertragen.

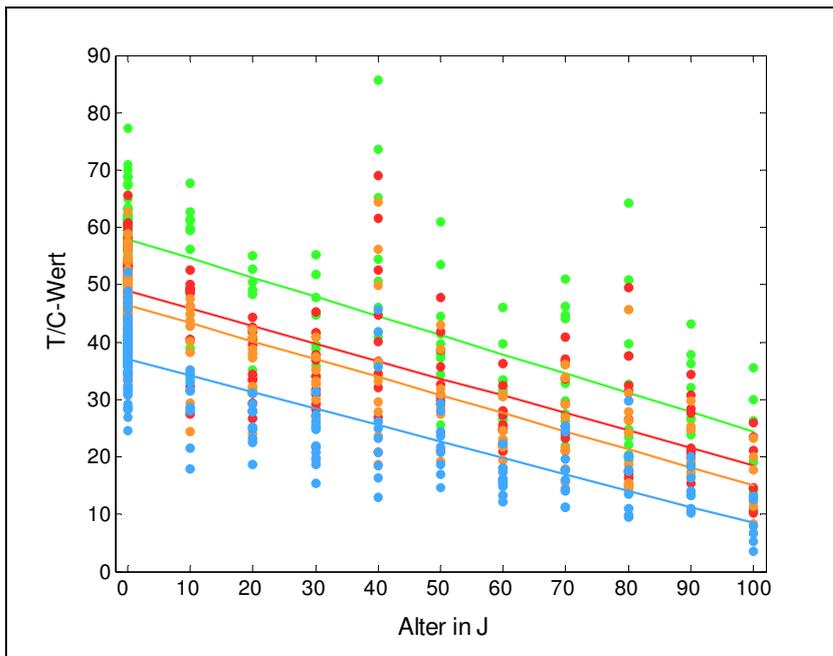


Abbildung 14: Punktwolken verschiedener statistischer Kenngrößen

Für die farbkodierten Regressionsgeraden, die durch lineare Regression ermittelt wurden, sind unten die Gleichungen und daneben die Korrelationskoeffizienten angegeben.

Mittelwert:	$y = -0,30x + 48,89$	$r = -0,81$
Median:	$y = -0,31x + 46,49$	$r = -0,83$
Q1:	$y = -0,29x + 36,96$	$r = -0,86$
Q3 :	$y = -0,33x + 57,94$	$r = -0,78$

Der Ausgangswert von Q_3 ist hoch, bei einer deutlich größeren Steigung als der des Mittelwerts und des Medians, während der Ausgangswert für Q_1 eher niedrig, seine Steigung allerdings relativ gering ist. So kommt es mit zunehmendem Alter zu einer Konvergenz der beiden Geraden. Auch die Parallelitätstendenz der Regressionsgeraden des Mittelwerts und des Medians wird deutlich. Ihre Steigung ist in etwa gleich, der Abstand zwischen den beiden Geraden beträgt ungefähr 2,4 T/C-Werte. Mittelwert, Median, Q_1 und Q_3 verhalten sich somit quasi identisch.

Für den Median, der ein gegenüber Ausreißern relativ robuster Parameter ist, ergibt sich aus der Regressionsgeraden umgerechnet ein mittlerer Ausgangswert von 12,0 kb bei Neugeborenen, ein Endwert von 5,7 kb bei 100jährigen sowie eine jährliche Abnahme von etwa 63,2 bp.

2. Chromosomenspezifische Telomerverkürzung

2.1 Parallelität von Mittelwert und Median

Vorangehend wurde die Beobachtung gemacht, dass sich Median und Mittelwert in gleicher Weise veränderten. Um dies zu untersuchen, wurden die Regressionsgeraden von Mittelwert und Median nochmals gesondert analysiert. Dazu wurden für jeden Probanden der Mittelwert und der Median jedes einzelnen Chromosomenarms bestimmt. Diese beiden Werte wurden zunächst unter Einbeziehung des Alters der Probanden miteinander verglichen.

Der Vergleich von Mittelwert und Median macht auch hier deutlich, dass beide Werte mit zunehmendem Alter immer kleiner werden. Dies bestätigt auch die lineare Regression. Zudem zeigen die Werte eine vergleichbar gute Korrelation in Bezug auf das Alter ($r = -0,74$ für den Mittelwert und $r = -0,76$ für den Median). Die differenzierte Aufschlüsselung von Mittelwert und Median jedes einzelnen Chromosomenarms und Probanden gibt zudem Aufschluss über die Parallelität.

Auf den ersten Blick verlaufen die Geraden relativ gleichförmig, und eine Parallelitätstendenz ist erkennbar. Diese Ergebnisse sind aufgrund der größeren Datenmengen bezüglich des errechneten Y-Achsenabschnitts im Nachkommabereich natürlich etwas unterschiedlich, insgesamt aber gut mit den obigen Werten (siehe 1.4) vergleichbar. Auch hier zeigen sich jedoch geringe Unterschiede in der Steigung. Einem Wert von ungefähr 48,7 T/C-Werten für den Mittelwert und 46,7 T/C-Werten für den Median der Neugeborenen steht bei den 100-Jährigen ein Wert von 18,7 T/C-Werten für den Mittelwert und 15,7 T/C-Werten für den Median gegenüber. Die Differenz der T/C-Werte beträgt somit in etwa 2 bei den Neugeborenen und 3 bei den 100-Jährigen, was bedeutet, dass die Geraden nicht ganz parallel sind. Der Wilcoxon-Test liefert beim Vergleich der Datensätze für Mittelwert und Median einen hochsignifikanten Unterschied.

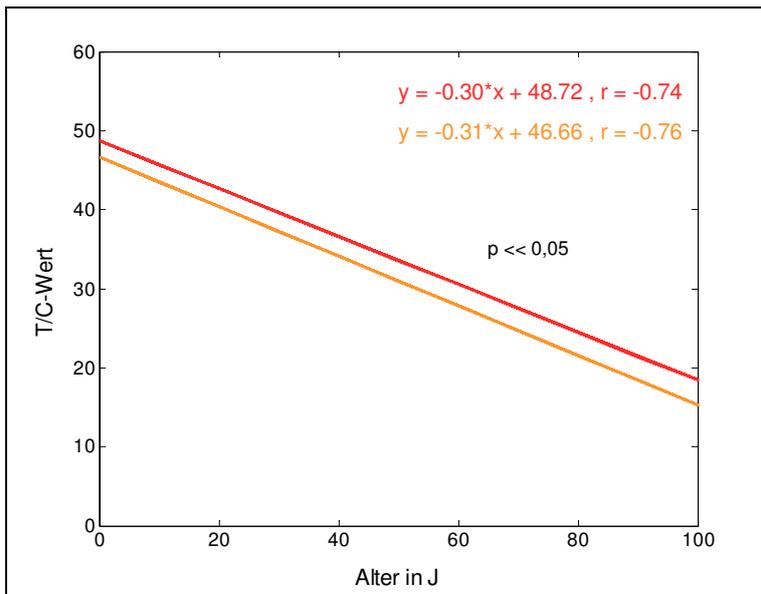


Abbildung 15: Regressionsgeraden für Mittelwert und Median

In der Graphik ist neben den Geradengleichungen des Mittelwerts (rot) und des Medians (orange) der Korrelationskoeffizient r angegeben.

Das errechnete p ist mit einem Wert von $1,36 \cdot 10^{-32}$ sehr viel kleiner als α und zeigt somit einen signifikanten Unterschied zwischen Mittelwert und Median an.

Die Differenz von ungefähr 2 T/C-Werten stellt insgesamt aber eine recht gute Näherung dar. Dies zeigt sich in Abbildung 16, in der von den Mittelwerten der Chromosomenarme der einzelnen Probanden die dazugehörigen Mediane abgezogen und in einem Histogramm aufgetragen wurden. Hier ist nur die absolute Wertedifferenz von Bedeutung, das Alter der einzelnen Probanden wurde in diesem Fall also nicht berücksichtigt.

Bei Berechnung der durchschnittlichen Differenz erhält man einen Wert von ungefähr 2,32 T/C-Werten, dies entspricht dem Bereich, in dem auch der Gipfel des Histogramms liegt. Das Histogramm fällt zu beiden Seiten des Gipfels relativ schnell und gleichmäßig ab. Die Standardabweichung beträgt ungefähr 3,00 T/C-Werte, nahezu alle Werte liegen somit innerhalb des Bereich, der vom Maximum aus zu beiden Seiten hin durch die doppelte Standardabweichung begrenzt wird.

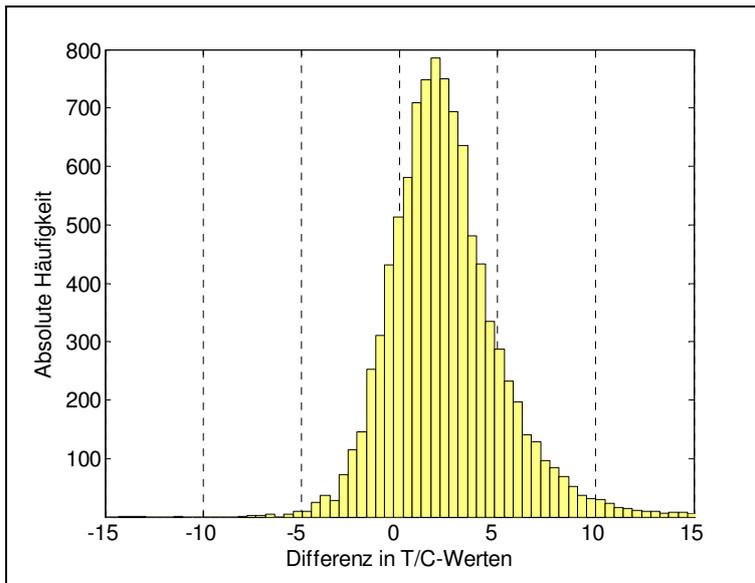


Abbildung 16: Differenz zwischen Mittelwert und Median

Die Differenz zwischen Mittelwert und Median in T/C-Werten (X-Achse) ist gegen die absolute Häufigkeit der Werte in der jeweiligen Kategorie (Y-Achse) aufgetragen und als Histogramm dargestellt.

2.2 Chromosomenspezifische Betrachtung des Medians

Eine differenzierte chromosomenspezifische Auswertung erfolgte nur für den Median, da dieser am wenigsten empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Hierfür wurden für jeden Probanden die Daten eines Chromosomenarms im Median zusammengefasst.

Das dreidimensionale Auftragen des Medians hinsichtlich gemessenem T/C-Wert, Alter und Chromosomenarm ergibt eine Punktwolke, die zeigt, dass es tendenziell bei allen Chromosomen zu einer Verkleinerung der T/C-Werte mit zunehmendem Alter kommt. Beim Betrachten der Ebene, die durch diese Punktwolke gelegt wurde, macht die Farbkodierung deutlich, wie die T/C-Werte mit zunehmendem Alter kleiner werden (Abbildung 17). Der rote Bereich zeigt hohe T/C-Werte an, während die grüne Zone niedrige T/C-Werte repräsentiert. Der Übergang ist gelb dargestellt. Die Linien auf der X-Y-Ebene sind die Projektionen der dreidimensional dargestellten Ebene. Zusätzlich zur Verringerung der T/C-Werte

mit zunehmendem Alter zeigen diese ebenfalls farbkodierten Projektionen einen schrägen Verlauf. Die am Anfang des Karyogramms liegenden größeren Chromosomen weisen somit im Schnitt etwas höhere Werte als die kleineren Chromosomen auf, die Ebene liegt also etwas schräg im Raum.

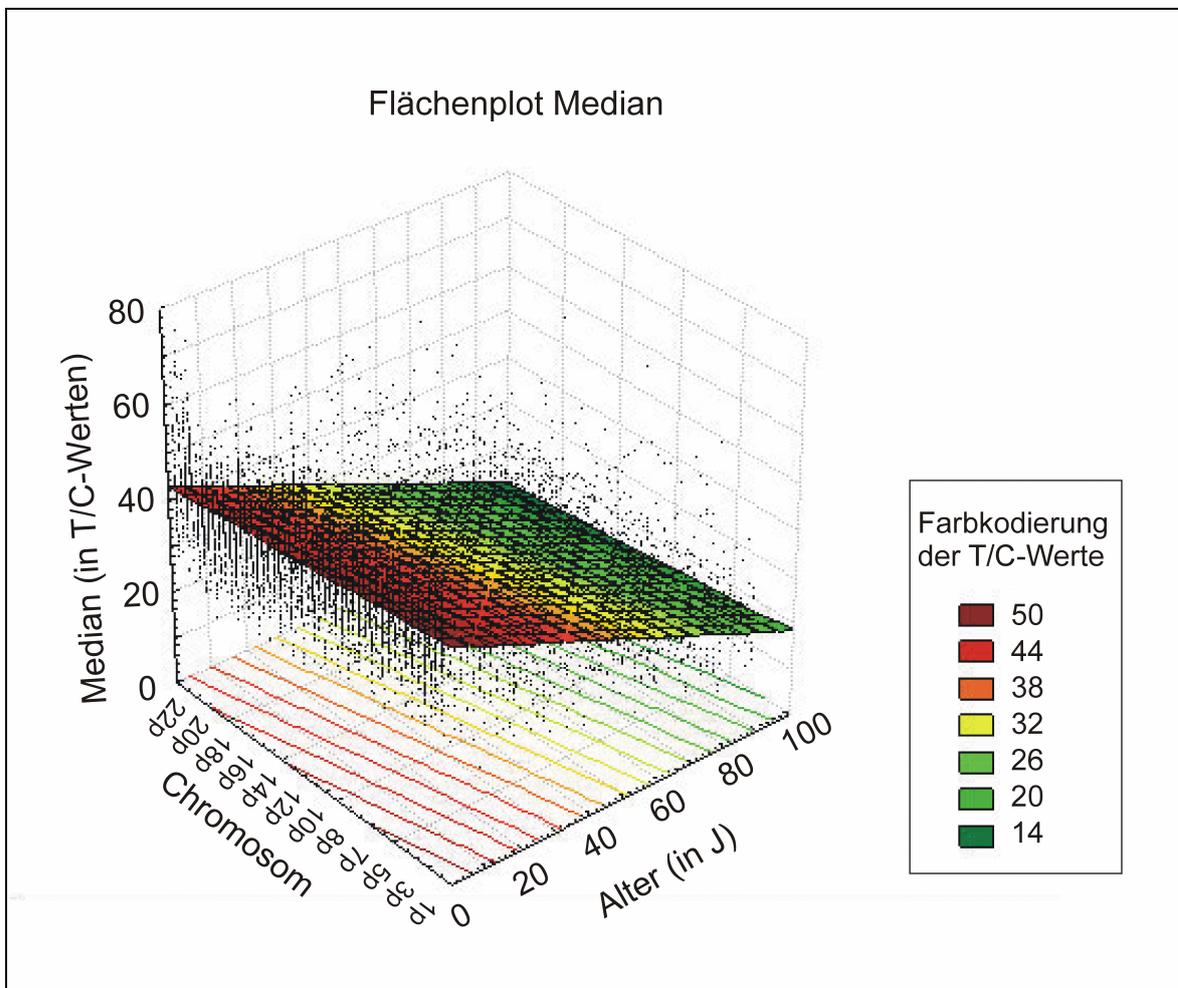


Abbildung 17: Dreidimensionale Punktwolke des Medians

Das Alter ist auf der X-Achse, das betreffende Chromosom auf der Y-Achse und der T/C-Wert auf der Z-Achse angegeben. Die Chromosomen sind in der Reihenfolge 1p bis 7q, Xp und Xq, 8p bis 22q sowie Yp und Yq angegeben, jeder sechste Chromosomenarm ist beschriftet.

Zusätzlich zu den einzelnen Punkten ist eine farbkodierte Ebene eingezeichnet. Der T/C-Wert, dem die einzelnen Farben entsprechen, ist der Legende zu entnehmen.

Eine differenzierte Beobachtung ist in dieser Darstellungsform allerdings noch nicht möglich. Erst die Auftrennung in einzelne Regressionsgeraden erlaubt eine genaue Verlaufsbeurteilung, da hier für jeden einzelnen Chromosomenarm der

Ausgangswert und die Steigung berechnet werden kann und somit genaue Aussagen über den Verlauf der einzelnen Chromosomenarme in Bezug auf das Alter getroffen werden können.

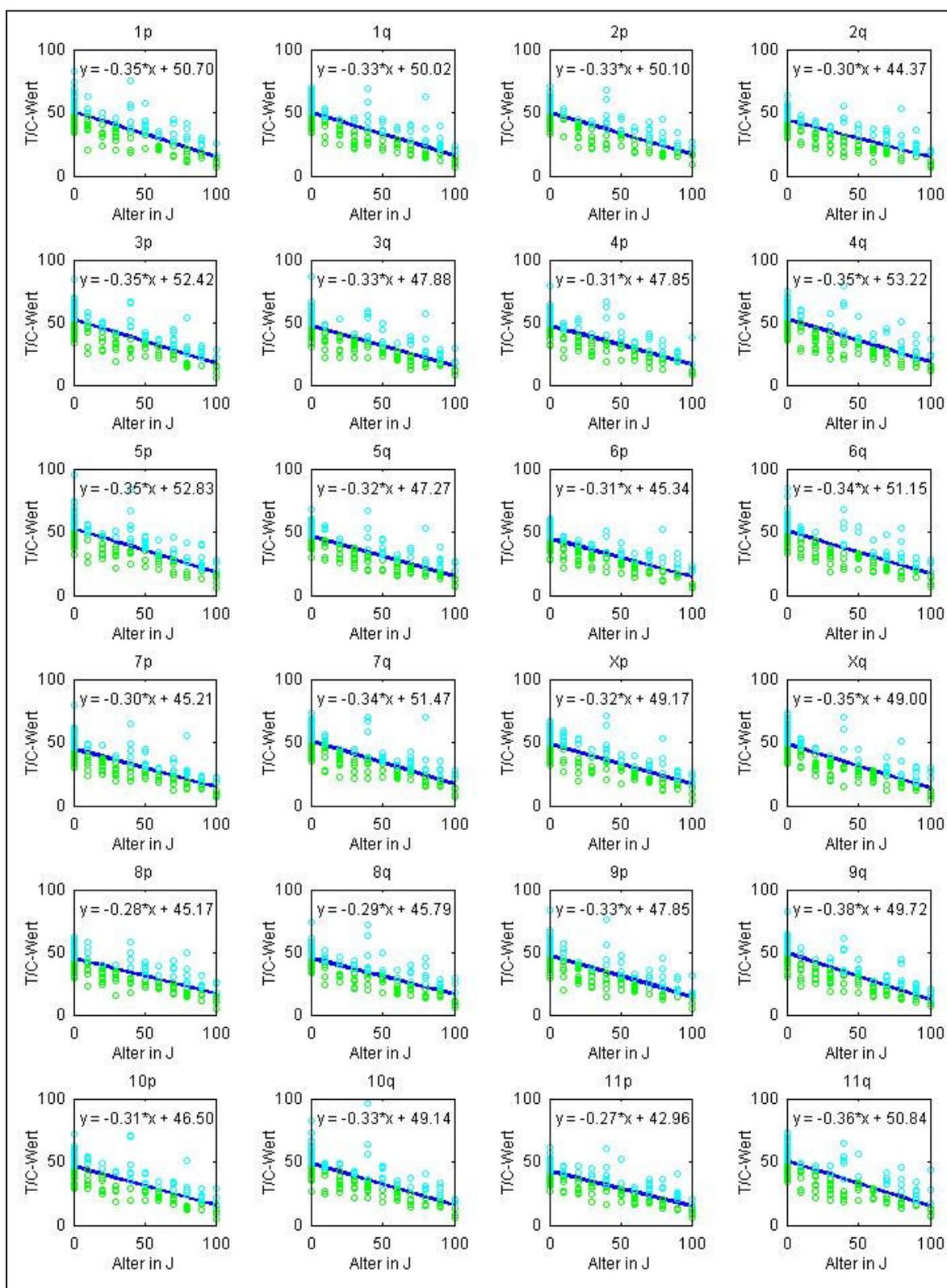
2.3 Regressionsgeraden der einzelnen Chromosomenarme

Um die einzelnen Chromosomenarme präzise vergleichen zu können, wurden die bereits oben in der dreidimensionalen Grafik vorliegenden Medianwerte verwendet. Für jeden Chromosomenarm konnte unter Bezugnahme auf das Alter und den errechneten T/C-Wert eine Regressionsgerade ermittelt werden, die den Vergleich mit den anderen erlaubt. Die Korrelationskoeffizienten aller untersuchten Chromosomenarme lagen durchschnittlich bei $r = -0,78$, das gesamte Intervall liegt zwischen $r = -0,69$ und $r = -0,84$, es ist also in jedem Fall eine deutliche negative Korrelation zu finden.

Hinsichtlich der Ausgangslänge der Chromosomenarme bei Neugeborenen lässt sich feststellen, dass hier 12q mit 53,69 T/C-Werten, also etwa 13,5 kb, der längste und 18p mit 39,19 T/C-Werten und somit 10,5 kb der kürzeste Arm ist. Im Alter von 100 Jahren dagegen ist 18q mit 19,51 T/C-Werten der längste und 19p mit 9,75 T/C-Werten der kürzeste, was einem Wert von ungefähr 6,5 kb beziehungsweise 4,5 kb entspricht. Durch die Steigung der Regressionsgeraden kann zudem eine Aussage über die Verkürzungsgeschwindigkeiten der Chromosomenarme getroffen werden. Die größte negative Steigung, das heißt die schnellste Verkürzungsgeschwindigkeit, weist hier 22p mit einer Steigung von -0,39 auf, am langsamsten verkürzt sich 18p mit einer Steigung von -0,22.

Aus diesen Werten lässt sich der durchschnittliche Verlust in Basenpaaren pro Jahr ermitteln, der für 22p in etwa 80 bp und für 18p ungefähr 45 bp beträgt. Interessant ist hier, dass 18p bei Neugeborenen zwar der kürzeste Arm ist, aber gleichzeitig die geringste Verkürzungsgeschwindigkeit aufweist, so dass er bei 100-Jährigen der achtlängste Arm ist.

Allgemein unterscheiden sich die einzelnen Chromosomenarme bezüglich ihrer Steigung zum Teil stark voneinander. Auch ihre durchschnittliche Länge bei Neugeborenen und 100-Jährigen ist unterschiedlich. Sie sind weder in ihrem Absolutwert noch in ihrem Verlauf identisch, so dass ein altersbezogener Durchschnittswert zunächst nur unter Zuhilfenahme des Ausgangswertes bei Neugeborenen und der Steigung der Regressionsgeraden ermittelt werden kann.



Fortsetzung siehe nächste Seite

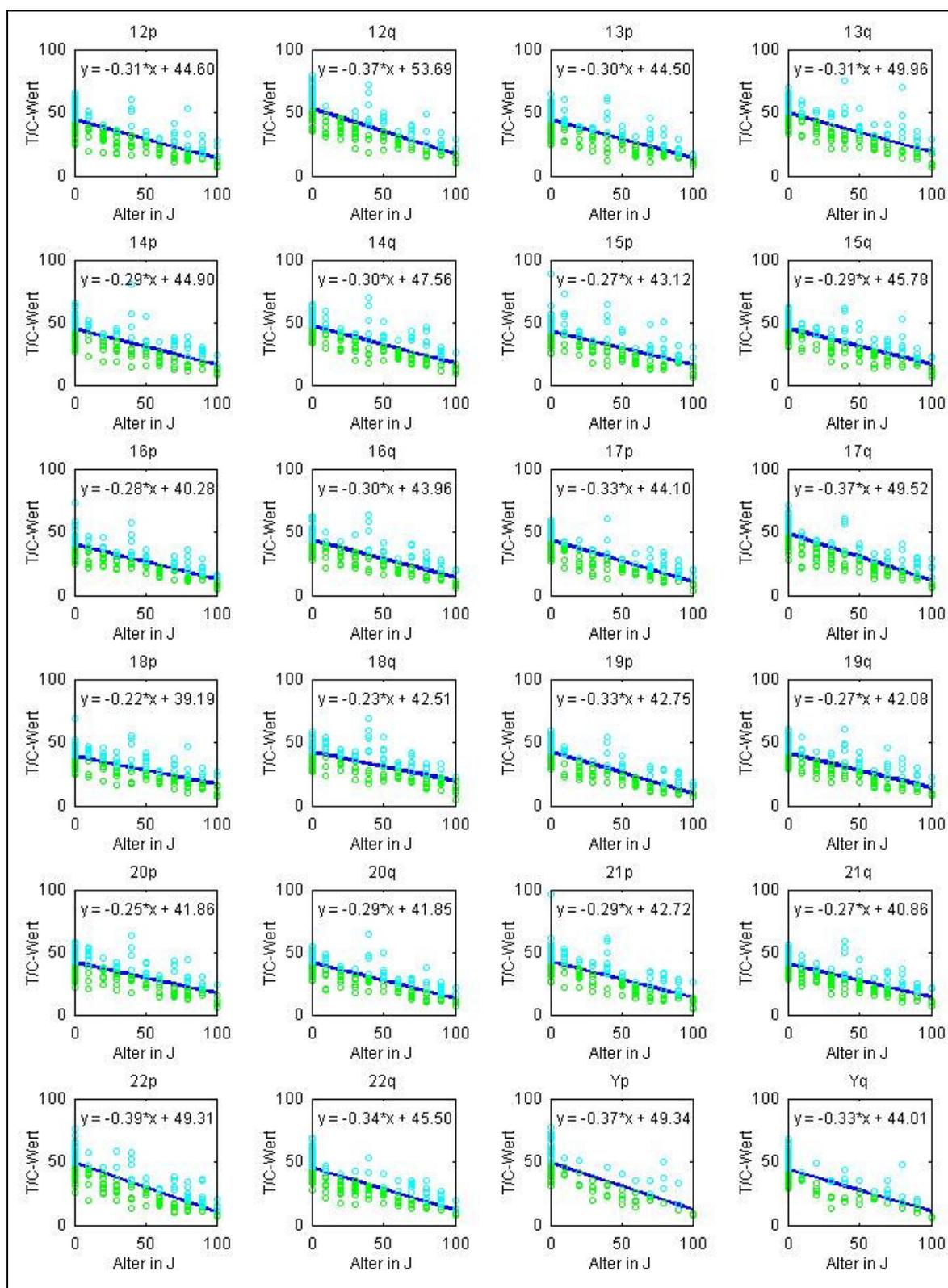


Abbildung 18: Regressionsgeraden der einzelnen Chromosomenarme

Die Überschrift gibt den Chromosomenarm an. Die Regressionsgerade ist blau dargestellt, ihre Gleichung ist in der Grafik angegeben. Oberhalb der Regressionsgeraden liegende Werte sind türkis, unterhalb liegende grün dargestellt.

Zusätzlich wurde nun aber die Art der Beziehung zwischen dem Y-Achsenabschnitt, also der durchschnittlichen Ausgangslänge bei Neugeborenen, und der Steigung der Regressionsgeraden untersucht. Aus der Korrelation ergibt sich für diese Daten ein Korrelationskoeffizient r von $-0,80$. Somit besteht ein relativ starker Zusammenhang zwischen der Ausgangslänge und der Steigung der Regressionsgeraden. Je größer also die Ausgangslänge eines Chromosomenarms ist, umso größer ist dem Betrag nach im Allgemeinen auch seine Steigung. Umgekehrt weisen diejenigen Chromosomenarme, die bei den Neugeborenen kürzere Telomere haben, in der Regel eine geringere Steigung auf. Auch diese Beziehung zwischen Y-Achsenabschnitt und Steigung der einzelnen Chromosomenarme lässt sich mittels linearer Regression beschreiben, es resultiert die Formel $y = -79,54x + 21,59$, wobei x die Steigung des Chromosomenarms und y den dazugehörigen Y-Achsenabschnitt repräsentiert.

Obwohl auf den ersten Blick keine Gesetzmäßigkeit erkennbar war, besteht eine Beziehung zwischen der durchschnittlichen Ausgangslänge der Telomere eines Chromosomenarms und seiner mittleren Verkürzungsgeschwindigkeit. Dieser ist dergestalt, dass es bei bezüglich ihrer Ausgangslänge längeren Telomeren zu einer schnelleren Verkürzung, bei den im Neugeborenenalter aber bereits kürzeren zu einem langsameren Längenabfall kommt.

2.4 Boxplots der Chromosomen

Die einzelnen Chromosomenarme wurden auch hinsichtlich ihrer Lagemaße verglichen. Dazu wurden Boxplots verwendet, in denen Median, erstes Quartil, drittes Quartil sowie Minimum und Maximum dargestellt sind, wobei alle Messwerte verwendet wurden, die für die einzelnen Chromosomenarme vorlagen. Die Boxplots wurden nach der Größe ihres Medians geordnet. Bezüglich des Medians wies 4q mit $43,7$ T/C-Werten den höchsten T/C-Wert auf (siehe Abbildung 19). Den mit Abstand kleinsten T/C-Wert hatte dagegen der Chromosomenarm 19p mit $31,2$ T/C-Werten.

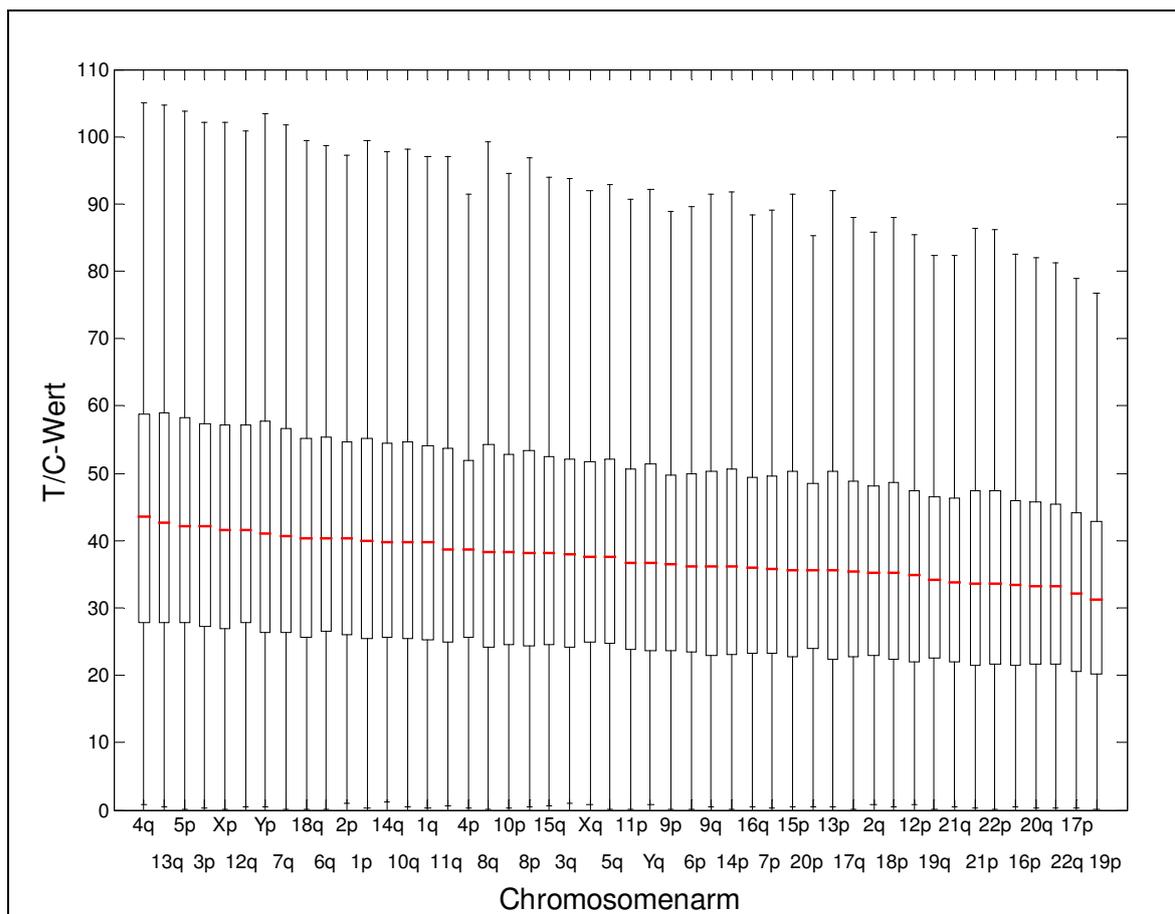


Abbildung 19: Boxplots der einzelnen Chromosomenarme

Eingezeichnet sind Median, Q_1 , Q_3 , Minimum und Maximum. Der Median, nach dem die einzelnen Chromosomenarme geordnet sind, ist in rot dargestellt. Die X-Achse enthält die Beschriftung der Chromosomenarme, auf der Y-Achse sind die T/C-Werte aufgetragen.

Zudem fielen die der Größe nach geordneten Medianwerte fast kontinuierlich ab. Größere Sprünge zwischen den benachbarten Chromosomenarmen konnten nicht beobachtet werden. Die Werte für Q_1 und Q_3 verhielten sich sehr ähnlich, auch hier war der Chromosomenarm 19p mit 20,2 respektive 42,9 T/C-Werten der kürzeste. Den höchsten Wert für Q_1 besaß dagegen 12q mit 27,9 T/C-Werten, den höchsten Wert für Q_3 13q mit 58,9 T/C-Werten. Die Unterschiede zu 4q waren hier jedoch nur marginal (im Bereich von etwa 0,1 T/C-Werten).

Auch Abbildung 20 zeigt die Kontinuität im Abfall der Lagemaße. Hier wurden nur Median sowie die dazugehörigen Werte für Q_1 und Q_3 eingezeichnet. Die Werte liegen sehr nahe an den Geraden, die den durchschnittlichen Verlauf der Werte

beschreiben. Alle Medianwerte liegen, abgesehen vom größten und kleinsten Wert, praktisch vollständig auf der Geraden, und auch bei den korrespondierenden Werten für Q_1 und Q_3 finden sich sehr wenige größere Sprünge. Diese Tatsache bilden die Korrelationskoeffizienten zwischen den nach Größe des Medians geordneten Chromosomenarmen und den entsprechenden Lagemaßen sehr gut ab. Es resultiert ein r von $-0,99$ für den Median sowie jeweils $-0,98$ für Q_1 und Q_3 . Alle Korrelationskoeffizienten liegen also nahezu bei eins, was für ein sehr hohes Maß an Konkordanz zwischen Median und den anderen beiden Kenngrößen spricht.

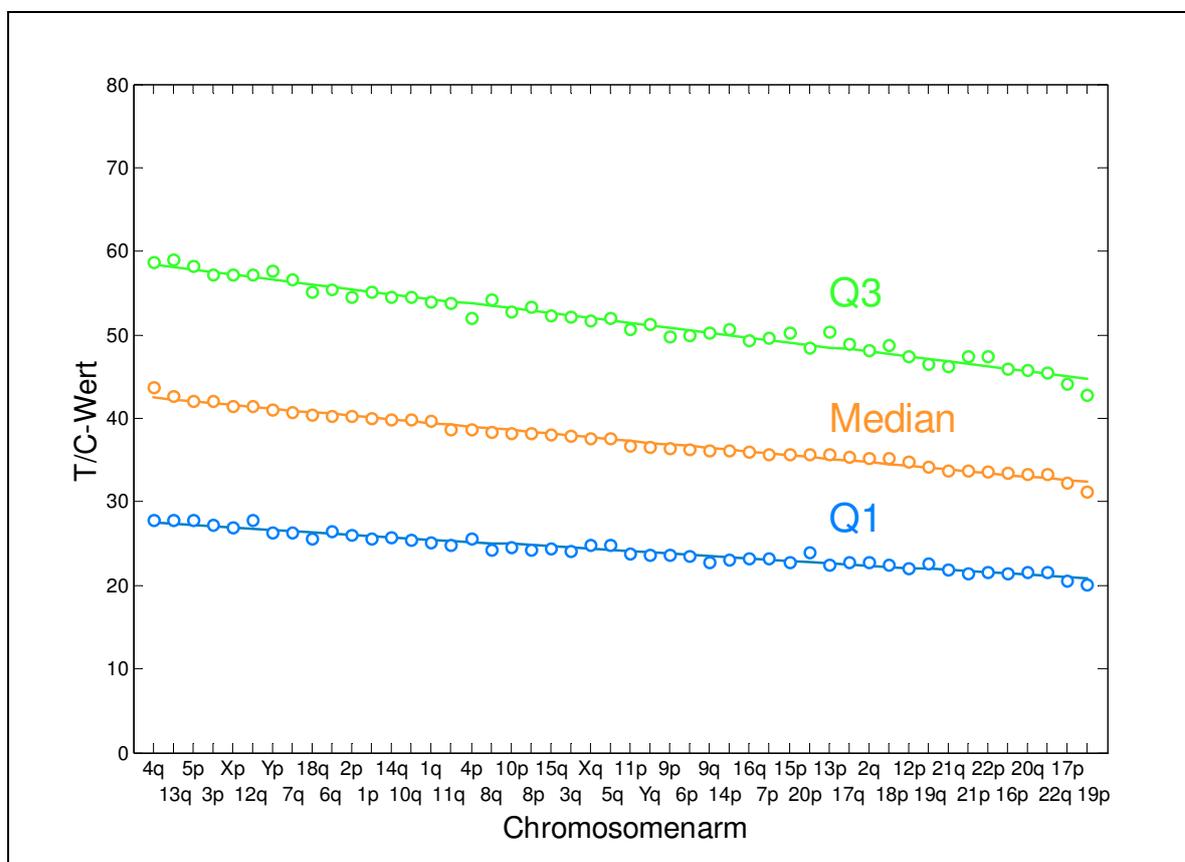


Abbildung 20: Veränderung von Q_1 und Q_3 bei fallendem Median

Auf der X-Achse sind die Chromosomenarme, auf der Y-Achse der dazugehörige T/C-Wert dargestellt. Das erste Quartil ist in blau, der Median in orange und das dritte Quartil in grün eingezeichnet. Die dazugehörigen Geraden haben die gleiche Farbe.

Im Anhang finden sich außerdem Boxplots, die sowohl nach den Chromosomenarmen als auch nach Alter aufgetrennt sind. Der Verlauf der Boxplots der

Chromosomenarme im Vergleich ist mit zunehmendem Alter insgesamt sehr ähnlich. Bezüglich der Form der Boxen und ihrer Zuordnung zu den einzelnen Altersgruppen bestehen keine größeren Unterschiede. Eine lineare Anpassung dieser Daten mittels Regressionsanalyse erfolgte bereits, so dass die oben durchgeführte globale Betrachtung am sinnvollsten erschien.

3. Getrennte Betrachtung männlicher und weiblicher Probanden

3.1 Betrachtung aller Chromosomen

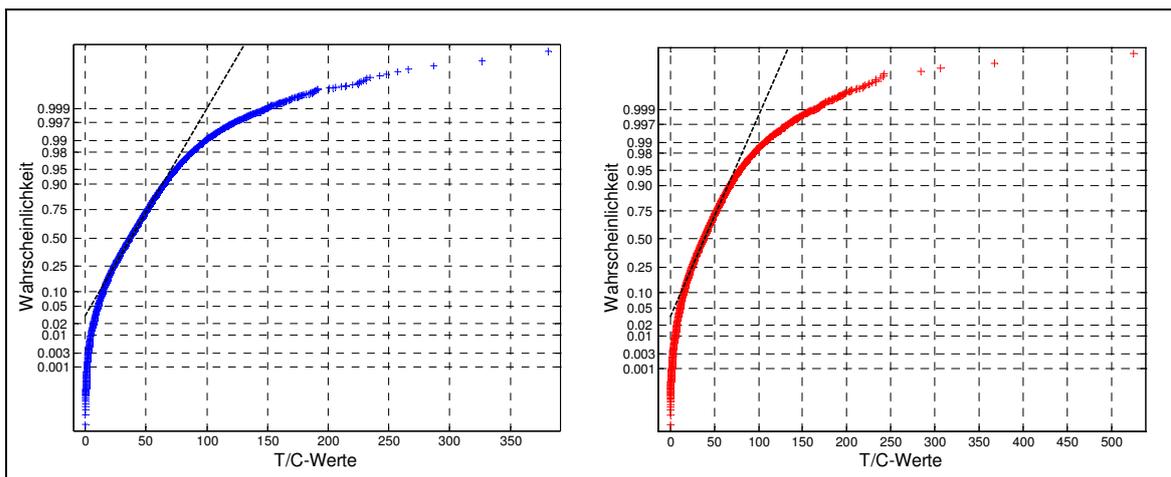


Abbildung 21: Normplots für Männer und Frauen

Der Normplot für die Daten der männlichen Probanden ist links, der für die weiblichen Probanden rechts dargestellt. Die Daten (blau beziehungsweise rot) weichen stark von der ermittelten Normalverteilung (schwarz) ab.

Nachdem alle Werte in ihrer Gesamtheit bereits auf Normalverteilung hin untersucht wurden (siehe 1.2), wurden die Daten der männlichen und die der weiblichen Probanden jetzt getrennt ausgewertet. Die Daten sind hier, wie aus den Normplots ersichtlich ist, ebenfalls nicht normalverteilt. Auch der Lilliefors-Test bestätigt die Alternativhypothese.

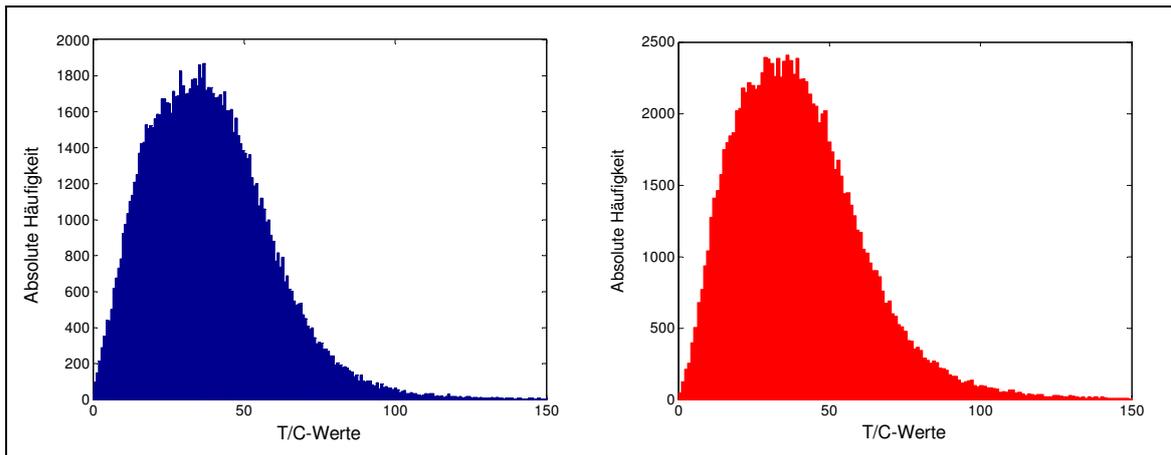


Abbildung 22: Histogramme für Männer und Frauen

Histogramm für Daten der männlichen (links) und der weiblichen Probanden (rechts). Die T/C-Werte sind auf der X-Achse in Kategorien eingeteilt, die absolute Häufigkeit der Werte findet sich auf der Y-Achse.

Auch die Histogramme lassen dies vermuten. Für die Formmaße ergab sich bei den männlichen Probanden eine Schiefe von 1,10 und eine Kurtosis von 4,13, bei den weiblichen eine Schiefe von 1,32 und eine Kurtosis von 6,13. Im Vergleich dazu wurde ohne eine Differenzierung nach Geschlecht eine Schiefe von 1,22 bei einer Kurtosis von 5,25 ermittelt.

Diese Maße sind hier also für männliche und weibliche Probanden unterschiedlich. Interpolation, Normierung und Übereinanderlegen der Kurven (Abbildung 23) visualisieren die Abweichung der Histogramme von der Normalverteilung und den Geschlechtsunterschied in der Verteilung der T/C-Werte, der auch statistisch hochsignifikant ist. Interessanterweise sind aber trotz der unterschiedlichen Formmaße die linken Seiten der Kurven für Männer und Frauen nahezu deckungsgleich.

Die beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Telomerlänge scheinen also nicht darauf zu beruhen, dass kürzere Telomere unterschiedlich häufig vorkommen, sondern darauf, dass längere Telomere bei Frauen häufiger sind.

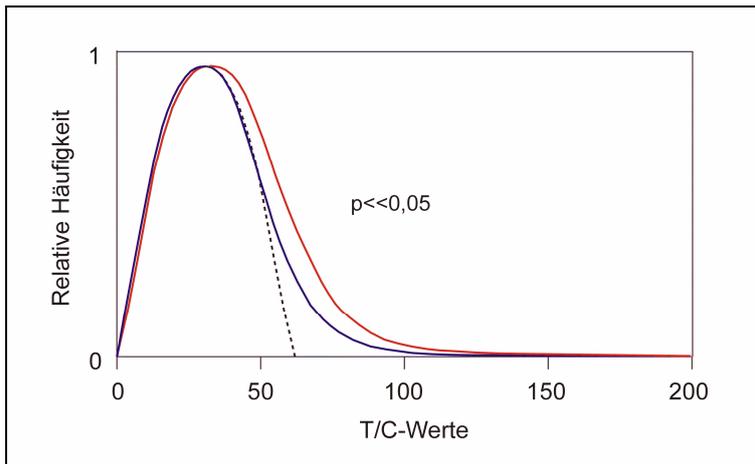


Abbildung 23: Schematischer Histogrammvergleich

Verlauf der Histogramme der männlichen (blau) und der weiblichen Probanden (rot), dargestellt in auf dasselbe Maximum normierten Kurven. Die T/C-Werte sind auf 200 limitiert. Außerdem ist eine theoretische Normalverteilung eingezeichnet (schwarz gestrichelte Linie) und der p-Wert angegeben.

3.2 Vergleich der männlichen und der weiblichen Medianwerte

Zum Vergleich männlicher und weiblicher Probanden wurde der Median jedes Chromosomenarms sowohl nach Alter als auch nach Geschlecht differenziert. Hieraus resultierten 4738 Medianwerte für weibliche und 4896 Medianwerte für männliche Probanden.

Lineare Regression ergab eine Geradengleichung von $y = -0,30x + 47,38$ bei Frauen und $y = -0,33x + 46,04$ bei Männern, wobei der Unterschied zwischen den beiden Geraden auch statistisch signifikant ist. Bei Frauen ist der Ausgangswert um einiges größer als bei Männern, und auch die Steigung der Geraden ist weniger negativ. Folglich divergieren die beiden Regressionsgeraden mit zunehmendem Alter immer mehr.

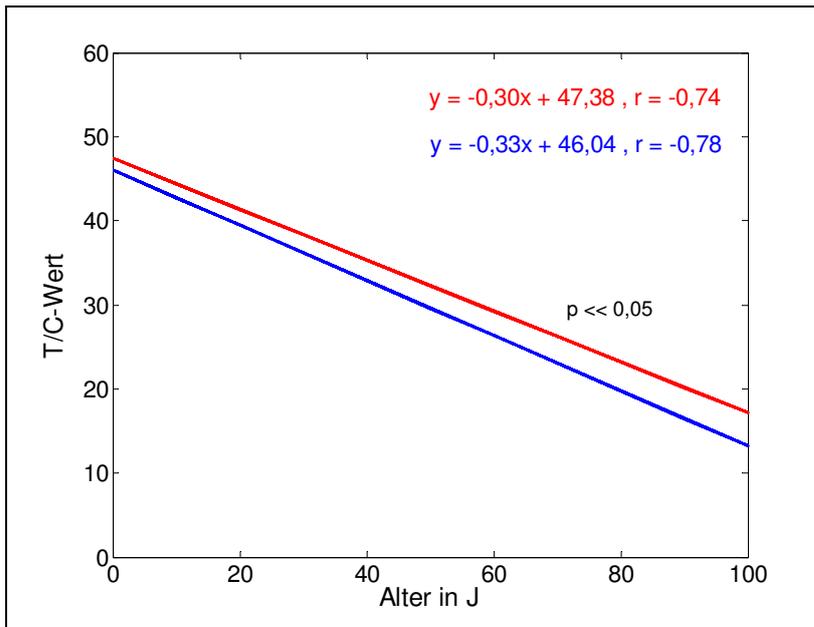


Abbildung 24: Geschlechtsspezifische Regressionsgeraden des Medians

Regressionsgeraden der Medianwerte, getrennt nach männlichen (blau) und weiblichen Probanden (rot). In der Abbildung sind die Gleichungen der Regressionsgeraden, der dazugehörige Korrelationskoeffizient r und der p -Wert angegeben.

Der durchschnittliche pangenomische T/C-Wert von 50-jährigen Frauen beträgt zum Beispiel 32,3, dies ist ein Wert, der bei Männern bereits in einem Alter von 41,9 Jahren erreicht wird. In einem Alter von 80 Jahren kommen Frauen im Schnitt auf einen T/C-Wert von etwa 23,2. Männer, die in etwa dieselbe Telomerlänge aufweisen, sind nur 69,6 Jahre alt. Die Differenz zwischen der durchschnittlichen Telomerlänge der männlichen und der weiblichen Probanden beläuft sich auf etwa 2,65 T/C-Werte bei 50-, 3,43 bei 80-, sowie 3,95 bei 100-Jährigen. In Basenpaaren ausgedrückt, beträgt der Unterschied in der Telomerlänge bei Frauen und Männern im Alter von 50 Jahren noch 540 bp, bei 80-Jährigen bereits 700 bp. Bei 100-Jährigen ist der Unterschied zwischen Männern und Frauen auf etwa 800 bp angestiegen. Frauen verlieren durchschnittlich 62 bp pro Jahr, bei Männern sind es dagegen 67 bp.

Die pangenomische Telomererosion ist bei Männern also in jedem Alter stärker ausgeprägt als bei Frauen, und auch der Absolutwert ihrer durchschnittlichen Telomerlänge ist geringer.

3.3 Chromosomenspezifische Betrachtungen

Unter Einbeziehung der chromosomalen Zuordnung erhält man für oben genannte Daten weitergehende Informationen über den Verlauf des Medians. Analog zu 2.2 wurden auch hier zunächst dreidimensionale Punktwolken gebildet, die allerdings für männliche und weibliche Probanden getrennt ausgewertet wurden. Durch diese Punktwolken wurden Ebenen gelegt, eine rote für die Daten der weiblichen sowie eine blaue für die der männlichen Probanden. Um den Verlauf der beiden Ebenen im Vergleich besser erkennen zu können, wurde in dieser Darstellung auf das Einzeichnen der Punkte selbst verzichtet.

Der Verlauf der Ebenen (Abbildung 25) zeigt, zunächst, dass Frauen tendenziell höhere T/C-Werte aufweisen als Männer, die rote Ebene also in Z-Richtung durchweg höher liegt als die blaue. Die beiden Ebenen verlaufen dabei aber nicht parallel. Schon die Werte für den Median bei Neugeborenen sind, chromosomenbezogen, unterschiedlich. Die größeren Chromosomen weisen im Schnitt bereits bei Neugeborenen höhere Werte auf als die kleineren, wobei der Abfall der T/C-Werte von den großen zu den kleinen Chromosomen bei Männern geringer ist als bei Frauen, so dass beide Ebenen schräg im Raum liegen, in der Y-Achse aber zusätzlich nach hinten hin konvergieren. Diese Tendenz setzt sich bis zu den 100-Jährigen fort. Mit zunehmendem Alter kommt allerdings noch eine zweite Komponente hinzu. In Richtung der X-Achse fallen die beiden Ebenen nämlich ebenfalls unterschiedlich steil ab, die Ebene der weiblichen Probanden verläuft flacher als die der männlichen. Bezüglich des Altersaspektes divergieren die beiden Ebenen also.

Insgesamt werden somit Unterschiede in der Lage der beiden Ebenen deutlich, die sowohl die absoluten T/C-Werte als auch den Altersverlauf sowie chromosomale Gesichtspunkte betreffen.

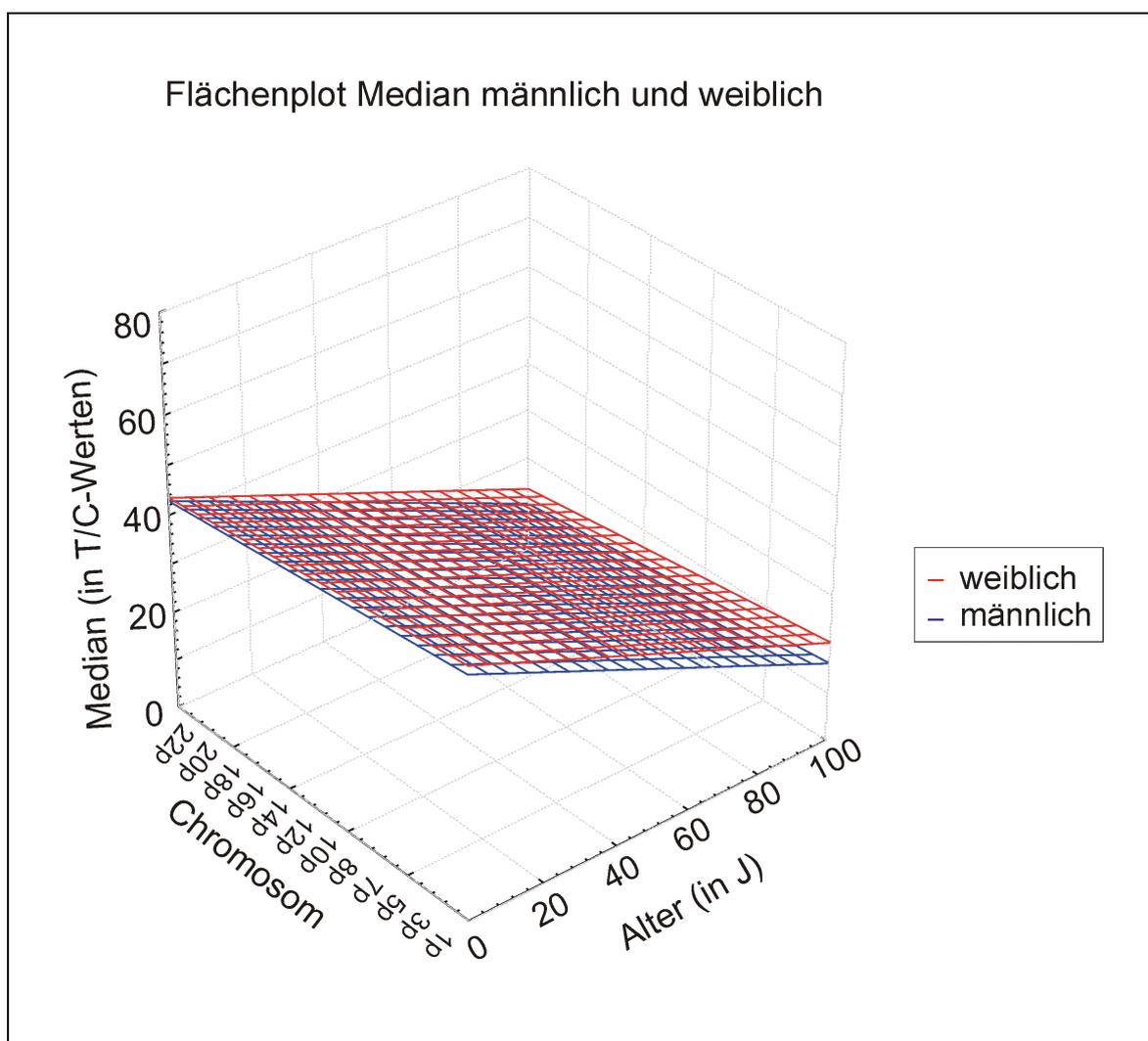


Abbildung 25: Dreidimensionaler Verlauf des Medians bei Männern und Frauen

Die X-Achse gibt das Alter der Probanden, die Y-Achse das betreffende Chromosom und die Z-Achse den entsprechenden T/C-Wert an. Die Chromosomen sind in der Reihenfolge 1p bis 7q, Xp und Xq, 8p bis 22q sowie Yp und Yq angegeben, jeder sechste Chromosomenarm ist beschriftet. Die blaue Ebene entspricht dem Verlauf des Medians bei männlichen, die rote dem bei weiblichen Probanden.

Die Ebenen können somit schon eine orientierende Beurteilung des chromosomenspezifischen Verlaufs der Medianwerte männlicher und weiblicher Probanden liefern. Genauere Aussagen lassen sich allerdings erst durch separate, nach Geschlecht differenzierte Regressionsgeraden für jeden Chromosomenarm machen.

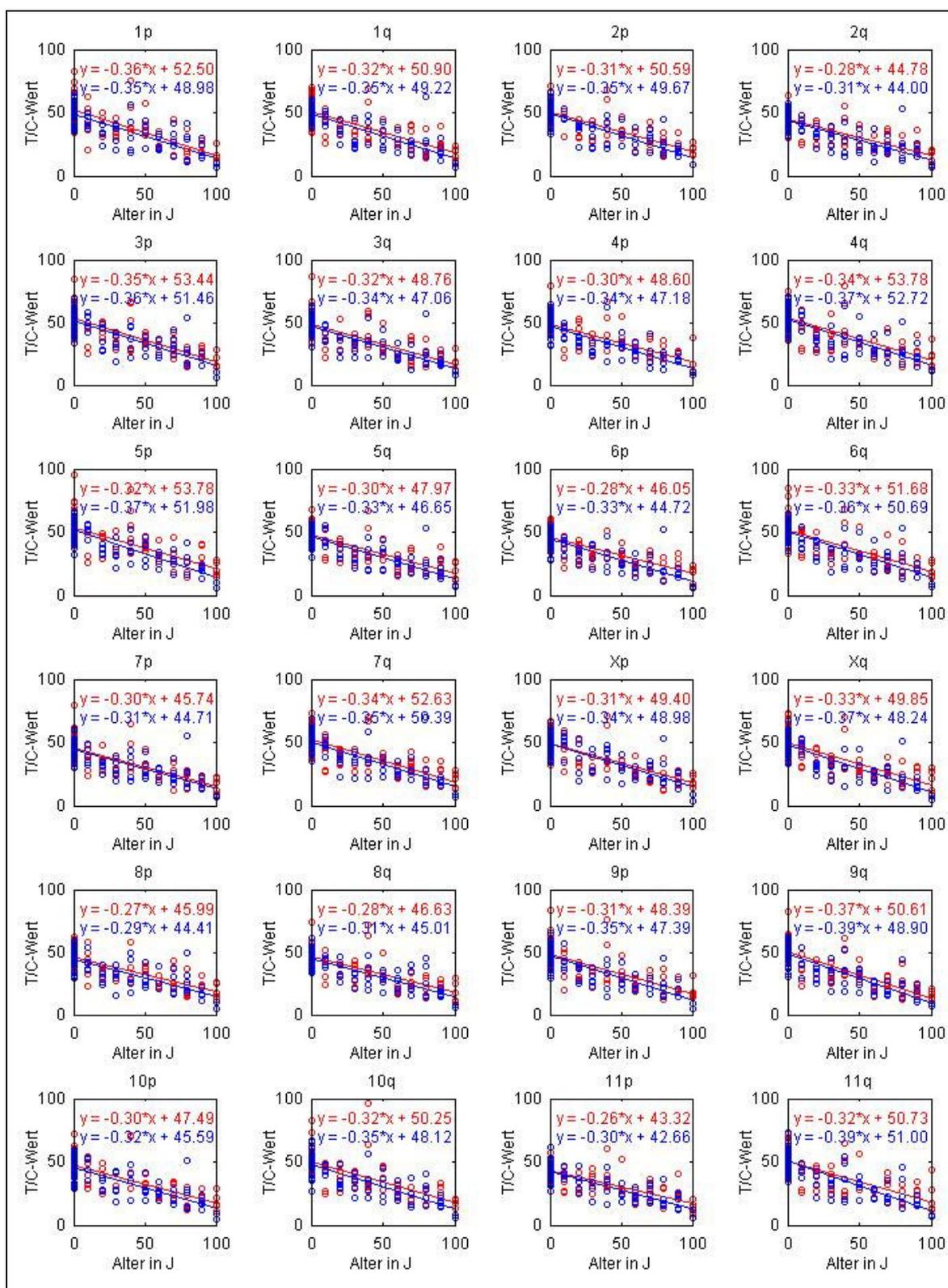
3.4 Regressionsgeraden männlich und weiblich

Das Geschlecht der untersuchten Probanden bildete auch hier die Grundlage für eine Auftrennung des untersuchten Kollektivs. Die Daten jedes Chromosomenarms wurden sowohl für die Männer als auch für die Frauen als Punkte unter Einbeziehung des Alters und der dazugehörigen T/C-Werte aufgetragen. Mittels linearer Regression wurden Ausgleichsgeraden ermittelt, die dann bezüglich ihres Verlaufs bei Männern und Frauen direkt verglichen werden konnten.

Auch hier ist die erwartete negative Beziehung zwischen Telomerlänge und Alter zu finden. Für weibliche Probanden können chromosomenspezifische Korrelationskoeffizienten von durchschnittlich $-0,76$ gefunden werden, mit einem maximalen r von $-0,84$ und einem minimalen von $-0,65$, für männliche Probanden liegen die Werte durchschnittlich bei $-0,8$, maximal bei $-0,86$ und minimal bei $-0,71$.

Generell liegen die aus den Regressionsgeraden bestimmten Werte bei weiblichen Neugeborenen höher, wobei bei dem Chromosomenarm 22q der Abstand mit $5,42$ T/C-Werten, also in etwa 1100 bp am höchsten ist. Eine Ausnahme bildet nur 11q, das bei den männlichen Neugeborenen mit $51,0$ T/C-Werten $0,27$ T/C-Werte höher liegt, was einer Basenpaardifferenz von $55,1$ bp entspricht. Bei den 100-Jährigen liegen die Werte für Frauen immer höher, der größte Unterschied besteht bei 5p mit $6,8$ T/C-Werten und somit in etwa 1387 bp, der geringste bei 22q mit $0,42$ T/C-Werten beziehungsweise $85,7$ bp.

Die Verkürzungsgeschwindigkeit, die sich über die Steigung der Regressionsgeraden bestimmen lässt, ist bei den weiblichen Probanden in der Regel geringer als bei den männlichen. Nur bei 22q und, in weitaus geringerem Ausmaße, 1p zeigt sich bei männlichen Probanden ein flacherer Verlauf der Regressionsgeraden. Eine weitere Ausnahme bilden 13q und 22p, hier laufen die Regressionsgeraden bei männlichen und weiblichen Probanden weitgehend parallel.



Fortsetzung siehe nächste Seite

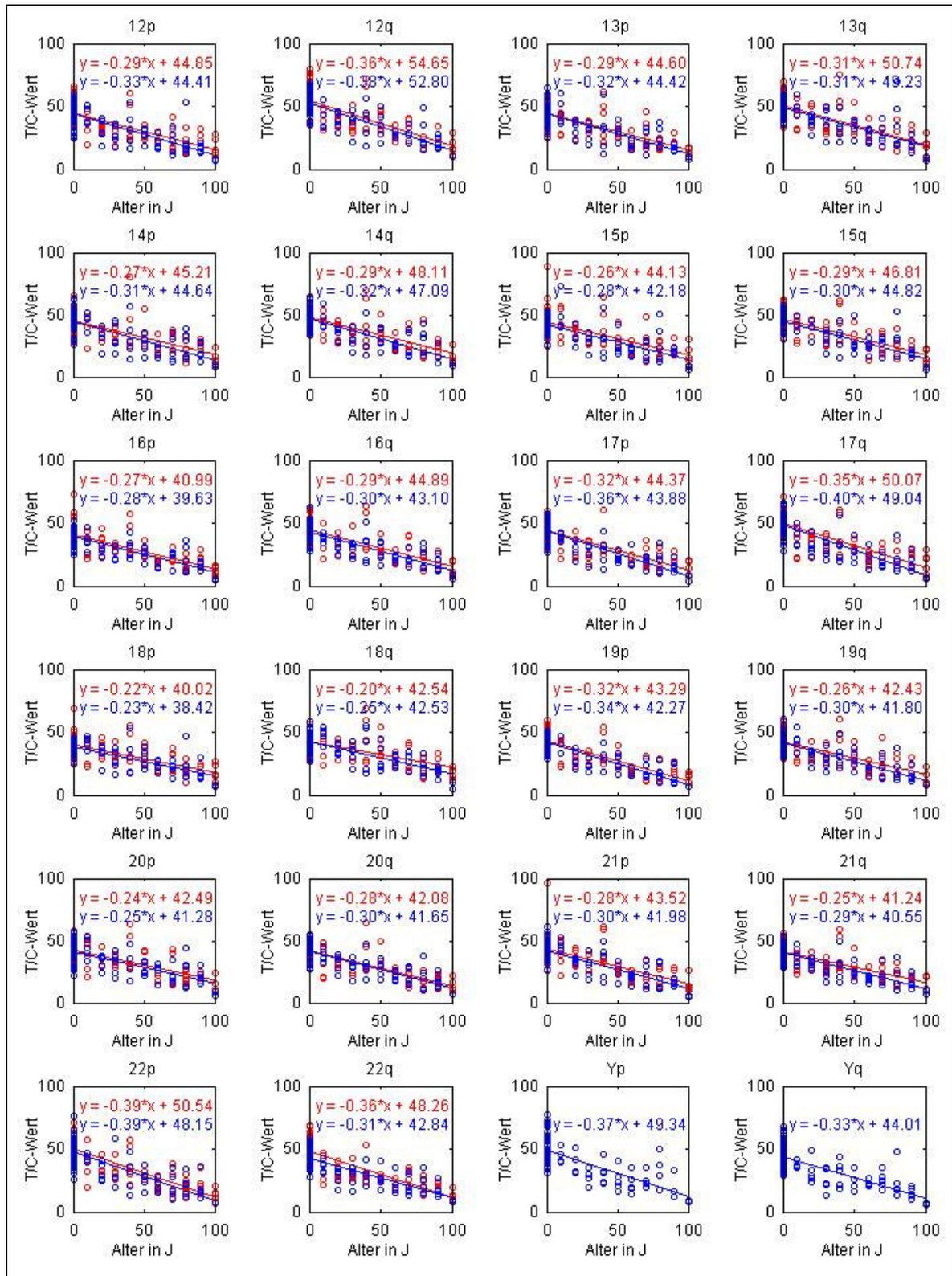


Abbildung 26: Geschlechtsspezifische Regressionsgeraden der Chromosomenarme

Die Überschrift gibt den Chromosomenarm an. Die Regressionsgerade für männliche Probanden ist in blau gehalten, die für weibliche in rot. Ihre Gleichung ist in der Grafik angegeben.

Wenn man die Absolutlängen der Chromosomenarme betrachtet, ist bei weiblichen und bei männlichen Neugeborenen 12q mit 54,65 T/C-Werten, also 13,66 kb, beziehungsweise 52,8 T/C-Werten, also 13,3 kb, jeweils der mit Abstand längste Arm. Der kürzeste Chromosomenarm ist bei beiden Geschlechtern ebenfalls identisch, nämlich 18p mit 40,0 respektive 38,4 T/C-Werten, also 10,7 beziehungsweise 10,3 kb. Bei den 100-Jährigen zeigt sich diese Kohärenz jedoch nur noch zum Teil. Auch hier ist sowohl bei Frauen als auch bei Männern 18q mit 22,5 und 17,5 T/C-Werten (7100 bp und 6080 bp) der längste Chromosomenarm. Der kürzeste Arm dagegen differiert bei den beiden Geschlechtern, bei den weiblichen Probanden ist es 19p mit 11,3 T/C-Werten (4810 bp), bei den männlichen hingegen 17p mit 7,9 T/C-Werten (4190 bp), wobei 19p der zweitkürzeste Arm ist.

Was die durchschnittlichen Verkürzungsgeschwindigkeiten anbelangt, verkürzt sich bei Frauen 18q mit einer Steigung von -0,2 am langsamsten; dies entspricht einem jährlichen Basenpaarverlust von etwa 41 bp. Die größte Verkürzungsgeschwindigkeit weist 22p mit einer Steigung von -0,39 auf, also einem Verlust von fast 80 bp pro Jahr. Bei den Männern erodieren dagegen die Telomere des Chromosomenarms 18p mit einer Steigung von -0,23 am langsamsten sowie die des Chromosomenarms 17q mit einer Steigung von -0,4 am schnellsten. Dies bedeutet umgerechnet einen Basenpaarverlust von 46,9 bp beziehungsweise 81,6 bp pro Jahr.

Es besteht also sowohl bei Männern als auch bei Frauen ein erheblicher Unterschied in den Verkürzungsgeschwindigkeiten der einzelnen Chromosomenarme.

Wie bereits unter 2.3 wurde auch jetzt die Art der Beziehung zwischen dem Ausgangswert bei Neugeborenen und der ermittelten Steigung untersucht. Diese beiden Werte wurden für jeden Chromosomenarm miteinander verglichen, bei Frauen also jeweils 46 Werte in jeder der beiden Kategorien, bei Männern durch das Y-Chromosom jeweils 48 Werte. Für die weiblichen Probanden ergab lineare Regression bei einem Korrelationskoeffizienten r von -0.81 eine Geradengleichung von $y = -79.91x + 23.22$, bei den männlichen Probanden wurde auf dieselbe

Weise bei einem r von -0.83 die Gleichung $y = -78.75x + 20.127$ ermittelt. x gibt dabei jeweils die Steigung, y den Y-Achsenabschnitt des betreffenden Chromosomenarms an.

Die beiden so ermittelten Geraden flankieren die unter 2.3 beschriebene. Die der weiblichen Probanden läuft etwas oberhalb und gleichzeitig steiler, die der männlichen Probanden etwas unterhalb und gleichzeitig flacher. Insgesamt sind die Unterschiede aber eher gering ausgeprägt.

Um Geschlechtsunterschiede, die in diesen beiden Geradengleichungen zum Ausdruck kommen, besser objektivieren zu können, wurden auch die Differenzen der Ausgangslänge bei männlichen und weiblichen Probanden, also den beiden Y-Achsenabschnitten, und die Differenzen der Steigung bei Männern und Frauen bezüglich der einzelnen Chromosomenarme verglichen.

Es resultierten wiederum 46 Werte für jeden Bereich, denn das Y-Chromosom wurde aufgrund des fehlenden korrespondierenden Chromosoms bei den Frauen nicht in die Betrachtung einbezogen. Es konnte ein Korrelationskoeffizient r von $-0,81$ ermittelt werden. Die Regressionsgerade wird hier durch die Formel $y = -39.20x + 2.39$ beschrieben. Y gibt dabei die Differenz des Ausgangswertes bei Neugeborenen in T/C-Werten, x die Differenz in der Steigung der einzelnen Chromosomenarme an, wobei die Werte für Männer immer von denen für Frauen abgezogen wurden. Bereits kleine Veränderungen in der Differenz der Steigung bei Männern und Frauen sind also mit relativ großen Unterschieden in der Absolutlänge eines Chromosomenarms verbunden.

Insgesamt zeigen diese Betrachtungen, dass die Steigung und die absolute Telomerlänge bei Neugeborenen in den für jeden Chromosomenarm ermittelten Regressionsgeraden keine völlig unabhängigen Größen sind. Sie können vielmehr zueinander in Beziehung gesetzt werden. Die Beziehung ist für das Gesamtkollektiv sowie für Männer und Frauen jeweils unterschiedlich. Auch diese Unterschiede sind mittels linearer Regression erfassbar.

3.5 Boxplots für männliche und weibliche Probanden

Hierauf wurden Box und Wiskers Plots dazu benutzt, um die Lagemaße Median, erstes Quartil, drittes Quartil sowie Minimum und Maximum darzustellen. Analog zu 1.1 wurden für diese zunächst alle Messwerte verwendet, hier allerdings zusätzlich getrennt nach Geschlecht, um eventuell vorliegende Geschlechtsunterschiede erkennen zu können. Dies gibt einen Überblick über die Altersdynamik bei Männern und Frauen.

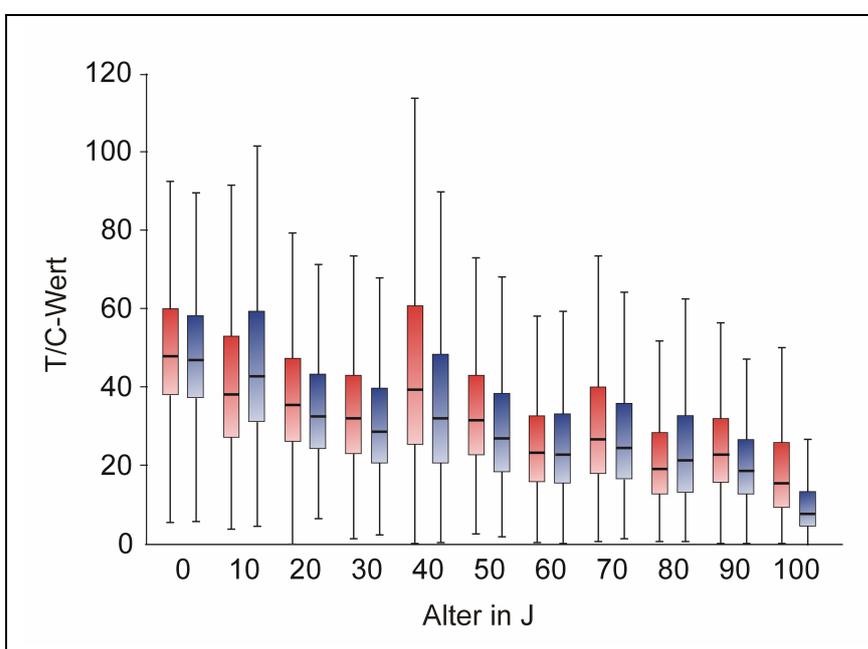


Abbildung 27: Altersgruppenspezifische Boxplots von Männern und Frauen

Für jede Altersgruppe sind für weibliche (rote Boxen) und männliche Probanden (blaue Boxen) Minimum, Maximum, erstes und drittes Quartil und Median eingezeichnet.

Der Median liegt, ebenso wie das erste und das dritte Quartil sowie die Maxima, bei Frauen bis auf wenige Ausnahmen (Altersgruppe der 10- und der 80-Jährigen) höher als bei Männern. Der Größenunterschied zwischen dem unteren, kleineren und dem oberen, größeren Kompartiment der Box ist bei Frauen im Allgemeinen ebenfalls stärker ausgeprägt. Dies spricht dafür, dass bei Frauen zum einen generell höhere T/C-Werte vorkommen als bei Männern, zum anderen aber auch

der Prozentsatz, in dem diese hohen Werte im Vergleich zur Gesamtzahl der gemessenen Werte vorkommen, im Vergleich zu Männern höher liegt. Im Altersverlauf werden die Boxplots und ihre Antennen bei Frauen und Männern kleiner. Die niedrigen Werte der 100-jährigen Männer mit sehr kleiner Box und sehr kleinem Interquartilsabstand sind durch die geringeren Fallzahlen dieser Altersgruppe bedingt. Der Verlauf der durch die Box und Whiskers Plots visualisierten Werte scheint bei Männern allerdings kontinuierlicher zu sein und im Vergleich zu den Frauen weniger starken Schwankungen zu unterliegen.

Anschließend wurden, wie unter 2.4, alle Messwerte chromosomen- und geschlechtsspezifisch verarbeitet. Die einzelnen Boxplots der männlichen und der weiblichen Probanden wurden anschließend anhand der Größe ihres Median sortiert (Abbildung 28).

Der Median ist bei den Frauen fast immer größer als bei den Männern. Eine Ausnahme bilden nur die Chromosomenarme 3p, Xp, 13q, 18p und 22p, bei denen der Median für die männlichen Probanden etwas höher liegt, was aber nur im Fall von 3p und Xp statistisch signifikant ist. Auch das erste und das dritte Quartil ist bei den weiblichen Probanden in der Regel höher, ausgenommen sind hier 4q, Xp, Xq, 13q, 16q und 20q im Hinblick auf das erste sowie 4q, Xp, und 18p im Hinblick auf das dritte Quartil. Nur der Chromosomenarm Xp liegt also hinsichtlich aller drei Werte bei Männern höher als bei Frauen. Ansonsten gilt für nahezu alle Werte unabhängig von der Art des betrachteten Lagemaßes, dass der Absolutwert bei Männern niedriger ausfällt. Bezüglich der Reihenfolge der Chromosomenarme, geordnet anhand des Absolutwertes ihres Medians, existieren nur marginale Unterschiede. Bei beiden Geschlechtern ist der Chromosomenarm 4q mit 43,88 T/C-Werten bei Frauen beziehungsweise 43,56 T/C-Werten bei Männern der längste. Der kürzeste Arm ist ebenfalls identisch, nämlich 19p mit 31,51 T/C-Werten für die weiblichen respektive 30,89 T/C-Werten für die männlichen Probanden. Der zweitkürzeste Arm, 17p, ist mit 32,50 bei Frauen und 31,75 bei Männern ebenfalls noch gut von den übrigen Werten zu unterscheiden.

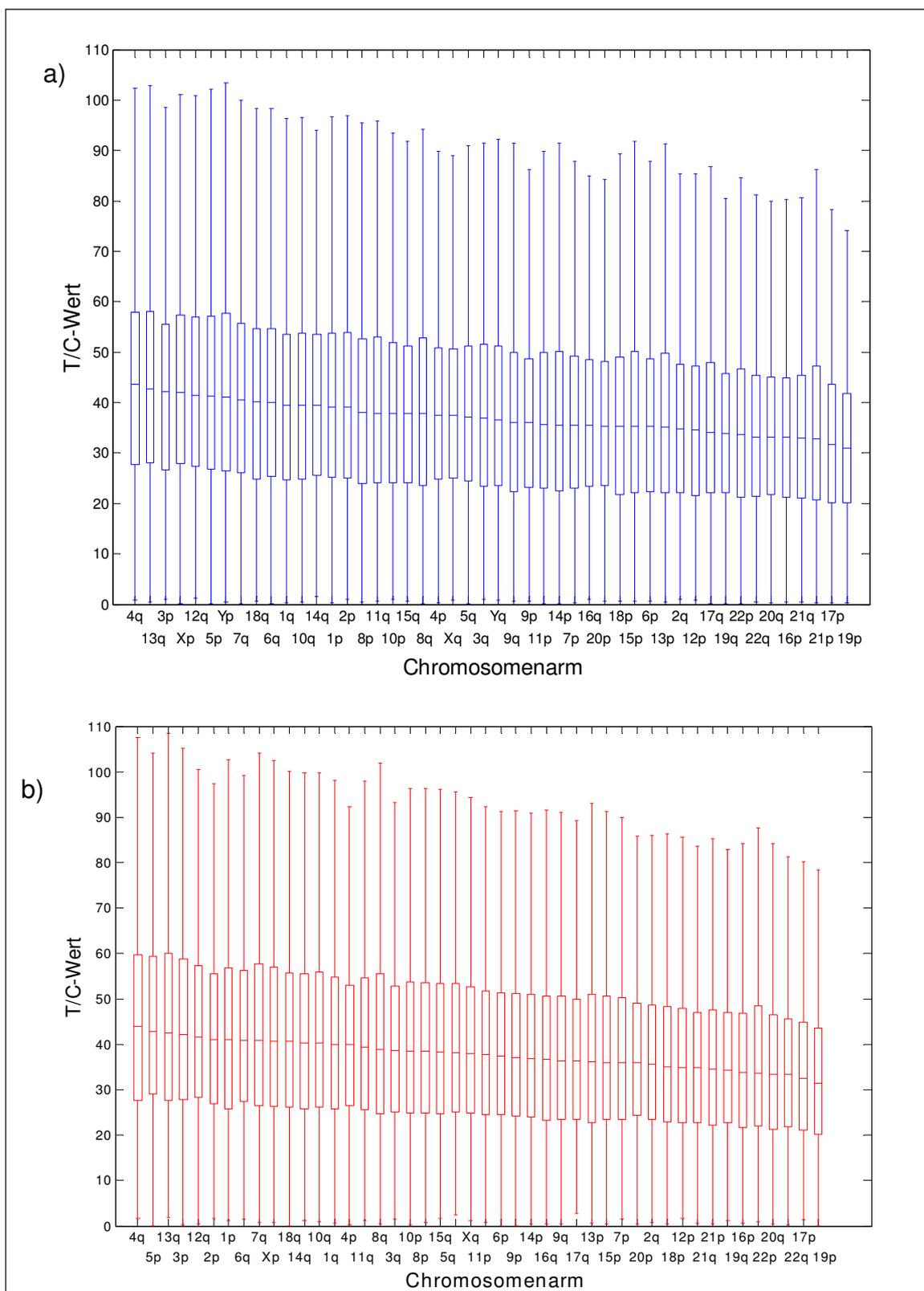


Abbildung 28: Chromosomenspezifische Boxplots für Männer und Frauen

Die Boxplots für männliche Probanden (Abbildungsteil a) befinden sich oben und sind in blau gehalten, die für weibliche Probanden (Abbildungsteil b) liegen darunter und sind rot dargestellt. Sämtliche Chromosomen wurden berücksichtigt, sie wurden für Männer und Frauen getrennt nach der Größe ihres Medians geordnet.

Insgesamt sind alle Chromosomenarme, die bei den Frauen zu denen mit größeren T/C-Werten zählen, bei den Männern derselben Gruppe zuzuordnen. Dies gilt umgekehrt auch für die Chromosomen mit kürzeren Telomeren. Die Reihenfolge der Zuordnung gründet sich zudem im mittleren Bereich teilweise auf minimale Differenzen der T/C-Werte, die zuweilen im Bereich der zweiten Nachkommastelle anzusiedeln sind, so dass Unterschiede in der Reihenfolge der Chromosomenarme beim Vergleich von Männern und Frauen vor allem im mittleren Bereich nicht überzubewerten sind. Das erste und die letzten beiden Chromosomen, die sich für Frauen und Männer kongruent darstellen, sind im Vergleich zu den übrigen deutlich abgrenzbar und weisen auch deutlich höhere beziehungsweise niedrige Werte als die übrigen Chromosomenarme auf.

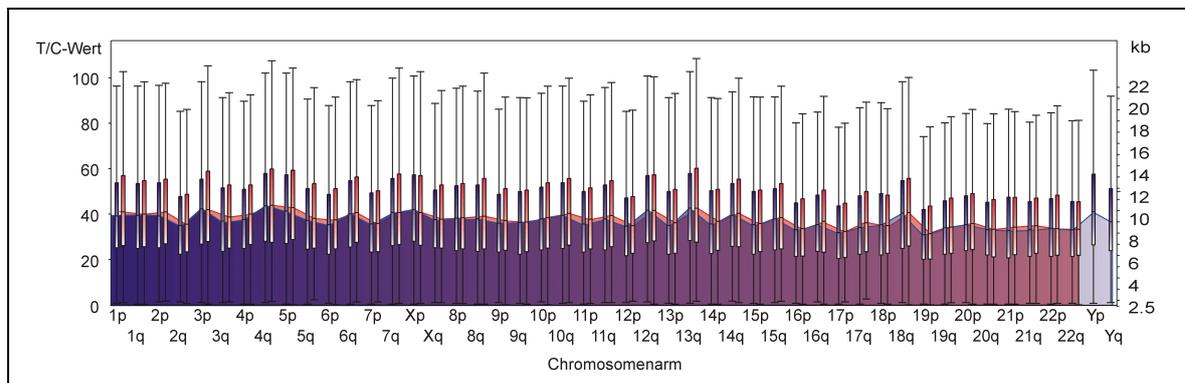


Abbildung 29: Chromosomenarmprofil bei Männern und Frauen

Zusätzlich zu den Boxplots für männliche (blau) und weibliche Probanden (rot) ist im Hintergrund der Verlauf des Medians der Chromosomenarme zu sehen. Die rote Linie stellt den Verlauf bei Frauen, die blaue den bei Männern dar. Die X-Achse bezeichnet den Chromosomenarm, die Y-Achse gibt links den T/C-Wert und rechts den korrespondierenden Wert in Kilobasen an.

Einen Überblick über das Chromosomenarmprofil bei Männern und Frauen gibt Abbildung 29. Diese bestätigt, dass das chromosomale Profil bei Männern und Frauen abgesehen von den generell niedrigeren Werten der männlichen Probanden praktisch identisch verläuft. Im direkten Vergleich stehen nicht nur die Größe der Boxen, sondern auch die Medianwerte eindeutig in Beziehung zueinander.

Die Betrachtung der Gonosomen zeigt, dass weder das X-Chromosom bei Frauen noch das X- beziehungsweise Y-Chromosom bei Männern bezüglich ihres altersspezifischen Verlaufs und ihrer Absolutlänge eine außergewöhnliche Stellung einnehmen, abgesehen davon, dass der Median von Xp bei Frauen etwas niedriger liegt als bei Männern (40,8 versus 42,1 T/C-Werte). Die Tendenz des etwas niedrigeren Medians von Xp bei Frauen lässt sich allerdings nicht generell bestätigen. Bei genauerer Betrachtung aller Boxplots, die für das X-Chromosom bei Männern und Frauen vorliegen (siehe Anhang), findet sich eine Abweichung von Xp gemäß der obigen Beobachtungen nur bei männlichen 10-Jährigen sowie in der Altersgruppe der 80-jährigen Männer.

Es fällt aber auf, dass bei Männern Xp und Yp sowie Xq und Yq relativ nahe beieinander liegen. Deshalb wurde für eine gesonderte Betrachtung der Gonosomen in Abbildung 30 aus den im Anhang befindlichen Boxplots für Männer und Frauen die Geschlechtschromosomen der Neugeborenen sowie der 50- und der 90-Jährigen herausgegriffen. So ist ein übersichtlicher Vergleich männlicher und weiblicher Daten möglich. Die Abbildung bestätigt die signifikanten Unterschiede im chromosomenspezifischen Verlauf bei Männern und Frauen, die jeweils dargestellten p-Werte sind alle deutlich kleiner als das erforderliche Signifikanzniveau α von 0,05. Auch die Konkordanz zwischen den Telomeren von Xp und Yp sowie Xq und Yq bei den Daten der männlichen Probanden wird deutlich. Sowohl zwischen den p- als auch zwischen dem q-Armen bestehen über alle Altersgruppen hinweg sehr starke positive Korrelationskoeffizienten ($r = 0,96$ für die p-Arme beziehungsweise $r = 0,95$ für die q-Arme), was stark für einen gleichartigen Verlauf von X- und Y-Chromosom spricht. Dies trifft auf die absoluten T/C-Werte ebenso zu wie auf die Altersdynamik.

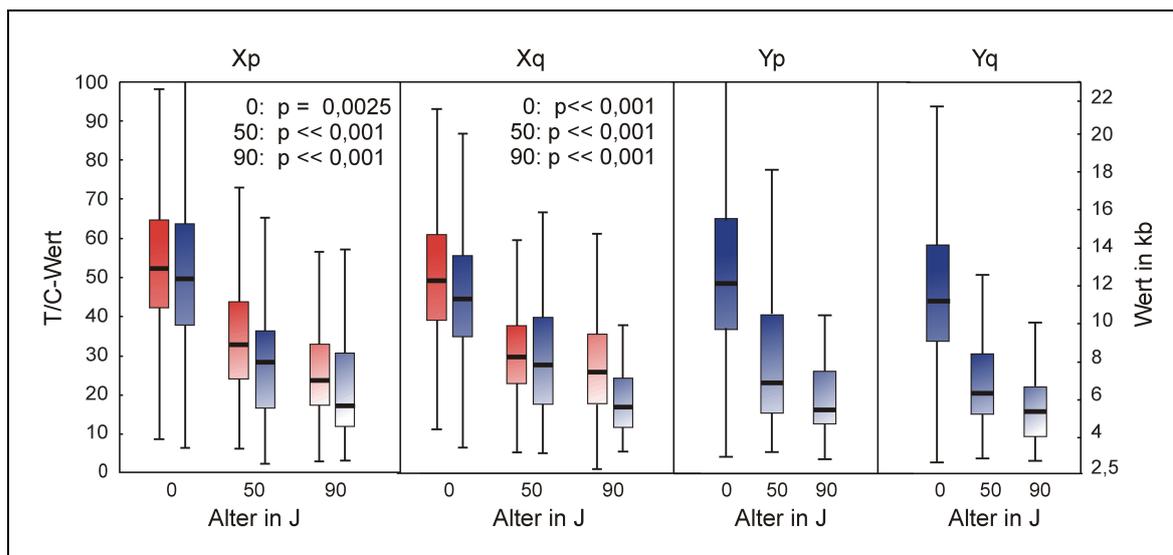


Abbildung 30: Boxplots der Gonosomen

Exemplarische Boxplots für Neugeborene, Fünfzig- und Hundertjährige unter Differenzierung nach Geschlecht. Die Daten der männlichen Probanden sind in blau, die der weiblichen Probanden in rot dargestellt. Die Überschrift der einzelnen Kästen gibt den Chromosomenarm an, neben den links aufgetragenen absoluten T/C-Werten findet sich rechts auch der entsprechende Wert in kb. Für den p- und q-Arm des X-Chromosoms wurden die Daten zudem auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern hin untersucht. Die resultierenden p-Werte sind jeweils zusammen mit der Altersgruppenbezeichnung angegeben.

Da im Größenverlauf der Telomerlänge der unterschiedlichen Chromosomen in Abbildung 19 und Abbildung 28 sowohl global als auch nach Geschlechtern getrennt keine Gesetzmäßigkeit gefunden werden konnte, wurde die Gesamtheit der gemessenen Werte pro Chromosomenarm beziehungsweise Chromosom zu einem Median zusammengefasst und dann anhand ihrer physikalischen Länge in Mb, ihrer genetischen Länge in cM oder ihrer Rekombinationsrate, das heißt des Quotienten aus genetischer Länge und physikalischer Länge in cM/Mb nach (42,66) geordnet.

Die Korrelation der globalen Mediane der Chromosomen mit ihrer physikalischen Länge ergibt nach (66) mit einem r von 0,7 beziehungsweise nach (42) mit einem r von 0,76 einen positiven Zusammenhang zwischen den beiden Parametern, dasselbe gilt für die Chromosomenarme, wobei der Korrelationskoeffizient hier bei 0,57 liegt. Aus der Verwendung der genetischen Länge der Chromosomen geht

ebenfalls eine positive Korrelation mit $r = 0,74$ hervor. Das Aufsplitten anhand der genetischen Länge in Chromosomenarme und zusätzlich in männliche und weibliche Probanden lässt die Korrelationskoeffizienten allerdings sinken, sie liegen dann nur noch bei 0,43 für die männlichen und 0,45 für die weiblichen Probanden. Aus der Untersuchung der Medianwerte und der dazugehörigen Rekombinationsraten schließlich ergibt sich mit $-0,82$ eine starke negative Korrelation. In Abbildung 31 sind exemplarisch die Medianwerte der Chromosomen gegen ihre physikalische Länge aufgetragen. Sie veranschaulicht den relativ starken positiven Trend.

Zwischen den p- und den q-Armen der Chromosomen konnte global kein signifikanter Unterschied im Verhalten ihrer Medianwerte festgestellt werden. Die Telomere der p-Arme sind also nicht generell kürzer als die der q-Arme desselben Chromosoms. Signifikante Unterschiede ergeben sich erst dann, wenn der p-Arm eines Chromosoms mit dem dazugehörigen q-Arm verglichen wird, und auch dann ist nur in einigen Fällen der p-Arm kürzer als der q-Arm (siehe Abbildung 29) .

Zusammengefasst besteht also die Tendenz, dass mit zunehmender physikalischer, aber auch genetischer Länge der Chromosomen beziehungsweise Chromosomenarme die Länge der korrespondierenden Telomere ebenfalls zunimmt, und umgekehrt bei zunehmender Rekombinationsrate die Telomerlänge abnimmt.

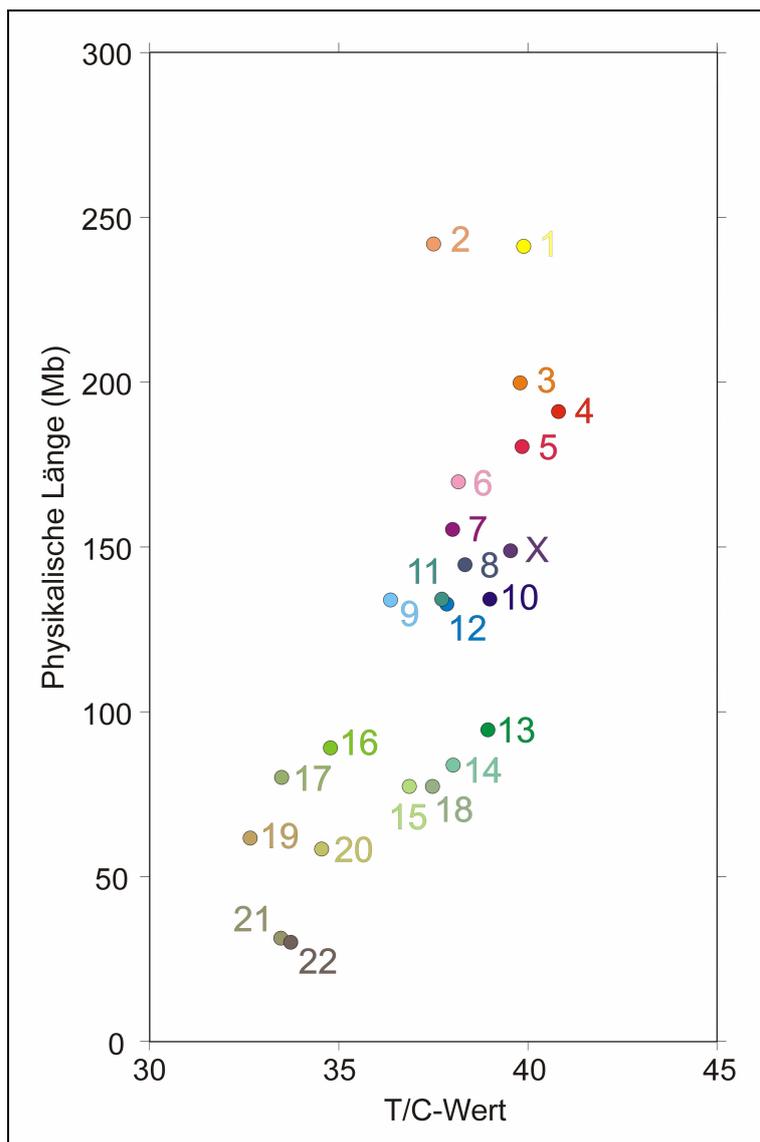


Abbildung 31: Korrelation von Median und Chromosomenlänge

Scatterplot der T/C-Werte (X-Achse) und der physikalischen Länge der Chromosomen in Megabasen (Y-Achse). Die Chromosomen sind durch farbige Punkte gekennzeichnet und mit ihrer Nummer beschriftet.

4. Phänomen der hohen Fluoreszenzintensitäten

4.1 Manifestation verstärkter Telomersignale

Die Histogramme für Männer und Frauen unter 3.1 zeigen, dass bei beiden Geschlechtern teilweise extrem hohe T/C-Werte vorkommen, die bei Frauen häufiger sind als bei Männern. Als morphologisches Korrelat dazu konnten bei der Betrachtung der aufgenommenen Metaphasen zum Teil extrem starke Signale einzelner Chromosomenarme beobachtet werden. Diese waren am besten bei den älteren Probanden zu sehen, die pangenomisch kürzere Telomere aufweisen. Meist traten die starken Hybridisierungssignale nur bei einem einzigen Chromosom innerhalb einer Metaphase auf, während die übrigen Chromosomen altersentsprechende T/C-Werte aufwiesen. Das Phänomen dieser starken Signale konnte in den anderen Metaphasen desselben Probanden im Allgemeinen nicht beobachtet werden.

Da extrem lange Telomere zudem keinen Chromosomenarm bevorzugt betrafen, schien es sich hier um zufällig verteilte Einzelereignisse zu handeln, die aus einem Verlängerungsmechanismus hervorgegangen sein könnten. Oft trat das Phänomen an beiden homologen Chromatiden des p- oder q- Arms eines Chromosoms auf.

In Abbildung 32 sind solche Variationen der Telomerlänge bei 70-bis 100-Jährigen zu sehen, bei denen beide homologen Chromatiden betroffen sind. Ihr T/C-Wert überschreitet den der anderen Chromosomen um ein Vielfaches, so dass die anderen Signale daneben kaum mehr sichtbar sind. Dennoch können sie mikroskopisch erfasst und von der Computersoftware ausgewertet werden.

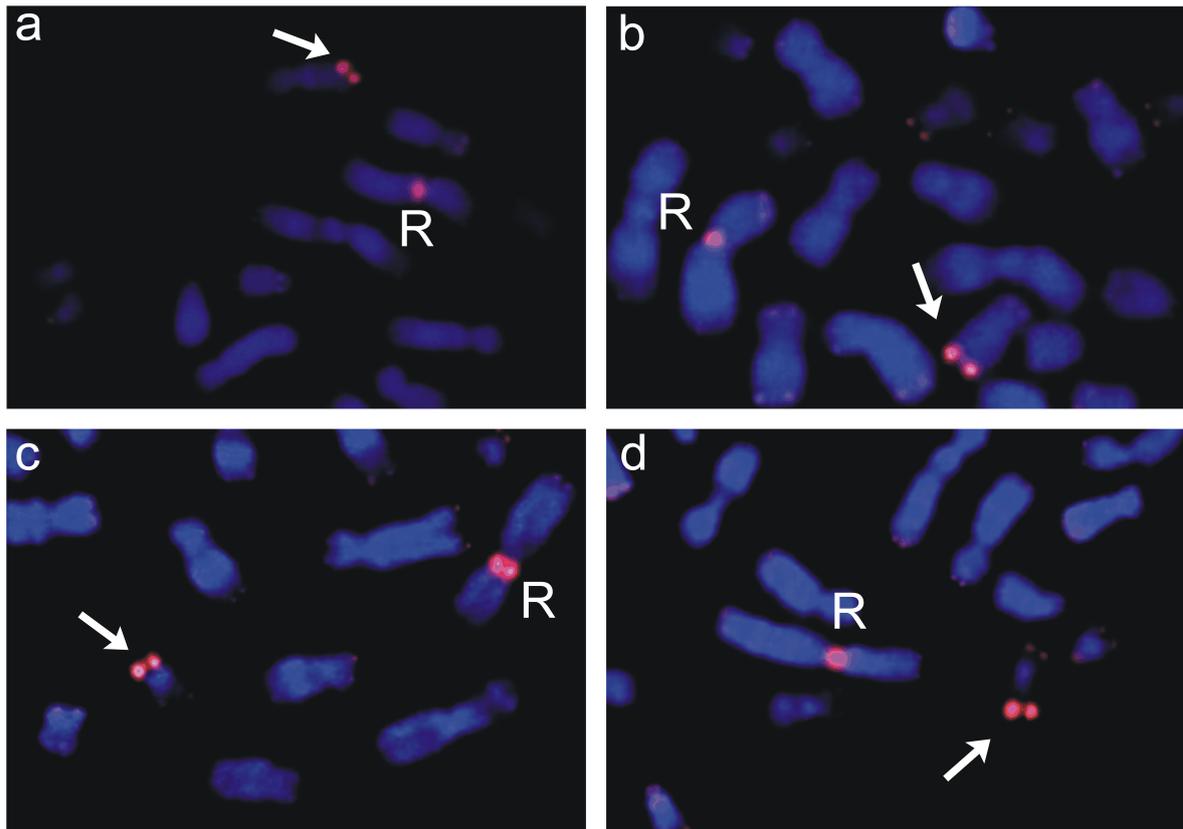


Abbildung 32: Verstärkte Fluoreszenzsignale an homologen Chromatiden

Am Beispiel einer 70-jährigen Frau (a), eines 80-jährigen Mannes (b), eines 90-jährigen Mannes (c) sowie einer 100-jährigen Frau (d) sind erhöhte Fluoreszenzintensitäten visualisiert. Der weiße Pfeil kennzeichnet diese im Vergleich zu den übrigen Chromosomen überdurchschnittlich hohen T/C-Werte, R markiert das Zentromer des Chromosoms 2, das als Referenz dient.

Es gab aber auch Fälle, in denen nur ein Chromatid des p- und/oder q-Arms eines Chromosoms ein verstärktes Signal aufwies. In Abbildung 33 ist deutlich zu sehen, dass der T/C-Wert bereits zwischen den Schwesterchromatiden desselben Chromosoms erheblich variieren kann. Hier sind die kürzeren Telomere optisch ebenfalls kaum zu erkennen, aber trotzdem sind die korrespondierenden T/C-Werte messbar. Neben den Chromosomen, die ungleiche Signale zeigen, gibt es in derselben Metaphase Chromosomen, bei denen die Signale an den Schwesterchromatiden identisch sind.

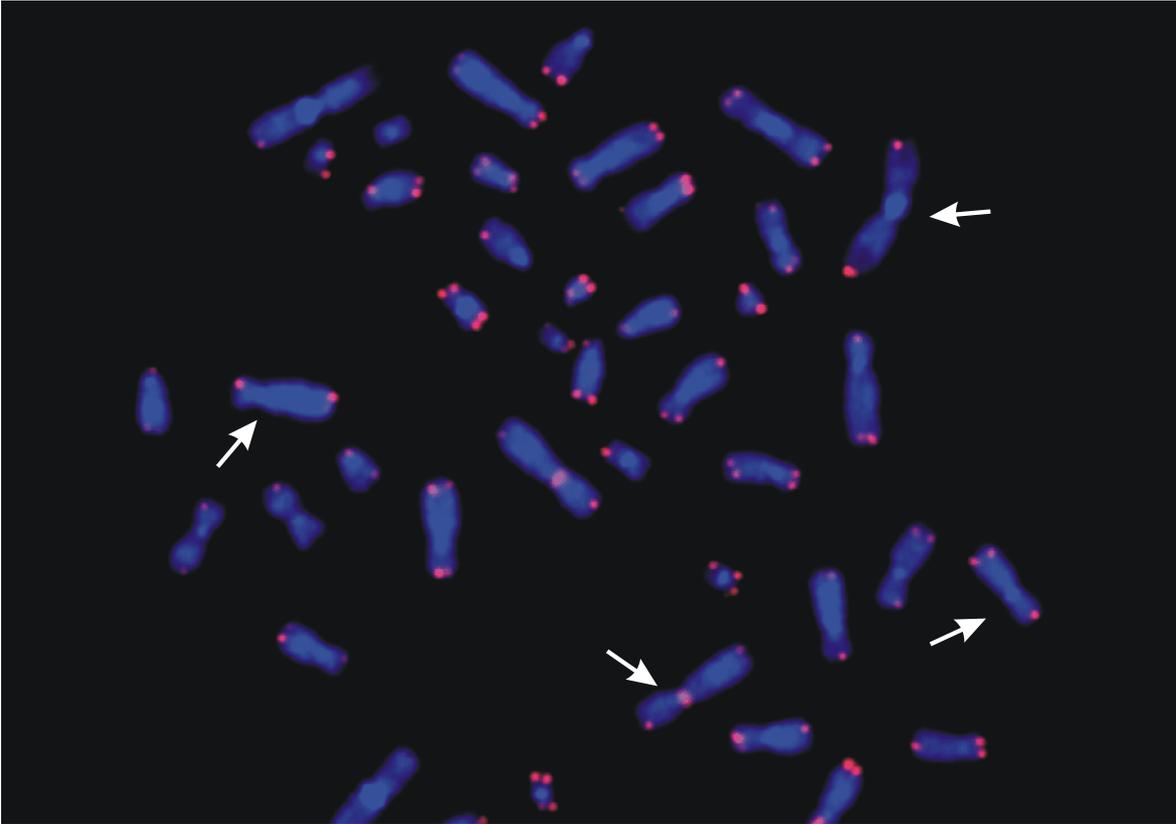


Abbildung 33: Variationen der Fluoreszenzintensität bei Schwesterchromatiden

An einigen Chromosomen finden sich stark unterschiedliche Fluoreszenzsignale, an anderen sind vier gleich starke Signale zu sehen. Bezüglich der Variationen ihrer Fluoreszenzintensität besonders auffallende Chromosomen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

4.2 Statistische Auswertung hoher T/C-Werte

Um die beobachteten Ausreißer in der Fluoreszenzintensität zu objektivieren, deren Detektion stark von der durchschnittlichen Intensität der T/C-Werte abhängig war, erfolgte für jede Altersgruppe und jeden Chromosomenarm eine Registrierung aller T/C-Werte, die mehr als die doppelte Standardabweichung über dem Median der untersuchten Gruppe lagen. Es wurde kein absoluter T/C-Wert, sondern die Abhängigkeit vom Median gewählt, da die absoluten T/C-Werte sich altersabhängig verändern. Für den Vergleich der Altersgruppen wurden die Werte außerdem in Bezug auf die Größe der Stichprobe angepasst, da für die einzelnen Altersgruppen zum Teil unterschiedlich viele Probanden vorhanden waren.

Die Auswertung ergab zum einen in Kohärenz mit obigen Histogrammen, dass bei globaler Betrachtung der Werte für Männer und für Frauen die Zahl der Werte, die zwei Standardabweichungen über dem Median der Daten lagen, für Frauen bei 4920, bei Männern dagegen nur bei 4675 lag. Obwohl diese Werte in Abhängigkeit vom Median ermittelt wurden, kamen bei Frauen häufiger höhere Werte vor. Zum anderen lag der durchschnittliche Wert, den diese T/C-Werte aufwiesen, bei Frauen höher. Einem Wert von 100.30 für die weiblichen Probanden stand ein Wert von 94,84 für Männer gegenüber.

Was die altersabhängige Verteilung der erhöhten T/C-Werte anbelangt, konnte bei Betrachtung der Abweichung in Standardabweichungen anders als in Abbildung 12 keine besondere Präferenz festgestellt werden (Abbildung 34).

Es gab keine Altersgruppe, bei der im Vergleich zu den anderen überdurchschnittlich viele starke Signale vorkamen. Auch der Vergleich der ermittelten prozentualen Werte zwischen Männern und Frauen ergab keinen Anhalt auf geschlechtsspezifische Unterschiede in der Verteilung dieser Ausreißer. Die einzige Gruppe, bei der relativ wenige dieser hohen Werte vorkamen, war sowohl bei Männern als auch bei Frauen die der Neugeborenen.

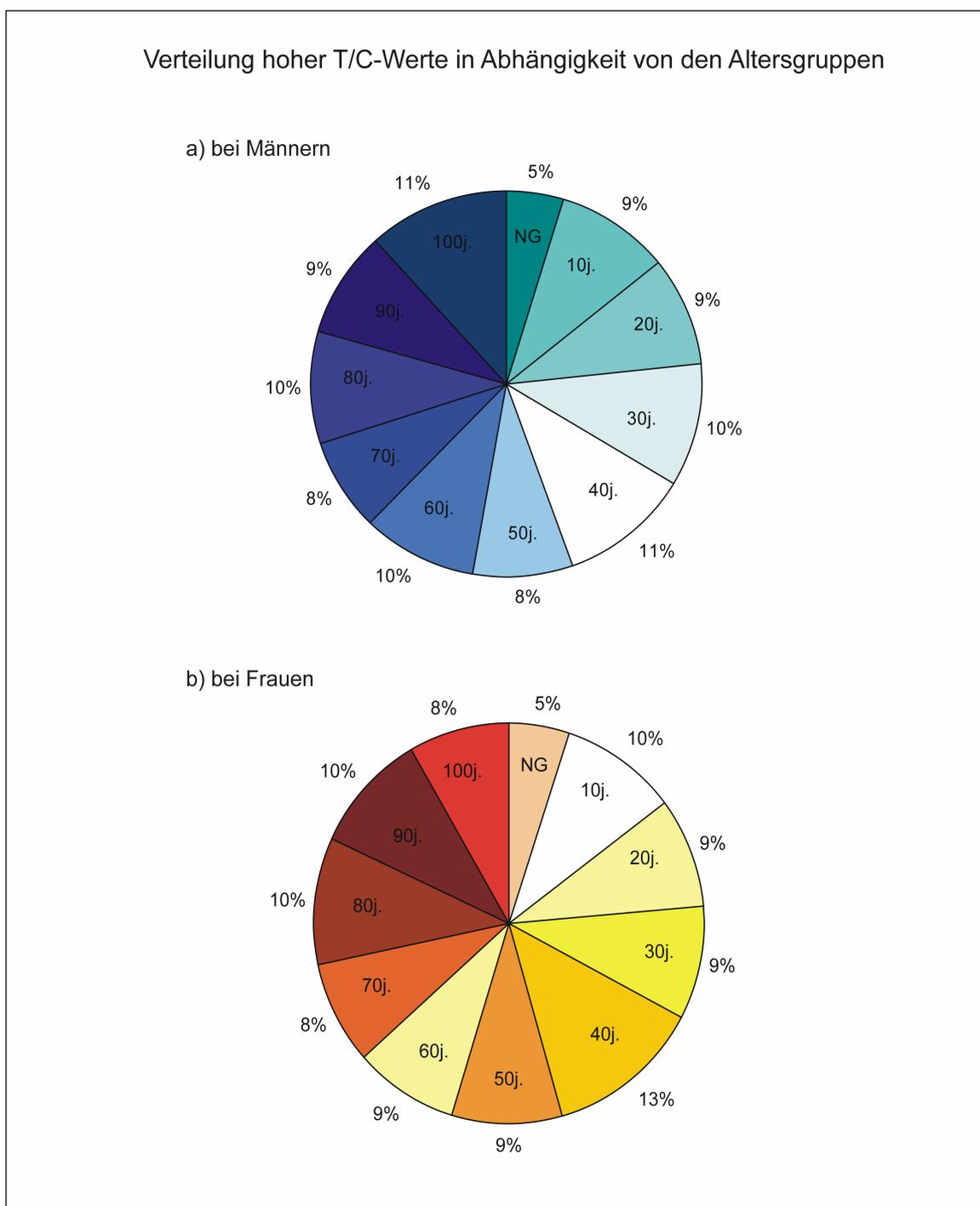


Abbildung 34: Verteilung hoher T/C-Werte bei Männern und Frauen

In den Kreisdiagrammen der männlichen (oben) und der weiblichen (unten) Probanden entspricht die Beschriftung der einzelnen Segmente den untersuchten Altersgruppen. Außerhalb der Segmente ist jeweils die prozentuale Häufigkeit dargestellt, mit der Werte innerhalb der Altersgruppen auftreten, die die Grenze der Summe aus Median und doppelter Standardabweichung überschreiten.

Die Daten wurden außerdem nach chromosomenspezifischen Gesichtspunkten ausgewertet. Hier bestätigt sich die Vermutung, dass überdurchschnittlich hohe T/C-Werte bei den einzelnen Chromosomenarmen unabhängig von deren Absolutlänge zufällig verteilt zu sein scheinen.

Die Häufigkeit der von starken Signalen betroffenen Chromosomenarme liegt jeweils in einer Größenordnung von etwa 2%. Auch mittels eines Balkendiagramms (Abbildung 35) zeigt sich eine recht zufällige Verteilung der Daten, die mehr als zwei Standardabweichungen über dem zugehörigen Median lagen, auf die einzelnen Chromosomen. Die Datenverteilung weist nur sehr wenige größere Schwankungen, wie zum Beispiel bei beiden Geschlechtern für den Chromosomenarm 10p, auf.

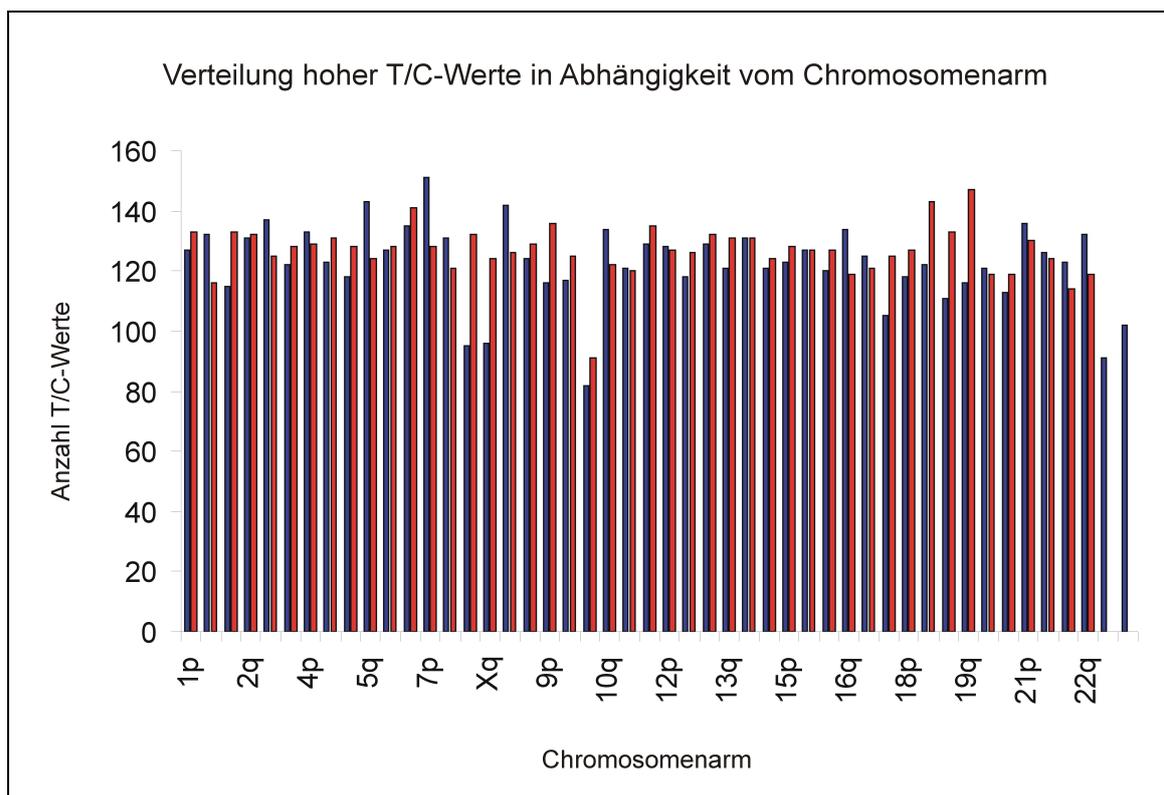


Abbildung 35: Chromosomenspezifisches Balkendiagramm für hohe T/C-Werte

Im Balkendiagramm wird der Teil der Daten verwendet, der größer ist als die Summe des jeweiligen Medians und der dazugehörigen doppelten Standardabweichung. Die Anzahl der Werte, auf die dieses Kriterium zutrifft, sind auf der Y-Achse aufgetragen, die unterschiedlichen Chromosomenarme in üblicher Reihenfolge auf der X-Achse. Bei der farblichen Unterscheidung der Balken determiniert blaue Farbe die männlichen, rote die weiblichen Probanden.

4.3 Endoreduplikation

Trotzdem könnte man bei Betrachtung der Bilder zunächst dazu neigen, das Phänomen als einen Hybridisierungsfehler anzusehen. Um ein Artefakt auszuschließen, wurden die Chromosomen von Lymphozyten nach einer Endoreduplikation betrachtet.

Hierbei handelt es sich um das Endprodukt einer Dysregulation des Zellzyklus, bei der dieser nicht regelrecht in einer Mitose endet. Statt dessen schließt sich unmittelbar ein weiterer Zyklus an, der so zu Tetraploidie der Zelle führt, wobei die entstandenen Chromosomen nahe beieinander liegen (Abbildung 36a). Die vier nebeneinanderliegenden homologen Chromatiden entsprechen dabei drei Generationen und stammen von einem einzelnen Chromatid ab. Die Reihenfolge der Aneinanderlagerung von Schwester- und Tochterchromatiden (Abbildung 36b) ist dabei variabel, da die dreidimensionale Anordnung durch das Spreiten der Chromosomen zerstört wird.

Bei Endoreduplikationen ist aufgrund der Abstammung der Tochterchromatiden oft eine auffallende Ähnlichkeit in der Größe der Telomere benachbarter Chromosomen zu sehen. Dies gilt auch dann, wenn bereits die Schwesterchromatiden eines einzelnen Chromosoms in ihrer Telomerlänge erheblich voneinander abweichen, wie dies an normalen Metaphasen beobachtet wurde. Wenn sehr starke Signale an zwei der vier Telomere in vergleichbarer Intensität vorkommen, wäre es möglich, dass dieses starke Signal im Rahmen der zweiten DNA-Replikation der Endoreduplikation an die nächste Generation weitergegeben wurde, also bereits einen Zellzyklus vor der eigentlichen Endoreduplikation vorhanden war. Ist nur ein Telomer betroffen, könnte eine Verlängerung während der S-Phase stattgefunden haben, die der Endoreduplikation direkt vorausging.

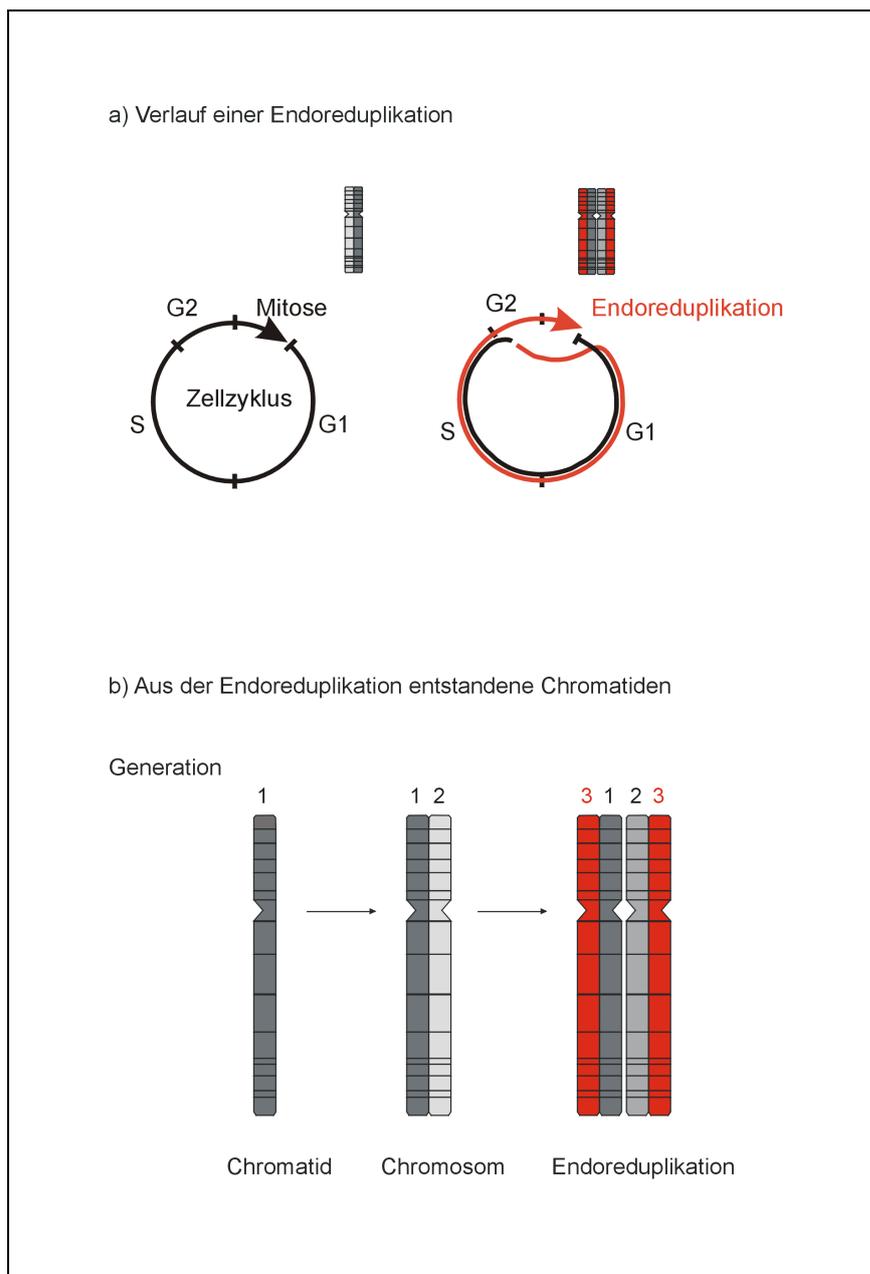


Abbildung 36: Schematische Darstellung des Vorgangs einer Endoreduplikation

- a) Verlauf einer Endoreduplikation (rechts) im Vergleich mit einem regulären Zellzyklus (links)
- b) Abstammung der 4 Chromatiden, die im Verlauf einer Endoreduplikation entstehen.

Abbildung 37 zeigt einzelne Chromosomen einer sporadischen Endoreduplikation bei einer 40-jährigen Frau, die teilweise sehr starke Telomersignale im Sinne einer möglichen Telomerverlängerung zeigt. Diese Signale kommen bei den Chromosomenarmen 2p, 5q, 6q, and 10p jeweils doppelt vor, was für eine Verlängerung vor der zweiten DNA-Replikation der Endoreduplikation spricht. 19q dagegen weist ein einzelnes starkes Signal auf, eine Verlängerung könnte also nur in der vorhergehenden S-Phase stattgefunden haben.

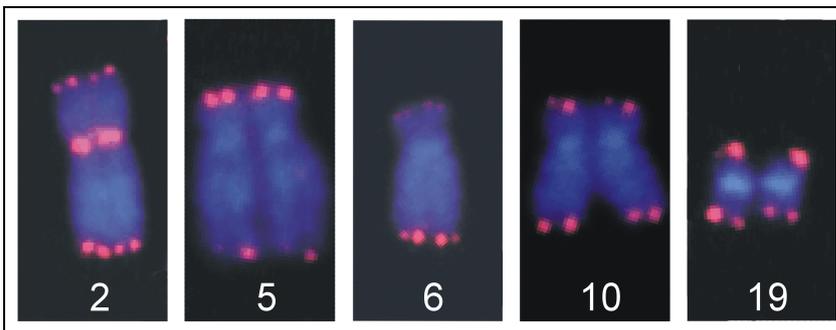


Abbildung 37: Chromosomen nach einer sporadischen Endoreduplikation

Die jeweiligen Chromosomen, hier isoliert aus der Metaphase einer 40-jährigen Frau, sind durch die unten im Bild stehende Nummer bezeichnet.

Im Rahmen einer Endoreduplikation können also Chromosomen auftreten, die ebenso wie die unter 4.1 beschriebenen Metaphasen unterschiedliche Signale aufweisen. Im Gegensatz zu diesen Metaphasen kann aber eine Endoreduplikation Aussagen über drei Generationen gleichzeitig treffen. Wenn also wie oben bei einem Chromosomenarm zwei schwache und zwei starke Signale auftreten und beide sich hinsichtlich ihrer Länge kohärent verhalten, spricht dies eher für eine Replikation der ungleich langen Telomere, die im Rahmen eines selektiven, letztlich noch undefinierten, jedoch nicht Telomerase-vermittelten, Verlängerungsmechanismus entstanden sein müssen, als für ein Artefakt oder einen Hybridisierungsfehler.

Diskussion

1. Beurteilung der Methodik und der Rohdaten

Da die Messung der Telomerlänge von Chromosomen in der Forschung heute einen hohen Stellenwert einnimmt, wurden diesbezüglich zahlreiche Methoden entwickelt, die jeweils unterschiedlichen Ansätzen folgen.

Die Standardmethode besteht in einer Southern-Blot-Hybridisierung der Telomersequenzen mit telomerspezifischen Sonden, wozu Enzyme mit bestimmten Restriktionsschnittstellen in der subtelomerischen DNA verwendet werden. Hierbei wird allerdings nur der Durchschnitt der Telomerlängen aller Chromosomen aller untersuchten Zellen gemessen, eventuelle Variationen in der Telomerlänge unterschiedlicher Zellen oder Chromosomen können also genausowenig erkannt werden wie Chromosomenbrüche oder -translokationen. Zudem kann die Verteilung der subtelomerischen DNA-Sequenzen variieren, was Einfluss auf die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Proben haben kann. Um das Problem der Chromosomenbrüche zu vermeiden, wurde der Slot-Blot-Assay entwickelt (10). Dieser unterscheidet sich insofern von der oben genannten Methode, als er den relativen Gehalt an Telomer-DNA misst und weitaus weniger Material als die herkömmliche Southern-Blot-Hybridisierung benötigt. Weitere Modifikationen bestehen unter anderem in dem Einbeziehen des Zentromers (71), in der Verwendung der Pulsfeldelektrophorese (19), in der Hybridisierung von DNA in Lösung (24) sowie in der Messung enzymatischer Farbreaktionen unmittelbar in Zellpellets (21). Der relativ neue PCR-basierte Ansatz (12) erlaubt eine schnelle Telomermessung direkt aus der DNA von Proben. Durch eine Abwandlung, die STELA-Technik (4) ist sogar die Messung von Einzeltelomeren möglich.

Die quantitative Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (47,61) erlaubt ebenfalls die Vermessung individueller Telomere an einzelnen Chromosomen. Die Telomermessung erfolgt mit telomerspezifischen PNA-Sonden an Metaphasechromosomen. Zusätzlich erfolgt eine Messung der Fluoreszenzintensitäten von DNA-

Plasmiden, die unterschiedlich hohe Anteile an Cy3-markierter PNA aufweisen und als Referenz dienen. Die Messung der Gesamtfluoreszenzintensität eines Kerns in der Interphase (17) ist unabhängig von proliferierenden Zellen. Man erhält Fluoreszenzwerte für bestimmte Zellpopulationen und vermeidet gleichzeitig Zellkultur und eventuelle Selektion.

Eine Kombination der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit der Flow-Zytometrie (37,81) macht schnell durchführbare Messungen von Zellen in Suspension möglich, allerdings können auch mit dieser Methode nur Aussagen über den Gesamtfluoreszenzgehalt von Zellen gemacht werden. Eine zusätzliche Antikörperfärbung (Multicolor Flow-FISH) erlaubt die Identifikation von Leukozytenuntergruppen und die Bestimmung ihrer Telomerlänge (3,43,94).

Vergleichbar mit der hier verwendeten Methode der T/C-FISH sind bezüglich deren Zielsetzung, der Messung von individuellen Chromosomenarmen, nur die STELA-Technik sowie die quantitative Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

Bei der PCR-basierten STELA-Technik wird mit chromosomenspezifischen Primern gearbeitet, die bei bekannten Polymorphismen in der subtelomerischen Region auch allelspezifisch sein können (4). Die Methode hat den Vorteil, dass keine Kultur der Zellen nötig und eine schnelle Analyse möglich ist, allerdings wurde sie bisher nur für die kurzen Arme der Geschlechtschromosomen etabliert. Ungeklärt ist, ob alle Chromosomen der Analyse in dieser Form zugänglich sind. Eine differenzierte chromosomenspezifische Messung aller Telomere ist bisher also nicht gesichert.

Die Methodik der quantitativen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist prinzipiell mit der T/C-FISH vergleichbar, problematisch ist allerdings die getrennte Messung der Proben und der Referenzplasmide. Diese kann durch Hybridisierungsfehler, Fluoreszenzunterschiede, unspezifische Hintergrundfärbungen und Nachlassen der Fluoreszenzintensität (fading-Effekt) einen Vergleich erschweren. Außerdem sind die Plasmide im Gegensatz zu den Telomeren proteinfrei, was sich in stärkeren Fluoreszenzsignalen und somit ebenfalls verfälschenden Effekten auswirken kann.

Die hier verwendete T/C-FISH-Methode hat den großen Vorteil, dass sie individuelle Chromosomen vermessen kann, ohne dass Nachteile wie unspezifische Hintergrundfärbungen oder fading-Effekte zum Tragen kommen, da sich die Referenz innerhalb der einzelnen Metaphase befindet. Durch die sichere quantitative Bindung der PNA-Sonde erfolgt sowohl eine sensitive als auch eine spezifische Messung der Telomere. Nachteilig ist allerdings der größere Zeitaufwand im Vergleich zur Flow-Zytometrie. Zusätzlich ist die Methode abhängig von Metaphasen, also einer Zellkultur. Mögliche Effekte in vitro werden aber so gering wie möglich gehalten, da die PHA-stimulierten Metaphasen bereits nach 72 Stunden präpariert werden, was dem Maximum des Auftretens der ersten Metaphase in Kultur entspricht (54). Da keine Bestimmung der Lymphozytenuntergruppen erfolgt, die unterschiedliche absolute Telomerlängen (58,59,79,103) und unterschiedliche Telomerlängendynamik (56,59,80,90) aufweisen und die sich zudem mit zunehmendem Alter verändern (40), könnte dies theoretisch Einfluss auf die Rohdaten haben. Praktisch hat dies allerdings nur eine geringe Bedeutung, da die verwendeten Kulturbedingungen klar das Wachstum von PHA-aktivierten CD8 T-Zellen favorisieren. Darüber hinaus können für das Zentromer des Chromosoms 2 als hochrepetitive Sequenz potentielle Polymorphismen nicht ausgeschlossen werden, die bedeuten, dass die Kopienzahl der Sequenz zwischen den einzelnen Individuen variiert und somit aus de facto gleich langen Telomeren für verschiedene Personen unterschiedliche T/C-Werte resultieren. Bei den Messungen bestätigte sich dies aber nicht, es konnten keine größeren Abweichungen des Zentromers beobachtet werden.

Zu berücksichtigen ist außerdem, dass die Daten durch unterschiedliche Untersucher erhoben wurden und untersucherabhängige Faktoren eine Rolle spielen könnten. Auch liegen für die verschiedenen Altersgruppen unterschiedliche Fallzahlen vor, die im Falle der Neugeborenen aus 53 weiblichen und 55 männlichen ausgewerteten Probanden und im Falle der 100-jährigen Männer nur aus zwei Probanden bestehen. Die Überprüfung des Verlaufs der Werte und der dazugehörigen Standardabweichungen zeigt dennoch eine starke Kohärenz. Trotz der unterschiedlichen Untersucher finden sich keine stärkeren Abweichungen. Die einzige Ausnahme bildet die Altersgruppe der 50-Jährigen, die generell sehr hohe Werte und damit auch eine relativ hohe Standardabweichung aufweist.

2. Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Arbeiten

2.1 Geschlechtsunabhängige Telomerverkürzung

Was die Untersuchung der Telomerlänge von Chromosomen peripherer Blutlymphozyten anbelangt, werden sehr oft nur Angaben über die durchschnittliche Länge der Telomere gemacht, wobei die Durchschnittswerte je nach Studie zum Teil um 13 kb (20) oder auch um 6,5 kb (86,90) betragen und innerhalb dieses Intervalls ebenfalls viele unterschiedliche Werte zu finden sind (11,22,23,59,65). Der Mittelwert der Daten dieser Arbeit beträgt umgerechnet 10,6 kb, liegt also innerhalb dieses Intervalls. Der Vergleich wird durch die starken Schwankungen allerdings sehr erschwert.

Die zum Teil sehr starken Variationen sind dadurch bedingt, dass zum einen unterschiedliche Altersgruppen untersucht werden und keine Altersanpassung erfolgt, zum anderen unterschiedliche Methoden zur Anwendung kommen, die die Werte in eine bestimmten Richtung beeinflussen können .

Deshalb werden im nachfolgenden Teil nur Studien berücksichtigt, die die Telomerlängendynamik mit zunehmendem Alter beschreiben. Dies geschieht größtenteils mit Hilfe von Regressionsgeraden beziehungsweise Kurven, die einen unterschiedlichen Verlauf zeigen. Es erfolgt zusätzlich eine Auftrennung nach der verwendeten Messmethode, um einen besseren Vergleich zu ermöglichen.

Viele Autoren verwenden Southern Blots, um die Telomerlänge der einzelnen Probanden zu quantifizieren. Die Mehrzahl von ihnen beschreibt ihre Ergebnisse im Altersverlauf durch lineare Regression (Abbildung 38, erste bis achte Regressionsgerade) (11,22,31,65,79,86,93,97), wobei die ermittelten Korrelationskoeffizienten in ihrer Größenordnung untereinander vergleichbar sind. Der Verlauf der linearen Regression unterscheidet sich je nach Autor allerdings zum Teil erheblich. Es gibt Geraden mit hohen Ausgangswerten bei Neugeborenen (11,93), die auch eine etwas höhere Steigung aufweisen, und solche, die geringere Ausgangswerte haben, aber etwas flacher verlaufen (22,31,79,86,97). Die Angaben über die jährliche Abnahme in Basenpaaren schwankt zwischen durchschnittlich 22 und 41 bp (31,65,79,86,97). Einige Autoren (Abbildung 38,

neunte und zehnte Regressionsgerade) wählen dagegen einen segmentierten beziehungsweise polynomischen Kurvenverlauf.

Die Gruppe um Frenck (20) unterscheidet mehrere Phasen der Telomerverkürzung. Einem sehr schnellen Telomerverlust in der Kindheit folgt hier ein Plateau bis ins junge Erwachsenenalter, dann ein zunehmender altersabhängiger Telomerverlust. Für diese Aussage werden aber Mittelwerte innerhalb einer Altersgruppe gebildet, wodurch ein direkter Vergleich mit anderen Arbeiten nicht möglich ist. Eine zweite Studie (79) folgt demselben Ansatz, fasst aber zusätzlich unterschiedliche Altersgruppen in einem Mittelwert zusammen, so dass eine grafische Darstellung im Rahmen von Abbildung 38 nicht erfolgen kann. Es werden jüngere Personen bis 31 Jahre untersucht, wobei es im ersten Lebensjahr mit einem jährlichen Verlust von etwa 700 bp zu einer sehr schnellen Telomerverkürzung kommt, dem sich ein Plateau bis zum zehnten Lebensjahr und dann ein relativ kontinuierlicher Abfall von etwa 20 bp pro Jahr anschließt, wobei diese Unterschiede in der Telomerlängendynamik aber keine statistische Signifikanz erreichen. Ein weiterer Autor (106) kann ebenfalls bei Kindern in den ersten drei Lebensjahren mit Verlusten von 270 bp pro Jahr eine sehr schnelle Abnahme der Telomerlänge beobachten. Einem etwas anderen Ansatz folgt ein Artikel, der eine Anpassung mittels polynomischer Regression vornimmt (38). Auch hier unterscheidet sich die jährliche Abnahme der Telomerlänge altersabhängig. Bei Personen unter 40 Jahren beträgt sie 84 bp, dann 41 bp.

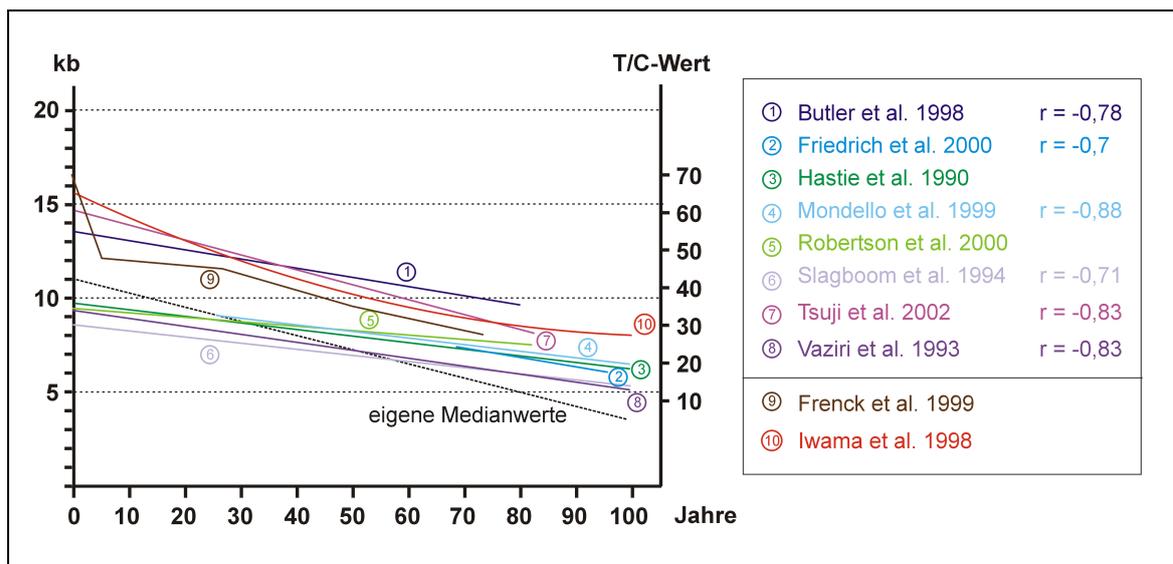


Abbildung 38: publizierte Telomerverkürzungen (Methode: Southern Blot)

Dargestellt sind Regressionsgeraden von Publikationen, die zur Messung der Telomerlänge in unterschiedlichem Lebensalter Southern Blots verwendeten. Das Alter ist auf der X-Achse, die Telomerlänge in kb beziehungsweise der T/C-Wert auf der Y-Achse aufgetragen. Die Regressionsgeraden sind farblich kodiert und mit Nummern versehen, die Legende gibt die dazugehörige Publikation und dahinter, falls in der Studie ermittelt, den jeweiligen Korrelationskoeffizienten an. Die oberen acht Studien verwenden im Gegensatz zu den beiden unteren eine lineare Darstellungsform. Die gestrichelte schwarze Linie repräsentiert die im Rahmen dieser Arbeit aus allen Medianwerten ermittelte Regressionsgerade.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse, die mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gewonnen wurden (Abbildung 39), muss ebenfalls der Ansatz der linearen Regression von dem eines segmentierten Verlaufs unterschieden werden.

Martens et al. sowie Son et al. verwenden lineare Regression, wobei die Gruppe um Martens quantitative Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verwendet und auf eine jährliche Abnahme von etwa 33 bp bei etwas höheren Ausgangswerten kommt (59), die Gruppe um Son mittels Flow-Zytometrie eine etwas geringere jährliche Abnahme von 26 bp bei niedrigeren Ausgangswerten feststellt (90). Das Prinzip der segmentierten Auswertung mittels Flow-Zytometrie findet Verwendung in der Arbeit von Rufer et al.. Einem stärkeren Abfall im frühen Kindesalter um 1000 bp im ersten Lebensjahr schließt sich eine langsamere Abnahme der Telomerlänge um 59 bp pro Jahr an.

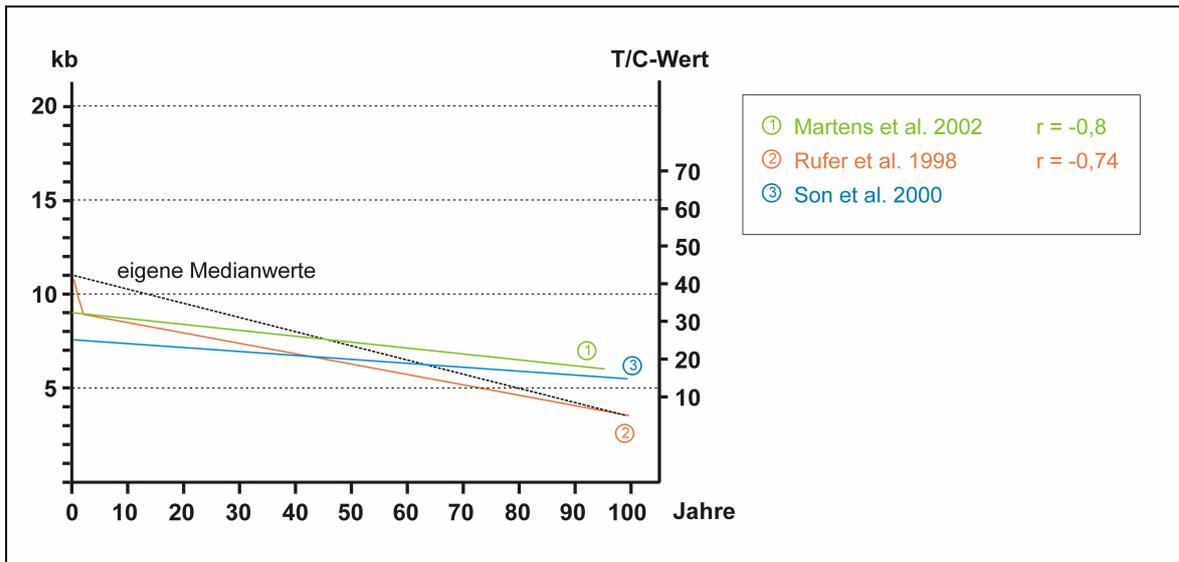


Abbildung 39: publizierte Telomerverkürzungen (Methode: FISH)

Dargestellt sind die Regressionsgeraden von Publikationen, die altersabhängige Telomerverkürzung mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung quantifizieren. Das Alter ist auf der X-Achse, die Telomerlänge in kb beziehungsweise der T/C-Wert auf der Y-Achse aufgetragen. Die Regressionsgeraden sind farbkodiert und mit Nummern versehen, die Legende gibt die dazugehörige Publikation an. Die gestrichelte schwarze Linie repräsentiert die im Rahmen dieser Arbeit aus allen Medianwerten ermittelte Regressionsgerade.

Es gibt auch Arbeiten, die keine negative Korrelation zwischen Alter und Telomerlänge finden oder bei denen ohne Modifikationen des untersuchten Kollektivs keine Unterschiede der Telomerlänge bei älteren und jüngeren Probanden festzustellen sind (49,53,57). Die oben beschriebenen negativen Korrelationen dominieren jedoch.

Der Vergleich der unterschiedlichen beschriebenen Telomerveränderungen, mit denen der vorliegenden Arbeit ergibt zunächst, unabhängig von der Methodik, vergleichbare Korrelationskoeffizienten zwischen -0,7 und -0,88, womit der hier ermittelte Wert von -0,76 gut harmonisiert. In Bezug auf die jährliche Abnahme in Basenpaaren, die nach dieser Arbeit bei etwa 63 bp liegt, kommen andere Studien, bei denen eine Basenpaarangabe erfolgt, zum Teil zu deutlich niedrigeren Ergebnissen. Sie gehen also von einem weniger starken Telomerverlust pro Zeiteinheit aus. Die Ausgangswerte bei Neugeborenen variieren sehr stark, was auch daran liegt, dass diese zum Teil nur interpoliert

wurden (31). Der hier ermittelte Ausgangswert von 12 kb liegt in etwa in der Mitte, es kommen deutlich höhere und niedrigere Werte vor. Der Endwert bei 100-Jährigen liegt dagegen mit 5,7 kb sehr niedrig, so gut wie alle Studien kommen in diesem Punkt zu höheren Endwerten, wobei auch hier zum Teil interpoliert wird (31,86). Einige Studien haben nur geringe Fallzahlen (11,22,65), was die Vergleichbarkeit zusätzlich erschwert. Generell fällt zudem auf, dass Studien, die Southern Blots verwenden, auf sehr hohe Werte kommen, was an der Miterfassung subtelomerischer Regionen liegen könnte.

Die meisten betrachteten Studien stimmen also in ihrer Tendenz zur Abnahme, im Detail aber nicht im Verlauf dieser mit den hier ermittelten Ergebnissen überein. Die Arbeit von Rufer et al. (80) aber einen ganz ähnlichen Kurvenverlauf wie hier, da der Anfangswert bei Neugeborenen sowie der Endpunkt bei 100-Jährigen fast identisch sind. Die durchschnittlichen jährlichen Abnahmen von -59 bp versus -63 bp sind ebenfalls gut vergleichbar. Die verwendeten Methoden sind ähnlich und die Fallzahl ist ebenfalls groß genug, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Im Rahmen der Studie wurde zwar eine segmentierte Analyse durchgeführt, was aber nicht im Widerspruch zu den hier ermittelten Ergebnissen steht, da diese auf einer Analyse in Zehnjahresschritten beruhen. Die lineare Auswertung erschien aufgrund der Altersverteilung des hier vorliegenden Kollektivs am sinnvollsten, eine Aussage über Telomerveränderungen im frühen Kindesalter kann oder soll nicht getroffen werden. Eine einfache lineare Regression auf der Basis der Daten von Rufer et al. hätte einen ähnlichen Verlauf gezeigt wie die Regressionsgerade der im Rahmen dieser Studie ausgewerteten Daten, was für eine vergleichbare Datenlage spricht.

Die globale Analyse der im Rahmen dieser Arbeit erfassten Daten ergibt also, wie in zahlreichen Literaturstellen beschrieben, eine Abnahme der pangenomischen Telomerlänge mit zunehmendem Alter, die hier durch eine stark negative Korrelation zwischen den beiden Faktoren bestätigt wird. Einige beschriebene Ergebnisse stimmen mit den hier erhaltenen insoweit überein, als sie von einer konstanten Telomerosion ausgehen. Bestehende Unterschiede können unter Umständen durch unterschiedliche Methoden oder anderes Studiendesign bedingt sein. Dennoch wurde auch in hohem Alter bei keiner Auswertung eine kritische

Telomerlänge erreicht, so dass die durchschnittliche Länge der Telomere nicht alleinentscheidend für den Prozess der Seneszenz sein kann. Zusätzliche Einflussfaktoren wie oxidativer Stress, Umwelteinflüsse, Zellteilungsraten, Veränderungen der Telomerstruktur und auf individueller Ebene auch genetische Determination sind ebenfalls beteiligt (26,55,78,83,91,98).

2.2 Geschlechtsabhängige Telomerverkürzung

Nur sehr selten wurden in der Literatur altersabhängige Telomerveränderungen bei Frauen und Männern getrennt untersucht. Zwar wurde die Beobachtung gemacht, dass die durchschnittliche Telomerlänge und auch ihre jährliche Abnahme in Basenpaaren bei Frauen etwas größer ist als bei Männern (41,80,97), allerdings waren diese Unterschiede statistisch nur in einem Fall (41) signifikant. Auch bei Neugeborenen konnten bisher keine geschlechtsspezifischen Unterschiede nachgewiesen werden (72).

Im Gegensatz dazu wird in zwei Studien eine geschlechtsgetrennte Auswertung der Telomerlängen in Abhängigkeit vom Alter vorgenommen, die jeweils eine statistische Signifikanz aufweisen. Die Studie von Benetos et al. (6) vergleicht mittels Southern Blot die durchschnittliche Telomerlänge bei Frauen und Männern und deren Verlauf mit zunehmendem Alter. Sie kommt bei einem durchschnittlichen Alter von 55 Jahren für Männer und 56 Jahren für Frauen auf eine mittlere Telomerlänge von 8,37 beziehungsweise 8,67 kb. Die jährliche Abnahme beträgt dabei 36 bp für Frauen und 38 bp für Männer. Die Regressionsgeraden der besagten Studie (Abbildung 40) verlaufen sehr flach. Die Divergenz ist recht schwach ausgeprägt, allerdings waren auch nur die mittleren Altersgruppen von ungefähr 25 bis 85 Jahren vertreten. Für die Korrelation zwischen Alter und Telomerlänge war in der Studie ein Wert von $r = -0,45$ für Männer und von $-0,48$ für Frauen angegeben. Die Studie von Nawrot et al. (69) beschäftigt sich ebenfalls mit Unterschieden der Telomerlänge zwischen den Geschlechtern. Auch hier werden mit Hilfe von Southern Blot gewonnene TRF-Längen von Männern und Frauen verglichen. Der Durchschnittswert für

Frauen wird hier mit 6,92 kb, der für Männer mit 6,77 kb angegeben, wobei der Unterschied zwischen Männern und Frauen statistisch signifikant ist. Die Regressionsanalyse liefert zwei Regressionsgeraden, bei denen der jährliche Basenpaarverlust für Frauen mit 19 bp deutlich geringer ist als für Männer mit 24 bp. Auch diese Regressionsgeraden verlaufen flach und nehmen vor allem für jüngere Probanden eine recht geringe Telomerlänge an (Abbildung 40). Es findet sich eine mit dem Alter zunehmende Divergenz zwischen den beiden Regressionsgeraden. Der Korrelationskoeffizient r nimmt Werte von $-0,49$ für Frauen und $-0,54$ für Männer an.

Im Vergleich dazu beträgt die im Rahmen dieser Arbeit berechnete durchschnittliche Telomerlänge umgerechnet 10,42 kb für Männer und 10,72 kb für Frauen. Sie ist also durchweg höher als die in den oben beschriebenen Arbeiten genannten Werte, allerdings bei einem durchschnittlichen Alter von 24,0 beziehungsweise 26,7 Jahren, was die Werte nur bedingt vergleichbar macht. Auch die jährliche Abnahme von durchschnittlich 62 bp pro Jahr bei Frauen und 67 bp bei Männern liegt um Einiges höher als die oben genannten Werte. Zudem zeigen sich Unterschiede im Vergleich der Regressionsgeraden, die hier bei höheren Ausgangs- und geringeren Endwerten weniger flach und für Männer und Frauen divergenter verlaufen. Die Korrelationskoeffizienten der hier verwendeten Daten sind mit $r = -0,78$ für Männer und $r = -0,74$ für Frauen besser als die oben genannten.

Die Ergebnisse der anderen Arbeiten stimmen also tendentiell mit denen der vorliegenden Arbeit überein, ein identischer Verlauf ist beim direkten Vergleich allerdings nicht zu erkennen. Dies könnte zum einen an der Anwendung unterschiedlicher Methoden (Southern Blot versus Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung), zum anderen aber auch an Unterschieden in der Beschaffenheit des Kollektivs liegen (beide Studien decken nur eine geringere Altersspanne ab).

In Bezug auf die geschlechtsabhängige Telomerverkürzung ist eine Bewertung der Ergebnisse im Vergleich nicht allumfassend möglich, da nur wenige Daten dazu vorliegen und eine Auswertung mittels einer vergleichbaren Methode bisher noch nicht erfolgt ist. Die unterschiedlich starke Ausprägung der Telomerverkürzung bei

Männern und Frauen kann im Rahmen dieser Arbeit aber auf statistisch signifikantem Niveau klar bestätigt werden.

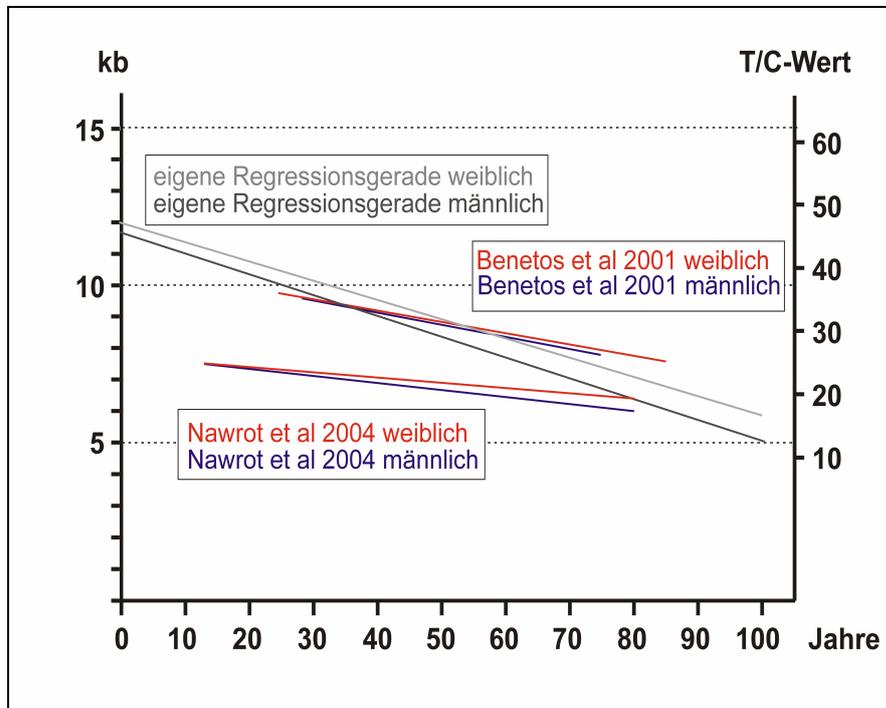


Abbildung 40: publizierte Telomerverkürzungen bei Männern und Frauen

Dargestellt sind Regressionsgeraden von Publikationen, bei denen eine Auftrennung in männliche (blau) und weibliche Probanden (rot) erfolgte. Das Alter ist auf der X-Achse, die Telomerlänge in kb beziehungsweise der T/C-Wert auf der Y-Achse aufgetragen. Als Vergleich sind die hier ermittelten Regressionsgeraden eingezeichnet (hellgrau für Frauen, dunkelgrau für Männer).

Eine explizite Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der Telomerlängendynamik bei Männern und Frauen fehlt bislang. Es gibt Hinweise, dass die Telomerverkürzungsrate bei Männern und Frauen in vivo auf unterschiedliche Weise beeinflusst werden könnte. Auf oxidativen Stress nämlich, der zu Schädigung der DNA und folglich der Telomere führt (83,98), kann Östrogen einen protektiven Effekt ausüben (2).

Sollten längere Telomere also das Risiko verringern, an altersassoziierten Erkrankungen zu versterben, wie in einem Artikel von Cawthon et al. postuliert

wird (13), könnte man damit also zumindest teilweise die höhere Lebenserwartung von Frauen gegenüber Männern erklären. Zu welchem Prozentsatz aber Telomere einen Beitrag zum Unterschied der Lebenserwartung von Männern und Frauen liefern, ist ungeklärt.

2.3 Chromosomenabhängige Telomerverkürzung

Bisher ist noch nicht bekannt, ob die globale Verkürzung der Telomere (52,60) oder die eines bestimmten Chromosoms (34) die Zellteilung einschränkt. Individuelle Chromosomenarme variieren stark in der Länge ihrer Telomere (7,47,52), beim Menschen wird eine Assoziation des Chromosomenarms 17p mit besonders kurzen Telomeren vermutet (47). Das inaktive X-Chromosom scheint sich schneller als das aktive zu verkürzen (92). Xp könnte ebenfalls für die Beschränkung des Proliferationspotentials von Zellen verantwortlich sein (30).

Die Telomerlänge aller einzelnen Chromosomenarme wurde bisher nur in einer Arbeit untersucht (47). Dort wurden, wie hier, chromosomenspezifische Unterschiede in der Telomerlänge gefunden. Als besonders kurzes Telomer wurde das des Chromosomenarms 17p herausgestellt, auch 19p, 22q und 20q wurden als relativ kurz beschrieben. Als längster Arm erscheint 4q.

Auch in der vorliegenden Arbeit ist 4q der längste Arm; 17p, 22q und 20q sowie 19p liegen am niedrigsten, wobei die kürzesten Telomere hier nicht 17p, sondern 19p aufweist. Insgesamt liegt also eine sehr gute Vergleichbarkeit vor. Eine geschlechtsspezifische Auftrennung der Chromosomenarme ist allerdings noch in keiner Arbeit erfolgt.

Eine Theorie zur Gesetzmäßigkeit der Verteilung der Telomerlänge der einzelnen Chromosomenarme vermutet in Anlehnung an die Chromosomenfeldtheorie von Lima-de-Faria (50), nach der die Organisation eukaryotischer Chromosomen auf dem Zusammenspiel von Telomeren und Zentromeren beruht, dass die Distanz zwischen Telomer und Zentromer einen Einfluss auf die Länge des Telomers hat

(88). Telomere sind danach kürzer an kürzeren Chromosomenarmen und länger an längeren. Die Beobachtung, dass Telomere von p-Armen kürzer sind als die von q-Armen (88), konnte hier nicht bestätigt werden. Dennoch zeigte sich, dass mit zunehmender physikalischer, aber auch genetischer Länge der Chromosomen beziehungsweise Chromosomenarme die Länge der korrespondierenden Telomere tendenziell ebenfalls zunimmt, und umgekehrt bei zunehmender Rekombinationsrate die Telomerlänge abnimmt. Dies steht in Einklang mit anderen Beobachtungen (61,87).

Was die Telomerlänge an Geschlechtschromosomen angeht, kann hier keine Aussage über die beschriebene unterschiedliche Verkürzungsrate zwischen aktivem und inaktivem X-Chromosom (92) gemacht werden. Über den Chromosomenarm Xp kann man sagen, dass er in dieser Arbeit weder global noch nach geschlechter-spezifischer Auftrennung zu den kürzeren Chromosomen zählt.

Die in dieser Arbeit gezeigte Konkordanz zwischen den Telomeren von Xp und Yp sowie Xq und Yq für männliche Probanden, die über alle Altersgruppen hinweg sehr stark positiv korreliert sind ($r = 0,96$ für die p-Arme beziehungsweise $r = 0,95$ für die q-Arme), spricht für ein Angleichen der Telomerlänge von X- und Y-Chromosom. Sie wurde bisher noch nicht beschrieben.

Man kann sich diesen Mechanismus in der Zygote oder im frühen Embryonalstadium lokalisiert vorstellen. Er muss davon abhängig sein, ob ein X- oder ein Y-Chromosom präsent ist. Entweder das X- oder das Y-Chromosom müssen daraufhin angeglichen werden. Hier kann man sich zwei Möglichkeiten vorstellen:

Im Allgemeinen geht man davon aus, dass die Telomere der Männer in diesem Stadium bereits um Einiges kürzer als die der Frauen gleicher Altersgruppe sind. Bei einer XX-Rekombination müssten die Telomere des männlichen X-Chromosoms also der Länge des weiblichen angeglichen, das heißt verlängert, werden. Im Falle einer XY-Rekombination müssten die Telomere des mütterlichen X-Chromosoms dagegen auf die Länge des väterlichen Y-Chromosoms verkürzt werden.

Es gibt aber auch eine Publikation, die eine Zunahme der Telomerlänge von Sperma-DNA mit dem Alter der Spender zeigt (1). Für Oozyten wurde dies nicht beschrieben. Gesetzt den Fall, dass das Phänomen nur bei Sperma-DNA auftritt, wären die Telomere der Männer zu diesem Zeitpunkt länger. Im Falle einer XX-Rekombination würde nun die Länge der Telomere des mütterlichen X auf die des väterlichen X verlängert, im Falle einer XY-Rekombination dagegen die Telomere des väterlichen Y-Chromosoms auf die des mütterlichen X-Chromosoms verkürzt.

Diese beiden Hypothesen unterscheiden sich darin, dass ohne Verlängerung der Sperma-DNA oder bei gleichförmiger Veränderung der Telomere in Spermien und Oozyten einmal das X-Chromosom (im Falle der XX-Rekombination) und einmal das Y-Chromosom (im Falle der XY-Rekombination) die telomerlängen-determinierenden Variablen wären. Bei Einbeziehen einer isolierten Verlängerung der Telomere von Sperma-DNA dagegen würde beide Male eine Angleichung an das X-Chromosom erfolgen. Dies würde auch zu einem postulierten X-gebundenen Vererbungsmechanismus der Telomerlänge passen (69).

In jedem Fall bedingt dies allerdings, dass Verlängerungen und Verkürzungen der Telomere stattfinden müssten, deren Mechanismus nicht geklärt ist. Rekombination zwischen telomerischen oder subtelomerischen Regionen, Verkürzung durch Exonukleasen, Verlängerung durch Telomerase oder auch Unterschiede in der epigenetischen Regulation der Telomerstruktur könnten eine Rolle spielen.

2.4 Schiefeverteilung und verstärkte Fluoreszenzsignale

Die vorliegenden Polymorphismen in der Telomerlänge sind als Telomerlängen-varianzen zwischen den Allelen eines Chromosoms bereits für Mäuse (45,107) sowie menschliche Fibroblasten (4) beschrieben. Auch für menschliche Lymphozyten finden sich statistisch signifikante Unterschiede in der Telomerlänge zwischen Schwesterchromatiden, die bei älteren Probanden zudem deutlicher sichtbar sind (5). Bei Älteren konnten trotz kürzerer durchschnittlicher Telomer-

länge größere Variationen in ihrer Länge beobachtet werden (11). Dies spricht für eine Zunahme dieser Heterogenität im Alter, was mit der hier ermittelten Zunahme der Schiefe und der zunehmenden Linksverschiebung der Histogramme übereinstimmt.

Bezüglich der Schiefeverteilung wurde für B-Zellen eine asymmetrische Telomerlängenverteilung mit sehr hohen Telomerlängen vergleichbar der hier beobachteten festgestellt, wobei T-Zellen in dieser Studie aber konträr zu den hier ermittelten Histogrammen ein symmetrisches Histogramm ohne hohe Werte aufwiesen (59). Das asymmetrische Verhalten der B-Zellen wurde dadurch erklärt, dass die B-Zellen mit längeren Telomeren memory-B-Zellen repräsentierten, die mit den kürzeren Telomeren dagegen naive B-Zellen.

Die geschlechtsabhängige Häufigkeit hoher T/C-Werte ist bisher nicht beschrieben. Die Tatsache, dass das Histogramm bei Frauen nicht nach rechts verschoben ist, sondern bei geringeren T/C-Werten der Histogrammverlauf bei Frauen und Männern quasi identisch ist, spricht dagegen, dass bei Frauen einfach protektive Faktoren gegen extrinsischen Telomerverlust oder -schädigung, zum Beispiel gegenüber freien Radikalen (2), vorliegen, da dies zu einer Parallelverschiebung führen würde.

Ein Mechanismus, der dem Telomerverlust entgegenwirkt und bei Frauen stärker ausgeprägt ist als bei Männern, wäre die wahrscheinlichere Erklärung. Telomerase spielt hierbei wohl keine Rolle, da die Länge von Telomerase-stabilisierten Telomeren in der Regel zwischen 4 und 10 kb liegt (84). Der alternative Weg der Telomerverlängerung (ALT), der DNA-Rekombinations- und Replikationsenzyme benutzt, kann dagegen extrem heterogene Telomere in einer Größenordnung von 5 bis 48 kb verursachen (14,84). Dies würde gut dazu passen, dass häufig Werte um und über 150 T/C-Werte (umgerechnet etwa 33kb) beobachtet werden konnten. Die Frage bleibt allerdings, warum bei Frauen dieser Mechanismus stärker ausgeprägt sein sollte. Potentielle Ursachen sind zwar noch nicht erfasst, aber die unterschiedliche Ausprägung könnte durch X-chromosomal kodierte Gene bedingt sein, die in die Replikation, Rekombination oder Reparatur der DNA eingreifen. Sie müssten der X-Inaktivierung entgehen und auf dem Y-

Chromosom nicht aktiv sein, so dass es zu einer relativen Überexpression bei Frauen kommt. Damit wären die bei Frauen relativ häufiger vorkommenden hohen T/C-Werte erklärt.

3. Telomere im Seneszenzprozess

Gemäß der vorherrschenden Meinung verkürzen sich die Telomere somatischer Zellen mit jeder Teilung, bis es durch die zunehmende Erosion schließlich zur Seneszenz der Zelle kommt. Sie werden vielfach als Indikator für das Altern von Zellen verwendet, womit in Einklang steht, dass die Telomerlänge hier in ihrer Gesamtheit, aber auch auf chromosomenspezifischer Ebene mit zunehmendem Alter der Menschen linear abnimmt. Auf chromosomaler Ebene findet man ein komplexeres Bild, starke Variationen in der Länge der individuellen Chromosomenarme sowie unterschiedliche Verkürzungsgeschwindigkeiten dieser können beobachtet werden. Das proliferative Potential menschlicher Zellen könnte also dadurch begrenzt sein, dass ein kritisch kurzes Telomer eines determinierten Chromosomenarms eine kritische Schwelle erreicht und so den Seneszenzprozess einleitet (67). Es ist aber auch nicht ausgeschlossen, dass es erst zu einer Akkumulation vieler kurzer Telomere kommt (46). Die Telomerlänge bei Frauen und Männern verhält sich zudem unterschiedlich. Bei Männern werden niedrigere Ausgangswerte und schnellere Verkürzungsraten beobachtet, sowohl global als auch chromosomenarmspezifisch, was zu der Theorie der Telomere als Triggermechanismen der Seneszenz passt, zumal Frauen eine höhere Lebenserwartung als Männer haben.

Neu ist allerdings die Tatsache, dass sich die Telomere von X- und Y-Chromosom beim Mann bezüglich ihrer Länge angleichen, das heißt, es könnte eine Beeinflussung der Telomerlänge auf chromosomaler Ebene geben, die eine Verkürzung und auch eine Verlängerung beinhaltet. Es ist somit nicht ausgeschlossen, dass auch die Größe der Telomere anderer Chromosomenarme beeinflusst wird. Die linksgipflige Schiefverteilung der Werte im Histogramm, die das regelmäßige Auftreten sehr hoher Werte visualisiert, spricht ebenfalls für

dynamische Veränderungen der Telomerlänge, da zum einen keine Normalverteilung vorliegt, die der Erwartung entsprechen würde. Außerdem nimmt die Schiefe mit dem Alter zu und ist bei Frauen stärker ausgeprägt als bei Männern. Zusammen mit dem visuell erkannten und statistisch belegten Phänomen hoher T/C-Werte, die auch an einzelnen Chromatiden auftreten, ist es naheliegend, einen Prozess zu vermuten, der zu einer Verlängerung von Einzeltelomeren führt. Dieser Prozess muss bei Frauen stärker greifen als bei Männern, da in den Histogrammen nicht eine Verschiebung der Maximalwerte, sondern ein vermehrtes Auftreten hoher Werte bei Frauen beobachtet werden. Dies gilt auch beim Betrachten der Standardabweichungen, die eine Verfälschung durch die generell höheren Werte der weiblichen Probanden nicht zulassen. Es kann sich also nicht nur um einen protektiven Faktor bei Frauen handeln, der vor Telomererosion schützt. Die hohen Werte müssen nach dieser Datenlage sekundär verlängerte Telomere repräsentieren.

Im komplexen Prozess der Seneszenz, der durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird, scheinen sich also auch die Telomere nicht unidirektional im Sinne einer biologischen Uhr zu verhalten. Die Modifikation beziehungsweise Anpassung von Telomerlängen, die hier für die männlichen Geschlechtschromosomen gezeigt werden konnte, sowie die sporadische, oft extensive Verlängerung von Einzeltelomeren, sprechen klar für bisher nicht erkannte epigenetische Modifikationen der Telomerlänge, die parallel zu einer automatischen Verkürzung im Rahmen des Zellzyklus ebenfalls vorkommen.

Die vorliegende Arbeit zeigt damit, dass die Telomere im Rahmen der Seneszenz ein dynamischer Faktor sind und Modifikationen durch Verkürzung und Verlängerung unterliegen, über deren Ätiologie bis jetzt nur spekuliert werden kann. Eine Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen könnte Aufschluss darüber geben, ob die beobachteten Unterschiede bei Männern und Frauen zur Erklärung der geschlechtsspezifischen Unterschiede der Lebenserwartung beitragen. Zudem könnte man Erkenntnisse gewinnen, inwieweit das spezifische Telomerprofil der einzelnen Chromosomenarme für den Prozess der Seneszenz eine Rolle spielt und inwieweit extrinsische und intrinsische Faktoren zu einer Beeinflussung der einzelnen Chromosomenarme führen.

Zusammenfassung

Von Telomeren als chromosomale Endstrukturen wird gemeinhin angenommen, dass sie als biologische Uhr von Zellen agieren und so im Seneszenzprozess eine entscheidende Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 205 Personen, die zwischen 0 und 100 Jahre alt waren, hinsichtlich der Telomerlänge ihrer peripheren Blutlymphozyten mittels der T/C-FISH-Methode (Telomer/Centromer-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) untersucht. Um Erkenntnisse über die Dynamik der Telomerlänge zu gewinnen, wurden die erhobenen Daten nicht nur nach Alter, sondern zusätzlich noch nach Geschlecht und nach Chromosomenarmen aufgetrennt.

Die globale Verkürzung des Medians der Telomerlänge mit zunehmendem Alter konnte durch lineare Regression beschrieben werden und entspricht einem Ausgangswert von etwa 12 kb (Kilobasen) bei Neugeborenen und einem Endwert von 5,7 kb bei 100-Jährigen, also einem durchschnittlichen Telomerverlust von etwa 63 bp (Basenpaaren) pro Jahr. Getrennte Betrachtung von Männern und Frauen lieferten statistisch signifikante Geschlechtsunterschiede, sowohl bei der Ausgangslänge der Telomere von Neugeborenen als auch in ihrem jährlichen Basenpaarverlust. Zusätzlich zur kürzeren Ausgangslänge von 11,9 kb im Vergleich zu 12,2 kb bei Frauen ist die pangenomische Telomerosion bei Männern jedes Alters mit 67 bp jährlich stärker ausgeprägt als bei Frauen mit 62 bp.

Die chromosomenarmspezifische Auftrennung ließ sowohl in ihren absoluten Medianwerten als auch in ihrer altersabhängigen Dynamik starke Unterschiede zwischen den einzelnen Chromosomenarmen erkennen, wobei die Telomerlänge der einzelnen Chromosomenarme gut mit deren physikalischer und genetischer Länge korrelierte. Auch hier fanden sich geschlechtsspezifische Unterschiede im Telomerverkürzungsprofil, bei beiden Geschlechtern konnten jedoch die Telomere an 4q als die längsten und die an 19p als die kürzesten hervorgehoben werden.

Bezüglich der Telomerlänge der männlichen Geschlechtschromosomen fiel eine starke Konkordanz sowohl der p-Arme des X- und des Y-Chromosoms als auch der korrespondierenden q-Arme auf. Diese Angleichung war über alle Altersgruppen hinweg sichtbar.

Statt einer erwarteten Normalverteilung der Daten fand sich eine linksgipflige Verteilung, wobei die Schiefe bei Frauen noch ausgeprägter als bei Männern war. Die Beobachtung einzelner sehr starker Telomersignale konnte mit den aufgetretenen hohen Werten in Verbindung gebracht werden. Diese wurden im Rahmen einer Endoreduplikation verifiziert. Bei Betrachtung dieser hohen Werte in Abhängigkeit von der Standardabweichung konnte keine Alters- oder chromosomale Präferenz gefunden werden, was für eine zufällige Verteilung dieses Phänomens und damit für sporadische Telomerverlängerungen spricht.

Telomere unterliegen diesen Ergebnissen zufolge also nicht nur einer kontinuierlichen Verkürzung mit zunehmendem Alter, die geschlechts- und chromosomenspezifisch unterschiedlichen Mustern folgt, sondern es existieren dazu Mechanismen, die zu einem Angleichen und sogar zu einer sporadischen Verlängerung der Telomere führen können.

Der Mechanismus dieser dynamischen Längenveränderungen ist bisher noch ungeklärt, könnte aber ein Ansatz sein, um geschlechtsspezifische Unterschiede in der Lebenserwartung zu erklären und festzustellen, inwieweit die Telomere einzelner Chromosomenarme am Prozess der Seneszenz beteiligt sind und durch Verlängerungsmechanismen beeinflusst werden.

Literaturverzeichnis

1. **Allsopp RC**, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB: Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10114-10118 (1992)
2. **Aviv A**: Telomeres, sex, reactive oxygen species, and human cardiovascular aging. *J Mol Med* 80: 689-695 (2002)
3. **Baerlocher GM**, Lansdorp PM: Telomere length measurements in leukocyte subsets by automated multicolor flow-FISH. *Cytometry* 55A: 1-6 (2003)
4. **Baird DM**, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D: Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet* 33: 203-207 (2003)
5. **Bekaert S**, Koll S, Thas O, Van Oostveldt P: Comparing telomere length of sister chromatids in human lymphocytes using three-dimensional confocal microscopy. *Cytometry* 48: 34-44 (2002)
6. **Benetos A**, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, Labat C, Bean K, Aviv A: Telomere length as an indicator of biological aging: The gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension* 37: 381-385 (2001)
7. **Benn P**: Aging chromosome telomeres: parallel studies with terminal repeat and telomere associated DNA probes. *Mech Ageing Dev* 99: 153-166 (1997)
8. **Broccoli D**, Young JW, de Lange T: Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9082-9086 (1995)

9. **Brüderlein S**: Eine Methode zur quantitativen und chromosomen-spezifischen Telomermessung (Verbesserung der Q-FISH Methode von PM Lansdorp). Hum Biol Dissertation, Universität Ulm 2000
10. **Bryant JE**, Hutchings KG, Moyzis RK, Griffith JK: Measurement of telomeric DNA content in human tissues. *Biotechniques* 23: 476-478 (1997)
11. **Butler MG**, Tilburt J, DeVries A, Muralidhar B, Aue G, Hedges L, Atkinson J, Schwartz H: Comparison of chromosome telomere integrity in multiple tissues from subjects at different ages. *Cancer Genet Cytogenet* 105: 138-144 (1998)
12. **Cawthon RM**: Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e47 (electronic publication) (2002)
13. **Cawthon RM**, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA: Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 361: 393-395 (2003)
14. **Cerone MA**, Londono-Vallejo JA, Bacchetti S: Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. *Hum Mol Genet* 10: 1945-1952 (2001)
15. **Ciloglu N**: Geschlechtsspezifische Unterschiede der Telomerlängen bei Neugeborenen. Med Dissertation, Universität Ulm (in Vorbereitung)
16. **Counter CM**, Ailion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S: Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11: 1921-1929 (1992)
17. **de Pauw ES**, Verwoerd NP, Duinkerken N, Willemze R, Raap AK, Fibbe WE, Tanke HJ: Assessment of telomere length in hematopoietic interphase cells using in situ hybridization and digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 32: 163-169 (1998)

18. **Dunham MA**, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR: Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 26: 447-450 (2000)
19. **Feng YR**, Norwood D, Shibata R, Gee D, Xiao X, Martin M, Zeichner SL, Dimitrov DS: Telomere dynamics in HIV-1 infected and uninfected chimpanzees measured by an improved method based on high-resolution two-dimensional calibration of DNA sizes. *J Med Primatol* 27: 258-265 (1998)
20. **Frenck RW**, Blackburn EH, Shannon KM: The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5607-5610 (1998)
21. **Freulet-Marriere MA**, Potocki-Veronese G, Deverre JR, Sabatier L: Rapid method for mean telomere length measurement directly from cell lysates. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 950-956 (2004)
22. **Friedrich U**, Griese E, Schwab M, Fritz P, Thon K, Klotz U: Telomere length in different tissues of elderly patients. *Mech Ageing Dev* 119: 89-99 (2000)
23. **Friedrich U**, Schwab M, Griese EU, Fritz P, Klotz U: Telomeres in neonates: new insights in fetal hematopoiesis. *Pediatr Res* 49: 252-256 (2001)
24. **Gan Y**, Engelke KJ, Brown CA, Au JL: Telomere amount and length assay. *Pharm Res* 18: 1655-1659 (2001)
25. **Gottschling DE**, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA: Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63: 751-762 (1990)
26. **Graakjaer J**, Pascoe L, der-Sarkissian H, Thomas G, Kolvraa S, Christensen K, Londono-Vallejo JA: The relative lengths of individual

-
- telomeres are defined in the zygote and strictly maintained during life. *Aging Cell* 3: 97-102 (2004)
27. **Greider CW, Blackburn EH**: Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405-413 (1985)
28. **Greider CW, Blackburn EH**: The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51: 887-898 (1987)
29. **Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T**: Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97: 503-514 (1999)
30. **Hao YH, Tan Z**: Telomeres at the chromosome X(p) might be critical in limiting the proliferative potential of human cells. *Exp Gerontol* 36: 1639-1647 (2001)
31. **Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC**: Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346: 866-868 (1990)
32. **Hayflick L**: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636 (1965)
33. **Hayflick L, Moorhead PS**: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621 (1961)
34. **Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW**: The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107: 67-77 (2001)
35. **Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, Shay JW, Ishioka S, Yamakido M**: Activation of telomerase in human

- lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 155: 3711-3715 (1995)
36. **Holdenried AB**: Telomere und Alterung: Telomerlängenbestimmung humaner T-Lymphozyten bei 10-, 20- und 30-jährigen mittels T/C-Fish. Med Dissertation, Universität Ulm 2004
37. **Hultdin M**, Gronlund E, Norrback K, Eriksson-Lindstrom E, Just T, Roos G: Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 26: 3651-3656 (1998)
38. **Iwama H**, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahata N, Ando K, Toyama K, Hoshika A, Takasaki M, Mori M, Shay JW: Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet* 102: 397-402 (1998)
39. **Iwano T**, Tachibana M, Reth M, Shinkai Y: Importance of TRF1 for functional telomere structure. *J Biol Chem* 279: 1442-1448 (2004)
40. **Jackola DR**, Ruger JK, Miller RA: Age-associated changes in human T cell phenotype and function. *Aging (Milano)* 6: 25-34 (1994)
41. **Jeanclos E**, Schork NJ, Kyvik KO, Kimura M, Skurnick JH, Aviv A: Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension* 36: 195-200 (2000)
42. **Jensen-Seaman MI**, Furey TS, Payseur BA, Lu Y, Roskin KM, Chen CF, Thomas MA, Haussler D, Jacob HJ: Comparative recombination rates in the rat, mouse, and human genomes. *Genome Res* 14: 528-538 (2004)
43. **Kapoor V**, Telford WG: Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Methods Mol Biol* 263: 385-398 (2004)

-
-
44. **Kass-Eisler A**, Greider CW: Recombination in telomere-length maintenance. *Trends Biochem Sci* 25: 200-204 (2000)
 45. **Kipling D**, Cooke HJ: Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347: 400-402 (1990)
 46. **Lansdorp PM**: Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. *Mech Ageing Dev* 118: 23-34 (2000)
 47. **Lansdorp PM**, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ: Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5: 685-691 (1996)
 48. **Levis R**, Hazelrigg T, Rubin GM: Effects of genomic position on the expression of transduced copies of the white gene of *Drosophila*. *Science* 229: 558-561 (1985)
 49. **Levy T**, AgoulNIK I, Atkinson EN, Tong XW, Gause HM, Hasenburt A, Runnebaum IB, Stickeler E, Mobus VJ, Kaplan AL, Kieback DG: Telomere length in human white blood cells remains constant with age and is shorter in breast cancer patients. *Anticancer Res* 18: 1345-1349 (1998)
 50. **Lima-de-Faria A**: Chromosome gradient and chromosome field in *Agapanthus*. *Chromosoma* 6: 330-370 (1954)
 51. **Lloyd AC**: Limits to lifespan. *Nat Cell Biol* 4: E25-E27 (electronic publication) (2002)
 52. **Londono-Vallejo JA**, DerSarkissian H, Cazes L, Thomas G: Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans. *Nucleic Acids Res* 29: 3164-3171 (2001)
 53. **Luke S**, Birnbaum R, Verma RS: Centromeric and telomeric repeats are stable in nonagenarians as revealed by the double hybridization fluorescent in situ technique. *Genet Anal Tech Appl* 11: 77-80 (1994)

-
-
54. **Mackinney AA**, Stohlman F, Brecher G: The kinetics of cell proliferation in cultures of human peripheral blood. *Blood* 19: 349-358 (1962)
 55. **Manestar-Blazic T**: Hypothesis on transmission of longevity based on telomere length and state of integrity. *Med Hypotheses* 62: 770-772 (2004)
 56. **Mariani E**, Meneghetti A, Formentini I, Neri S, Cattini L, Ravaglia G, Forti P, Facchini A: Different rates of telomere shortening and telomerase activity reduction in CD8 T and CD16 NK lymphocytes with ageing. *Exp Gerontol* 38: 653-659 (2003)
 57. **Mariani E**, Meneghetti A, Formentini I, Neri S, Cattini L, Ravaglia G, Forti P, Facchini A: Telomere length and telomerase activity: effect of ageing on human NK cells. *Mech Ageing Dev* 124: 403-408 (2003)
 58. **Martens UM**, Brass V, Engelhardt M, Glaser S, Waller CF, Lange W, Schmoor C, Poon SS, Lansdorp PM: Measurement of telomere length in haematopoietic cells using in situ hybridization techniques. *Biochem Soc Trans* 28: 245-250 (2000)
 59. **Martens UM**, Brass V, Sedlacek L, Pantic M, Exner C, Guo Y, Engelhardt M, Lansdorp PM, Waller CF, Lange W: Telomere maintenance in human B lymphocytes. *Br J Haematol* 119: 810-818 (2002)
 60. **Martens UM**, Chavez EA, Poon SS, Schmoor C, Lansdorp PM: Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp Cell Res* 256: 291-299 (2000)
 61. **Martens UM**, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, Ward RK, Lansdorp PM: Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet* 18: 76-80 (1998)
 62. **Mathog D**, Hochstrasser M, Gruenbaum Y, Saumweber H, Sedat J: Characteristic folding pattern of polytene chromosomes in *Drosophila* salivary gland nuclei. *Nature* 308: 414-421 (1984)

-
-
63. **Mattern KA**, Swiggers SJ, Nigg AL, Lowenberg B, Houtsmuller AB, Zijlmans JM: Dynamics of protein binding to telomeres in living cells: implications for telomere structure and function. *Mol Cell Biol* 24: 5587-5594 (2004)
 64. **McElligott R**, Wellinger RJ: The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J* 16: 3705-3714 (1997)
 65. **Mondello C**, Petropoulou C, Monti D, Gonos ES, Franceschi C, Nuzzo F: Telomere length in fibroblasts and blood cells from healthy centenarians. *Exp Cell Res* 248: 234-242 (1999)
 66. **Morton NE**: Parameters of the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7474-7476 (1991)
 67. **Moyzis RK**, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR: A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 6622-6626 (1988)
 68. **Natarajan S**, McEachern MJ: Recombinational telomere elongation promoted by DNA circles. *Mol Cell Biol* 22: 4512-4521 (2002)
 69. **Nawrot TS**, Staessen JA, Gardner JP, Aviv A: Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet* 363: 507-510 (2004)
 70. **Neidle S**, Parkinson GN: The structure of telomeric DNA. *Curr Opin Struct Biol* 13: 275-283 (2003)
 71. **Norwood D**, Dimitrov DS: Sensitive method for measuring telomere lengths by quantifying telomeric DNA content of whole cells. *Biotechniques* 25: 1040-1045 (1998)

-
-
72. **Okuda K**, Bardeguet A, Gardner JP, Rodriguez P, Ganesh V, Kimura M, Skurnick J, Awad G, Aviv A: Telomere length in the newborn. *Pediatr Res* 52: 377-381 (2002)
73. **Olovnikov AM**: A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41: 181-190 (1973)
74. **Parkinson GN**, Lee MP, Neidle S: Structure And Packing Of Human Telomeric DNA. PubMed MMDB:19541 PDB1KF1 (data file) (2001)
75. **Parkinson GN**, Lee MP, Neidle S: Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* 417: 876-880 (2002)
76. **Perner S**, Bruderlein S, Hasel C, Waibel I, Holdenried A, Ciloglu N, Chopurian H, Nielsen KV, Plesch A, Hogel J, Moller P: Quantifying telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence in situ hybridization and digital imaging. *Am J Pathol* 163: 1751-1756 (2003)
77. **Perner S**: Evaluation einer neuen Methode zur quantitativen und chromosomenspezifischen Telomerlängenmessung. Med Dissertation, Universität Ulm 2002
78. **Proctor CJ**, Kirkwood TB: Modelling cellular senescence as a result of telomere state. *Aging Cell* 2: 151-157 (2003)
79. **Robertson JD**, Gale RE, Wynn RF, Dougal M, Linch DC, Testa NG, Chopra R: Dynamics of telomere shortening in neutrophils and T lymphocytes during ageing and the relationship to skewed X chromosome inactivation patterns. *Br J Haematol* 109: 272-279 (2000)
80. **Rufer N**, Brummendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, Wadsworth L, Schulzer M, Lansdorp PM: Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high

- turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med* 190: 157-167 (1999)
81. **Rufer N**, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM: Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol* 16: 743-747 (1998)
82. **Sandell LL**, Zakian VA: Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 75: 729-739 (1993)
83. **Saretzki G**, Von Zglinicki T: Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 959: 24-29 (2002)
84. **Scheel C**, Poremba C: Telomere lengthening in telomerase-negative cells: the ends are coming together. *Virchows Arch* 440: 573-582 (2002)
85. **Schiestl RH**, Reynolds P, Prakash S, Prakash L: Cloning and sequence analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD9 gene and further evidence that its product is required for cell cycle arrest induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 9: 1882-1896 (1989)
86. **Slagboom PE**, Droog S, Boomsma DI: Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 55: 876-882 (1994)
87. **Slijepcevic P**: Telomere length and telomere-centromere relationships? *Mutat Res* 404: 215-220 (1998)
88. **Slijepcevic P**, Hande MP, Bouffler SD, Lansdorp P, Bryant PE: Telomere length, chromatin structure and chromosome fusigenic potential. *Chromosoma* 106: 413-421 (1997)
89. **Smith CD**, Blackburn EH: Uncapping and deregulation of telomeres lead to detrimental cellular consequences in yeast. *J Cell Biol* 145: 203-214 (1999)

-
-
90. **Son NH**, Murray S, Yanovski J, Hodes RJ, Weng N: Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity for telomerase expression in human T and B lymphocytes with age. *J Immunol* 165: 1191-1196 (2000)
 91. **Stewart SA**, Ben Porath I, Carey VJ, O'Connor BF, Hahn WC, Weinberg RA: Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nat Genet* 33: 492-496 (2003)
 92. **Surralles J**, Hande MP, Marcos R, Lansdorp PM: Accelerated telomere shortening in the human inactive X chromosome. *Am J Hum Genet* 65: 1617-1622 (1999)
 93. **Tsuji A**, Ishiko A, Takasaki T, Ikeda N: Estimating age of humans based on telomere shortening. *Forensic Sci Int* 126: 197-199 (2002)
 94. **Van Ziffle JA**, Baerlocher GM, Lansdorp PM: Telomere length in subpopulations of human hematopoietic cells. *Stem Cells* 21: 654-660 (2003)
 95. **Van Steensel B**, Smogorzewska A, de Lange T: TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92: 401-413 (1998)
 96. **Vaziri H**, Benchimol S: Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8: 279-282 (1998)
 97. **Vaziri H**, Schachter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, Cohen D, Harley CB: Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 52: 661-667 (1993)
 98. **Von Zglinicki T**: Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27: 339-344 (2002)
 99. **Waibel I**: Telomerlängen humaner T-Lymphozyten bei 40- bis 60-jährigen Probanden. Med Dissertation, Universität Ulm 2004

-
-
100. **Walker CL**, Cargile CB, Floy KM, Delannoy M, Migeon BR: The Barr body is a looped X chromosome formed by telomere association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6191-6195 (1991)
 101. **Watson JD**: Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239: 197-201 (1972)
 102. **Weinert TA**, Hartwell LH: The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241: 317-322 (1988)
 103. **Weng NP**, Granger L, Hodes RJ: Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10827-10832 (1997)
 104. **White CI**, Haber JE: Intermediates of recombination during mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 9: 663-673 (1990)
 105. **Wright WE**, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW: Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* 11: 2801-2809 (1997)
 106. **Zeichner SL**, Palumbo P, Feng Y, Xiao X, Gee D, Sleasman J, Goodenow M, Biggar R, Dimitrov D: Rapid telomere shortening in children. *Blood* 93: 2824-2830 (1999)
 107. **Zijlmans JM**, Martens UM, Poon SS, Raap AK, Tanke HJ, Ward RK, Lansdorp PM: Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7423-7428 (1997)

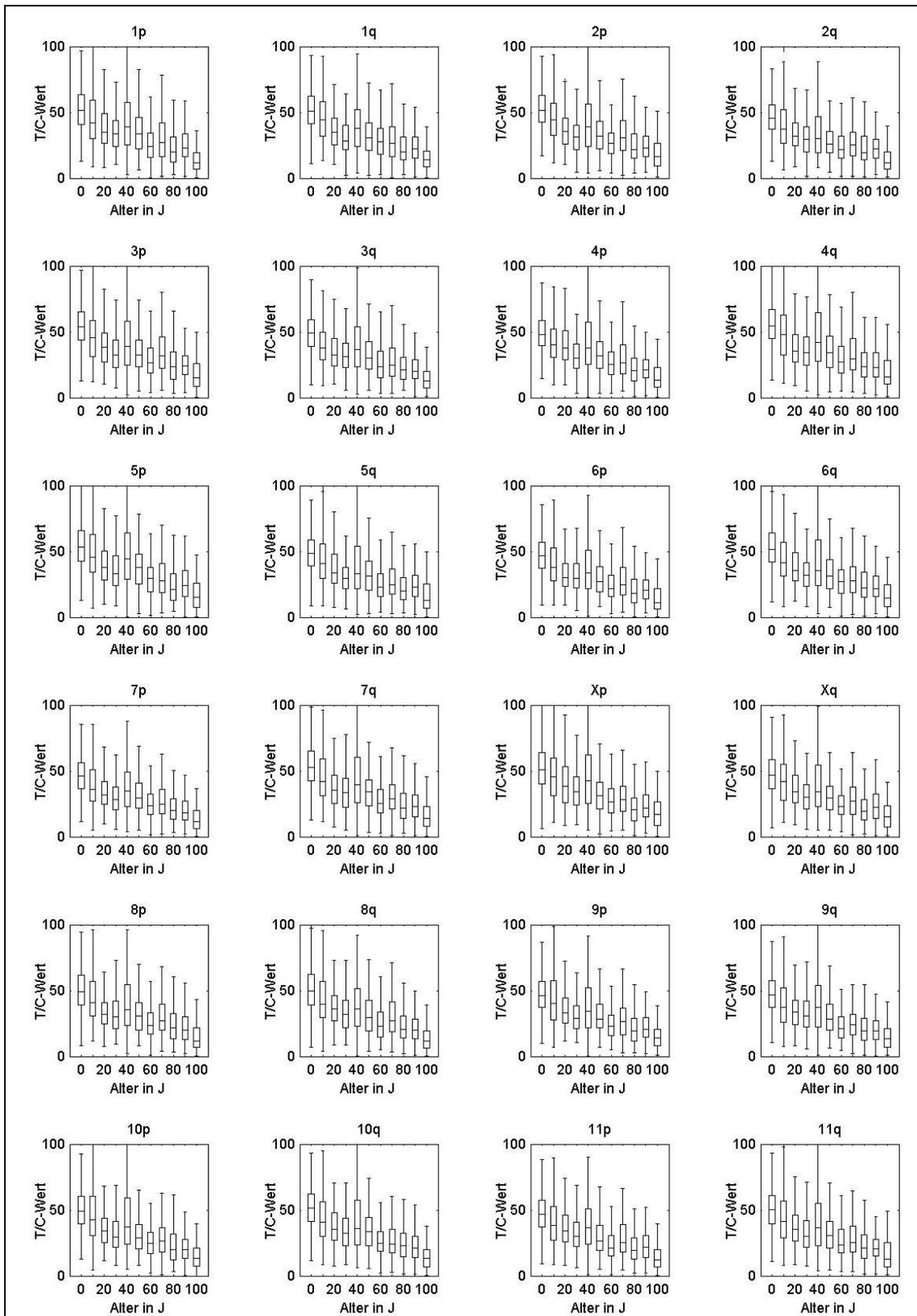
Anhang

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur und Faltung menschlicher Telomere.....	6
Abbildung 2: Metaphase einer 90jährigen Frau.....	12
Abbildung 3: Karyogramm eines 70jährigen Probanden	13
Abbildung 4: Beispiel eines Histogramms	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Boxplots.....	19
Abbildung 6: Schema einer graphischen Normalverteilungsprüfung.....	20
Abbildung 7: Punktwolken verschiedener statistischer Kenngrößen	25
Abbildung 8: Box und Wiskers Plots aller Altersgruppen.....	26
Abbildung 9: Normplot der Globaldaten	27
Abbildung 10: Histogramm der Globaldaten.....	28
Abbildung 11: Histogramme innerhalb der verschiedenen Altersgruppen.....	29
Abbildung 12: Histogrammverlauf mit zunehmendem Alter.....	30
Abbildung 13: Verlauf von Schiefe und Kurtosis in Abhängigkeit vom Alter	31
Abbildung 14: Punktwolken verschiedener statistischer Kenngrößen	32
Abbildung 15: Regressionsgeraden für Mittelwert und Median	34
Abbildung 16: Differenz zwischen Mittelwert und Median	35
Abbildung 17: Dreidimensionale Punktwolke des Medians	36
Abbildung 18: Regressionsgeraden der einzelnen Chromosomenarme	40
Abbildung 19: Boxplots der einzelnen Chromosomenarme.....	42
Abbildung 20: Veränderung von Q_1 und Q_3 bei fallendem Median.....	43
Abbildung 21: Normplots für Männer und Frauen.....	44
Abbildung 22: Histogramme für Männer und Frauen.....	45
Abbildung 23: Schematischer Histogrammvergleich	46
Abbildung 24: Geschlechtsspezifische Regressionsgeraden des Medians.....	47
Abbildung 25: Dreidimensionaler Verlauf des Medians bei Männern und Frauen.....	49
Abbildung 26: Geschlechtsspezifische Regressionsgeraden der Chromosomenarme	52
Abbildung 27: Altersgruppenspezifische Boxplots von Männern und Frauen	55
Abbildung 28: Chromosomenspezifische Boxplots für Männer und Frauen.....	57
Abbildung 29: Chromosomenarmprofil bei Männern und Frauen.....	58

Abbildung 30: Boxplots der Gonosomen	60
Abbildung 31: Korrelation von Median und Chromosomenlänge.....	62
Abbildung 32: Verstärkte Fluoreszenzsignale an homologen Chromatiden	64
Abbildung 33: Variationen der Fluoreszenzintensität bei Schwesterchromatiden	65
Abbildung 34: Verteilung hoher T/C-Werte bei Männern und Frauen.....	67
Abbildung 35: Chromosomenspezifisches Balkendiagramm für hohe T/C-Werte	68
Abbildung 36: Schematische Darstellung des Vorgangs einer Endoreduplikation	70
Abbildung 37: Chromosomen nach einer sporadischen Endoreduplikation	71
Abbildung 38: publizierte Telomerverkürzungen (Methode: Southern Blot)	77
Abbildung 39: publizierte Telomerverkürzungen (Methode: FISH)	78
Abbildung 40: publizierte Telomerverkürzungen bei Männern und Frauen	82
Abbildung 41: Altersgruppenspezifische Boxplots aller Chromosomenarme	106
Abbildung 42: Altersgruppenspezifische Boxplots aller Chromosomenarme für Männer	108
Abbildung 43: Altersgruppenspezifische Boxplots aller Chromosomenarme für Frauen .	110

2. Boxplots aller Altersgruppen global



Fortsetzung siehe nächste Seite

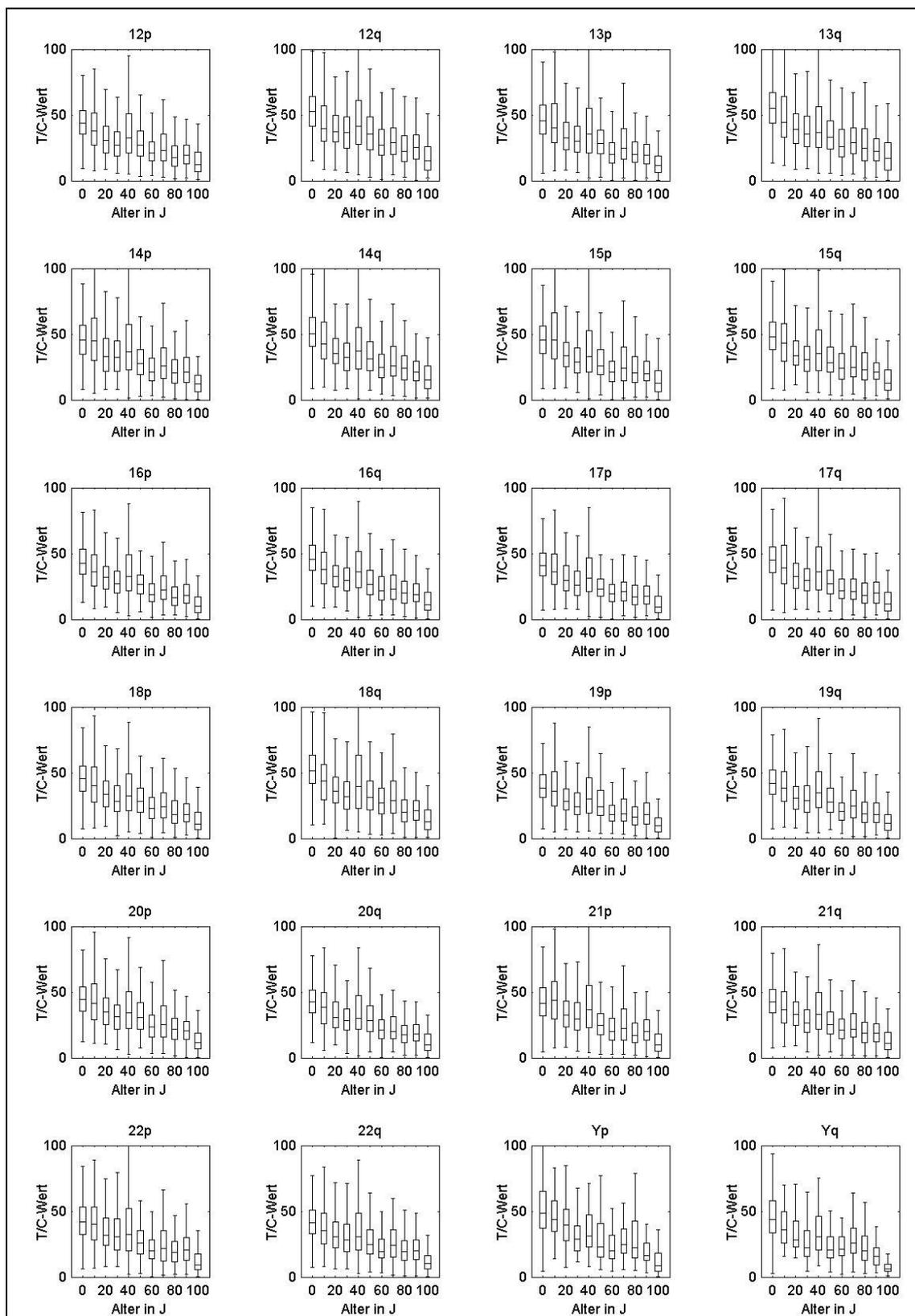
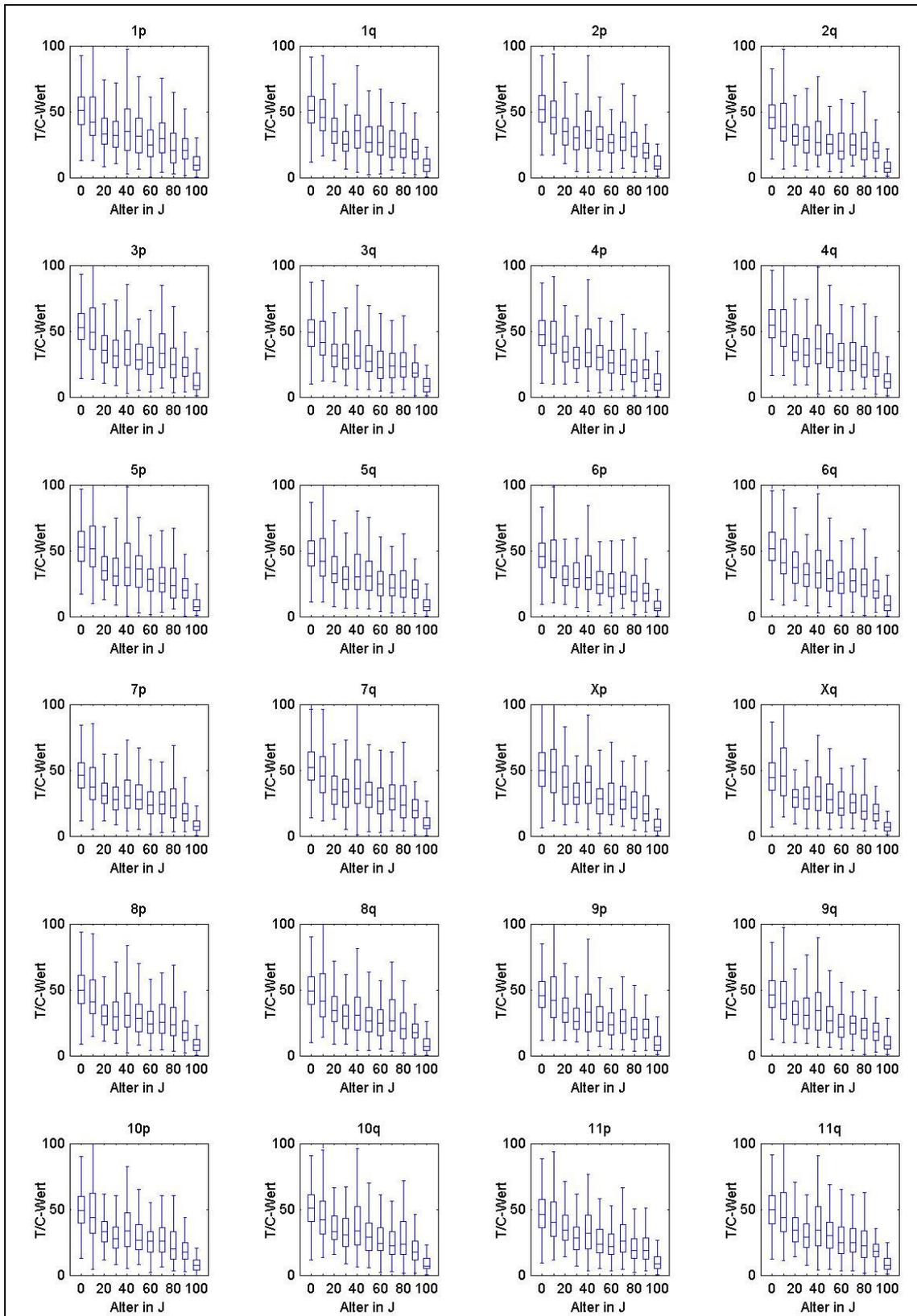


Abbildung 41: Altersgruppenspezifische Boxplots aller Chromosomenarme

Die Überschrift gibt den Chromosomenarm an. Die Boxplots bestehen aus den Globaldaten der jeweiligen Altersgruppe. Auf der Y-Achse ist der T/C-Wert, auf der X-Achse das Alter verzeichnet.

3. Boxplots aller Altersgruppen differenziert nach Geschlecht



Fortsetzung siehe nächste Seite

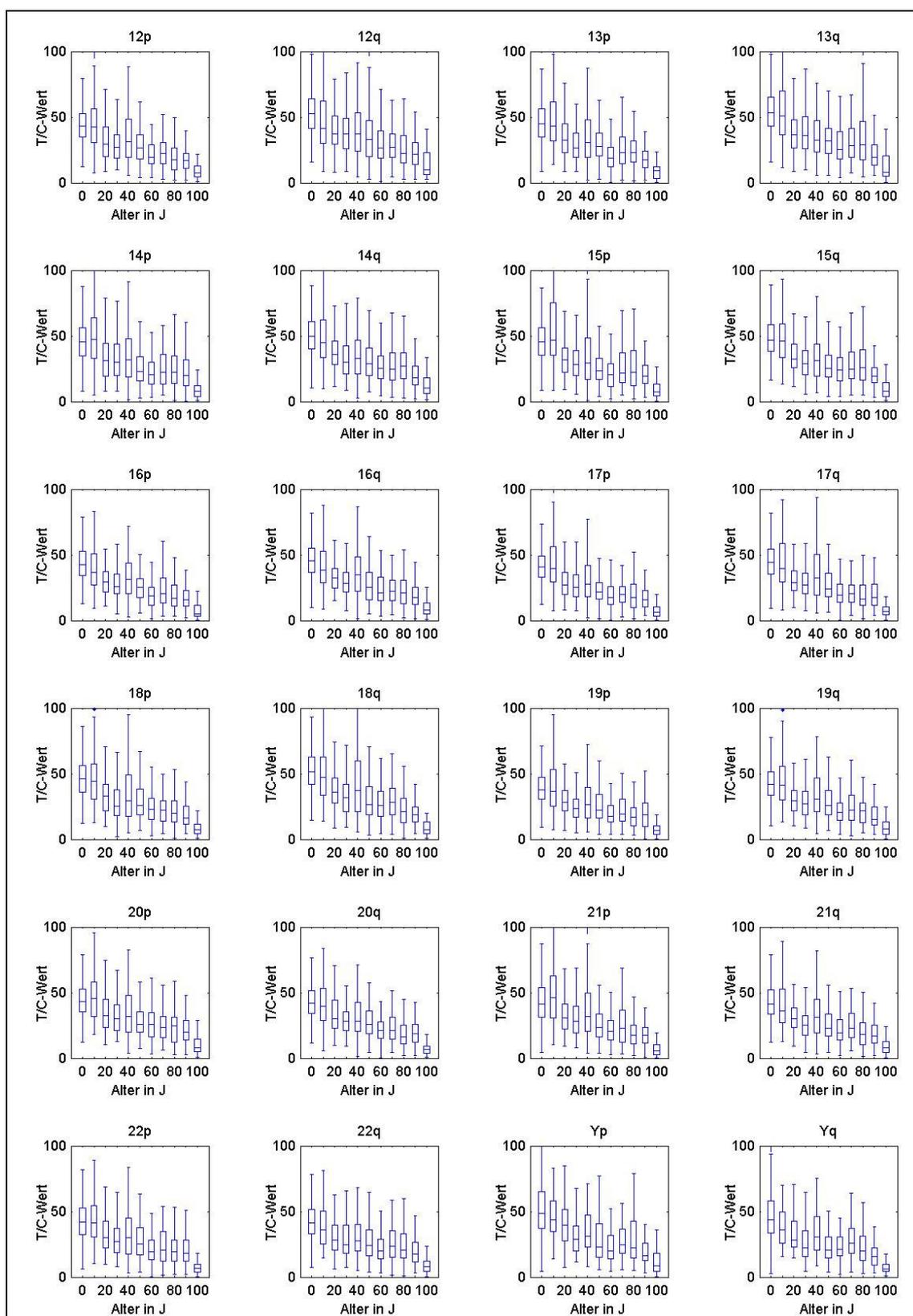
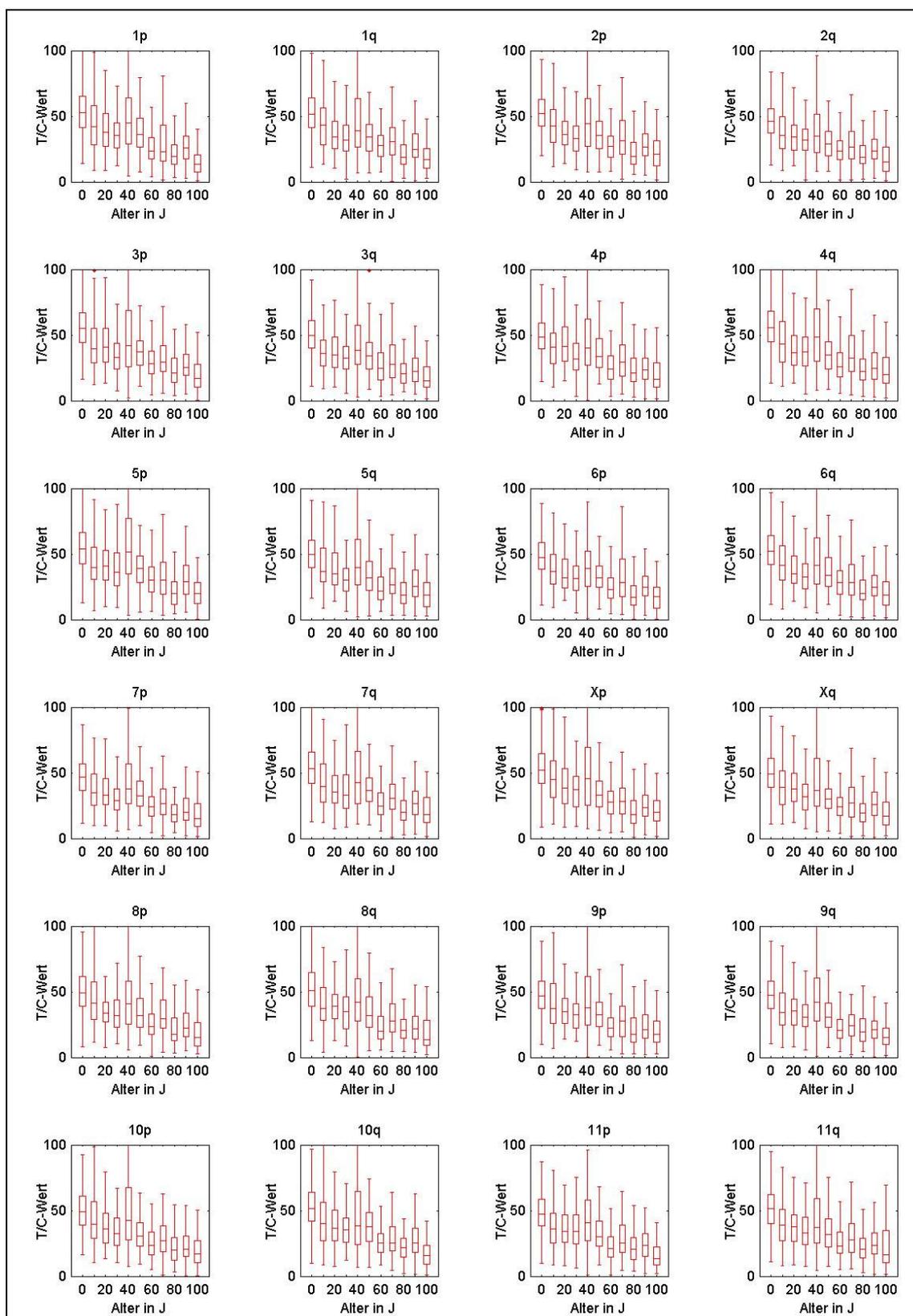


Abbildung 42: Altersgruppenspezifische Boxplots aller Chromosomenarme für Männer

Die Überschrift gibt den Chromosomenarm an. Die Boxplots bestehen aus den Globaldaten der männlichen Probanden der jeweiligen Altersgruppe. Auf der Y-Achse ist der T/C-Wert, auf der X-Achse das Alter verzeichnet.



Fortsetzung siehe nächste Seite

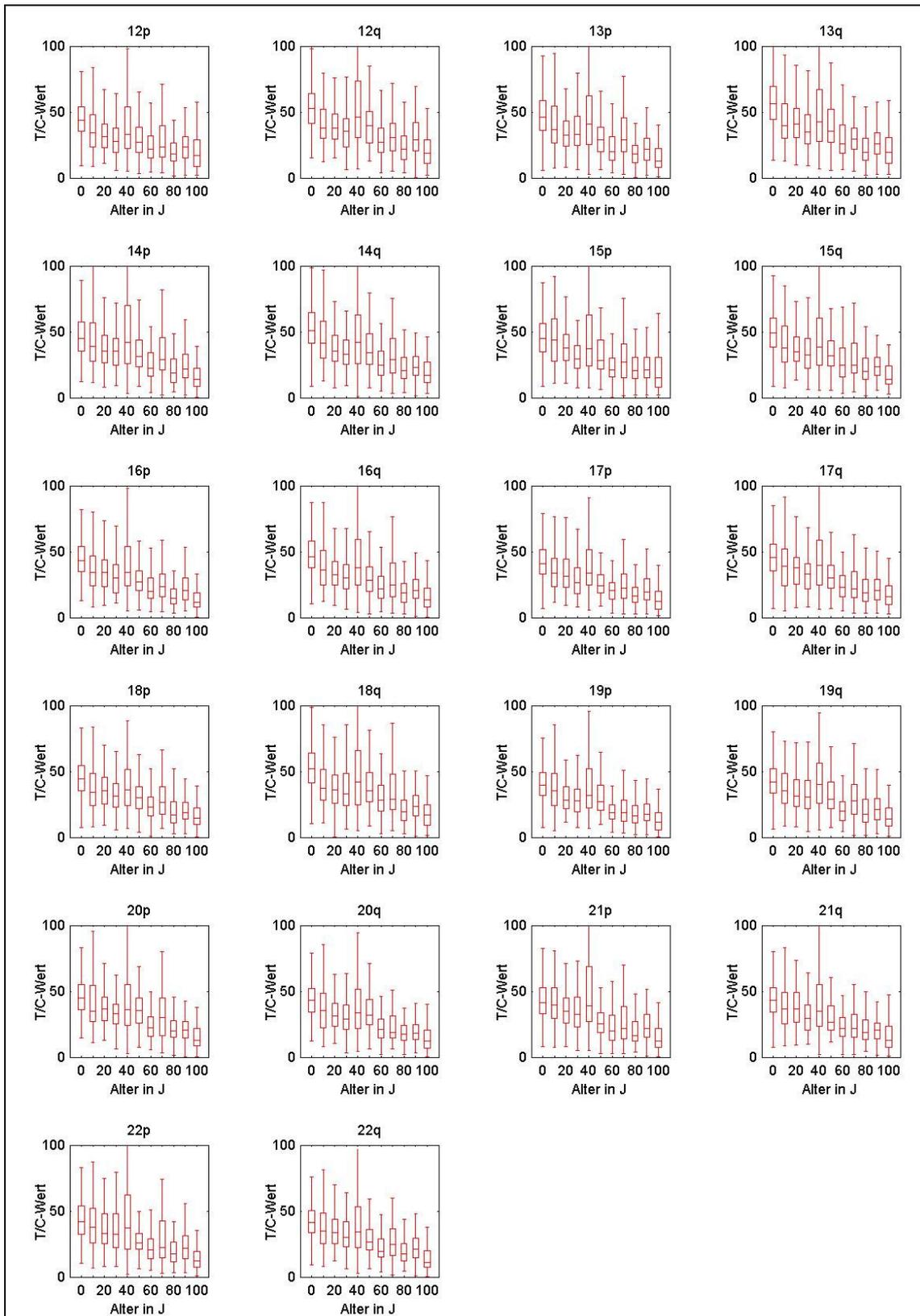


Abbildung 43: Altersgruppenspezifische Boxplots aller Chromosomenarme für Frauen

Die Überschrift gibt den Chromosomenarm an. Die Boxplots bestehen aus den Globaldaten der weiblichen Probanden der jeweiligen Altersgruppe. Auf der Y-Achse ist der T/C-Wert, auf der X-Achse das Alter verzeichnet.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Peter Möller und meinen beiden Betreuern Dr. Silke Brüderlein und Dr. Sven Perner für praktische Anleitung und konstruktive Kritik.

Des weiteren möchte ich mich bei allen Hochbetagten bedanken, die es mir mit ihrer Blutspende ermöglichten, Daten für meine Arbeit zu sammeln.

Vielen Dank auch sämtlichen Korrekturlesern und Software-Experten, vor allem meiner Schwester Stefanie Mayer, für ihre tatkräftige Hilfe.

Publikationsliste

Mayer S, Brüderlein S, Perner S, Waibel I, Holdenried AB, Ciloglu N, Mattfeld T, Nielsen KV, Möller P: Sex-specific telomere length profiles and age-dependent erosion dynamics of individual chromosome arms in humans. *Cytogenet Genome Res* (zur Publikation angenommen)

Möller P, Mayer S, Perner S, Ciloglu N, Waibel I, Holdenried AB, Hasel C, Mattfeld T, Nielsen KV, Brüderlein S: Sex-related differences in length and erosion dynamics of human telomeres favour females. (Publikation in Vorbereitung)