

***Analyse der Chromosomenverteilung
in menschlichen Fibroblasten
mittels 3D-Vielfarben Fluoreszenz in
situ Hybridisierung***

DISSERTATION

AN DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

vorgelegt von
Andreas Bolzer
aus München
2002

*Im Herbst geriet ein Regenwurm
in einen schlimmen Regensturm
und wurde nass als wie ein Lurch.
Dann kam die Sonne wieder durch.*

*Moral: Na das ist aber fein -
erst Regen und dann Sonnenschein.*

(Wigalf Droste, aus der taz vom 25.05.1999)

Analyse der Chromosomenverteilung in menschlichen Fibroblasten mittels
3D-Vielfarben Fluoreszenz in situ Hybridisierung
Dissertation an der LMU München
vorgelegt von
Dipl. Biol. Andreas Bolzer
aus München

Gutachter:
Prof. Dr. Thomas Cremer
Prof Dr. Rainer Uhl

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2002

Vorwort

Die vorläufige Sequenz des menschliche Genoms wurde im letzten Jahr veröffentlicht (The Genome International Sequencing CONSORTIUM 2001b; Venter et al. 2001). Seit 1999 wurde jedes Jahr die vollständige Karte eines Chromosoms präsentiert, zunächst 22, dann 21 und 20 (Dunham et al. 1999; Deloukas et al. 2001; Hattori und Taylor 2001). Die Fortsetzung dieser Leistung soll in den nächsten beiden Jahren in den genomischen Karten aller 24 menschlichen Chromosomen gipfeln (Hattori und Taylor 2001).

Wie spielen die Chromosomen an dem Ort ihres Wirkens, dem Zellkern, zusammen? Das Wechselspiel zwischen DNA und Proteinen ist kompliziert. Oft wird übersehen, dass ein funktionaler Zusammenhang überhaupt erst nach seiner genauen deskriptiven Beschreibung entdeckt werden kann. Einige funktionelle Voraussagen sind aus der DNA-Sequenz zu treffen, z. B. Promoterabschnitte oder repetitive Sequenzen, andere aus ihrer Wechselwirkung mit Proteinen. Aber wie liegt die DNA-Sequenz im menschlichen Zellkern? Gibt es eine höhere Ordnung der Chromosomen in der Interphase? Fest steht seit etwa Anfang der 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts, dass jedes Chromosom im Zellkern einen bestimmten Raum einnimmt, das Chromosomenterritorium. FISH-Experimente mit Painting Sonden haben diese Territorien nicht nur bestätigt, sondern sind zu einem unverzichtbaren Werkzeug geworden, um die 3-dimensionale Organisation des Zellkerns zu studieren. Mithilfe von kombinatorischen FISH Experimenten, neuen 3-dimensionalen mikroskopischen Techniken und 3D-Rekonstruktionen wurde versucht dem Zellkern-Puzzle ein weiteres Stück hinzuzufügen.

Methodische Grundlagen

Die Arbeit enthält einen großen methodischen Teil, bezüglich der Sondenherstellung, der Mikroskopie und der Bildbearbeitung. Der Hintergrund zu diesen Methoden wird teilweise ausführlich behandelt, vor allem wenn es um Techniken der Bildbearbeitung geht. Nichtsdestotrotz konnte ich nicht alle Grundlagen der Mikroskopie und Bildverarbeitung erklären, die dem naturgemäß biologisch geprägtem Leser eventuell ungeläufig sein werden. Hierzu möchte ich auf Einführungs- und Nachschlageliteratur verweisen, zum Beispiel über Mikroskopie Pawley (1995) oder Robenek (1995), oder über Bildverarbeitung Russ (1995).

CDROM

Der Arbeit ist eine CDROM beigelegt, auf der sämtliche Abbildungen und Texte im Ordner „Abb“ bzw. „docs“ enthalten sind. Zusätzlich ist jeder angegebene Artikel, falls er als PDF-Datei verfügbar war, in dem Ordner „articles“ zu finden. Im Ordner „bin“ finden sich Programme, die für die Betrachtung der Bilder und Texte nützlich bzw. unumgänglich sind. Die Versionen dieser Programme laufen auf Computern der Architektur x386, leider nicht auf Apple Macintosh.

Bei jeder *mfish3d* -Klassifikation wurde eine 3 dimensionale Rekonstruktion des Bildstapels im „Inventor“ - Format ausgegeben (Abb. 3-27c). Diese Dateien (*.iv) sind auf einem PC (keine Mac-Version z. Z. vorhanden) zugreifbar, nachdem das Programm *OpenInventor 5.2.5* (Fa. TGS) installiert und der *SceneViewer* gestartet wurde. Die Rekonstruktionen geben einen anschaulichen Eindruck über die räumliche Verteilung und über die Volumina der hybridisierten Signale.

Danksagung

Bei Prof. Thomas Cremer möchte ich mich für die Möglichkeit, am Institut für Humangenetik im Department Biologie II der LMU München die Dissertation anfertigen zu können herzlich bedanken. Vor allem seine Mühen bei der Korrektur waren beachtlich. Danke für die fortwährende wissenschaftliche Unterstützung!

Herrn Prof. Rainer Uhl sei an dieser Stelle für die Übernahme des Zweitgutachtens und für sein dafür aufgebrachtes Engagement gedankt.

Dr. Michael Speicher danke ich für die Bereitstellung des Themas, der Arbeitsgeräte, für die zahlreiche Anregungen bei der Durchführung der Experimente und nicht zuletzt für zwei Anträge bei Stiftungen, die mir die Arbeit ermöglicht haben.

Dr. Daniele Zink Dank dafür, dass sie mir in schwierigen Zeiten durch eine einjährige Unterstützung geholfen hat, über die Runden zu kommen.

Für die praktische Hilfe, teils im Labor, teils in anregenden Diskussionen, möchte ich mich bei Dr. Irina Solovei und bei Dr. Marion Cremer herzlich bedanken.

Dank geht an Dr. Stefan Müller, der die Arbeit zur Gewinnung der Sonden durch Flow-Sorting durchgeführt hat. Danke auch für die Einführung in die ReFISH-Methode. Wir haben zusammen zwei ReFISH Experimente durchgeführt, aus denen die konfokalen Bilder der G0-Fibroblasten von mir aufgenommen werden konnten. Die von ihm aufgenommenen fünf konfokalen Prometaphaserosettenbilder, hat er mir zur weiteren Klassifikation überlassen. Seine Korrekturvorschläge waren sehr hilfreich.

Ich habe in den letzten Jahren viel über physikalische Optik und Computer lernen dürfen, und ein großer Teil davon geht auf Joachim Walter zurück. Von Sauron bis *Khoros*, von Schwellwert- zu RER-Berechnungen haben wir zusammengearbeitet. In den Anfängen war er außerdem mein Sprachrohr zu Rainer Heintzmann (Göttingen), bei dem ich mich für die Bereitstellung der Dekonvolutionssoftware *axialrec* und die Diskussionen zur RER-Berechnung bedanken möchte.

Großer Dank gebührt Kaan Saracoglu. Er hat das für 2-dimensionale Bilder entwickelte Programm *MCK* für 3D-Bildstapel ausgebaut und so einen großen Teil zum Gelingen der Arbeit ermöglicht. Diese Weiterentwicklung geschah im regen Austausch zwischen ihm als Programmierer und mir als Anwender. Danke auch an Christian Konrad und Roland Eils für den Dialog, das Korrekturlesen und den Spaß auf den Konferenzen.

Die in der Arbeit verwendeten Modellsimulationen wurden von Gregor Kreth durchgeführt. Dank dafür nach Heidelberg an die Arbeitsgruppe von Christoph Cremer.

Vielen Dank an Christine Fauth für die Bereitstellung des 7-Fluor Mixes, für die geduldige Korrektur und die immer gute Zusammenarbeit.

Für die gelungene Zusammenarbeit, den Spaß im Alltag bzw. auf den Kongressen und die Hilfe im Labor danke ich herzlich Sabine Uhrig, Lothar Schermelleh, Sandro Brero, Melanie Markmann, Klaus Leonhard, Rüdiger Neef, Rainer Gangnus, Sabine Langer, Isabell Jentsch, Christine Maierhofer und Jürgen Kraus.

Bei den Auswertearbeiten der fünf Farben Experimente an Lymphozyten hat mir Katrin Heiliger sehr unter die Arme gegriffen - Danke.

Herzlichen Dank an meine Freundin Monika Grabowski für die Endkorrektur und ihre Unterstützung während der letzten zwei Jahre dieser Arbeit.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich für die finanzielle und ideelle Unterstützung in den Jahren.

Andreas Bolzer
September 2002

Zusammenfassung

Die Erforschung von Chromosomenpositionen im menschlichen Zellkern führte zu kontroversen Ergebnissen. In Lymphozyten konnte eine radiale Chromosomenposition entdeckt werden, die von der Gendichte der Chromosomen abhing (Boyle A. L. et al. 1990; Cremer M. et al. 2001). Genreiche Chromosomen lagen zentraler im Zellkern als genarme. In Fibroblasten wurde zwar ebenfalls eine radiale Verteilung gefunden, jedoch korreliert diese besser mit der genomischen Größe der Chromosomen. Hier lagen kleinere Chromosomen zentraler als größere (Sun et al. 2000). Darüberhinaus finden einige Publikationen eine starr gegenüberliegende und fixierte nachbarschaftliche Anordnung (Nagele et al. 1995), andere hingegen eine zufällige Nachbarschaft (Allison und Nestor 1999).

Voraussetzung zur Klärung der Frage, ob die Chromosomenanordnung starr oder variabel ist, waren folgende methodische Verbesserungen:

- (a) Minimierung von Fixierungsartefakten
- (b) Entwicklung einer Technik zur simultanen Darstellung aller 24 Chromosomen im Zellkern
- (c) Wahl einer geeigneten Mikroskoptechnik und Entwicklung von Softwareprogrammen zur quantitativen dreidimensionalen Analyse.

Artefaktfreie Fixierung

Die Zellen wurden mit einem speziellen Protokoll „3D-fixiert“ (Solovei et al. 2002a), so dass ihre dreidimensionale Morphologie gut erhalten blieb, und keine Schrumpfungartefakte o. ä. auftraten.

Simultane Darstellung aller Chromosomen im Zellkern

Mit Painting Sonden kann man individuelle Chromosomen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung anfärben. Eine Weiterentwicklung dieser durch Flow-sorting gewonnenen Sonden stellen die „repeat depleted“ Painting Sonden dar, welche im Zuge dieser Doktorarbeit hergestellt und für einige Experimente verwendet wurden. Sie können ohne Zugabe kompetitiver C₀t-1 DNA und ohne „preannealing“ hybridisiert werden und verbessern so das Signal-zu-Hintergrund Verhältnis.

Painting Sonden werden zur Karyotypisierung von Chromosomen in Metaphasespreitungen routinemäßig verwendet. Mit den beiden kombinatorischen Vielfarbenansätzen M-FISH und ReFISH wurde es erstmals möglich, alle Chromosomenterritorien im Kern simultan zu erforschen. Um die Klassifizierungsspezifität bei M-FISH Experimenten zu erhöhen, wurde ein verbesserter Probensatz entwickelt, in dem die Anzahl der Fluorochrome von fünf auf sieben erhöht wurde (Azofeifa et al. 2000).

Weitfeldmikroskoptechnik, Dekonvolution und Klassifikation

Ein Großteil der Arbeit betraf die Etablierung und das Testen eines 3D-Mikroskopie- und Dekonvolutions-System für M-FISH Präparate. Ein Leica Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskop wurde mit einem Filterrad für acht Bandpassfilter und einem z-Schrittmotor für den Mikroskoptisch ausgestattet. Die Software zu Steuerung wurde in Zusammenarbeit mit Leica Microsystems angepasst. Nach Aufnahme der Bildstapel wurden sie der Dekonvolution unterzogen, um sie auf die Qualität konfokaler Bilder anzuheben. Für die Dekonvolution war es nötig die richtigen Programme und Parameter herauszufinden.

ReFISH-Präparate konnten mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen werden, jedoch war es nötig das Präparat nach der ersten Hybridisierung erneut zu waschen und zu denaturieren, um den zweiten, komplementären SONDENSATZ zu hybridisieren. Die zwei nacheinander aufgenommenen Bildstapel mussten mit einem Alignmentprogramm aneinander angeglichen werden.

Schließlich wurde es durch die Erweiterung des Karyotypisierungsprogramms auf 3 Dimensionen möglich, Chromosomenterritorien im Zellkern automatisch zu bestimmen. Das Programm klassifiziert die Regionen anhand des Markierungsschemas und weist jedem erkannten Chromosomenterritorium eine Klassifikationsfarbe zu. Die Schwerpunkte der Chromosomenterritorien wurden in eine Ausgabetabelle geschrieben. Die daraus berechneten Abstände und Winkel liessen eine Aussage bezüglich der Chromosomentopologie zu.

Chromosomenpositionen und Fibroblasten

In allen Experimenten an G0-Fibroblasten und Prometaphaserosetten wurde in den Kernen eine größenabhängige, radiale Verteilung der Chromosomenterritorien gefunden, wobei kleinere Chromosomen allgemein zentraler lagen als größere. Eine starre Ordnung, wie sie in Nagele et al. (1995) propagiert wurde, konnte nicht nachvollzogen werden. Vielmehr stellte sich heraus, dass die nachbarschaftliche Anordnung der Chromosomen im Zellkern weitgehend zufällig ist.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	V
Zusammenfassung	IX
Abkürzungen	XV
1. EINLEITUNG	16
1.1 Zellkernarchitektur	16
1.1.1 Anordnung der Chromsomenterritorien im Zellkern	18
1.1.2 Zellkernmodelle	24
1.2 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	26
1.2.1 Painting Sonden	26
1.2.2 Vielfarben-FISH Techniken	28
1.2.3 Zellpräparation	32
1.3 3D-Mikroskopie und Bildverarbeitung	33
1.3.1 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	34
1.3.2 Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskopie	36
1.3.3 Dekonvolution (Entfaltung)	36
1.3.4 Klassifikation von Chromosomenterritorien	39
1.4 Zielsetzung der Arbeit	39
2. MATERIAL UND METHODEN	41
2.1 Chromosomen-, Zellpräparation und FISH Vorbehandlung	42
2.1.1 Zellkultur	42
2.1.1.1 Fibroblasten	42
2.1.1.2 Periphere Blutlymphozyten	42
2.1.2 Auswertung im FACScan	43
2.1.3 Chromosomenpräparation	43
2.1.4 Zellpräparation für 3D-FISH	44
2.1.5 Vorbehandlung der Präparate	45
2.2 Zusammensetzung der DNA SONDENSÄTZE	45
2.2.1 Farbspezifität	46
2.2.2 Übersicht über die verwendeten SONDENSÄTZE und Markierungen	48
2.2.2.1 Painting Sonden	48
2.2.2.2 M-FISH	48
2.2.2.3 Abreicherung repetitiver Elemente in Painting Sonden („Repeat Depletion“)	49
2.2.2.4 ReFISH	52
2.2.3 Übersicht über die verwendeten Fluorochrome	54
2.2.4 Amplifikation und Markierung der Sonden-DNA	54
2.2.4.1 Markierung mittels PCR	55
2.2.4.2 Markierung mittels Nicktranslation	56
2.3 Hybridisierung und Detektion	57
2.3.1 Hybridisierung	57
2.3.1.1 Sondenmischung	57
2.3.1.2 Chromosomenpräparat	57

2.3.1.3	Zellpräparat.....	57
2.3.2	Nachweis der hybridisierten Sonden.....	57
2.4	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM).....	59
2.5	M-FISH Bildaufnahme	60
2.5.1	Epifluoreszenzmikroskop	60
2.5.2	CCD-Kamera und Pixelgröße.....	61
2.5.3	Lichtquelle	61
2.5.4	Fluoreszenzfilter	61
2.5.5	Bildaufnahmeprozess.....	62
2.5.5.1	Metaphasenpräparate	62
2.5.5.2	Zellkernpräparate	62
2.5.6	Bildauswertung mit dem Programm <i>MCK</i>	63
2.6	Bildverarbeitung.....	63
2.6.1	Format der Bilddaten.....	63
2.6.2	Bildhintergrund und Rauschen	63
2.6.3	Normalisieren	64
2.6.4	Volumenmessungen	64
2.7	Dekonvolution	65
2.7.1	<i>Huygens</i> von SVI	66
2.7.2	<i>TILLvisION</i> von T.I.L.L. Photonics.....	67
2.7.3	<i>KS400</i> von ZeissVision	68
2.7.4	<i>Axialrec</i> von Rainer Heintzmann	68
2.7.5	Qualitätsfaktoren	69
2.8	Klassifikation mit <i>mfish3d</i>.....	72
2.8.1	Allgemeines zu <i>mfish3d</i>	72
2.8.2	Klassifikation von M-FISH Bildstapeln mit dem Programm <i>mfish3d</i>	73
2.8.3	Klassifikation eines Bildstapels aus der virtuellen Mikroskopie	75
2.8.4	Bestimmungsschlüssel für M-FISH Bilder	76
2.9	Computersimulationen	78
2.9.1	Zwei einzelne Territorien	78
2.9.2	Kombinatorischer Ansatz mit 3 Fluorochromen.....	79
2.10	Formeln und Vektorrechnung	80
2.11	Statistische Auswertung	82
2.12	Spezielle Hersteller	83
2.13	Software	83
3.	ERGEBNISSE	85
3.1	Zellen, Painting Sonden und Klassifikation von Metaphasen.....	86
3.1.1	Zellsynchronisation und -präparation	86
3.1.2	Entfernung von repetitiven Elementen aus Painting Sonden	87
3.1.3	Klassifikation von Metaphasen.....	90
3.2	3D-Mikroskopie	92
3.2.1	Konfokale Aufnahmen	93
3.2.2	Weitfeldaufnahmen	96
3.3	Dekonvolution im Vergleich	97

3.3.1	Virtuelle Mikroskopie - Modelldaten	97
3.3.2	Fluoreszenzgefüllte Kugeln („beads“)	107
3.3.3	Chromosomenterritorien	111
3.3.3.1	Dekonvolution mit <i>Huygens</i>	114
3.3.3.2	Dekonvolution mit <i>KS400</i> (Zeiss Vision)	118
3.3.3.3	Dekonvolution mit <i>Axialrec</i>	121
3.3.3.4	Dekonvolution mit <i>TILLvisION</i>	121
3.4	Klassifikation mit <i>mfish3d</i>	123
3.4.1	Klassifikation mit simulierten Modelldaten.....	124
3.4.2	Konfokale Aufnahmen von drei Chromosomenterritorien <i>in situ</i>	126
3.4.3	Konfokale Aufnahmen von sieben Chromosomenterritorien <i>in situ</i>	127
3.5	Positionen der Chromosomenterritorien im Zellkern	130
3.5.1	Chromosomenpositionen in Lymphozyten – konfokale vs. Weitfeldaufnahmen..	131
3.5.2	Chromosomenpositionen in Fibroblasten	138
3.5.2.1	M-FISH.....	141
3.5.2.2	ReFISH	147
3.5.2.3	Abstände zum Kernmittelpunkt	150
3.5.2.4	Abstände der homologen Chromosomen zueinander	155
3.5.2.5	Winkel der homologen Chromosomen zueinander	158
3.5.2.6	Abstände und Winkel der heterologen Chromosomen zueinander	159
3.5.3	Chromosomenpositionen in Prometaphaserosetten	162
3.5.3.1	M-FISH.....	164
3.5.3.2	ReFISH	164
3.5.3.3	Volumina der Territorien.....	166
3.5.3.4	Abstände zum Rosettenmittelpunkt.....	169
3.5.3.5	Abstände der homologen Chromosomen zueinander	172
3.5.3.6	Winkel der homologen Chromosomen zueinander	173
3.5.3.7	Abstände der heterologen Chromosomen	174
3.5.3.8	Winkel der heterologen Chromosomen zueinander	175
4.	DISKUSSION	177
4.1	Chromosomen- und Zellpräparation, FISH Vorbehandlung	177
4.2	Hybridisierung und Detektion	178
4.2.1	Verbesserung der Spezifität mit Hilfe von „repeat depleted“ Painting Sonden	178
4.2.2	Fluorochrome und Filter	179
4.2.3	M-FISH und ReFISH	180
4.3	3D-Mikroskopie und Dekonvolution	181
4.3.1	Konfokale Vielfarben-Mikroskopie	181
4.3.2	Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskopie	182
4.3.3	Dekonvolution	183
4.3.4	Schwellwerte und Volumenberechnungen	186
4.4	Klassifikation mit <i>mfish3d</i>	187
4.5	Zellkernarchitektur: Chromosomenpositionen im Zellkern	190
4.5.1	Fünf Chromosomenterritorien in Lymphozyten	190
4.5.2	Homologenassoziation.....	193
4.5.3	Positionen aller Chromosomen in 46 XY-Fibroblasten.....	194
4.5.4	Positionen aller Chromosomen in Prometaphaserosetten	197

Literaturverzeichnis	200
Publikationen	214
Lebenslauf	215

Abkürzungen

°	Grad	µm	mikrometer
Av	Avidin	M	Mol/l
A	Adenin	MAA	methanol-acetic acid (3:1)
Bio	Biotin	MDS	Multidimensionale Skalierung
BSA	bovine serum albumin	min	Minuten
bp	basepair	ml	Milliliter
C	Cytosin	mM	millimolar
CCD	charge coupled device	MW	Mittelwert
CHO	chinese hamster ovary	NA	Numerische Aperatur
Chr	Chromosom	NaOH	Natronlauge
Cen	Centromer	OS	Operating system
CISS	chromosome <i>in situ</i> suppressi- on	OT	Objektträger
CLSM	confocal laser scanning mic- roscope	OTF	object transfer function
CN	center of nucleus	PBL	periphere Blutlymphozyten
CNP	center of nuclear projection	PBS	phosphate buffered saline
CT	Chromosomenterritorium, Chromosomenterritorien	PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Ketten Reaktion)
d	Durchmesser	pg	Picogramm
ds	double strand	PHA	Phytohämagglutin-L
DexSO ₄	Dextransulfat	PMT	Photo multiplier tube
Dig	Digoxigenin	PSF	point spread function
DNA	desoxyribonucleic acid	r	Radius
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	rDNA	ribosomale DNA
EtOH	Ethanol	RNA	ribonucleic acid
EM	Elektronenmikroskop	rRNA	ribosomale RNA
FA	Formamid	rpm	rounds per minute
FACS	fluorescence activated cell sorter	RT	Raumtemperatur
FCS	fetal calf serum	ss	single strand
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridi- sierung	SSC	sodium saline citrat
FWHM	full width of the spectral band at half of the peak maximum	SSCT	sodium saline citrat tween20
G	Guanin	SDS	Sodiumdodecylsulfat
g	Erdbeschleunigung ([m/s²])	SD	standard deviation (Standard- abweichung)
g	Gramm	sek	Sekunden
gDNA	genomische DNA	SHAC	subtractive hybridisation and affinity chromatography
h	hour (s)	T	Thymin
HCl	Salzsäure	t	time
IgG	Immunglobulin G	TEM	Transmissions - Elektronen- mikroskop
IR	Infrarot	Thr	Threshold (Schwellwert)
kb	kilo basepair	Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)- 1,3-propandiol
l	Liter	UV	ultraviolet
LM	Lichtmikroskop	WCP	whole chromosome painting probe
µl	Mikroliter	WWW	World Wide Web
µM	mikromolar (Mikromol/Liter)		

1. EINLEITUNG

1.1 Zellkernarchitektur

Der typische Zellkern einer diploiden menschlichen Zelle wird oft mit einer Kugel mit einem Durchmesser von 5 – 10 μm und einem Volumen von etwa 500 μm^3 verglichen (Carmo-Fonseca et al. 1996). Morphologisch variieren Zellkerne jedoch beträchtlich, z. B. ist der Zellkern von Granulozyten gelappt (Bartova et al. 2001), der von Fibroblasten oval und flach und der oben beschriebene „Standardzellkern“ entspricht dem peripherer Blutlymphozyten. Innerhalb des Zellkernvolumens sind je nach Zellzyklusstadium circa 6 - 12 $\times 10^9$ bp DNA auf 46 Chromosomen verteilt.

Einteilung der Chromosomen

Die Einteilung menschlicher Chromosomen geschah aufgrund ihrer zytologischen Größe (ISCN 1985). Ihr DNA - Gehalt wurde im Laufe der Jahre immer genauer bestimmt (Morton 1991) und heute ist die Basenabfolge, nach der ersten DNA-Sequenzvorlage des menschlichen Genoms, nahezu vollständig bekannt (The Genome International Sequencing CONSORTIUM 2001b; Venter et al. 2001).

Im menschlichen Genom gibt es nach Schätzungen dieser Publikationen etwa 35000 – 40000 Gene. Sie sind nicht gleichmäßig auf die Chromosomen verteilt. Das Chromosom mit der höchsten Gendichte ist Chr. 19 (23 Gene / Mb DNA) und die beiden mit der geringsten Gendichte sind Chr. 13 und Chr. Y (5 Gene / Mb). Die akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 tragen die ribosomalen Gene (Warburton und Henderson 1979), die Bestandteil der „Nucleolar Organizer Regions“ sind (NORs; Suja et al. 1997; Krystosek 1998). Der in der Interphase mikroskopisch sichtbare Nukleolus ist Ort ihrer Transkription (Spector 1993).

Chromosomenterritorien

Seit den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts existieren experimentelle Hinweise, dass Chromosomen im menschlichen Zellkern eigene Kompartimente einnehmen, mit speziellen biochemischen und genetischen Eigenschaften (Zorn et al. 1976; Stack et al. 1977; Zorn et al. 1979; Cremer T. et al. 1982b). Bereits ein Jahrhundert zuvor stellte Carl Rabl die Hypothese auf, dass Chromosomen während der Interphase begrenzte Bezirke im Zellkern einnehmen und eine bestimmte Orientierung haben (Rabl 1885). Als Teil seiner „Theorie der Chromosomenindividualität“ forderte Theodor Boveri 1909, dass jedes Chromosom ohne eine Durchmischung mit anderen, ein eigenes Territorium im Zellkern ausfüllt (Boveri 1909). In den 50er Jahren des vorigen Jahrhunderts wurde die Theorie der Chromosomenterritorien zunächst wieder verworfen, weil man im Elektronenmikroskop (EM) nur kontrastreiche Chromatingrenzen zwischen Eu- und Heterochromatin, nicht aber zwischen einzelnen Chromosomen erkennen konnte (Comings und Okada 1970). Einen histori-

konnte (Comings und Okada 1970). Einen historischen Überblick geben Cremer T. (1985) und Murken und Wilmowski (1973).

Für eine territoriale Organisation des Zellkerns sprachen zunächst UV-Mikrobestrahlungs-experimente (Cremer C. et al. 1974; Zorn et al. 1979; Cremer T. et al. 1982a). Zellkerne chinesischer Hamsterzellen wurden mit einem UV-Laser partiell bestrahlt und anschließend in einem Medium mit [³H]-Thymidin inkubiert. Verfolgte man diese Zellen in die nächste Mitose, so fanden sich die radioaktiven Markierungen beschränkt auf nur wenigen Chromosomen. Wenn umgekehrt versucht wurde einzelne Chromosomen in der Metaphaseplatte zu bestrahlen, um die Zellen in die nächste Interphase zu verfolgen, beobachtete man dort markierte „Domänen“ in den Tochterzellen (Cremer T. et al. 1984).

Weitere Experimente zeigten eine positive Korrelation zwischen dem DNA - Gehalt eines Chromosoms und der Häufigkeit, mit der es bei einer Mikrobestrahlung des Zellkerns getroffen wurde (Cremer T. et al. 1982b). Dies führte zu der auch für diese Arbeit relevanten Idee, dass die relativen Größen (Volumina) von Chromosomenterritorien in der Interphase auch ihren relativen DNA-Gehalt widerspiegeln (nicht zu verwechseln mit der Gendichte eines Chromosoms). Bemerkenswerterweise wurden selten beide Homologe zugleich geschädigt, was gegen eine Homologenassoziation sprach.

In den 80er Jahren machten es Hybridisierungsexperimente mit radioaktiver und Fluoreszenzmarkierung möglich, ganze Chromosomenterritorien mit gesamtgenomischer DNA in somatischen Zellhybriden anzufärben (Manuelidis 1985; Schardin et al. 1985; Pinkel et al. 1986). Untersuchungen mit chromosomalen Painting Sonden (Cremer T. et al. 1988; Lichter et al. 1988b; Pinkel et al. 1988) in normalen und Tumorzellen beseitigten letzte Zweifel an einer territorialen Organisation des Säugerzellkerns.

In den darauffolgenden Jahren wurde die Organisation von Chromosomenterritorien (CT) detailliert untersucht (für ein zusammenfassendes, heute gültiges Modell siehe Abb. 1-1). Dabei wurde herausgefunden, dass benachbarte Territorien sich nicht oder nur marginal überlappen (Eils et al. 1996; Visser und Aten 1999). Innerhalb der CT wurden Subdomänen gefunden, welche denjenigen entsprachen, die man bereits aus Chromosomenpräparaten kannte: Chromosomenarmdomänen (Guan et al. 1996; Dietzel et al. 1998b), Centromerdomänen (Dietzel et al. 1998a), Bandendomänen (Lengauer et al. 1991) und Replikationsdomänen (Sadoni et al. 1999; Kennedy et al. 2000). Für den Nachweis von Centromerdomänen stehen neben pan-centromerischen DNA - Sonden inzwischen zahlreiche chromosomenspezifische Centromer – Sonden zur Verfügung. Der Nachweis von Arm - und Bandendomänen gelang mittels DNA – Sonden, die nach Mikrodissektion entsprechender Chromosomenabschnitte etabliert wurden. Replikationsdomänen in CT, die den R - und G – Banden mitotischer Chromosomen entsprechen, konnten mithilfe von Pulsexperimenten mit halogenierten Thymidinanaloga bzw. direkt mit Fluoreszenzmarkierten Basenanaloga nachgewiesen werden.

Mittlerweile gilt es als unbestritten, dass nicht nur die Chromosomen, sondern der Zellkern als Gesamtes, funktionell kompartmentalisiert ist (für einen

Übersichtsartikel siehe Misteli 2000; Cremer T. und Cremer 2001; Spector 2001).

Modell einer funktionellen Zellkernarchitektur

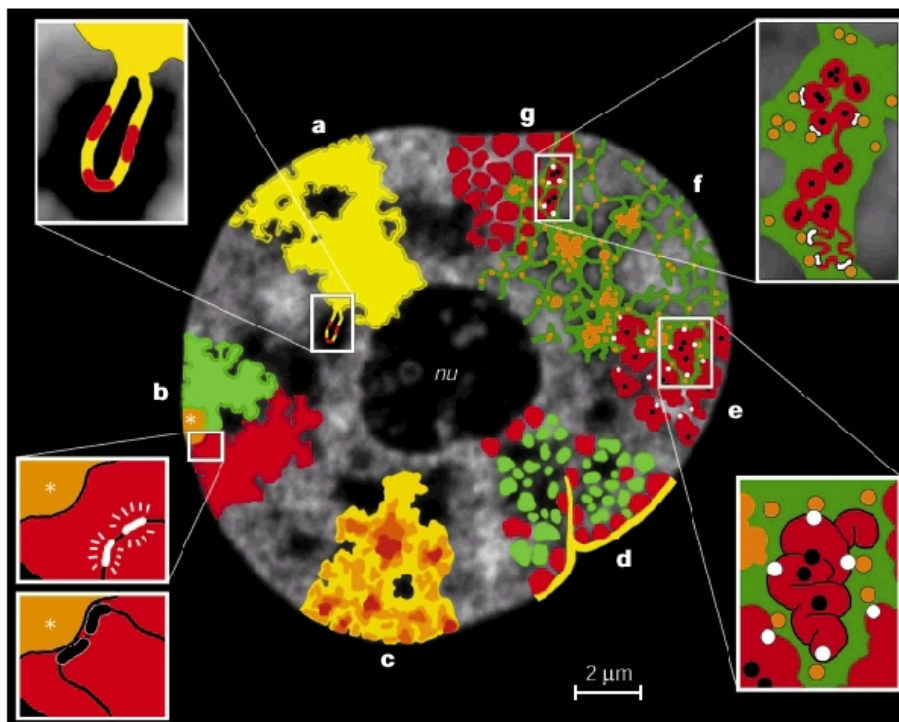


Abb. 1-1 Aktuelles Modell der funktionellen Zellkernarchitektur. Die farblichen Elemente betonen jeweils ein charakteristisches Merkmal und sind auf dem optischen Schnitt eines HeLa-Zellkerns eingezeichnet. (a) CT haben eine komplex gefaltete Oberfläche. Zur Genregulation können Schleifen aus dem CT herausragen. (b) CT enthalten separate Subdomänen für den kurzen und den langen Chromosomenarm, sowie für das Centromer (Sternchen). Positionseffekte treten auf, wenn Genloci in direkte Nachbarschaft zu Heterochromatin treten. (c) CT haben eine unterschiedliche Chromatindichte (dunkelbraun: hohe Dichte, hellgelb geringe Dichte). Dicht gepacktes Chromatin liegt zentraler als locker gepacktes. (d) Dieses CT zeigt früh- (grün) und spät replizierende Chromatindomänen (rot). Erstere sind genreich und liegen im Inneren der gesamten Domäne, letztere sind eher genarm und peripher oder um den Nukleolus (nu) herum platziert. Jede Domäne enthält ~1Mb DNA. Die Kernmembran, welche auch Einfaltungen haben kann ist hier gelb dargestellt. (e) CT sind aus einer Hierarchie von Chromatinfasern aufgebaut. Aktive Gene (weiße Punkte) sind an der Oberfläche der gefalteten Fasern gelegen, nicht exprimierte Gene eher in der Mitte (schwarze Punkte). (f) Der Interchromatinraum (ICD, grün) enthält Proteine für Transkription und Splicing, für DNA-Replikation und Reparatur (alle zusammen orange). (g) Zwischen den ~1Mb Subdomänen (rot) befindet sich der ICD-Raum (grün). Aktive Gene (weiße Punkte) liegen entweder auf der Oberfläche oder ragen auf Schleifen aus den Subdomänen heraus und werden an den „Transkriptionsfabriken“ (orange Punkte) exprimiert. Aus Cremer T. und Cremer C. (2001).

1.1.1 Anordnung der Chromosomenterritorien im Zellkern

Bald nach der Entdeckung der Chromosomenkompartimente konnte mithilfe von radioaktiven *in situ* Hybridisierungen mit X- und Y-chromosomalen Sonden gezeigt werden, dass der Abstand zwischen den beiden Geschlechts-

chromosomen in einer männlichen Zelle signifikant kleiner ist, als in einer weiblichen (Rappold et al. 1984).

Mit dem Aufkommen der FISH Technik und der konfokalen Mikroskopie wurde in 3D-Rekonstruktionen neuronaler Zellkerne von Epilepsiepatienten eine Lageveränderung der Territorien des Chromosom X festgestellt, welche im Inneren des operativ entfernten Gehirngewebes aus einem Epilepsiefocus lagen. Als Kontrolle dienten Zellen vom Rand des entfernten Gewebes, die eine normale Verteilung des X-Chromosoms aufwiesen (Borden und Manuelidis 1988).

In einer weiteren Veröffentlichung fanden die Autoren ebenfalls in menschlichen Neuronen in den Hybridisierungssignalen von 1q12 und 9q12 zwei verschiedene Muster (Manuelidis und Borden 1988): Die Sonde 1q12 war immer im Zellkerninneren, nie membranständig zu finden, im Fall von 9q12 lagen entweder beide Homologe um den Nukleolus herum, oder eins um den Nukleolus und das andere an der Kernhülle.

Radiale Anordnung in der Interphase

Unter der Annahme, dass Chromosomenspreitungen die Anordnung im Zellkern widerspiegeln, wurde bereits früh versucht ein Chromosomenarrangement darin zu erkennen (Warburton et al. 1973; Hens et al. 1982; Wollenberg et al. 1982). Mit solchen Präparaten, gewonnen aus peripheren Blutlymphozyten, konnten zwar viele Metaphasen untersucht werden, jedoch lautete die Kritik immer, dass die Zellen mit Colcemid inkubiert, hypoton behandelt und in Methanol-Eisessig fixiert und aufgetropft werden mussten. Es war offensichtlich, dass eine solche Prozedur die Anordnung der Chromosomen beeinflussen könnte (Sperling und Ludtke 1981; Wollenberg et al. 1982). Gleichwohl wurde in diesen Arbeiten ein statistisch signifikantes Muster gefunden: kleinere Chromosomen lagen radial näher zum Zentrum der Metaphasespreitung als größere.

In mitotischen Figuren menschlicher Fibroblasten konnte eine radiale Verteilung bestätigt werden (Mosgöller et al. 1991; Leitch et al. 1994). Hier handelte es sich um mit Formaldehyd fixierte Zellen und nicht mehr um artifiziell gespreitete Chromosomenpräparate. Aus zehn Metaphasefiguren männlicher Fibroblasten wurden Seriendünnschnitte angelegt, im EM aufgenommen und rekonstruiert. Die Auswertung ergab, dass kleinere Chromosomen die Tendenz hatten zentral zu liegen, wohingegen größere eher peripher gefunden wurden.

Eine erste computergestützte Auswertung und gleichzeitig der erste Vorläufer dieser Arbeit wurde Ende der 80er Jahre durchgeführt (Emmerich et al. 1989). Zwei verschiedenfarbigen Sonden für repetitive DNA-Abschnitte in den Chromosomenregionen 1q12 und 15p wurden auf Interphasekerne von Lymphozyten, Amnionzellen und Fibroblasten hybridisiert. Die Signale, genauso wie die Zellkerngrenzen wurden mithilfe einer Camera lucida abgezeichnet und eingescannt. Das entsprach einer 2D-Projektion der Signale in den abgezeichneten Zellkernen. Der Vorteil dieser Methode war, dass viele Zellen in relativ kurzer Zeit bearbeitet werden konnten, z. B. brauchte man für die Aus-

wertung von 300 Kernen nur 2 – 3 Stunden. Danach wurden die Koordinaten des Mittelpunkts, sowie die der Signale bestimmt und die Distanzen berechnet. Zum Vergleich mit einer zufälligen Anordnung wurden zwei Modelle entwickelt, ein Ellipsoid- und ein Zylindermodell. Die zufällige Verteilung zweier Punkte in den Modellen wurde in Monte-Carlo-Methoden simuliert. Keines der beiden Modelle berücksichtigte die Tatsache, dass die genannten Chromosomenregionen Teile der unterschiedlich großen Territorien 1 und 15 sind, und diese Größenunterschiede Auswirkungen auf die Verteilung der CT haben sollten. Messungen ergaben, dass die beiden Signale für die CT 15 näher beieinander und auch näher zum Mittelpunkt lagen, als die beiden Signale für die CT 1. Individuelle Kerne unterschieden sich aber in den nachbarschaftlichen Positionen der markierten Sonden, was gegen eine starre Anordnung der Chromosomen sprach.

Weil das Chromosom 15 eine NOR im kurzen Arm enthält und deshalb mit Nukleoli assoziiert ist, wurden die Experimente mit den Sonden für das Centromer von Chr. 18 (18c) und X (Xc) wiederholt (Popp et al. 1990). Wieder wich die Distanz 18c-CN (center of nucleus) signifikant von der Zufallsverteilung des Zylinder- bzw. Ellipsoidmodells ab, d. h. Chr. 18 lag signifikant näher zur Zellkernmitte.

Interessant war in dieser Studie, dass verschiedene Fixierungen zu gleichen Resultaten führten. Sogar in Zellen, die hypoton behandelt wurden und bei denen die Zellkernfläche um etwa das 2,5-fache größer war, wurden ähnliche Verhältnisse der gemessenen Distanzen gefunden.

Zwei weitere Arbeiten bestimmten die Lage der Centromere 7 und 15 (Höfers et al. 1993a; Höfers et al. 1993b). Beide waren signifikant näher am Zentrum, als in dem Zylinder- bzw. Ellipsoidmodell. Die Position 15c war noch zentraler als die von 7c.

Sun et al. (2000) beschrieben in Fibroblasten eine Korrelation zwischen der Lage der Territorien und der Chromosomengröße. Je kleiner die Chromosomen, desto weiter innen lagen sie. Jahre zuvor wurde bereits in Distanzmessungen an Fibroblasten-Metaphasespreitungen eine größenabhängige radiale Positionierung gefunden, mit den kleinen Chromsomen 19, 20, 21, 22 und Y innen und den großen 1, 2, 3, 4 außen (Hoo und Cramer 1971). Aufgrund der artefaktbehafteten Technik fand diese Veröffentlichung jedoch keine Beachtung.

Ein Einfluß des Zellzyklus auf die Chromosomeposition ist nicht unwahrscheinlich, denn Bridger et al. (2000) konnten bei den beiden gleich großen Chromosomen 18 und 19 eine unterschiedliche Innen-Außen Verteilung in wachsenden Fibroblasten feststellten, jedoch nicht bei Fibroblasten in der G0-Phase. Hinweise auf eine Zellzyklusabhängigkeit liegen auch für Hühnerfibroblasten vor, wo die früh-replizierenden Mikrochromosomen immer in der Kernmitte lokalisierten (Habermann et al. 2001; Tanabe et al. 2002a).

Zusammengefasst zeichnet sich für die untersuchten Zellkerne das Schema einer radialen Anordnung ab: kleine CT häufen sich zentral in der Kernmitte, große Territorien präferenziell in der Kernperipherie. Defizite der meisten Arbeiten war jedoch eine Fixierung der Zellen mit Methanol-Eisessig (MAA) und

eine hypotone Behandlung. Eine weitere Einschränkung war die Hybridisierung mit höchstens zwei Sonden und der Vergleich mit wenig geeigneten Kernmodellen.

Nachbarschaftliche Anordnung in der Interphase

In der Veröffentlichung Nagele et al. (1999) wurden die Chromosomenpositionen von 7, 8, 16 und X in Fibroblasten bestimmt. Die Autoren fanden experimentell eine Verteilung aus der sie schlossen, homologe Chromosomen nehmen gegenüberliegende Positionen mit einem Winkel von etwa 150° ein. Sie versuchten, die experimentell gefundene Verteilung mit dem entweder parallelen oder anti-parallelen „Umfallen“ der Tochterzellen nach der Mitose zu erklären. Würde man alle vier Möglichkeiten, die zwei Tochterzellen besitzen um „umzufallen“, auf eine Fläche projizieren, so fände man die tatsächlich beobachtete Anordnung (für ein Schema siehe „Nagele_etal99_JCS_Fig7.jpg“ auf der CDROM zu diesem Kapitel).

In Bronchialzellen, die in der Form und Größe den Fibroblasten ähnlich sind, wurde von Koss (1998) ebenfalls eine gegenüberliegende Verteilung aller homologen Chromosomen beobachtet.

Anordnung in Prometaphaserosetten

Uneinigkeit besteht in der Literatur bezüglich der Lagebeziehung der Chromosomen in Prometaphaserosetten. Die kondensierten Chromosomen ordnen sich während der Prometaphase in einer Ebene parallel zum Objektträger ringförmig an (siehe Abb. 1-2). In der Mitte scheint ein „Loch“ freigelassen zu sein. Mithilfe einer Anti-Centromer Färbung fanden Chaly und Brown (1988) heraus, dass eine modifizierte Rabl-Konfiguration vorliegt, d. h. alle Centromere zeigen nach innen, alle Telomere nach außen.

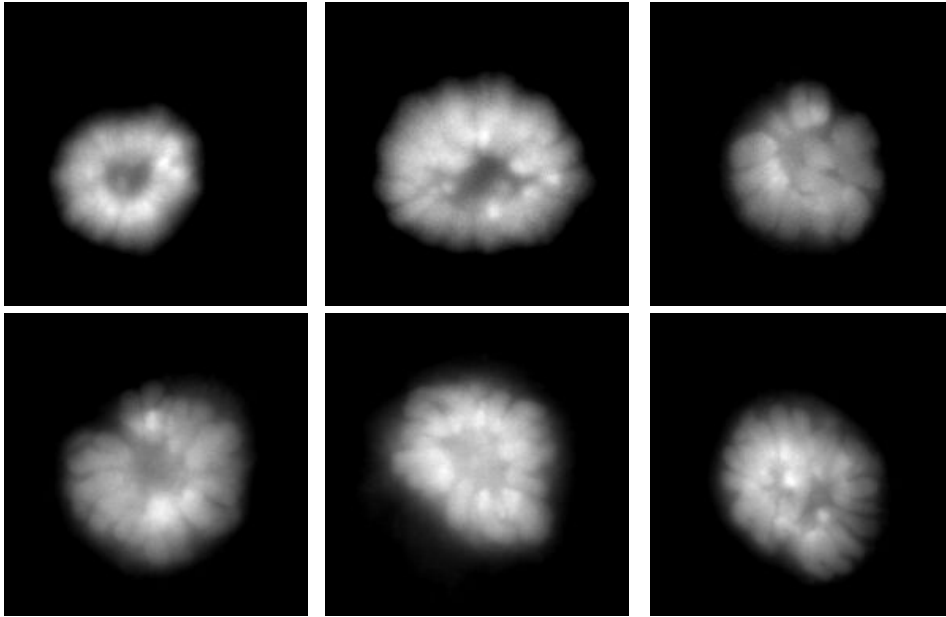


Abb. 1-2 Sechs verschiedene Beispiele für DAPI gefärbte Prometaphaserosetten. Man kann einzelne Chromosomen erkennen, die ringförmig angeordnet sind. Eine Rabl-Orientierung (helle Centromere nach innen, Telomere nach außen) ist an manchen Chromosomen zu erkennen.

Frühe Studien an Säugerzellen fanden homologe Chromosomen benachbart in den Prometaphaserosetten bei Mensch (Schneiderman und Smith 1962), Muntjac (Heneen und Nichols 1972) und Chinesischem Hamster (Juricek 1975). Andere Veröffentlichungen berichteten dagegen von einer eher zufälligen oder weit separierten Anordnung (Hens 1976; Korf und Diacumakos 1977; Nagele et al. 1995). In zwei kontrovers diskutierten FISH Arbeiten fanden Nagele und Mitarbeiter heraus, dass homologe Chromosomen von Fibroblasten und HeLa-Zellen in Prometaphaserosetten immer durch einen Winkel von mindestens 90° getrennt waren (Nagele et al. 1995; Nagele et al. 1998). Aus ihren Ergebnissen leiten die Autoren ein Modell ab, in dem alle homologen Chromosomen sich in der Rosette gegenüber liegend positionieren, dann die Chromatiden in die Tochterzellkerne verteilt werden und diese Anordnung in die nächste Generation übertragen wird (siehe Abb. 1-3). Das Modell impliziert eine Trennung des väterlichen und mütterlichen Chromosomensatzes, ähnlich der gefundenen Genomseparation in Weizen-Hafer-Hybriden (Leitch et al. 1991), oder der in den ersten Zellteilungen bestehenden Trennung von Spermium- und Eigenom nach der Befruchtung in Mausembryos (Haaf 2001). Allerdings wurden die Ergebnisse durch eine neuere Arbeit (Allison und Nestor 1999) stark in Zweifel gezogen. Diese Autoren finden in Experimenten mit dem gleichen Zelltyp und den gleichen Hybridisierungsmethoden, aber einer größeren Anzahl an Rosetten eine zufällige nachbarschaftliche Anordnung der Chromosomen in der Prometaphaserosette.

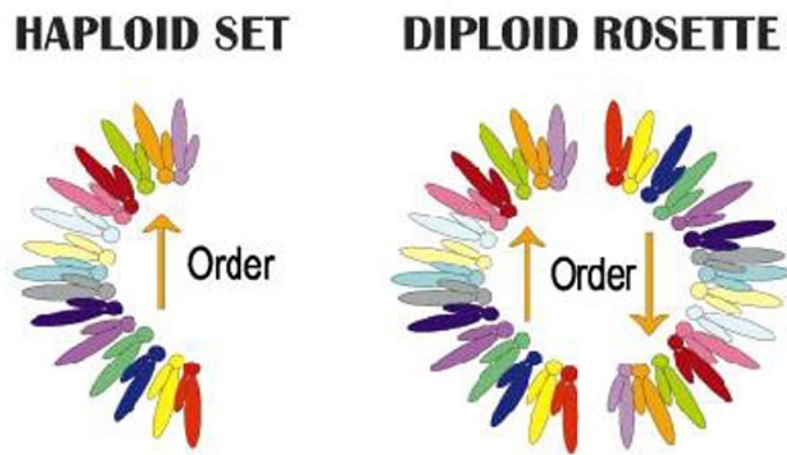


Abb. 1-3 Postulierte Anordnung der Chromosomen in menschlichen Prometaphase-rosetten aus Nagele et al. (1998). Die Autoren schließen aus ihren FISH Experimenten, dass die zwei haploiden Chromosomensätze der beiden Elternzellen strikt getrennt auf den entgegengesetzten Seiten liegen müssen. Die Homologen liegen sich in etwa gegenüber. Eine danach erschienene Arbeit konnte dieses Muster nicht bestätigen (Allison und Nestor 1999).

Homologenassoziation

In Zellkernen von *Drosophila melanogaster* scheint die Assoziation der drei Autosomenpaare eine typische Eigenschaft somatischer Zellen zu sein (Hiraoka et al. 1993; Henikoff 1997). Darüberhinaus konnte die topologische Anordnung aller Chromosomen in Polytänkernen (Agard und Sedat 1983) und eine Rabl-Konfiguration (Marshall et al. 1996) gezeigt werden.

In Metaphasepräparaten menschlicher Lymphozyten fanden Cohen et al. (1972) nach einer Colchizin-Behandlung peripherer Blutlymphozyten keine Homologenassoziation. Heneen und Nichols (1972) fanden dagegen eine derartige Assoziation in einer Untersuchung, bei der das Colchizin weggelassen wurde. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass mitotische Inhibitoren die normale Chromosomenposition zerstören (Rohlf et al. 1980).

In Zellkernen wurde eine Homologenassoziation bisher lediglich in ausdifferenzierten neuronalen Zellen gezeigt. Die Centromerabschnitte der Chromosomen 1, 7 und 17 wurden in Gewebeschnitten des Cerebellums nebeneinander beobachtet (Arnoldus et al. 1989; Arnoldus et al. 1991). Hingegen wurde in menschlichen Fibroblasten in 2D - Projektionen der centromerischen Sonden 1 und 7 keine Homologenassoziation gefunden (Höfers et al. 1993a; Höfers et al. 1993b). Andere Arbeiten hatten zuvor ebenfalls keine Homologenassoziation in Fibroblasten (Emmerich et al. 1989; Leitch et al. 1994) und in Amnionzellen (Popp et al. 1990; Volm 1992) nachweisen können. Auch in peripheren Blutlymphozyten betrug die Anzahl der unmittelbar benachbarten homologen Chromosomen weniger als 2% (Alcobia et al. 2000). Diese Arbeit bestätigte auch die Vermutung, dass in Lymphozyten unabhängig von der Präparationsmethode keine Homologenassoziation vorliegt (Ferguson und Ward 1992; Vourc'h et al. 1993; Lesko et al. 1995).

Für eine Zelltyp- und/oder Differenzierungsabhängigkeit in dieser Frage spricht eine vergleichende FISH Analyse mit den Painting Sonden 3, 7, 8, 13, 17, 21 und X in Testis Sertoli-Zellen (Chandley et al. 1996). In diesen ausdifferenzierten Zellen wurde meist nur ein Signal pro Painting Sonde gesehen, so dass angenommen wurde, beide Homologen lägen assoziiert nebeneinander.

Möglich wäre auch eine Paarung, beschränkt auf bestimmte Chromosomenabschnitte oder Zellzyklusphasen. In T-Lymphozyten wurde eine Assoziation der beiden Chr. 15 Homologen spezifisch im Bereich 15q11-q13 (PWD-Region) während der späten S-Phase gefunden (LaSalle und Lalande 1996). Ebenso zeigten pericentromerische Sonden für die Homologen der Chr. 9 und 17 in Prostatatumoren eine Assoziation (Williams et al. 1995). Im Falle des Chr. 17 konnten die Autoren demonstrieren, dass nur der pericentromerische Bereich und nicht das ganze Chromosom gepaart waren.

1.1.2 Zellkernmodelle

Verschiedene Modelle beschäftigen sich mit der Simulation von Chromatin im Zellkern, aufgrund lichtmikroskopischer und im EM gefundener Daten (Widom und Klug 1985; Felsenfeld und McGhee 1986; Belmont und Bruce 1994; Graziano et al. 1994; Horowitz et al. 1994). Jedoch machen nur die unten vorgestellten Aussagen über die Lage der Chromosomen zueinander. Sie wurden vor allem benutzt, um Translokationsfrequenzen nach einer Bestrahlung vorherzusagen (Ostashevsky 2000; Sachs R. K. et al. 2000).

Random Walk / Giant Loop - und Multi Loop Subcompartment - Modell

Abstandsmessungen zwischen FISH Signalen im Kern führten zum „Random Walk / Giant Loop (RW / GL) Modell“ (Yokota et al. 1995). Aus den Messungen wurde ein Modell entwickelt, das mehrere Mb große Chromatinschleifen auf ein (postuliertes) biegbares Rückgrat zurückfaltet (Sachs R. K. et al. 1995). In Monte-Carlo-Simulationen ergaben sich dabei das erste Mal Chromosomenterritorien. In Modellen, die keine Zurückfaltung von Chromatinfibern voraussetzen, wurden auch keine Territorien bewirkt (Kreth et al. 1998). Ein anderes Modell, das „Multi Loop Subcompartment Modell (MLS)“, basiert auf bekannten EM-Bildern von 30-150 kb Chromatinschleifen (Okada und Comings 1979). Es postuliert ~1 Mb große Chromatindomänen, aufgebaut aus einer Serie von Chromatinschleifen, die an der Basis zusammengehalten werden. Jede dieser Schleifen kann wiederum eine zufällige Organisation haben (Münkel und Langowski 1998; Münkel et al. 1999).

Bei der Berechnung ergaben sich in beiden Modellen Chromosomendomenen. Sie gelangten jedoch zu unterschiedlichen Vorhersagen z. B. über den Grad der Durchmischung von Chromatin benachbarter CT und über Distanzen im Interphasekern (Münkel und Langowski 1998; Zink et al. 1998; Zink et al. 1999; Cremer T. und Cremer 2001).

Spherical Chromatin Domain - Modell

Ein Sonderfall des MLS ist das „Spherical ~1Mb Chromatin Domain (SCD) Modell“, mit dem die großräumige Lagebeziehung aller CT im Zellkern simuliert werden kann (siehe Abb. 1-4). Für die vorliegende Arbeit ist bedeutsam, dass man anhand dieses Modells virtuelle konfokale Mikroskopiebilder simulierter Schnitte durch den Zellkern und deren 3D-Rekonstruktionen berechnen kann. Darüberhinaus konnten Fluorochrommarkierungen nach Bedarf zugeordnet werden. Es wurden immer vollständige Kerne mit 46 CT simuliert, je nach Bedarf konnten aber unterschiedliche Chromosomen visualisiert werden. In dieser Arbeit wurden drei SCD-Modelle verwendet. Das erste visualisiert zwei einzelne Territorien, um die Dekonvolution testen zu können (Kapitel 3.3.1, S. 97 ff). Das zweite visualisiert einen Zellkern mit sieben Chromosomen für die Überprüfung der Klassifikationsgenauigkeit (Kapitel 3.4.1, S. 124). In der dritten Simulation wurden jeweils alle Territorien von 50 Fibroblastenkerne mit dem SCD-Modell berechnet, um eine zufällige Verteilung der Chromosomenanordnung zu erhalten (Kapitel 3.5.2.3, S. 150). Für eine genaue Beschreibung des SCD-Modells siehe Cremer T. et al. (2000) und Kreth et al. (2001).

In früheren Publikationen (z. B. Emmerich et al. 1989) wurden mittels Monte-Carlo-Simulation zufällige Punkteverteilungen in einer Ellipse bzw. in einem Zylinder betrachtet. Es ergaben sich zwei Grenzlinien, deren Überschreitung als nicht-zufällig bewertet wurde. Die Größe und das Volumen der Chromosomen konnte jedoch erst mit dem später verwendeten SCD-Modell berücksichtigt werden.

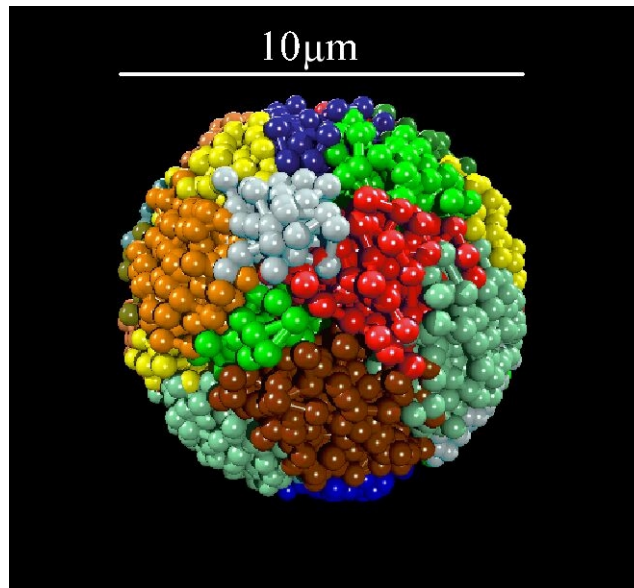


Abb. 1-4 Computersimulation eines diploiden menschlichen Zellkerns, dargestellt in 24 verschiedenen Farben mithilfe des „Spherical ~1Mb Chromatin Domain (SCD) Models“. Aus Cremer T. et al. (2000).

1.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Absorption eines Photons mit der Energie $h\nu$ kann ein Molekül in einen höheren Energiezustand versetzen. Die Anregungsenergie wird durch Emission eines Photons $h\nu'$ wieder abgegeben. Als Fluoreszenz wird die spontane Emission von Strahlung bezeichnet bei der für jedes absorbierte Photon wieder ein Photon ausgesandt wird. Von jedem Fluorochrom können durch kontinuierliche Messung aller Wellenlängen Anregungs- und Emissionsspektren bestimmt werden (siehe Abb. 2-3, S. 61). Die Maxima dieser Spektren sollten klar getrennt sein, um eine gute Abgrenzung zu Spektren benachbarter Fluorochrome zu bekommen.

Neben den neuen Fluorochromen und Filtern waren es vor allem auch die verbesserte Zellpräparation (zur Erhaltung der Topologie während der Denaturierung), die reinere Sortierung menschlicher Chromosomen im Durchflußzytometer und optimierte kombinatorische Ansätze zur simultanen Hybridisierung aller 24 menschlichen Chromosomen, die zusammen ein erfolgreiches Arbeiten zuließen.

1.2.1 Painting Sonden

Chromosomen-spezifische DNA-Sonden können, nachdem sie mit einem Fluorochrom gekoppelt und als Hybridisierungssonden eingesetzt wurden, ein ganzes Chromosom anfärben. Individuelle Chromosomen werden entweder durch Mikrodisektion einzelner Chromosomen aus Metaphasespreitungen (Guan et al. 1994; Guan et al. 1996) oder mithilfe eines FACS (Telenius et al.

1992b) gewonnen. Daraus werden dann mittels DNA-Klonierung oder PCR-Verfahren mit degenerierten Primern (DOP-PCR) die Sonden hergestellt.

Mit Painting Sonden und der Chromosomen *in situ* Suppressionsmethode (CISS) kann mit einem Überschuss an nichtmarkierter, kompetitiver C_0t1 -DNA eine spezifische Hybridisierung erreicht werden (Lichter et al. 1988a). Allerdings benötigt man pro Hybridisierung etwa einen 20-fachen Überschuss an C_0t1 -DNA zum Abblocken möglicher nicht-spezifischer Bindungen (Lichter et al. 1988a; Lengauer et al. 1991). Der Begriff C_0t1 -DNA entstand in Experimenten mit Reassoziationskinetiken zu Beginn der 70er Jahre (Britten et al. 1974). Dort wurde gezeigt, dass sich nach einer Denaturierung doppelsträngiger DNA, kurze repetitive Elemente schneller wiederfinden als lange single-copy DNA. Ließ man das Reassoziationsexperiment mit einer Konzentration C_0 genau so lange inkubieren, bis das Produkt aus $C_0 \times t$ den Wert eins ergab, so erhielt man ein Gemisch aus reassozierten repetitiven DNA-Fragmenten, die C_0t1 -DNA. Wenn vor einer Hybridisierung diejenigen Elemente, welche von der C_0t1 -DNA blockiert werden, aus den zu hybridisierenden Sonden entfernt werden könnten, so wäre eine stringente Hybridisierung auch ohne Competitor-DNA möglich. Dieser Ansatz wurde mit der folgenden Methode verwirklicht.

Abreicherung von repetitiven Elementen in Painting Sonden

Das Prinzip der hier beschriebenen Experimente ist das einer subtraktiven Hybridisierung der DNA-Population A mit einer DNA-Population B. Diejenigen Moleküle, die schnell hybridisieren sind in beiden Populationen gleich und daher uninteressant, weil repetitiv. Die Moleküle, die einzelsträngig in Lösung bleiben, stellen „single-copy“ Sequenzen dar und sollten isoliert werden.

Zur Abtrennung einer DNA-Teilmenge aus der gesamten DNA-Population gibt es unterschiedliche Ansätze. Bernardi (1965) beschrieb erstmals eine Chromatographie mit Hydroxylapatit, um ssDNA abzutrennen. Jedoch ist der Prozess arbeitsaufwendig und man benötigt die zu subtrahierende DNA in ausreichender Menge (mehrere mg).

Eine experimentelle Verbesserung stellte das Avidin-Biotin-System zur Selektion spezieller DNA-Sequenzen dar (Welcher et al. 1986). So konnten spezifische DNA-, cDNA- und RNA-Sequenzen mithilfe biotinylierter Sonden, die an Avidin banden, über eine Kupferchelate-Agarose-Chromatographie isoliert werden.

Die selektive DNA-Trennung wurde unter dem Begriff „subtraktive Hybridisierung mit direkter Selektion“ bekannt (einen Übersichtsartikel bietet Lovett 1994). Sie wurde hauptsächlich verwendet, um codierende Sequenzen innerhalb komplexer Genome zu finden. Neu war der Einsatz der PCR-Technik. Die Subtraktor-DNA wurde entweder an einer Membran verankert (Parimoo et al. 1991), oder an Latex-Kügelchen (Hara et al. 1993). So konnten z. B. Transkripte aus einer cDNA-Bank isoliert werden, die nur in seneszenten menschlichen Fibroblastenkulturen exprimiert sind (Hara et al. 1993).

Die Biotinylierung der Subtraktor-DNA, um sie nach der Hybridisierung mit Streptavidin-Eisenkügelchen und einem Magneten zu fangen, war eine weitere

Verfeinerung der Technik (Morgan et al. 1992). Damit wurden z. B. aus einer genomischen cDNA-Bank diejenigen DNA-Abschnitte isoliert, die vom Chr. 17 (Rouquier et al. 1995) oder vom Chr. 11 (Chen-Liu et al. 1995) stammten. In der zuletzt genannten Veröffentlichung erhielt die Methode das Acronym SHAC („selection of hybrids by affinity capture“). All diesen Arbeiten ist gemeinsam, dass stets eine positive Selektion angewandt wurde, d. h. bestimmte Sequenzen wurden aus einem Pool angereichert.

Im Gegensatz dazu verwendeten Craig et al. (1997) eine negative Selektion. Dabei wird diejenige DNA am Magneten gefangen, die man nicht haben möchte und die verbleibende Lösung wird weiterverwendet. Dieses Protokoll wurde im Rahmen der Dissertation verbessert und zur Eliminierung repetitiver DNA-Sequenzen aus allen menschlichen Painting Sonden angewandt (Bolzer et al. 1999).

1.2.2 Vielfarben-FISH Techniken

Die simultane Verwendung verschiedener Haptene und Fluorochrome ermöglicht eine Darstellung mehrerer DNA-Sonden. Ende der 80er Jahre konnten zum ersten Mal drei, bzw. sieben Chromosomen gleichzeitig visualisiert werden (Nederlof et al. 1989; Nederlof et al. 1990; Ried et al. 1992). Diese Mikroskopiemethode entfaltete sich in enger Verknüpfung mit der Entwicklung von Fluorochromen und Filtern, sowie einer automatischen Klassifikation. Es gibt heute zwei prinzipielle Strategien zur Vielfarbenmarkierung: den kombinatorischen Ansatz und den Verhältnisansatz. Die kombinatorische oder boolesche Markierung ordnet jeder Sonde eine eindeutige Kombination von ein, zwei oder mehr Fluorochromen zu. Es kommt dabei nicht auf die Stärke der Signalintensität an sondern nur, dass sie auf einem Chromosom vorhanden ist. Im Gegensatz dazu ist die Stärke der Markierung im Verhältnis- (ratio)- Ansatz wichtig. Hier werden die Sonden so markiert, dass verschiedene Chromosomen durch die Intensitäten eines Fluorochroms unterschieden werden können, z. B. 33% blau, 66% grün, 0% rot = Chr.1, oder 33% blau, 100% grün, 33% rot = Chr.2. Die wichtigsten Vertreter beider Ansätze werden im folgenden geschildert.

M-FISH

Das Multiplex-FISH Verfahren (Speicher et al. 1996) wurde in dieser Arbeit für 3D-Anwendungen weiterentwickelt. Es beruht auf einem Engpassfiltersatz, der Licht außerhalb der definierten Wellenlängen kaum durchlässt (Reichman 2000). In ein Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskop wurde ein elektrischer Filterwechsler eingebaut, der 8 Filterblöcke aufnehmen kann (Eils et al. 1998). Durch die Motorisierung konnte die Aufnahmezeit verschnellert und ein lateraler Pixelshift reduziert werden.

Die verwendeten Fluorochrome sind in Abb. 1-5 dargestellt (Spektren in Abb. 2-3, S. 61). Die genaue Abstimmung der Fluorochrome mit den Filtern ist wichtig, damit ein „Durchstrahlen“ („bleed-through“ oder „cross-talk“) der Fluorochromspektren minimiert wird. Durch die spektrale Trennung von Fluorochro-

men, wurde es möglich kombinatorisch markierte Sonden zu verwenden und jedem der 24 Chromosomen des Menschen eine eindeutige Farbkombination zuzuordnen (Speicher et al. 1996; Eils et al. 1998).

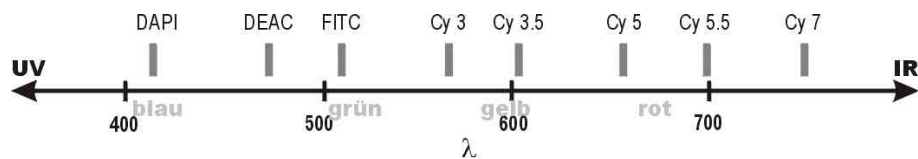


Abb. 1-5 Ausschnitt aus dem Spektrum elektromagnetischer Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts. Farben für das menschliche Auge, Wellenlängenangaben (λ) und Emissionsmaxima einiger in dieser Arbeit verwendeter Fluorochrome sind angegeben.

Die kombinatorische Markierung der Painting Sonden für M-FISH ist in Tab. 2-2 (S. 49) gezeigt. Alle Chromosomen, die mit einem bestimmten Fluorochrom markiert werden sollen, können in einem Pool vereint und gemeinsam markiert werden. Z. B. enthält der Cy3-Pool die Chr. 3, 6, 8, 11, 15, 18 und 20. Werden die korrespondierenden Painting Sonden in ein Reaktionsgefäß pipettiert, so kann aus dieser Mischung ein Aliquot via DOP-PCR amplifiziert und markiert werden (Abb. 1-6). Die so markierten Pools werden gemischt und hybridisiert.

Im Anschluss an die Hybridisierung und den Nachweis der indirekt markierten Sonden wird von jedem Fluoreszenzkanal eine Aufnahme gemacht und gespeichert (Abb. 1-7). Überlagert man alle Bilder, entweder manuell oder mit einer speziellen Software, so kann man anhand des Markierungsschemas jedes Signal im Bild eindeutig klassifizieren. Mit diesem Aufnahmesystem gelingt es eine M-FISH Metaphase innerhalb von 2 - 3 min aufzunehmen und zu klassifizieren (Eils et al. 1998).

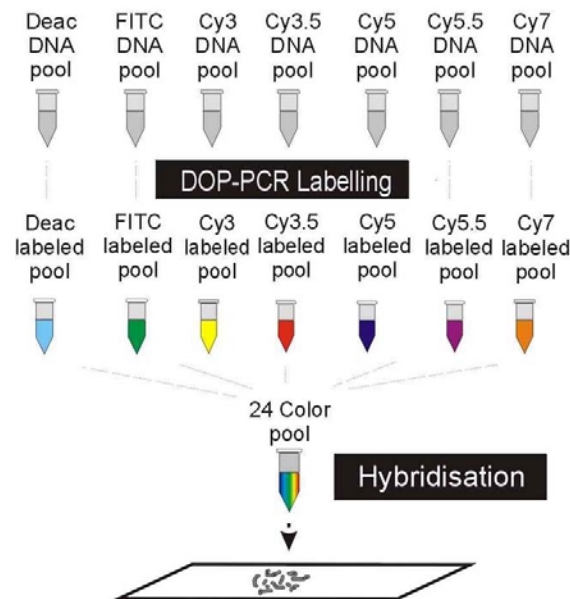


Abb. 1-6 M-FISH: Prinzip der Sondenherstellung und Hybridisierung. Entsprechend den Fluorochromen im Markierungsschema werden Pools hergestellt und amplifiziert. Diese werden gemischt und hybridisiert.

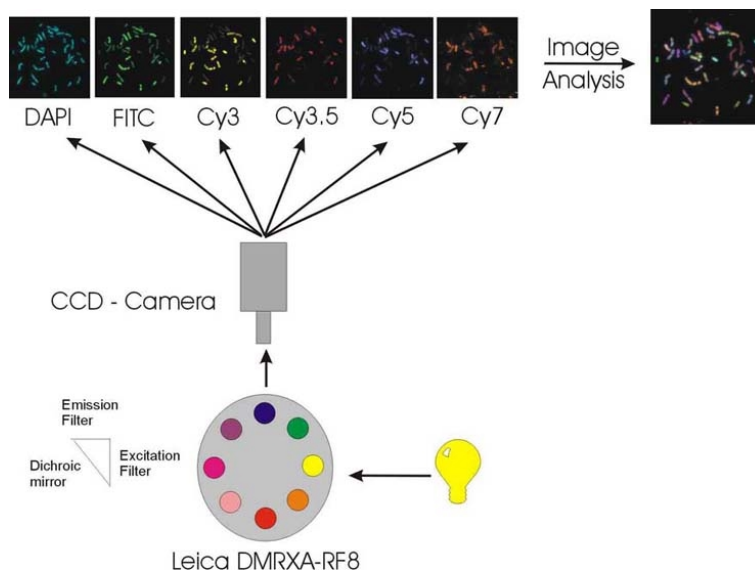


Abb. 1-7 M-FISH: Prinzip der Bildaufnahme. Das Licht einer Quecksilberdampf-Lampe wird durch den Anregungsfilter geschickt und trifft anschließend auf das Präparat. Das von den Fluorochromen ausgesandte Licht gelangt, nachdem es den Emissionsfilter passiert hat, zur CCD-Kamera. Mit ihr wird von jedem Kanal ein Bild angefertigt und abgespeichert. Zur besseren Darstellung sind die Bilder hier farblich dargestellt. Eine anschließende Bildanalyse ermittelt die Überlappbereiche der einzelnen Kanäle und ordnet den klassifizierten Chromosomen eine falsche Farbe und eine Nummer zu.

SKY

Ein weiteres 1996 veröffentlichtes Karyotypisierungsverfahren heißt „Spectral Karyotyping“ (SKY) (Garini et al. 1996; Schröck et al. 1996). Es wird von der Firma Applied Spectral Imaging vertrieben und beruht auf einer Fourier-Transformation des aufgenommenen Bildes mit anschließender Analyse der Farbinformation jedes Pixels (Malik et al. 1996). Die Aufnahme- und Analyse-

zeit für eine Metaphase ist mit M-FISH vergleichbar. Der Vorteil dieses Systems ist die spektrale Auflösung des verwendeten Interferometers, die theoretisch bei 5 nm liegt. Im Vergleich dazu haben M-FISH-Filter eine durchschnittliche Bandbreite von 30 - 60 nm. Aufgrund technischer Gegebenheiten müssen auch bei SKY drei Hochpassfilter verwendet werden, je einer für blau, grün und rot, was letztendlich dazu führt, dass die oben erwähnte spektrale Auflösung in der Praxis nicht erreicht wird (Castleman et al. 2000). Zusätzlich werden während der Aufnahmezeit alle Fluorochrome gleichzeitig bestrahlt, was trotz der Photostabilität der Fluorochrome zum Ausbleichen beiträgt. Je höher die Auflösungskraft des Interferometers eingestellt wird, desto länger benötigt das System für eine Aufnahme.

ReFISH und CCK

Der Nachteil aller oben beschriebenen Techniken ist, dass man speziell ausgestattete Mikroskope mit Filtern oder Interferometer benötigt, um die Fluoreszenzmarkierungen detektieren zu können. In vielen Fluoreszenzmikroskopen sind aber nur drei Standardfilter vorhanden, die z. B. für die Fluorochrome Fitc, Cy3 und Cy5 verwendet werden können. Diese methodische Lücke füllt ReFISH, das zwei aufeinanderfolgende Hybridisierungen mit einem dazwischenliegenden Waschschrift nutzt, um mit den vorhandenen drei Filtern alle 24 Chromosomen zu detektieren (Heslop-Harrison et al. 1992; Epstein et al. 1995; Wang et al. 1995; Raap 1998; Zhen et al. 1998; Nie et al. 2001). Das Verfahren beruht auf der vollständigen Entfernung aller Signale aus der ersten Hybridisierung durch Denaturierung und einer anschließenden Hybridisierung eines komplementären SONDENSATZES. Das Markierungsschema ist in Tab. 2-3 (S. 53) gezeigt. Optimierte wurde die Methode für komplexe SONDENGEMISCHTE von S. Müller (LMU München; Müller et al. 2002).

Eine Abwandlung dieses Prinzips ist CCK („Colour-changing karyotyping“, Henegariu et al. 1999). Dabei werden in der ersten Hybridisierung nur direkt markierte Fluorochrome verwendet, wohingegen in der zweiten Hybridisierung nur Haptene zum Einsatz kommen, die indirekt mit Antikörpern nachweisbar sind (Biotin, Digoxigenin und Dinitrophenyl). Die Fluoreszenzintensität der indirekten Sonden ist stärker und überstrahlt deshalb die Signale der ersten Hybridisierung.

COBRA

Ein weiteres Vielfarben FISH-System trägt den Namen COBRA als Akronym für **C**ombined **B**inary **R**atio labelling (Tanke et al. 1999). Es verwendet 4 Fluorochrome und einen sogenannten Verhältnismarkierungsansatz. Mit drei Fluorochromen werden zwölf Painting Sonden jeweils so markiert, dass sie bereits durch ihr Fluoreszenzsignalverhältnis unterschieden werden können (siehe S.28 unten). Dieses Verhältnis kann erzielt werden, indem man der Markierungs-PCR entsprechende Mengen fluorochrom-gekoppelter dUTPs zugibt, oder mittels der chemischen Markierung mit dem Universal Linking Systems ULS (Akers et al. 1999; Wiegant et al. 1999). Die komplementären zwölf Painting Sonden werden anhand des Markierungsschemas markiert und zusätzlich

noch mit einem vierten Fluorochrom, welches als binäres Unterscheidungsmerkmal zum ersten Satz verwendet wird. Ist das vierte Fluorochrom in dem später aufgenommenen Bild vorhanden, gehört das Chromosom zu dieser zweiten Gruppe. Mit diesem Ansatz können im Prinzip sogar mehr Chromosomen, arm- und bandenspezifische Sonden simultan nachgewiesen werden, als mit ReFish oder CCK.

1.2.3 Zellpräparation

Bei der FISH Methode sind einige harsche Schritte erforderlich, um eine optimale Sondenpenetration und Hybridisierung zu gewährleisten (z. B. DNA Denaturierung bei 95°C). Das führte zu der Frage, bis zu welchem Grad die räumlichen Beziehungen der von FISH detektierten CT die Topologie in lebenden Zellen widerspiegelt. Folgende Schritte bei der Vorbehandlung der Präparate könnten zu Veränderungen führen: (a) Fixierung, (b) Permeabilisierung der Zell-, bzw. Kernmembran und (c) DNA-Denaturierung.

Methanol-Eisessig (MAA) und Formaldehyd (PFA)

In der Zytologie werden zwei Fixierungslösungen standardmäßig angewandt: Methanol-Eisessig (MAA, 3:1) und Formaldehyd (PFA, 4% in PBS). Die erste Methode wird verwendet, um Chromosomenspreitungen herzustellen (Lichter et al. 1991), findet sich jedoch auch in Publikationen zur Zellkernarchitektur. Durch die hygroskopische Wirkung schrumpfen die Zellen um einige Prozent. Ein direkter Vergleich der beiden Fixierungsmethoden ergab, dass die relativen Abstände zwischen Hybridisierungssignalen dennoch weitgehend identisch blieben (Popp et al. 1990). Dennoch bietet diese Methode aufgrund ihrer artefaktträchtigen Schritte keine geeignete 3D-Erhaltung.

Bei der Fixierung mit einer 4%-igen Formaldehydlösung wird dafür gesorgt, dass die Zellen nie austrocknen (Zirbel et al. 1993). Die Zellen bleiben immer in wässriger Umgebung, was zu einer besseren Erhaltung der 3D-Topologie führt. In Kombination mit verschiedenen Schritten zur Permeabilisierung, Protein Entfernung und Denaturierung ist diese Fixierung für FISH Experimente am besten geeignet. Das gesamte Verfahren wird als „3D-FISH“ bezeichnet (Kapitel 2.1.4, S. 44).

Qualitätskontrolle

Manuelidis (1984) konnte keine Hinweise dafür finden, dass sich die relativen Positionen und Distanzen während der *in situ* Hybridisierung aufgrund des Formamids oder der Temperatur änderten.

Eine mögliche Qualitätskontrolle stellt eine DAPI-Färbung nach verschiedenen Vorbehandlungsschritten und eine anschließende Bildanalyse dar (Mongelard et al. 1999). Jeweils die gleichen Zellkerne wurden nach der Fixierung, Permeabilisierung, thermischen Denaturierung und Hybridisierung mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen und sowohl das Muster als auch das Volumen verglichen. Die Autoren fanden nur einen geringen Effekt nach

der Permeabilisierung sowohl auf das Muster, als auch auf das Volumen. Nach dem Denaturierungsschritt wies der Kern jedoch eine beträchtliche Volumenzunahme auf. Es zeigte sich auch, dass mit längerer Denaturierungsdauer eine Zunahme des Volumens der FISH Signale einherging, was auf eine Veränderung in der Chromatinstruktur schließen lässt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein 3D-FISH Protokoll verwendet, welches auf der Ebene lichtmikroskopischer Analysen zu keiner wesentlichen Lageveränderung des Chromatins führte (Solovei et al. 2002a). Durch das Formaldehyd wird eine so gute Quervernetzung von Proteinen und DNA erreicht, dass die relativen Distanzen zwischen Sondersignalen erhalten bleiben. Im Gegensatz zu der oben genannten Veröffentlichung schwillt im Zuge der Permeabilisierung der Zellkern zwar leicht, schrumpft aber während der 3D-FISH Prozedur wieder, so dass er am Ende etwa 80% des Lebendvolumens einnimmt.

1.3 3D-Mikroskopie und Bildverarbeitung

Konfokale Mikroskopietechniken lassen detailliertere Aussagen hinsichtlich der Nachbarschaft von CT zu und ermöglichen so neue Einblicke in die Struktur des Zellkerns (Eils et al. 1996; Dietzel et al. 1998b). Einer verbesserten Beschichtung der Objektivlinsen ist es zu verdanken, dass die verschiedenen optischen Aberrationen heute zumindest in der xy-Richtung weitgehend korrigierbar sind. Das laterale Auflösungsvermögen beträgt bei hochnumerischen Objektiven mit Ölimmersion $\sim 0,17 \mu\text{m}$, die axiale Auflösung hingegen nur $0,7 \mu\text{m} - 1 \mu\text{m}$ (Höfers et al. 1993a).

3D-Rekonstruktionen und Dekonvolutionsalgorithmen können in der Regel nur angewendet werden, wenn das aufzunehmende Objekt überabgetastet wird. Dazu werden über- und unterhalb der Fokusebene mehr Schnitte aufgenommen, als eigentlich für die reine Objektaufnahme nötig wären. Diese Bilder enthalten kaum noch sichtbare Information, jedoch genügend, um die Restauration durch eine Software zu ermöglichen. Das sogenannte Nyquist-Kriterium sollte in z-Richtung erfüllt oder unterschritten sein. Es beschreibt diejenige Mindest-Schrittweite, die benötigt wird, um zwei Punkte als solche auflösen zu können und berechnet sich näherungsweise durch die folgende Formel (Heintzmann 1999):

$$\text{Nyquist Kriterium} \quad 0,25 \cdot \frac{\lambda}{NA^2} \quad \text{Gleichung 1-1}$$

mit NA numerische Aperatur des Objektivs
 λ Wellenlänge des verwendeten Lichts, wobei $\lambda_{\text{ex}} \approx \lambda_{\text{em}}$

Optimal wäre eine mindestens zweifache Überabastung des berechneten Wertes. Hat ein Zellkern z. B. einen Durchmesser von $10 \mu\text{m}$, so errechnet sich bei einer durchschnittlichen Wellenlänge (600 nm) und einem Ölimmersionsobjektiv ($NA=1,4$) eine Nyquist-Kriterium von 542 nm . Um diesen Wert mindestens zweifach zu unterschreiten, sollten alle 250 nm ein lichtoptischer

Schnitt erfolgen. Bei dem erwähnten Durchmesser des Zellkerns wären das 40 Schnittebenen (Abb. 1-8). In dieser Arbeit wurde, sofern nicht anders angegeben, das Nyquist-Kriterium erfüllt und ein Schichtabstand von 250 nm gewählt.

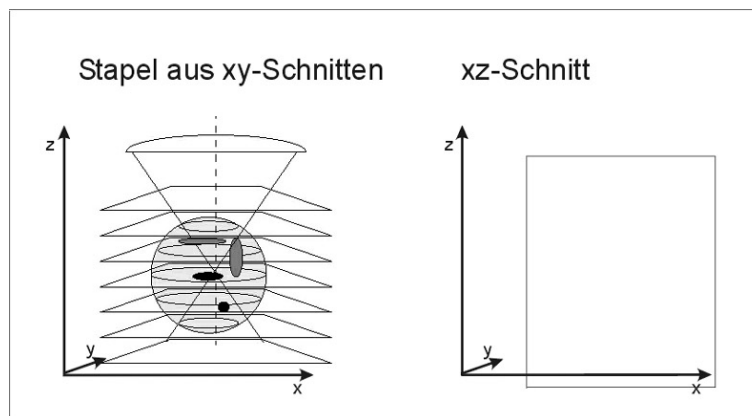


Abb. 1-8 *Bilddatenstapel aus xy-Schnitten in z-Richtung (links) und ein xz-Schnitt (rechts).*

Weil das Auflösungsvermögen des Weitfeldmikroskops schlechter ist als das des konfokalen, kommen dort zusätzlich Dekonvolutionsalgorithmen zur Anwendung. Die Theorie behauptet, dass damit eine Auflösungsverbesserung bis hin zu der eines konfokalen Mikroskops erreicht werden könne (Turner et al. 1994; Pawley 1995; Schaefer L. 1997; McNally et al. 1999; Scientific-Volume-Imaging 1999; T.I.L.L.-Photonics-GmbH 2001; Wallace et al. 2001). Damit würden sich die Eigenschaften zweier Geräte ergänzen: die breite Fluoreszenzpalette eines Epifluoreszenzmikroskops mit dem besseren Auflösungsvermögen eines konfokalen Mikroskops.

1.3.1 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wurde bereits im Jahre 1961 von Minsky beschrieben (Minsky 1961). In den letzten 20 Jahren wurden zahlreiche Weiterentwicklungen vollzogen (Cremer C. und Cremer T. 1978; Brakenhoff et al. 1979; Wijnaendts van Resandt et al. 1985; Stelzer E. und Wijnaendts van Resandt 1987) und Firmen vertreiben ihre Geräte mittlerweile in Serie. Es gibt zahlreiche Übersichtsartikel, Bücher und WWW-Seiten, die sich mit dem Thema „CLSM und biologische Anwendungen“ intensiv beschäftigen (Shotton und White 1989; Stelzer E. H. et al. 1991; Majlof und Forsgren 1993; Pawley 1995; Entwistle 2000; Robinson 2001; <http://128.40.242.20/ConfocalTheoryFramer1.htm>).

Unterschiede zum Weitfeldmikroskop

Der wichtigste Unterschied des CLSM zu einem Weitfeld-Mikroskop ist ein Photodetektor, der über eine verstellbare Lochblende, das Emissionslicht aufängt. Durch diese Vorrichtung wird das „out-of-focus“-Licht vermindert und so vor allem das Licht aus der fokalen Ebene ausgewertet.

Ein weiterer Unterschied ist die punktförmige und einheitliche Anregung durch einen Laser, z. B. Argon-Krypton-Laser mit den Linien 488 nm, 568 nm und 647 nm. Diese Kombination ermöglicht die Anregung von Fitc, Cy3 und Cy5. Spezielle Kurz-, Band- und Langpassfilter (Reichman 2000) selektieren das Licht, das zu den Photomultipliern gelangt.

Auflösung

Die laterale Auflösung (xy) eines konfokalen Systems beträgt etwa 200 nm (Höfers et al. 1993a; Robenek 1995). Dagegen ist die axiale Auflösung viel schlechter. Sie kann als „Full-Width at Half-Maximum“ (FWHM) eines Intensitätsprofils gemessen oder theoretisch berechnet werden und beträgt etwa 750 nm - 900 nm (Höfers et al. 1993a und Pawley 1995, dort Kap. 10). Das FWHM ist definiert als die Bandbreite in nm, bei der 50% der Lichtintensität transmittiert werden (Reichman 2000). Es ist ein Maß für die beidseitige Steigung einer Intensitätsfunktion (Abb. 1-9). Je kleiner der Wert, desto steiler das Intensitätsprofil, desto besser die Auflösung.

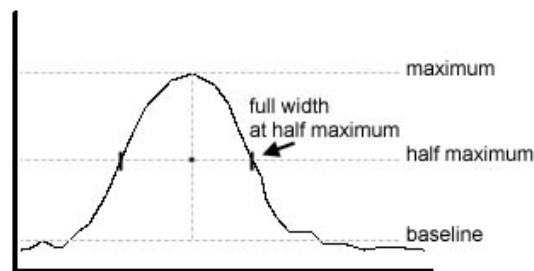


Abb. 1-9 *FWHM („Full-Width-Half-Maximum“) eines Intensitätsprofils gemessen an einem punktförmigen Objekt. Auf der x-Achse ist die Ortsinformation entlang einer Linie durch das punktförmige Objekt aufgetragen, auf der y-Achse die Fluoreszenzintensität.*

Signal zu Hintergrund

Die bei der Bildaufnahme detektierten Photonen unterliegen der Poissonstatistik. Man muss bei der Aufnahme daher dafür sorgen, möglichst viele Photonen für jeden Bildpunkt z. B. mit einem Photo-Multiplier einzufangen. Dies wird durch mehrfache Aufnahmen und Mitteln während einer konfokalen Aufnahme erzielt. Je öfter aufgenommen und gemittelt wird, desto besser wird das Signal-Rausch-Verhältnis. Allerdings setzt das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe diesem Verfahren praktische Grenzen.

Vorzüge eines CLSM

Die wichtigsten Konsequenzen, die sich aus der konfokalen Abbildung ergeben, können wie folgt zusammengefasst werden (Robenek 1995):

- Emittiertes Licht außerhalb des Laserfokus in der Objektebene wird unterdrückt
- Defokussierung erzeugt keine Unschärfe, sondern Ausblendung der Objektteile, die sich von der Brennebene entfernen. Das Bild des Objektes wird beim Defokussieren dunkel, bevor es unscharf wird. Man spricht daher vom „optischen Schneiden“

- Durch die punktförmige Beleuchtung kommt es zu einer Streulichtreduktion von benachbarten Strukturen

1.3.2 Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskopie

Die planare, großflächige Ausleuchtung und eine fehlende Lochblende sind entscheidend für die Sensitivität der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie und gleichzeitig das größte Problem bezüglich Auflösung und Ausdehnung in drei Dimensionen. Streulicht („out-of-focus light / -information“), vermindert den Kontrast und damit die Auflösung. Über 90% des Gesamtlichts sind „out-of-focus“ Information (Robenek 1995). Ein partieller konfokaler Effekt tritt allerdings ein, wenn man die Beleuchtungsblende so klein wie möglich macht (Hiraoka et al. 1990). Ein Vorteil gegenüber konfokalen Geräten ist die bessere Lichtausbeute und die CCD-Kamera, die viel sensitiver als ein Photomultiplier ist. Dadurch können Expositionszeiten herabgesetzt und Ausbleichen vermieden werden (Agard et al. 1989).

Erstellung einer PSF

Die Charakterisierung des Streulichts basiert auf dem 3D-Bild eines punktförmigen Objekts, der sogenannten PSF (**P**oint **S**pread **F**unction, siehe Abb. 3-6, S. 96). Die PSF eines konfokalen Mikroskops unterscheidet sich von einer Weitfeld-PSF, da sie speziell in z-Richtung viel enger ist (siehe Abb. 3-4 ,S. 93; Shaw und Rawlins 1991).

Für die Erstellung einer experimentellen PSF wird als punktförmige Quelle eine mit Fluorochromen beladene Kugel („bead“) verwendet. Sie sollte so klein wie möglich sein und unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops liegen. Jedoch sind solche „beads“ dann meistens schwierig zu sehen und bleichen zu schnell. Als Kompromiss sollte der „bead“-Durchmesser etwa $\frac{1}{3}$ der Auflösungsmöglichkeit des gewählten Objektivs entsprechen (McNally et al. 1999). Setzt man die Werte $NA = 1,4$ und durchschnittliches gelbes Licht (600 nm) in die Formel zur Berechnung der Auflösung ein (McNally et al. 1999), so bekommt man eine Auflösungsgrenze von $0,5 \mu\text{m}$. Der Durchmesser eines zu verwendenden „beads“ sollte folglich zwischen 175 nm und 500 nm betragen ($\sim \frac{1}{3} \times 0,5$).

Wenn alle Bildaufnahmebedingungen optimal erfüllt sind, kann durch Dekonvolution mit einer PSF die Auflösung in xy-, vor allem aber in z-Richtung erhöht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit einem Weitfeldfluoreszenzmikroskop der Fa. Leica ideale Aufnahmebedingungen zu erreichen und nach Dekonvolution die Auflösung der erhaltenen Bilder zu steigern.

1.3.3 Dekonvolution (Entfaltung)

Konvolution (Faltung) wird der Prozess genannt, dem das Bild eines Objektes unterworfen wird, wenn es durch die Optik eines Mikroskops aufgenommen wird (Agard et al. 1989). Sie ist abhängig von der Beleuchtung und allen Mik-

roskopkomponenten, die den Lichtweg kreuzen (Objektiv, Spiegel, Filter, Reflexionen innerhalb des Lichtweges, Einstellung der Lampe bzw. des Lasers, Pinhole, Kamera). Eine ideale Konvolution wird erreicht, wenn alle Komponenten optimal aufeinander abgestimmt sind und das Bild eines punktförmigen Objekts nur noch von der Wellenlänge und der numerischen Aperatur abhängt (van der Voort et al. 1989).

Vergleich konfokaler PSF mit Weitfeld-PSF

Ein Schnitt durch eine ideale PSF bzw. ihre fouriertransformierte Funktion, OTF (Object Transfer Function), kann zum anschaulichen Vergleich herangezogen werden (siehe Abb. 1-10). Sowohl die Weitfeld- als auch die konfokale OTF sind symmetrisch und ihr Ursprung liegt jeweils genau in der Mitte der Figur (die Achsen wurden zur besseren Sichtbarkeit aus ihrem Ursprung in der Bildmitte gerückt). Frequenzen, die nahe dem Ursprung der OTF liegen repräsentieren großflächigen Bildstrukturen und zunehmende Werte spiegeln kleinere Bildstrukturen wider (Heintzmann 1999). Man erkennt in der konfokalen OTF, dass vom Ursprung aus gesehen Frequenzen in alle Richtungen ansetzen, und dass die z-Ausdehnung etwa 2- bis 3-mal geringer ist als in xy. Bei der Weitfeld-OTF schnüren sich die Frequenzen in z-Richtung ein, was bedeutet, dass kleine Strukturen entlang der z-Achse verloren gehen. Man spricht hierbei vom „missing cone“. Der Grund dafür liegt in der gleichmäßigen Beleuchtung des Objekts bzw. der fehlenden Lochblende. Bei einer solchen Beleuchtung tritt beim Defokussieren ein Unschärfefeffer ein, ähnlich dem Verstellen des Entfernungsrings bei einer Kleinbildkamera. Alle Objekte verschwimmen ineinander und es sind nur noch großflächige Strukturen im Bild zu erkennen. Beim CLSM hingegen sorgen die punktförmige Anregung und die Lochblende dafür, dass es immer zu einem scharfen Bild kommt, gleichgültig in welcher Ebene man sich befindet.

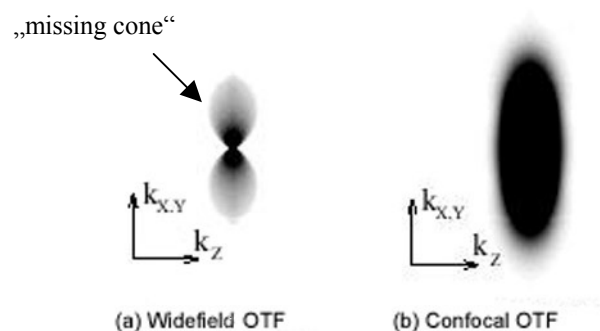


Abb. 1-10 OTF einer simulierten Linse. Die Achsen sind nur zur besseren Darstellung aus dem Zentrum der jeweiligen OTF herausgerückt worden, der Ursprung liegt eigentlich genau in der Mitte der jeweiligen Figur. Auf den „missing cone“ wird mit einem Pfeil hingewiesen. Leicht verändert aus Heintzmann (1999).

Zwischen einer mit den besten Objektiven ermittelten PSF und einer theoretisch berechneten PSF gibt es Differenzen. Dies liegt an den bereits genannten Faktoren des Mikroskopbaus. Mittels verschiedener Computeralgorithmen kann eine Umkehrung der Faltung für mikroskopische Bilder berechnet wer-

den. Dieser Prozess wird Dekonvolution genannt (Agard 1984; Conchello et al. 1997; McNally et al. 1999).

Für die Dekonvolution benötigt man, mit Ausnahme der sogenannten „blinden Dekonvolution“ (Holmes T. J. und O'Connor 2000), eine gemessene oder simulierte Abbildung eines „beads“, dessen geometrische Eigenschaften bekannt sind (McNally et al. 1999). Sie werden in exakt der gleichen Weise aufgenommen, wie das zu entfaltende Bild. In das Dekonvolutionsprogramm werden beide Bildstapel importiert. Im Fourierraum wird das zu entfaltende Bild durch die PSF dividiert und man erhält nach der Rücktransformation in den Ortsraum das entfaltetete Bild.

Unterschiede der Software

Für die Dekonvolution werden Softwarepakete von verschiedenen Firmen angeboten. Die Unterschiede in den Produkten liegen hauptsächlich in folgenden zwei Umständen (Scientific-Volume-Imaging 1999). Erstens, die oben genannte Division im Fourierraum liefert manchmal ein nicht definiertes Ergebnis durch eine Division durch Null und verschiedene Ansätze wurden in den einzelnen Programmen entwickelt, dies zu umgehen. Zweitens, die Dekonvolution benötigt zu Beginn ein virtuelles, ideales Bild des zu entfaltenden Bildes. Dieses wird aus dem importierten Bild geschätzt und dafür gibt es verschiedene Algorithmen. Die Differenz zwischen dem zu entfaltenden Bild und dem geschätzten wird intern in einem „Qualitätsfaktor“ ausgedrückt. Das Programm versucht in einem iterativen Prozess diesen Wert zu minimieren. Gibt es keinen solchen Faktor, muss die Anzahl der Iterationen empirisch herausgefunden werden.

Die Implementierungen können in folgende Kategorien eingeteilt werden:

- (1) Nearest Neighbor (Agard 1984)
- (2) Inverse Volumenfilterung: „Constrained Wiener Filter“ (Wallace et al. 2001), „Tikhonov Miller (ICTM)“ (Scientific-Volume-Imaging 1999), „Adaptive Inverse Modeling“ (T.I.L.L.-Photonics-GmbH 2001)
- (3) Eingeschränkt iterative Volumenfilterung: „Maximum Likelihood Estimation (MLE)“ (Holmes T. J 1988; Holmes T. J. und Liu 1991; Schaefer L. 1997; Conchello 1998; Heintzmann 1999; Scientific-Volume-Imaging 1999; Schaefer L. 2000), „Maximum Entropie“ (Skoglund et al. 1996), „Least Square“ (Schaefer L. 1997), „Jansson van Cittert“ (Schaefer L. 1997)
- (4) Blinde Dekonvolution (Holmes T. J. 1992; Holmes T. J. und O'Connor 2000)

Die in dieser Arbeit verwendeten Programme enthielten ausschließlich Algorithmen des Typs 2 und 3.

Qualitätskriterien

Es gibt Versuche, Gütefaktoren (Figures of Merit (FoM)) zu erstellen, bzw. durch Nebeneinanderstellung die entfalteteten Bilder zu vergleichen. Darunter befinden sich der Sichtbarkeitsindex von Linien, die Signalintensität betrachtet als FWHM oder das Signal-zu-Hintergrunds-Kriterium (Markham und Conchello 1997). Ein nützliches Kriterium ist die „Fehlerenergie“ (Holmes T. J 1988).

Um die Bildqualität bestimmter Objektfrequenzen zu beurteilen wurde dieser Faktor weiter modifiziert in den sogenannten „Relative energy regain“ (RER; Heintzmann 1999). Der berechnete Wert liegt bei „1“ für eine perfekte räumliche Rekonstruktion und ist „0“ für keine Veränderung zum Ursprungsbild. Artefakte können leicht erkannt werden, wenn der Graph in den negativen Bereich abrutscht (für eine genauere Beschreibung siehe Abb. 2-7 im Kapitel Material und Methoden, S. 71).

1.3.4 Klassifikation von Chromosomenterritorien

Um die Spezifität der Farbauflösung zu maximieren, wäre es wünschenswert für jede zu markierende Sonde auch ein eigenes Fluorochrom zu haben. Für die 24 menschlichen Chromosomen würden daher 24 Fluorochrome benötigt werden. Da derzeit nur acht Fluorochrome, die simultan verwendet werden können, verfügbar sind, behelf man sich mit kombinatorischen Ansätzen.

Die Fragestellung bei der Klassifikation von Vielfarbenbildern lässt sich grob wie folgt skizzieren:

Wünschenswert ist ein automatisiertes Auswertesystem, dem die Bilder aller aufgenommenen Kanäle übergeben werden können. Jeder Region, die in zwei oder mehr Kanälen überlappt, wird anhand des Markierungsschemas die Nummer eines bestimmten Chromosoms und eine falsche Farbe zugeordnet. Darüber hinaus soll es ein überwachter Prozess sein, das heißt es dürfen weder zuviel noch zuwenig klassifizierte Regionen auftreten. Dabei sollten die unterschiedlichen Intensitäten der Fluorochrommarkierungen Berücksichtigung finden.

Für diese Art von Klassifikationsproblem wurden verschiedenen Lösungen entwickelt. Die naheliegendste Möglichkeit war, für jeden Kanal einen optimalen Schwellwert zu finden und anschließend die Pixel anhand ihrer binären Farbinformation zu klassifizieren (Speicher et al. 1996). Dieser Ansatz erwies sich zunächst als nützlich bei Bildern von Metaphasespreitungen, jedoch zeigte sich, dass diese Methode oftmals zu keiner stabil reproduzierbaren Lösung führte, weil jeder Kanal unabhängig behandelt wurde und es zu Ringeffekten und Fragmentierungen kam. Für diese 2D-Bilder wurde das Programm *MCK* entwickelt, welches die genannten Schwachstellen überwand und in die Software *QFish* von Leica implementiert wurde (Eils et al. 1998). Eine Weiterentwicklung dieser Software führte zu *mfish3d*, das 3D-Bildstapel importieren und anhand der Kanäle und einem Markierungsschema klassifizieren kann.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ein erstes Ziel war die Herstellung eines SONDENSATZES zur Darstellung aller menschlichen Chromosomen, der keine störenden repetitiven Sequenzen mehr enthalten sollte. Die SHAC-Methode („selection of hybrids by affinity capture“; Craig et al. 1997) sollte im Rahmen der Dissertation weiter verbessert und auf alle menschlichen Painting Sonden angewendet werden. FISH

sollte damit ohne C₀t1-DNA möglich werden und die Signale ein besseres Signal- zu Hintergrund - Verhältnis liefern.

Daran anschließend stand die Etablierung einer 3D-Aufnahmetechnik für Vielfarben - FISH Experimente mit einem speziellen Fluoreszenzmikroskop. In der Interphase 3D fixierter Zellkerne sollte diese Methode eine gleichzeitige Visualisierung aller menschlicher Chromosomen erlauben. Die wesentliche Fragestellung hierbei war: Ist die bislang für Metaphasenpräparate etablierte Vielfarben - FISH - Methode auf den Zellkern übertragbar und kann eine territoriale Verteilung aller Chromosomen simultan nachgewiesen werden?

Die 3D-Positionen aller Chromosomen sollten in Form ihrer Schwerpunkte zeigen, ob eine nicht-zufällige Anordnung der Chromosomen im Zellkern vorliegt. Dabei ist die Art der Fixierung und Vorbehandlung der Zellen wichtig, damit nicht durch diese Schritte bedingte Artefakte die Verteilung verändern. Die Anwendung und Verbesserung einer 3D-Fixierung war daher ein weiteres Ziel.

Eine simultane Positionsbestimmung möglichst vieler (am besten aller 46) Chromosomen in einzelnen Fibroblastenkernen und Prometaphaserosetten sollte Erkenntnisse liefern, ob die kontrovers diskutierte nachbarschaftliche Anordnung der Chromosomen existiert oder nicht.

Da die Realisierung dieses Vorhabens zum großen Teil von den verfügbaren Mikroskopen abhing, wurden zwei Ansätze gewählt: M-FISH und ReFISH.

M-FISH

Obwohl konfokale Laser Scanning Mikroskope für die dreidimensionale Analyse von FISH-Experimenten vielfach verwendet werden, stand keines zur Verfügung, mit dem die Analyse aller für M-FISH benötigten Fluorochrome durchgeführt werden konnte. Deshalb sollte ein 3D-Vielfarben-FISH Verfahren auf der Basis eines Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskops entwickelt werden, das die Vorteile der engen Bandpassfilter und einer sensitiven CCD-Kamera mit einem steuerbaren Aufnahmemodus in z-Richtung verbindet. Die zur Steuerung und Bildaufnahme nötige Computersoftware sollte in Zusammenarbeit mit Leica Microsystems (Cambridge, UK) angepasst werden. Die schlechtere Auflösung sollte mit nachgeschalteten Dekonvolutionsprogrammen auf das Niveau konfokaler Bilder angehoben werden. Dazu sollten Dekonvolutionsalgorithmen von unterschiedlichen Firmen intensiv getestet werden. Ein parallel weiterentwickeltes Programm zur Klassifikation 3-dimensionaler M-FISH Bildstapel, *mfish3d*, sollte durch Testen der Einstellungsparameter für die Analyse der Zellkerne optimiert werden (Zusammenarbeit mit der Bioinformatik-Gruppe von R. Eils am DKFZ in Heidelberg).

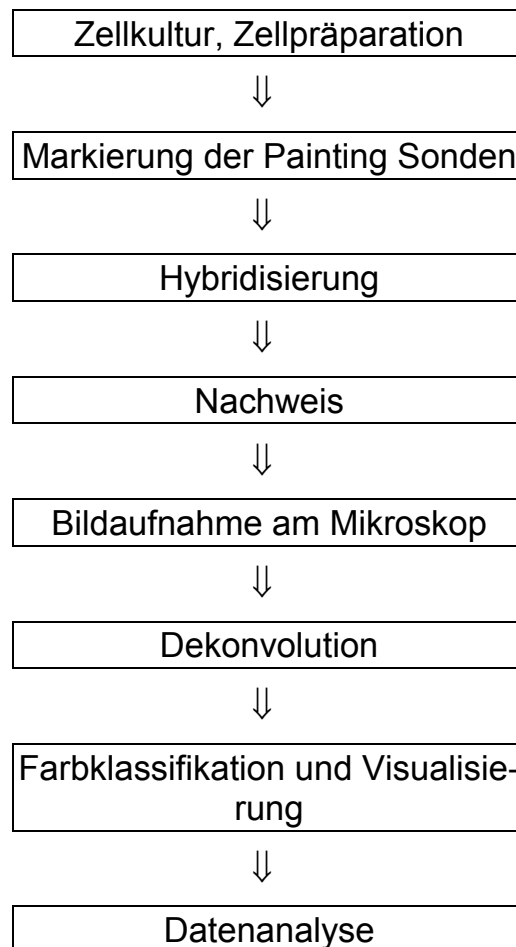
ReFISH

Unter ReFISH versteht man eine sequenzielle Hybridisierung zweier komplementärer Painting SONDENSÄTZE auf dasselbe Präparat. Es sollte ausgetestet werden, ob auf diesem Wege eine Analyse alle 24 Chromosomen mit einem konfokalen Mikroskop ebenfalls möglich wird.

2. MATERIAL UND METHODEN

Soweit nicht anders angegeben wurden Lösungen und Methoden nach Protokollen aus Maniatis et al. (1989) hergestellt bzw. durchgeführt. Bei der Verwendung von Kits wurde nach den entsprechenden Angaben des Herstellers verfahren. Es wurde bei Raumtemperatur gearbeitet, sofern nicht explizit eine andere Temperatur angegeben ist.

Der Ablauf der Experimente war schematisch folgender:



2.1 Chromosomen-, Zellpräparation und FISH Vorbehandlung

2.1.1 Zellkultur

Zur Anwendung kamen Standardtechniken der Zellkultur (z. B. Weatley und Wang 1998).

2.1.1.1 Fibroblasten

46, XY Fibroblasten wurden in der Kinderklinik der LMU München aus der Beschneidung männlicher Vorhaut gewonnen. Die Zellen wurden als karyotypisch unauffällig eingestuft. Sie wurden nach mechanischer Vereinzelung in Aliquots eingefroren und je nach Bedarf aufgetaut.

Nach dem raschen Auftauen der Zellen im 37°C Wasserbad wurden sie in ein Falconröhrchen mit 8 ml vorgewärmtem Vollmedium (DMEM, 10%FCS, 100 µg/ml Pen/Strep) überführt und bei 200g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in etwas Vollmedium resuspendiert. Danach wurden die Zellen in einer 50 ml Kulturflasche mit 8 ml Vollmedium für 3 - 4 Tage im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 80% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die adherent wachsenden Fibroblasten vom Flaschenboden abtrypsinisiert (1-2ml 0,05% Trypsin), mit 30 - 40 ml Medium aufgenommen und wuchsen wieder 3 - 4 Tage in einer 250 ml Kulturflasche bis zur Konfluenz.

Für die Herstellung mikroskopischer Präparate erfolgte die Anzucht der Zellen direkt auf Deckgläsern definierter Dicke ($1,7 \pm 0,01$ mm). Die Deckgläser wurden zuvor etwa 2 h in einem 1:1 Ethanol / Ether-Gemisch zur Entfettung gelagert und wurden anschließend abgeflammt. Dann wurden sie in sterile Quadriperm-Kammern gelegt und mit circa 4ml Vollmedium befüllt. In jede Kammer wurden 2 ml der Zellsuspension aus einer konfluenten Kultur gegeben und bis zur gewünschten Zelldichte mehrere Tage inkubiert.

2.1.1.2 Periphere Blutlymphozyten

Periphere Blutlymphozyten können direkt aus dem Blut isoliert werden und befinden sich bei gesunden Spendern in der G₀-Phase (Tashiro et al. 1996). Im Gegensatz zu den adhären wachsenden Fibroblasten musste man bei den Lymphozyten die Anheftung auf den Deckgläsern künstlich erzwingen. Hierfür wurden mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen verwendet. Die stark basischen, positiv geladenen Seitenketten dieser Aminosäure treten mit den carboxy-terminalen, negativ geladenen Proteinenden auf der Zelloberfläche in Kontakt, so dass die Zellen aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen auf dem Deckglas haften bleiben.

Venöses Blut freiwilliger Spender wurde abgenommen und sofort in ein heparinisierendes Falconröhrchen überführt, um eine Gerinnung zu vermeiden. Das Blut war so mehrere Stunden haltbar. Es wurde anschließend 1:1 mit HANKS-Lösung (Gibco, BRL) verdünnt. Die Auftrennung der unterschiedlichen Blutbestandteile (Plasma, Erythrozyten, Leukozyten) erfolgte mit Hilfe von Ficoll® (Amersham Pharmacia) in einer Dichtegradientenzentrifugation: 7,5 ml vorgewärmtes Ficoll® wurde in ein 50ml Falconröhrchen überführt und mit 14,5 ml Blut vorsichtig überschichtet, so dass zwei getrennte Phasen entstanden. Nach der Zentrifugation (35 – 40 min, 300g, RT) wurde die oberste Schicht (Plasma) abgenommen und verworfen. Die darauffolgende, gelblich-trübe Schicht („buffy coat“) enthielt die Leukozyten, betrug circa 3 ml und wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Für deren Isolierung erwiesen sich 50 ml Falconröhrchen mit einem fest eingebauten Filter als praktisch, da sie die Ficoll®-Überschichtung mit Blut und die nachfolgende Schichtabnahme erleichterten und durch die klare Auftrennung die Ausbeute erhöhten. Zur Entfernung von restlichem Ficoll® wurde mit einer dreifachen Menge an HANKS-Lösung gewaschen und die Zellen anschließend pelletiert (10 min, 200g, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in 6 - 8 ml HANKS-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Überstandabnahme wurden die Zellen in 1 - 1,5 ml RPMI 1640 / FCS (1:1) - Gemisch resuspendiert.

Die gewonnenen Lymphozyten wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen aufgebracht. Während einer Inkubation von 30 min bei 37°C setzten die Lymphozyten sich darauf fest. Danach erfolgte eine kurze hypotone Behandlung mit 0,25× PBS für exakt 1 min 50 s und eine sofortige Fixierung in 4% PFA / 0,25× PBS.

2.1.2 Auswertung im FACScan

Zellen einer Kulturflasche wurde abtrypsinisiert, kurz in PBS gewaschen und 10 min mit 4% Formaldehyd / PBS fixiert. Nach einer 10 minütigen Inkubation in Propidiumjodid-Lösung (PBS, 0,1% Triton-X-100, 50 µg / ml Propidiumjodid) wurden die Zellen in PBS / 0,1% NaN₃ bis zur Verwendung aufbewahrt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten im Eppendorfgefäß, 3 min bei 500g und 4°C. Propidiumjodid färbt DNA und RNA in fixierten Zellen an und emittiert Licht bei 617 nm (entspricht etwa Tritc oder Cy3.5, siehe 2.2.3, S. 54).

Zur Quantifizierung der Fluoreszenz wurden jeweils 10000 Einzelzellen im FACScan gemessen und mit der Software CellQuest™ Version 3.1f (Becton Dickinson) ausgewertet, um ihre Zellzyklusphase (G1, S oder G2) zu bestimmen.

2.1.3 Chromosomenpräparation

Die Standardtechnik der Chromosomenpräparation ist unter anderem beschrieben in Lichter et al. (1991) oder in <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/FISHguide.html>.

Frisches, heparinisiertes Vollblut wurde in einem Falconröhrchen 10 min bei 200g abzentrifugiert. Die Leukozytenschicht, die zwischen Plasma (oben) und Erythrozytenschicht (unten) lag, wurde abgenommen, auf zwei 50 ml Kulturflaschen mit 15ml Komplettmedium RPMI 1640 (Gibco, BRL) und 0,5 ml PHA verteilt und 72 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) vermehrt. Nach einer 40 minütigen Inkubation mit Colcemid [10 µg / ml], erfolgte eine hypotone Behandlung mit 0,56%-iger KCl-Lösung, wahlweise auch mit einer 0,8%-igen Natriumcitrat-Lösung. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren (10 min, 200g) bis auf etwa 0,5 ml abgenommen und verworfen, der Rest sorgfältig resuspendiert. Es erfolgte tropfenweise und unter vorsichtigem Schütteln die Zugabe von 10 ml Hypotonielösung. Daran schloss sich eine Inkubation für 20 min bei 37°C an. Danach wurde abzentrifugiert (10 min, 200g), der Überstand wurde wieder bis auf etwa 0,5 ml abgenommen und das Pellet resuspendiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch tropfenweise Zugabe 10 ml eiskalten Fixatives (MAA, Methanol / Eisessig 3:1) unter vorsichtigem Schütteln. Wieder wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und der Rest resuspendiert. Die letzten beiden Schritte wurden als Waschschriffe mindestens drei mal wiederholt.

Die Zellsuspension wurde auf mit Ethanol (100%) gereinigte und mit destilliertem Wasser gewaschene OT getropft. Die Präparate wurden in 70% EtOH bei 4°C gelagert.

2.1.4 Zellpräparation für 3D-FISH

Wollte man die 3-dimensionale Struktur des Zellkerns erhalten, wurde dafür eine Fixierung mit einer wässrigen Paraformaldehydlösung (4% PFA in 1 x PBS, pH 7,0, 10 min, RT) und anschließender Behandlung mit flüssigen N₂ („freeze-thawing-cycles“) angewandt. Diese Technik ist Teil einer als „3D-FISH“ veröffentlichten Technik (Solovei et al. 2002b). Dabei war ein Austrocknen des Präparates unter allen Umständen zu vermeiden, da sonst Schrumpfungartefakte entstehen konnten. Ebenso wurde ausschließlich mit isotonen wässrigen Lösungen gearbeitet. Das Protokoll diente gleichzeitig auch zur Permeabilisierung der Zellen und der Zellkerne (Tab. 2-1).

Nach der Fixierung (s. o.) wurden die Deckgläser in einer 0,5% Saponin / 0,5% Triton X100-Lösung in PBS 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Präparate für mindestens 30 min in 20% Glycerinlösung gestellt. Die Deckgläser wurden mit einer Pinzette vorsichtig 10 s in flüssigen Stickstoff getaucht und danach in das Glycerin zurückgestellt. Dieser Vorgang wurde 4 - 5 mal wiederholt. Zur weiteren Entfernung von Proteinen erfolgte danach eine Inkubation für 5 min in 0,1 N HCl. Die Zellen wurden zwei mal 5 min in 2 x SSC äquilibriert. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in 50% Formamid / 2xSSC (pH 7) im Kühlschrank. Es schlossen sich die DNA-Denaturierung und alle weiteren Hybridisierungsschritte an.

Schritt	Behandlung
1. Zellen auf Deckgläschen wachsen lassen	
2. Fixierung	4% Paraformaldehyd in PBS
3. Permeabilisierung der Zell-/Kernmembran	Inkubation in 0,5% Saponin / 0,5% Triton X100 in PBS
4. Ermöglichung der Sondenpenetration durch Zytoplasmaentfernung	Inkubation in 20% Glycerin in PBS und anschließend in flüssigem N ₂
5. Proteinentfernung	Inkubation in 0,1N HCl
6. DNA Denaturierung	Erhitzung auf 75°C in 50% Formamid
7. Hybridisierung	Inkubation bei 37°C für 1-3 Tage
8. Entfernung unspezifisch gebundener Sonden	Waschen in 0,1x SSC bei 60°C
9. Visualisierung der Hybrid-DNA	Nachweis der Haptene (bio, dig), Eindeckeln in Antifade-Medium, Mikroskopie

Tab. 2-1 Gesamte 3D-FISH Prozedur mit allen Schritten von der Zellkultur bis zur Mikroskopie.

2.1.5 Vorbehandlung der Präparate

RNAse- und Pepsinbehandlung dienen der Beseitigung störender Hintergrundsignale (Lengauer et al. 1992). Das Pepsin verdaut Cytoplasmareste auf dem Präparat, welche später vor allem beim indirekten Nachweis Bio- und Dig-markierter Sonden stören. Chromosomen- und Zellpräparate wurden gleichermaßen behandelt: Die Präparate wurden 5 min in 1x PBS äquilibriert und kurz mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Pepsinbehandlung selbst (50 mg / ml Pepsin in 0,01N HCl, pH 2) erfolgte 2 - 10 min bei 37°C. Der Erfolg wurde am Mikroskop kontrolliert und eventuell musste nachverdaut werden. Zum Stoppen der Reaktion wurde 2 mal 5 min in 1x PBS gewaschen.

2.2 Zusammensetzung der DNA SONDENSÄTZE

Die unterschiedlichen Möglichkeiten, Sonden kombinatorisch so zu markieren, so dass sie später eindeutig detektiert werden können, sind vielfältig. Z. B. hat man mit der Einfach-, Zweifach- und Dreifachkombination von 5 Fluorochromen die Möglichkeit 31 Sonden unterschiedlich zu markieren. Wie wurden die besten Kombinationen ausgewählt? Nicht jedes Markierungsschema war gleich gut geeignet und es galt, die Kriterien der Farbauflösung so gut wie möglich zu beachten. Allgemein verbessert sich die Farbauflösung, wenn alle Chromosomen mit der gleichen Anzahl an Fluorochromen markiert sind (Azofeifa et al. 2000). So konnte z. B. der klassische 5 Fluor M-FISH Mix (Speicher et al. 1996), mit dem kein durchgreifender Erfolg hinsichtlich 3D-FISH gelungen war, durch den neuen 7 Fluor Mix (Azofeifa et al. 2000) ersetzt und die farbliche Differenzierung entscheidend verbessert werden.

2.2.1 Farbspezifität

Grundsätzlich kann man die Anzahl aller möglichen Kombinationen bestimmter Fluorochrome mit einer einfachen Formel bestimmen (Gleichung 2-1, Speicher et al. 1996).

$$x = 2^n - 1$$

Gleichung 2-1

mit x Anzahl möglicher Kombinationen
n Anzahl Fluorochrome

Mit den drei Standard-Fluorochromen ist es folglich nicht möglich, mehr als 7 Sonden kombinatorisch zu markieren. Mit vier Fluorochromen beträgt das Ergebnis 15, mit fünf 31. Um alle 24 menschlichen Painting Sonden in einer eindeutigen, kombinatorischen Weise zu markieren, müssen mindestens fünf verschiedene Fluorochrome zur Verfügung stehen.

Um die Spezifität im Sinne der Farbauflösung zu maximieren, wäre es wünschenswert für jede zu markierende Sonde ein eigenes Fluorochrom zu haben. Da dies beim Stand der Technik unrealistisch ist, behilft man sich mit kombinatorischen Ansätzen. Dabei spielt das Markierungsschema eine entscheidende Rolle. Z. B. hat man mit drei Fluorochromen dreimal die Möglichkeit der Einermarkierung, dreimal die der Zweiermarkierung und einmal die einer Dreiermarkierung. Bei 5 Fluorochromen und 24 zu markierenden Sonden kann die Dreiermarkierung nicht vermieden werden, es sollte aber ihre Anzahl minimiert werden. Möchte man z. B. nur Zweiermarkierungen in seinem Markierungsschema verwenden, so errechnet sich ihre Anzahl in Abhängigkeit von den vorhandenen Fluorochromen nach Gleichung 2-2.

$$x = \frac{n \cdot (n - 1)}{2}$$

Gleichung 2-2

mit x Anzahl möglicher Kombinationen
n Anzahl Fluorochrome

Mit fünf Fluorochromen sind 10 Zweiermarkierungen möglich, mit sieben 21 und mit acht 28. Erhöht man die Anzahl der Fluorochrome weiter, so kann auf immer mehr Simultanmarkierungen verzichtet werden. Deshalb wurde im Laufe der Arbeit das Markierungsschema auf sieben Fluorochrome umgestellt. Acht wären ideal gewesen, dies war jedoch aufgrund technischer Gegebenheiten (Filterrad) nicht möglich.

Man kann die Sensitivität zweier einzelner Markierungsschemata mit der Gleichung 2-3 für die Farbauflösung („color discrimination efficiency“) berechnen (Saracoglu 2001; Saracoglu et al. 2001). Dieser Wert entspricht anschaulich dem Winkel zwischen zwei Farbvektoren (Abb. 2-8, S. 73 und Abb. 2-9, S. 73).

$$f = \frac{N(A \cap B)}{\sqrt{N(A)} \cdot \sqrt{N(B)}} \quad \text{Gleichung 2-3}$$

mit f Farbauflösung (color discrimination efficiency)
 $N(A \cap B)$ Anzahl gemeinsamer Markierungen
 $N(A)$ Anzahl Labels A
 $N(B)$ Anzahl Labels B

Der beste zu erreichende Wert beträgt 0, wenn das Schema keine gemeinsamen Kombinationen enthält, der schlechteste Wert 1. Zwei Painting Sonden könnten beispielsweise bei drei Fluorochromen entweder mit einer Zweifach- und einer Dreifach-Kombination A $\{1,1,0\}$ und $\{1,1,1\}$ oder nur mit Zweifach-Kombinationen B $\{1,1,0\}$ und $\{0,1,1\}$ markiert sein. Der Wert für A beträgt $f = \frac{2}{(\sqrt{2}\sqrt{3})} = 0,816$, der für B $f = \frac{1}{(\sqrt{2}\sqrt{2})} = 0,5$ und ist damit etwa 40% besser als A.

Ein weiteres Beispiel mit 5 Fluorochromen: Zwei Sonden sind im Schema A mit $\{1,1,1,1,0\}$ und $\{1,1,1,0,0\}$ markiert, im Schema B mit $\{1,1,1,0,0\}$ und $\{1,1,0,0,0\}$. Obwohl die jeweils zweite Sonde in beiden Fällen eine Kombination weniger enthält, ist die Farbdiskriminierung im Falle $f(B) = \frac{2}{(\sqrt{3}\sqrt{2})} = 0,816$ besser als im Fall $f(A) = \frac{3}{(\sqrt{4}\sqrt{3})} = 0,866$, wenn auch nicht viel (6%). Der kritische Faktor liegt hier offensichtlich an der Zahl gemeinsamer Markierungen.

Der Grenzfall („worst case“) für ein komplettes Markierungsschema (z. B. Tab. 2-2) kann mit Gleichung 2-4 bestimmt werden (Saracoglu 2001).

$$f_{\text{worst}} = \sqrt{\frac{(m-1)}{m}} \quad \text{Gleichung 2-4}$$

mit f_{worst} schlechteste Farbauflösung in einem kompletten Markierungsschema
 m Maximum($N(A \cap B)$)
 $N(A \cap B)$ Anzahl gemeinsamer Markierungen

Beispielsweise ist der Wert für ein kombinatorisches 3-Fluor-Markierungsschema, bei dem alle Einfach-, Zweifach- und Dreifach-Markierungen ausgenutzt wurden $f_{\text{worst}} = \sqrt{\frac{2}{3}} = 0,81$. Lässt man die Dreifach-Kombination allerdings komplett weg, ergibt sich ein besserer Wert $f_{\text{worst}} = \sqrt{\frac{1}{2}} = 0,7$. Das ist 14% besser.

Genau den gleichen Abstand ergibt die Berechnung zwischen dem „klassischen“ 5 Fluor Mix (Speicher et al. 1996) und dem neuen 7 Fluor Mix (Azofeifa et al. 2000, siehe auch Tab. 2-2), weil auch hier schlechtere Dreierkombinationen durch maximal Zweierkombination ersetzt wurden.

Fazit, die Farbauflösung steigt mit der Anzahl der Fluorochrome und der Verminderung an Fluorochromkombinationen. Eine ausführlichere Diskussion zum Thema Auflösung und Genauigkeit bei Klassifikationen von M-FISH Bildern findet sich in Garini et al. (1999), Azofeifa et al. (2000), Castleman et al. (2000) und Saracoglu et al. (2001).

2.2.2 Übersicht über die verwendeten SONDENSÄTZE und Markierungen

2.2.2.1 Painting Sonden

Als Sonden dienten chromosomen-spezifische DNA-Bibliotheken, sogenannte Painting Sonden, die als Hybridisierungssonden markiert, eingesetzt werden konnten. Sie wurden entweder durch Mikrodissektion einzelner Chromosomen von Metaphasespreitungen (Guan et al. 1994; Guan et al. 1996), oder mithilfe eines Durchflusszytometers (Telenius et al. 1992b) hergestellt. Erstere wurden von Prof. J. Trent (NIH, Bethesda, US), letztere von Dr. Stefan Müller (am Lehrstuhl von Prof. M. Ferguson-Smith, Cambridge, UK, jetzt LMU München) zur Verfügung gestellt.

2.2.2.2 M-FISH

Für M-FISH wurde eine Sondenmarkierung in kombinatorischer Weise nach eigenen Protokollen und einem speziellen Markierungsschema vorgenommen (Speicher et al. 1996; Speicher und Ward 1996; Eils et al. 1998). Zwei solcher Markierungsschemata sind als Beispiele in Tab. 2-2 gezeigt: in (a) das des klassischen 5 Fluorochrom Ansatzes (Speicher et al. 1996) und in (b) das des neuen 7 Fluorochrom Ansatzes, in dem vor allem Zweiermarkierungen vorherrschen (Azofeifa et al. 2000).

Alle Painting Sonden, die nach dem Markierungsschema mit demselben Fluorochrom markiert werden sollten, wurden in einem Pool zusammengefasst. Hierbei wurde die Menge der einzelnen Chromosomenbibliotheken so angepasst, dass eine möglichst gleichmäßige Anfärbung aller Chromosomen erfolgte. Daraus ergaben sich Pools entsprechend der Anzahl der Fluorochrome. Im 5 Fluorochrom Mix (Tab. 2-2 a) wurde die Markierung der Pools mit Cy3.5 sowie Cy5.5 indirekt über Biotin bzw. Digoxigenin vorgenommen. In dem 7 Fluorochrom Mix (Tab. 2-2 b) wurde Biotin mit Avidin-Cy5.5 und Digoxigenin mit Cy7 nachgewiesen.

(a)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	
Fitc	x			x		x		x	x		x		x			x		x			x			x	
Cy3			x		x			x	x		x		x		x				x	x			x	x	
Cy3.5	x		x	x				x		x	x				x		x		x						x
Cy5	x				x	x	x	x				x		x	x	x								x	
Cy5.5		x	x		x	x			x	x		x											x		x

(b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	
Deac	x					x				x			x			x								x	
Sg	x			x	x		x											x	x		x				
Cy3			x			x		x			x				x			x		x					
Cy3.5			x	x					x	x							x						x		x
Cy5		x										x	x		x		x					x			
Cy5.5		x					x		x		x			x		x									
Cy7					x			x				x		x									x		x

Tab. 2-2 Markierungsschemata zweier M-FISH Ansätze. (a) Klassischer 5 Fluorochrom M-FISH Mix. (b) 7 Fluorochrom M-FISH Ansatz mit ausschließlich Zweierkombinationen (Ausnahmen 19, 20 und Y: Einfachmarkierungen). Zur Nomenklatur der Fluorochrome siehe Tab. 2-4, S. 54.

2.2.2.3 Abreicherung repetitiver Elemente in Painting Sonden („Repeat Depletion“)

Die hier beschriebene Methode wurde im Lauf der Dissertation entwickelt und veröffentlicht (Bolzer et al. 1999). Das Prinzip ist in Abb. 2-1 dargestellt.

Vorbereitung der Painting Sonden für die negative Selektion und Affinitätschromatographie

In einem ersten Schritt wurde die Original-DNA mittels DOP-PCR (S. 54) amplifiziert. In einer zweiten Amplifikation kam die stringente CTA4-PCR zur Anwendung (Craig et al. 1997), in die etwa 100 ng des DOP-PCR Produkts eingesetzt wurden. Die Unterschiede zwischen den beiden PCRs liegen in der Verwendung eines nicht degenerierten Primers CTA4 (5'-CTA CTA CTA CTA CCG ACT CGA G-3') und in einem modifizierten PCR-Programm. Die einzelnen PCR-Programme sind in Tab. 2-5 (S. 55) dargestellt.

Die PCR-Produkte wurden entweder mit Sephadex G50 Säulen oder mit kommerziell erhältlichen BioGel P6 Säulen (BioRad) gereinigt und der Erfolg auf einem 1% Agarosegel überprüft. Die so gewonnenen CTA4-PCR Amplifikationsprodukte waren bereit für die negative Selektion und anschließende Affinitätschromatographie.

Markierung der C₀t-1 DNA mit Biotin

25 µg C₀t-1-DNA (GIBCO BRL) wurden mit dem Biotin-Chem-Link Kit (Boehringer Mannheim) markiert. Biotinylierte Reaktionsprodukte wurden mit Sephadex G50 Säulen oder mit kommerziell erhältlichen BioGel P6 Säulen (BioRad)

(BioRad) gereinigt und werden im weiteren Text „bC₀t1-DNA“ bezeichnet. Die Konzentration wurde auf 250 ng / µl eingestellt.

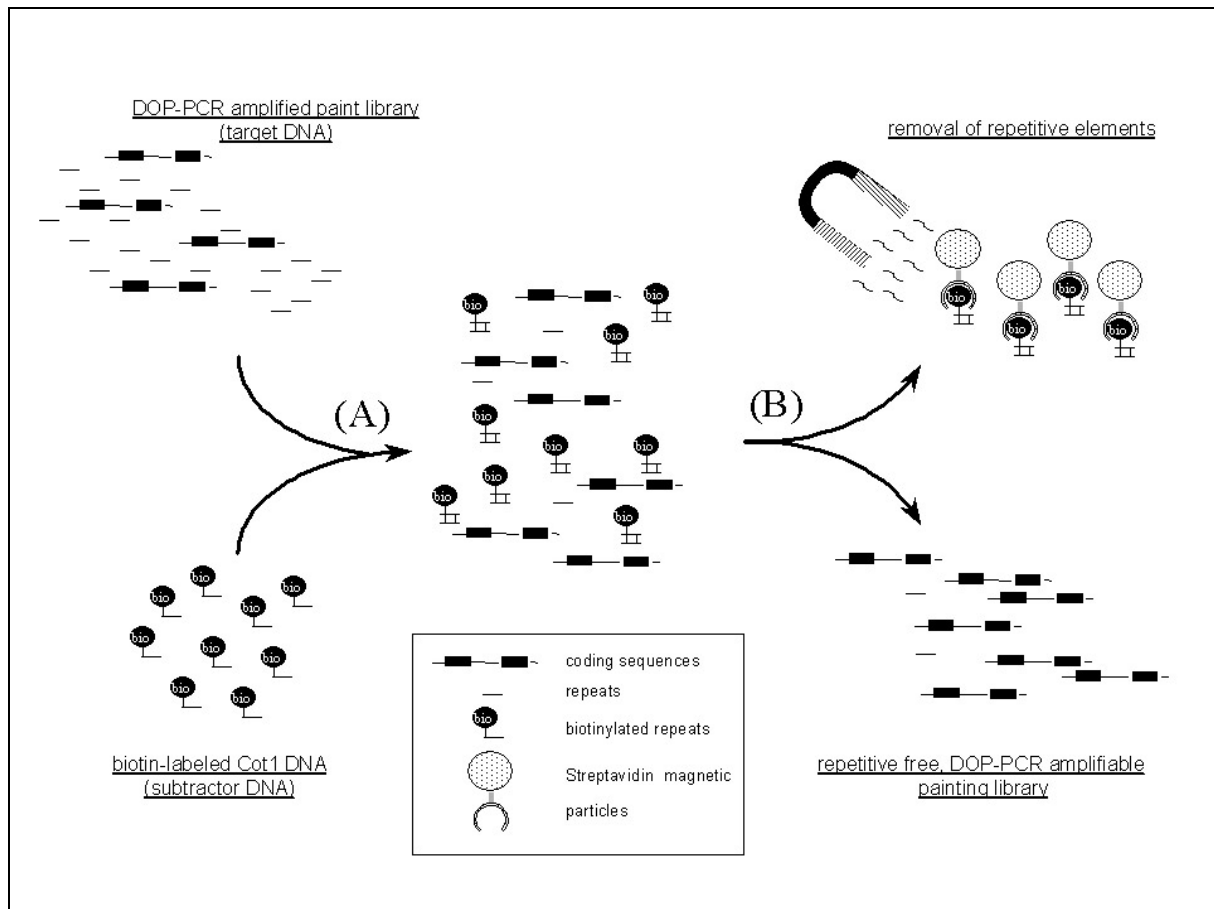


Abb. 2-1 Prinzip der Abreicherung repetitiver Elemente durch (A) subtraktive Hybridisierung mit (B) anschließender Affinitätschromatographie (SHAC). Details siehe Text.

Selektive Hybridisierung und Affinitätschromatographie

Das bei Craig et al. (1997) beschriebene Verfahren wurde weiter modifiziert und, soweit nicht anders angegeben, zwei Subtraktionsrunden pro Painting Sonde durchgeführt. Aus jeder Painting Sonde wurden zuerst repetitive Sequenzen mit Hilfe von bC₀t1-DNA als Subtraktor DNA entfernt.

Erste Subtraktionsrunde: 200 ng CTA4-PCR Produkt war die Ausgangsmenge, die mit einem 25-fachen Überschuss Subtraktor DNA in 2× SSC in einem Endvolumen von 30 µl vermischt wurde. Die DNA wurde 10 min bei 95°C denaturiert, anschließend für 5 min auf Eis gestellt und schließlich 4 - 5 h bei 37°C hybridisiert. Dieser Schritt sollte die hoch-repetitiven Sequenzen einfangen. Streptavidin-Eisenkügelchen (Roche) wurden nach Anleitung gewaschen und zusammen mit der fertig hybridisierten DNA 30 min bei 37°C auf einem Thermoschüttler (Eppendorf) mit axialer Rotation inkubiert. Im Anschluss wurden die Kügelchen mit einem Magneten an der Gefäßwand festgehalten, während der Überstand in ein neues Gefäß pipettiert wurde. Dies wurde mit neuen Kügelchen wiederholt. Es erfolgte eine Reinigung und Konzentration der DNA

mit Microspin Säulchen (Genomed Jetquick oder Qiagen QIAquick) und die Eluierung erfolgte in einem Volumen von 30 µl 10mM Tris-HCl (pH8).

Zweite Subtraktionsrunde: Die aus der ersten Runde vorliegende Lösung wurde als Start-DNA für die nächste Depletionrunde verwendet. Wieder wurde ein 25-facher Überschuss C_0t_1 -DNA zugegeben und die Sonde wie oben denaturiert. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 62°C durchgeführt. Die höhere Temperatur wurde empirisch ermittelt und sorgte dafür, daß mittel-repetitive Sequenzen hybridisierten. Es schloss sich eine Affinitätschromatographie an, genau wie nach der ersten Runde. Die Lösung wurde wieder gereinigt und konzentriert, so dass die resultierenden 30 µl die subtrahierte DNA enthielt. Das gesamte Volumen wurde in eine CTA4-PCR eingesetzt. Auf dem anschließenden Agarosegel konnte meist noch kein Produkt gesehen werden, weshalb eine zweite CTA4-PCR mit 9 µl aus der ersten PCR als DNA-Vorlage notwendig war. In der Regel wurde die DNA in diesem Schritt auch gleich mit einem Fluorochrom oder Hapten markiert (S. 55).

Zusätzliche Subtraktionsrunden waren nur dann nötig, wenn die Hybridisierung der „repeat depleted“ Sonde auf Metaphasechromosomen noch Kreuzhybridisierungen zeigte. Abhängig davon wurde dann eine andere Subtraktor DNA verwendet, wie im folgenden beschrieben wird. Dies war notwendig für die Chromosomen 1, 3, 12, 14, 18, 19, 22, und X. All diese Sonden außer 22 wurden einer weitergehenden Subtraktion mit einer alphoiden DNA unterworfen. Die α -Satelliten hierfür wurden mit einer speziellen alphoiden PCR gewonnen (Dunham et al. 1992). Mithilfe dieses PCR Protokolls wurden für jedes der Chromosomen 1, 3, 12, 18, 19, und X Centromer-spezifische, repetitive Sonden hergestellt. Diese bekamen die Bezeichnung „ $\alpha\text{Chr}\#\#$ DNA“. Im Ganzen kam es zu speziellen Subtraktionsrunden mit den folgenden Quellen als Subtraktor-DNA: pUC1.77 und α -Chr. 1-DNA für Chromosom 1; α -Chr. 3-DNA für Chr. 3; α -Chr. 12-DNA für Chr. 12; Chr. 14 Painting Sonde für Chr. 14; α -Chr. 18-DNA für Chr. 18; α -Chr. 19-DNA für Chr. 19; chromosomale Painting Sonden 14 und 19 für Chr. 22; α -Chr. X-DNA für Chr. X.

Herstellung der Sondenpools für M-FISH

Als Test, ob die neuen „repeat depleted“ Painting Sonden auch in komplexen DNA-Gemischen optimal und ohne Kreuzhybridisierung funktionieren, wurden M-FISH Experimente durchgeführt. Dazu wurden die Sonden für jedes Fluorochrom in Pools vereinigt (Tab. 2-2 a, S. 49). Die Sondenmarkierung und Hybridisierung erfolgte wie in den Kapiteln 2.2.4.1 (S. 55) und 2.3 (S. 57) beschrieben, lediglich die DNA-Fällung erfolgte ohne C_0t_1 -DNA.

Southern Blot und Hybridisierung

Southern Blot und die anschließende Hybridisierung wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Maniatis et al. 1989). C_0t_1 -DNA wurde mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP durch „random primed labeling“ markiert und danach über Sephadex G50 Säulen gereinigt. Von den PCR-amplifizierten Painting Sonden wurden 10 µg auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Dieses wurde anschließend de-

naturiert und neutralisiert. Die DNA wurde mittels alkalischem Kapillarblot auf eine Nylonmembran (Pall) übertragen und für 30 min bei 80°C fixiert. Nach Rehydrierung und Prähybridisierung wurde über Nacht bei 65°C hybridisiert. Die Membran wurde je einmal in 2× SSC, 0,1% SDS bei 37°C, 0,5× SSC, 0,1% SDS bei 37°C, 0,1× SSC, 0,1% SDS bei 37°C und 0,1× SSC, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Die Filter wurden etwa 4 h bei -70°C auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Ergebnisse werden in Kapitel 3.1.2 (S. 87) besprochen.

2.2.2.4 ReFISH

Das Prinzip von ReFISH wurde bereits in Kapitel 1.2.2 (S. 28) erläutert. Der Vorzug dieses Ansatzes war die Anwendbarkeit mit einem konfokalen Mikroskop, da nur die 3 Standard-Fluorochrome genutzt wurden.

Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben (S. 32) präpariert und Painting Sonden entsprechend Tab. 2-3 (a) oder (b) via Markierungs-PCR (S. 55) markiert. Nach der Hybridisierung des Mixes H1 wurden die Präparate gewaschen und nachgewiesen (S. 57), wobei die Fluorochrome SpektrumGreen (entspricht Fitc), Tamra (Cy3) und Cy5 zum Einsatz kamen, letzteres indirekt über das Biotin-Avidin-System. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt und mit dem Antifade Phenylendiamin eingedeckelt. Konfokale Aufnahmen wurden mit einem LSM 410 (Zeiss, Göttingen) durchgeführt. Die xy-Koordinaten der aufgenommenen Zellen auf dem Kreuztisch des Mikroskops wurden bestimmt, damit sie später auf dem Objektträger wiedergefunden werden konnten. Die Kerne wurden mit 20 - 40 Ebenen aufgenommen und abgespeichert. Danach wurden die Objektträger so lang in 4× SSC / Tween (SSCT) gespült, bis sich das Deckglas und das Antifade vorsichtig ablöste. Die Zellen wurden in 4× SSCT gewaschen, mit 4% Formaldehyd nachfixiert und in einer Lösung aus 70% FA / 2× SSC bei 75°C erneut denaturiert. Wie aus Vortests bekannt, wurde H1 damit vollständig entfernt. Das Präparat war bereit für die 2. Hybridisierung (H2). Sie wurde im Anschluss daran durchgeführt. Nach dem erneuten Nachweis, der Gegenfärbung und der Montage auf einem Objektträger wurde die Zellen im konfokalen Mikroskop mithilfe des Kreuztisches wiedergefunden. Ein weiteres mal wurden die Zellen aufgenommen.

In einer Experimentserie stellte sich heraus, dass am Ende noch Signale aus H1 sichtbar waren. In diesem Fall konnte der entsprechende Cy5-Kanal nicht verwendet werden, weil keine Eindeutigkeit mehr gegeben war und die Anzahl detektierbarer Chromosomen reduzierte sich auf elf (Tab. 2-3 c).

(a)

	Pool	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
H1	1.1			x				x	x	x				x			x			x	x		x		
	1.2							x	x		x				x			x		x		x		x	
	1.3											x				x			x		x	x			x
H2	2.1	x	x					x					x	x	x	x							x		
	2.2	x		x		x			x	x	x	x												x	
	2.3			x	x		x						x					x	x						

(b)

	Pool	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
H1	1.1			x	x		x						x					x	x						
	1.2	x		x		x			x	x	x	x											x		
	1.3	x	x					x					x	x	x	x							x		
H2	2.1											x				x			x		x	x			x
	2.2							x	x		x				x			x		x		x		x	
	2.3			x				x	x	x				x			x			x	x		x		

(c)

	Pool	1	2	3	11	12	15	17	18	21	X	Y
H1	1.1			x		x		x	x			
	1.2	x		x	x							
	1.3	x	x			x	x					
H2	2.1				x		x		x	x		x
	2.2							x		x	x	

Tab. 2-3 Markierungsschema eines ReFISH Ansatzes. Pool x.1: Sg; Pool x.2: TAMRA; Pool x.3: bio-Av-Cy5 mit $x=\{1;2\}$. (a) Ursprünglicher ReFISH Ansatz zur 24-Farben Karyotypisierung menschlicher Chromosomen. (b) Leicht verändertes Markierungsschema entsprechend eines zweiten Experiments (c) In dieser Arbeit teilweise verwendetes Markierungsschema, bei dem der Kanal H 2.3 des Markierungsschemas b ausgefallen war, weil Signale aus der 1. Hybridisierung in der 2. Hybridisierung noch sichtbar waren. Damit ergab sich für einige Chromosomen keine eindeutige Zuordnung mehr und es konnten nur noch die gezeigten elf Chromosomen identifiziert werden.

Durch die unabhängige Aufnahme mussten die zwei erhaltenen Bilderstapel in x-, y- und z-Richtung aneinander angeglichen werden, damit das Klassifikationsprogramm die korrespondierenden Voxel richtig erkennen konnte. Das Alignmentprogramm *correlator.cc* (R. Heintzmann, Göttingen) kann mit Subvoxel-Genauigkeit zwei Bilddatensätze aneinander angleichen (Heintzmann 1999). In der Entwickleroberfläche *Khoros* (Khoral Inc, OS IRIX, SGI oder LINUX) wurde ein Ablauf programmiert, der die Bilder parallel einlas, sie jeweils zu einem Maximumbild $H1_{Max}$ und $H2_{Max}$ vereinigte, dann ihr Alignment durchführte und schließlich die Kanäle wieder trennte und abspeicherte. Der *Khoros*-Workspace wurde unter dem Namen „*ReFISH_Correlator*“ abgespeichert. So wurde ein Alignment des zweiten Kerns an den ersten erreicht. Überprüft wurde der Prozess durch den Vergleich der rot-cyan gefärbten Bildstapel H1 und H2 vor und nach dem Alignment (siehe Abb. 3-36, S. 148).

2.2.3 Übersicht über die verwendeten Fluorochrome

Die in Tab. 2-4 aufgeführten Fluoreszenzfarbstoffe wurden für die FISH-Experimente verwendet. Details über den Hersteller und den Einbau / Markierung der DNA finden sich im nächsten Kapitel.

Fluoreszenzfarbstoff	Abkz.	Abkz. in Dateinamen	Anregungsmaxima [nm]	Emissionsmaxima [nm]
4,6-Diamidino-2-Phenylindol	DAPI	d	359	461
Diethyl-Amino-Coumarin	DEAC	de	426	480
Spectrum Green	Sg	sg	497	524
Fluoresceinisothiocyanat	Fitc	fi	494	520
Propidium Iodid	PI	pi	538	617
TAMRA	Ta	ta	545	575
Cy 3	Cy3	3cy	554	568
Cy 3.5	Cy3.5	35cy	581	588
Texas Red	TR	tr	595	615
Cy 5	Cy5	5cy	652	672
Cy 5.5	Cy5.5	55cy	682	703
Cy 7	Cy7	7cy	755	778
LaserPro	Lp	lp	795	812

Tab. 2-4 Übersicht der verwendeten Fluorochrome, mit deren gebräuchlichen Abkürzungen, ihren in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen, sowie den Anregungs- und Emissionsmaxima. Sammlung aus den Quellen <http://www.probes.com>, <http://www.fluorescence.bio-rad.com/>, <http://www.apbiotech.com/germany/>, http://www.packardbioscience.com/reference_matl/822.asp.

2.2.4 Amplifikation und Markierung der Sonden-DNA

Zur Amplifikation und Markierung der chromosomalen Painting Sonden wurden verschiedene leicht modifizierte Protokolle der DOP-PCR (**d**egenerated **o**ligonucleotide **p**rimed PCR) angewandt (Telenius et al. 1992a). Der DOP-Primer, ein Oligomer mit 22 bp, in dessen mittlerer Sequenz 6 zufallsverteilte Nukleotide vorkommen (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3'), bindet statistisch alle 4 kb (4^6 bp), so dass eine universale Amplifizierung der DNA eines Chromosoms stattfinden kann.

1 μ l (~ 250 ng) einer zu amplifizierenden Sonde wurde mit 24 μ l Reaktionsmix (Endkonz.: 1 \times PCR-Puffer [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,4)], 2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 2 μ M Primer, 1U Taq (Gibco, BRL), ad 25 μ l H₂O) gemischt und in einem Thermocycler (Hybaid) inkubiert. Die Programme der einzelnen PCRs sind in Tab. 2-5 aufgelistet. Der Erfolg der Amplifikation wurde auf einem 1%-igem Agarosegel überprüft. Diese so amplifizierten primären DOP-PCR Produkte wurden bei -20°C gelagert und dienten als Vorlage für weitere Amplifikationen bzw. für die Markierungs-PCR.

<u>Primäre DOP</u> Kapitel 2.2.4	<u>Markierungs DOP</u> Kapitel 2.2.4.1	<u>CTA4 DOP</u> Kapitel 2.2.2.3
<i>Denaturierung 95°C, 5min</i> <i>4 Zyklen:</i> <i>Denaturierung 95°C, 1min</i> <i>Annealing 31°C, 1min30s</i> <i>Extension 72°C 3min</i> <i>32 Zyklen:</i> <i>Denaturierung 95°C, 1min</i> <i>Annealing 60°C, 1min30s</i> <i>Extension 72°C 1min</i> <i>+1s pro Zyklus</i> <i>1 Zyklus:</i> <i>Extension 72°C, 5min</i>	<i>Denaturierung 95°C,</i> <i>3min</i> <i>35 Zyklen:</i> <i>Denaturierung 94°C,</i> <i>1min</i> <i>Annealing 56°C, 1min</i> <i>Extension 72°C, 4min</i> <i>1 Zyklus:</i> <i>Extension 72°C, 20min</i>	<i>Denaturierung 95°C,</i> <i>3min</i> <i>36 Zyklen:</i> <i>Denaturierung 94°C,</i> <i>1min</i> <i>Annealing 56°C,</i> <i>1min30s</i> <i>Extension 72°C, 2min</i> <i>1 Zyklus:</i> <i>Extension 72°C, 5min</i>

Tab. 2-5 PCR Thermocycler Programme.

2.2.4.1 Markierung mittels PCR

Die Markierung erfolgte über fluorochrom / haptene-gekoppelte Nukleotide, die dem PCR-Ansatz zugegeben und wie normale Nukleotide von der Taq-Polymerase als Substrat eingebaut wurden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die markierten Nukleotide nicht im Überschuss vorlagen, da die großen Haptene sich beim Einbau sterisch behindern und die PCR zum Abbruch kommt.

Etwa 100 ng DNA wurden in die PCR eingesetzt. Die Ansätze für die PCR unterschieden sich von der normalen DOP-PCR in dem Verhältnis der markierten und unmarkierten Nukleotide, die empirisch ermittelt werden mussten (Tab. 2-6). Anstatt der üblichen 200 µM dNTPs mussten z. B. für Bio-16-dUTP 200 µM AGC-Nukleotid-Mix, 50 µM markiertes Nukleotid und 150 µM unmarkiertes dTTP (Verhältnis 3:1) zugegeben werden. Eine Ausnahme war Fluorescein (Fitc): da es an ein dCTP gekoppelt war, musste statt AGC- ein AGT-Nukleotid-Mix verwendet werden. Zudem musste unmarkiertes dTTP durch dCTP ersetzt werden.

Nach der PCR wurde die Größe der PCR-Produkte auf einem 1%-igem Agarosegel überprüft. Bei der Amplifikation entstanden oft Fragmentlängen im kb Bereich. Da die optimale Länge für Hybridisierungen bei 200 - 500 bp liegt, wurde, falls notwendig, das PCR-Produkt mit Dnase I nachverdaut. Dazu wurden 25 µl PCR-Produkt in einem Reaktionsvolumen von 50 µl (Endkonz.: Nick-Translations-Puffer [50 mM Tris-HCl pH 8; 5 mM MgCl₂; 50 µg / ml BSA], entsprechende Menge DNase in einer Verdünnung 1:1000 (Stock 3 mg / ml, Roche Diagnostics), ad 50 µl H₂O) über 1,5 bis 2 h bei 15°C inkubiert. Die Größe der Fragmente wurde wiederum auf einem 1% Agarosegel getestet. Wenn optimale Längen erreicht waren, wurde die Reaktion durch Zusatz von ¹/₁₀ Vol 0,5 M EDTA und Erhitzung für 10 min auf 65°C gestoppt.

Firma	Homepage	Fluorochrom	Verhältnis unmarkiert / markiert
Amersham Pharmacia Biotech	http://www.biotech.pharmacia.se/	FluorX(Fitc)-dCTP Cy3-dUTP Cy5-dUTP	2:1 3:1 1:1
Roche Diagnostics	http://biochem.roche.com	Bio-16-dUTP Dig-11-dUTP	3:1 3:1
Molecular Probes	http://www.probes.com/	Texas Red-12-dUTP	3:1
NEN (jetzt PE)	http://lifesciences.perkinelmer.com/	DEAC-5-dUTP	1:1
Vysis	http://www.vysis.com/	Sg-dUTP	2:1

Tab. 2-6 *Aufstellung gekoppelter Fluorochrome. Ihre Hersteller mit WWW-Adresse, sowie das Verhältnis markierter zu unmarkierter Nukleotide, das in die PCR-Reaktion eingesetzt werden musste, sind angegeben.*

2.2.4.2 Markierung mittels Nicktranslation

Das Prinzip der Nicktranslation beruht darauf, dass DNase in geringer Konzentration Einzelstrangbrüche („nicks“) in die DNA einfügt. Diese Lücken erkennt die DNA-Polymerase I, baut mit Hilfe ihrer Exonuclease-Aktivität den Strang von 5' nach 3' ab und füllt ihn mit markierten Nukleotiden am 3' Ende wieder auf. Da die DNase die Doppelhelix auch vollständig durchtrennen kann, verkürzt sie gleichzeitig den DNA-Strang. Dieser Effekt wird ausgenutzt, um eine optimale Sondengröße von 200 - 500 bp für FISH-Anwendungen zu erreichen.

Zu 1 µg Sonden DNA wurde in einem 50 µl Volumen der Reaktionsmix hinzugegeben (Endkonz.: Nick-Translations-Puffer [50 mM Tris-HCl pH 8; 5 mM MgCl₂; 50 µg / ml BSA], 50 mM AGC-Mix, 10 mM β-Mercaptoethanol, 20 mM markiertes Nukleotid, 5U DNA-Polymerase I (Roche Diagnostics), entsprechende (~ 3 – 5 µl) Menge DNase in einer Verdünnung 1:1000 (Stock 3 mg / ml, Roche Diagnostics), ad 50 µl H₂O). Die Inkubation wurde über 1,5 h bei 15°C im Wasserbad ausgeführt. Anschließend wurden 2,5 µl des Produkts auf einem 1%-igem Agarosegel getestet, und wenn Größen von 200 - 500 bp erreicht waren, die Reaktion durch Zusatz von 1 / 10 Volumen 0,5 M EDTA und Erhitzung für 10 min auf 65°C gestoppt.

2.3 Hybridisierung und Detektion

2.3.1 Hybridisierung

2.3.1.1 Sondenmischung

Dem PCR-Produkt (0,5 – 1 µg DNA pro Sonde) wurden Salmon Testis DNA (Sigma) und C₀t1-DNA zur Unterdrückung der repetitiven Sequenzen zugegeben (falls keine „repeat depleted“ Sonden verwendet wurden).

Die gesamte DNA wurde mittels EtOH und 3 M NaAcetat gefällt, wobei gleichzeitig freie Nukleotide und Primer entfernt wurden. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet getrocknet. Es wurde in einer Mischung aus 50% FA, 20% DexSO₄, 2× SSC resuspendiert und zum vollständigem Lösen mind. 30 min bei 37°C geschüttelt. Die Denaturierung erfolgte 5 min bei 75°C und falls nötig ein „preannealing“ etwa 45 min bei 37°C.

2.3.1.2 Chromosomenpräparat

Das Metaphase-Präparat wurde in einer Lösung aus 70% FA in 2× SSC für 5 min bei 75°C denaturiert, anschließend zur Dehydrierung durch eine Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) gezogen und an der Luft getrocknet. Je nach Größe des Hybridisierungsareals und des Deckgläschens wurden 2 - 6 µl des Hybridisierungsmixes auf ein Deckglas pipettiert. Das Deckglas wurde vorsichtig auf das Präparat gelegt und luftdicht mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im 37°C Wasserbad.

2.3.1.3 Zellpräparat

Die Zellpräparate blieben bis zum Ansatz der Hybridisierung in ihrem Aufbewahrungsmedium (50% FA in 2x SSC). 3 – 6 µl des denaturierten Hybridisierungsmixes wurden auf ein Deckglas angemessener Größe pipettiert. Das Deckglas mit den Zellen wurde herausgenommen und abgetropft. Anschließend wurde es mit der Oberseite nach unten auf das kleine Deckglas mit der Sonde gelegt. Nach vorsichtigem Umdrehen wurde mit Fixogum abgedichtet. Sobald das Fixogum getrocknet war, wurde das Präparat auf einem 75°C Heizblock 5 min denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte wie bei Metaphasepräparaten.

2.3.2 Nachweis der hybridisierten Sonden

Ein erster Waschschrift diente allgemein der Entfernung des Deckglases und überschüssiger Hybridisierungsmixtur, ein zweiter zur stringenten Entfernung unspezifisch gebundener DNA-Sonden. Die Stringenz lässt sich nach Gleichung 2-5 (Maniatis et al. 1989) berechnen:

$$\text{Stringenz} = 81,5^{\circ}\text{C} - 16,6 \log([\text{Na}^+]) + 0,41 (\%G_{\text{SondeDNA}} + \%C_{\text{ZielDNA}}) - 500/\text{Sondenlänge} - 0,61 (\% \text{Formamid})$$

Gleichung 2-5

Das für die stringente Waschlösung verwendete 0,1× SSC hat eine Na⁺-Konzentration von 0,015 M. Der G/C-Gehalt wird für Sonden- und Ziel-DNA je auf 50% geschätzt und die durchschnittliche Sondenlänge auf 500 bp. Die Hybridisierung erfolgt in 50% FA. Daraus ergibt sich:

$$\text{Waschtemperatur WT} = 81,5^{\circ}\text{C} + (-30) + 41 - 1 - 30,5 = 61^{\circ}\text{C}$$

Nach dem letzten Waschschrift wird zum Blocken unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen das Präparat 30 min in 3% BSA-Lösung gestellt. Tab. 2-7 gibt die Avidinderivats- und Antikörperkombinationen wieder, welche für den Biotin-, Digoxigenin und Östradiol-Nachweis verwendet wurden.

Biotin		Digoxigenin		Östradiol	
	Verdünnung in 3%BSA/4xSSCT		Verdünnung in 3%BSA/4xSSCT		Verdünnung in 3%BSA/4xSSCT
Av-Fitc (Amersham Pharmacia Biotech)	1:200	Sheep-Anti-Dig Fitc (Sigma)	1:200		
Av-Cy3 (Dianova)	1:400				
Av-Cy3.5 (Amersham Pharmacia Biotech)	1:400				
Av-Cy5 (Dianova)	1:400				
Av-Cy5.5	1:200	Sheep-Anti-Dig Cy5.5 (Amersham Pharmacia Biotech/Roche kit for conjugation)	1:200	Rabbit-Anti-Estradiol Cy5.5 (Amersham Pharmacia Biotech)	1:400
Av-LaserPro (Molecular Probes)	1:100	Sheep-Anti-Dig Cy7 (Amersham Pharmacia Biotech)	1:100		

Tab. 2-7 Verwendung der Avidinderivate und Antikörper im indirekten Nachweis.

Da die Fluorochromkombinationen aufeinander abgestimmt werden mussten, kann kein generelles Markierungsprotokoll angegeben werden. Für ein 7 Fluor M-FISH Experiment wurde z. B. Avidin-Cy5.5 und Anti-Dig-Cy7 verwendet. Die Inkubation erfolgte 45 min in einer feuchten Kammer bei 37°C. Anschließend wurde das Präparat 3 mal 5 min in 4x SSCT bei 42°C gewaschen.

Eine DNA-Gegenfärbung wurde standardmäßig mit DAPI durchgeführt. Chromosomenpräparate wurden kurz mit destilliertem Wasser abgespült und luftgetrocknet. Zellpräparate hingegen wurden direkt auf einen OT aufgelegt (Abb. 2-2, S. 60): Auf das Präparat wurden etwa 35 µl Antifade (1% p-

Phenylendiamindihydrochlorid in PBS-gepuffertem Glycerol) gegeben und ein 24 x 60 mm großes Deckglas (bei Chromosomenpräparaten), bzw. auf einen OT (Zellpräparate sind ja bereits Deckgläser) gelegt. Das Präparat wurde im Kühlschrank im Dunkeln aufbewahrt, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern.

2.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

In dieser Arbeit wurden zwei Mikroskope benutzt, ein Leica TCS 4D und eine Zeiss LSM 410. Beide sind recht ähnlich im Aufbau (z. B. verwenden beide ein Plan Apo 63x/1.4NA Öl), jedoch unterschiedlich in der Bedienung.

Zusätzlich zur Quecksilber-Lampe besaß das Leica TCS 4D einen Argon-Krypton-Laser mit den Wellenlängen 488nm, 568nm und 647nm. Das Zeiss LSM 410 war mit einem Argon-Laser (488nm) und einem Helium-Neon-Laser (543nm und 633nm) bestückt. Diese Kombinationen ermöglichten jeweils die Anregung von Fitc, Cy3 (TRITC) und Cy5. Spezielle Kurz-, Band- und Langpaßfilter (Reichman 2000) ließen das Licht beim LSM 410 zu einem Photomultiplier, beim TCS 4D zu zwei Photomultipliern durchdringen, einer für die kurzwellige Fitc-Detektion und einer für Cy3 und Cy5. Die Quecksilber-Lampe diente zur Durchsicht des Präparates vor der Aufnahme.

Optische Serienschnitte wurden bei beiden Mikroskopen in Abständen von 250 nm durchgeführt, um die Auflösungsgrenze in z-Richtung (~ 600 – 700 nm) mindestens um das Zweifache zu unterschreiten (siehe Nyquist Kriterium, S. 33).

Die Bildgröße betrug immer 256 × 256 Pixel, die xy-Pixelgröße beim CLSM Leica TCS 4D 100 nm, beim Zeiss LSM 410 CLSM 110 nm (mit einer Ausnahme: Rosette *confRo16*, dort 66 nm). Die Höhe eines Nukleus in z-Richtung wurde aus der Anzahl der Serienschnitte, die noch deutlich ein Signal enthielten, abgeschätzt.

Bezüglich der Wahl der Fluorochrome in Vielfarben-Experimenten musste darauf geachtet werden, dass gleichzeitig weder Cy3 und Cy3.5, noch Cy5 und Cy5.5 unterschieden werden konnten, da die Emissionsspektren zu nah beieinander lagen (weder von Leica TCS 4D bzw. Zeiss LSM410, noch von den ebenfalls getesteten Leica TCS SP und Zeiss LSM510).

Um eine PSF berechnen zu können, wurden fluoreszenz-gefüllte „beads“ (Tetra Spec, Molecular Probes) mit den Durchmessern 125 nm und 560 nm pro Aufnahmetag einmal aufgenommen (Shaw und Rawlins 1991).

Im Strahlengang eines Mikroskops erfährt das Licht unterschiedliche Aberrationen. Sphärische Aberrationen können z. B. durch Inhomogenitäten im Deckglas, im Objektiv oder durch das Immersionsöl hervorgerufen werden. Dies führt dazu, dass nur eine Zone kurz unterhalb des Deckglases als sphärisch aberrationsfrei gilt. Dem wurde in den Experimenten dadurch Rechnung getragen, dass die Zellen direkt auf dem Deckgläschen wuchsen und dann umgedreht auf einen Objektträger in das Einbettmedium eingedeckelt wurden (Abb. 2-2).

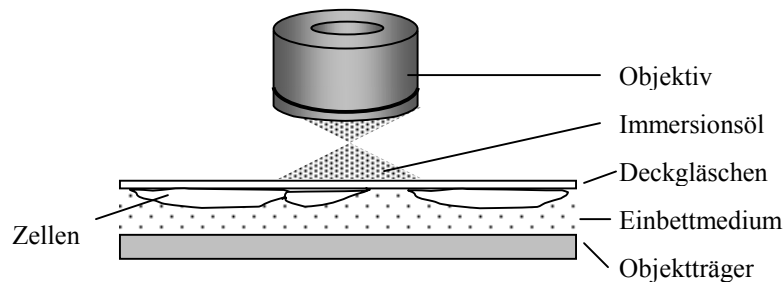


Abb. 2-2 Schematischer Aufbau eines eingedeckelten Zellpräparates.

Während die Objektive eine Beschichtung besaßen, welche die chromatische Abberation in xy-Richtung korrigierte, war in z-Richtung eine Shift-Korrektur bei jedem Bildstapel erforderlich (Solovei et al. 2002b). Sie betrug sowohl am Zeiss LSM410 als auch am Leica TCS 4D etwa 250 nm. Folglich wurden die aufgenommenen Stapel wie folgt korrigiert:

<u>Fluorochrom</u>	<u>zu löschende Schnitte</u>
Fitc	die letzten beiden
Cy3	der erste und der letzte
Cy5	die ersten beiden

2.5 M-FISH Bildaufnahme

Um bei einem M-FISH Experiment alle 24 Chromosomen in kombinatorischer Weise markieren zu können, werden mindestens $n = 5$ Fluorochrome benötigt (Gleichung 2-1, S. 46). Um aber die beste Farbauflösung zu erzielen (Kapitel 2.2.1, S. 46), sollten soviel Fluorochrome wie möglich benützt werden, bei minimaler Anzahl Simultan-Markierungen. Aufgrund dieser Überlegungen wurde ein 7 Fluor Mix zusammengestellt, der nur noch Doppel- und drei Einfach-Markierungen aufwies. Einzelheiten über die Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome können aus Tab. 2-4 (S. 54) entnommen werden.

2.5.1 Epifluoreszenzmikroskop

Die Aufnahme der Hybridisierungen erfolgte mit dem Epifluoreszenzmikroskop Leica DMRXA-RF8 und einem Objektiv 63x/1.4NA Plan Apo, Ölimmersion. Der Zoom-Tubus wurde standardmäßig auf den Wert „1“ gestellt, nur bei Metaphasen wurde davon manchmal abgewichen, je nach ihrem Spreitungsgrad. Das Mikroskop war mit einem automatischen 8 Filterrad, sowie hochspezifischen Filtern (S. 61) ausgestattet. Jedes Fluorochrom konnte so mit einem separaten Anregungs- und Emissionsfilter analysiert werden.

Die Bildaufnahme wurde über die Software Leica *QFISH* für 2D-Aufnahmen und Leica *QFluoro* für 3D-Aufnahmen gesteuert (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd, Cambridge, UK).

2.5.2 CCD-Kamera und Pixelgröße

Die Aufnahme erfolgt mit der CCD-Kamera Sensys (Kodak KAF 1400 Chip mit einer 12bit Dynamik, d. h. 4096 Graustufen) der Fa Photometrics.

Die Pixelgröße wurde mit einem Kalibrierungspräparat, einem Objektmikrometer (Fa Nikon) gemessen, auf dem parallele Striche in genau definiertem Abstand, z. B. 1 μm , eingeztzt waren. Sie betrug bei dem Objektiv 63x (Plan Apo, NA 1.4) und einer Zoomeinstellung von „1“ 110 nm in xy-Richtung.

2.5.3 Lichtquelle

Als Lichtquelle diente eine 100W Quecksilberdampfampe. Die zuvor ausgetestete 75W Xenon-Lampe, die eigentlich im IR-Spektrum lichtintensiver sein sollte, erwies sich als weniger geeignet.

2.5.4 Fluoreszenzfilter

Die Filter wurden von der Fa Chroma hergestellt und haben die in Tab. 2-8 und Abb. 2-3 angegebenen Spezifikationen. Eine Quelle für zusätzliche Information zu diesem Thema findet sich bei Reichman (2000).

	DAPI	Sg/Fitc	Cy3	Cy35	Cy5	Cy55	Cy7
Anregungsfilter	360 \pm 20	475 \pm 15	546 \pm 5,5	580 \pm 5	602 \pm 19	682 \pm 6	740 \pm 17
Strahlteiler	400	497	557	593	647	697	765
Emissionsfilter	460 \pm 20	522 \pm 20	567 \pm 7,5	612 \pm 15	667 \pm 15	720 \pm 20	790 \pm 20

Tab. 2-8 Filterspezifikationen.

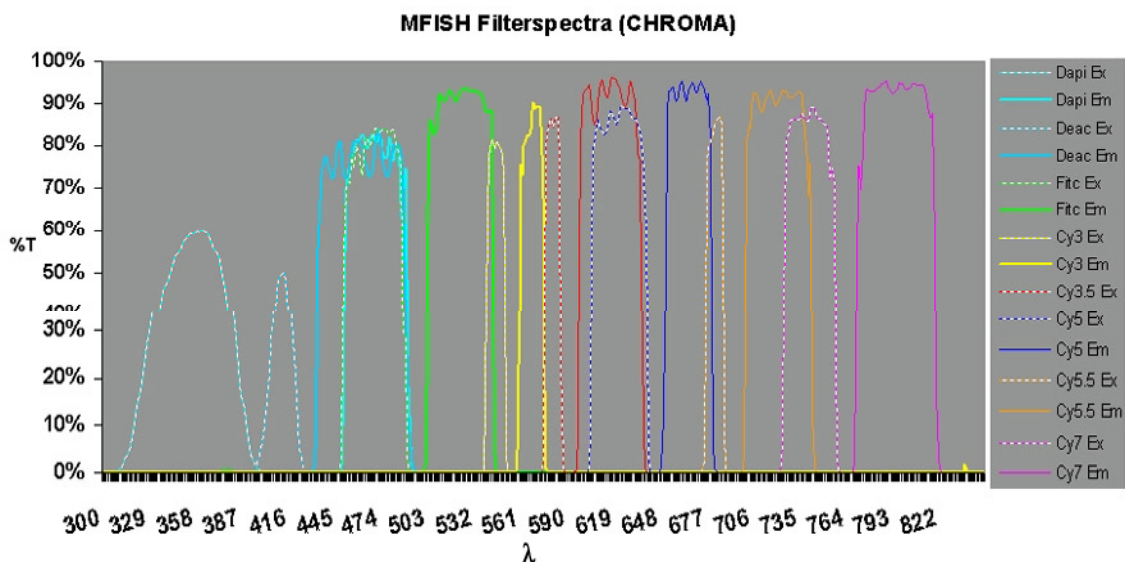


Abb. 2-3 Spektren der verwendeten Fluorochromfilter der Firma Chroma. Ex: Excitation (Anregung), Em: Emission, λ : Wellenlänge.

2.5.5 Bildaufnahmeprozess

In diesem Unterkapitel wird die Aufnahme von 2D - und 3D-Daten beschrieben, ausgehend von einem Präparat, welches bereits auf dem Mikroskop-Kreuztisch eingespannt sei (Eils et al. 1998).

2.5.5.1 Metaphasenpräparate

In der Software Leica *QFISH* wurden die verwendeten Fluorochrome in einem ersten Schritt definiert und die passenden Filterblöcke automatisch zugeordnet. Der Aufnahmeprozess begann, indem für jeden Kanal die Belichtungszeit und der hellste und dunkelste Punkt („scaling“) eingestellt wurde. Die war nötig, weil die CCD-Kamera zwar 12 bit aufnehmen, aber das System nur 8 bit darstellen und weiterverarbeiten konnte. Die Bandbreite an 4096 Grauwerten (2^{12}) musste demnach auf 0-255 Grauwerte (2^8) linear transformiert werden, wofür das hellste (255) und dunkelste (0) Pixel definiert werden musste. Diese Einstellung musste bei jeder neuen Aufnahme wiederholt werden. Nach Abschluss der Einstellungsphase wurden die Bilder der Reihe nach automatisch aufgenommen. Alle 7 Kanäle eines M-FISH Bildes wurden in etwa 50s erfasst.

2.5.5.2 Zellkernpräparate

Mit dem Epifluoreszenzmikroskop Leica DMRXA und der Software *QFluoro* konnte ein Bilderstapel in z-Richtung aufgenommen werden. Dieses Modul wurde in Zusammenarbeit mit Leica Microsystems (Cambridge, UK) entwickelt.

Zunächst wurde ein Bild des Präparats in der Signalmitte (Fokusebene) aufgenommen. Alle Einstellungen (Fokusebene 0 μm , Belichtungszeit, „scaling“) für diese Aufnahme, wurden für die folgende Bildstapelaufnahme automatisch übernommen. Dies war bedeutsam, damit nicht alle Bilder, v. a. auch solche außerhalb der Fokusebene, jedes Mal vom System neu skaliert wurden.

Das Programm steuerte den automatischen z-Trieb des Objektisches von einer vorher festgelegten unteren bis zu einer definierten oberen Grenze. Wie weit aus dem Fokus geschritten wurde, war Ermessenssache, jedoch mindestens soweit, bis vom Fokusbild nichts mehr zu sehen war. Diese Überabtastung war für eine spätere Dekonvolution notwendig.

Daran anschließend musste die Schnittdicke festgelegt werden, die frei gewählt werden konnte, in der Regel aber 200 oder 250 nm entsprach. Je nach Wert hierfür wurde die Anzahl der Ebenen berechnet und angezeigt. Jede Ebene wurde als eigene Datei mit einer dreistelligen Nummer „<Bildname>000.tif“ abgespeichert. Die Zeit für die Aufnahme eines kompletten M-FISH Bildstapels mit 7 Kanälen und 30 Ebenen betrug etwa 25-30 min.

2.5.6 Bildauswertung mit dem Programm *MCK*

Die Karyotypisierung der M-FISH Metaphase-Präparate erfolgte über das Klassifizierungsprogramm *MCK*. Dieses Programm wurde in einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe iBioS (Leitung: R. Eils, DKFZ, Heidelberg) bis zur Serienreife entwickelt und wird von der Firma Leica vertrieben (Eils et al. 1998). Es findet seine Anwendung außer in der Forschung v. a. in der molekularzytogenetischen Diagnostik.

Weil es zu *QFISH* kompatibel war, konnten die Kanäle einer aufgenommenen Metaphase in dem multiplen TIF-Format eingelesen und nach einer kurzen DAPI-Segmentierung auf Knopfdruck klassifiziert werden. Die Chromosomen wurden in einem Karyogramm automatisch der Größe nach sortiert und konnten im in Klassifizierungs-, sowie in Falschfarben dargestellt werden.

2.6 Bildverarbeitung

Für 3D-Anwendungen mussten einige Schritte durchgeführt werden, um die Bilddaten kompatibel zu machen, Hintergrund zu entfernen, Dekonvolution und Messungen durchzuführen. Um eine anschließende Klassifikation so optimal wie möglich zu gestalten, wurden die Schritte in enger Abstimmung mit dem Entwickler des Programms *mfish3d*, K. Saracoglu (Heidelberg), eingeführt (Saracoglu 2001).

2.6.1 Format der Bilddaten

Der Steuerrechner des Aufnahmemikroskops verwendete ein multiples TIF-Format zum Abspeichern der Bilder. Da dieses Dateiformat von den weiterführenden Programmen nicht erkannt wurde, mussten die Kanäle mit einem externen Skriptprogramm in einzelne Unterordner aufgetrennt werden. Dies entsprach einer Umformatierung und änderte an den Daten nichts. Das TCL - Skript heißt *elgrande.tcl* und läuft unter dem Betriebssystem IRIX 6.2 (SGI), wenn zusätzlich die Programmbibliotheken *imgcopy* (SGI) und *ImageMagickTM* installiert sind. Eine Dokumentation mit dem Namen „ElGrande_Doku_v06.pdf“ ist auf der CDRom im Verzeichnis /docs zu finden.

2.6.2 Bildhintergrund und Rauschen

Der Hintergrund ist derjenige Bildteil, der offensichtlich nicht zum Objekt gehört, z. B. der Bereich um einen aufgenommenen Zellkern herum bis zum Bildrand.

Bei mikroskopischen Aufnahmen war aufgrund des Photonen- und Detektorrauschens der Hintergrund nicht durchgehend Null. Dies wurde korrigiert, indem die Grauwerte des Hintergrunds gemessen und anschließend vom gesamten Bild subtrahiert wurden. Diese Prozedur wurde zusammen mit dem

Normalisieren in den Programmen *KS400*, *TILLvisION*, *Khoros* oder *ImageJ* durchgeführt.

Falls nötig wurde einem Peakrauschen mit einem Gaussfilter, implementiert in dem Dekonvolutionsprogramm *Huygens*, wirkungsvoll begegnet. Optional konnten die Bilder kurz vor der Klassifikation von *mfish3d* mit einem 3 x 3 Medianfilter oder einem anisotropen Diffusionsfilter geglättet werden (Saracoglu et al. 2001).

2.6.3 Normalisieren

Es kam vor, dass das „scaling“ während der Aufnahme nicht optimal ausgeführt wurde, sondern Grauwerte z. B. nur maximal den Wert 180 annahmen. In anderen Fällen wurde aufgrund der Hintergrundsubtraktion der maximale Grauwert von 255 nicht mehr erreicht. Dann wurden alle Bilder im Stapel so transformiert, dass sie die volle Spanne an Grauwerten (0 - 255) einnahmen. Wenn ein helles Fluoreszenzsignal, das offensichtlich nicht zum Zellkern gehörte, im Bild vorkam, senkte dies die Grauwerte der eigentlichen Signale so ab, dass eine Korrektur der Grauwerte nach oben (bis 255) stattfinden musste. Das Normalisieren wurde mit den Programmen *KS400*, *TILLvisION*, *Khoros* oder *ImageJ* durchgeführt.

2.6.4 Volumenmessungen

Diese Art der Auswertung zählt die Pixel eines Bildstapels nach der Binärisierung bei einem bestimmten Schwellwert und multipliziert die Anzahl mit der bekannten Voxelgröße. Aus Abb. 2-4 wird ersichtlich, warum dieser Vorgang auch Erosionsanalyse genannt wird. Die Volumenmessung wurde mithilfe eines Skripts innerhalb des Programms *KS400* durchgeführt.

Zunächst wurde der gesamte Bildstapel eingelesen und binärisiert: alles über einem bestimmten Schwellwert erhielt die Farbe schwarz (255), alles darunter weiß (0). Die Anzahl der schwarzen Pixel wurde gemessen und mit der Voxelgröße multipliziert. In Zehnerschritten wurde dann der Schwellwert erhöht und immer wieder das Volumen gemessen, bis zum Maximumwert 250. Man erhielt eine Kurve, die das Volumen des Kerns in Pixel abhängig vom Schwellwert angab.

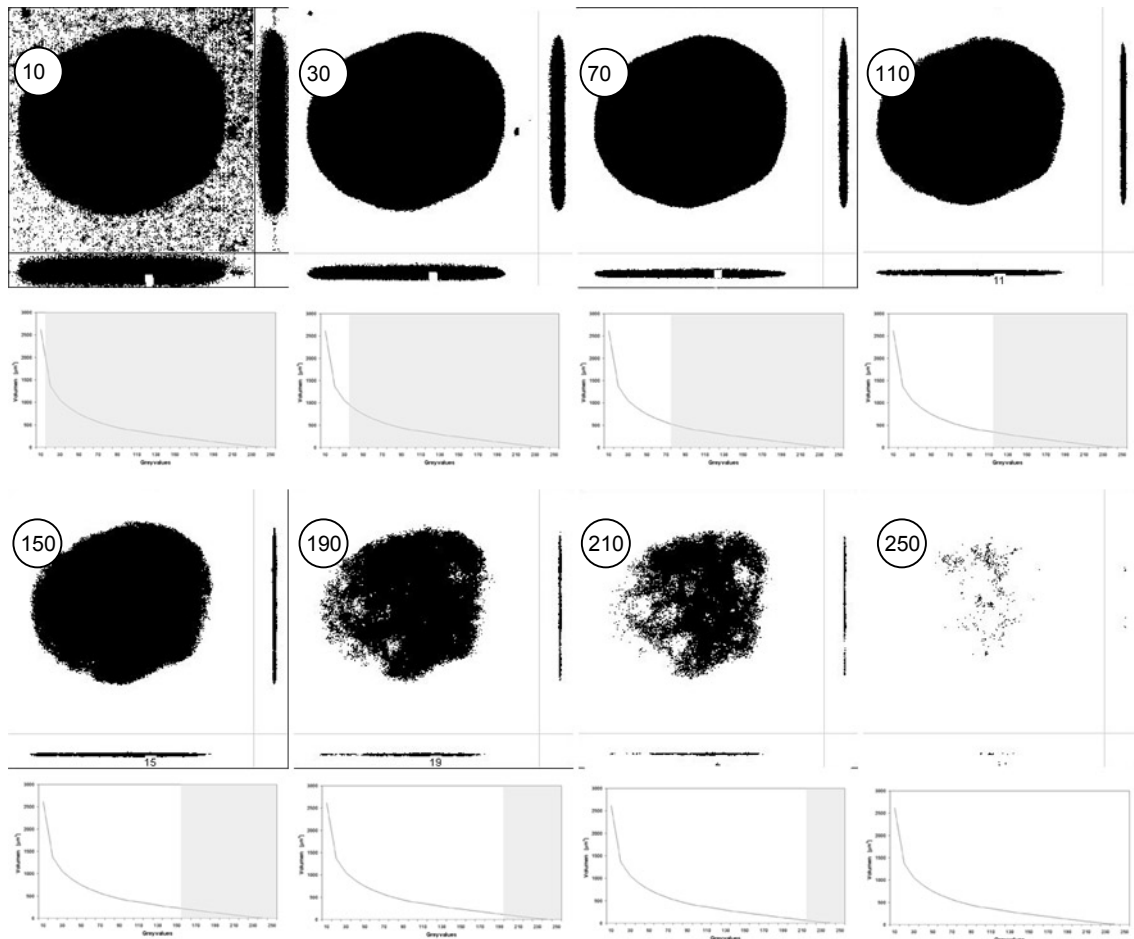


Abb. 2-4 Volumenbestimmung eines PI gefärbten Zellkerns, der mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen wurde. Jedes Einzelbild zeigt einen xy-Schnitt durch eine mittlere Ebene, rechts ein yz-Schnitt und darunter ein xz-Schnitt. Die Bilder wurden bei dem im Kreis angegebenen Grauwert binärisiert (alle Werte über dem Schwellwert schwarz (255), alle darunter weiß(0)). Zur Verdeutlichung soll der graue Bereich in dem jeweiligen Graph diesen Schwellwert anzeigen. Die graue Fläche unter der Kurve entspricht dem Volumen des Kerns bei diesem Schwellwert.

2.7 Dekonvolution

Mathematisch lässt sich eine Abbildung durch ein Mikroskop als folgendes Vektorprodukt beschreiben:

$$O = F \times O'$$

Gleichung 2-6

O ist das Originalbild unter dem Mikroskop und O' das Abbild nach der Mikroskopie. F ist der Faltungsfaktor, der für alle Aberrationen steht, welche durch die Aufnahmeapparatur eingeführt wurden. Die Linearität obiger Gleichung und die Tatsache, dass Bilder aus Bildpunkten zusammengesetzt sind, führt zu dem Schluss, dass wenn man den Faltungsfaktor in einem Punkt kennt, sich jedes beliebige Bild berechnen lässt. Die Summe aller Punkte der Faltungsfunktion nennt man Point Spread Function, kurz PSF.

$$O_{x,y,z} = \text{PSF} \times O'_{x,y,z}$$

Gleichung 2-7

Sie stellt eine Antwort eines Punktfilters auf ein Punktbild dar und kann für ein gegebenes Mikroskop-Setup theoretisch berechnet oder experimentell bestimmt werden, indem ein Bild von einem fluoreszierenden Objekt („bead“) aufgenommen wird.

Aufgrund des Welle-Teilchen-Dualismus gibt es zwei Repräsentationen der obigen Gleichung und angelehnt an diesen Ausdruck spricht man von der Dualität von Orts- und Frequenzraum. Der gleichwertige Zusammenhang zwischen Orts- und Frequenzraum wurde von dem französischen Mathematiker Jean Baptiste Fourier (1768-1830) bewiesen. Die Formel zur Umrechnung wird Fouriertransformation, der Frequenzraum wird auch Fourierraum genannt.

Die folgende Gleichung gibt die Gleichung 2-7 im Frequenzraum wieder:

$$F(O) = F(\text{PSF}) \cdot F(O')$$

Gleichung 2-8

Hierbei ist entscheidend, dass diese Berechnung mathematisch zugänglicher ist, weil sie nur noch eine einfache Multiplikation darstellt. Die fouriertransformierte PSF wird Object Transfer Function (OTF) genannt. In obiger Gleichung läßt sich durch Umstellen aus einem mikroskopischen Bild das Originalbild theoretisch zurückrechnen.

Unterschiede in der Implementierung der angebotenen Softwarepakete sind darauf zurückzuführen, dass die konkrete Berechnung der Gleichung 2-8 einige Schwierigkeiten in sich birgt. Z. B. liegen die Werte $F(O)$ oft nahe bei Null, was im konkreten Fall zu einer Division durch Null führen kann. Man versuchte dies zu umgehen, indem man z. B. eine kleine Konstante zu $F(O)$ addiert (*Wiener Filter*) oder aber man bricht die Division unterhalb einer kleinen Schwelle ab (direkte Entfaltung).

2.7.1 Huygens von SVI

Die in dieser Arbeit am häufigsten verwendete Software war die der Firma Scientific Volume Imaging - *Huygens*. Sie lieferte 2 Algorithmen: *Maximum Likelihood Estimation (MLE)* und *Iterative Constraint Tikhonov Miller (ICTM)*. Einige Mikroskopparameter wie Brechungsindex oder verwendete Wellenlänge mussten als Parameter eingegeben werden. Das Softwarepaket enthielt eine Dokumentation (Scientific-Volume-Imaging 1999) und war „batch-fähig“, d. h. man konnte sich mit der Skriptsprache Tcl/Tk selbst Makros generieren, um mehrere Kerne z. B. über Nacht nacheinander entfalten zu lassen. Im Rahmen dieser Arbeit habe ich ein Tcl-Skript für die Batch-Version *Huygens2t* geschrieben. Es berechnet zunächst eine PSF aus einem „bead“-Bilderstapel und anschließend wird eine eingegebene Reihe an Bilderstapeln automatisch entfaltet. Eine Dokumentation zu diesem Skript *elgrande.tcl* ist auf der CDROM in der Datei „/docs/EIGrande_Doku_v06.pdf“ zu finden. *Huygens* lief

auf einer Silicon Graphics Workstation O₂ (MIPS R5000 200MHz Prozessor) mit 640 MB Arbeitsspeicher unter dem Betriebssystem IRIX 6.2.

Der wichtigste Schritt bei einer Dekonvolution war der Endpunkt. Brach der Prozess zu früh ab, war eventuell die Entfaltung noch nicht weit genug fortgeschritten. Endete sie zu spät, wurden möglicherweise Artefakte eingeführt. Hier immer das Optimum zu finden war eine der schwierigsten und langwierigsten Aufgaben. In allen Dekonvolutionsprogrammen musste ein Maximum an Iterationen angegeben und das Ende durch Ausprobieren bestimmt werden. *Huygens* erleichterte diesen Endfindungsprozess durch interne Qualitätsfaktoren. Man konnte sich die Zahlen anzeigen lassen und erhielt so einen Vergleich über die Annäherung an den Endpunkt (Abb. 2-5). Dieser wurde erreicht, wenn sich in zwei aufeinanderfolgenden Iterationen der Qualitätsfaktor nicht mehr als um einen zuvor eingegebenen Wert (z. B. 0,01%) änderte. Die Qualität der Ergebnisbilder war manchmal mit MLE und manchmal mit ICTM besser.

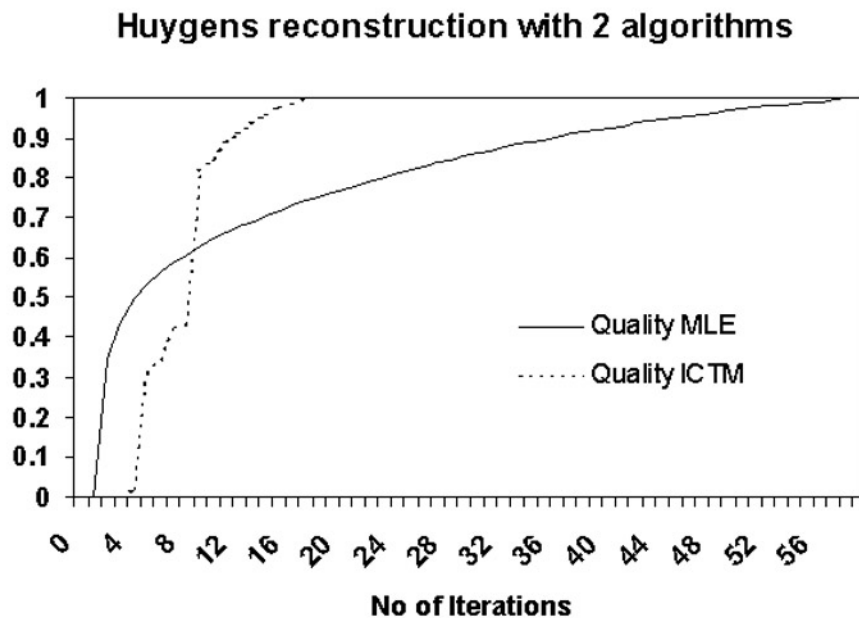


Abb. 2-5 Vergleich des Anstiegs der Werte der internen Huygens Qualitätsfaktoren für die zwei angegebenen Algorithmen, normalisiert zwischen 0 und 1. Entfaltet wurde ein Bild eines Zellkerns mit 2 Chromosomendomänen, einmal mit dem Huygens MLE- und einmal mit ICTM-Algorithmus, aber beide Male mit dem gleichen Endkriterium 0,01%. Der ICTM erreicht schneller das Ende. Der erste Wert wurde beim ICTM Verfahren erst nach der dritten Iteration ausgegeben. Die nicht auf 0 – 1 normierten Werte sind zusammen mit einigen Zwischenbildern in der Abb. 3-22 (S. 117) zu sehen.

2.7.2 TILLvision von T.I.L.L. Photonics

Der von dieser Firma verwendete Dekonvolutionsalgorithmus gehört zur Klasse der inversen Volumenfilter und nennt sich in der Dokumentation „*Adaptive Inverse Modeling (AIM)*“ (T.I.L.L.-Photonics-GmbH 2001). Er ist implementiert in die Software *TILLvision 4.0* und läuft auf einem Windows NT - Rechner (Intel 860 Mhz Prozessor) mit 256 MB Arbeitsspeicher.

Die Theorie geht bei diesem Algorithmus von einer reinen Impulsantwort aus, so dass keine Mikroskopparameter als Voraussetzung eingegeben werden mussten. Das „bead“ für die PSF musste unter exakt den gleichen Bedingungen wie die Zellkernbilder aufgenommen werden. Aus dem aufgenommenen „bead“ wurde ein sogenannter Filter berechnet. Das Programm stoppte, wenn das eingegebene Konvergenzkriterium die Iterationenzahl erreicht hatte. Die Filterberechnung dauerte sehr lang (3 h bis über Nacht), dafür wurde die Dekonvolution der eigentlichen Bilddaten in wenigen Sekunden berechnet.

Es war möglich, mehrere Bildstapel nacheinander bearbeiten zu lassen (Stapelverarbeitung). Es wurden keine Qualitätskriterien angezeigt, aber es war möglich sich die Filterwerte nach der Berechnung im Einzelnen anzusehen.

2.7.3 KS400 von ZeissVision

In dieser Dekonvolutionssoftware waren vier Algorithmen implementiert: (1) *Maximum Entropy*, (2) *Maximum Likelihood*, (3) *Least Square* und (4) *J/V*. *Cit-tert*. Für jede dieser Möglichkeiten gab es wiederum drei sogenannte Konvergenzmodi: (a) *Conjugated Gradient*, (b) *Maximum Descent* und (c) *Normal*. Damit wurde die Schrittweite der iterativen Lösungssuche eingestellt. Beispielsweise verwendete die Konvergenzstrategie *Maximum Descent* den steilsten möglichen Gradienten, um zu einer Lösung zu kommen. Die *Conjugated Gradient* Methode versuchte, einen optimalen Gradientenschritt bei allen Iteration zu finden, angepasst an die Änderungen der Restaurationsfehlerfunktion.

Dieses Programmpaket besaß interne Funktionen, um die Restaurierungsqualität abzuschätzen, im Gegensatz zu *Huygens* waren diese aber nicht einsehbar. Der Endpunkt musste durch eine einzugebende maximale Iterationenzahl bestimmt werden. Die Online-Hilfe schrieb hierzu, dass im *Conjugated Gradient* Modus in den meisten Fällen 10 - 20 Iterationen benötigt werden würden, um Konvergenz zu erreichen, während im *Normal* Modus 100 - 200 Iterationen dafür nötig seien.

Die Software lief unter Windows NT auf einem PC (Intel 860 Mhz Prozessor) mit 256 MB Arbeitsspeicher. Im Lieferumfang war eine eigene Skriptsprache enthalten, mit der man Stapelprozesse selbst programmieren konnte. Eine PSF musste separat berechnet werden und dazu die Mikroskopparameter bekannt sein. Wie bei allen hier verwendeten Paketen dauerte die PSF-Berechnung am längsten, im Vergleich zu der zügigen eigentlichen Dekonvolution.

2.7.4 Axialrec von Rainer Heintzmann

Dieses Programm war Teil der neuen Mikroskopentwicklung Axialtomographie (Heintzmann 1999; Heintzmann et al. 2000). Es war implementiert in der *Khoros* Entwicklungsoberfläche auf einer SGI OS2 (MIPS R5000 200 MHz Prozessor) mit 640 MB Arbeitsspeicher unter dem Betriebssystem IRIX 6.2. Skripte zur Stapelverarbeitung konnten erstellt werden und ein Ablauf wurde in dem

Skript *elgrande.tcl* realisiert. Wenn alle zu verarbeitenden Bildstapel zusammen mit einer „bead“-Aufnahme angegeben waren, restaurierte *elgrande.tcl* diese nacheinander in Stapelverarbeitung. Die PSF musste unter den gleichen Bedingungen aufgenommen worden sein und eine gleiche Ebenenanzahl, wie der Bildstapel haben. Mikroskopparameter mussten nicht angegeben werden.

2.7.5 Qualitätsfaktoren

Subjektive Kriterien

Bilddaten sind häufig einer subjektiven Wahrnehmung unterworfen. Z. B. kann ein Bild besser oder schärfer für einen Betrachter aussehen, für einen anderen aber nicht. Die Beurteilung verschiedener Dekonvolutionsparameter (verwendeter Algorithmus, Anzahl der Iterationen, Prozentangabe des Quality Factor, usw.) beinhaltete folgende subjektive Kriterien, die den Grad an Veränderung vor und nach Dekonvolution bestimmen half:

- In und leicht über-/unterhalb der Fokusebene waren alle zuvor vorhandenen Bildelemente noch zu sehen.
- Die Unschärfe der ersten und letzten Bilder war verschwunden.
- Kein offensichtliches Artefakt, wie Streifen, Flackern, o. ä. wurde eingeführt.
- Der Bildstapel als Ganzes wirkte homogen und allgemein war die Verwandtschaft zum Originalbild offensichtlich.

Neben diesen subjektiven Anschauungskriterien wurde versucht, objektive Messungen zu verwerten.

Volumenmessung I

Die Volumenmessung ergab vor bzw. nach Dekonvolution unterschiedliche, schwelwertabhängige Werte. Dabei war $V_{\text{vor}} > V_{\text{nach}}$. Je kleiner das Verhältnis $V_{\text{nach}} / V_{\text{vor}}$ bei einem definierten Schwellwert, desto besser wurde die Dekonvolution eingeschätzt. Da nur bei kleinen Schwellwerten (1-100) eine Messung sinnvoll war, wurde das Volumen bei Schwellwert „1“ gemessen und die Relation $V_{\text{nach}} / V_{\text{vor}}$ berechnet.

Volumenmessung II

Mit der geometrischen Formel (Gleichung 2-10, S. 80) wurde das Volumen einer Ellipse mit den gleichen Halbachsen wie eine aufgenommene Zelle berechnet. Der Bereich, in dem die gemessene, schwelwertabhängige Volumenkurve diese Gerade im Diagramm schneidet, entspricht der Volumengleichheit. Dieser Schwellwert war je nach Dekonvolutionsparameter anders. Bei optimaler Dekonvolution sollte sich die Kurve so an den berechneten Schwellwert anschmiegen, dass sie möglichst flach die Gerade schneidet. Geht man z. B. von einem Intervall $\pm 10\%$ um das konstante Volumen herum aus, so lässt sich der Bereich bestimmen, in dem eine experimentelle Volu-

menkurve liegt. Je größer dieser Bereich, desto besser waren die Dekonvolutionsparameter (Abb. 2-6).

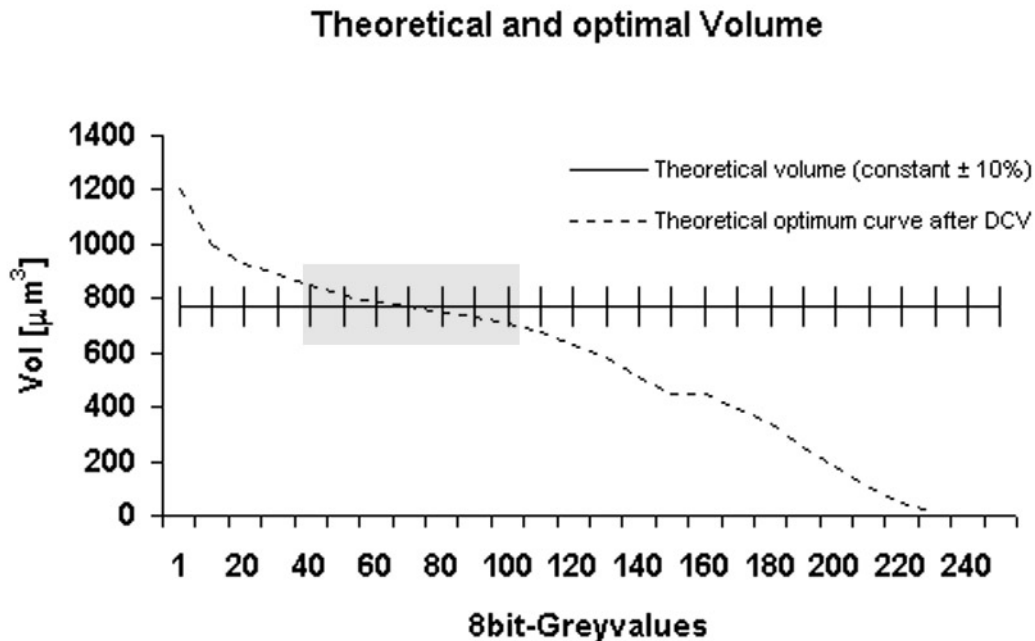


Abb. 2-6 Theoretische und optimale Volumenkurve. Das konstante theoretische Volumen eines Lymphozyten wurde aus seinem Radius anhand der DAPI-Färbung gemessen und berechnet. An jeder Seite wurden 10% als Konfidenzintervall angegeben. Eine optimal experimentelle Volumenkurve wäre in etwa volumengleich im Intervall von 40 bis 100 Grauwerten. Sie wurde stellvertretend für eine gemessene Kurve frei eingezeichnet.

Relative Energy Regain (RER)

Diese Messung beschreibt die Differenz eines entfalteten Bildes im Vergleich zu seinem Originalbild im Sinne seiner Wellenzusammensetzung („Energiegehalt“) im Fourierraum (Heintzmann 1999). Sie ist kein einzelner Wert, sondern eine Kurve, die beschreibt, bei welcher Raumfrequenz welche Wellen („Energie“) rekonstruiert werden konnte. Der RER-Graph kann nur berechnet werden, wenn das Originalbild bekannt ist.

Unter *Khoros* brauchte man eine bestimmte Fourier-Transformation (*floatfft*), weiterhin die Programme *magnitudes*, *ringtrans* und *expression*. Zunächst wurde *floatfft* auf den Originalbildstapel angewandt, gefolgt von *magnitudes* (Einstellung „Abs square“) und *ringtrans*. Dies ergab die gemittelte Kurve $E(r)$. Genauso wurde mit dem rekonstruierten Bild verfahren und schließlich die Differenz (rekonstr. Bild minus Originalbild) berechnet. So erhielt man die Kurve $\Delta E(r)$. Anschließend wurde der RER durch folgenden Term mit *expression* berechnet: $RER = (E(r) - \Delta E(r))/E(r)$. Es musste darauf geachtet werden, dass das Integral aller Grauwerte jedes Bildstapels gleich war. Dies wurde durch folgende Rechnung erreicht: mit dem *Khoros*-Programm *statistics* (Einstellung „Total integral“) wurden von beiden Bildstapeln die jeweiligen Integrale ihrer Grauwerte ermittelt und diese ins Verhältnis gesetzt $\int I_0 / \int I_d = f$ (mit I_0 : Intensitäten des Originalbildes, I_d : Intensitäten des entfalteten Bildes). Mit diesem

Faktor, wurde das entfaltete Bild multipliziert. Anschließend wurde das oben beschriebene Verfahren zur Bestimmung des RER-Wertes durchgeführt.

Der entsprechende *Khoros*-Workspace mit allen gerade beschriebenen Rechenschritten ist unter dem Namen *FigureOfMerit2.wks* abgespeichert. Eine Beispielkurve ist in Abb. 2-7 dargestellt. Auf der Abszisse wird der Frequenzbereich dargestellt, auf der Ordinate der „Relative Energy Regain“. Einer niedrigen Frequenz im Fourierraum entsprechen großräumige Strukturen im Bild (Ortsraum), einer hohen Frequenz entsprechen kleine Strukturen, wie Punkte, Kanten oder Linien. Die relative transmittierte Frequenz „1“ ist die kleinste durch die gegebene PSF (bzw. OTF) darstellbare Struktur. Alle Frequenzen darüber sind „out-of-band“ Information. Der Wert für den „Relative Energy Regain“ beträgt Eins für eine perfekte räumliche Rekonstruktion und Null für keine Veränderung zum Ursprungsbild. Z. B. verläuft die blaue Kurve bei tieferen Frequenzen viel länger in der Nähe von 1, als die rote. Artefakte können leicht erkannt werden, wenn der Graph in den negativen Bereich abrutscht (lila Kurve). Liegt der Graph für das rekonstruierte Bild oberhalb dem des Originalbildes, so hat der Dekonvolutionsalgorithmus Information wiedergewonnen. Dies bedeutet für das Bild meist eine Verstärkung kleinerer Strukturen und Kanten.

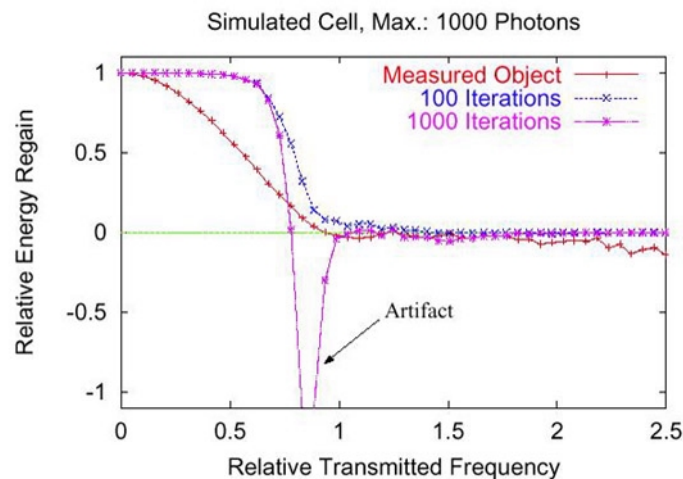


Abb. 2-7 Beispielgraph für eine Relative Energy Regain Kurve. Dargestellt ist Fig 5.2 aus Heintzmann (1999). Ein RER-Wert von 0 bedeutet keine Veränderung zum Ursprungsbild, 1 bedeutet perfekte räumliche Rekonstruktion. Auf der x-Achse ist der Frequenzbereich in relativen Einheiten angegeben. Der Bereich 0-1 bezeichnet die Frequenzinformation innerhalb des Bildes, der Bereich über 1 (hier dargestellt bis 2,5) die „Out-of-band“ Information. Diese kann von Dekonvolutionsprogrammen (teilweise) wieder restauriert werden. Eine erfolgreiche Rekonstruktion kann man beispielsweise an der blauen und lila Kurve erkennen, in dem Bereich, in dem die beiden Kurven über der roten Originalbildkurve liegen.

2.8 Klassifikation mit *mfish3d*

2.8.1 Allgemeines zu *mfish3d*

Der verwendete Algorithmus für eine farbbasierte Klassifikation wurde von K. Saracoglu (AG Intelligente Bioinformatiksysteme, DKFZ Heidelberg) entwickelt (Saracoglu 2001). Er beruht auf der Unterscheidung von Farbwinkeln. Man kann jeden Pixelgrauwert als Vektor vom Ursprung mit der Intensität als Endpunkt auffassen. Da diejenigen Pixel, welche Information enthalten, z. B. ein markiertes Territorium, alle ähnliche Intensitäten besitzen, können sie zusammengefasst und ein mittlerer Vektor berechnet werden. Dies wurde für jeden Kanal durchgeführt. Durch diese Clusterung relevanter Bildbereiche in sogenannte Regionen ergibt sich auch eine Komprimierung der Daten (~3000 Pixel → 100-300 Regionen) und eine Rauschunterdrückung, weil einzelne helle Pixel (Folge von Rauschen oder Noise) in einer dunklen Umgebung durch den Mittelwert schwächer wurden. Der Vergleich der Winkel zwischen den Regionenvektoren war das entscheidende Kriterium.

Beispiel: In einem Zellkern wurden drei unterschiedliche Chromosomen angefärbt, mit den Fluorochromen FITC (grün), Cy3 (rot) und Cy5 (blau). Die Farbintensitäten, dargestellt in einem 3D-Koordinatensystem, ergaben in jedem Kanal eine Intensitätswolke (Abb. 2-8).

Das Bild wird zuerst in Regionen zerteilt, welche aus Pixel gleicher Intensität bestehen. Die Vektoren zu jeder Farbregion können ebenfalls dargestellt werden (Abb. 2-9). Der mittlere Intensitätsvektor wird berechnet und der Winkel zwischen den Vektoren bestimmt. Setzt man das Winkelkriterium z. B. auf 45° , so werden alle Regionen als zu einem CT zugehörig klassifiziert und zusammengefasst, deren Winkel sich um weniger als 45° unterscheidet.

Der theoretische Winkel bei einer Einfachmarkierung wie in diesem Fall betrug $\alpha = 45^\circ$, er wurde normalerweise jedoch kleiner gewählt (5° - 15°) und musste empirisch ermittelt werden.

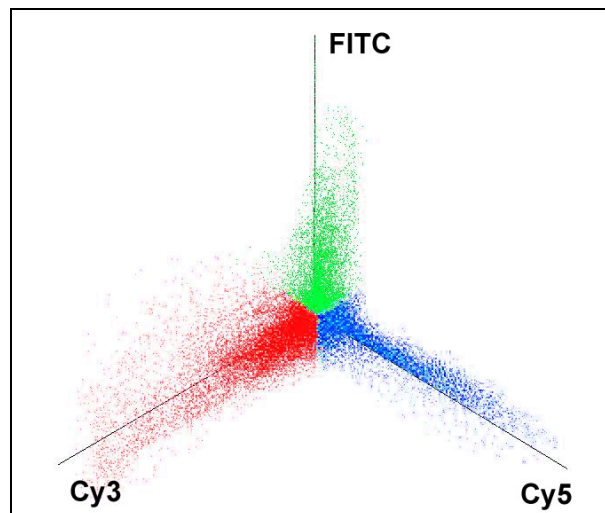


Abb. 2-8 Verteilung der Pixelintensitäten aus einem Bild mit 3 Kanälen (FITC, Cy3, Cy5), dargestellt in einem 3D-Koordinatensystem. Die Punktwolke entlang einer Achse entspricht den Intensitäten von 0-255 in einem Kanal.

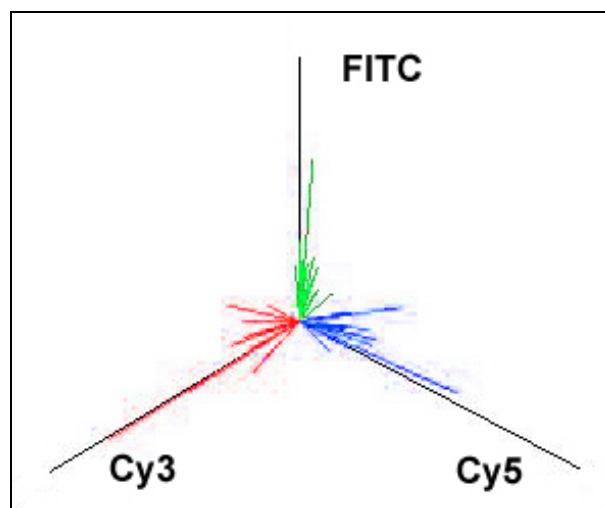


Abb. 2-9 Vektoren zu jeder geclusterten Farbregion. Der Winkel zwischen den Farbregionen muss voreingestellt werden und beträgt in diesem Falle dreier Einzelmarkierungen 45° .

2.8.2 Klassifikation von M-FISH Bildstapeln mit dem Programm

mfish3d

Die Klassifikation mit *mfish3d* erfolgte auf einer Silicon Graphics O₂-Workstation (Betriebssystem IRIX 6.2) mit 640 MB RAM. Die Zeit für einen Durchlauf eines Bildstapels mit z. B. 25 Bildern und fünf Kanälen betrug etwa vier Minuten. Der Aufruf des Programms *mfish3d* erfolgte im Zeilenmodus einer *shell*:

```
mfish3d <image1> <image2> <image3> ... <out-image> [Dapi-image]
```

Bsp.: *mfish3d* *Sg/5kernsg* *Cy3/5kern3cy* *Cy5/5kern5cy* *5kern10epiTEST* *Dapi/5kernd*

In dem Ordner, von dem aus *mfish3d* gestartet wurde, mussten außer den Bildstapeln zwei weitere Dateien vorhanden sein, mit denen Parameter an das Programm übergeben werden konnten: *classes* und *menu*. In der Datei *classes* stand die binäre Kombination der Fluorochrome für die einzelnen Chromosomen in der folgender Art:

```

1  1,0,0
2  0,1,1
3  1,1,1

```

...

Dies bedeutete, dass Chr. 1 mit dem ersten Fluorochrom markiert ist und mit keinem weiteren, Chr. 2 mit Fluorochrom 2 und 3, Chr. 3 mit allen drei Fluorochromen gleichzeitig, usw. Dieser Eintrag musste dem jeweiligen experimentellen Markierungsschema entsprechen. Die Falschfarben für die klassifizierten Chromosomen waren fest im Programm kodiert und konnten nicht verändert werden.

In der Datei *menu* standen alle Parameter, welche dem Programm mitgegeben werden konnten. Die drei wichtigsten waren *angle*, *background* und *minsize*:

ANGLE [0 - 90]	Ähnlichkeitsmass = Winkelunterschied in der Farbrichtung. Je mehr Farben, desto kleiner muss der Winkel sein. Winkel = 0 bedeutet „nehme alle direkt benachbarten Pixel“.
BACKGROUND [float, 1 - ...]	Faktor für die Subtraktion des Hintergrunds in Einheiten der Standardabweichung, d. h. Pixel mit Grauwerten kleiner als z. B. 2·SD des Bildes werden als Hintergrund unterdrückt.
MINSIZE [int, 1 - ...]	Falls die Anzahl der Pixel in einer Klasse kleiner als MINSIZE ist, geht das Programm davon aus, dass die Klasse nicht vorhanden ist. Hier kann man zusammenhängende Bereiche ausschließen, deren Größe unterhalb einer gewissen Schwelle liegen. Man kann diesen Parameter verwenden, um Überlappungsbereiche zu entfernen. Null (0) bedeutet ausgeschaltet.

Nach dem Programmablauf wurden die klassifizierten Dateien Ebene für Ebene im TIF-Format (**.tif*) exportiert. Zusätzlich wurde eine Datei ausgegeben, welche die Visualisierung des Kerns in 3-dimensionale Ansicht im Inventor-Format (**.iv*) ermöglichte. Die berechneten Schwerpunkte der einzelnen Chromosomen und des Zellkernmittelpunktes wurden in zwei Dateien geschrieben (*regions* und *dapiregions*), in das Tabellenkalkulationsprogramm *Excel* importiert und in der Datei *regions.xls* zusammengefasst.

Trotz der prinzipiellen Intensitätsunabhängigkeit des Klassifikationsverfahrens aufgrund der Winkelunterscheidung der Farbvektoren bereitete die Zuordnung manchmal Schwierigkeiten. Je nach Qualität der Bilder mussten die drei oben genannten Parameter *angle*, *background* und *minsize* in den Experimenten unterschiedlich verändert und die korrespondierenden Ergebnisse überprüft werden. Dies stellte sich im Verlauf der Arbeit als schwierig heraus, denn wurden, sobald man z. B. den *background* änderte, zuvor falsch klassifizierte Chromosomen richtig identifiziert, erhielten andere CT im Zuge dieser Umstellung eine falsche Zuordnung. Darüberhinaus gelang diese Überprüfung bei M-FISH Experimenten nur mit wenigen Chromosomen, welche in der Interphase ein spezielles Muster erkennen ließen und somit leicht zu identifizieren waren: Y (starkes Hybridisierungssignal im Cy3.5 Kanal), 19 (starkes Hybridisierungssignal im Sg Kanal), 2 (größte Hybridisierung im Cy5/Cy5.5 Kanal) und 1 (größte Hybridisierung im Deac/Sg Kanal). Bei den anderen CT war unbekannt, ob man mit der Parameteränderung eine Verbesserung der Ergebnisse erreicht hatte. Dennoch wurde davon ausgegangen, dass wenn diese vier erkennbaren Chromosomen richtig klassifiziert wurden, die Mehrheit der anderen Chromosomen ebenfalls korrekt waren.

Damit kein einziges falsch klassifiziertes CT Eingang in die Ergebnistabelle findet, wurden alle von *mfish3d* ermittelten Schwerpunkte mit den Originaldaten überprüft. D. h. pro Zellkern wurde 46 mal die Frage gestellt „Kann diese Klassifizierung mit den Originaldaten übereinstimmen?“. Der zu überprüfende Schwerpunkt wurde mit den Hybridisierungssignalen aus den Originalbildern der jeweiligen Kanäle verglichen. Es ergab sich ein „Bestimmungsschlüssel“ (Kapitel 2.8.4, S. 76), der gute Resultate bezüglich dieser Entscheidungsfindung brachte. Konnte ein Klassifikationsergebnis bestätigt werden, wurde der Schwerpunkt aus der Tabelle *regions.xls* in die Tabelle *regions_results.xls* kopiert. Bei einer falschen oder unsicheren Klassifikation wurde der Wert weggelassen. Einen Sonderstatus hatten diejenigen CT, welche so nah nebeneinander lagen, dass sie nur noch als ein großes Territorium erschienen. Hier wurden die Schwerpunkte visuell zugeordnet. Wurde nur eine Region für ein bestimmtes Chromosom in einem Kern gefunden und es war aufgrund der Größe nicht erkennbar, ob zwei Territorien vorlagen, wurde nur ein Schwerpunkt zugeordnet. Das bedeutet, dass Homologenassoziationen möglicherweise unterrepräsentiert sein könnten.

2.8.3 Klassifikation eines Bildstapels aus der virtuellen Mikroskopie

Eine Schwierigkeit für eine automatische Klassifikation ist der Überlappungsbereich zweier CT. Hier entstehen Zonen, in denen Fluorochrome aus unterschiedlichen Kanälen so ineinanderstrahlen, dass sie eine legitime Kombination des Markierungsschemas ergeben können. Dieser Zone wird dann von der automatischen Klassifizierung eine Falschfarbe zugeordnet, die an dieser Stelle nicht auftreten dürfte.

Um den Anteil solcher Überlappungsbereiche zu messen, wurde der simulierte Bildstapel „GK-3Fluor-7Chr“ (S. 79) klassifiziert. Er enthält 7 Chromoso-

men, die mit einer Kombination von 3 Fluorochromen markiert sind. Das Markierungsschema ist in Tab. 2-9 (S. 79) dargestellt, ein 3D Rendering Modell der einzelnen Kanäle und ihre Projektion an die Seitenwände findet sich in Abb. 2-10 (S. 79).

Die farbigen *mfish3d* Ergebnisbilder wurden einer Aufspaltung in Farbe (Hue), Sättigung (Saturation) und Helligkeit (Brightness) des HSB-Farbmodells unterzogen. Das Hue-Bild enthielt die verschiedenen Farben des Ergebnisbildes als verschiedene Grauwerte, jede Farbe für sich jedoch mit einem einheitlichen Grauwert. Damit wurde es durch geschickte Schwellwertsetzung möglich die klassifizierten Farben in 8bit Grauwertbilder zu überführen und zwar so, dass jede Klassifikationsfarbe einen eigenen Kanal bekam. Anschließend wurden die Bilder völlig binärisiert, d. h. die Klassifikationsfarbe wurde weiß und der Hintergrund schwarz gesetzt. Entsprechend den sieben klassifizierten Farben ergaben sich nach dieser Prozedur sieben Kanäle, welche das Klassifikationsergebnis in binärer Form in sich trugen. Nun konnte das aus den Originalbildern bekannte CT von diesen Bildstapeln subtrahiert und die Anzahl der übriggebliebenen Pixel gemessen werden. Sie stellten den „automatisch klassifizierten Überlapp außerhalb der eigentlichen Territorien“ dar. Der Prozentsatz im Verhältnis zu dem CT der gleichen Farbe, sowie der Prozentsatz zu allen CT wurde bestimmt. Diese Bildverarbeitungsschritte wurden mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt.

2.8.4 Bestimmungsschlüssel für M-FISH Bilder

Da die Parameter bei der Klassifikation mit *mfish3d* nicht immer optimal eingestellt werden konnten, wurden alle Zuordnungen, welche das Programm durchgeführt hat, nochmal überprüft. Mithilfe der Originaldaten und des DAPI-Bildes konnte in der Regel eine Klassifikation nachvollzogen werden. War das Ergebnis nicht eindeutig oder falsch, wurde der Schwerpunkt weggelassen. Aus diesen immer wiederkehrenden Entscheidungen ergab sich ein „Bestimmungsschlüssel“. Er gilt nur für das in Tab. 2-2 b (S. 49) dargestellte M-FISH Markierungsschema, nicht für ReFISH.

Darüberhinaus wurde festgehalten, welches CT wie bestimmt wurde (*mfish3d* UND / ODER *visuell*), um eine Abschätzung dieser Zahl zu bekommen.

Ausgangspunkt für den Bestimmungsschlüssel war eine klassifizierte Region, die überprüft werden sollte (die Zahl am Schluss jeder Zeile weist auf die Nummer der nächsten Zeile):

- (1) Ermittlung der zwei Kanäle, die ein Chromosom eindeutig bestimmen sollten, z. B. Cy5 + Cy5.5 für das Chromosom2 (Tab. 2-2). (2).
- (2) HINWEIS 1: Übereinanderlagerung der zwei Kanäle, welche ein CT eindeutig bestimmen. In einem Bildverarbeitungsprogramm (z. B. *Adobe Photoshop*) werden den s/w-Bildern zwei komplementäre Falschfarben-Paletten zugeordnet, z. B. rot dem ersten Bild und grün dem zweiten er-

- gibt einen Überlappbereich gelb. Ist ein gelber Überlappbereich vorhanden? (3).
- (3) HINWEIS 2: Direkter Vergleich der originalen Grauwert-Bilder vom Mikroskop, sowie der Grauwert-Bilder nach Dekonvolution z. B. mit dem Programm *IrfanView*. Ausschluss eines eventuellen Rauschens, bzw. einer offensichtlicher Verschmutzung. Ist ein gemeinsamer Bereich in beiden Bildern vorhanden?Ja (8), Nein (4).
- (4) HINWEIS 3: Chr Y ist aufgrund seines äußerst starken Hybridisierungssignals im Cy3.5-Kanal leicht als solches zu erkennen (van Dekken et al. 1989).Ja (8), Nein (5).
- (5) HINWEIS 4: Chr 2 ist aufgrund des äußerst großen Hybridisierungsgebietes im Cy5- und Cy5.5-Kanal leicht als solches zu erkennen.Ja (8), Nein (6).
- (6) HINWEIS 5: Chr 1 ist aufgrund des äußerst großen Hybridisierungsgebietes im Deac- und Sg-Kanal leicht als solches zu erkennen (van Dekken et al. 1989).Ja (8), Nein (7).
- (7) HINWEIS 6: Chr 19 ist aufgrund des äußerst prägnanten Hybridisierungssignals im Sg-Kanal leicht als solches zu erkennen. (8).
- (8) HINWEIS 7: Falschfarbe der automatischen Klassifizierung durch *mfish3d*. Wurden CT von dem Programm bestimmt? ... Ja (9), Nein (14).
- (9) Ergebnis *mfish3d*: 2 eindeutige Farbsignaturen, welche den beiden CT in der Interphase entsprechen. (12).
- Konnte nur eine eindeutige Region bestimmt werden:
- (10) Wenn das Volumen, bzw. die Größe des CT viel größer ist, als in den übrigen Kernen, wurde davon ausgegangen, dass die 2 Homologen nebeneinander liegen und es wurden 2 Koordinaten visuell festgelegt. ... (15).
- (11) Keine Unterscheidung der Homologen möglich, da sie zu nah beieinander liegen. D. h. es gibt dann nur eine Koordinate, die evtl. falsch ist, aber dieser Fehler ist nur geringfügig, wegen der sowieso nahen Nachbarschaftsbeziehung. (17).
- (12) HINWEIS 8: Centromere im DAPI-Kanal: Entscheidungshilfe bei Chr. 1 und Chr. 9, weil die Centromere sehr eindeutig zu erkennen sind. Liegen prominente Centromere neben / in den als Chr. 1 oder Chr. 9 klassifizierten Arealen? (13).
- (13) Auswertung der Ergebnistabelle *regions*, die das Programm *mfish3d* ausgibt. Sind die Koordinaten für die visuell bestimmten CT vorhanden?
-
Ja, eine Koordinate (17).
Ja, zwei Koordinaten.....(18).
Nein (14).

- (14) Sind die Signale in den Originaldateien so überzeugend, dass von einer falschen Klassifizierung des Programms ausgegangen werden muss? -
Ja 0.
Nein ... (16).
- (15) Die Koordinaten der CT-Schwerpunkte werden visuell bestimmt und in die Ergebnistabelle *regions_results.xls*. eingetragen.
- (16) Kein Eintrag in die Ergebnistabelle *regions_results.xls*.
- (17) Eintrag eines Wertes für ein homologes CT in die Ergebnistabelle *regions_results.xls*.
- (18) Eintrag zweier Werte für beide homologe CT in die Ergebnistabelle *regions_results.xls*.

2.9 Computersimulationen

Alle simulierten Zellkerne wurden von G. Kreth (Kirchhoff Institut für Physik, Heidelberg) modelliert. Die CT wurden in einer iterativen Monte - Carlo - Prozedur berechnet (Kreth et al. 1998). Jede Simulation begann in der Metaphaseplatte, in der zur Vereinfachung angenommen wurde, die Chromosomen seien verschieden große Stäbchen innerhalb des Zellkerns. Die Berechnung liess jedes Chromosom mittels positiven und negativen Federkräften zu einem Chromosomenterritorium dekondensieren bis der Zellkern ausgefüllt war.

Es wurden 2 Datensätze berechnet: (i) Visualisierung der beiden Chr. 12 - Territorien und (ii) ein kombinatorischer Ansatz, in dem sieben Chromosomen mit drei Fluorochromen markiert wurden.

2.9.1 Zwei einzelne Territorien

Dieser Datensatz diente zu Testzwecken der Dekonvolution. Der Abbildungsmodus entsprach dem eines konfokalen Mikroskops, die Voxelgrößen waren:

xy: 40 nm, z: 156 nm.

Um eine konfokale Aufnahme zu simulieren, wurden die digitalisierten Bilder mit einer PSF gefaltet und anschließend Noise eingebracht (eine Abbildung ist auf der CDROM zu diesem Kapitel zu finden). Beides geschah innerhalb der Programmoberfläche *Khoros*: Für die Faltung wurde das Programm *floatconv* verwendet. Zuvor mussten die beiden Bildstapel (Bild und PSF) mit dem Programm *rescale* auf eine z-Größe normiert werden (der größere der beiden Bildstapel musste mit dem z-Verhältnissfaktor < 1 skaliert werden, Einstellung „Interpolation method fft-based“). Dem jetzt gefalteten Bild wurde Poisson-Noise mit dem Programm *possit* zugegeben, anschließend wurden alle Werte < 0 abgeschnitten (*clipbelow*) und auf 0-255 Grauwerte normalisiert (*normalize*). Die Prozedur ist in dem *Khoros*-Workspace *Img_convolve.wks* abgespeichert.

2.9.2 Kombinatorischer Ansatz mit 3 Fluorochromen

Dieser kombinatorische Ansatz, in dem 7 Chromosomen mit 3 Fluorochromen markiert waren, diente zum Testen der Klassifikation mit dem Programm *mfish3d*. Die Parameter entsprachen denen des vorigen Kapitels. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird dieser Datensatz „GK-3Fluor-7Chr“ genannt.

Das Markierungsschema ist in Tab. 2-9 dargestellt, ein 3D Rendering Modell der einzelnen Kanäle und ihre Projektionen an die Seitenwände findet sich in Abb. 2-10.

Kanal	Chromosomen						
	1	2	3	4	5	6	7
grün		x		x		x	x
rot	x			x	x		x
blau			x		x	x	x

Tab. 2-9 Markierungsschema des simulierten kombinatorischen Experiments, in dem 7 Chromosomen mit 3 Fluorochromen markiert waren. Die Kanäle heißen hier „grün, rot, blau“, um zu verdeutlichen, dass das Experiment nicht an einem wirklichen Mikroskop aufgenommen wurde. Dort würden sie den Kanälen Fitc, Cy3 und Cy5 entsprechen.

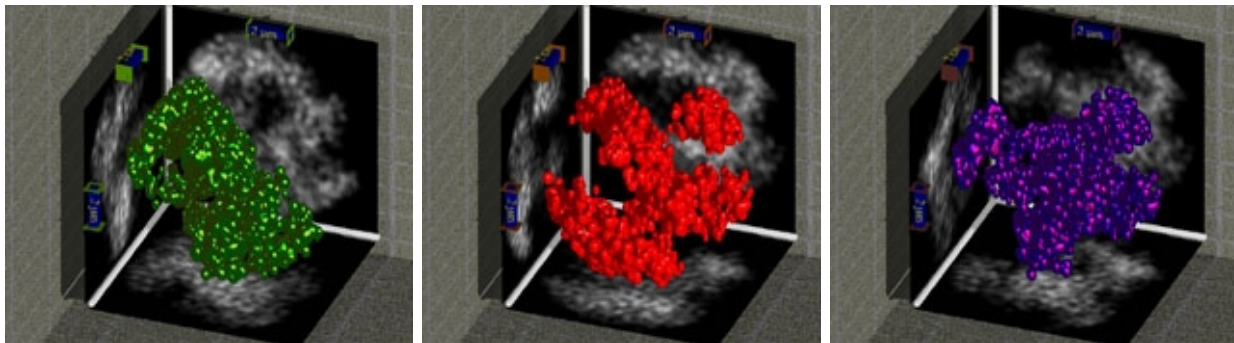
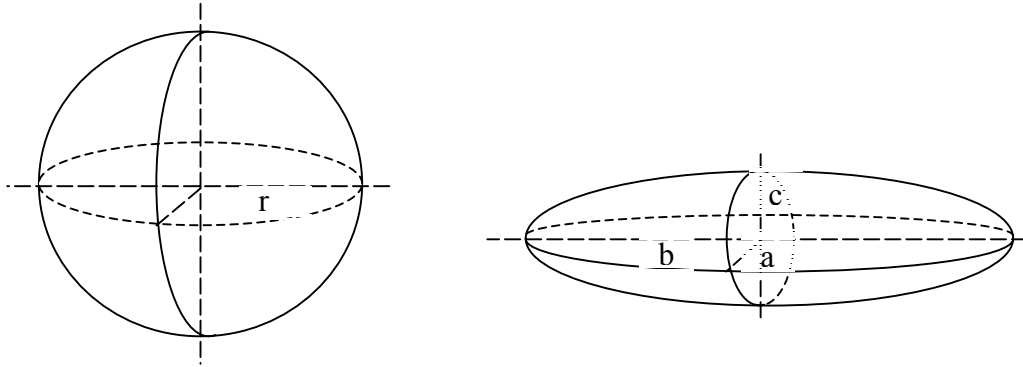


Abb. 2-10 3D Rendering der drei Kanäle „grün, rot und blau“ aus dem kombinatorischen Datensatz „GK-3Fluor-7Chr“. Projektionen an den Seitenwänden. Man erkennt mithilfe des Markierungsschemas beispielsweise in der rechten oberen Ecke des roten und blauen Kanals eines der beiden CT des Chr. 5.

2.10 Formeln und Vektorrechnung

Geometrische Formeln

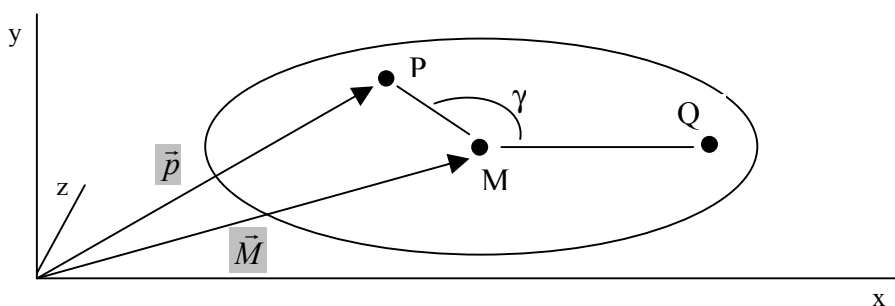


Kugelvolumen	$V = \frac{4}{3} \pi r^3$	Gleichung 2-9
--------------	---------------------------	---------------

Ellipsenvolumen	$V = \frac{4}{3} \pi abc$	Gleichung 2-10
-----------------	---------------------------	----------------

mit r Radius
 a, b, c Halbachsen

Polarkoordinaten und Vektorrechnung



Entfernung zweier Punkte	$d = \sqrt{(x_p - x_q)^2 + (y_p - y_q)^2 + (z_p - z_q)^2}$	Gleichung 2-11
--------------------------	------------------------------------------------------------	----------------

mit $P(x, y, z)$ Punkt P mit den Koordinaten
 $Q(x, y, z)$ Punkt Q mit den Koordinaten

Aus dem Skalarprodukt (Gleichung 2-12) ergibt sich durch Einsetzen und Umformung der Winkel zwischen zwei Mittelpunktsgeraden (Gleichung 2-13):

Skalarprodukt	$(\vec{p} - \vec{M})(\vec{q} - \vec{M}) = p q \cos \gamma$	Gleichung 2-12
---------------	----------------------------------------------------------------	----------------

Winkelberechnung	$\cos \gamma = \frac{\sum (p - M)(q - M)}{ \vec{p} - \vec{M} \vec{q} - \vec{M} }$	Gleichung 2-13
------------------	-------------------------------------------------------------------------------------	----------------

mit $\sum (p - M)(q - M) = (x_p - x_M)(x_q - x_M) + (y_p - y_M)(y_q - y_M) + (z_p - z_M)(z_q - z_M)$
 $|\vec{p} - \vec{M}| = \sqrt{\sum (x_i - M_i)^2} = \sqrt{(x_p - x_M)^2 + (y_p - y_M)^2 + (z_p - z_M)^2}$
 $|\vec{q} - \vec{M}|$ analog

Transformation aller Punkte, so dass der Ursprung des Koordinatensystems im Zellkernmittelpunkt liegt:

Parallelverschiebung eines rechtwinkligen Koordinatensystems	$P'(x'; y'; z') = P(x; y; z) - M(x; y; z)$	Gleichung 2-14
--------------------------------------------------------------	--------------------------------------------	----------------

mit $P(x; y; z)$ Koordinaten des Punktes P im ursprünglichen System
 $M(x; y; z)$ Koordinaten des Mittelpunktes
 $P_{\min}(x_{\min}; y_{\min}; z_{\min})$ Koordinaten des Punktes P im neuen System

Transformation aller Punkte, so dass die Zellkerngröße auf eine mittlere Kerngröße gebracht wird:

Multiplikation der x-, y- und z-Komponenten einer Koordinate mit einer Konstante	$P'(x'; y'; z') = t_{a, b, c} \cdot P(x; y; z)$	Gleichung 2-15
----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------	----------------

mit $P(x; y; z)$ Koordinaten des Punktes P im ursprünglichen System
 $t_{a, b, c}$ Distanz der mittleren Zellkernachse im Verhältnis zur individuellen Zellkernachse: $t_a = \bar{a} / a$, $t_b = \bar{b} / b$, $t_c = \bar{c} / c$.
 $P_{\min}(x_{\min}; y_{\min}; z_{\min})$ Koordinaten des Punktes P im neuen System

Bestimmung des Winkels der langen Zellkernachse zur x-Achse, durch die beiden Punkte am jeweiligen Ende der langen Zellkernachse (nur in xy-Richtung):

Richtung der Strecke	$\tan \alpha = m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$	Gleichung 2-16
----------------------	-------------------------------------------------	----------------

mit Endpunkt1 $x_1; y_1$
 Endpunkt2 $x_2; y_2$

Transformation der Schwerpunktskoordinaten, so dass die lange Zellkernachse die x-Achse bildet (nur in xy-Richtung):

XY-Koordinatentransformation um einen Winkel	$x' = \cos \alpha \cdot x - \sin \alpha \cdot y$ $y' = \sin \alpha \cdot x + \cos \alpha \cdot y$	Gleichung 2-17
----------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------

mit $P(x;y)$ Koordinaten des Punktes P im ursprünglichen System
 $P_{\min}(x_{\min};y_{\min})$ Koordinaten des Punktes P im neuen System
 Die Drehrichtung ist mathematisch positiv gemeint, d. h. z. B. -70° ist eine Drehung im Uhrzeigersinn.

2.11 Statistische Auswertung

Signifikanztest zwischen experimentellen und Modelldaten

Wurden die wie oben ermittelten Modell-Vergleichskurven mit den experimentell gewonnenen Verteilungsfunktionen verglichen, ließen sich Aussagen hinsichtlich der zufälligen Verteilung der untersuchten Chromosomenregionen treffen. Mithilfe des zweiseitigen Kolmogorov-Smirnov-Tests (Young 1977) ließ sich anhand der Größe der Abweichung der experimentellen Kurve von der Modellkurve das Signifikanzniveau der Abweichung bestimmen.

Signifikanzniveaus

Um Überinterpretationen der Schwankungen zu vermeiden, wurden die folgenden drei Signifikanzniveaus herangezogen:

ns: $p > 0,01$ nicht signifikant, *: $p < 0,01$ signifikant, **: $p < 0,001$ hoch signifikant, ***: $p < 0,0001$ höchst signifikant.

Das heißt ein p-Wert größer als 1% wurde als nicht signifikant gewertet und erst ein p-Wert kleiner als 0,1% als sehr signifikant.

Test auf Normalverteilung

Um eine experimentelle Verteilung auf Normalverteilung zu testen, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest (Sachs L. 1968) mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors, bei Stichproben kleiner als 50 der Shapiro-Wilks-Anpassungstest, verwendet.

Multidimensionale Skalierung (MDS)

Mithilfe einer Multidimensionalen Skalierung (MDS) ist es möglich Unterschiede in distanzähnlichen Daten zu finden (Rohlf et al. 1980). Der Zweck ist eine Landkarte der Schwerpunkte so zu konstruieren, dass sich ihre euklidischen Abstände in ihren relativen Positionen widerspiegeln. MDS analysiert die Daten in einer Weise, welche die Struktur als geometrisches Bild ausgibt. Das bekannteste Beispiel ist eine Entfernungstabelle, welche die Entfernung in Kilometern zwischen unterschiedlichen Städten Deutschlands zeigt. Jede Stadt

ist einmal auf der x-Achse und einmal auf der y-Achse aufgetragen. Am genauen Kreuzungspunkt beträgt die Entfernung „0“. Die Hälfte aller Zellen enthält die Distanzen zwischen den beiden Städten, die andere Hälfte bleibt leer, da die Matrix spiegelsymmetrisch ist. Das Statistikprogramm *SPSS* kann aus solch einer Tabelle durch Berechnung der relativen Abstände eine Landkarte Deutschlands konstruieren. Die Daten müssen in einer quadratischen und symmetrischen Art vorliegen und werden dann vollautomatisch berechnet. Der Ergebnisplot enthält nicht mehr die Originalskalierung, sondern die standardisierte Skalierung, die Einheiten sind dimensionslos. Eine Standardisierung erhält man durch die Gleichung 2-18. Alle Statistiken wurden mit dem Programm *SPSS* (Version 11) berechnet.

Standardisierung	$z = \frac{x - MW}{SD}$	Gleichung 2-18
------------------	-------------------------	----------------

mit x Wert des konkreten Falls
 MW Mittelwert
 SD Standardabweichung

2.12 Spezielle Hersteller

Amersham Pharmacia (<http://www.apbiotech.com>)

Biorad (<http://www.microscopy.bio-rad.com>)

Carl Zeiss GmbH, Göttingen (<http://www.zeiss.com> ; <http://www.zeiss.de>)

Chroma Technology Corp. (<http://www.chroma.com>)

Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd, Cambridge, UK (<http://www.leica-microsystems.com>)

Molecular Probes (<http://www.molecularprobes.com>)

Nikon (<http://www.nikon.com>)

Roche (<http://www.roche.com>)

2.13 Software

Adobe Systems Inc. 1984-1999 (<http://www.adobe.com/> ; <http://www.adobe.de/>)

Photoshop V 5.5

Acrobat V 4.0

Distiller V 4.0

Carl Zeiss Vision (<http://www.zeiss.de>)

KS 400 V 3.0

3D for LSM V 1.4.1b

Axiovision V 3.1.0.18, Release 3.1

Corel Corporation (<http://www3.corel.com>)
CorelDRAW V 8.0

ISI Research Software (<http://www.endnote.com/>)
Endnote V 4.0

Khoral Inc (<http://www.khoral.com/>)
Khoros V 2.2

Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd, 1990-2000 (<http://www.leica-microsystems.com>)

Leica QWin Version V 2.0
Leica MCK Version Y1.3 Beta 1
Leica QFISH Version V 2.3a
Leica QFLUORO Version V 1.0b

Microsoft Inc. (<http://www.microsoft.com/> ,
<http://www.microsoft.com/germany/>)
Windows NT V 4.0 (Build 1381; SP 5)
Excel 2000 (Version 9.0.2812)
Word 2000 (Version 9.0.2812)
PowerPoint 2000 (Version 9.0.2716)

Scientific Volume Imaging (SVI) b.v. (<http://www.svi.nl/>)
Huygens2 V 2.2.1 p2

Silicon Graphics Inc (<http://www.sgi.de/>)
OS IRIX 6.2

SPSS für Windows (<http://www.spss.com/>)
Release 11.0.1

TGS Inc. (<http://www.tgs.com/>)
Amira V 2.2

T.I.L.L. Photonics GmbH, 1996-2001 (<http://www.till-photonics.com/>)
TILLvision V 4.00 build: 4724

Public Domain Software

DKFZ Heidelberg, Arbeitsgruppe Intelligente Bioinformatiksysteme (<http://www.dkfz-heidelberg.de/ibios/>)

Kaan Saracoglu mfish3d

Rasband, Wayne Image J V 1.23y (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)

Image MagickTM (<http://www.imagemagick.org/>)

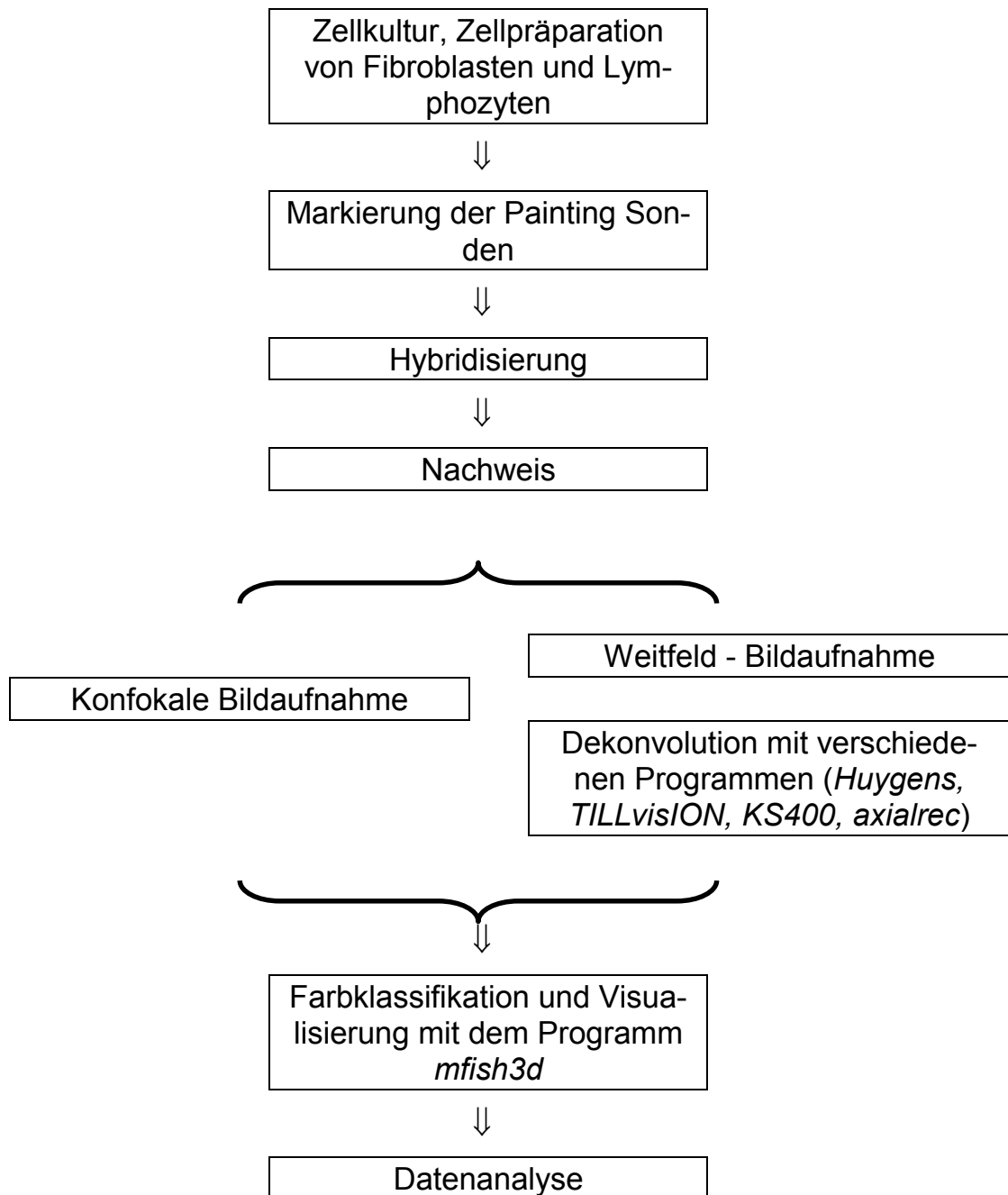
Irfan, Skiljan Irfan View V 3.36 (<http://www.irfanview.com/>)

Red Hat Inc. (<http://www.cygwin.com/>)
CygWin V 1.3.1

Scion Corporation, 1997-2000 (<http://www.scioncorp.com/>)
Scion Image V Beta 4.0.2

3. ERGEBNISSE

Schematischer Ablauf der Experimente und Methoden:



3.1 Zellen, Painting Sonden und Klassifikation von Metaphasen

3.1.1 Zellsynchronisation und -präparation

In dieser Arbeit wurden primäre menschliche 46, XY Fibroblasten (HDF) und periphere 46, XY Blutlymphozyten (PBL) verwendet. Die HDF stammten aus einer Vorhautsektion, die PBL aus frisch entnommenen Blut Erwachsener. Beide wurden in vitro kultiviert.

Fibroblasten

Um Zellen zu erhalten, die sich in der G₀-Phase befinden, wurden Fibroblasten nach dem Einsetzen in Kulturflaschen bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Wie aus Zellzählungen nach bestimmten Zeitpunkten ermittelt wurde, beträgt die Verdopplungszeit etwa 20-30 h (Engelhardt 2001). Konfluenz war erreicht, wenn die Zellen so dicht wuchsen, dass sie aneinander stießen (für ein Durchlichtbild einer konfluenten Fibroblastenkultur siehe Nagele et al. (1999), oder die Datei „Nagele_etal99_JCS_FiG2.jpg“ auf der CDROM zu diesem Verzeichnis; für ein Durchlichtbild einer wachsenden Zellkultur mit einer Prometaphaserosette „rosette9.jpg“). Zellen einer konfluenten Kulturschale befinden sich in der G₀-Phase des Zellzyklus (Nagele et al. 1999). Wie die Fibroblasten selbst, sind auch ihre Zellkerne flach und oval von Gestalt und haben im Durchmesser etwa die Abmessungen 15 - 20 µm × 7 - 10 µm × 3 - 5 µm. Sie flachen sich beim Eintritt in G₀ etwas ab.

Mit dem Antikörper Ki-67, der ein Epitop eines Proteins unbekannter Funktion im Zellzyklus erkennt (Endl und Gerdes 2000), konnte durch Mustervergleich eine Zuordnung in G₁-, S- und G₂-Phase erfolgen (Engelhardt 2001). In der G₀-Phase ist keine Färbung erkennbar. Die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen lag bei wachsenden Kulturen bei etwa 50%, in konfluenten Zellkulturen traten sie nur vereinzelt auf. Dies demonstrierte, dass sich in einer konfluenten Kulturflasche so gut wie alle HDF in der G₀-Phase befanden.

Den Zellzyklusstatus in einer Kulturflasche ergaben ebenfalls Messungen im FACS. Wurde eine logarithmisch wachsende Kulturflasche abtrypsiniert, fixiert und mit Propidiumjodid als Gesamt-DNA-Farbstoff gefärbt, so wurde im FACS die klassische Größenverteilung für G₁-, S- und G₂-Phase beobachtet: eine Subpopulation (~ 40,5%) befand sich in der G₁-Phase, eine kleine Population (~ 4%) in der S-Phase und eine dritte große Subpopulation (~ 55,5%) in der G₂-Phase (für die Abbildung hierzu siehe „FACS_growing2.jpg“).

Das Diagramm einer konfluenten Kulturschale zeigte im FACS nur noch G₀-Zellen in einer einzigen Größenpopulation (~ 97%) (siehe „FACS_konfluent2.jpg“).

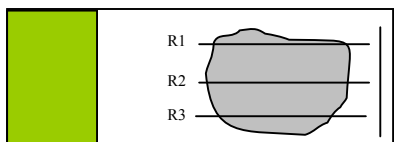
Prometaphaserosetten

Überprüft man das Wachstum der HDF regelmäßig, so stößt man bei einer wachsenden Kultur auf Prometaphaserosetten (Chaly und Brown 1988). Dieses Stadium dauert nur für einen sehr kurzen Zeitraum an und ist selten zu beobachten (siehe Tab. 3-1). Die Zellkerne der Fibroblasten kugeln sich zu Beginn der Mitose ab und die Chromosomen beginnen sich zu kondensieren (Prophase). Sie ordnen sich danach, schon deutlich als Chromosomen zu erkennen, in einer Ebene parallel zum Objektträger ringförmig an (Abb. 1-2, S. 22). In der Mitte scheint ein „Loch“ freigelassen zu sein. Mithilfe einer Anti-Centromer Färbung stellte sich heraus, dass eine modifizierte Rabl-Konfiguration vorliegt, d. h. alle Centromere zeigen nach innen, alle Telomere nach außen (Chaly und Brown 1988).

Lymphozyten

Zellkerne peripherer Blutlymphozyten (PBL) entsprachen der Form einer unregelmäßig geformten Kugel und waren kleiner als die der Fibroblasten (~ 10 µm im Durchmesser).

Die Präparation unterschied sich von der Zellkulturarbeit bei Fibroblasten. Aus dem Blut eines Erwachsenen wurden die PBL durch Ficoll®-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (siehe S. 42 und Solovei et al. 2002b). In ihrem ausdifferenzierten Status und natürlichem Umfeld befinden sich die meisten Lymphozyten in der G₀-Phase (Tashiro et al. 1996). Mit der Inkubation mit PHA (72 h bei 37°C) können sie zum erneuten Wachstum stimuliert werden und man erhält eine logarithmisch wachsende Lymphozytenkultur, in der auch Prometaphaserosetten vorkommen. Tab. 3-1 zeigt eine Häufigkeit von lediglich 1,2% Prometaphaserosetten innerhalb einer wachsenden Lymphozytenkultur.



Reihen	R1	R2	R3	Summe
Interphase	300	1089	141	1530
Rosetten	6	12	0	18
%	2.0%	1.1%	0.0%	1.2%

Tab. 3-1 Anzahl an Prometaphaserosetten auf einem Deckglas (Lymphozytenpräparation).

3.1.2 Entfernung von repetitiven Elementen aus Painting Sonden

Mit der in Kapitel 2.2.2.3 vorgestellten Methode „Repeat Depletion“ gelang es die repetitiven Elemente aus allen 24 menschlichen „whole chromosome painting“ (WCP)-Bibliotheken abzureichern (Bolzer et al. 1999).

Beurteilung der Güte der „Repeat Depletion“

Kriterien für eine erfolgreiche Abreicherung repetitiver Elemente waren:

- (1) eine spezifische Hybridisierung an das Zielchromosom ohne eine Zugabe von C₀t1-DNA und ohne „preannealing“

(2) ein Signal- zu Hintergrund-Verhältnis, das mit einer Hybridisierung mit C₀t1-DNA vergleichbar ist.

Ein Vergleich der Hybridisierungsmuster mit und ohne C₀t1-DNA ist in Bolzer et al. (1999) dargestellt (die Pdf-Datei liegt auf der CDROM dem Kapitel bei). Fig. 1a präsentiert dort die Hybridisierung der WCP Sonde 1 unter Standardbedingungen: es zeigte sich eine hoch spezifische Färbung beider Zielchromosomen. Für eine Beurteilung wurde der große heterochromatische Block (1q12) am proximalen Teil des langen Arms von Chr. 1 herangezogen. Hybridisierung unter Suppressionsbedingungen führte immer zu einer Lücke zwischen kurzen und langem Arm. Im Gegensatz dazu führte die gleiche Hybridisierung ohne C₀t1-DNA und ohne „preannealing“ zu einer Überbetonung dieses Heterochromatinblocks und desweiteren zu Kreuzhybridisierung auf den Chromosomen 9 und 16 (Fig. 1b). Die an repetitiven Elementen abgereicherte WCP Sonde 1 wies wieder das gleiche Signalmuster auf, wie die nicht-abgereicherte Sonde plus C₀t1-DNA (Fig. 1c). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten-Verhältnisse für die Chromosomen 1, 7 und 15 bestätigten die spezifische Hybridisierung.

Beurteilung der vollständigen Abreicherung

Obwohl die FISH Ergebnisse keine Hinweise auf zurückgebliebene repetitive Sequenzen zuließen, gab es Überlegungen, dass Reste in den Sonden zurückgeblieben waren, welche nicht mit FISH detektiert werden könnten. Würden diese Überbleibsel in aufeinanderfolgenden PCR Runden wieder amplifiziert werden, wäre die Qualität nach einigen PCR-Runden erneut minderwertig. Deshalb wurde versucht, die Menge an repetitiver DNA nach jeder Reamplifikationsrunde mittels Southern-Blot zu quantifizieren. Die Sonden 1 und 15 wurden vor und nach der „repeat depletion“ mehrere Male amplifiziert, nebeneinander auf ein Gel aufgetragen, geblottet und mit radioaktiv-markierter C₀t1-DNA hybridisiert. Nicht abgereicherte, normale WCP Sonden zeigten ein starkes Signal für C₀t1-DNA (Abb. 3-1 a). Dieses Signal wurde nach der „repeat depletion“ nicht mehr beobachtet. Auch nach vier aufeinanderfolgenden Reamplifikationen konnte keine C₀t1-DNA mehr detektiert werden. Dies bestärkte die Vermutung, dass einmal abgereicherte Sonden frei von repetitiven Elementen blieben, und nicht in erneuten PCR-Schritten reamplifiziert wurden.

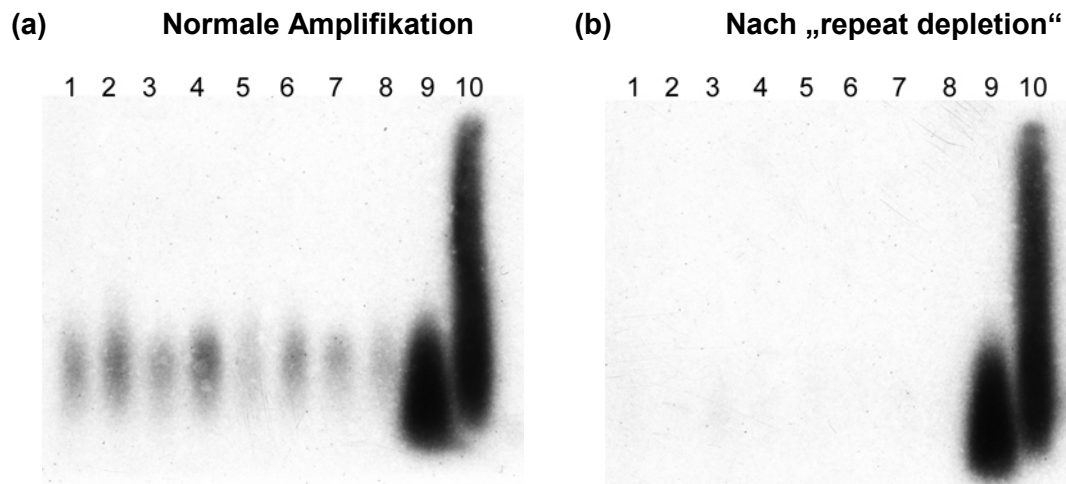
„Repeat depletion“ der Painting Sonden 1 und 15

Abb. 3-1 Beurteilung der Menge an repetitiven Sequenzen in den WCP-Bibliotheken 1 und 15. Hybridisierung von [³²P]-C₀t1-DNA. Aufgetragen wurden von links nach rechts abwechselnd WCP1 (ungerade Zahlen) und WCP 15 (gerade Zahlen): (a) Spuren 1, 3, 5, 7 – WCP-Sonde 1, aufeinanderfolgende 1. bis 4. PCR; Spuren 2, 4, 6, 8 – WCP-Sonde 15 analog; Spur 9 – C₀t1-DNA; Spur 10 – gDNA. (b) analog nach durchgeführter „repeat depletion“. Es war keine Signal mehr in den PCR Amplifikaten erkennbar.

Beurteilung der Komplexität genomischer DNA

Wieviel repetitive Sequenzen enthält genomische DNA, im Vergleich zu via PCR amplifizierter gDNA? Anders gefragt, genügt bereits die alleinige Amplifikation aus, um repetitive Elemente aus den Sonden zu eliminieren? 10 µg (OD-Messung) genomischer DNA und gleichviel via DOP-PCR oder CTA4-PCR amplifizierter gDNA wurden auf ein Gel aufgetragen. [³²P]-markierte C₀t1-DNA wurde als Hybridisierungssonde für einen Southern-Blot verwendet (Abb. 3-2). Jede der drei eingesetzten DNA-Arten enthielt repetitive Elemente. Die Hybridisierungssignale in den Spuren 1-6 (PCR) waren im Vergleich zu Spur 10 (genomische DNA) nicht so intensiv und wurden mit zunehmender Folge immer kleiner. Dieses Verhalten wurde mit beiden PCR-Methoden beobachtet. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die PCR-Methoden nicht wie ursprünglich gedacht alle Sequenzen gleichmäßig amplifiziert (Telenius et al. 1992a), sondern repetitive Sequenzen geringer, oder aber von der Gesamtheit aller Sequenzen nur einen bestimmten Teil. Diese Vorstellung wurde unterstützt von zytogenetischen Beobachtungen, vor allem von der Tatsache, dass eine Painting Sonde höchstens 4 - bis 6-mal reamplifizierbar war, ohne dass die Qualität der anschließenden Hybridisierung nachließ.

Nachdem die optimalen Bedingungen der Abreicherung herausgefunden waren, wurde das Protokoll auf alle 24 chromosomalen WCP-Bibliotheken ausgedehnt (Bolzer et al. 1999). Ihre Tauglichkeit im Hinblick auf komplexe FISH-Anwendungen wurde in M-FISH Experimenten getestet. Die Qualität der Ergebnisse mit den neuen, abgereicherten Sonden ohne C₀t1-DNA und ohne „preannealing“ war vergleichbar den M-FISH Ergebnissen unter Standard-Bedingungen.

Komplexität repetitiver genomischer DNA

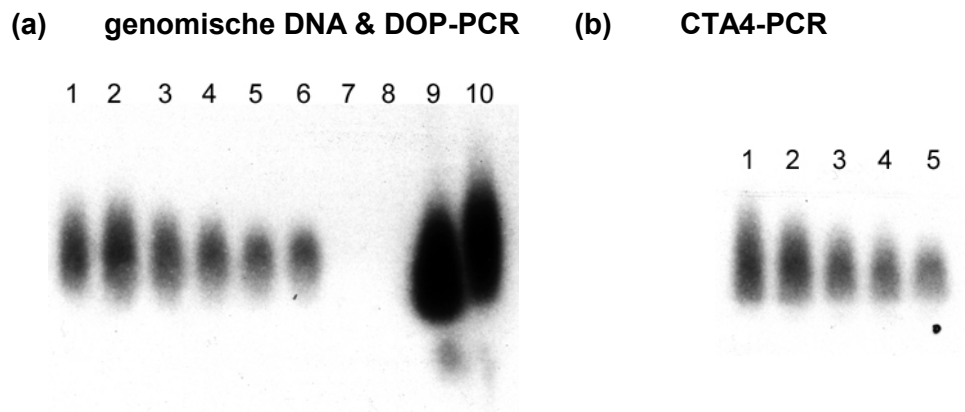


Abb. 3-2 Beurteilung der Menge an repetitiven Sequenzen in genomischer DNA. Hybridisierung von [32 P]-C $_{\alpha}$ t1-DNA. Aufgetragen wurde von links nach rechts: (a) Spuren 1 - 6 – aufeinanderfolgende 1. bis 6. DOP-PCR; Spur 7 – 6MW-Primer allein (kein Signal); Spur 8 – 100 bp-Leiter (kein Signal); Spur 9 – C $_{\alpha}$ t1-DNA; Spur 10 – gDNA. (b) Spur 1 - 5 – aufeinanderfolgende 1. bis 5. CTA4-PCR.

3.1.3 Klassifikation von Metaphasen

Ein wichtiger Schritt bei dem Versuch alle 24 Chromosomen im Interphasekern gleichzeitig zu visualisieren, stellte die Erweiterung der für Metaphasespreitungen entwickelten Karyotypisierungssoftware *MCK* dar (Eils et al. 1998). Dies geschah in enger Zusammenarbeit mit K. Saracoglu (Arbeitsgruppe iBioS, Leitung R. Eils, DKFZ Heidelberg), der bereits an der Entwicklung von *MCK* beteiligt war. Das daraus hervorgegangene Programm *mfish3d* musste intensiv ausgetestet werden, um sicherzustellen, dass eine korrekte Klassifikation stattfand (Saracoglu et al. 2001).

Von MCK zu mfish3d

Mithilfe des Programms *MCK* konnten Metaphasechromosomen automatisch anhand eines Markierungsschemas klassifiziert werden (Abb. 3-3). Eine Metaphasespreitung wurde mit dem 7 Fluor M-FISH Mix hybridisiert (Kapitel M-FISH, S. 48). Nach der Aufnahme am Mikroskop wurde ein RGB-Bild zur Übersicht erstellt (Abb. 3-3 a). Importierte man diese Datei in *MCK* mit der entsprechenden Markierungstabelle, so wurde die Metaphase innerhalb weniger Minuten klassifiziert (Abb. 3-3 b) und ein Karyogramm erstellt (Abb. 3-3c). Zu dem gleichen Klassifikationsergebnis gelangte man, wenn man das neuere Programm *mfish3d* verwendete. Mit den Parametern ANGLE = 15°, Background = 1 und MINSIZE = 2 (zur Beschreibung der Parameter siehe S. 73) wurden die besten Ergebnisse erzielt (Abb. 3-3 d). Bild 3 d unterschied sich nur durch einige Inhomogenitäten von 3 b. Fünf Chromosomen (7, 13, 16, 20 und Y) wurden aufgrund einer neueren Farbzusordnungstabelle andere Falschfarben zugeordnet (Abb. 3-3 e).

Damit konnte gezeigt werden, dass die beiden Programme bei Metaphasespreitungen die gleichen Resultate ergaben. Da *MCK* keine 3D-Stapel importieren kann, wurden für alle Darstellungen von CT im Zellkern das *mfish3d* Programm verwendet.

(e)

Chr. 1	Grey
Chr. 2	Magenta
Chr. 3	Blue
Chr. 4	Cyan
Chr. 5	Green
Chr. 6	Yellow
Chr. 7	Red
Chr. 8	Dark Blue
Chr. 9	Light Blue
Chr. 10	Purple
Chr. 11	Yellow-Green
Chr. 12	Light Red
Chr. 13	Orange
Chr. 14	Light Green
Chr. 15	Light Purple
Chr. 16	Bright Green
Chr. 17	Dark Green
Chr. 18	Orange-Red
Chr. 19	Light Grey
Chr. 20	Dark Red
Chr. 21	Cyan
Chr. 22	Purple
Chr. X	Yellow
Chr. Y	Dark Cyan

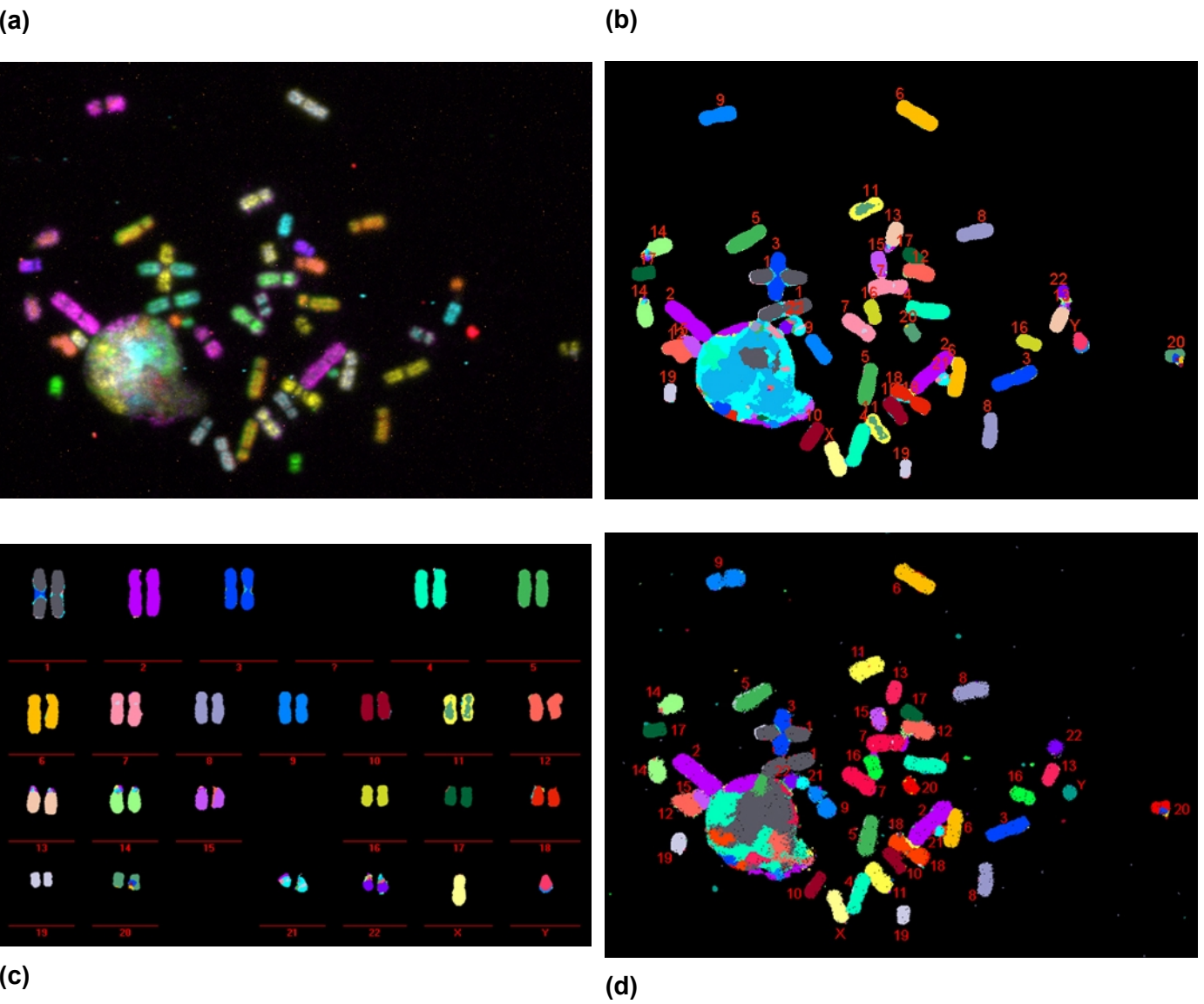


Abb. 3-3 Klassifizierung einer normalen 46,XY PBL Metaphasespreitung. (a) RGB-Bild der mikroskopischen Aufnahme. (b) Automatische Klassifikation mit dem Programm MCK. (c) Automatische Erstellung eines Karyotyps mit MCK. (d) Automatische Klassifikation mit dem Programm mfish3d. Das Bild wirkt etwas inhomogener, weil keine DAPI-Maske angewandt wurde. Das Klassifikationsergebnis entspricht exakt dem in b. Man beachte in beider Bildern die unzureichende Klassifikationsfarbe der Zellkerns. Dass fünf Chromosomen (7, 13, 16, 20, Y) eine andere Klassifikationsfarbe haben, liegt an einer neuen Farbzustimmungstabelle, nicht an einer falschen Klassifikation. (e) Falschfarbentabelle der einzelnen Chromosomen.

3.2 3D-Mikroskopie

CLSM und Weitfeldmikroskop

Um dem Ziel der gleichzeitigen Visualisierung möglichst vieler Chromosomen *in situ* im Zellkern näher zu kommen, wurden zwei 3D-Mikroskopie-Methoden angewandt. Die Eigenschaften eines CLSM erlauben es, Signale in optischen Serienschnitten sofort nach der Aufnahme zu erkennen und dreidimensional zu rekonstruieren. Jedoch war aufgrund der definierten Laserwellenlängen und Filtervoraussetzungen der beiden verfügbaren CLSM die Visualisierung von nur drei Fluorochromen möglich. Damit war das CLSM nur für Vielfarben-Ansätze geeignet, in denen bis zu 7 Sonden (2^3-1) markiert werden konnten.

Die Weiterentwicklung eines Leica Weitfeldmikroskops, ausgestattet mit einer Quecksilberlampe und einem 8-Filterrad ermöglichte es, dass auch mit diesem Mikroskop lichtoptische Serienschnitte aufgenommen werden konnten. Diese Entwicklung war ein wesentlicher Teil der durchgeführten Arbeit.

In einer Zusammenarbeit mit Leica Microsystems (Cambridge, UK) wurde das in *QFluoro* implementierte 3D-Aufnahmesystem entworfen. Es steuerte den z-Trieb des Mikroskop-tisches so, dass von einer unteren bis zur oberen Grenze in definierten Abständen Aufnahmen in allen Kanälen gemacht werden konnten (minimale Schrittweite 100 nm). Dabei wurden die Einstellungen der Belichtungszeit und der Skalierung der CCD-Kamera aus einer unmittelbar zuvor getätigten Aufnahme in der Fokusebene übernommen. Die erhaltenen Bilder wurden in Tif-Dateien auf der Festplatte abgespeichert und standen so in einem universellen Format allen nachgeschalteten Applikationen zur Verfügung.

Nach der Aufnahme wurden die Bilder mit einer Dekonvolutionssoftware entfaltet. Da eine Dekonvolution in der Regel mehrere Stunden dauerte, bzw. meist über Nacht verlief, war es nur bedingt möglich die Bilder direkt nach der Aufnahme zu beurteilen. Der Zeitvorteil aufgrund der schnelleren Aufnahmetechnik am Weitfeldmikroskop gegenüber dem CLSM ging durch die obligate Dekonvolution wieder verloren. Dennoch erhöhte der Vorteil, bis zu acht Fluorochrome gleichzeitig anregen zu können, die Flexibilität im experimentellen Aufbau.

Für einen Vergleich der beiden Mikroskopiearten (CLSM und Weitfeldmikroskop) wurden drei FISH Experimente an 3D-fixierten Fibroblasten durchgeführt. Tab. 3-2 fasst die Markierungsschemata zusammen. Dabei wurden jeweils drei Fluorochrome Fitc, Cy3 und Cy5 verwendet. Im Experiment 1 wurden drei verschiedene Painting Sonden mit drei unterschiedlichen Fluorochromen markiert. Bis zu sechs Territorien waren in der Interphase zu erkennen. Im Experiment 2 wurde mit zwei Fluorochromen eine Painting Sonde markiert, eine weitere mit dem verbleibenden dritten Fluorochrom. Dies sollte zu vier Territorien führen, mit einer Kolokalisation zweier der drei Fluorochrome. Im 3. Experiment wurde das Chr. 1 mit allen drei Fluorochromen markiert, was zu höchstens zwei Territorien in allen drei Kanälen führen durfte.

Fluorochrom Farbe in der Bildern	Markierte Chromosomen		
	Fitc grün	Cy3 rot	Cy5 blau
Experiment Nr			
1	Chr.20	Chr.9	Chr.15
2	Chr.9	Chr.9	Chr.15
3	Chr.1	Chr.1	Chr.1

Tab. 3-2 3-Farben FISH Experimente zur Beurteilung der verwendeten zwei Mikroskopiearten (konfokal und Weitfeld).

3.2.1 Konfokale Aufnahmen

An beiden benutzten konfokalen Mikroskopen (Leica TCS 4D, Zeiss LSM 410) wurden Stapel optischer Serienschritte von Interphase-Kernen in einem Abstand von 250nm aufgenommen. Die drei Kanäle wurden zu einem RGB-Bild überlagert. Fitc wurde dabei immer grün dargestellt, Cy3 rot und Cy5 blau (Abb. 3-5). Jeder Stapel erfuhr eine Shift-Korrektur (S. 60). In fast jeder konfokalen Sitzung wurde zu Beginn eine PSF bestimmt, indem fluoreszenzgefüllte Kügelchen („beads“) aufgenommen wurden (Kapitel 2.7, S. 65). Eine konfokale Abbildung eines solchen „beads“ ist in Abb. 3-4 dargestellt.

Konfokale PSF

(a) xy Ebenen

(b) xz-Projektion

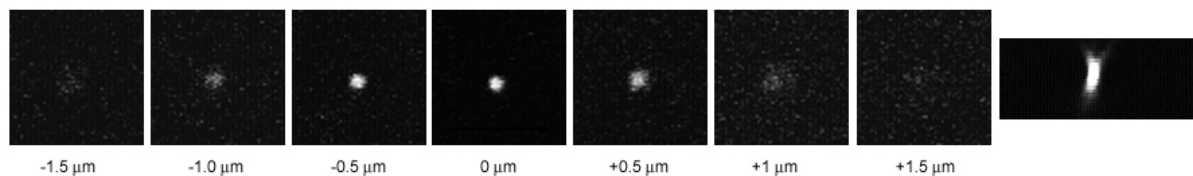


Abb. 3-4 Konfokale PSF. (a) Sequenzielle lichtoptische Schnittserie durch eine experimentell bestimmte konfokale PSF für ein 63x, 1,4 NA Leica Plan Apo Objektiv, aufgenommen am CLSM Leica TCD4d. Der Durchmesser des „beads“ betrug 0,5μm. Die Distanzen über- und unterhalb der Focusebene sind angegeben, von $-1,5\mu\text{m}$ bis $+1,5\mu\text{m}$. (b) XZ-Schnitt desselben „beads“. Man erkennt die ovale Form der PSF. Alle Intensitäten sind mit einer logarithmischen Skala dargestellt, um die viel schwächeren äußeren Bereiche hervorzuheben.

3-Farben FISH Experimente

Der Vergleich von Weitfeld- mit konfokalen Bildstapeln, speziell im Hinblick auf hybridisierte Painting Sonden in Interphasekernen, soll die vergleichbare Qualität der gewählten Ansätze demonstrieren. Abb. 3-5a zeigt das Ergebnis des Experiments 1, der Hybridisierung dreier verschiedener Painting Sonden. Man erkennt gut die unterschiedliche Lage z. B. der beiden „blauen“ Domänen des Chr.15 in z-Richtung. Weiterhin ist die unregelmäßige Gestalt eines einzelnen Territoriums gut z. B. anhand des „roten“ Chr. 9 zu sehen. In Säugerzellen besitzen CT Einbuchtungen und Fortsätze ohne eine offensichtliche Regelmäßigkeit. Zudem existiert ein unterschiedlicher Kondensationsgrad zwischen

verschiedenen CT (Eils et al. 1996; Cremer M. et al. 2001; Habermann et al. 2001).

Darstellung der xy-Projektion

Beim konfokalen Ansatz war es nicht möglich, zusätzlich zu den drei Fluorochromen noch eine Gegenfärbung darzustellen (Abb. 3-5 b, f). Damit fehlte die Information über klare Zellkerngrenzen. Es war aber möglich, aufgrund des immer vorhandenen Hybridisierungshintergrundes eine ungefähre Begrenzung zu erkennen.

Darstellung der xz-Projektion

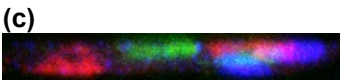
In der xz-Projektion (Abb. 3-5 c, j) erkennt man die Flachheit der Fibroblastenkerne, in denen die Territorien bei den großen Chromosomen an den oberen und unteren Rand stoßen. Bei kleineren (z. B. grün = Chr. 20) ist das nicht der Fall und manchmal liegen zwei CT in der z-Achse übereinander. In der xz-Ansicht wird der Unterschied zwischen konfokalem und Weitfeldmodus besonders deutlich. Während im konfokalen Bild alle Ebenen scharf sind, und die ersten und letzten Ebenen so gut wie keine Information mehr enthalten, sind im Weitfeldmodus nur die mittleren Ebenen im Fokus, und das Bild wird nach oben und unten hin unscharf. Die letzten Ebenen enthalten wichtige Informationen, welche die Dekonvolutionssoftware für eine gute Rekonstruktion benötigt.

Exaktheit kombinatorischer Markierung

Das Experiment 2 (Abb. 3-5 e) demonstriert, dass Hybridisierungen von Painting Sonden, die mit zwei verschiedenen Fluorochromen markiert sind, in der Regel zu einer weitgehenden Kolo-kalisation führen. Die gelbe Farbe geht aus der Überlagerung der Fitc- und Cy3-Markierung (grün und rot) für das Chr. 9 hervor. Hybridisiert man die Painting Sonde eines dreifach markierten Chromosoms wie in Experiment 3 beschrieben, so überlagern sich alle drei Farben in diesem Areal zu weiß (Bilder auf der CDROM im Ordner zu diesem Kapitel). Diese Exaktheit spielt eine Rolle, sobald man für 3D M-FISH Experimente einen komplexen kombinatorisch markierten SONDENSATZ einsetzt.

Neuere konfokale Mikroskope

Um die Möglichkeiten einer besseren Anregung und Detektion zu testen, wurde ein M-FISH Präparat mit den konfokalen Mikroskopen Leica TCS SP und Zeiss LSM 510 aufgenommen. Beide konnten aber nicht die erforderliche Trennschärfe erbringen. V. a. Cy3.5 konnte nicht von Cy3 und Cy5.5 nicht von Cy5 unterschieden werden. Cy7 konnte mit dem verwendeten Argonlaser, bzw. Ar/Kr-Laser gar nicht angeregt werden.



	Cy5 (b)	Cy3 (r)	Fltc (g)
Chr.9		x	
Chr.15			x
Chr.20	x		

(d)

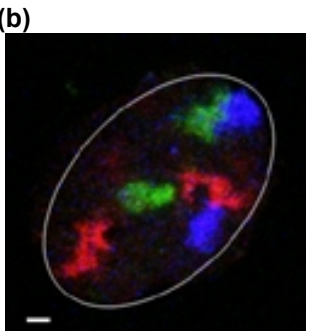
	Cy5 (b)	Cy3 (r)	Fltc (g)
Chr.9		x	x
Chr.15			x

(g)

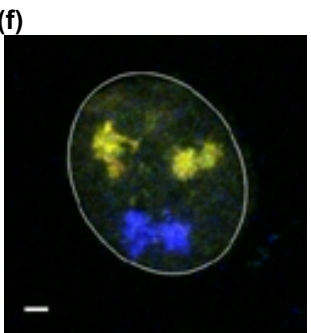


	Cy5 (b)	Cy3 (r)	Fltc (g)
Chr.9		x	
Chr.15			x
Chr.20	x		

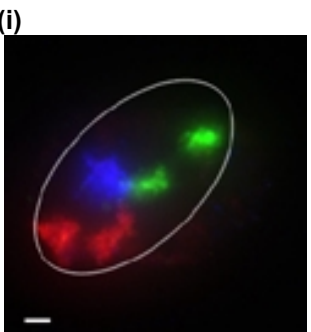
(k)



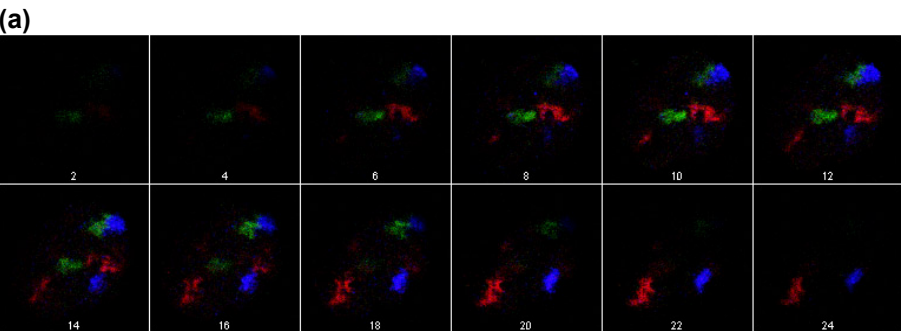
(b)



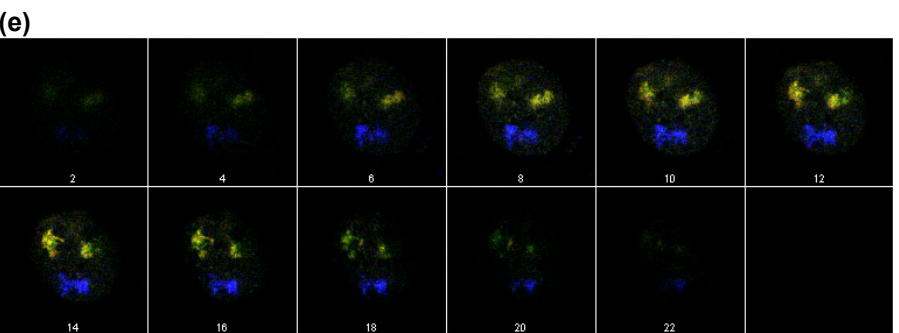
(f)



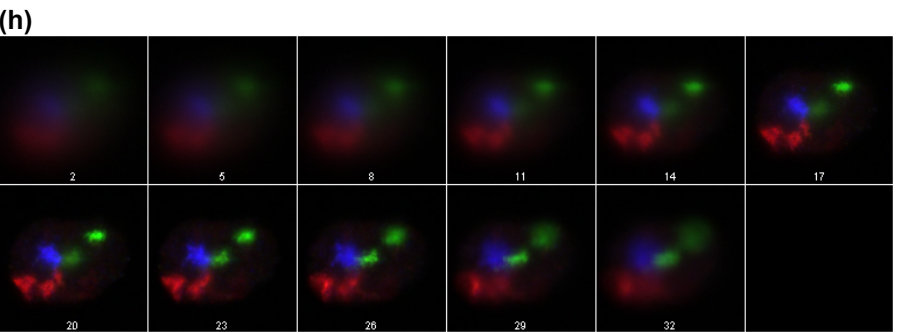
(i)



(a)



(e)



(h)

Abb. 3-5 3D-Mikroskopie: kontokale (a-g) und Weitfeld-Aufnahmen (h-k). Die erste und letzte Reihe zeigt Ergebnisse des Experiments 1, die mittlere Experiment 2. Die Übereinanderlagerung der beiden Kanäle g und r ergibt die Mischfarbe gelb. Ein Markierungsschema ist jeweils angegeben. Für Details siehe Text. (c, j) Horizontale xz-Projektionen demonstrieren die Flachheit der Fibroblasten. Im Weitfeldbild (i) kann die hyperbole Struktur der CT, bedingt durch den Weitfeld-Modus erkannt werden. Balken = 2µm.

3.2.2 Weitfeldaufnahmen

An einem Leica Weitfeld-Epifluoreszenz Mikroskop wurden, analog einem CLSM, Schnittserien in einem Abstand von 250 nm aufgenommen. Dazu wurde ein motorisierter z-Tisch eingebaut und eine Steuerungssoftware in Zusammenarbeit mit Leica entwickelt. Die bis zu acht Kanäle wurden sequentiell aufgenommen und in einem „true color“ Farbbild überlagert. Die s/w-Bilder aus den einzelnen Kanälen wurden in einem multiplen Tif-Format abgespeichert und waren so für die anschließende Dekonvolution verfügbar.

Wie beim CLSM auch, wurde in fast jeder Mikroskopsitzung eine PSF bestimmt, indem „beads“ aufgenommen wurden. Daraus ergab sich eine PSF deren Abbild die unterschiedlichen Mikroskopeigenschaften deutlich macht (Abb. 3-6). In der xz-Projektion (b) kann man leicht die typisch hyperbole Form einer Weitfeld-PSF erkennen.

Weitfeld PSF

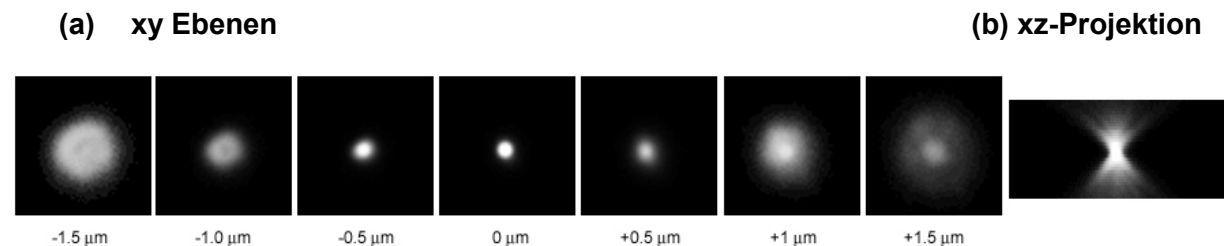


Abb. 3-6 Weitfeld-PSF. (a) Sequenzielle lichtoptische Schnittserie durch eine experimentell bestimmte Weitfeld-PSF für ein 63x, 1.32 NA Leica Plan Apo Objektiv. Der Durchmesser des „beads“ betrug $0.5\mu\text{m}$. Die Distanzen über- und unterhalb der Focusebene sind gezeigt, von $-1.5\mu\text{m}$ bis $+1.5\mu\text{m}$. (b) Ein XZ-Schnitt bringt die hyperbole Form der PSF deutlich zu Tage. Alle Intensitäten sind mit einer logarithmischen Skala dargestellt, um die viel schwächeren äußeren Bereiche hervorzuheben.

3-Farben FISH Experimente

Die drei Experimente der in Tab. 3-2 (S. 93) beschriebenen Serie wurde zusätzlich mit dem Weitfeldmikroskop aufgenommen. In Abb. 3-5 h erkennt man, dass an den oberen und unteren Rändern die Domänen nicht verschwinden, sondern lediglich unschärfer werden. Erst nachdem das Objektiv sich mehrere Mikrometer von der Fokusebene entfernt hat, verschwinden die letzten Unschärfereste.

Die xy-Projektion (Abb. 3-5 i) demonstriert, dass die laterale Auflösung, wenn auch annähernd, so doch nicht gleich der konfokalen Aufnahme ist, da weniger Details erkannt werden können.

In der xz-Projektion wird der Unterschied zwischen CLSM und Weitfeldmodus besonders deutlich. Im Gegensatz zum konfokalen Bild grenzen hier alle CT an den oberen und unteren Rand des Zellkerns an. Geht man davon aus, dass das konfokale Mikroskop die wirklichen Verhältnisse besser wiedergibt, so ist dieses Anstoßen ein Manko und eine Dekonvolution der Weitfeldbilder,

v. a. in z-Richtung unumgänglich. In den Experimenten 2 und 3 ergaben sich analoge Ergebnisse (Daten auf der CDROM im Ordner zu diesem Kapitel).

Die hier vorgestellten Experimente verdeutlichen, dass das 3D-Weitfeldsystem verglichen mit einem CLSM annähernd gleichwertige Bilder lieferte, mit einer etwas schlechteren lateralen Auflösung und einer erheblich schlechteren Auflösung in z-Richtung. Eine Dekonvolution in z-Richtung ist daher bei der Verwendung des Weitfeldsystems unverzichtbar.

3.3 Dekonvolution im Vergleich

Vier verschiedene Softwarepakete zur Dekonvolution (siehe Kapitel 2.7.1 - 2.7.4, S. 66 ff) wurden ausgetestet und auf gefaltete Weitfeldbilder angewandt:

- *Huygens* von SVI
- *TILLvisION* von T.I.L.L. Photonics
- *Ks400* von ZeissVision
- *Axialrec* von Rainer Heintzmann (Göttingen)

Jedes Program besaß verschiedene einstellbare Parameter und die Schwierigkeit lag darin, die essentiellen herauszufinden. Es wurde versucht, verschiedene Gütekriterien auf die entfalteten Bilder anzuwenden, um ein Mittel zur Abschätzung der Restauration zu erlangen (Kapitel 2.7.5, S. 69). Falls ein Dekonvolutionsversuch keine guten Resultate lieferte, mussten die eingestellten Parameter geändert werden. Manchmal traten Bildteile nach der Dekonvolution auf, die im Ursprungsbild nicht vorhanden waren. Diese Artefaktbildung war dann der Grenzfall. Im Großen und Ganzen war dies aber nicht der Fall und die Dekonvolution lieferte unterschiedlich gut entfaltete Ausgangsbilder.

3.3.1 Virtuelle Mikroskopie - Modelldaten

Als Testobjekt dienten zunächst zwei nach dem beschriebenen Verfahren simulierte Territorien (Kapitel 2.9.1, S. 78) der beiden Chromosom 12 - Domänen (Abb. 3-7 a). Jedes Kügelchen (im Bild kleine Kreise) stellt eine ~1Mb große Chromatindomäne dar. Dieser Originalbildstapel wurde mit einer PSF mittels einer Faltungsfunktion (*floatconv*) gefaltet und anschließend statistisches Rauschen mit einer Poisson-Statistikfunktion (*poissit*) zugegeben. So konnte die Photonverteilung eines konfokalen Mikroskops simuliert und eine virtuelle konfokale Aufnahme generiert werden (Abb. 3-7 b). Der Vorzug eines solchen modellierten Systems besteht darin, dass die Eigenschaften des Originalbilds (z. B. Volumen, Ausdehnung, Form, usw.) bekannt sind. Die mittels Dekonvolution entfalteten Bilder konnten mit dem Originalbild genau verglichen werden. Das Volumen der beiden virtuellen Territorien zusammen betrug im Originabildstapel $12 \mu\text{m}^3$.

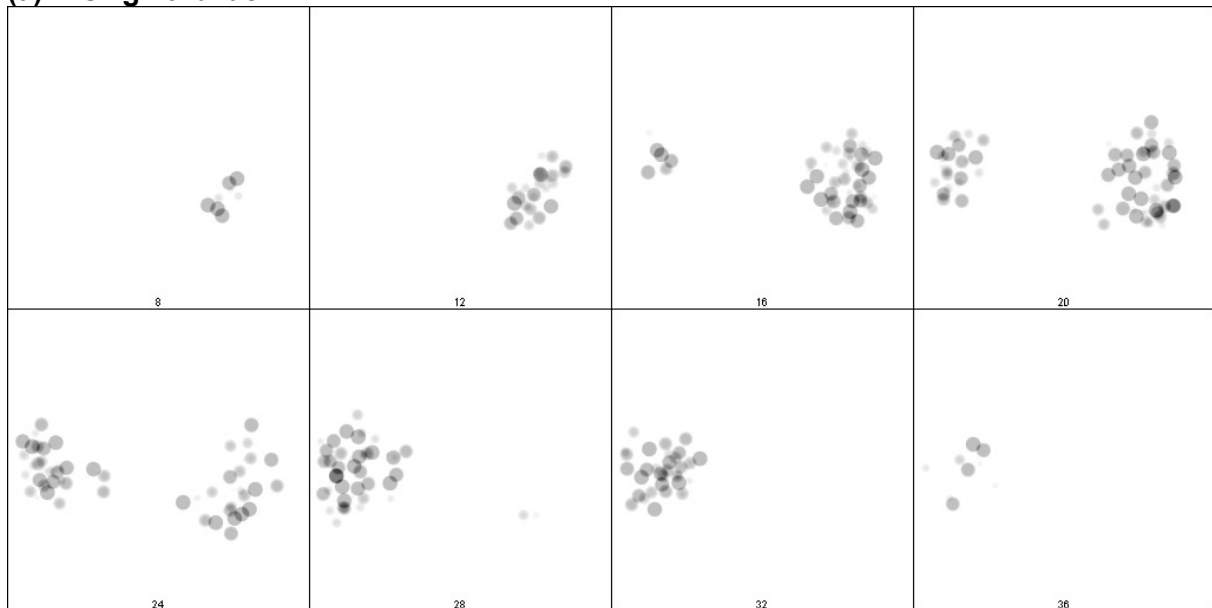
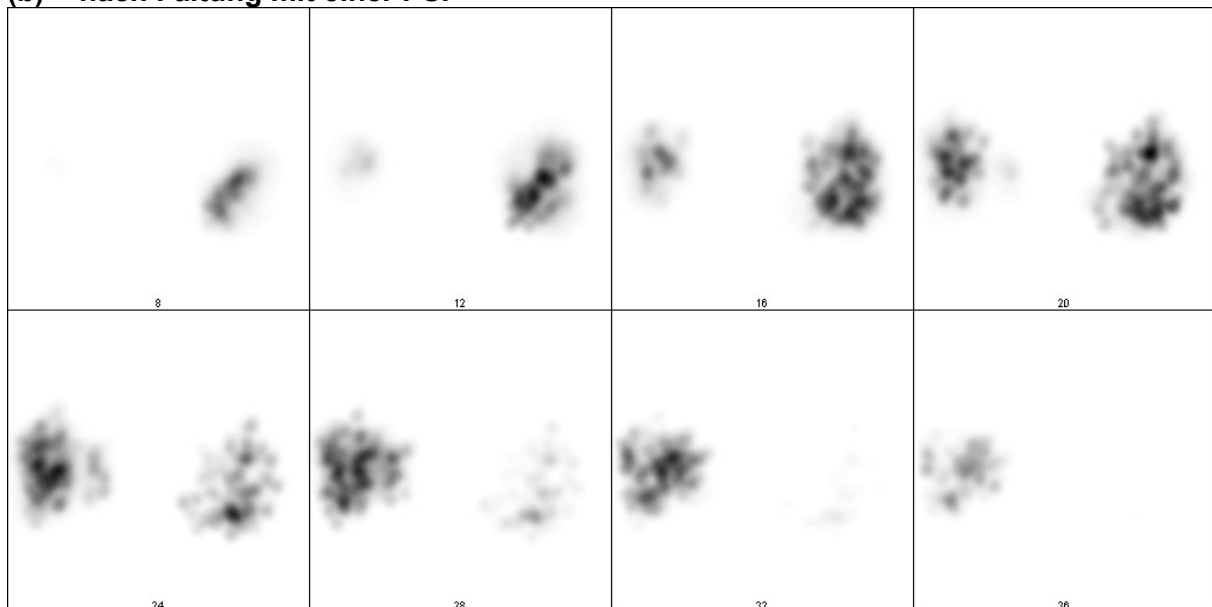
Schnittserie der modellierten Territorien**(a) Originalbilder****(b) nach Faltung mit einer PSF**

Abb. 3-7 Modellierte Territorien. (a) Computersimulation der beiden Chr. 12 Territorien in einem Zellkern. (b) konfokale Faltung des Bildstapels in a.

Dekonvolution mit Huygens

In den Abb. 3-8 und Abb. 3-9 kann man die Ergebnisse der *Huygens* Dekonvolution sehen. Kreise in den einzelnen Bildern sind im Vergleich zum Originalbild (Abb. 3-7 a) auch nach Dekonvolution nur verschwommen erkennbar. Die Verbesserung gegenüber dem Faltungsbild (Abb. 3-7 b) ist jedoch eindeutig erkennbar. Der *Huygens* ICTM-Algorithmus lieferte hier eine etwas bessere Restauration als der *Huygens* MLE-Algorithmus. Verkettete Strukturen wie sie in Verschure et al. (1999) beschrieben sind, tauchten nur bei der *Huygens* MLE-Restauration auf.

Bezüglich der schwellwertabhängigen Volumina ist in der MLE-Restauration kaum ein Unterschied zwischen den verschiedenen Iterationen zu erkennen. Alle Graphen schneiden das Modellvolumen etwa bei Grauwert 40. Beim ICTM-Algorithmus liegt nach zwei Iterationen das Volumen bereits unterhalb der Faltungskurve, jedoch noch überhalb den Kurven längerer Iterationen.

Der Relative Energy Regain (RER) - Wert beschreibt die Differenz eines Originalbildes minus seinem entfalteten Bild in einer frequenz-abhängigen Weise (siehe Abb. 2-7, S. 71). Der Wert „0“ auf der x-Achse bedeutet großflächige Strukturen im Bild. Der Wert „1“ ist die Grenzfrequenz der kleinsten, noch im Bild sichtbaren Strukturen. Alles über „1“ ist „out-of-band“ Information. Auf der y-Achse ist der RER-Wert aufgetragen. Er beträgt „1“ für eine perfekte räumliche Rekonstruktion und „0“ für keine Veränderung zum Ursprungsbild. Die Kurve „Chr. 12 Originalbild minus Faltungsbild“ (in den Graphen „Chr12Original-Faltung“ bezeichnet) entspricht der Aussage „keine Dekonvolution“. Verläuft die Dekonvolutionskurve überhalb dieser Faltungskurve, so kann man von einem Energiegewinn, und damit von einer mehr oder weniger erfolgreichen Dekonvolution sprechen. Verläuft hingegen die Kurve unterhalb der Faltungskurve, dann ist der Energiegewinn geringer als ohne Dekonvolution, d. h. das nach Dekonvolution erhaltene Bild weicht noch stärker vom Originalbild ab, als das Faltungsbild. Artefakte werden durch ein starkes Abgleiten der Kurve in den negativen Bereich aufdeckt.

Bei der *Huygens*-Dekonvolution liegen alle Graphen über der Faltungskurve, was bedeutet, dass eine Restauration effektiv stattgefunden hat. Die Werte wurden umso besser, je länger die Dekonvolution dauerte.

Dekonvolution mit KS400 (ZeissVision)

Drei der vier in diesem Programmpaket enthaltenen Algorithmen (Maximum Likelihood (ML), Maximum Entropie (ME) und Least Square (LS), die Namen beziehen sich auf die Berechnungsweise) lieferten in etwa die gleichen Resultate, weshalb hier nur die ML-Ergebnisse abgebildet sind (Abb. 3-10, S. 103). Die Strukturen sind in xy- und z-Richtung erkennbar rekonstruiert. Die Volumenkurve schneidet das Originalvolumen etwa bei Grauwert 30. Die RER-Kurve verläuft bei tiefen Frequenzen unterhalb der Faltungskurve, und erst bei höheren Frequenzen darüber. Das bedeutet, dass großflächige Strukturen ungenügend restauriert wurden. In beiden Kurvenverläufen ist kaum ein Unterschied der Iterationslängen zu erkennen, was ein Hinweis darauf ist, dass bereits bei Iteration 10 die Dekonvolution beendet war.

Der Janson van Cittert (JvC) - Algorithmus (Abb. 3-11, S. 104) zeigte bei zu vielen Iterationen deutliche Artefakte, sowohl in den Bildern, als auch in den RER-Kurven. Er befand sich zur Zeit des Tests jedoch erst im Prototypenstadium (H. Bauch, Carl Zeiss Vision, pers. Bemerkung).

Dekonvolution mit Axialrec

Die Restauration mit diesem Algorithmus liefert, betrachtet man allein die Kurvenverläufe, ein sehr gutes Resultat (Abb. 3-12, S. 105). In der Bildgalerie ist

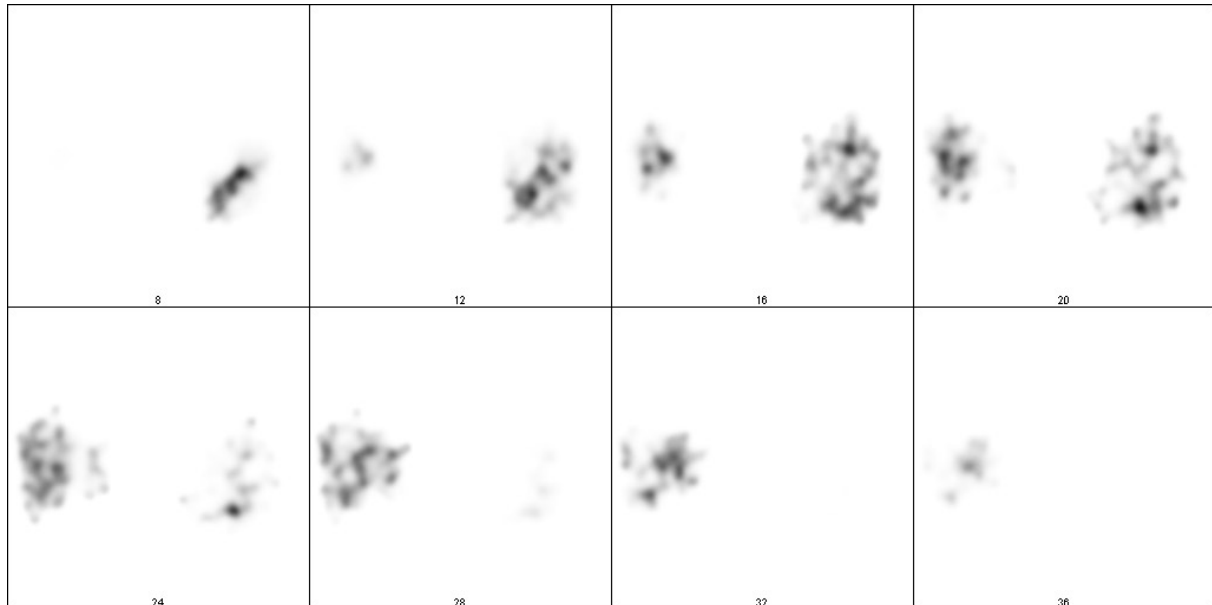
jedoch eine gewisse Überrestauration erkennbar, denn die Kreise in den einzelnen Bildern sind im Vergleich mit dem Original zu klein.

Dekonvolution mit TILLvisION

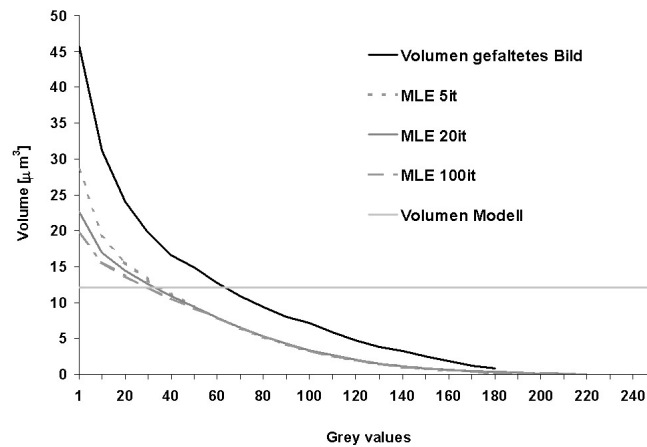
Bei dieser Dekonvolution musste zuerst ein sogenannter Filter berechnet werden, bei dem alle Dekonvolutionsparameter eingestellt wurden. Dieser Prozess nahm die meiste Zeit in Anspruch. Dafür dauerte die eigentliche Dekonvolution nur noch einige Sekunden. Die Güte der Restauration an sich ist an der fast perfekten Rekonstruktion der Kreise in den jeweiligen Bildern zu erkennen (Abb. 3-13, S. 106, vgl. Originalbilder in Abb. 3-7, S. 98). Jedoch konnte bei allen Tests der verschiedenen Parameter Ringartefakte nicht unterdrückt werden. Diese Artefaktbildung bei hohen Frequenzen erkennt man beim RER-Graphen an dem Abfallen in negative Beträge. Ein Grund dafür konnte auch nach mehrmaliger Rücksprache nicht ausfindig gemacht werden. (C. Seel, T.I.L.L. Photonics, pers. Mitteilung).

Dekonvolution der modellierten Territorien

(a) Huygens MLE Algorithmus



(b) schwellwertabhängige Volumenmessung



(c) Relative Energy Regain

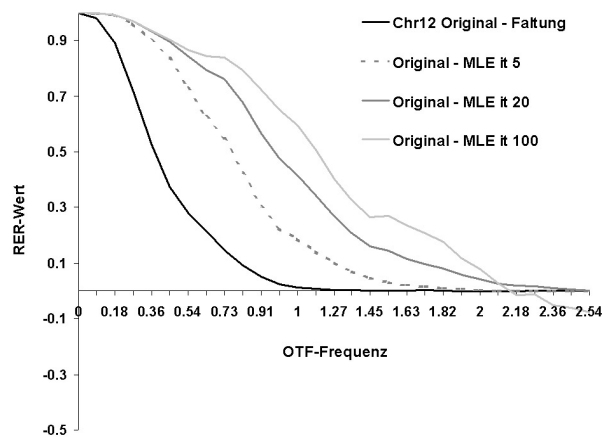


Abb. 3-8 Dekonvolution der Modellterritorien mit dem Huygens MLE-Algorithmus. (a) Galerie (b) Volumenmessung (c) Relative Energy Regain (RER). Details siehe Text.

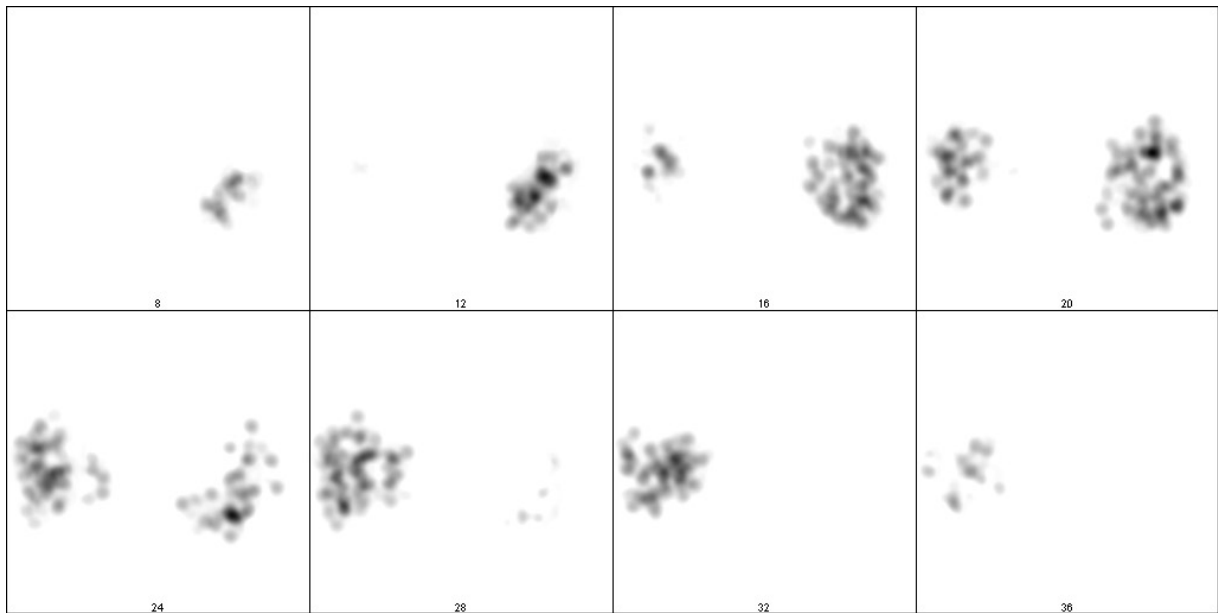
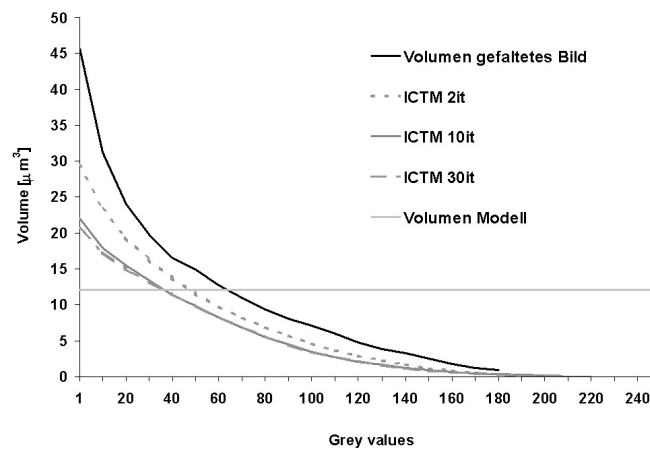
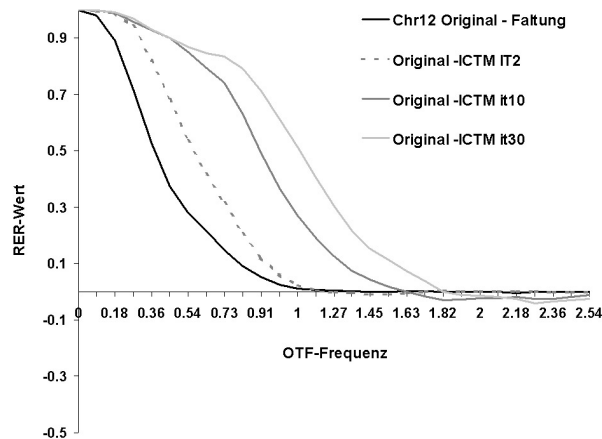
(a) Huygens ICTM Algorithmus(b) schwelligwertabhängige Volumenmessung(c) Relative Energy Regain

Abb. 3-9 Dekonvolution der Modellterritorien mit dem Huygens ICTM-Algorithmus.
 (a) Galerie (b) Volumenmessung (c) Relative Energy Regain (RER). Details siehe Text.

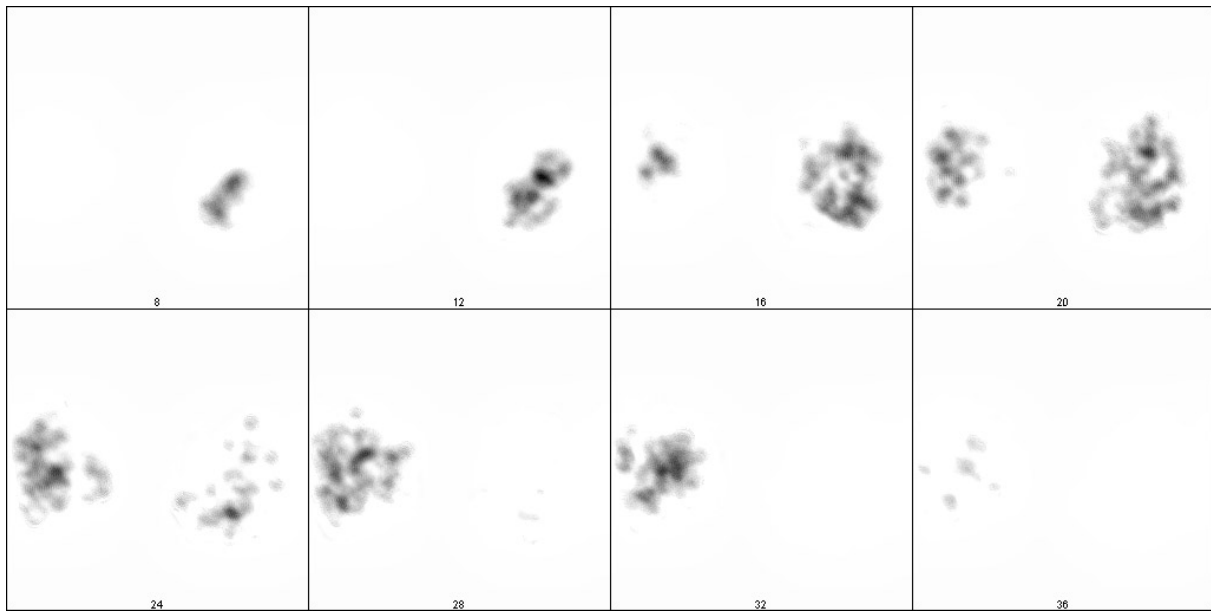
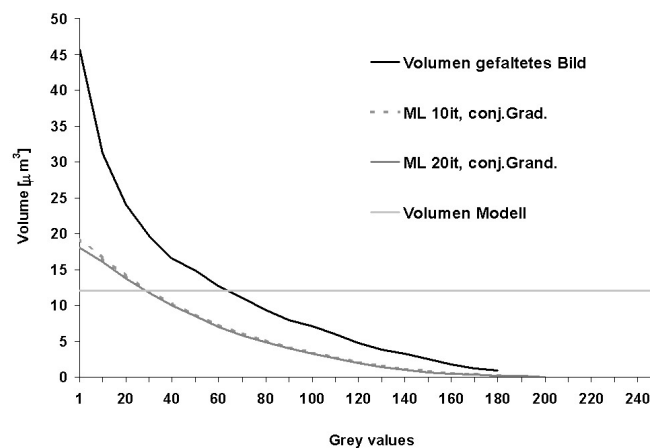
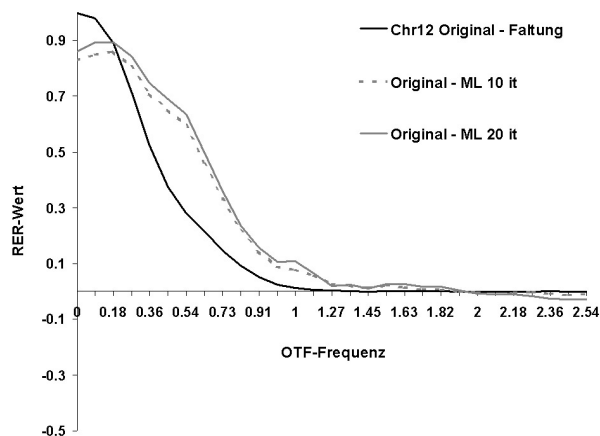
(a) KS400 ML Algorithmus(b) schwellewertabhängige Volumenmessung(c) Relative Energy Regain

Abb. 3-10 *KS400 Max. Likelihood-Algorithmus (ML), 20 Iterationen, Conjugated Gradient Modus. (a) Galerie (b) Volumenmessung (c) Relative Energy Regain (RER). Die Ergebnisse des Max. Entropie-Algorithmus (ME) bei 20 Iterationen sind äußerst ähnlich. Details siehe Text.*

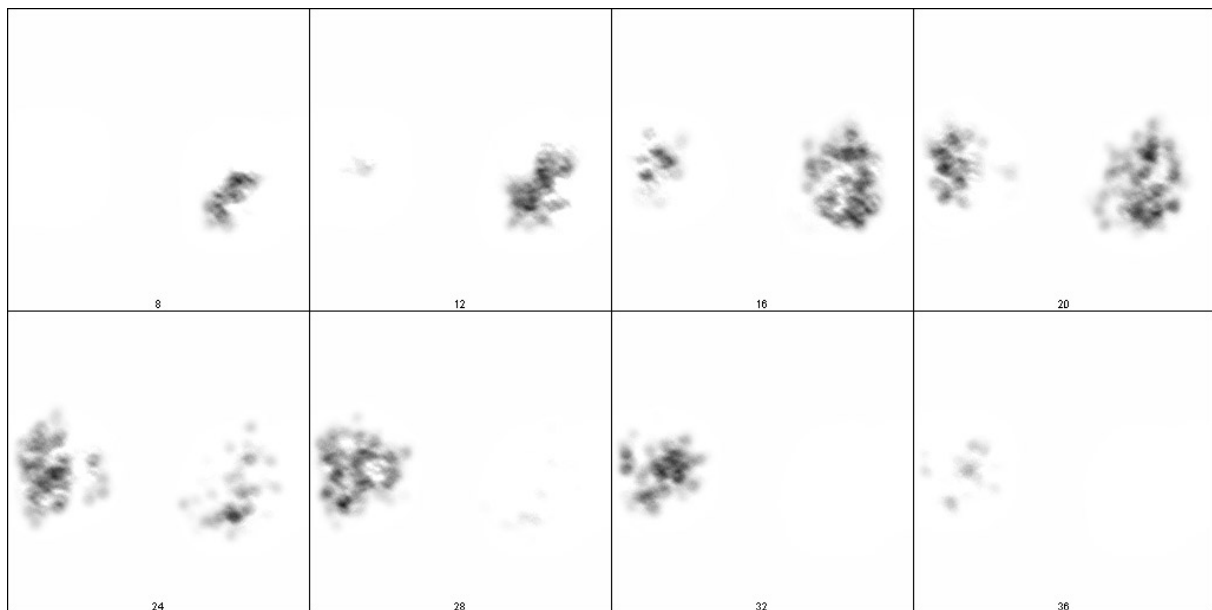
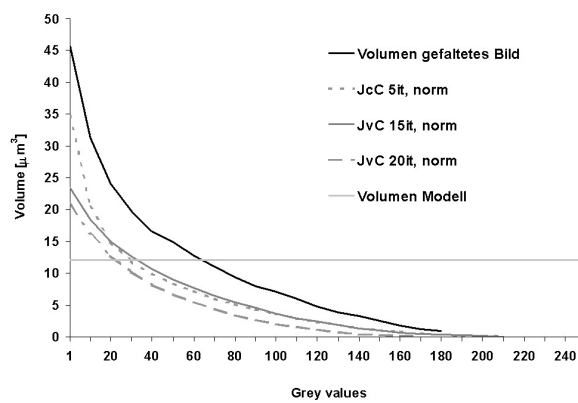
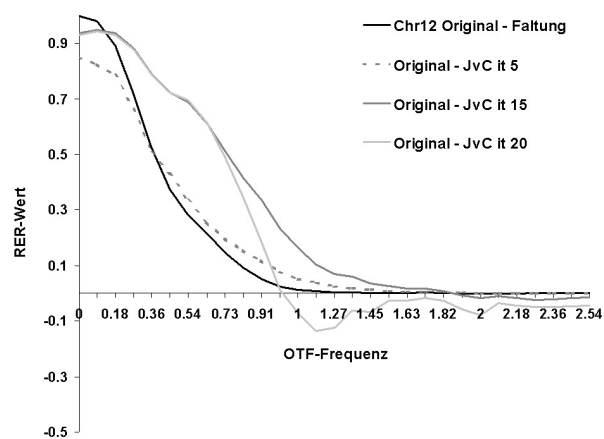
(a) **KS400 JvC Algorithmus**(b) **schwellewertabhängige Volumenmessung**(c) **Relative Energy Regain**

Abb. 3-11 *KS400 Janson van Cittert-Algorithmus (JvC), 15 Iterationen, Normal Modus.*
 (a) *Galerie* (b) *Volumenmessung* (c) *Relative Energy Regain (RER)*. Details siehe Text.

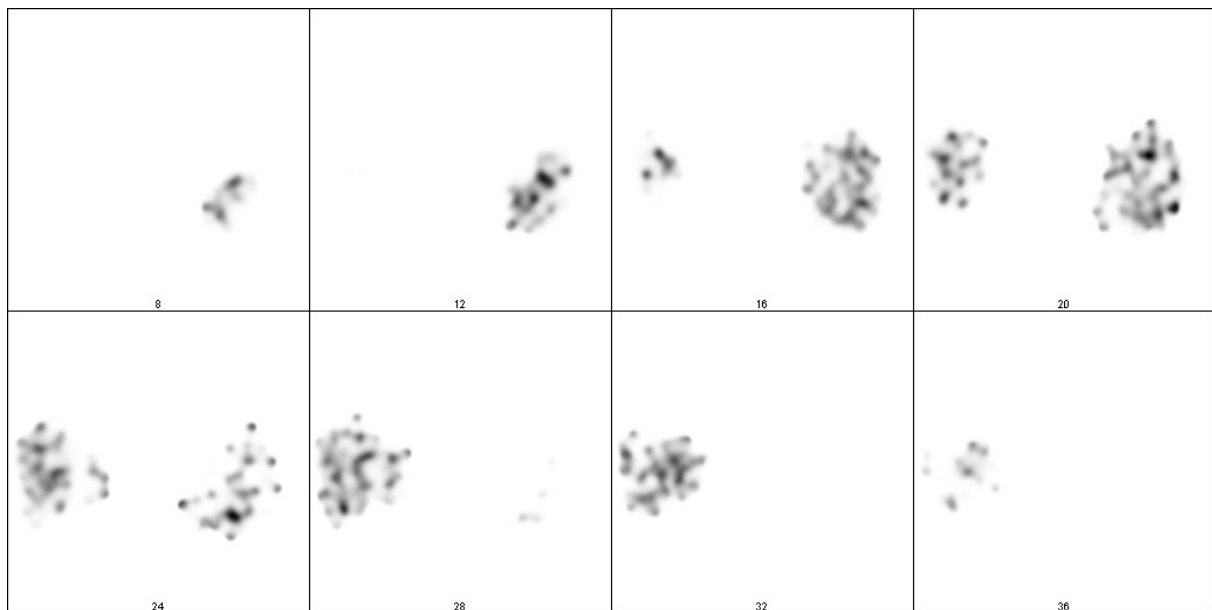
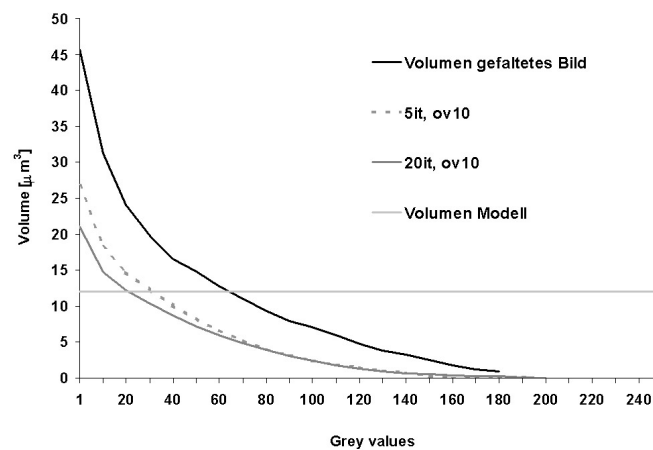
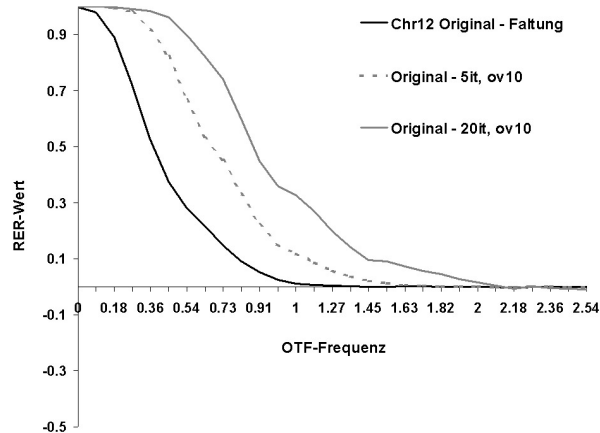
(a) Axialrec Algorithmus(b) schwellewertabhängige Volumenmessung(c) Relative Energy Regain

Abb. 3-12 Axialrec-Algorithmus, 20 Iterationen. (a) Galerie (b) Volumenmessung (c) Relative Energy Regain (RER). Details siehe Text.

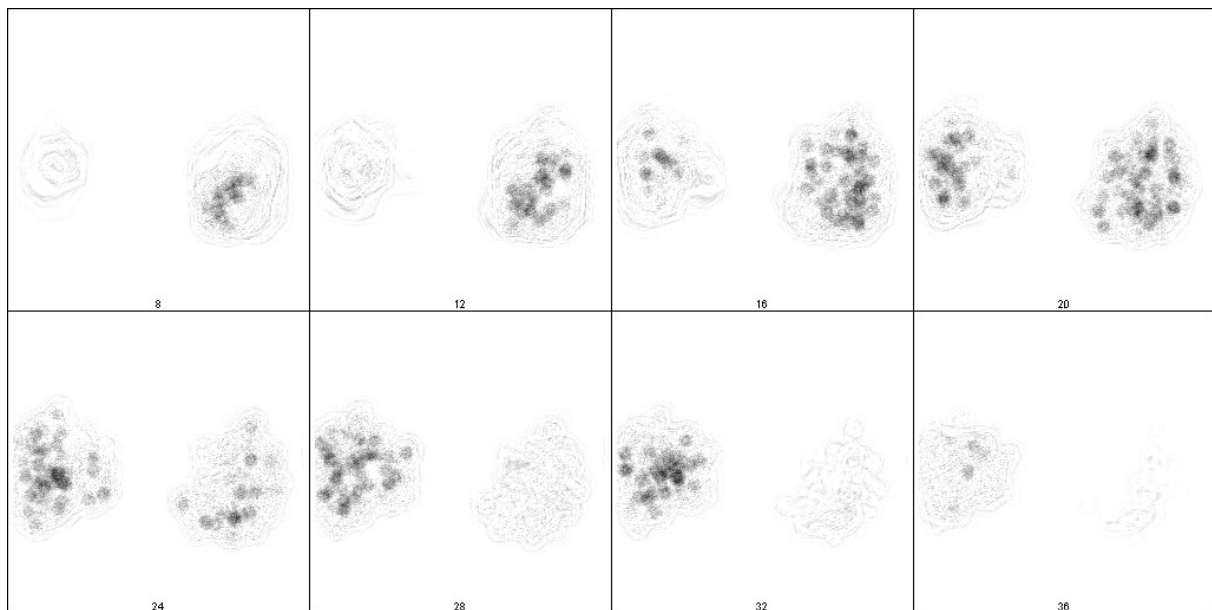
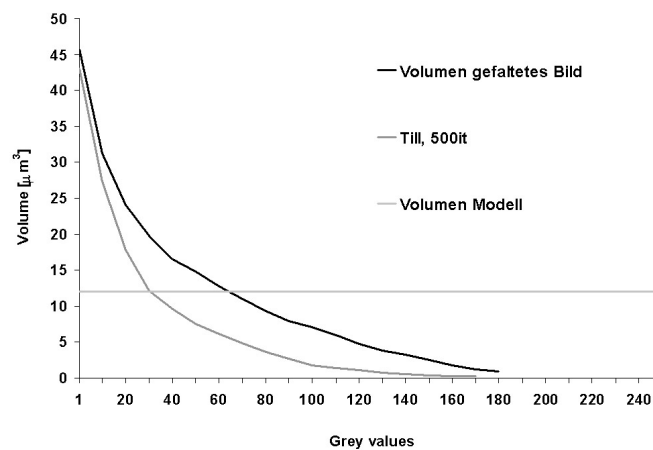
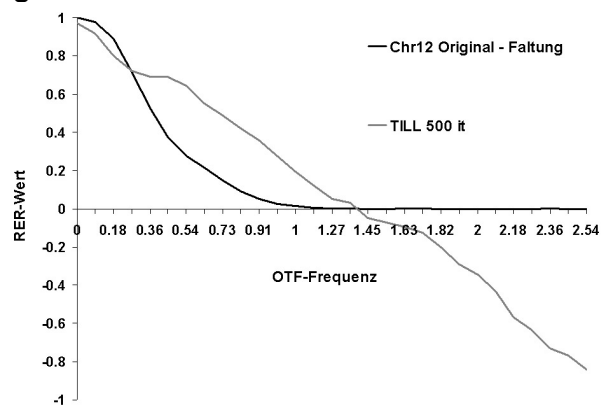
(a) **TILLvisION**(b) **schwelligwertabhängige Volumenmessung**(c) **Relative Energy Regain**

Abb. 3-13 TILLvisION-Algorithmus, 500 Iterationen zur Filterberechnung (a) Galerie (b) Volumenmessung (c) Relative Energy Regain (RER). Details siehe Text.

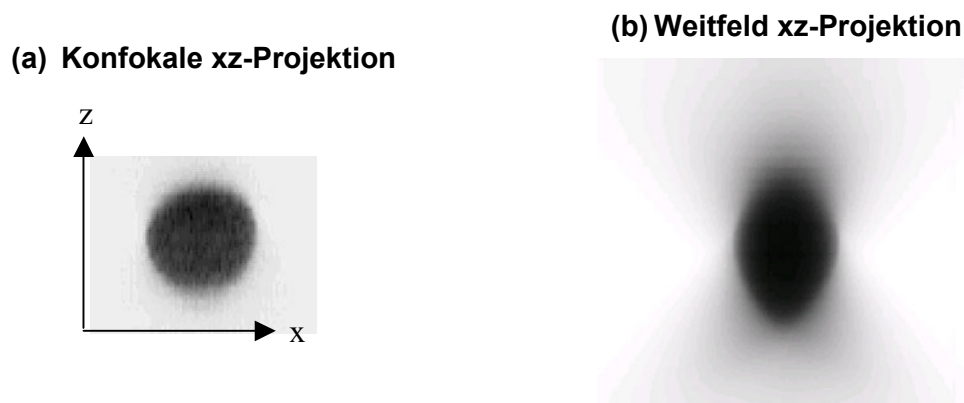
3.3.2 Fluoreszenzgefüllte Kugeln („beads“)

Um die Zuverlässigkeit der Dekonvolution abschätzen zu können, wurden mit Fluorochromen gefüllte Kügelchen, sogenannte „beads“ (Hersteller z. B. Molecular Probes) verwendet. Dies hatte den Vorteil, dass die geometrischen Eigenschaften dieser Kügelchen genau bekannt waren. Für die möglichst gute Simulation einer Zelle wurden zu diesem Zweck die größten vorhandenen „beads“ mit einem Durchmesser von 4 μm verwendet. Sie wurden sowohl am konfokalen, als auch am Weitfeldmikroskop mit einem Schichtabstand von 250 nm aufgenommen. Anschließend wurden die Weitfeldbilder der Dekonvolution unterworfen und das Volumen gemessen. Dabei galten als Referenzen erstens das aus dem Radius berechnete Kugelvolumen, zweitens eine am Computer simulierte Kugel gleichen Durchmessers und drittens der konfokale Bildstapel. Das Volumen einer Kugel mit 4 μm Durchmesser beträgt 33,5 μm^3 . Kriterien für eine gute Dekonvolution waren:

- keine Artefakte
- ein kugelförmiges Aussehen in der xz-Projektion
- kein Verlust an Bildinformation in der xy-Ebene durch Überrestauration
- Verlauf der Volumenkurve des restaurierten Bildes in einem möglichst langen Bereich nahe am theoretischen Volumen (siehe Abb. 3-14 c).

In der Abb. 3-14 a erkennt man, dass die xz-Projektion des konfokalen „beads“ wieder eine Kugel ergibt. Das ist im Weitfeldmodus nicht der Fall (Abb. 3-14 b). Jedoch ist auch das Volumen des konfokalen „beads“ nur in dem Schwellwertbereich von 80 - 120 Grauwerten dem des theoretisch berechneten Volumens nahe (Abb. 3-14 c). Das Volumen vor diesem Grauwertbereich ist zu hoch, danach zu gering. Einen idealen Kurvenverlauf zeigt ein mit dem Programm *Huygens* computersimuliertes 4 μm „bead“. Der Graph ist flach und befindet sich immer nahe dem theoretisch berechneten Wert. Das Volumen des nicht entfalteten Weitfeldbildes ist um eine Vielfaches größer als die anderen beiden Kurven, und die Aufgabe einer Dekonvolutionssoftware war es, dieses Volumen so zu trimmen, dass die Volumenkurve nach der Dekonvolution sich an die aus dem konfokalen Bildstapel ermittelte Volumenkurve, oder an die aus dem simulierten Bildstapel ermittelte Volumenkurve, angleich.

Vergleich einer konfokalen mit einer Weitfeld „bead“-Aufnahme



(c) schwellwertabhängige Volumenmessung

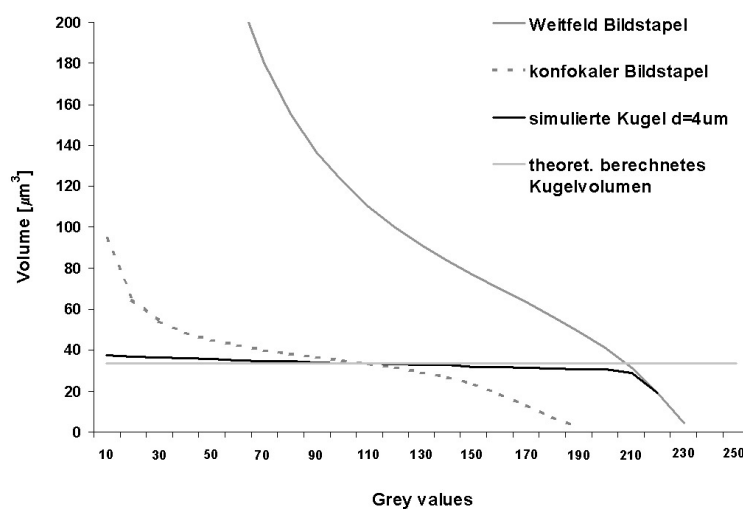
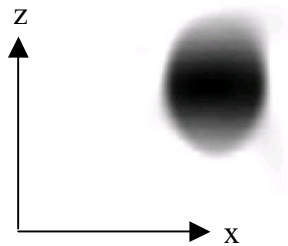


Abb. 3-14 (a) xz-Projektion eines konfokalen Bildstapels des 4 micron „beads“. (b) xz-Projektion des gleichen „beads“ im Weitfeldmikroskop aufgenommen. (c) Zugehörige schwellwertabhängige Volumina. Als Gerade ist das konstante, theoretisch berechnete Volumen eingezeichnet. Der Graph der computersimulierten Kugel verläuft ideal. Der Graph „konfokal“ entspricht der Aufnahme in (a), der Graph „Weitfeld“ der Aufnahme in (b).

Nach der Dekonvolution ergab sich mit allen Entfaltungsprogrammen ein gutes Ergebnis, wenn auch die „konfokale“ Kurve nie völlig erreicht wurde (Abb. 3-15 und Abb. 3-16). Man kann deutlich erkennen, dass das Volumen mit der Zahl der Iterationen abnimmt. Die flachste Kurve erhielt man mit den beiden *Huygens* Algorithmen, z. B. ist der Graph des MLE-Algorithmus in etwa volumengleich mit dem theoretisch berechneten Volumen in einem Bereich von 110 - 160 Grauwerten. Das entfaltete Bild des kugelförmigen „beads“ entsprach wieder in etwa seiner ursprünglichen Form, allerdings wurde nie wieder eine perfekte Kugel daraus, sondern es blieb immer bei einem Oval in der xz-Ansicht.

„bead“ Dekonvolution mit Huygens

(a) Konfokale xz-Projektion der Dekonvolution mit ICTM



(b) schwellwertabhängige Volumenmessung

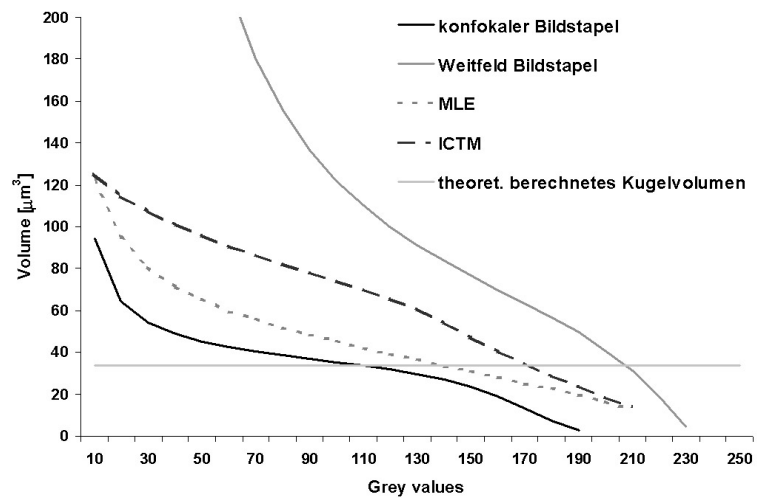


Abb. 3-15 xz-Projektion eines mit dem Huygens ICTM Algorithmus entfalteten Bildstapels des 4 Mikron „beads“. (b) Zugehörige schwellwertabhängige Volumina. Die Dekonvolution mit dem MLE-Algorithmus ist nicht als Bild dargestellt. Abkz.: MLE: Maximum Likelihood Estimation, ICTM: Iterative Constrained Tikhonov Miller.

Propidiumjodid gefärbte, runde Lymphozytenkerne

Ähnlich den hier durchgeführten Aufnahmen mit „beads“, wurden auch mit Propidiumjodid (PI) gefärbte Lymphozytenkerne aufgenommen, um die Dekonvolution zu testen. PI färbt die gesamte DNA und RNA eines Zellkerns an. Diese Bilder haben den Vorteil, dass sie bereits „richtigen“ Zellkernen entsprechen, d. h. nicht mehr nur eine gleichmäßig fluoreszenz-gefärbte Struktur, sondern unterschiedlich intensive Strukturen erkennbar waren. Lymphozytenkerne sind rund, ihre geometrischen Eigenschaften leicht zu erschließen, aber sie sind nicht eben in der Oberfläche. Die Ergebnisse entsprachen denen der „beads“:

- konfokal aufgenommene Lymphozytenkerne waren in der xz-Projektion rund, im Weitfeldmikroskop aufgenommene Kerne oval und nach oben und unten hin unscharf
- Die Kurve einer konfokalen Volumenmessung entsprach fast genau der in Abb. 3-14 c gezeigten
- Die ermittelten Volumina aus den Weitfelddaten waren immer größer als die Volumina aus konfokalen Aufnahmen. Sie nahmen nach der Dekonvolution ab und schnitten das theoretisch berechnete Volumen bei einem unterschiedlichen Betrag auf der x-Achse.

Zusammenfassend zeigen diese Daten die große Schwierigkeiten, verlässliche Volumenwerte aus den Bildstapeln zu ermitteln.

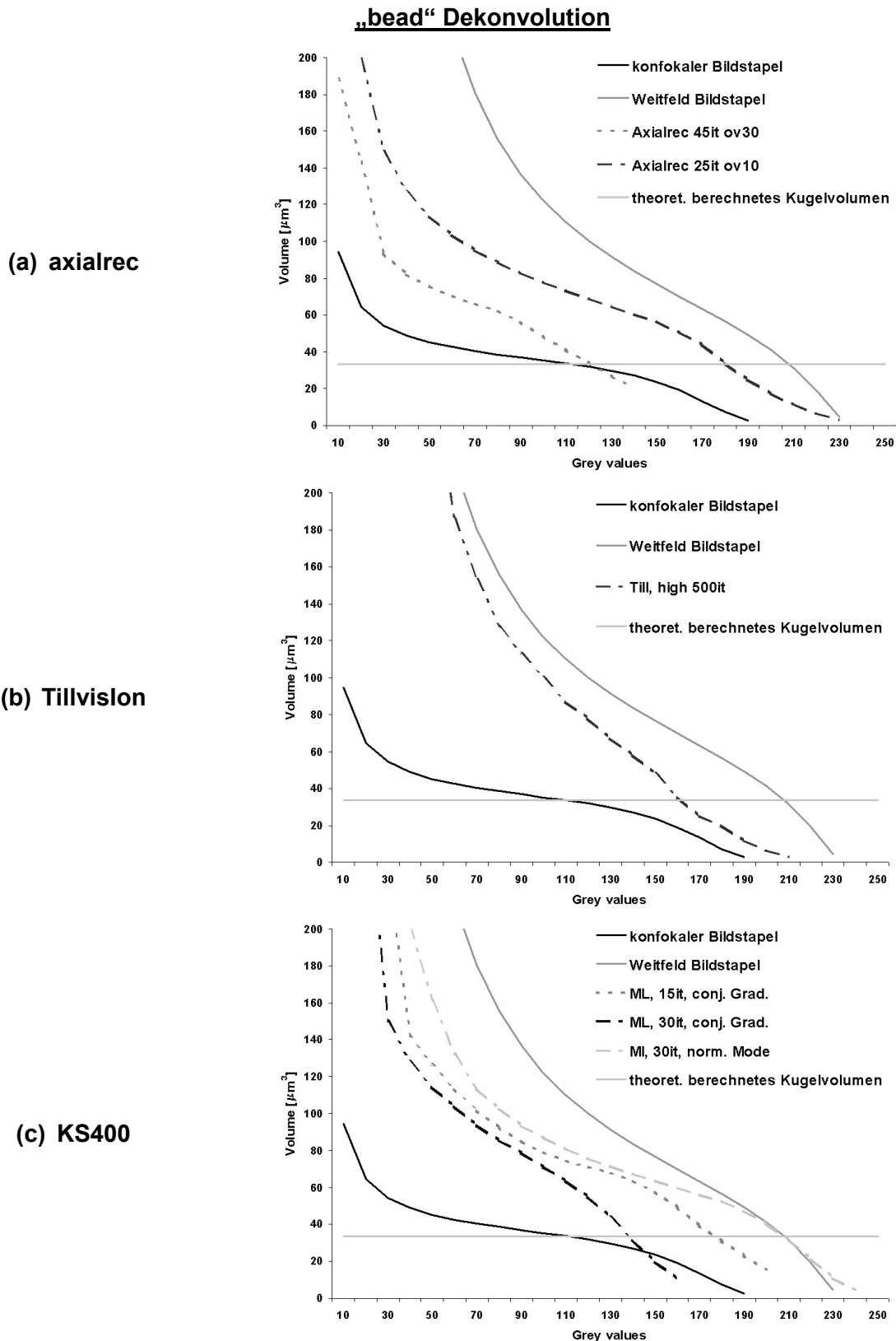


Abb. 3-16 Volumina des 4 Mikron „beads“ nach den Dekonvolutionen von (a) Axialrec (b) TILLvislon und (c) KS400 (ZeissVision). Verschiedene Parameter wurden ausgetestet, Details siehe Text. Abkz.: it: iterations, ov: overrelaxationtable, high: filter quality high, ML: Maximum Likelihood, conj. Grad.: Conjugated Gradient mode, norm: Normal mode.

3.3.3 Chromosomenterritorien

Der Theorie nach sollten entfaltete Weitfeldbilder dasselbe Aussehen wie konfokale Bilder besitzen. Die Vielzahl der Einflüsse beginnt mit der Qualität der Eingangsbilder und endet beim „Grad an Zufriedenheit“ beim Betrachten der entfalteten Bilder. Auch hier gelten als Anforderungen für eine gute Dekonvolution (S. 92): keine Artefakte, eine möglichst weitgehende Annäherung an das konfokal erhaltene Aussehen im xz-Schnitt, nicht zu viel Signalbeschneidung durch Überrestauration in der xy-Ebene.

Um die verschiedene Software vergleichen und deren Parameter einstellen zu können, wurde ein Kanal eines Vielfarben-Bildstapels mit jedem Programm getestet. Als Beispiel diente ein Fibroblastenzellkern, auf den 5 Painting Sonden hybridisiert wurden, wie in Tab. 3-3 dargestellt. Zuerst wurden Aufnahmen am konfokalen Mikroskop gemacht (Abb. 3-17). Dieser Bildstapel diente als Referenz für die Weitfeldaufnahmen (Abb. 3-18) und den verschiedenen Dekonvolutionsalgorithmen.

	Fitc (grün)	Cy3 (rot)	Cy5 (blau)
Chr.1		x	
Chr.3	x	x	
Chr.10		x	x
Chr.12	x		x
Chr.20	x		

Tab. 3-3 Markierungsschema des Experiments zur vergleichenden Dekonvolution.

Die Eigenschaften dieser konfokalen Bilder waren:

- kein / kaum „out-of-focus“ Information
- hoher Hintergrund

Im Gegensatz dazu waren die Eigenschaften der Weitfeldbilder:

- „out-of-focus“ Information über und unterhalb der Brennebene
- etwas geringere Auflösung als beim CLSM
- hohe Sensitivität in den einzelnen Kanälen.

Konfokale Schnittserie

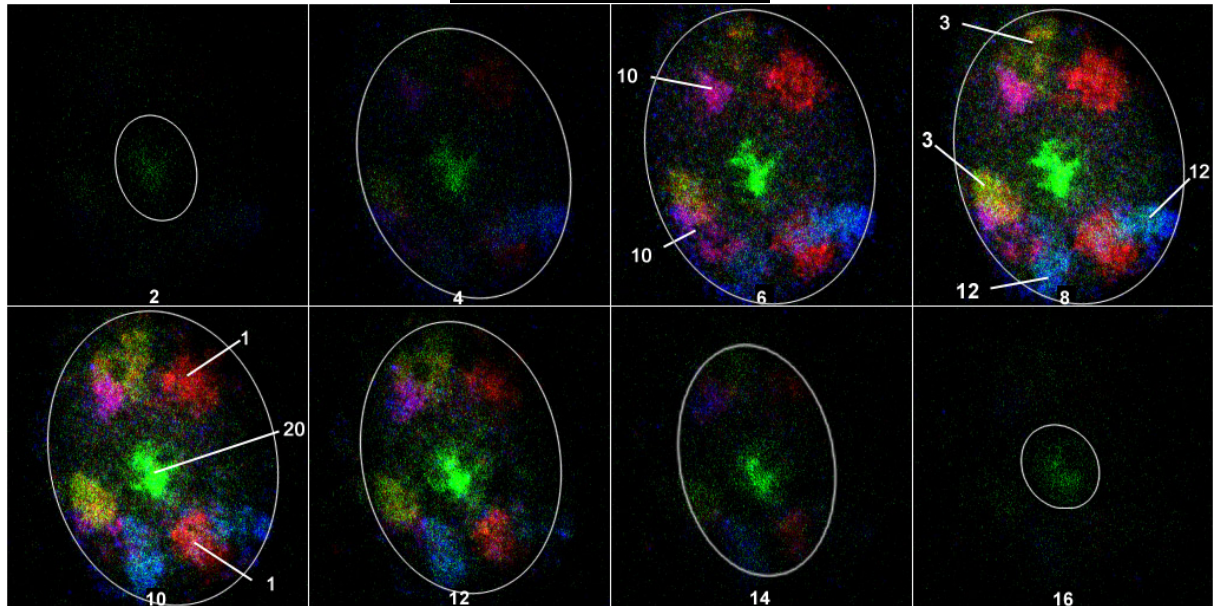


Abb. 3-17 Konfokale Schnittserie durch einen Fibroblastenkern. Die CT der kombinato-
risch markierten Chromosomen wurden mit Adobe Photoshop beschriftet und die ungefähren
Zellkerngrenzen eingezeichnet. Die Nummer der Ebene ist in jedem einzelnen Bild unten
angegeben.

Weitfeldschnittserie

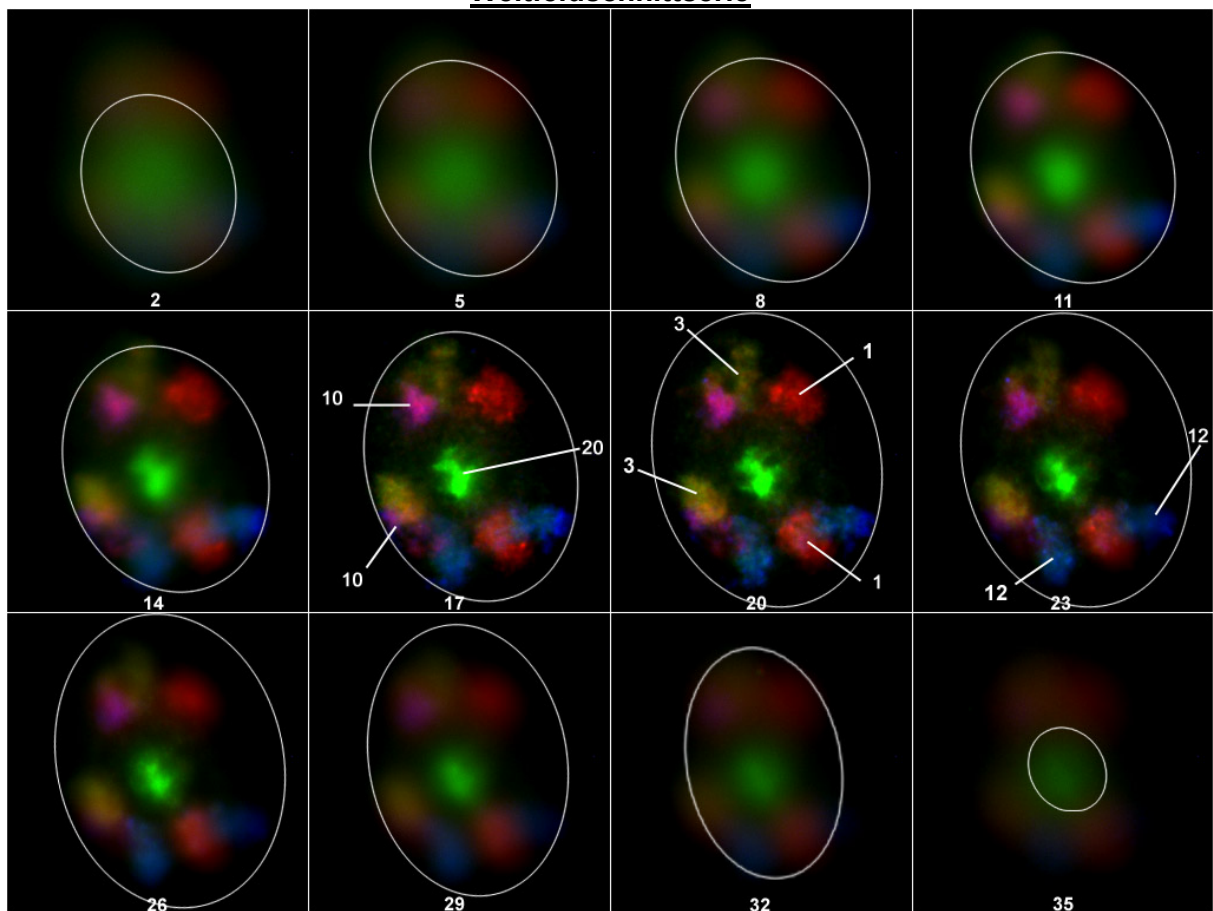


Abb. 3-18 Weitfeldschnittserie analog Abb. 3-17. Nur in den mittleren Ebenen sind die
Domänen scharf zu erkennen, nach oben und unten hin verschwimmen die Konturen durch
Unschärfe. Die Zellkerngrenzen wurden nur ungefähr eingezeichnet.

Dekonvolution des im Fitc-Kanal am Weitfeldmikroskop aufgenommenen Bildstapels

CT waren in beiden Bildstapeln eindeutig zuordenbar. Die Dekonvolution musste für jeden aufgenommenen Fluorochromkanal einzeln durchgeführt werden. Deshalb reichte es für einen Test verschiedener Dekonvolutionsalgorithmen aus, sich einen Kanal als Beispiel auszusuchen und an ihm die Dekonvolution exemplarisch zu zeigen. Hier wurde die Dekonvolution am SpectrumGreen - Kanal ($Sg \approx Fitc$) ausgetestet und versucht, die optimalen Parameter zu finden. Der Bildstapel umfasste am Weitfeldmikroskop 40 s/w-Bilder und wurde damit in z-Richtung weit genug aufgenommen, um dem Nyquist-Kriterium zu genügen. Der Informationsgehalt des Bilderstapels entsprach fünf erkennbare Territorien, wobei das mittlere viel stärker angefärbt war, als die äußeren vier (Abb. 3-19). In einem idealen Bild sollten alle Signale in etwa gleich intensiv sein, nur ließ sich das in den Experimenten nicht immer erreichen. Deshalb stellt dieses kontrastreiche Bild eine Herausforderung an eine Dekonvolutionssoftware dar. Wird zuviel restauriert, verschwinden die flauen äußeren CT, eine ungenügende Dekonvolution hinterlässt Unschärfen in den einzelnen Ebenen des Bildstapels.

Als Vergleichskriterium wurde jeweils die schwellwertabhängige Volumenkurve berechnet und mit derjenigen des Weitfeld-Originalbilds (Abb. 3-20), bzw. mit derjenigen des konfokalen Bildes (Abb. 3-19) verglichen. Dargestellt sind die Bilder ohne eine Schwellwertsetzung. Man erkennt das deutlich größere Volumen der Grauwerte in den Weitfelddaten ohne Dekonvolution.

Fitc-Kanal der konfokalen Schnittserie

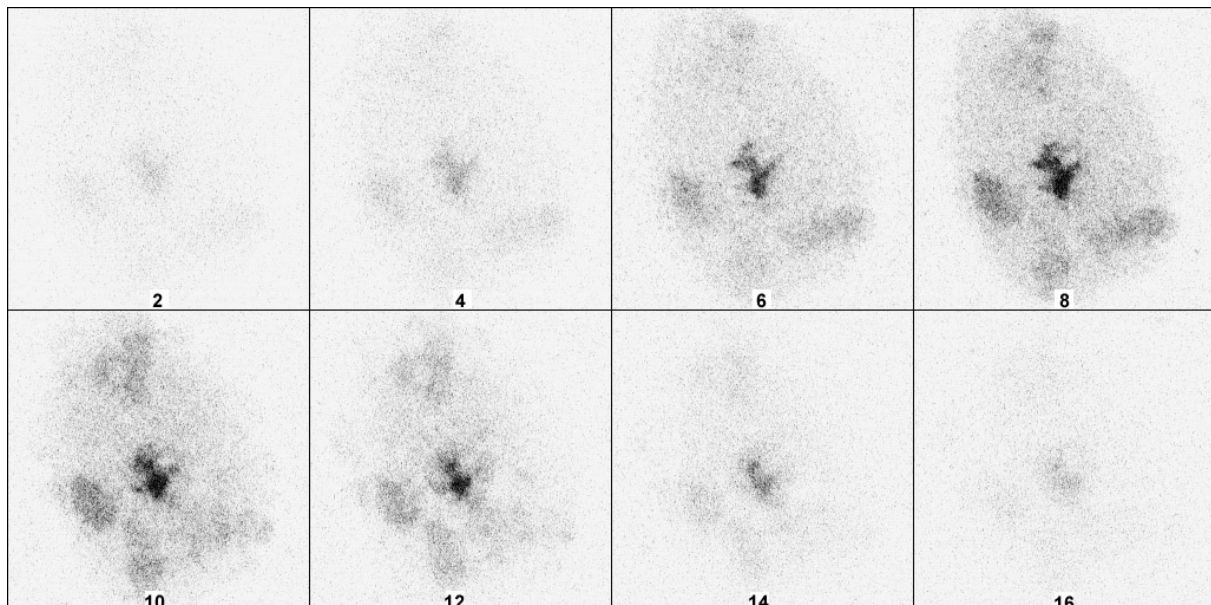


Abb. 3-19 Konfokale Aufnahme (Fitc-Kanal).

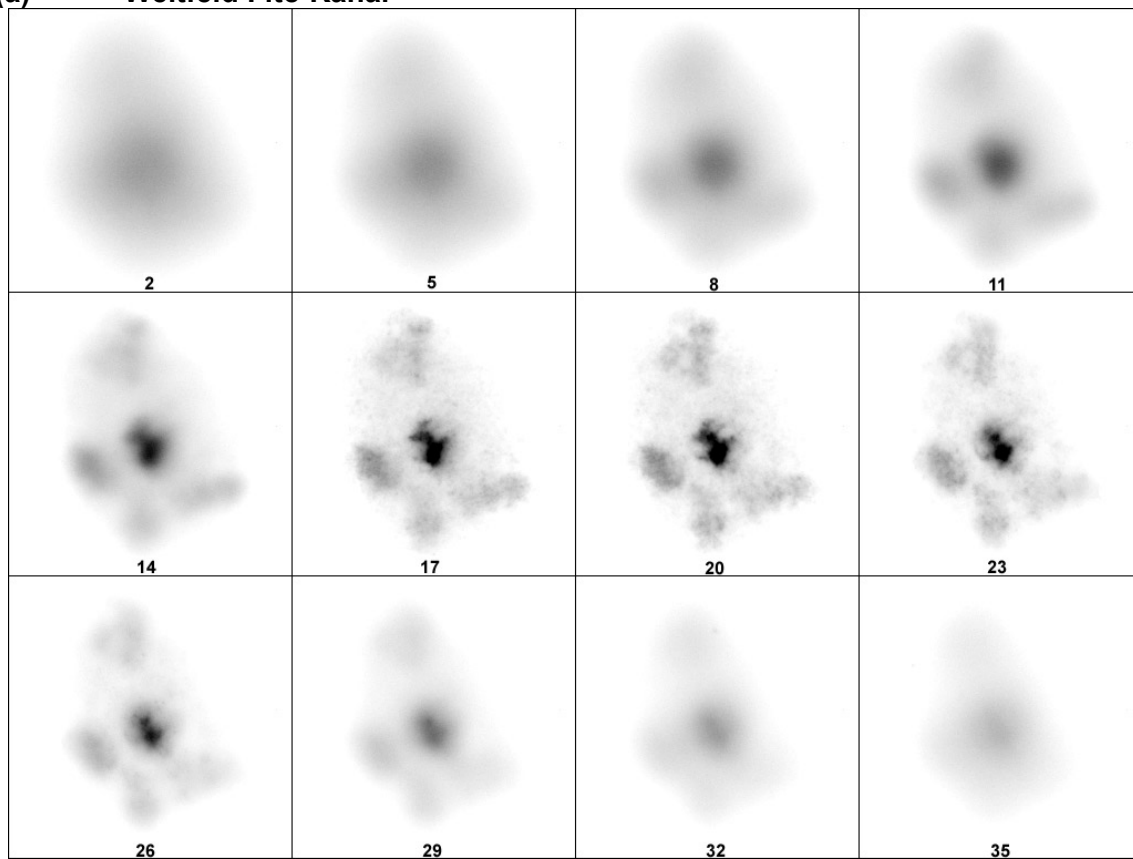
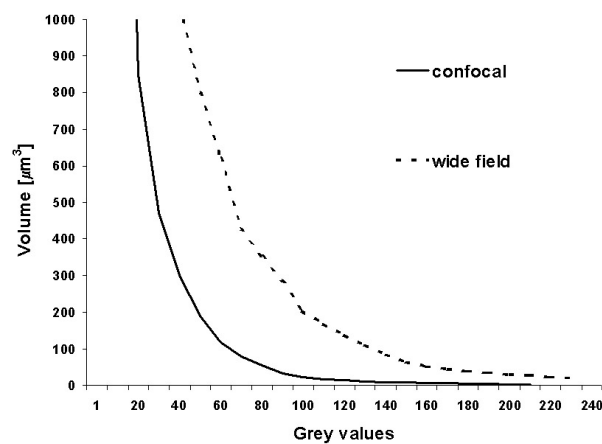
Fitc-Kanal der Weitfeldschnittserie und Volumenmessung**(a) Weitfeld Fitc-Kanal****(b) schwellwertabhängige Volumenmessung**

Abb. 3-20 Fitc-Kanal. (a) Weitfeldaufnahme desselben Kerns wie in Abb. 3-19. (b) Volumenmessung der Grauwerte in Abhängigkeit vom Schwellwert (x-Achse). Der Weitfelddatensatz hat ein deutlich größeres Volumen.

3.3.3.1 Dekonvolution mit Huygens

Die in dieser Arbeit in allen weiteren Experimenten standardmäßig verwendete Huygens-Software hat zwei Algorithmen implementiert: (i) Maximum-Likelihood Estimation (MLE) (ii) Iterative Constrained Tikhonov-Miller (ICTM)

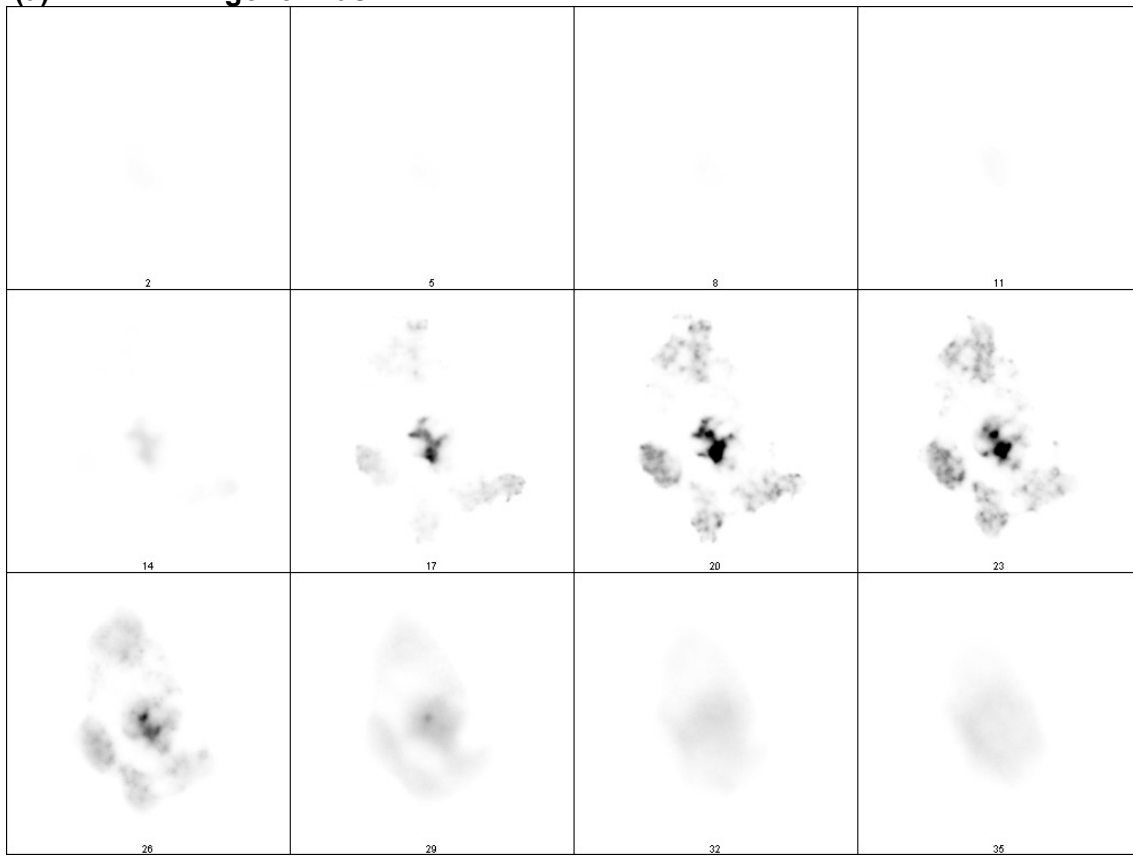
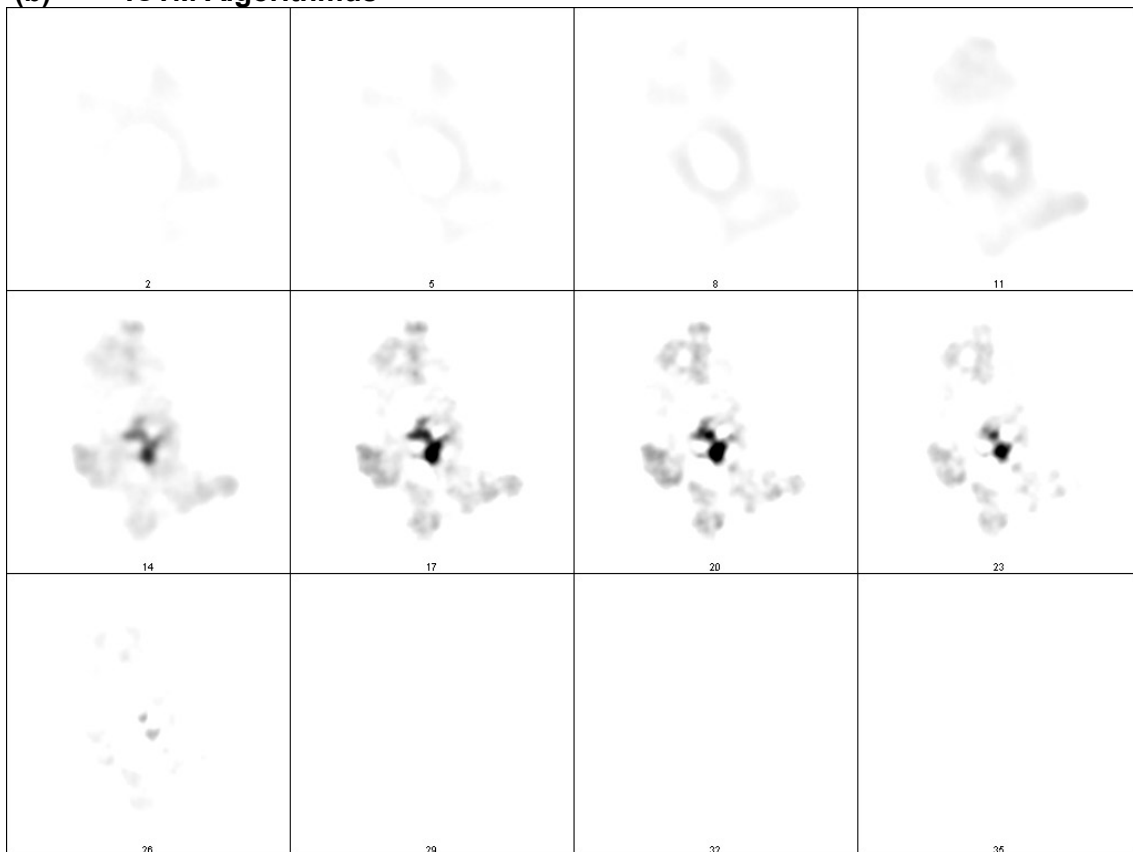
Algorithmus. Beide lieferten mit die besten Resultate, die mit visueller Betrachtung und Volumenmessungen auswertbar waren.

In der Galerieansicht des MLE-Algorithmus (Abb. 3-21 a) kann man gut erkennen, dass die Unschärfe überhalb der Brennebene völlig und unterhalb zu weiten Teilen entfernt wurde. Alle fünf CT sind eindeutig zu erkennen. Die Volumenkurve nach der Dekonvolution (c) ist gegenüber der Volumenkurve aus dem konfokalen Bilderstapel und der Volumenkurve aus dem nicht-entfalteten Weitfeld-Bilderstapel stark nach links verschoben. Dies ist an sich nicht folgenschwer, solange für einen bestimmten Schwellwertbereich nach dem Urteil des Betrachters die CT angemessen abgebildet werden. Es erschwert aber den direkten Vergleich mit konfokalen Bildern. Außerdem muss die Gefahr einer Überrestauration vermieden werden, die zu kleine Volumina liefern würde.

Der zweite *Huygens*-Algorithmus ICTM lieferte ebenfalls gute Ergebnisse, obwohl die Flächen leichter zu verschwimmen scheinen (Abb. 3-21 b). In Bildebenen überhalb der abgebildeten Fokusebene ist ein kleines Ringartefakt zu erkennen.

Speicherte man nach bestimmten Iterationen Bilder als Zwischenstufen ab, so konnte man zeitlich verfolgen, wie die beiden Algorithmen das interne Konvergenzkriterium erreichten. Hilfreich war dabei der sogenannte „Quality factor“, der dieses interne Konvergenzkriterium als Zahlenwert widerspiegelte. Dieser Wert wird vom Programm ausgegeben (Abb. 3-22). Aus den 2 Graphen und den zugehörigen Bildern wird folgendes ersichtlich:

- Der ICTM-Algorithmus erreicht bereits nach kurzer Zeit (16 Iterationen) sein Ende, der MLE erst nach 60.
- Lässt man den Algorithmus zum Ende fortschreiten, waren die Daten überrestauriert, ersichtlich aus den mit hohen Iterationen schlechter gewordenen Bildern. Der Zeitpunkt mit den besten Bildern lag etwa bei fünfzehn Iterationen für MLE, bzw. etwa bei sieben Iterationen für ICTM. Diese Werte wurden bei den weiteren Experimenten als Parameter „Maximum number of Iterations“ angegeben.

Huygens Dekonvolution**(a) MLE Algorithmus****(b) ICTM Algorithmus**

(c) schwellwertabhängige Volumenmessung

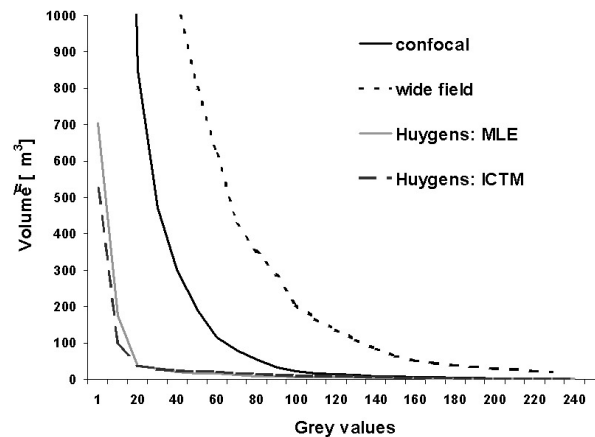


Abb. 3-21 (vorige Seite und hier) *Huygens Dekonvolution*. (a) MLE (b) ICTM (c) Volumenmessung. Details siehe Text.

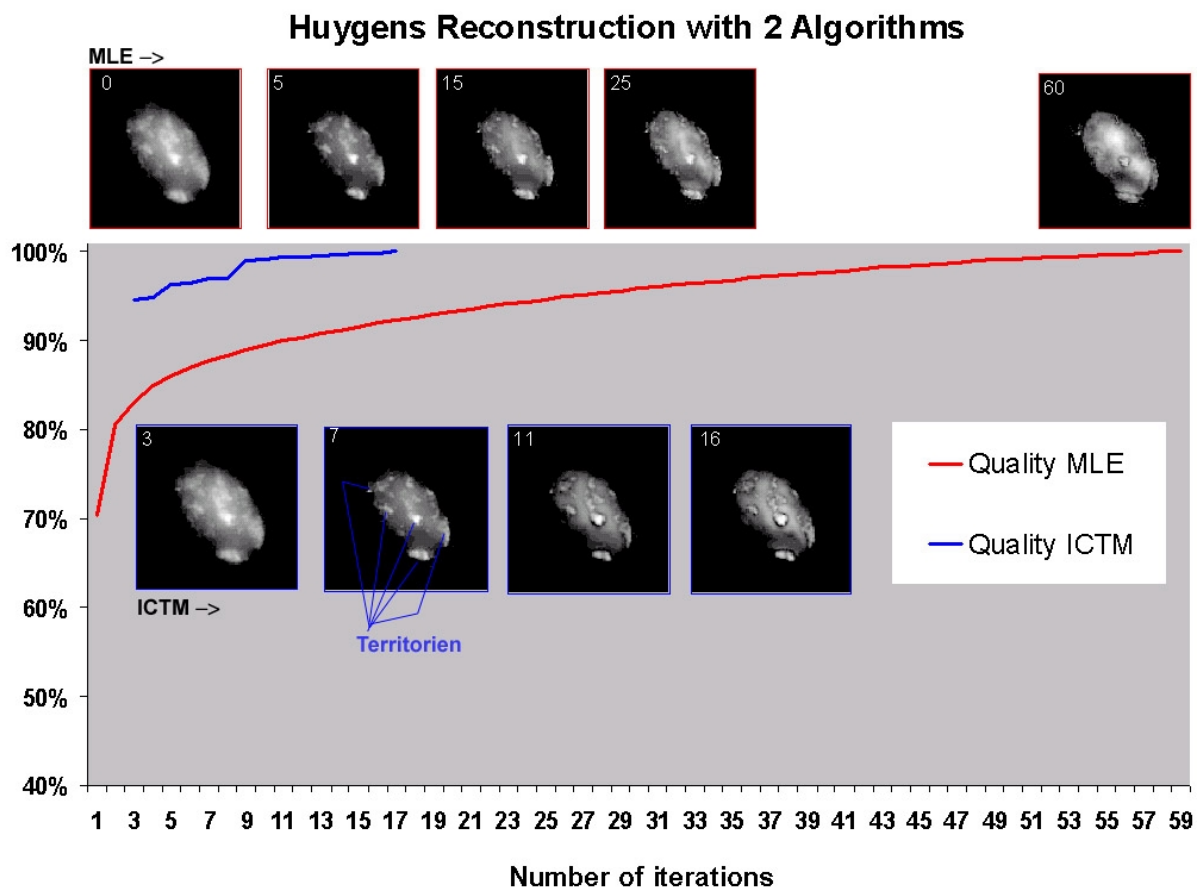


Abb. 3-22 *Direkter Vergleich der beiden in Huygens implementierten Algorithmen Maximum-Likelihood-Estimation (MLE) und Iterative-Constrained-Tikhonov-Miller (ICTM)*. Dargestellt sind die Qualitätsfaktoren, die das Programm intern benützt, um zu einem Ende zu konvergieren. Sie wurden hier nicht normalisiert, sondern sollen den Unterschied deutlich machen, nach wieviel Iterationen jeder Algorithmus Konvergenz erreicht. Im Gegensatz zu MLE wurde der ICTM Qualitätsfaktor erst nach der dritten Iteration zum ersten Mal ausgegeben, weshalb er bereits bei über 90% beginnt. Der normalisierte Graph ist in Abb. 2-5 (S. 67) zu sehen. In den Bildern sind die Zwischenschritte zu den Iterationen der angegebenen Nummern dargestellt.

3.3.3.2 Dekonvolution mit *KS400* (Zeiss Vision)

In der Software *KS400* Zeiss Vision sind vier Algorithmen implementiert, zwei davon allerdings noch im Prototypenstadium. Die Anzahl der Iterationen musste abgeschätzt, bzw. ausprobiert werden. Dabei lieferten die einzelnen Algorithmen unterschiedliche Resultate.

Alle Dekonvolutionen wurden in den hier gezeigten Beispielen mit den folgenden Parametern durchgeführt: 20 Iterationen, Konvergenzmodus „normal“, AutoScale „on“.

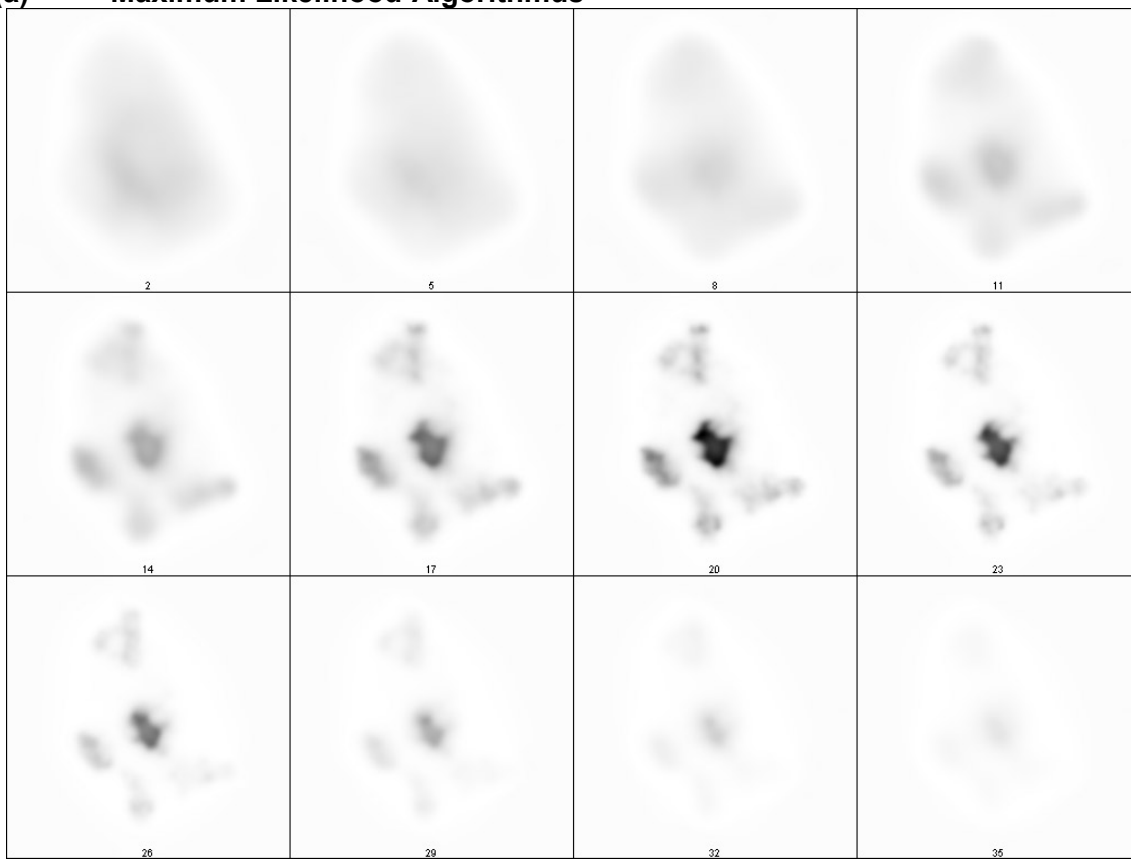
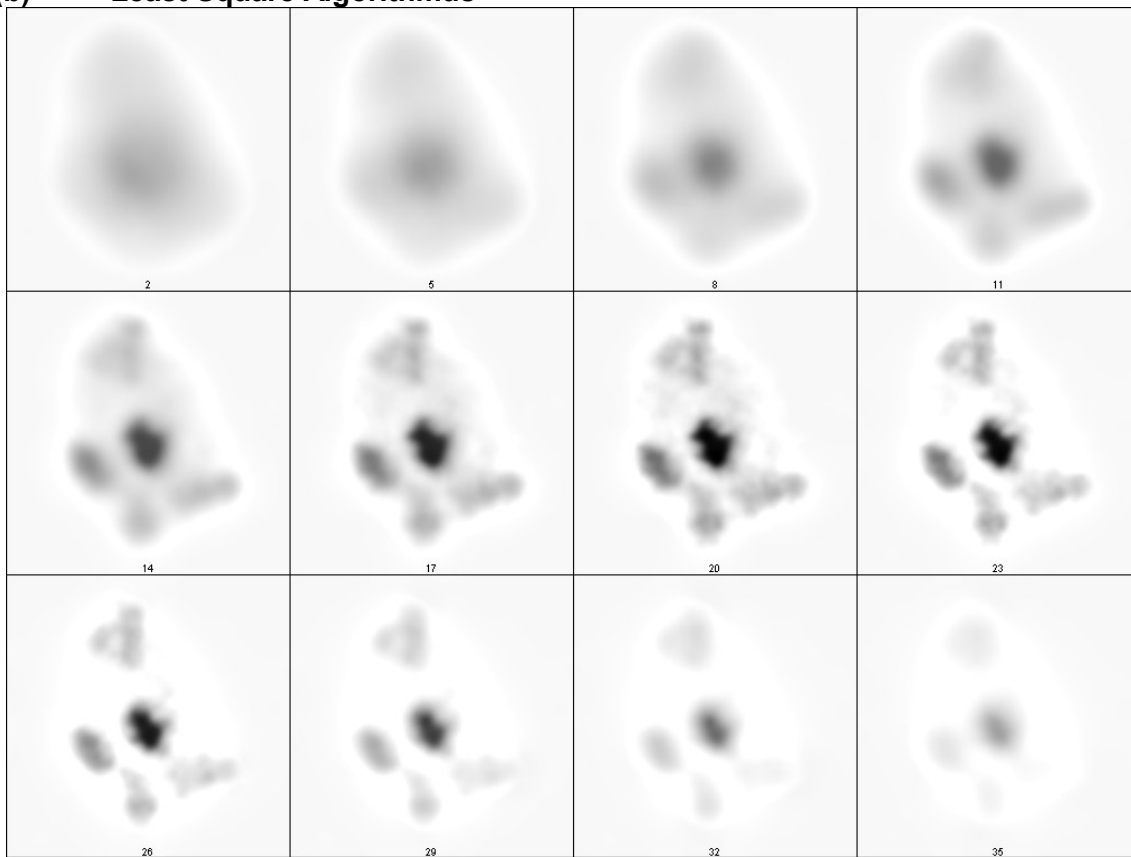
Eine Reihe anderer Parameter wurden ebenfalls ausgetestet, ergaben jedoch schlechtere Resultate. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass in dieser Arbeit nicht getestete Parameter eventuell bessere Ergebnisse geliefert hätten.

Die besten Ergebnisse wurden mit dem Maximum-Likelihood Algorithmus (20 Iterationen) gefunden (Abb. 3-23 a). Das Volumen (b) ist im Vergleich zu den *Huygens*-Algorithmen bei niedrigen Schwellwerten größer, was nicht verwunderlich ist, wenn man die noch bestehende Unschärfe vor allem in Bildern überhalb der Fokusebene betrachtet. Volumengleichheit mit der konfokalen Messung wird etwa bei Grauwert 90 erreicht. Bei den konfokalen Aufnahmen an dem verwendeten Leica TCS 4D ist das Volumen meist in einem Schwellwertbereich von 40 - 90 Grauwerten korrekt.

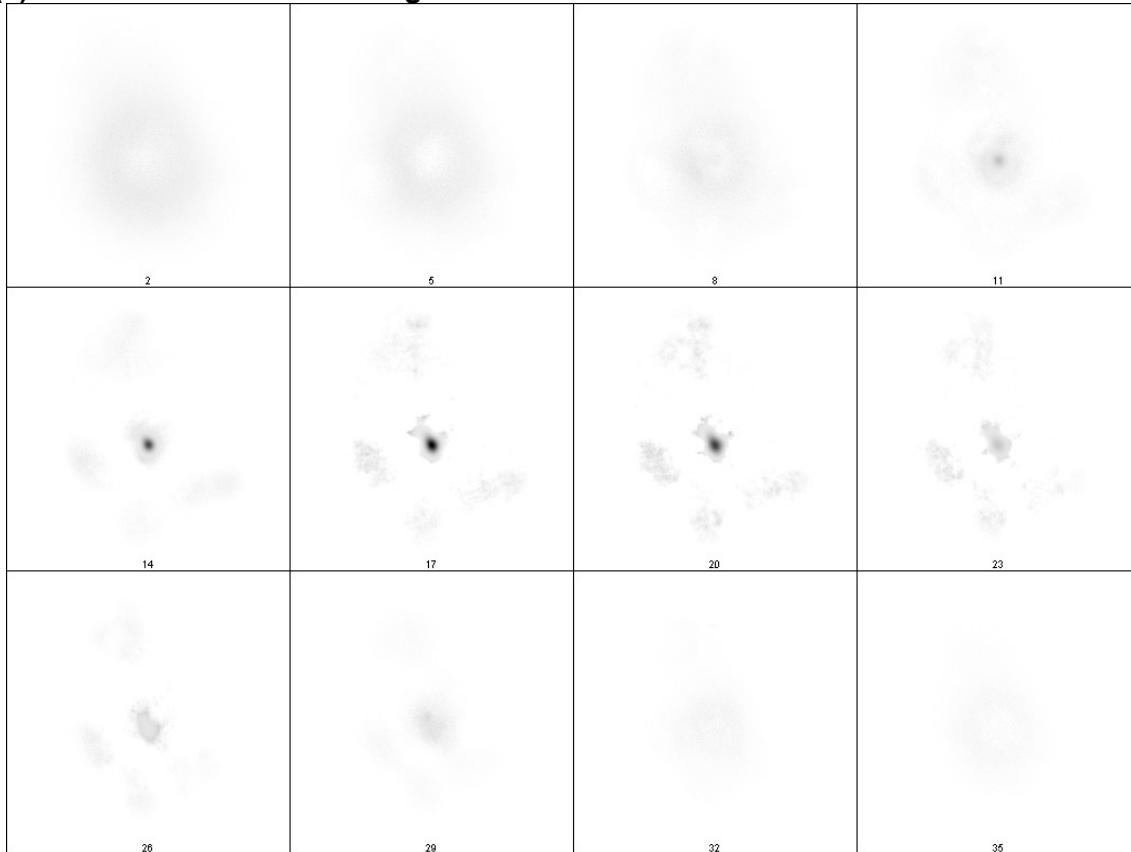
In etwa die gleichen Ergebnisse wurden mit dem Maximum-Entropie Algorithmus (20 Iterationen) erzielt (keine Galerie gezeigt, da die Bilder fast identisch den ML-Bildern waren).

Der Least-Square-Algorithmus lieferte keine ausreichende Restauration (Abb. 3-23 b), die Volumenkurve war bei diese Messung dem konfokalen Kurvenverlauf am ähnlichsten, jedoch immer noch größer als dieser.

Eine klare Überrestauration lieferte der Janson-van-Cittert-Algorithmus. Die schwachen Territorien sind nicht mehr gut zu erkennen und Ringartefakte bilden sich an den Rändern (Abb. 3-23 c). Das mittlere, ursprünglich stark angefärbte CT ist zu einem Fleck geschrumpft.

KS400 Dekonvolution**(a) Maximum Likelihood-Algorithmus****(b) Least Square Algorithmus**

(c) Janson van Cittert Algorithmus



(d) schwellwertabhängige Volumenmessung

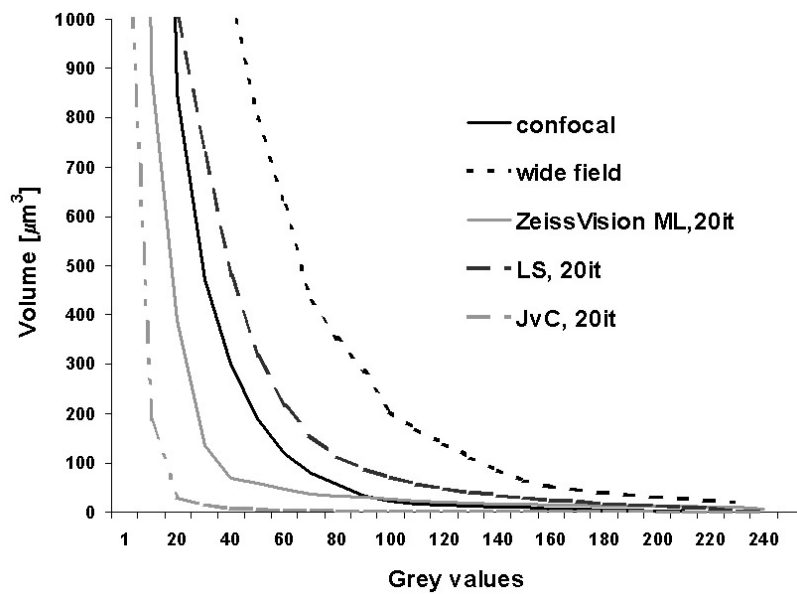


Abb. 3-23 (vorige Seite und hier) Dekonvolution mit KS400 (ZeissVision). (a) Maximum-Likelihood-Algorithmus (ML). Der Maximum Entropie-Algorithmus (ME) ist nicht gezeigt, weil die Bilder fast identisch aussehen. (b) Least Square Algorithmus (c) Janson van Cittert Algorithmus (d) Volumenmessung. Details siehe Text.

3.3.3.3 Dekonvolution mit *Axialrec*

Das Programm *axialrec* ist ein von R. Heintzmann (Göttingen) in der Arbeitsgruppe von C. Cremer (Heidelberg) geschriebener Dekonvolutionsalgorithmus, welcher seinen Einsatz in der Axialtomographie (Heintzmann et al. 2000) fand, aber nach Angaben des Autors auch mit den hier verwendeten Bildern ausgetestet werden konnte. Verwendet wurden bei dieser Dekonvolution die Parameter 20 Iterationen und Overrelaxationtable 10. Die PSF und die zu entfaltenden Bilder mussten die gleiche Anzahl Schnitte haben.

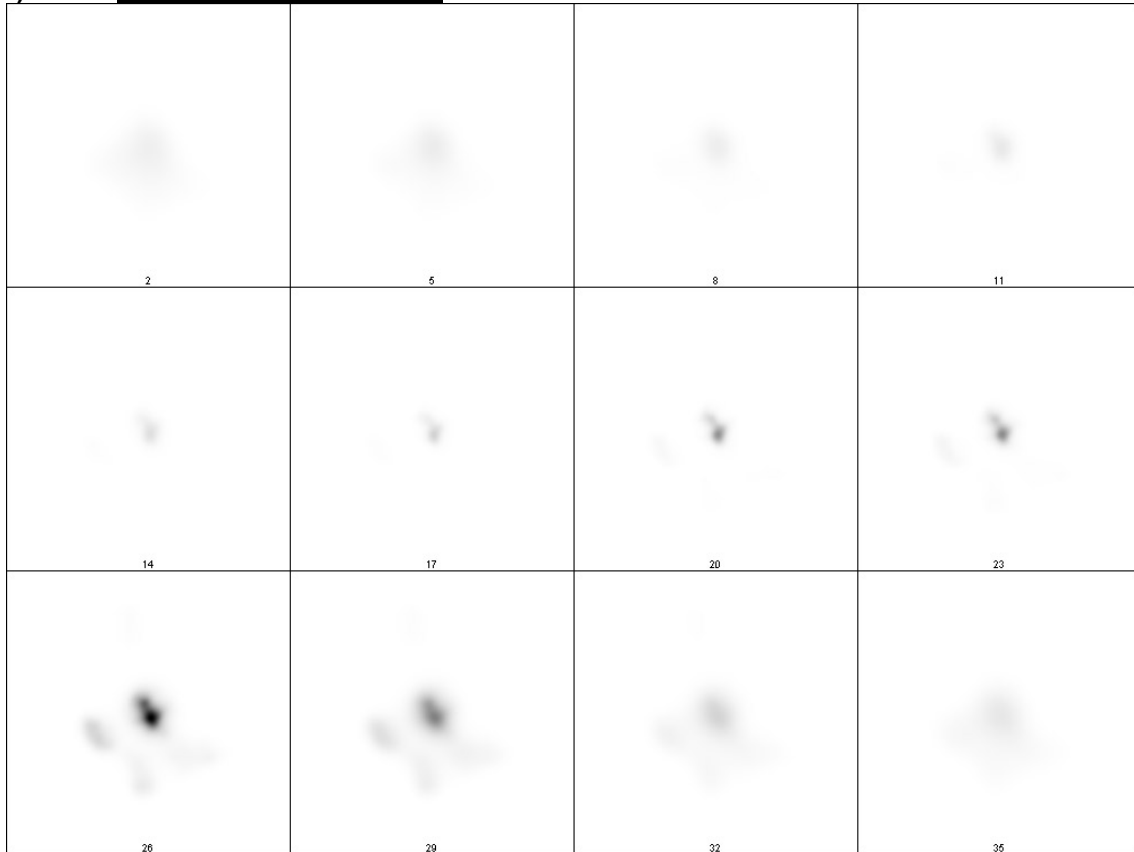
Auf den Ergebnisbildern ist fast nichts mehr von der ursprünglichen Struktur zu sehen und das Volumen ist entsprechend klein (Abb. 3-24). Trotz vielen Parametertests konnte hier kein zufriedenstellendes Resultat erzielt werden.

3.3.3.4 Dekonvolution mit *TILLvisION*

Bei dieser Software war die Filter-Berechnung (PSF-Berechnung) der entscheidende Schritt. Für den hier berechneten Filter mussten wiederum Parameter ausgetestet werden, um die am besten geeigneten herauszufinden (Größe „11x11x11 Pixel“, Auflösung „Medium“, Konvergenz „0.99“, 100 Iterationen). Bei der Dekonvolution an sich, konnten keine Parameter mehr verändert werden.

Man erkennt in den Bildern (Abb. 3-25), dass nach der Dekonvolution die fünf CT schärfer erscheinen. Auch die Volumenkurve verläuft parallel zur konfokalen Kurve, was einen ähnlichen Schwellwertbereich für den Versuch einer Volumenbestimmung nahe legt. Unterhalb den Bildern der Fokusebene bilden sich leichte Ringartefakte.

(a) Axialrec Deconvolution



(b) schwellwertabhängige Volumenmessung

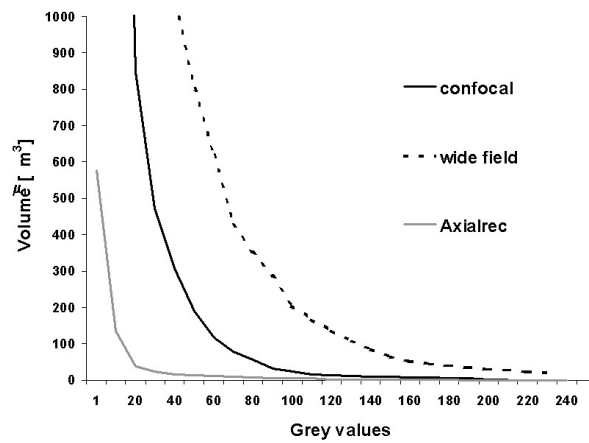


Abb. 3-24 Axialrec Dekonvolutionsprogramm. (a) Galerie (b) Volumenmessung. Details siehe Text.

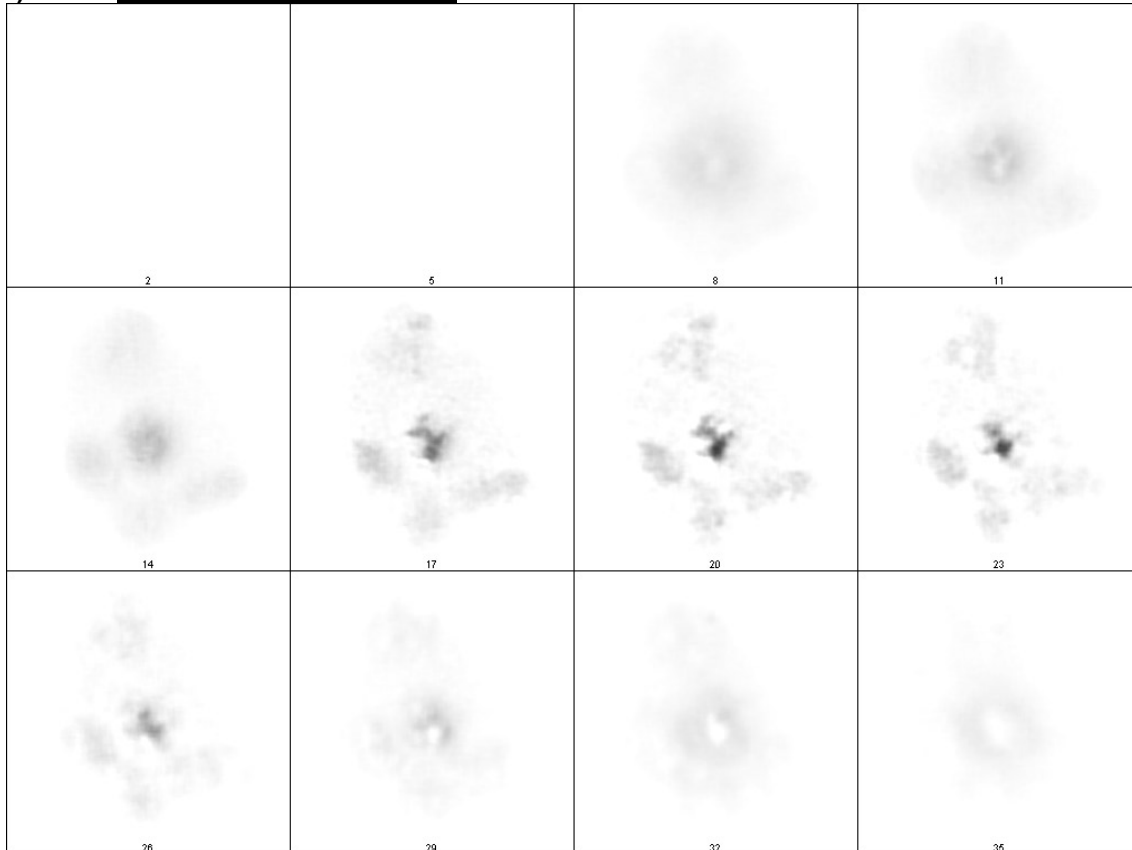
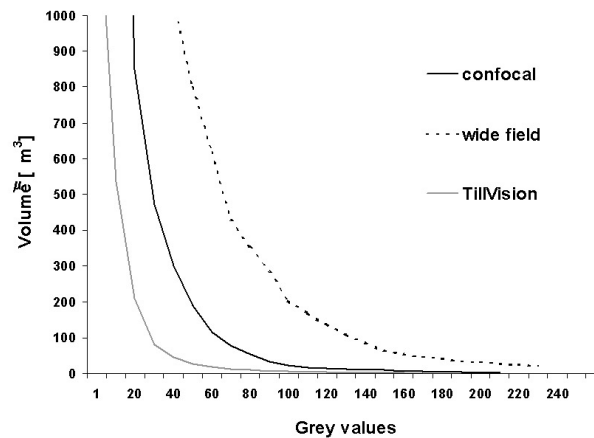
(a) Tillvislon Deconvolution**(b) schwellwertabhängige Volumenmessung**

Abb. 3-25 Tillvislon Dekonvolutionsprogramm. (a) Galerie (b) Volumenmessung Details siehe Text.

3.4 Klassifikation mit *mfish3d*

Von MCK zu *mfish3d*

Der Klassifikation aufgenommener Vielfarben-Bilddaten kam in dieser Arbeit eine entscheidende Bedeutung zu. Das hier entwickelte Programm ist eine Erweiterung des im Softwarepaket MCK (Fa. Leica) implementierten Moduls zur Klassifikation von Metaphasen (Eils et al. 1998; Saracoglu et al. 2001). Die

Änderungen bestanden in einer erweiterten Einleseroutine, welche Tif-Stapelbilder erkennt, Implementation verschiedener Pixelfilter und eine flexible Einstellungsmöglichkeit für Parameter, wie z. B. das Winkelkriterium (Kapitel 2.8, S. 72). Das Programm wurde von K. Saracoglu (Heidelberg) nach meinen Vorgaben geschrieben und in den einzelnen Entwicklungsstadien von mir getestet. Eine eigens geschriebene Dokumentation befindet sich auf der CDROM in der Datei „/docs/mfish3d_Doku.pdf“.

Metaphasebilder

Als ein erster Schritt wurden Aufnahmen von Metaphasespreitungen verwendet, um die Klassifikationsgenauigkeit des neu entwickelten *mfish3d* mit dem herkömmlichen *MCK* zu überprüfen. Die Metaphase in Abb. 3-3 (S. 91) wurde mit folgenden Hauptparametern klassifiziert: ANGLE 15, BACKGROUND 1, MINSIZE 2.

Alle Chromosomen wurden eindeutig erkannt und die richtige Falschfarbe zugeordnet. In den nächsten Tests sollte *mfish3d* auf simulierten Daten und schließlich auf mikroskopische 3D-Bilder angewandt werden.

3.4.1 Klassifikation mit simulierten Modelldaten

Würde man bloß ein Fluorochrom für jede einzelne Painting Sonde verwenden, so würde jeder Überlapp zu einer Kombination führen, die im Markierungsschema nicht auftreten kann und *mfish3d* würde diese Regionen schwarz lassen (= Fall A „unerlaubte Kombination“). Bei einer Verwendung von Zweierkombinationen ist das nicht mehr der Fall (Azofeifa et al. 2000). Hier ergeben sich auch Kombinationen, die ein Territorium an einen falschen Ort ansiedeln würden (= Fall B „erlaubte Kombination mit falschem Resultat“). Die Möglichkeiten solcher Falschklassifikationen nehmen weiter zu, wenn komplexere Kombinationsschemata für die Sondenmarkierung benutzt werden.

Aus diesem Grund wurde das Markierungsschema so verbessert, dass im M-FISH Mix nur noch Zweiermarkierungen vor kamen, mit den Ausnahmen 19, 20 und Y, die jeweils mit einem Fluorochrom markiert wurden (Tab. 2-2, S. 49). Bei gut gespreiteten Metaphasepräparaten liegen die Chromosomen so weit voneinander entfernt, dass es - außer im Falle einer Translokation - normalerweise kaum zu Überlagerungen kommt. Im engen Zellkern ist es dagegen leicht vorstellbar, dass unerwünschte Überlappungen der Kanäle häufig sind, wenn man bedenkt, dass allein schon die Fluorochrome bei ihrer Anregung über ihre eigentlichen Grenzen hinaus streuen („flaring“).

Bestimmung der Überlappungsbereiche

Um den Überlapp abschätzen und gleichzeitig die Parameter von *mfish3d* testen zu können, wurde unter Verwendung des SCD-Modells (S. 25) ein simulierter Datensatz konstruiert, der sieben Chromosomen umfasste, die mit insgesamt drei Fluorochromen kombinatorisch markiert waren (S. 79). Dazu

wurden Einer-, Zweier- und Dreiermarkierungen verwendet. Das simulierte Originalbild mit 14 distinkten CT wurde mit einer PSF gefaltet und anschließend mit dem *Huygens* ICTM Algorithmus wieder entfaltet. Als Folge der Faltung sollten sich Überlappungen verstärkt zwischen den einzelnen CT bilden, die im simulierten Originalbild fehlen. Der Grad an Überlappung sollte bei der Einermarkierung geringer als bei der Zweiermarkierung und am stärksten bei der Dreiermarkierung sein (siehe Tab. 3-4). Bei der Dreiermarkierung ergab sich ein Überlapp von 12,2%, bei den Zweiermarkierungen von 2,3% und bei den Einermarkierungen von 0%. Der kritische Überlappungsbereich in Pixeln wurde aus den Klassifikationsbildern wie folgt bestimmt (siehe auch Kapitel 2.8.3, S. 75): Jede Klassifikationsfalschfarbe wurde extrahiert und separat weiterbearbeitet. Von diesem Ergebnisbild (Originalbild plus Überlappbereiche) wurde das Originalbild subtrahiert und der Rest im Verhältnis zum Ergebnisbild in Prozent berechnet. Daraus ergaben sich folgende Ergebnisse (siehe Tab. 3-4):

- Im gefalteten Bild erhöhten sich die Überlappungsbereiche zwischen den CT um ein Vielfaches, da die Faltung mit einer PSF zu ausgedehnteren Flächen führte.
- Im Vergleich zum Überlapp nach der Faltung (55%) reduzierte sich dieser Bereich nach der Dekonvolution wieder auf 40,4%. Der wesentlich kleinere Überlappungsbereich des simulierten Originalbildes (14,4%) wurde jedoch nicht wieder erreicht. Dies lag vor allem daran, dass die Einermarkierungen stark überlappten und dadurch unerlaubte Zweierkombinationen ergaben.
- Betrachtete man nur Zweiermarkierungen, was dem M-FISH Ansatz am nächsten kam, so ergab sich eine Verringerung der Falschklassifikationen nach der Dekonvolution von 19,6% auf 7,7%. Dies war ein wichtiger Hinweis für eine obligate Durchführung der Dekonvolution.
- Alle Werte der Einermarkierung waren im entfaltetem Bild größer, als im gefalteten Bild. Das lag daran, dass die Kanäle einzeln entfaltet wurden und dadurch unterschiedlich viel Bildinformation wiedergewonnen wurde, vor allem in den Außenbereichen der Territorien. Deswegen ergaben sich nach der Dekonvolution Einkombinationen, welche ursprünglich zu Zweierkombinationen gehörten. Dies resultierte in einem Anstieg falsch klassifizierter Regionen außerhalb der korrekten Territorien.

Klassifikation mit simulierten Modelldaten

Art der Markierung	Chr. N°	Fluorochrom Kombination	Klassifizierte Regionen außerhalb der korrekten Territorien		
			virtuelles Originalbild	gefaltetes Bild (konfokale Aufnahme)	Dekonvolution mit Huygens ICTM Algorithmus
1er	1	0,0,1	0,0%	5,3%	13,9%
	2	0,1,0	0,0%	0,6%	4,2%
	3	1,0,0	0,0%	0,0%	9,9%
2er	4	0,1,1	0,4%	2,5%	1,3%
	5	1,0,1	1,6%	3,3%	2,0%
	6	1,1,0	0,3%	13,8%	4,4%
3er	7	1,1,1	12,2%	29,4%	4,6%
Total			14,4%	55,0%	40,4%

Tab. 3-4 Bestimmung der mit *mfish3d* klassifizierten Regionen außerhalb der vertrauten CT aus dem simulierten Datensatz „GK-3Fluor-7Chr“ (Kapitel 2.9.2, S. 79). Die Orte der Territorien in diesem Datensatz sind a priori bekannt und waren auch nach der Klassifikation mit *mfish3d* sofort zu erkennen. Außerhalb dieser kommt es genau dann zu einer Klassifikation, wenn solche Regionen überlappen, deren Kombinationen eine legale Kombination darstellen. Liegen z. B. die CT 4 und 5 so nebeneinander, dass sie sich berühren, so wird im Überlappungsbereich die Farbe für das Chr. 7 angezeigt. Dies zeigt auch, dass Dreierkombinationen wo möglich zu vermeiden sind.

3.4.2 Konfokale Aufnahmen von drei Chromosomenterritorien *in situ*

An einfach zu kontrollierenden Bilderstapeln sollte das Klassifikationsprogramm *mfish3d* erprobt werden. 3 Painting Sonden wurden mit 3 verschiedenen Fluorochromen markiert, vorerst ohne eine kombinatorische Markierung, so dass die konfokalen Rohdaten in einer Galerie zum Vergleich mit den klassifizierten Bildern herangezogen werden konnten. Das Experiment wurde bereits vorgestellt (siehe Tab. 3-2) und die Originalbilder sind in Abb. 3-5a, b und c (S. 95) zu betrachten. Folgende Hauptparameter der Klassifikation stellten sich als ideal heraus (zur Erklärung der Begriffe siehe Methoden 2.8.2, S. 73): SINGLELABELS 1, ANGLE 33, BACKGROUND 4, MINSIZE 200.

Mit diesen ersten Ergebnissen wurde sichergestellt, dass eine automatische Klassifikation ganzer Bilderstapel zu einem korrekten Ergebnis führte (Abb. 3-26).

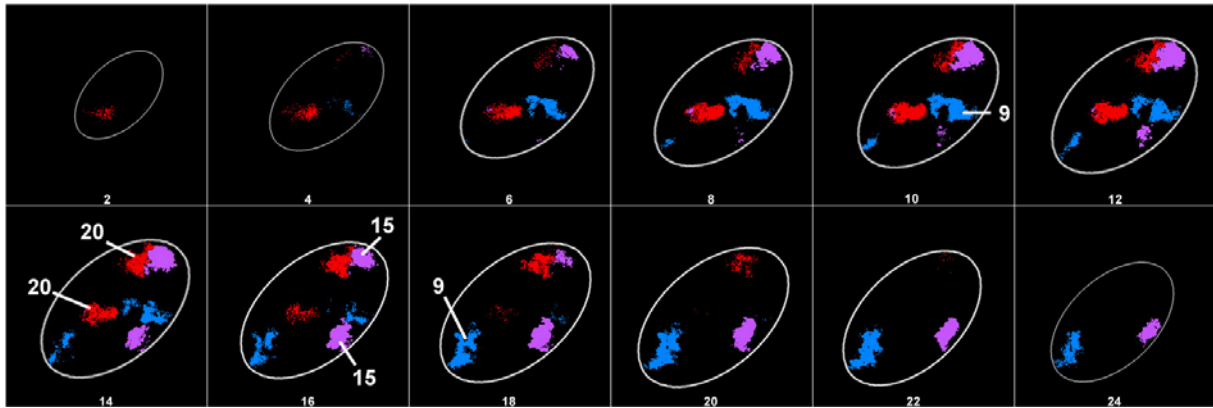


Abb. 3-26 mfish3d-Klassifikation. Klassifikation des konfokalen Bilderstapels aus Abb. 3-5 (S. 95) mit dem Programm *mfish3d*. Es wurden die drei Painting Sonden für die Chromosomen 9, 15 und 20 in Einfachmarkierungen verwendet und die im Text beschriebenen Klassifikationsparameter eingestellt. Alle sechs CT wurden automatisch zugeordnet. Die ungefähren Zellkerngrenzen sind eingezeichnet.

3.4.3 Konfokale Aufnahmen von sieben Chromosomenterritorien *in situ*

Die maximale Sondenanzahl, die man mit den drei am CLSM gebräuchlichen Fluorochromen Fitc, Cy3 und Cy5 kombinatorisch markieren kann, beträgt sieben ($2^3 - 1$, siehe Gleichung 2-1, S. 46). Um die prinzipielle Durchführbarkeit einer 3D-Klassifikation mit *mfish3d* zu demonstrieren wurden sieben Painting Sonden nach dem Markierungsschema in Tab. 3-5 markiert. Die damit dargestellten CT wurden mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen.

Kanal	Chromosomen						
	1	3	7	9	12	15	20
Fitc (grün)	×		×	×			×
Cy3 (rot)	×	×		×	×		
Cy5 (blau)	×	×				×	×
rgb-Farbe	weiß	magenta	grün	gelb	rot	blau	cyan
Falschfarbe	grau	blau	blaß-rot	hellblau	fleisch	lila	tief-rot

Tab. 3-5 Markierungsschema des 3 Fluorochrom – 7 CT – Experiments.

Der Vorteil bei diesem Markierungsschema besteht darin, dass man die Territorien noch visuell bestimmen kann, d. h. die Farben im RGB-Bild waren ausreichend gut unterscheidbar. Aber bereits hier stellten sich Schwierigkeiten in dieser Beziehung ein (siehe Abb. 3-27). Zum Beispiel wurden durch das Klassifikationsprogramm einerseits Regionen klassifiziert, die mit dem bloßen Auge nicht mehr gut sichtbar waren (z. B. Chr. 15), andererseits wurden CT, die bereits in Ebenen zuvor gut zu sehen waren, erst ein bis zwei Ebenen später klassifiziert (z. B. Chr. 1). Folgende Bildeigenschaften führten zu Klassifikationsproblemen:

- allgemein hoher Hintergrund in konfokalen Bildern.

- unterschiedlich hoher Hintergrund in den einzelnen Kanälen (Fitc > Cy5 > Cy3).
- ungleichmäßige Hybridisierungseffizienz der Painting Sonden in den einzelnen Kanälen.
- Klassifikationsbilder mit „körniger“ Struktur (siehe Abb. 3-27 b).

Die Größe der Territorien in der Interphase korrelierte nicht immer eindeutig mit der Chromosomengröße in der Metaphase. Dies lies die Zuordnung teilweise zweifelhaft erscheinen, obwohl sie aufgrund der Farbkennung eindeutig war. Beispielsweise erschien das Volumen jedes der Chr. 12 Territorien gelegentlich mindestens gleich groß, wenn nicht größer als das Volumen des CT 1 (siehe Abb. 3-27 a, b). Nach der ISCN - Nomenklatur (1985) hat das Chr. 12 in der Metaphase nur etwa 50% der Größe des Chr. 1. Dieses kondensationsabhängige Größenproblem stellte sich in Laufe der Arbeit immer wieder ein. Bislang ist unbekannt, welchen Kondensationsgrad Territorien in der Interphase besitzen können.

Die bei jeder *mfish3d*-Klassifikation ausgegebenen Inventor-Dateien (die Dateien *.iv auf der CDRom) geben einen anschaulichen Eindruck über die räumliche Verteilung und über die Volumina der hybridisierten Signale. Darin lässt sich auch deutlich die Flachheit der Zellen erkennen (siehe Abb. 3-27 c).

3D-Rekonstruktion von sieben Chromosomen in einem Fibroblasten

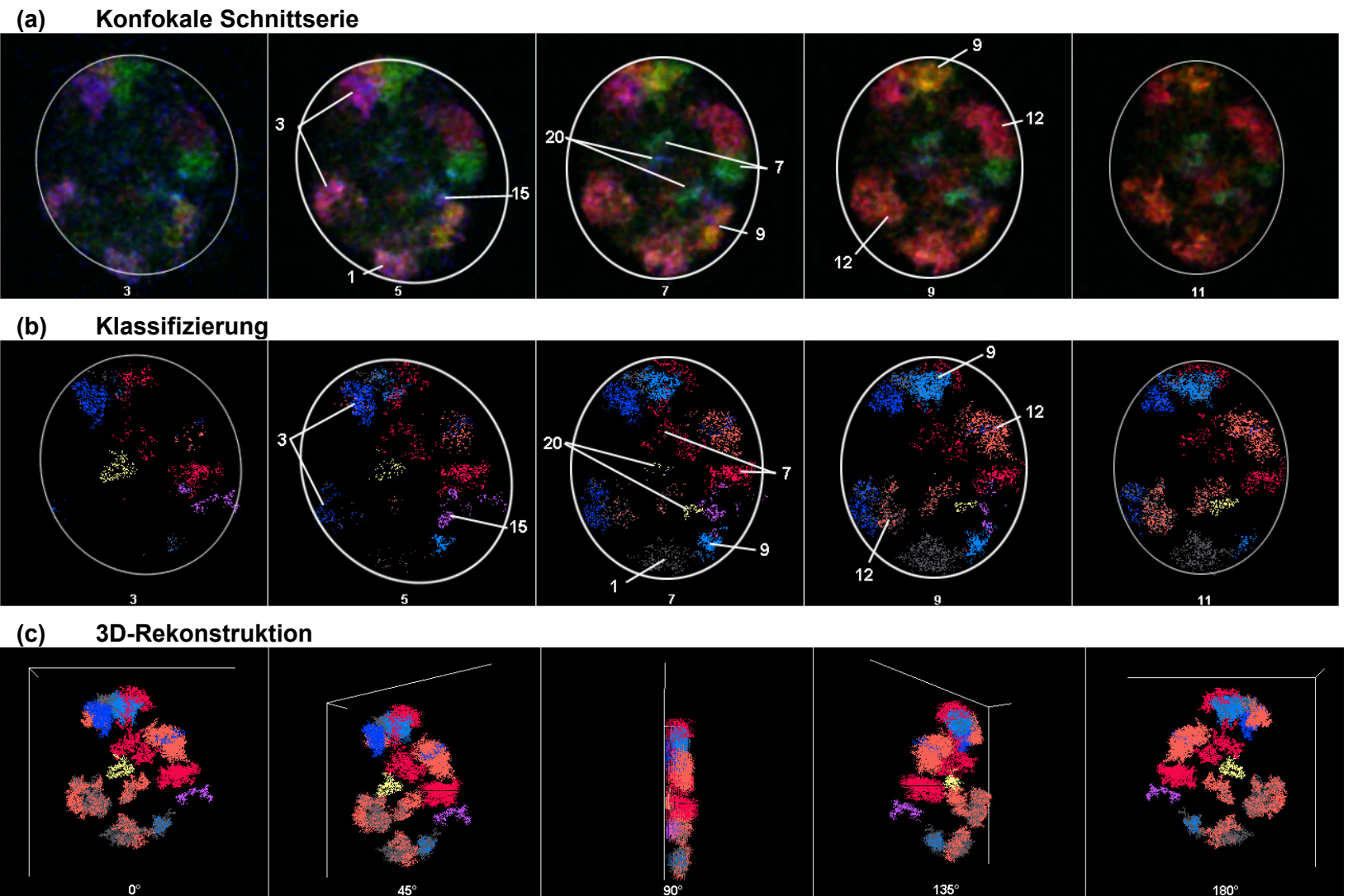


Abb. 3-27 Konfokale Schnittserie durch einen Fibroblasten, markiert mit 7 chromosomalen Painting Sonden, wie in Tab. 3-5 gezeigt. Dargestellt ist nur jede zweite Ebene. (a) RGB-Bild direkt nach der konfokalen Aufnahme. (b) Klassifikationsbilder mit mfish3d (c) 3 dimensionale Rekonstruktion, Drehung in x-Richtung um die angegebenen Winkel. Beschriftung mit Adobe Photoshop. Die ungefähren Zellkerngrenzen wurden eingezeichnet.

3.5 Positionen der Chromosomenterritorien im Zellkern

Klassifikationsverfahren

Das verwendete Klassifikationsverfahren ist prinzipiell intensitätsunabhängig, so dass eine Variabilität der Hybridisierungssignale bei den einzelnen CT keine Rolle mehr spielen sollte (Betrachtung der Farbe als Vektor, Unterscheidungskriterium „Winkel“, siehe Kapitel 2.8.1, S. 72). Dennoch bereitete die Zuordnung bisweilen Schwierigkeiten. Je nach Qualität der Bilder mussten die drei Parameter *ANGLE*, *BACKGROUND* und *MINSIZE* (siehe Methoden 2.8.2, S. 73) in den Experimenten unterschiedlich verändert und die korrespondierenden Ergebnisse überprüft werden. Zwar wurden, sobald man z. B. den *background* änderte, zuvor falsch klassifizierte Chromosomen richtig identifiziert, jedoch erhielten andere CT im Zuge dieser Umstellung eine falsche Zuordnung. Darüber hinaus gelang diese Überprüfung bei M-FISH Experimenten nur mit wenigen Chromosomen, welche in der Interphase ein spezielles Muster erkennen ließen und somit leicht zu identifizieren waren, insbesondere das Y (eindeutiges Hybridisierungssignal), 19 (starkes Hybridisierungssignal), 2 (größter Hybridisierungsbereich im Cy5/Cy5.5 Kanal) und 1 (größter Hybridisierungsbereich im Deac/Sg Kanal). Diese vier Chromosomen dienten als Qualitätskontrolle bei einem FISH Experiment. Wenn ihre Identifizierung nach der Einstellung der Parameter mit dem Klassifikationsprogramm eindeutig möglich war, ging man davon aus, dass auch die weiteren Chromosomen richtig klassifiziert wurden, obwohl unbekannt war, ob man mit einer Parameteränderung eine Verbesserung des Ergebnisses bei diesen CT erreicht hatte.

Damit nach Möglichkeit keine falsch klassifizierten CT Eingang in die Ergebnistabelle fanden, wurden alle von *mfish3d* ermittelten Schwerpunkte mit den Originaldaten überprüft. Pro Zellkern wurde für jedes klassifizierte CT die Frage gestellt: „Kann diese Klassifizierung mit den Originaldaten übereinstimmen“? Das zu überprüfende Territorium wurde mit den Hybridisierungssignalen in den Originalbildern der einzelnen Kanäle verglichen. Dabei ergab sich ein empirisch gefundener „Bestimmungsschlüssel“ (Kapitel 2.8.4, S. 76), der die Entscheidungsfindung erleichterte. Bei einer falschen oder unsicheren Klassifikation wurde der Wert weggelassen! Einen Sonderstatus hatten diejenigen Territorien, welche so nah nebeneinander lagen, dass sie nur noch als ein großes Signal erschienen (Duplex-Signal). Hier wurden zwei Schwerpunkte visuell zugeordnet, wenn dieses Signal viel größer war als Signale für die gleichen aber einzelnen Territorien in anderen Zellkernen. Wenn es aufgrund der Größe zweifelhaft war, ob ein Duplex-Signal vorlag oder nur ein Singlet-Signal, wurde nur ein Schwerpunkt zugeordnet. Das bedeutete auch, dass Homologenassoziationen möglicherweise unterrepräsentiert sein könnten.

Am Ende dieses Prozesses entstand pro Zellkern eine Tabelle mit den x-, y- und z-Schwerpunkten der einzelnen Territorien und des Zellkerns, ihren Volumina, sowie der Länge, Breite, Höhe des Kerns. Mithilfe dieser Schwerpunkts-

koordinaten und den Formeln in Kapitel 2.10 (S. 80) wurden alle weiteren Berechnungen durchgeführt.

Fehlerrate in der Schwerpunktsbestimmung

Die Zuverlässigkeit der Schwerpunkt war zum einen abhängig von der Hybridisierung und zum anderen von der Klassifikation. Um den Hybridisierungseinfluss abzuschätzen, wurde eine sequenzielle Hybridisierung auf dasselbe Präparat durchgeführt (siehe das spätere Kapitel 3.5.2.1, S. 141). Um die Frage zu beantworten, wie akkurat *mfish3d* die Schwerpunkte bestimmt, wurde das bereits genannte Modell der virtuellen sieben Chromosomen im Zellkern herangezogen (Kapitel 2.9.2, S. 79). Die simulierten konfokalen Bilder wurden mit *mfish3d* klassifiziert und mit den a priori bekannten Originalschwerpunkten verglichen. In vier Fällen (bei den Chromosomen 1, 3, 4 und 7) lagen die Chromosomenterritorien so eng beieinander, dass das Klassifikationsprogramm sie nicht als getrennt liegend identifizieren konnte (Duplex-Signal). Es wurde ein Schwerpunkt ausgegeben, der genau in der Mitte der beiden eigentlichen Schwerpunkte lag. In diesen Fällen wurden zwei getrennte Schwerpunkte durch visuelle Bestimmung festgelegt.

Der Unterschied der von *mfish3d* ausgegebenen Schwerpunkte zu den simulierten Originalschwerpunkten betrug im Mittel 0,8 Pixel in xy-Richtung und 0 Pixel in z-Richtung. Der Unterschied der visuell bestimmten Schwerpunkte zu den simulierten Originalschwerpunkten betrug im Mittel 1 Pixel in xy-Richtung und 0,1 Pixel in z-Richtung. Dies bedeutet, dass sowohl das Klassifikationsprogramm, als auch eine visuelle Bestimmung die Schwerpunkte mit einer großen Genauigkeit festlegt. Auf die Bedingungen einer M-FISH Klassifikation übertragen ergibt sich ein verschwindend geringer Fehler, der aufgrund der visuellen oder automatischen Schwerpunktszuordnung bedingt ist.

3.5.1 Chromosomenpositionen in Lymphozyten – konfokale vs. Weitfeldaufnahmen

Beschreibung der Präparate

Zum Zeitpunkt der experimentellen Datenerhebung gab es in der Arbeitsgruppe schon viel Erfahrung im Umgang mit konfokalen Bilderstapeln. Dagegen gab es weder in der Literatur, noch bei den Herstellern von Fluoreszenzmikroskopen viel Erfahrung mit den Eigenschaften von Weitfeldbilderstapeln und ihrer Dekonvolution. Deshalb war es erforderlich, konfokale und Weitfelddaten plus Dekonvolution im Hinblick auf die Verteilung der CT-Schwerpunkte zu vergleichen. Die Frage war, ob die Verteilung der CT-Schwerpunkte in konfokalen Aufnahmen und in Weitfeldaufnahmen nach Dekonvolution gleich sein würden. Dazu wurde ein zweiteiliges Experiment mit den in Tab. 3-6 a und b gezeigten zwei Markierungsschemata entworfen: Ein Präparat sollte den konfokalen Anforderungen genügen (fünf Painting Sonden, kombinatorisch markiert mit drei Fluorochromen), aber ebenso am Weitfeldmikroskop aufnehmbar

sein. Das andere Präparat sollte nur mit dem Weitfeldmikroskop aufgenommen werden können, dafür aber eine geringere Komplexität im Sinne der kombinatorischen Markierung besitzen (fünf Painting Sonden, markiert mit fünf Fluorochromen, nicht-kombinatorisch). Erwartet wurde, dass trotz der unterschiedlichen Markierungs- und Aufnahmemodi die Verteilung der Schwerpunkte im Zellkern gleich sein sollte. Es wurden 3D-fixierte periphere Blutlymphozyten verwendet, die aus der Literatur in dieser Hinsicht bereits bekannt waren (Boyle et al. 2001; Cremer M. et al. 2001). Aufgenommen wurden insgesamt 153 Zellkerne, 50 davon am CLSM und 103 am Weitfeldmikroskop (Tab. 3-6 c). Von den Weitfeldaufnahmen besaßen wiederum 50 ein einfaches Markierungsschema und 53 das kombinatorische, wie bereits in der konfokalen Serie (dasselbe Präparat).

(a) nicht - kombinatorische Markierung

	Fitc	Cy3	Cy3.5	Cy5	Cy5.5
Chr. 1				×	
Chr. 3		×			
Chr. 10	×				
Chr. 12			×		
Chr. 20					×

(b) kombinatorische Markierung

	Fitc	Cy3	Cy5
Chr. 1		×	
Chr. 3	×	×	
Chr. 10		×	×
Chr. 12	×		×
Chr. 20	×		

(c) Zahlen dieser Experimentserie

Aufnahmemodi Markierungsschema	CLSM	Weitfeld-Mikroskop		Total
	(b)	(a)	(b)	
Anzahl aufgenommener Kerne	50	50	53	153
Anzahl klassifizierter CT	438	454	394	1286
Anzahl klassifizierter CT von 10 möglichen pro Zellkern	87,6%	90,8%	74,3%	84,1%

Tab. 3-6 Markierungsschemata und Zahlen des zweiteiligen Experiments zur vergleichenden Markierungs- und Aufnahmeart. Beide Markierungen (a und b) können am Weitfeldmikroskop aufgenommen werden. Das Experiment mit der kombinatorischen Markierung (b) kann nur am CLSM aufgenommen werden. (c) Zahlen der im Zuge dieser Experimentserie aufgenommenen Lymphozytenkerne. CLSM: confocal laser scanning microscope.

Aufnahme, Dekonvolution und Klassifizierung

Zunächst wurden konfokale Bildstapel als Referenzbilder aufgenommen (Abb. 3-29 a). Das gleiche Präparat, jedoch nicht die gleichen Zellkerne, wurde nun unter dem Weitfeldmikroskop ebenfalls aufgenommen. Zuletzt wurden die Bilder des nicht-kombinatorischen Präparats aufgenommen (Abb. 3-29 c).

Anschließend wurde bei den Weitfeldbildern eine Dekonvolution mit dem Huygens MLE-Algorithmus durchgeführt (Parameter: Max. Iterations 100, Signal-to-noise ratio 200, Estimated Background 0,5, Quality change threshold 0,1%). Die konfokalen Bilder wurden ohne weitere Verarbeitungsschritte ausgewertet.

Alle Stapel wurden mit *mfish3d* automatisch klassifiziert (Abb. 3-29 b und d; Parameter kombinatorische Markierung: ANGLE 10, BACKGROUND 1,5, MINSIZE 90; Parameter nicht-kombinatorische Markierung: ANGLE 30, BACKGROUND 7, MINSIZE 150). Die Klassifikationsbilder wurden mit den Originalbildern auf ihre Richtigkeit überprüft, falls nötig geändert oder verworfen, wenn keine eindeutige Klassifikation nachvollziehbar war. Kam nur eine Region für eine Painting Sonde vor, und war diese gleichzeitig größer als ein einzelnes Signal (Duplex-Signal), so wurde davon ausgegangen, dass die zwei Homologen so eng nebeneinander lagen, dass sie nicht getrennt dargestellt werden konnten und es wurden visuell zwei Schwerpunkte zugeordnet. Dies war insgesamt in etwa 9% aller CT der Fall, wobei der Wert bei den konfokalen Aufnahmen nur 5% und bei den Weitfeldaufnahmen etwa 12% betrug. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf die bessere Auflösung des konfokalen Mikroskops zurückzuführen.

Nach jeder erfolgreichen Zuordnung wurden die x-, y- und z-Koordinaten in eine neue Tabelle übertragen. Alle Zellkerne wurden auf eine mittlere Größe normalisiert. Aus den Schwerpunkten wurden die Abstände CT-CN (center of nucleus), deren Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler und Häufigkeiten berechnet. Die Abstände wurden in Prozent des Radius umgerechnet. Der mittlere Zellkernradius betrug beim nicht-kombinatorischen Präparat Tab. 3-6 (a) $4,9 \mu\text{m} \pm 0,60$ (MW \pm SD) und beim kombinatorischen Präparat Tab. 3-6 (b) $4,2 \mu\text{m} \pm 0,26$.

Histogramme

Die Abb. 3-28 zeigt die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Chromosomen aller 153 aufgenommenen Zellkerne, zunächst ungeachtet des Markierungs- und Aufnahmemodus.

Von außen nach innen beträgt die Reihenfolge 3, 10, 20, 12 und 1. Die mittlere Gendichte wurde abgeschätzt aus beobachteten zu erwarteten STS - Markern (Deloukas et al. 1998). Die meisten Abstände des in dieser Reihe genärmsten Chr. 3 liegen in der Klasse $0,7r - 0,8r$ (70 – 80% des Radius). Damit tendiert seine Position zum Zellkernrand. Die beiden gleichgroßen Chromosomen 10 und 12 liegen häufig am Zellkernrand, obwohl Chr. 12 genreicher ist als Chr. 10. Chromosom 20 ist eines der kleinsten Chromosomen und enthält durchschnittlich viele Gene im Vergleich zu anderen. Die CT-CN Abstände verhalten sich normalverteilt mit dem Gipfel bei $0,6r - 0,7r$. Das aus dieser Reihe größte und gleichzeitig genreichste Chromosom 1 zeigt ebenfalls normalverteilte Abstände mit den häufigsten Abständen bei $0,5r - 0,6r$.

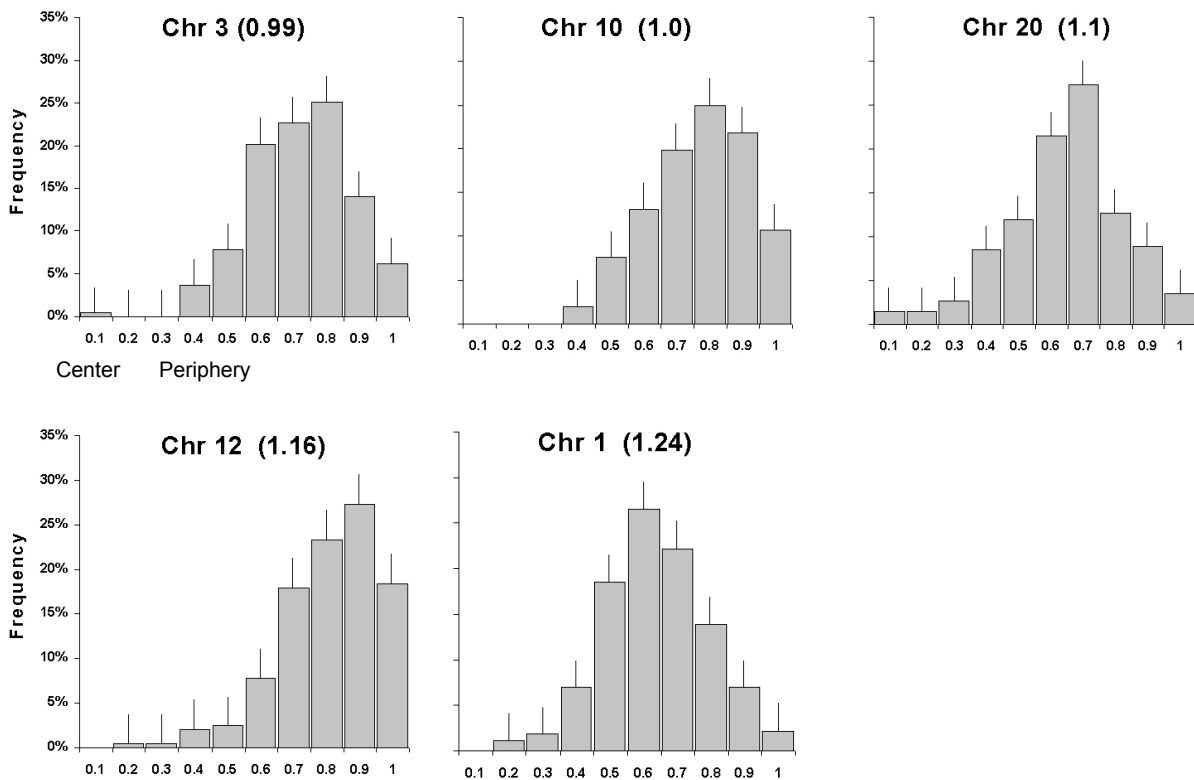
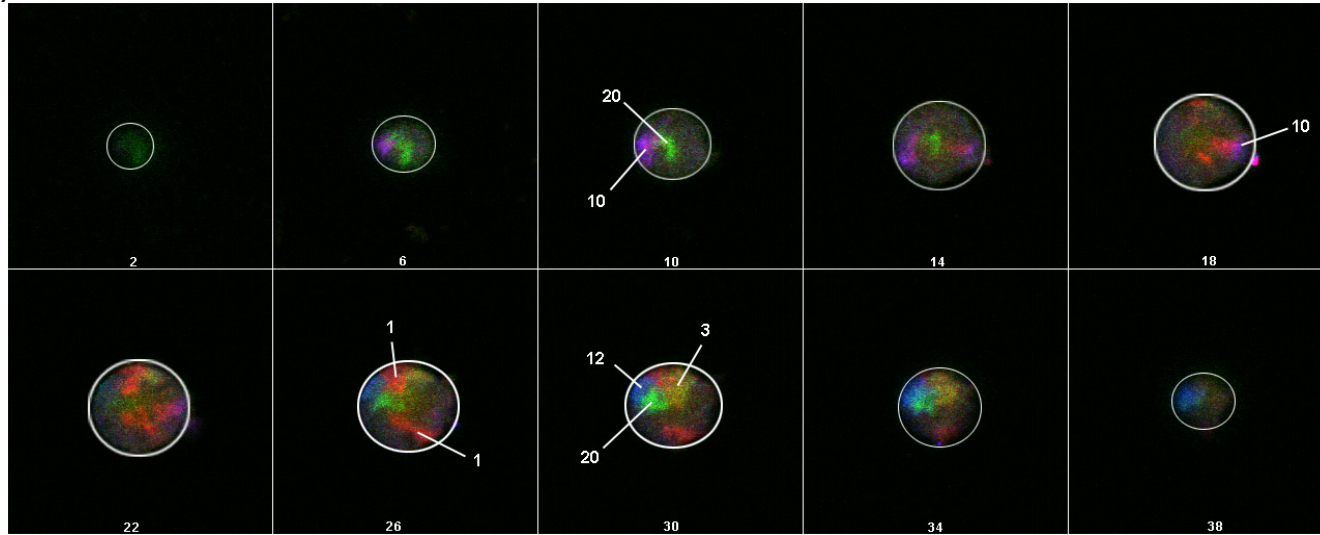
Radiale Verteilung in Lymphozyten

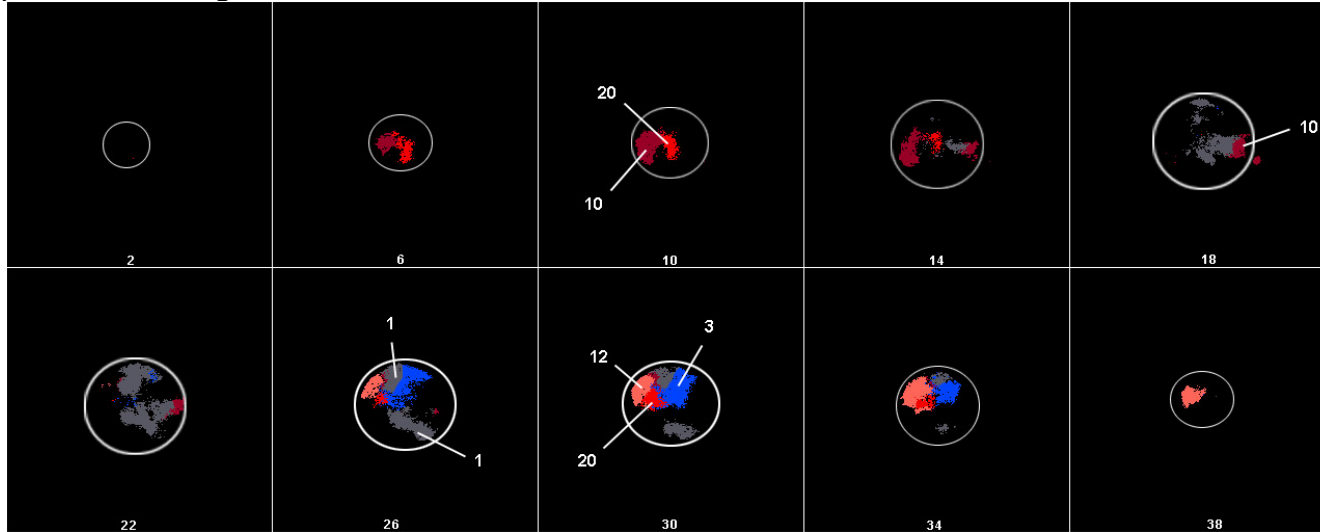
Abb. 3-28 Häufigkeiten der Abstände CT-CN aller 153 hier untersuchten Zellkerne, unabhängig vom Markierungs- und Aufnahmemodus. Die Chromosomen sind von links nach rechts angeordnet nach ihrer Gendichte, vom genarmen Chr. 3 zum genreichen Chr. 1. Die Gendichte (in Klammern) steht für das Verhältnis beobachteter zu erwarteter STS - Marker nach Deloukas et al. (1998). Die Abstände wurden in 10 Klassen eingeteilt, wobei die Klasse 0,1r das Zentrum widerspiegelt und 1r den Rand. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Abb. 3-29 (nächsten zwei Seiten) Schnittserie aus den Bilderstapeln zweier Lymphozytenzellkerne, in denen je fünf Painting Sonden hybridisiert wurden. Die Schnittebenen sind unter jedem Bild angegeben. (a und b) konfokale Schnittserie (c und d) Weitfeld-Schnittserie (a und c) RGB-Darstellung direkt nach der Aufnahme, bzw. nach Dekonvolution (b und d) Klassifikationsfarben nach mfish3d. Beschriftung mit Adobe Photoshop. Die ungefähren Zellkerngrenzen wurden eingezeichnet.

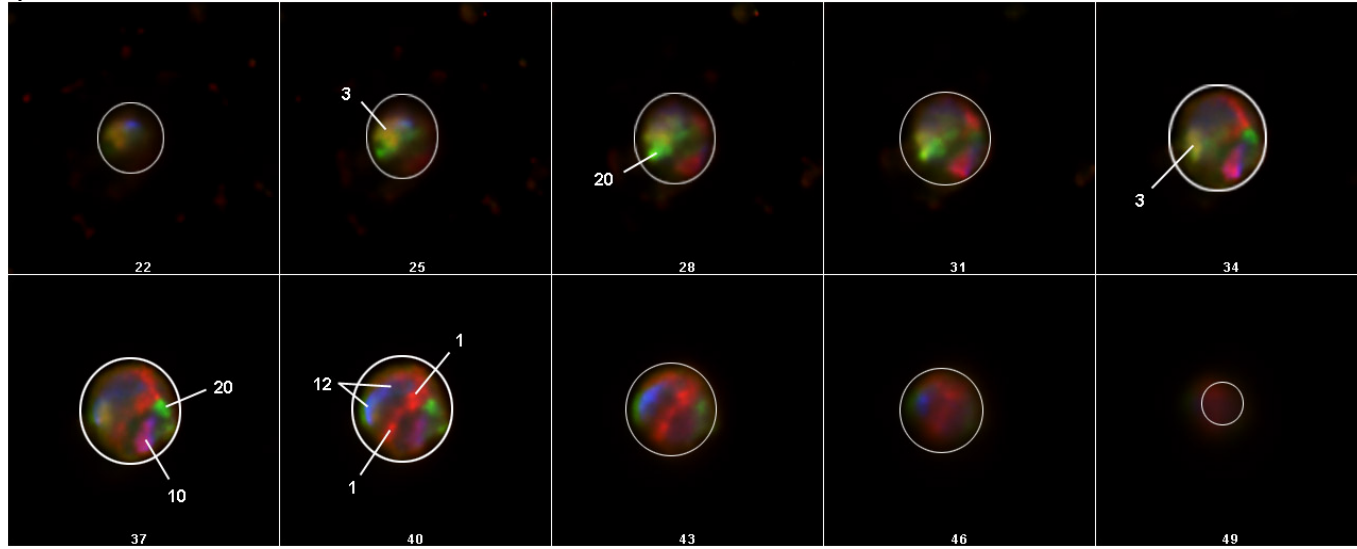
(a) Konfokale Aufnahme



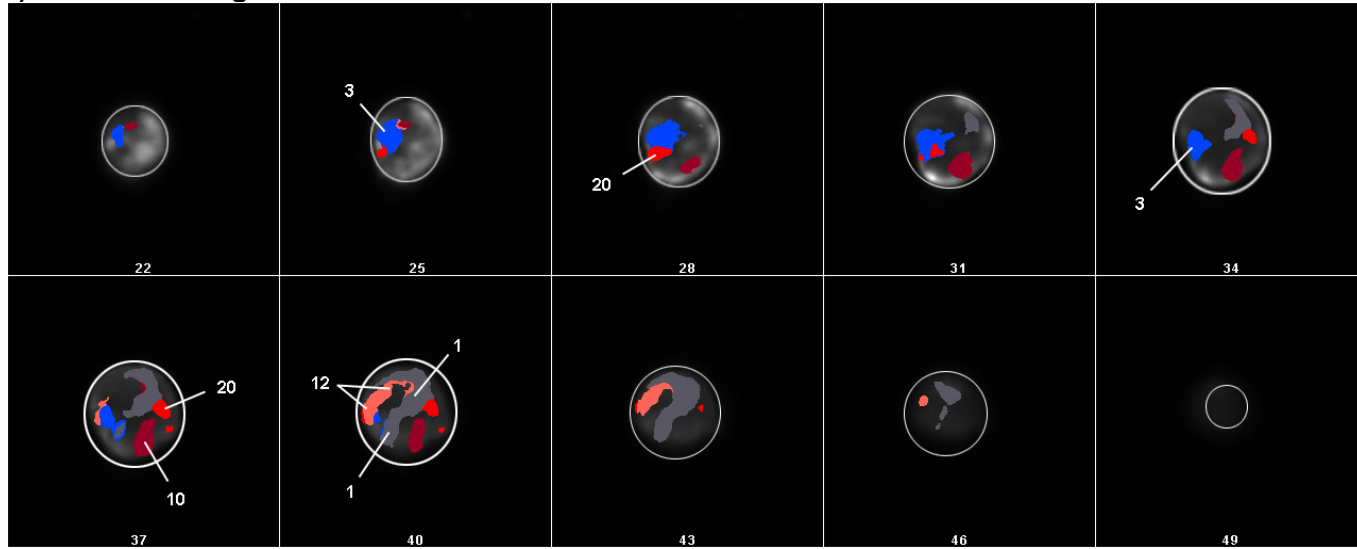
(b) Klassifizierung



(c) Weitfeldaufnahme nach Dekonvolution



(d) Klassifizierung



Kumulative Häufigkeiten

Die Ergebnisse, angeordnet nach dem Markierungs- und Aufnahmemodus sind in Abb. 3-30 zusammengestellt. Dargestellt sind wieder die ermittelten Häufigkeiten der Abstände CT-CN, diesmal als kumulative Häufigkeiten (jeder Wert wird zu seinem Vorgängerwert addiert). Verglichen wurden die hier verwendeten zwei Aufnahmemodi, sowie die Markierungsschemata. Die Graphen (a) und (b) des Präparates mit kombinatorischer Markierung (gleiches Präparat, jedoch nicht die gleichen Zellkerne aufgenommen) sind fast identisch. Dies bedeutet, dass die Analyse von Weitfeldbildern mit nachgeschalteter Dekonvolution die gleichen Resultate lieferte, wie eine konfokale Aufnahme.

Die Verteilung der Abstände im nicht-kombinatorischen Präparat (c) verläuft im Vergleich enger zusammen. Die radialen Abstandsunterschiede zwischen den Chromosomen waren nicht so groß wie bei dem vorigen Präparat. Die Abstände der Chr. 10 und 12 weisen darauf hin, dass die Schwerpunkte dieser CT beträchtlich weiter im Zellkerninneren liegen, als bei dem kombinatorischen Präparat. Ein Grund hierfür war auch nach mehrmaliger Durchsicht der Originaldaten nicht ersichtlich.

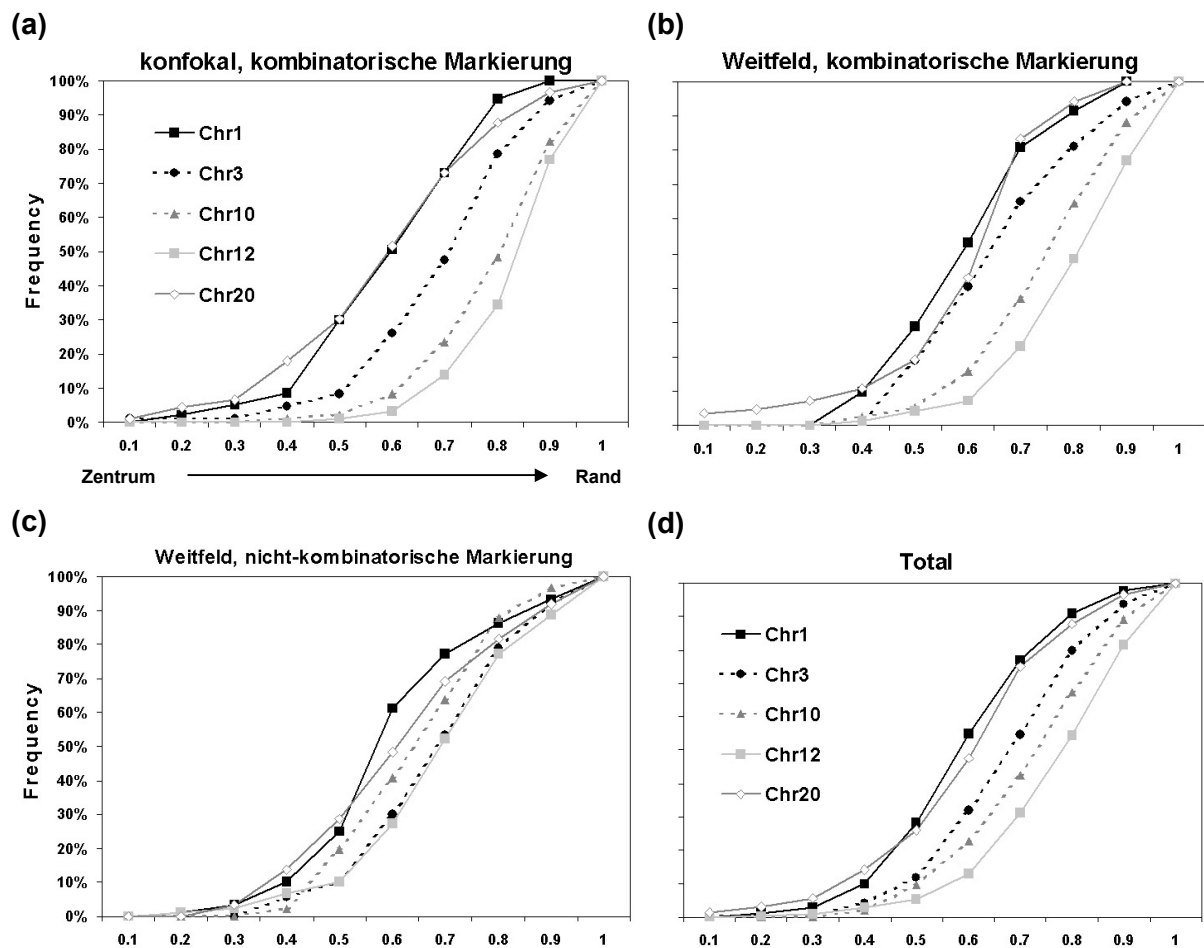
Radiale 3D-Anordnung in Lymphozyten

Abb. 3-30 Kumulative Häufigkeitsverteilung der Abstände CT-CN in den einzelnen Experimenten. Auf der x-Achse sind die Abstände CN-CT im Verhältnis zum Radius angegeben, die in 10 Klassen eingeteilt wurden, wobei z. B. die Klasse 0,1r die Abstände 0-10% des Radius beinhaltet. Die Verteilung ist bei dem kombinatorisch-markierten Präparat zwischen Weitfeld und Konfokal fast identisch. Bei dem nicht-kombinatorisch markierten Präparat liegen die Abstände etwas näher zusammen, das Chr. 3 liegt etwas weiter am Rand dafür das Chr. 10 weiter im Zentrum. Für Details siehe Text.

3.5.2 Chromosomenpositionen in Fibroblasten

Zahlen der Experimentserie

Die 22 Autosomen plus die zwei Geschlechtschromosomen bilden insgesamt 46 Chromosomenterritorien im Zellkern. Mithilfe zweier Ansätze, M-FISH und ReFISH, konnten die Positionen aller Chromosomen zum ersten Mal simultan bestimmt werden. In insgesamt 54 ausgewerteten Zellkernen konnten 81,2% aller Chromosomenterritorien bestimmt werden (Abb. 3-31 a). Die Sortierung nach den einzelnen Chromosomen ergab, dass das Chr. Y beispielsweise in 52 der 54 Fälle immer identifiziert werden konnte. Die beiden Chr. 2 Territorien konnten in 93% aller Fälle klassifiziert werden, die beiden Chr. 20 Territorien jedoch nur in 43% (Abb. 3-31 b und c). Die Klassifizierungseffizienz hing vom Markierungsschema, von der Signalintensität und der Größe des Territoriums

ab. Je kleiner ein Territorium war, desto schwieriger war in der Regel seine Klassifikation. Eine Ausnahme war das kleine Y-Chromosom, das aufgrund seines charakteristischen Hybridisierungssignals immer leicht zu erkennen war.

Nukleoli

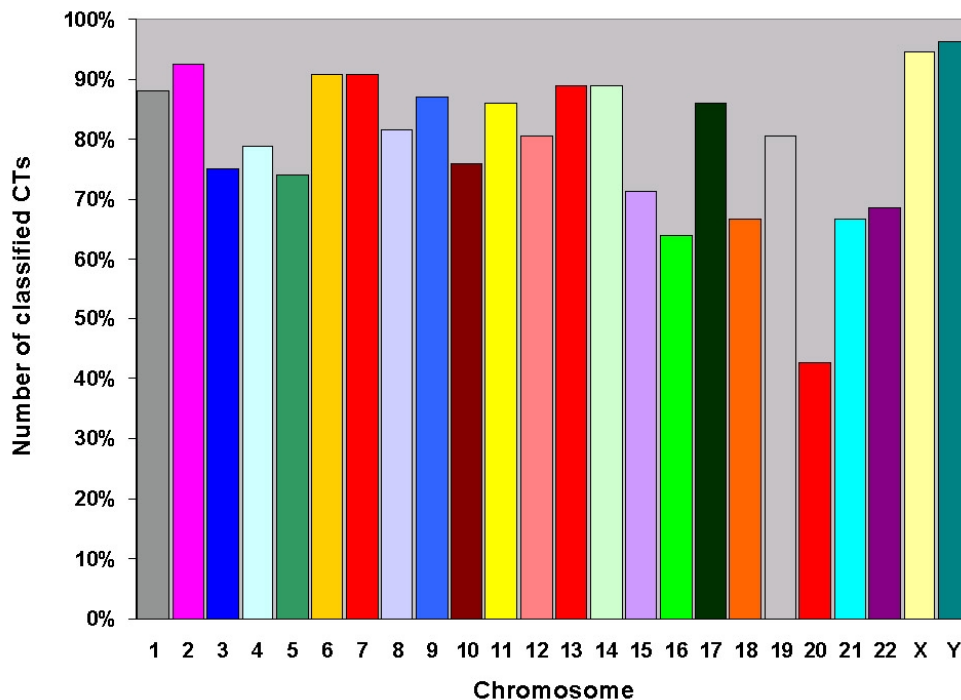
In der DAPI-Färbung der M-FISH Experimente konnten in den meisten Fällen die Nukleoli erkannt, und deren Schwerpunkte bestimmt werden. Da bei den ReFISH-Experimenten keine Gegenfärbung verwendet wurde, fiel diese Bestimmung dort aus. 19% (6/31) der Kerne enthielten einen Nukleolus, 52% (16/31) zwei und 23% (7/31) drei. In zwei Kernen konnten keine Nukleoli zugeordnet werden.

Vielfarben-FISH bei Fibroblasten

(a)

Aufnahmemodus	konfokal	Weitfeld	
Experimentserie	ReFISH	M-FISH	
Markierungsschema	Tab. 2-3	Tab. 2-2	
Ergebnisse im Kapitel	3.5.2.2	3.5.2.1	Total
Anzahl aufgenommener Fibroblasten	23	31	54
Anzahl klassifizierter Chromosomen	826	1190	2018
Anzahl klassifizierter CT von 46 möglichen pro Zellkern	78,3%	83,5%	81,2%

(b)



(c)

Chr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl	95	100	81	85	80	98	98	88	94	82	93	87
von 108	88	93	75	79	74	91	91	81	87	76	86%	81%
möglichen	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%		

Chr.	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X (von 54)	Y (von 54)
Anzahl	96	96	77	69	93	72	87	46	72	74	51	52
von 108	89	89	71	64	86	67	81	43	67	69	94%	96%
möglichen	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%		

Abb. 3-31 G0-Fibroblasten (a) Zahlen der im Zuge dieser Experimentserie aufgenommenen Fibroblastenkerne. ReFISH bedeutet konfokaler Aufnahmemodus, M-FISH bedeutet Weitfeldaufnahmen mit anschließender Dekonvolution. Querverweise zu den Markierungsschemata sind angegeben. (b) Prozente der klassifizierten CT, angeordnet nach zunehmender Größe. Die Säulen besitzen die Klassifikationsfarben. (c) Tabelle mit den in b dargestellten Werten. Bei jedem Autosom konnten maximal 108 CT gefunden werden (54×2), bei den Geschlechtschromosomen maximal 54 CT.

3.5.2.1 M-FISH

Auf ein Präparat mit 3D-fixierten G0-Fibroblasten wurde der in Tab. 2-2 b (S. 49) dargestellte M-FISH Mix hybridisiert. 31 Kerne wurden mit dem Weitfeldmikroskop in optischen Schnittserien aufgenommen, anschließend der Dekonvolution unterzogen und mit *mfish3d* klassifiziert. Jede klassifizierte Region wurde mithilfe der Originaldaten auf ihre Richtigkeit hin kontrolliert, und die Schwerpunktskoordinaten in eine Tabelle eingetragen. Konnte ein automatisches Klassifikationsergebnis nicht verifiziert werden, wurden diese Schwerpunkte weggelassen. Kam nur ein Signal für eine Painting Sonde vor, und war dieses Signal gleichzeitig größer als ein einzelnes Signal, so wurde davon ausgegangen, dass die zwei Homologen so eng nebeneinander lagen, dass sie nicht getrennt dargestellt werden konnten, und es wurden visuell zwei Schwerpunkte zugeordnet (Duplex-Signal, z. B. Abb. 3-35 Chr. 2).

In den M-FISH Hybridisierungen wurden im Mittel 83,5% (SD 7,4%) aller möglichen CT klassifiziert. D. h. von 46 möglichen wurden durchschnittlich 39 Territorien identifiziert, allerdings mit einer hohen Schwankungsbreite von 31 - 44. Zwei Beispiele sind in Abb. 3-35 gezeigt. Da immer unterschiedliche Territorien fehlten, konnte mit der Gesamtheit an Koordinaten eine relevante Schwerpunktsverteilung für alle 46 CT erstellt werden. Dass es prinzipiell möglich war alle CT in einem Zellkern zu identifizieren, zeigen die konfokalen Daten im Kapitel 3.5.3, S. 162. Für eine detaillierte Fehlerbetrachtung verweise ich auf das vorige Kapitel und auf die Tab. 4-1 in der Diskussion (S. 188).

Sequenzielle Hybridisierung zur Kontrolle der Positionen

Finden die markierten Sequenzen der komplexen Mischung aus Painting Sonden immer ihren zugehörigen Gegenstrang im Kerninneren, oder ergeben sich manchmal falsche Signale? Um dies zu testen, wurden die Positionen von 11 Zellkernen auf einem M-FISH Präparat gespeichert. Weitfeldmikroskopie und Klassifikation erfolgten oben beschrieben. Anschließend wurde das Präparat entdeckt, gewaschen, erneut denaturiert und eine 2. Hybridisierung mit fünf einzeln markierten Painting Sonden nach dem Schema Tab. 3-6 a (S. 132) durchgeführt. Deren Schwerpunkte wurden wiederum bestimmt. Die Differenz zwischen der 1. und der 2. Hybridisierung der Koordinaten für die Schwerpunkte dieser fünf Chromosomen sollte möglichst klein sein.

In Abb. 3-32 ist eine Schnittserie der 1. Hybridisierung und der 2. Hybridisierung exemplarisch dargestellt. Sieben davon wurden nach der 2. Hybridisierung wiedergefunden. In diesen sieben Kernen konnten 66 der möglichen 70 CT (94%) klassifiziert werden. In der 1. Hybridisierung konnten 55 der möglichen 70 CT (79%) klassifiziert werden. Da zu jedem identifizierten Schwerpunkt aus der 1. Hybridisierung der korrespondierende aus der 2. Hybridisierung wiedergefunden werden musste, um einen möglichen Positionsunterschied berechnen zu können, ergaben sich 53 auswertbare Territorien ($66 \cap 55$).

Fehleranalyse

Für die hier durchgeführte Fehleranalyse ist es interessant zu wissen, in welcher Hybridisierung **beide** Territorien identifiziert werden konnten. Damit konnte eine Aussage getroffen werden, wie oft eine Klassifizierung reproduzierbar richtig war. Weil gezählt wurde, ob beide CT in einem Zellkern vorhanden waren, ergab sich als maximal mögliche Anzahl der Ereignisse 35 (70 CT / 2 CT). Vier Fälle wurden unterschieden:

1. Hyb. beide CT **UND** *2. Hyb. beide CT* **60%**

In der 1. Hybridisierung konnten alle beiden Territorien identifiziert werden, in der 2. Hybridisierung ebenfalls. Einzelne Territorien in der 1. Hybridisierung wurden in der Zählung als „nicht beide“ gewertet. In 60% der Fälle (21/35) konnten in jeder Hybridisierung beide Territorien klassifiziert werden.

1. Hyb. kein CT **UND** *2. Hyb. kein CT* **0%**

In keinem Fall konnte überhaupt kein Territorium identifiziert werden. Entweder in der 1. oder in der 2. Hybridisierung wurde mindestens ein CT klassifiziert.

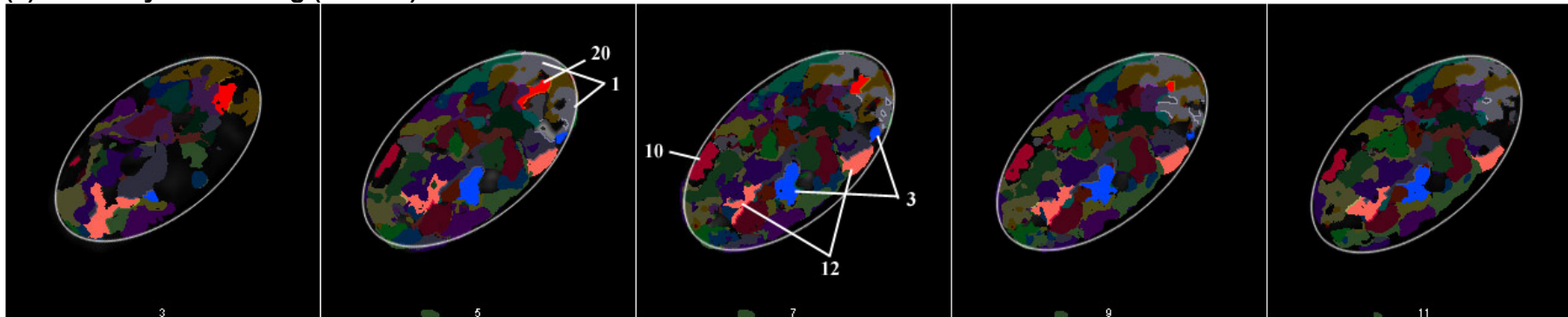
1. Hyb. beide CT **UND** *2. Hyb. ein oder kein CT* **4%**

Der Fall, dass in der 1. Hybridisierung beide Territorien klassifiziert wurden, in der 2. Hybridisierung jedoch nur noch höchstens eines wiedergefunden wurde, kam nur in 4% (1/23) vor. Einzelne Territorien in der 1. Hybridisierung gingen nicht in die Zählung ein. Diese Kombination beantwortet die Frage: „Wenn M-FISH zwei CT klassifiziert, in wieviel Fällen kann dies reproduziert werden?“ – Das Ergebnis bedeutet mit anderen Worten, dass zwei Territorien, die mit der M-FISH Klassifizierungsprozedur nach der 1. Hybridisierung identifiziert wurden, in 96% der Fälle mit den Einzelsondenhybridisierungen bestätigt werden konnten.

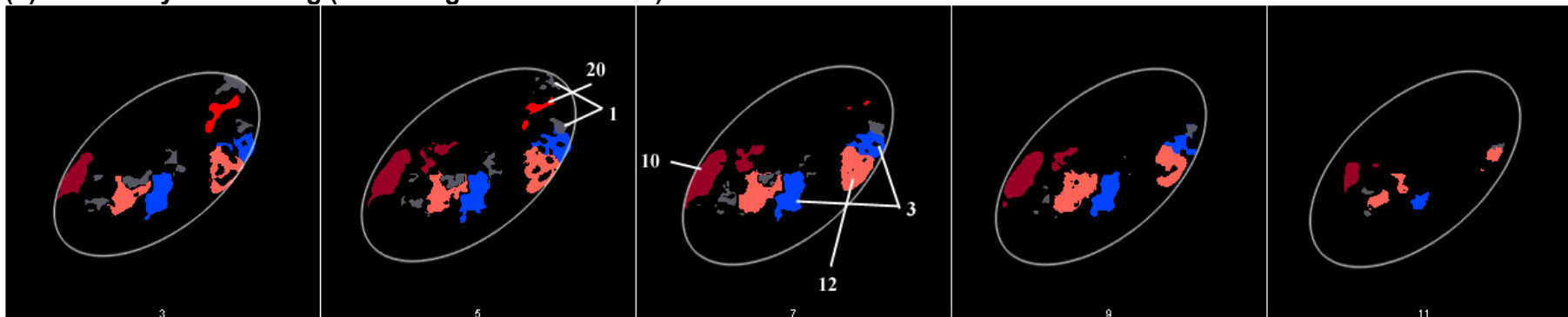
1. Hyb. ein oder kein CT **UND** *2. Hyb. beide CT* **34%**

Der Fall, dass in der 1. Hybridisierung nur eines oder gar kein Territorium klassifiziert werden konnte, in der 2. Hybridisierung jedoch alle beide gefunden wurden, kam in 34% vor (11/32). Einzelne Territorien in der 2. Hybridisierung gingen nicht in die Zählung ein. Wenn in der Bestimmungsprozedur der M-FISH Bilder ein Territorium nicht klassifiziert werden konnte, wurde in 34% der Fälle in den anschließenden Einzelsondenhybridisierungen doch noch ein zweites gefunden. Dies entsprach der Fehlerrate, wie oft ein Territorium **nicht** klassifiziert werden konnte. Mit anderen Worten, in 66% der Fälle wurden immer beide Territorien klassifiziert und können als sicher eingestuft werden. Extrapoliert man diese 66% auf alle Territorien eines diploiden menschlichen Zellkerns, so würde man durchschnittlich 30 von 46 Territorien klassifizieren können. Tatsächlich konnten sogar noch mehr, im Mittel 38 (82%) aller CT, identifiziert werden (Abb. 3-31, S. 140).

(a) Erste Hybridisierung (M-FISH)



(b) Zweite Hybridisierung (5 Painting Sonden einzeln)



Sequenzielle Hybridisierung zur Überprüfung der Positionen:
M-FISH → 5 einfache Sonden

Abb. 3-32 Klassifizierte *lichtoptische* Schnitte der fünf hier relevanten CT in (a) nach der 1. Hybridisierung und (b) nach der 2. Hybridisierung. Die übrigen Klassifikationsfarben in a wurden mit Adobe Photoshop abgedunkelt. In b wird deutlich, dass manchmal zu viele Regionen von *mfish3d* klassifiziert werden (z. B. zu viele graue Regionen). Man muss dann durch Kontrolle der Originaldaten die korrekten beiden herausfinden. Man erkennt, dass die Schwerpunkte in etwa die gleiche Position haben in beiden Serien.

Positionsunterschiede zwischen 1. und 2. Hybridisierung

Die Differenz der beiden Schwerpunkte aus der 1. und 2. Hybridisierung wurde berechnet, indem die Abstände zum Zellkernmittelpunkt voneinander subtrahiert wurden. So wurde für jedes zusammengehörige CT-Paar aus den beiden Hybridisierungen verfahren. Diese Abstandsdifferenzen sind in Abb. 3-33 gezeigt. Der erwartete Wert wäre Null, wenn die beiden Schwerpunkte an exakt der gleichen Stelle wären. Im Experiment kommt als minimaler Betrag 0,01 μm , als maximaler 1,3 μm vor. Das entspricht beispielsweise in lateraler Richtung einem Abstand von 0 bis etwa 10 Pixeln und ist ausreichend klein.

Differenzen zwischen 1. und 2. Hybridisierung

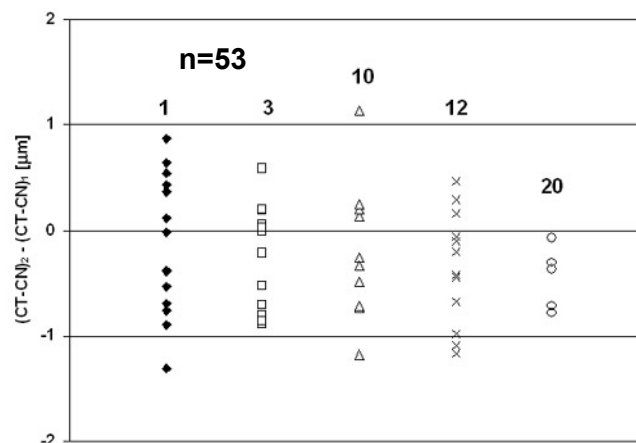


Abb. 3-33 Abstandsdifferenzen der korrespondierenden zwei Schwerpunktskoordinaten aus der 1. und der 2. Hybridisierung in μm aller 53 wiederzugeordneten CT. Der erwartete Wert wäre Null, wenn die beiden Schwerpunkte an exakt der gleichen Stelle wären. Als maximaler Betrag kommt 1,3 μm vor.

Koordinatentransformation

Nachdem sicher gestellt war, dass die klassifizierten Schwerpunkte der Hybridisierungssignale innerhalb enger Grenzen (S. 141) den einzelnen chromosomalen Territorien entsprachen, wurden die Koordinaten wie folgt normalisiert:

Definitionsgemäß liegt die xy-Ebene parallel zur Objektträgeroberfläche und die z-Achse steht senkrecht darauf. Der Ursprung des Koordinatensystem wurde durch Parallelverschiebung in den Zellkernmittelpunkt gelegt (Gleichung 2-14, S. 81). Der Winkel, den die lange Zellkernachse jedes individuellen Fibroblasten mit der x-Achse einschließt wurde bestimmt (Gleichung 2-16) und anschließend alle zugehörigen Koordinaten um diesen Winkel transformiert (Gleichung 2-17), so dass die lange Zellkernachse auf der x-Achse zu liegen kam (Abb. 3-34). Weil alle Fibroblastenkerne eine leicht unterschiedliche Größe besaßen, wurden die Koordinaten auf die Durchschnittsgröße normalisiert. Dies geschah, indem die x-, y- und z-Komponenten einer Koordinate durch den jeweiligen x-, y- und z-Radius dividiert wurden (Gleichung 2-15). Folgende Abstände wurden mithilfe der Gleichung 2-11 bestimmt: CT-CN, CT-CT homo-

log, CT-CT heterolog (siehe Abb. 3-34). Zusätzlich wurden noch die Winkel zwischen den homologen Domänen berechnet (Gleichung 2-13).

Koordinatentransformation

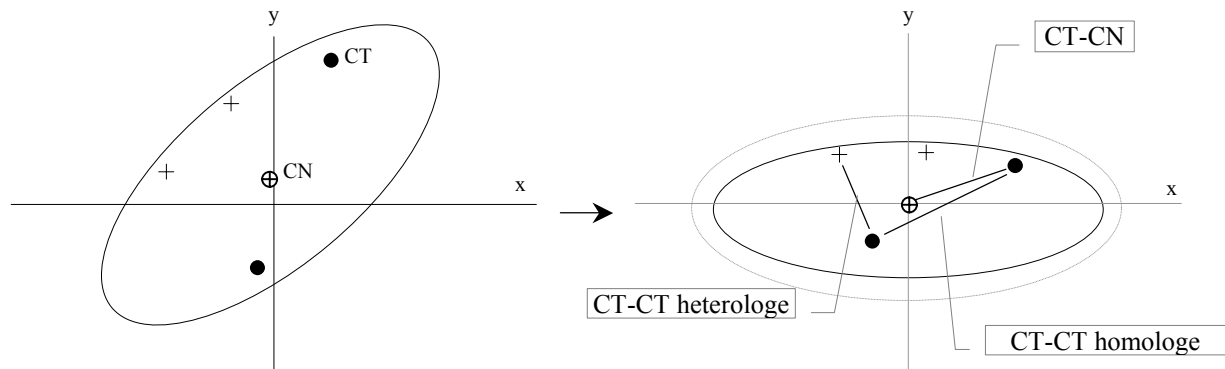


Abb. 3-34 Koordinatentransformationen um den Winkel, den die lange Zellkernachse mit der x-Achse einschließt, sowie Größentransformation auf einen durchschnittlichen Durchmesser. Die Punkte und Kreuze bezeichnen die Schwerpunkte zweier homologer CT. Beispielfhaft sind die verschiedenen Abstände eingezeichnet. Zur Vereinfachung wurde die z-Achse weggelassen. CN: center of nucleus. Für Details siehe Text.

Datenpool

Weil sich M-FISH- und ReFISH-Daten zwar in technischen Merkmalen unterscheiden (Markierungs- und Aufnahmemodi), nicht aber in den biologischen, wurden die zwei Datensätze zusammengefasst. Die Ergebnisse bezüglich der berechneten Kenndaten werden in den übernächsten Unterkapiteln für den gesamten Datensatz dargestellt.

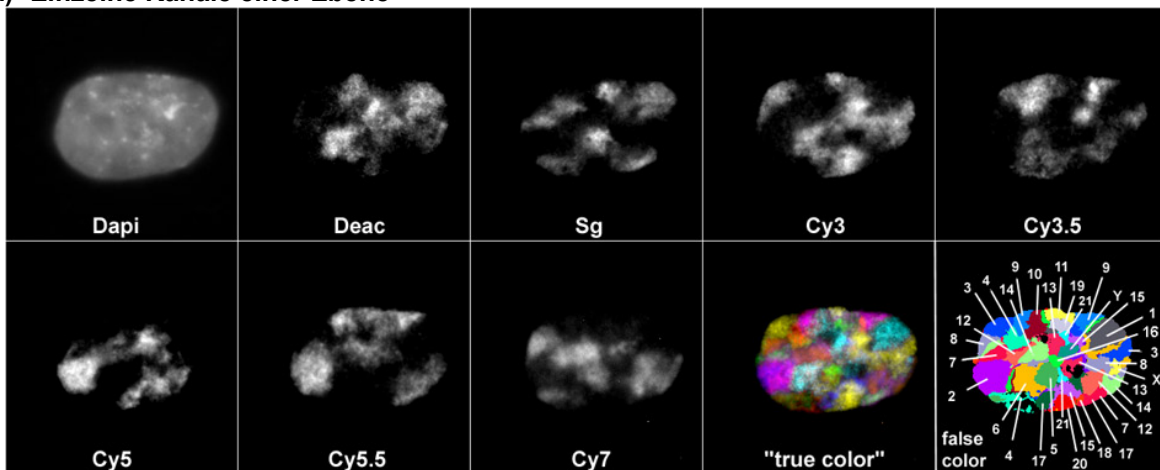
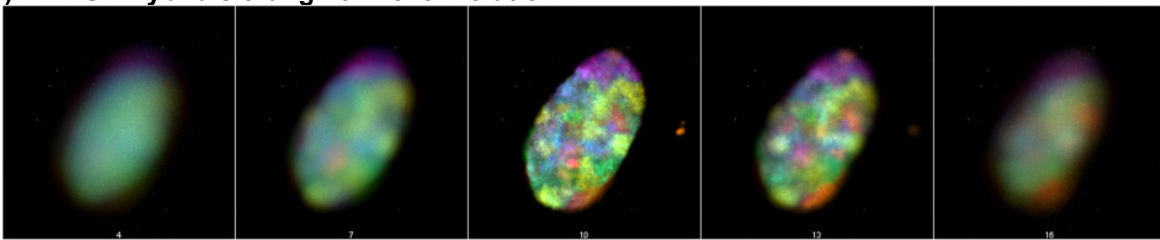
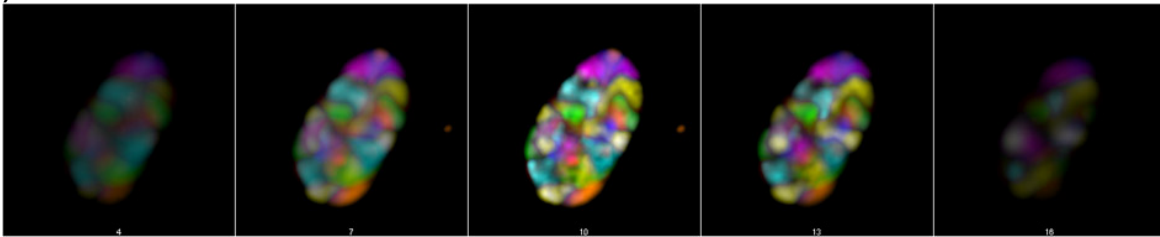
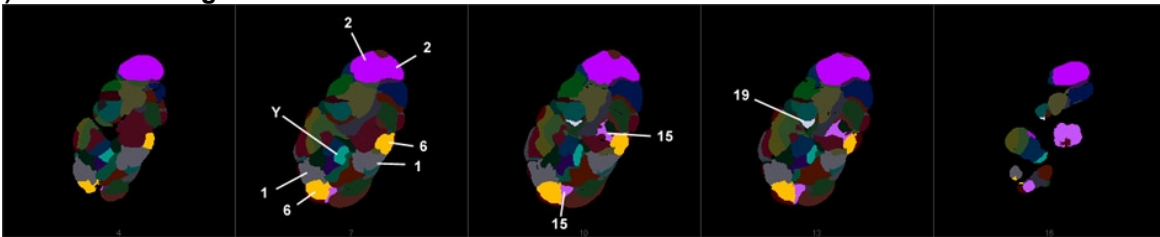
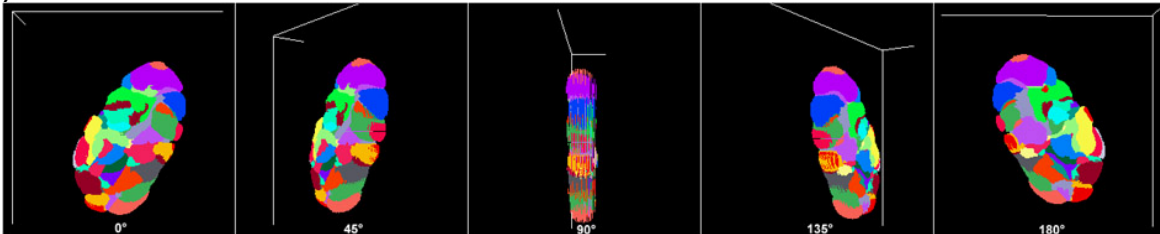
3D M-FISH**(a) Einzelne Kanäle einer Ebene****(b) M-FISH Hybridisierung vor Dekonvolution****(c) nach Dekonvolution****(d) Klassifizierung****(e) 3D-Rekonstruktion**

Abb. 3-35 M-FISH Klassifikation am Beispiel zweier flacher Fibroblastennuklei. (a) Spektrale Kanäle einer mittleren Aufnahmeebene. Die Signalflecken stellen die einzelnen CT dar. Am Ende entsteht durch RGB-Überlagerung das „true color“-Bild. Nach Klassifikation mit *mfish3d* werden den CT Falschfarben entsprechend den verschiedenen Chromosomen zugeordnet. (b) True color lichtoptische Serienaufnahme durch einen weiteren Fibroblasten, ohne Dekonvolution. (c) Die gleiche Serie nach Dekonvolution mit dem Huygens ICTM-Algorithmus. (d) Nach Klassifikation mit *mfish3d*. Zur besseren Darstellung wurden die meisten CT abgedunkelt und nur einige in ihren Farben gelassen. (e) 3D-Rekonstruktion des klassifizierten Nukleus.

3.5.2.2 ReFISH

CT in den Zellkernen von G0-Fibroblasten wurden mit der ReFISH-Technik markiert und aufgenommen. Dabei wurden im Markierungsschema die drei Fluorochrome benützt, die am konfokalen Mikroskop aufgenommen werden konnten. Nach der 1. Hybridisierung (H1) wurden zunächst 50 Kerne im CLSM in lichtoptischen Serienschnitten aufgenommen. Anschließend wurde das Präparat entdeckelt, gewaschen, erneut denaturiert und mit der komplementären ReFISH-Mixtur aus Painting Sonden (H2) hybridisiert (siehe Methoden 2.2.2.4, S. 52). Unter dem Mikroskop wurden 23 auswertbare Kerne wiedergefunden und aufgenommen (Abb. 3-37). Durch die Zwischenprozedur schrumpften die Zellkerne in ihrer z-Richtung um etwa 4 Schnitte (1 μ m). Obwohl auf möglichst ähnliche Positionen geachtet wurde konnte es nicht erreicht werden, dass beim Aufnahmeprozess der Kern in exakt derselben xy-Stellung wiederaufgenommen wurde. Dieser Pixelshift wurde in einem nachgeschalteten Alignment durch das Programm *correlator.cc* (Heintzmann 1999) korrigiert (Kapitel 2.2.2.4, S. 52). Überprüft wurde der Prozess durch vergleichende visuelle Inspektion der künstlich rot-cyan gefärbten Bildstapel H1 und H2 vor und nach dem Alignment (Abb. 3-36). Diese Überprüfung ergab eine gute Übereinanderlagerung, die keine Fehler erkennen lies, entsprechend der auch in der Beschreibung angegebenen Genauigkeit von 0,1 Voxel in jeder Richtung (Heintzmann 1999). Nach dem Alignment wurden die abgeglichenen Bilderstapel mit dem Klassifizierungsprogramm *mfish3d* weiterverarbeitet.

Das weitere Vorgehen geschah analog dem vorigen Kapitel: Klassifikation mit *mfish3d* (Abb. 3-37 d und e), Überprüfung jeder klassifizierten Region mithilfe der Originaldaten auf ihre Richtigkeit und Eintrag der entsprechenden Schwerpunkte in eine Tabelle. Konnte ein automatisches Klassifikationsergebnis nicht verifiziert werden, wurden diese Schwerpunkte weggelassen. Die Daten wurden, wie im vorigen Kapitel beschrieben, transformiert und ausgewertet.

Alignment der ReFISH Bilder nach der 2. Hybridisierung

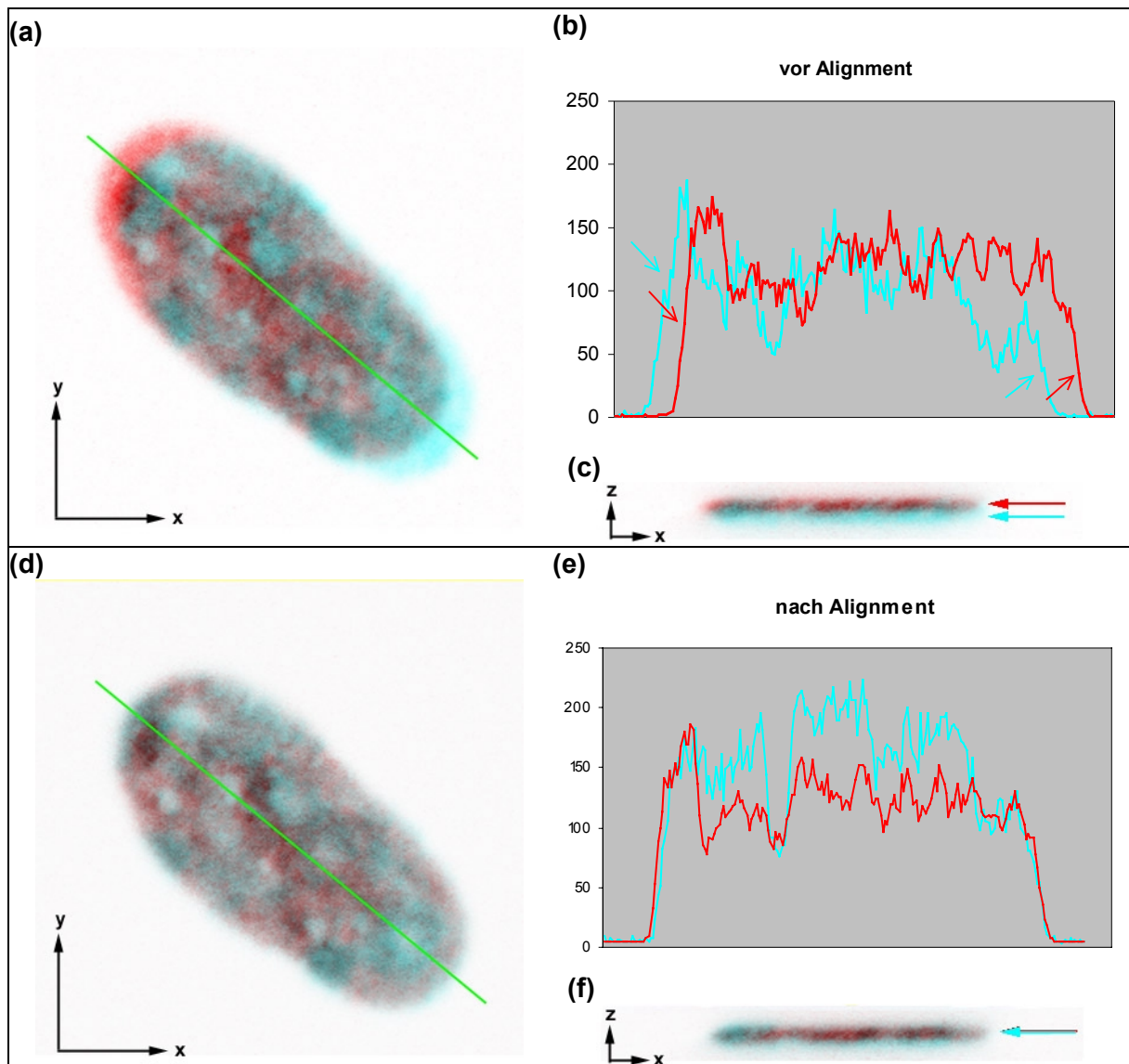
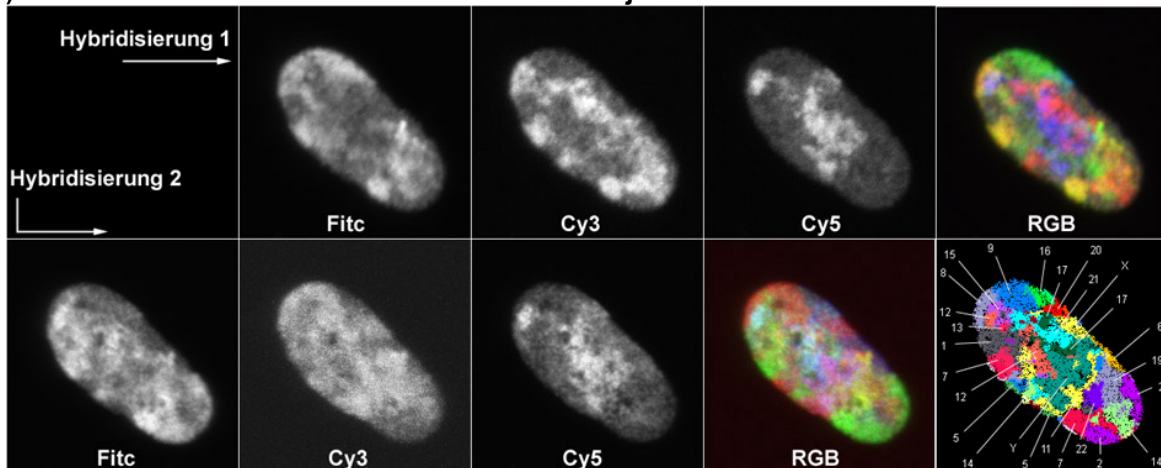


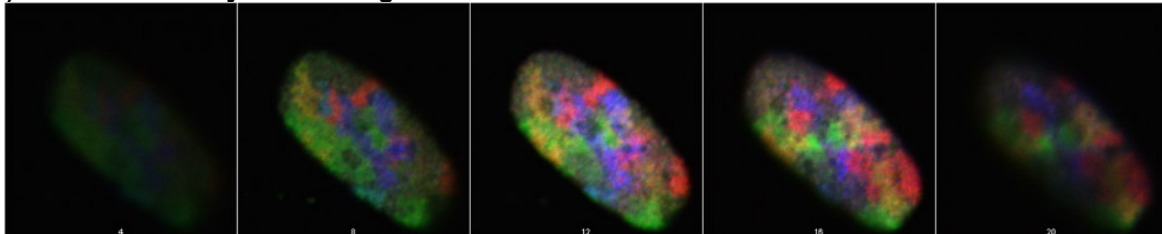
Abb. 3-36 ReFISH-Abgleich der 1. Hybridisierung (die drei Farbkanäle wurden zu einem Bild zusammengefasst: rot) und der 2. Hybridisierung (cyan). Gezeigt sind mittlere Ebenen aus der lichtoptischen Schnittserie. (a, b, c) Vor dem Alignment stimmen die Silhouetten der beiden Aufnahmen weder in xy- noch in xz-Richtung überein. Ein Linienprofil entlang der grünen Linie bestätigt dies. (d, e, f) Das Alignment erreicht eine Genauigkeit von 0,1 Voxel in jeder Richtung (Heintzmann 1999).

3D ReFISH

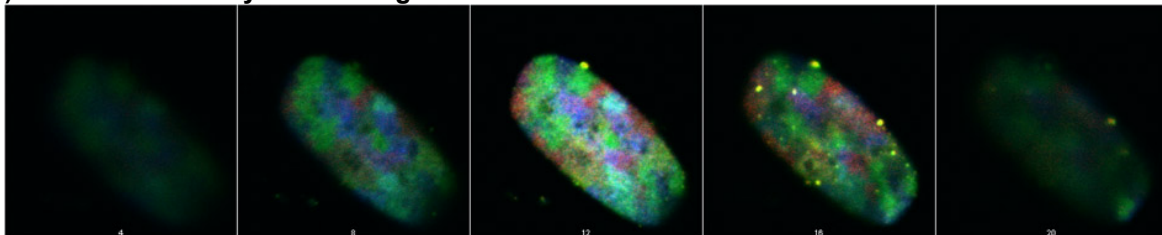
(a) Einzelne Kanäle einer Maximum Intensitäts Projektion



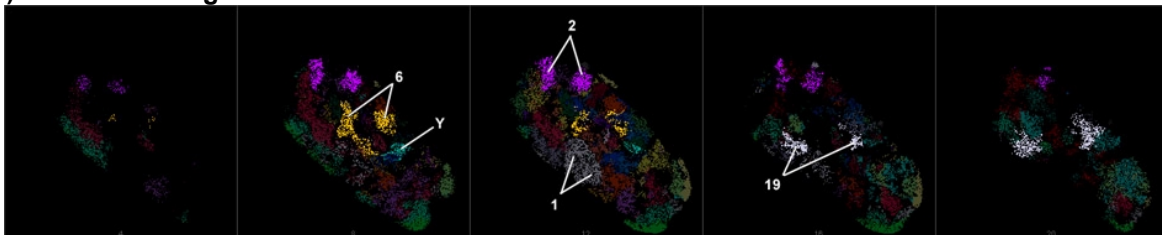
(b) Erste ReFISH-Hybridisierung



(c) Zweite ReFISH-Hybridisierung



(d) Klassifizierung



(e) 3D-Rekonstruktion

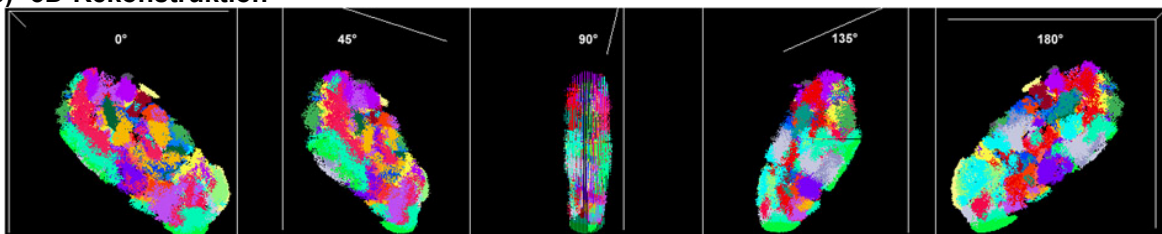


Abb. 3-37 ReFISH Klassifikation am Beispiel zweier flacher Fibroblastennuklei. (a) Spektrale Kanäle einer Maximum-Intensitätsprojektion. Die Signalflecken stellen die einzelnen CT dar. Am Ende entsteht durch Überlagerung ein RGB-Bild. Nach Klassifikation mit *mfish3d* werden den CT Falschfarben zugeordnet. (b) Lichtoptische Serienaufnahme durch die 1. Hybridisierung eines weiteren Fibroblasten. (c) Die gleiche Serie nach der 2. Hybridisierung. (d) Nach Klassifikation mit *mfish3d*. Zur besseren Darstellung wurden die meisten CT abgedunkelt und nur einige in ihren Farben gelassen. (e) 3D-Rekonstruktion des klassifizierten Nukleus.

3.5.2.3 Abstände zum Kernmittelpunkt

Nach der Datenerhebung und Klassifikation wurden die Koordinaten wie beschrieben gedreht, normalisiert und die Abstände zum Zellkernmittelpunkt mit der Gleichung 2-11 berechnet.

Histogramme

In Abb. 3-38 sind die Abstände der homologen CT zum Mittelpunkt des Zellkerns CN für jedes Chromosom dargestellt. Die Linie im Vordergrund stellt das SCD-Modell dar, welche einer zufälligen Verteilung der Chromosomen im Zellkern entspricht. Mit dem SCD-Modell konnten am Computer die Abstände CT-CN für Fibroblastenkerne mit dem Durchmesser $x:y:z = 20:10:5 \mu\text{m}$ simuliert werden. Die Berechnung ergab, dass die Chromosomen im Mittel $4,4 \mu\text{m}$ vom Zentrum entfernt lagen. Zusammen mit der äußerst hohen Standardabweichung von $1,8 \mu\text{m}$ (fast 50% des Mittelwerts) entsprechen diese simulierten Abstände einer Gleichverteilung im Zellkern. Kleinere Chromosomen liegen etwas weiter außen als größere. Dies ist bei den experimentell ermittelten Daten nicht der Fall, es zeichnet sich eine radiale Anordnung ab. Große Chromosomen liegen bevorzugt peripher, kleine eher im Bereich der Kernmitte. Zum Beispiel liegt Chr. 1 in 40% der Fälle in der Klasse $0,9r$, was einem Abstand von 80 - 90% des Radius entspricht, fast ganz außen. Im Gegensatz dazu hat das Y - Chr. eine Verteilung, die bereits in der Klasse $0,5r$, also viel zentraler, ihren Gipfel überschreitet. Die Territoriumsgröße spielt eine gewisse Rolle, denn es ist vorstellbar, dass die Schwerpunkte großer CT nicht ganz am Rand zu liegen kommen können, da ein Teil des Territoriums noch dazwischen ist.

Streudiagramme

Eine andere Form der Darstellung wird in Abb. 3-39 gezeigt, wobei allerdings die z-Achse außer Acht gelassen werden musste. Der Fibroblastenkern wird behandelt wie eine zweidimensionale Fläche, was in diesem Fall einen Fehler mit einschließt, der aber aufgrund der Flachheit der Zellen nicht allzu groß sein dürfte. Jeder CT-Schwerpunkt wird als ein Punkt im ersten Quadranten dargestellt. Die durchschnittlichen Achsdurchmesser (Achsradii) betragen $d_x = 22,1 \mu\text{m}$ ($r_x = 11,05 \mu\text{m}$), $d_y = 11,6 \mu\text{m}$ ($r_y = 5,8 \mu\text{m}$) und $d_z = 5,8 \mu\text{m}$ ($r_z = 2,9 \mu\text{m}$).

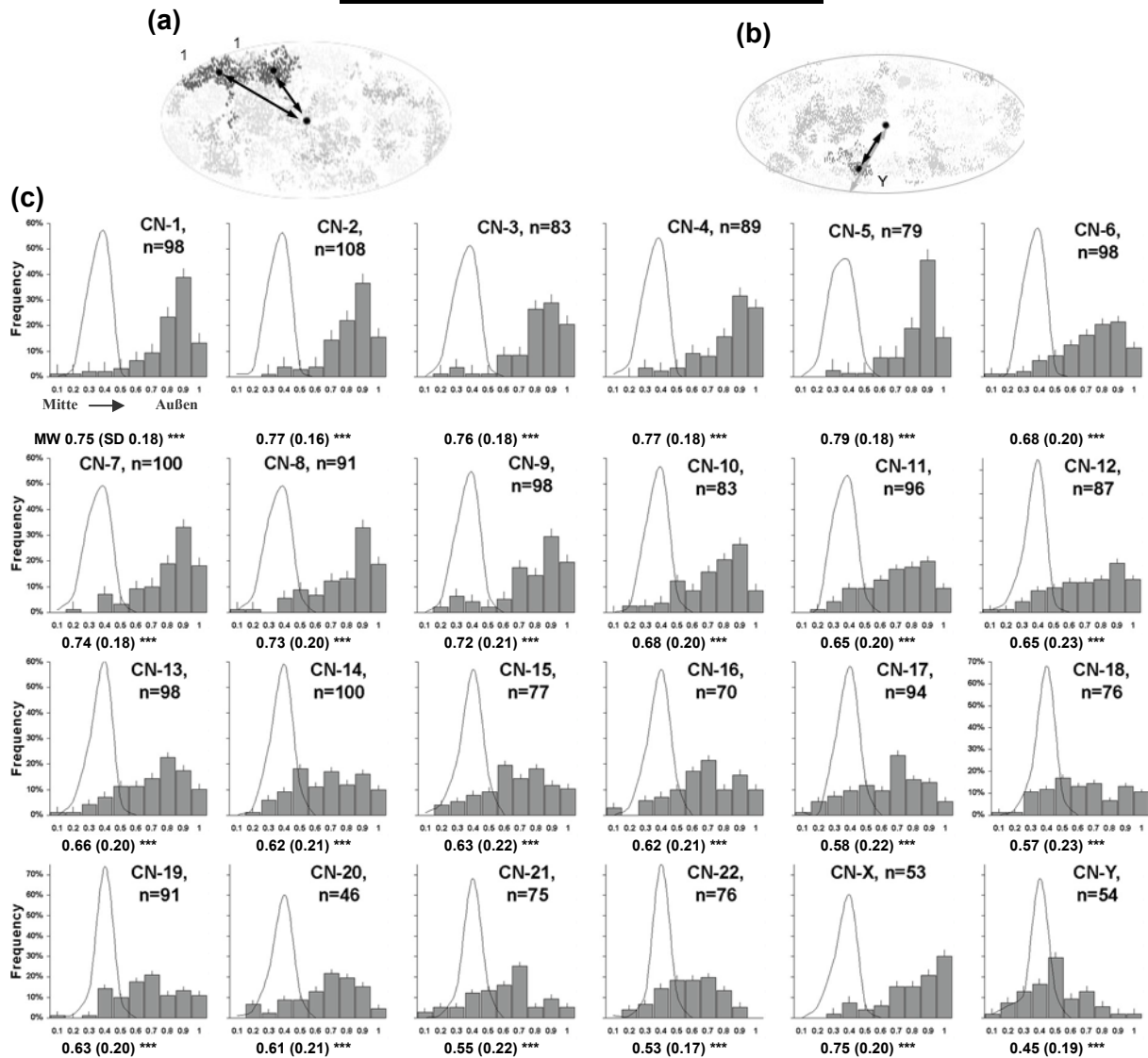
Radiale 3D-Abstände in Fibroblasten

Abb. 3-38 Abstände CT-CN der Chromosomen in 46XY-Fibroblasten. (a und b) Zwei Beispiele für die Datenerhebung mit Bildern aus der ReFISH-Serie. In (a) werden die Abstände der beiden CT 1 zum Mittelpunkt CN gezeigt. In (b) wird der Anteil der Strecke zum CT Y (schwarzer Pfeil) am Radius (grauer Pfeil) dargestellt. (c) Häufigkeiten der Schwerpunktsabstände vom Mittelpunkt, normalisiert auf den Radius und anschließend in 10 Klassen eingeteilt, wobei z. B. 0,1r die Abstände 0 - 10% des Radius beinhaltet. Die Fallzahlen n sind angegeben. Die Fehlerbalken bezeichnen den Standardfehler. Unter den Diagrammen ist der Mittelwert, die Standardabweichung und das Signifikanzniveau gezeigt. 2-seitiger Kolmogorov-Smirnov-Test ***: $p < 0,0001$.

Am Beispiel der CT 1 und Y kann man erkennen, dass Chr. 1 radiär meist weiter außen liegt als Y (a). Bei den beiden gleich großen Chromosomen 18 und 19 ist dieser Unterschied auch gegeben, wenn auch nicht so offensichtlich (b). Berechnet man die jeweiligen Mediane, so kann eine generelle Position aller Chromosomen in einem menschlichen Fibroblastenzellkern ermittelt werden (c). Am weitesten innen liegend die kleinen Chromosomen Y und 18, am äußersten die großen Chromosomen 1, 2 und 3.

Positionsplots aller Chromosomen in Fibroblasten

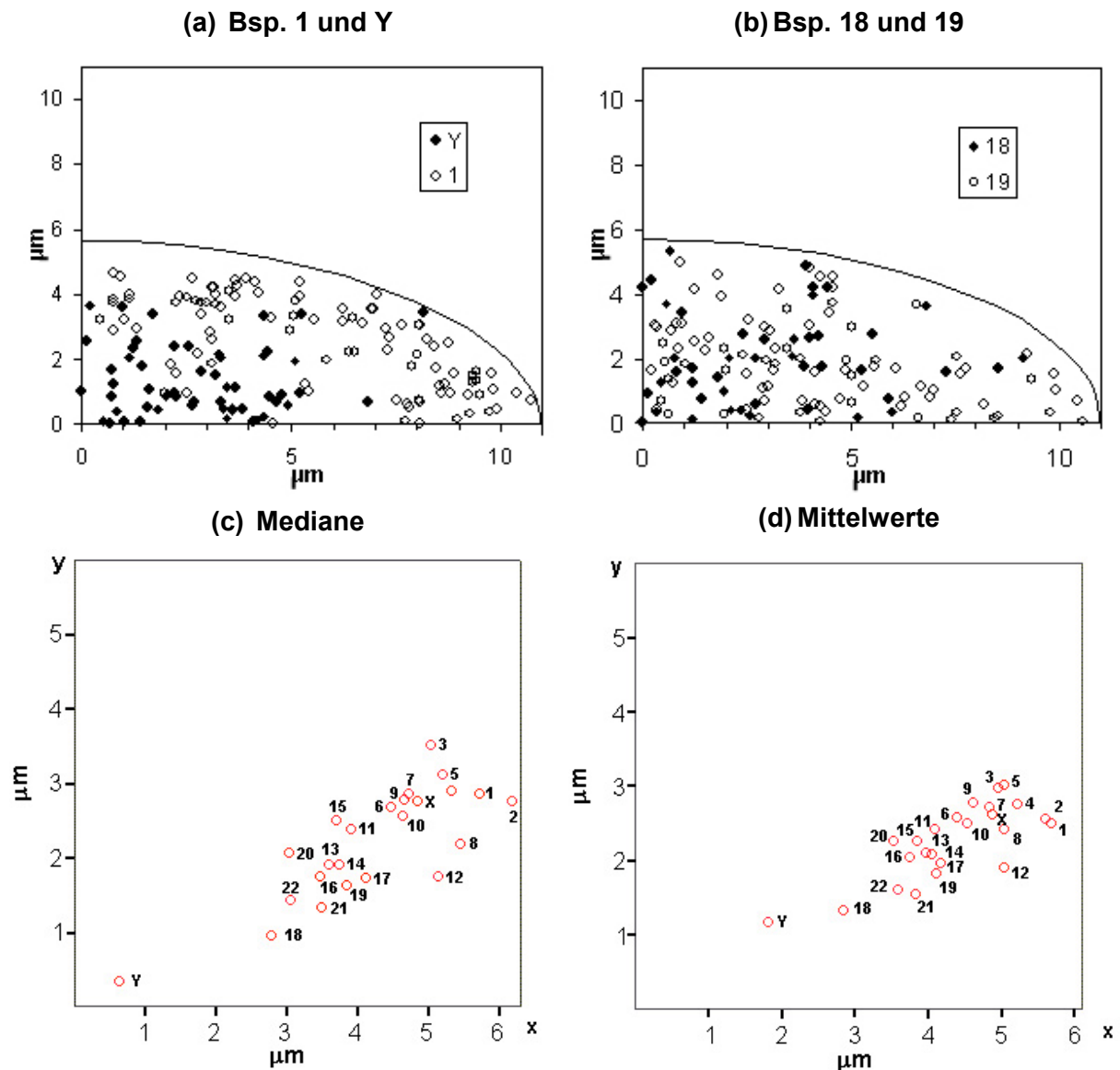


Abb. 3-39 XY-Plot der CT-Schwerpunkte in 46, XY-Fibroblasten. Die Koordinaten wurden gedreht, so dass die lange Achse mit der x-Achse übereinstimmt, auf den Radius normalisiert und als Punkte im ersten Quadranten dargestellt. Die z-Richtung musste für diese Darstellung außer Acht gelassen werden. (a) Die Y - Positionen sind weiter in der Mitte zu finden als die 1 - Positionen. (b) Die 18 - Positionen sind ebenfalls weiter in der Mitte als die 19 - Positionen, wenn auch nicht so offensichtlich. (c) Mediane und (d) mittlere Positionen aller Chromosomen im Zellkern. Chr. 18 ist klar in einer zentraleren Position als Chr. 19. Die Spreitung der Daten ist bei den Medianen größer.

Vergleich mit den Modelldaten

In den Modelldaten finden sich die Chromosomen umso weiter außen, je kleiner sie werden (siehe Abb. 3-40 a). Allerdings ist dieser Unterschied nur sehr gering (siehe Skala Abb. 3-40 a). Es konnte nicht vollständig geklärt werden, inwieweit der Radius der Territorien Einfluss nimmt. Kleine Chromosomen können näher am Kernrand liegen, da sich der Schwerpunkt eines Territori-

ums dem Kernrand bis zu seinem Radius nähern kann. So kann man das Abfallen der Kurve in dem Graphen (a) zu erklären.

In den experimentellen Abständen vom Mittelpunkt ist dieser Trend umgekehrt, es existiert eine Innen-Außen Korrelation der Schwerpunkte mit dem DNA-Gehalt der Chromosomen: größere Chromosomen liegen weiter außen als kleinere.

Korreliert man die Distanzen mit der Gendichte (Abb. 3-40 c; Deloukas et al. 1998), so lässt sich kein eindeutiger Trend erkennen, wie er in Boyle et al. (2001) beschrieben wurde. Das genreichste Chr. 19 liegt beispielsweise weiter außen als das genärmste Chr. 18 und nicht, wie man nach der Gendichte allein voraussagen würde, ganz im Zentrum. Die eingezeichnete Trendlinie besitzt jedoch ein leichtes Gefälle in Richtung genreicher Chromosomen, so dass ein Effekt nicht völlig auszuschließen ist.

Vergleicht man die experimentellen Wertepaare (Tab. 3-7) einzeln, so lässt sich herausfinden, ab welchem Größenunterschied zum ersten Mal ein signifikanter Verteilungsunterschied auftaucht. Dabei stellt sich heraus, dass die Grenze etwa bei Chr. 10 liegt. Alle Distanzen von 1 bis 10 unterscheiden sich untereinander nicht signifikant (Ausnahme: Chr. 6), jedoch ab Chr. 11 bis 22 teils beträchtlich. Als extremstes Beispiel liegt das Chr. Y signifikant zentraler als andere Chromosom (Ausnahmen: Chr. 18, 21 und 22).

Radiale Distanzen in Relation zu Genomparametern

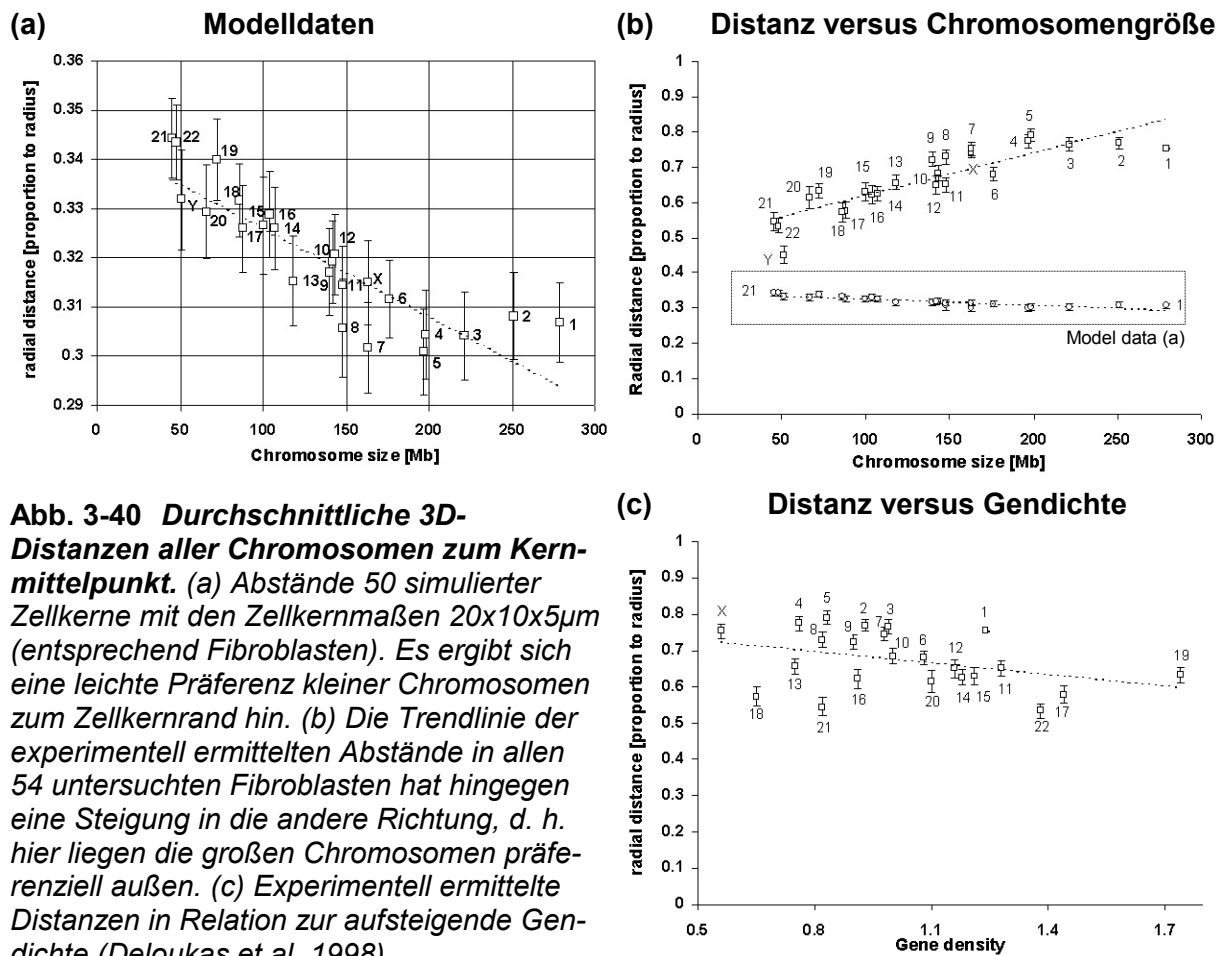


Abb. 3-40 Durchschnittliche 3D-Distanzen aller Chromosomen zum Kernmittelpunkt. (a) Abstände 50 simulierter Zellkerne mit den Zellkernmaßen 20x10x5µm (entsprechend Fibroblasten). Es ergibt sich eine leichte Präferenz kleiner Chromosomen zum Zellkernrand hin. (b) Die Trendlinie der experimentell ermittelten Abstände in allen 54 untersuchten Fibroblasten hat hingegen eine Steigung in die andere Richtung, d. h. hier liegen die großen Chromosomen präferenziell außen. (c) Experimentell ermittelte Distanzen in Relation zur aufsteigende Gendichte (Deloukas et al. 1998).

Signifikanzniveaus der radialen Verteilung

	CN-1	CN-2	CN-3	CN-4	CN-5	CN-6	CN-7	CN-8	CN-9	CN-10	CN-11	CN-12	CN-13	CN-14	CN-15	CN-16	CN-17	CN-18	CN-19	CN-20	CN-21	CN-22	CN-X	
CN-1																								
CN-2	ns																							
CN-3	ns	ns																						
CN-4	ns	ns	ns																					
CN-5	ns	ns	ns	ns																				
CN-6	*	*	*	*	***																			
CN-7	ns	ns	ns	ns	ns	ns																		
CN-8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns																	
CN-9	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns																
CN-10	ns	ns	ns	*	**	ns	ns	ns	ns															
CN-11	**	***	**	**	***	ns	*	*	ns	ns														
CN-12	**	***	**	**	***	ns	*	ns	*	ns	ns													
CN-13	**	***	**	***	***	ns	**	*	*	ns	ns	ns												
CN-14	***	***	***	***	***	ns	***	**	**	ns	ns	ns	ns											
CN-15	***	***	***	***	***	ns	**	*	**	ns	ns	ns	ns	ns										
CN-16	***	***	***	***	***	ns	***	**	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns									
CN-17	***	***	***	***	***	ns	***	***	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns								
CN-18	***	***	***	***	***	*	***	***	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns							
CN-19	***	***	***	***	***	ns	***	**	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns						
CN-20	**	**	**	***	***	ns	**	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns					
CN-21	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	*	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns				
CN-22	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	**	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CN-X	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CN-Y	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Tab. 3-7 Signifikanzunterschiede zwischen den Distanzen von der Zellkernmitte in den experimentell ermittelten Verteilungskurven. Der 2-seitige Kolmogorov-Smirnov-Test wurde verwendet, um die jeweiligen Abstände gegeneinander zu testen. Z. B. ist der Abstand zwischen Chr. 1 (CN - 1) und Chr. 6 (CN - 6) signifikant unterschiedlich. Alle Chromosomen kleiner als 11 waren gegenüber den größeren Chromosomen näher zur Zellkernmitte hin verteilt. ns: p>0,01, *: p<0,01, **: p<0,001, ***: p<0,0001.

3.5.2.4 Abstände der homologen Chromosomen zueinander

Die Abstände CT-CT der homologen Chromosomen sollten sich analog zu den Abständen CT-CN verhalten. Je näher sich zwei homologe Territorien in der Zellkernmitte befinden, desto geringer sollte auch ihr Abstand zueinander sein. Ein Vergleich mit den theoretischen Modelldaten kann Hinweise auf eine nicht-zufällige Konformation geben. Desweiteren kann mit den Abstandsdaten der homologen Chromosomen der Frage einer Homologenassoziation nachgegangen werden. Sind die Abstände immer klein, so liegen die zwei Homologen nah beieinander, was für eine Assoziation sprechen würde. Einen wichtigen Faktor hierbei spielt die Größe des Territoriums, wenn nur der Schwerpunkt für die Berechnungen herangezogen wird. Angenommen jedes Territorium wäre eine Kugel mit dem Radius r , so würde man von einer Assoziation sprechen, wenn der Abstand CT-CT den Betrag $2r$ annehmen würde. Der interhomologe Abstand ist deswegen abhängig von der Größe und der Form der Territorien. Diese sind jedoch meist unregelmäßig und aus M-FISH Bildern nicht perfekt ableitbar (siehe das spätere Kapitel 3.5.3.3, S. 166).

Histogramme

In Abb. 3-41 sind die Ergebnisse der Abstandsberechnung zwischen den homologen Chromosomen gezeigt. Die Abstände wurden diesmal nicht auf den Radius, sondern auf den großen Durchmesser des Zellkerns normalisiert. Die Einteilung der Häufigkeiten fand wieder in 10 Klassen statt, z. B. kam bei den homologen CT 1-1 die Klasse $0,5d$ (50-60% des Durchmessers) in 17% der untersuchten Kerne vor. Im Gegensatz zu den experimentellen Daten zeigen die Modelldaten meist eine ein- oder zweigipfelige Verteilung (Linien in Abb. 3-41 c). Auffallend ist, dass der Abstand bei den Modelldaten von den großen Chromosomen hin zu den kleinen leicht ansteigt (Chr. 1 = $0,4d \pm 0,14$ (MW \pm SD), Chr. 22 = $0,5d \pm 0,15$). In den experimentellen Histogrammen ist dies umgekehrt. Einen signifikanten Unterschied zu den Modellkurven ergaben die Abstände 5-5, 10-10, 12-12, 16-16, 20-20, 21-21, 22-22 (zweiseitiger Kolmogorov-Smirnov-Test, $p < 0,01$). Das heißt z. B. die Homologen des Chr. 5 haben experimentell einen signifikant größeren Abstand, als im Modell für eine zufällige Verteilung erwartet werden würde.

Liegen Chromosomen eher in der Zellkernmitte (z. B. Chr. 16 oder 22, Abb. 3-38, S. 151), so sollten auch die homologen Abstände geringer als bei anderen Chromosomen sein. Dies ist tatsächlich der Fall, denn die experimentell ermittelten Histogramme verschieben sich zu kleinen Chromosomen hin auch zu kleineren Werten nach links. Am deutlichsten ist dieser Trend bei Chr. 22 sichtbar (Abb. 3-41 c). Der Umkehrschluss, weit außen liegende Chromosomen seien auch immer weit voneinander entfernt ist nicht gültig, denn die Anordnung kann an der Kernhülle ganz variabel sein. Für große Chromosomen sollte sich deshalb eine Normalverteilung um den halben Durchmesser ($0,5d$) als Mittelwert ergeben, was auch der Fall ist. Allerdings kommt bei einigen großen Chromosomen (2, 3, 4, 7, und 11) die Klasse $0,2d$ gehäuft vor. Dies deutet darauf hin, dass diese homologen CT mit einer geringfügig überzufälligen Häufigkeit im Kerninneren vorkommen.

gen Häufigkeit im Kerninneren vorkommen. Möglicherweise reflektiert dieser Befund die Tatsache, dass in Fällen, in denen nur ein großes CT klassifiziert wurde, visuell zwei eng benachbarte Schwerpunkte zugeordnet wurden.

Signifikante Unterschiede

Die Verteilung der homologen Distanzen eines Chromosomentyps zu den homologen Distanzen eines anderen Chromosomentyps zeigte in den meisten Fällen keinen signifikanten Unterschied (zweiseitiger Kolmogorov-Smirnov-Test, $p > 0,01$; detaillierte Tabelle auf der CDROM im Verzeichnis zu diesem Kapitel „Tabelle der homologen Abstände in Fibroblasten.doc“). Ausnahmen sind die signifikant rechts-gipfelige Verteilung 5-5 ($p < 0,01$ zu den Distanzen von fünf anderen Chromosomentypen) und die links-gipfeligen Verteilungen von 16-16 und 22-22 ($p < 0,01$ zu den Distanzen von sieben, bzw. zehn anderen Chromosomentypen). Die Verteilung der letztgenannten Chromosomen kann durch ihre zentralere Lage im Kern erklärt werden.

Alle Distanzenhäufigkeiten der homologen Chromosomen waren normalverteilt mit einer großen Standardabweichung (einseitiger Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors, $p > 0,01$). Würden die beiden Homologen eines Chromosoms überzufällig häufig nebeneinander liegen, so müsste sich eine signifikante Verschiebung zu kleineren Abständen zeigen, und zugleich die Standardabweichung sehr klein werden. Dies ist selbst in dem Extremfall von Chr. 22 nicht der Fall, wo im Intervall $0,26d \pm 0,23$ ($MW \pm 2*SD$) 95% aller Messwerte liegen. Insgesamt sprechen die Ergebnisse in diesem Kapitel daher gegen eine Homologenassoziation.

3D-Abstände homologer Chromosomenpaare

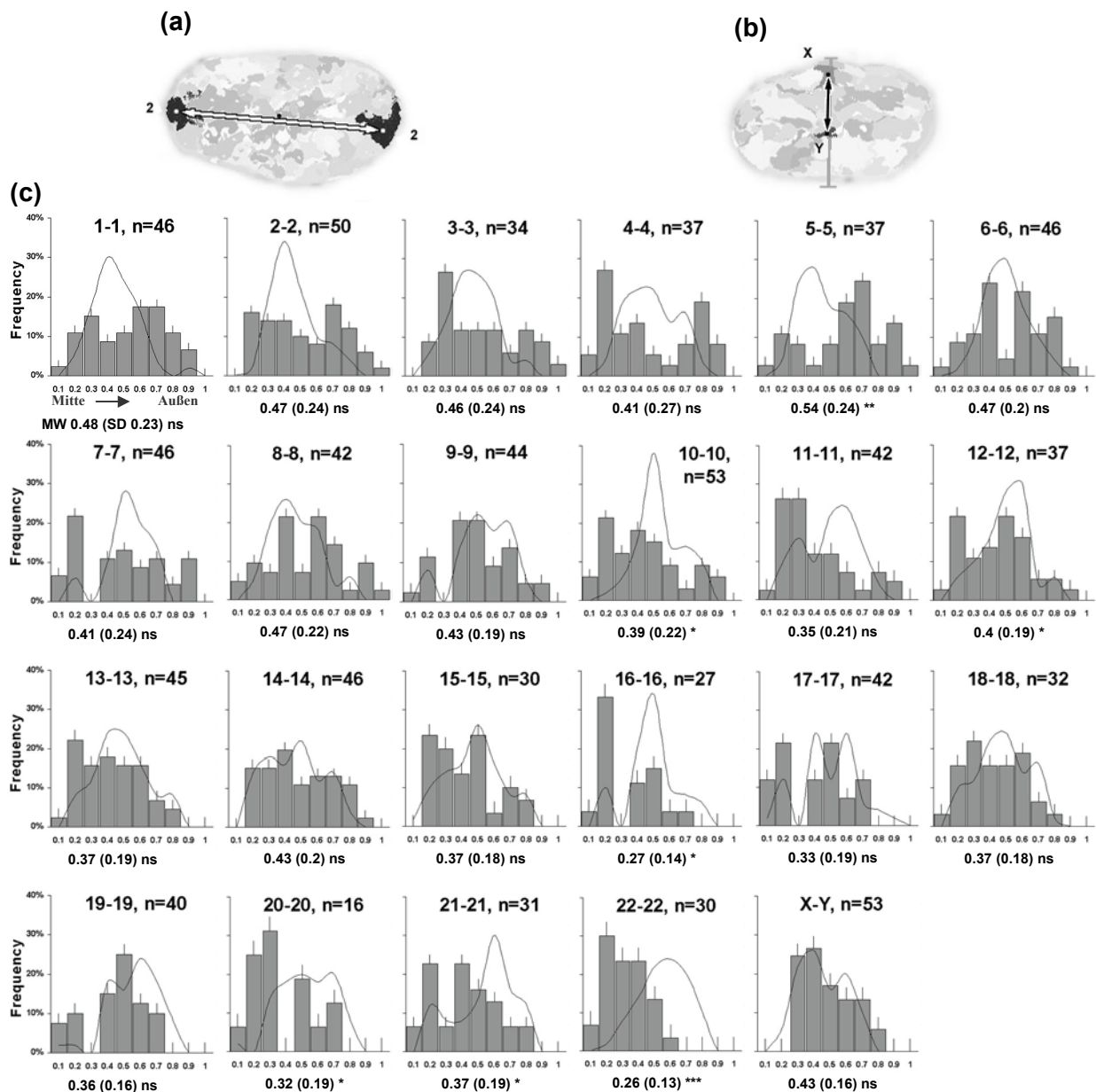


Abb. 3-41 3D-Abstände der homologen Chromosomenterritorien in 46, XY Fibroblasten. (a und b) Zwei Beispiele für die Datenerhebung mit Bildern aus der M-FISH Serie. In (a) werden die Abstände der beiden CT 2 zueinander gezeigt. In (b) wird die Strecke XY (schwarzer Pfeil) in relation zum Durchmesser (graue Linie) dargestellt. (c) Häufigkeiten der Schwerpunktsabstände der homologen CT, normalisiert auf den Durchmesser und anschließend in 10 Klassen eingeteilt, wobei z. B. die Klasse 0,1d die Abstände 0-10% des Durchmessers beinhaltet. Im Hintergrund ist die Linie der Modellverteilung gezeichnet. Unter den Diagrammen ist der jeweilige Mittelwert, in Klammern die Standardabweichung und dahinter das Signifikanzniveau angegeben, ob die experimentelle Verteilung von der Modellverteilung abweicht. Die Abstände 10-10, 12-12, 16-16, 20-20, 21-21 und 22-22 weichen signifikant von der Modellverteilung ab, hin zu kleineren Abständen, 5-5 hin zu größeren Abständen (zweiseitiger Kolmogorov-Smirnov-Test, ns: $p > 0,01$, *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$). Die Standardabweichung liegt im Bereich von 0,13 (Chr. 22) – 0,27 (Chr. 4) und entspricht bis zu 50% des Mittelwerts. Eine solch hohe SD spricht gegen eine Homologenassoziation. Bei den großen Chromosomen 2, 3, 4, 7, 11 kommt die Klasse 0,2d auffallend oft vor.

3.5.2.5 Winkel der homologen Chromosomen zueinander

Der Winkel, den zwei homologe Chromosomenterritorien vom Mittelpunkt aus gesehen einschließen, ist ein Maß für die nachbarschaftliche Nähe. Winkel werden benutzt, um herauszufinden, ob zwei parentale Genome getrennt im Zellkern vorliegen, wie es von Nagele et al. (1999) postuliert wurde. Bei einer Genomseparation würde man erwarten, dass viele homologe CT einander mehr oder weniger gegenüber liegen, also einen großen Winkel ($\gg 90^\circ - 180^\circ$) haben. Aus Tab. 3-8 geht hervor, dass dem nicht so war. Alle Homologen schlossen einen Winkel von durchschnittlich 81° ein, wobei die Spannweite von 0° bis fast 180° reichte. Zusammen mit der hohen Standardabweichung war kein Trend bezüglich einer geordneten Separation erkennbar. Ein Signifikanztest bestätigte, dass die Winkelverteilung für kein Homologenpaar von einer Normalverteilung oder von einer Gleichverteilung abwich (Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest, $p > 0,01$).

Bei fast allen Chromosomen gab es keinen signifikanten Unterschied zu den Winkeln aus den SCD-Modelldaten (zweiseitiger Kolmogorov-Smirnov-Test, $p < 0,01$). Die Winkel zwischen den homologen der Chromosomen 4 und 20 wiesen jedoch einen signifikant kleineren Winkel (60° und 45°) als bei der Modellverteilung auf. Das bedeutet, dass die homologen Paare 4-4 und 20-20 näher als im Modell erwartet zusammenliegen. Es war kein Trend erkennbar, der diese beiden Werte erklären konnte, so dass es sich wahrscheinlich um „Ausreißerwerte“ handelte.

Mit den gefundenen Winkeln wurde keine von der Zufallserwartung abweichende Anordnung der homologen Chromosomenterritorien gefunden. Die von Nagele et al. (1999) postulierte Trennung der Genome wird durch diese Daten nicht gestützt.

Fibroblasten Interphasekern								
Durchschnittliche Homologenseparation								
Chr.	n	MW	Spannweite		SD	Unterschied zu Normalverteilung	Unterschied zu Modell-daten	
		°	°	°	°			
1-1	46	90,6	7	-	176	59,3	ns	ns
2-2	50	78,9	4	-	178	55,9	ns	ns
3-3	34	86,6	4	-	178	54,3	ns	ns
4-4	37	65	1	-	179	59	ns	**
5-5	37	103	11	-	172	48,1	ns	ns
6-6	46	92,7	1	-	175	51,3	ns	ns
7-7	46	79,7	5	-	176	57,9	ns	ns
8-8	42	100	2	-	179	57	ns	ns
9-9	44	77,8	2	-	175	46,8	ns	ns
10-10	33	78,5	2	-	179	61,6	ns	ns
11-11	42	80,4	3	-	178	55,2	ns	ns
12-12	36	80,2	0	-	177	61,1	ns	ns
13-13	46	77	4	-	172	54	ns	ns
14-14	46	105	4	-	177	55,1	ns	ns
15-15	30	71,1	3	-	157	44,5	ns	ns
16-16	27	60,3	1	-	177	54,5	ns	ns
17-17	42	63,2	5	-	167	48,4	ns	ns
18-18	32	80,3	3	-	172	60,7	ns	ns
19-19	40	83	2	-	176	57,7	ns	ns
20-20	17	51,2	0	-	134	44,7	ns	*
21-21	31	89,7	4	-	173	55,1	ns	ns
22-22	29	69	0	-	152	51,3	ns	ns
X-Y	53	102	5	-	176	56,7	ns	ns

Tab. 3-8 Winkel der homologen Chromosomen in menschlichen 46, XY Fibroblastennuklei. Die Spannweite reicht von 0°-180° und die Werte zeigen keinen signifikanten Unterschied zu einer Normal- oder (ebenfalls getesteten) Gleichverteilung. (Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest, $p > 0,01$). Im Vergleich zu den Modelldaten (4-4: $104^\circ \pm 47,6^\circ$ (MW \pm SD), 20-20: $95^\circ \pm 50^\circ$) ist der Winkel zwischen den Homologen 4-4 und 20-20 im Experiment näher zusammen (zweiseitiger Kolmogorov-Smirnov-Test, ns: $p > 0,01$, *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$).

3.5.2.6 Abstände und Winkel der heterologen Chromosomen zueinander

Die Abstände zwischen heterologen Chromosomen, also z. B. zwischen Chr. 1 und Chr. 2, können über die relativen nachbarschaftlichen Beziehungen Aufschluss geben. Eine starre Nachbarschaft in einer Population von Zellkernen verlangt von einem beliebigen heterologen Chromosomenpaar immer einen ähnlichen Distanzbetrag, mit einer geringen Standardabweichung. Wie bereits bei den Homologen ist auch der Abstand der Heterologen umso kleiner, je näher sie sich an der Zellkernmitte befinden.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3-42 als MDS-Plot zusammengefasst. Mithilfe einer Multidimensionalen Skalierung (MDS) ist es möglich, Unterschiede in distanzähnlichen Daten zu finden. Das bekannteste Beispiel ist eine Entfer-

nungstabelle, welche die Distanzen in Kilometern zwischen unterschiedlichen Städten eines Landes zeigt. Das Statistikprogramm *SPSS* kann aus solch einer Tabelle der 3-dimensionalen Distanzen durch multidimensionale Skalierung eine 2D - Landkarte konstruieren.

Die Abstände vom Mittelpunkt in den experimentellen Daten Abb. 3-42 c wurden im Gegensatz zu den Modelldaten von den großen Chromosomen zu den kleinen hin geringer. Deswegen lagen vor allem die kleinen Chromosomen Y, 17, 18, 19, 21, 22 nahe zusammen im Zentrum. Die großen Chromosomen verstreuten sich in der Peripherie in etwa gleichmäßig. Ein Cluster war zu erkennen, welches die Chromosomen {9, 10, 11, 16} enthielt, wobei vor allem 11 und 16 sehr nahe beieinander lagen. Allerdings zeigen die durchgeführten Winkelberechnungen einen Winkel zwischen {11, 16} von durchschnittlich 100° und auch die Winkel der anderen beteiligten Chromosomen liegen etwa um 90° , so dass eine enge Assoziation auch hier unwahrscheinlich ist (Datei „Tabelle der heterologen Winkel in Fibroblasten.doc“ im Ordner zu diesem Kapitel auf der CDROM).

MDS-Plot heterologer Chromosomen in Fibroblasten

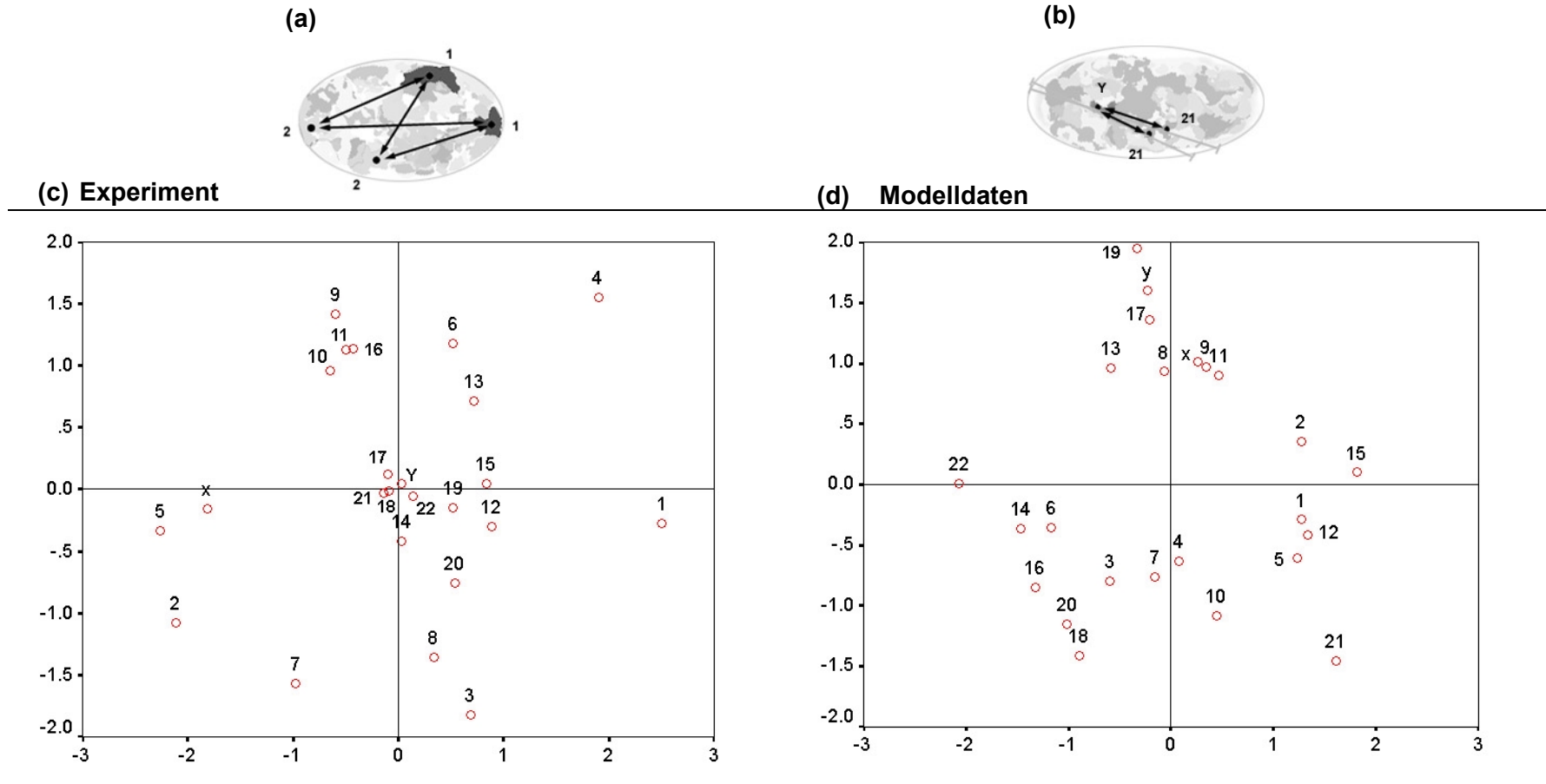


Abb. 3-42 Abstände der heterologen Chromosomen in menschlichen 46, XY Fibroblastennuklei, dargestellt als MDS-Plot. (a und b) Zwei Beispiele für die Datenmessung. In a sind die vier berechneten Abstände zweier Chromosomen eingezeichnet. In (b) wird der Anteil der Strecke 21-Y (schwarze Pfeile) am Radius (graue Striche) verdeutlicht. (c) Darstellung der experimentellen Daten als MDS-Plot. In eine Tabelle wurden die Mittelwerte aller gemessenen Distanzen heterologer Chromosomen als Verhältnis zum Durchmesser eingegeben. Die Standardabweichung lag bei allen Werten im Mittel bei 18% ($13\% \leq SD \leq 23\%$). n lag für jedes Chromosomenpaar im Mittel bei 133 ($45 \leq n \leq 192$). SPSS berechnete daraus den hier gezeigten MDS-Plot. (d) MDS-Plot der simulierten Modelldaten einer zufälligen Chromosomenverteilung im Kern. Man erkennt kaum Chromosomen in der Mitte liegen und die kleineren eher zum Rand positioniert.

3.5.3 Chromosomenpositionen in Prometaphaserosetten

Ratio für Untersuchung der Prometaphaserosetten

Ringförmige Rosettenstrukturen sind bei sich teilenden Zellen in der Prometaphase zu erkennen (Chaly und Brown 1988). In diesen Prometaphaserosetten ordnen sich die Chromosomen außen um ein Zentrum herum an (Abb. 1-2, S. 22). Die Chromosomen liegen parallel zum Objektträger, sind gut zugänglich für DNA-Sonden und können leicht im Mikroskop erkannt werden. Es gibt zwei verschiedene Hypothesen ihre relative Anordnung betreffend: Nagele et al. (1995) behaupten, es gäbe eine starr angeordnete Nachbarschaft und eine gegenüberliegende Separation homologer Chromosomen menschlicher Fibroblasten, Allison und Nestor (1999) finden dagegen eine zufällige Anordnung in demselben Zelltyp. Mit dem hier angewandten Verfahren wurde es möglich, das in diesen Veröffentlichungen vorkommende Manko zu überwinden: es konnten zum ersten Mal mehr als nur maximal drei Sonden auf ein Präparat hybridisiert werden. Dadurch wurde eine simultane Anschauung der nachbarschaftlichen Anordnung möglich und konnte zur Klärung der Kontroverse beitragen.

Zahlen der Experimentserie

Insgesamt wurden in zwei Versuchsserien 28 Prometaphaserosetten mit M-FISH und ReFISH ausgewertet (Abb. 3-43). Dabei konnten 990 Chromosomen klassifiziert und deren Koordinaten festgestellt werden (76,9%). Folglich konnten von den 46 möglichen Chromosomen pro Rosette im Schnitt 35 sicher klassifiziert werden.

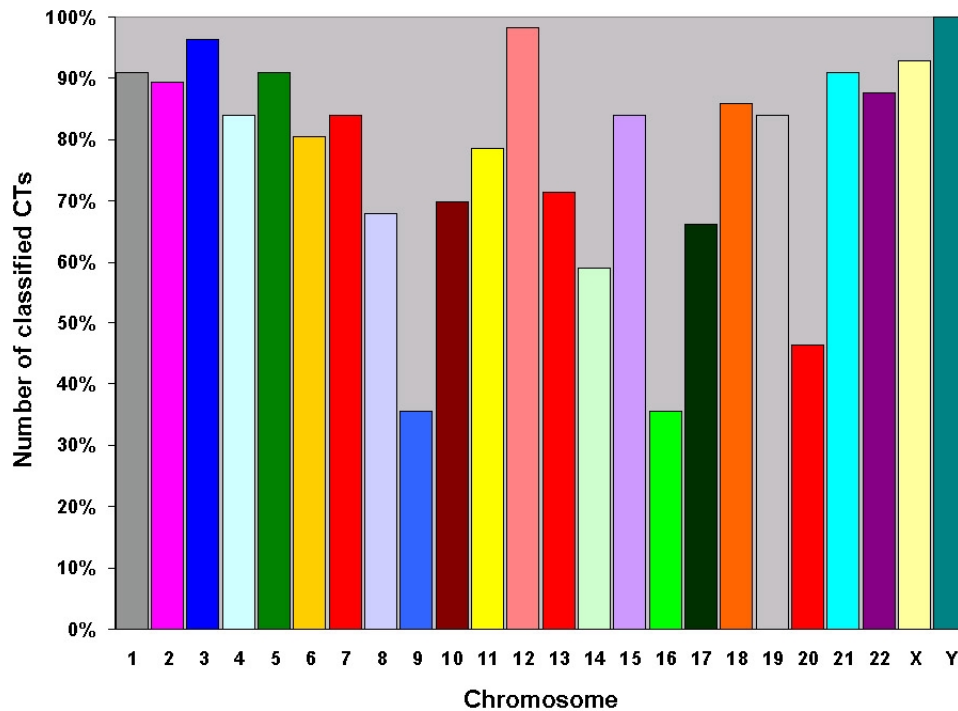
Die erhaltenen Schwerpunktskoordinaten wurden wie in der Abb. 3-34 (S. 145) beschrieben transformiert. Folgende Abstände wurden mithilfe der Gleichung 2-11 bestimmt: CT-CN, CT-CT homolog, CT-CT heterolog. Zusätzlich wurden noch die Winkel zwischen den homologen und heterologen Domänen berechnet (Gleichung 2-13).

Vielfarben-FISH bei Prometaphaserosetten

(a)

Aufnahmemodus	konfokal	Weitfeld	
Experimentserie	ReFISH	M-FISH	
Markierungsschema	Tab. 2-3	Tab. 2-2	
Ergebnisse im Kapitel	3.5.2.2	3.5.2.1	Total
Anzahl aufgenommener Prometaphaserosetten	5	23	28
Anzahl klassifizierter CT	153	837	990
Anzahl klassifizierter CT von 46 möglichen pro Rosette	66,5%	79,1%	76,9%

(b)



(c)

Chr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl von 56 möglichen	51	50	54	47	51	45	47	38	20	39	44	55
	91%	89%	96%	84%	91%	80%	84%	68%	36%	70%	79%	98%

Chr	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X (von 28)	Y (von 28)
Anzahl von 56 möglichen	40	33	47	20	37	48	47	26	51	49	26	28
	71%	59%	84%	36%	66%	86%	84%	46%	91%	88%	93%	100%

Abb. 3-43 Prometaphaserosetten. (a) Zahlen der im Zuge dieser Experimentserie aufgenommenen Prometaphaserosetten. ReFISH bedeutet konfokaler Aufnahmemodus, M-FISH Weitfeldaufnahmen mit anschließender Dekonvolution. Querverweise zu den Markierungsschemata sind angegeben. (b) Prozentzahlen der klassifizierten Chromosomen. (c) Tabelle der Werte in b. Jedes Autosom konnte maximal 56 mal in 28 Rosetten gefunden werden, jedes Geschlechtschromosom maximal 28 mal. Der Mittelwert klassifizierter Chromosomen pro Rosette betrug 35 (76,9%).

3.5.3.1 M-FISH

Im Gegensatz zu den G0-Fibroblasten des vorigen Kapitels mussten die Zellen auf diesen Präparaten in der Wachstumsphase sein, um Prometaphaserosetten zu erhalten. Auf ein solches 3D-fixiertes Präparat wurde der in Tab. 2-2b (S. 49) dargestellte M-FISH Mix hybridisiert. Es wurden alle 23 gefundenen Rosetten mit dem Weitfeldmikroskop in optischen Schnittserien aufgenommen, anschließend der Dekonvolution unterzogen und mit *mfish3d* klassifiziert. Jede klassifizierte Region wurde mithilfe der Originaldaten auf ihre Richtigkeit kontrolliert, und die entsprechenden Schwerpunktskoordinaten in eine neue Tabelle eingetragen. Konnte ein automatisches Klassifikationsergebnis nicht nachfolgt werden, wurden diese Schwerpunkte weggelassen, außer die visuelle Klassifikation war eindeutig (z. B. Detektion des Y-Chromosoms). Bezüglich der Schwerpunktzunordnung bei Duplex-Signalen gilt das bei G0-Fibroblasten bereits Erwähnte analog. Da die Chromosomen in den Rosettenstrukturen bereits einen hohen Kondensationsgrad hatten, konnten die Homologen häufiger als bei den G0-Fibroblasten getrennt werden.

In den M-FISH Hybridisierungen wurden im Mittel 79% (SD 9%) aller möglichen Chromosomen klassifiziert. D. h. von 46 möglichen wurden durchschnittlich 36 Chromosomen identifiziert, allerdings mit einer hohen Schwankungsbreite von 32 – 41. Zwei Beispielklassifikationen sind in Abb. 3-44 gezeigt.

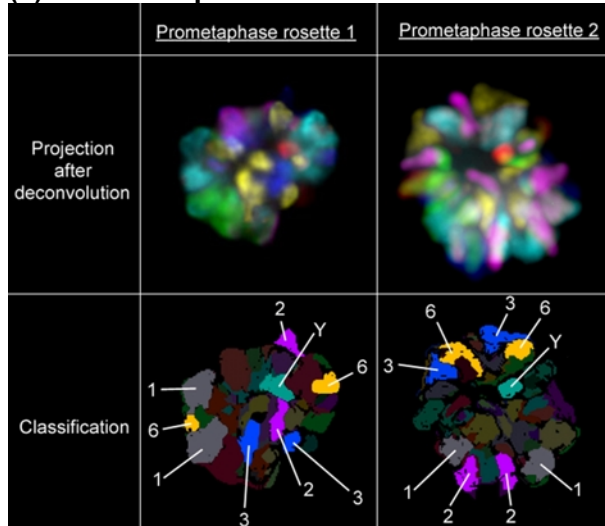
3.5.3.2 ReFISH

Auf zwei Präparaten aus wachsenden Fibroblastenkulturen wurden 5 Prometaphaserosetten entdeckt und am CLSM aufgenommen (Abb. 3-45 a und b). Bei dem ersten Präparat gelang der intermediäre Wasch- und Denaturierungsschritt nicht vollständig, wodurch der Cy5-Kanal nicht mehr eindeutig war (Tab. 2-3 c, S. 53). Von diesem Präparat wurden 4 Rosetten aufgenommen. Bei dem zweiten Präparat gelang zwar der Nachweis, jedoch wurde nur eine einzige Rosette wieder gefunden.

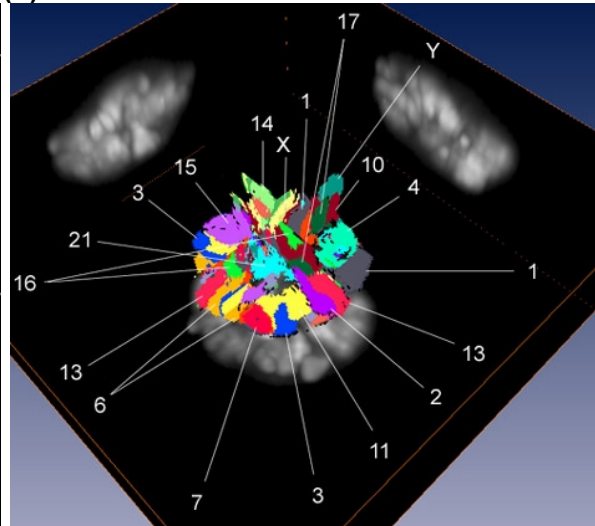
Pixelshift und Klassifizierung

Der durch die zweifache Aufnahme bedingte xy-Pixelshift wurde mit einem nachgeschalteten Alignment durch das Programm *correlator.cc* (Heintzmann 1999) wieder ausgeglichen (Abb. 3-36, S. 148). Das weitere Vorgehen war analog den Fibroblasten (Kapitel 3.5.2.1, S. 141): Klassifikation mit *mfish3d* (Abb. 3-45 c), Überprüfung jeder klassifizierten Region mithilfe der Originaldaten auf ihre Richtigkeit und Eintrag der Schwerpunktskoordinaten in eine Tabelle. Eine 3D-Rekonstruktion veranschaulicht die räumliche Anordnung, wenn auch die Fülle an Farben verwirrend ist (Abb. 3-45 d).

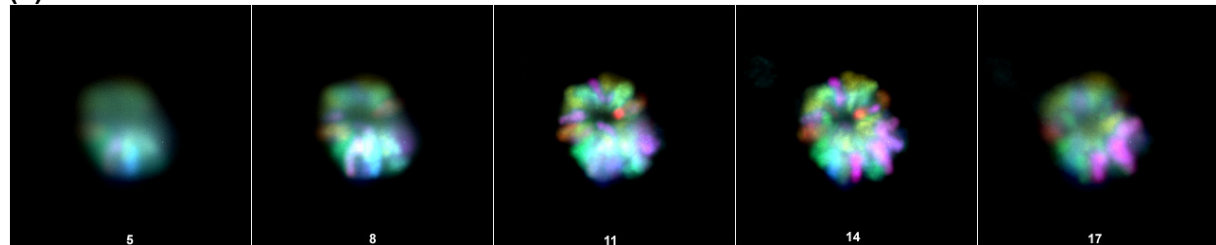
(a) Zwei Beispiele



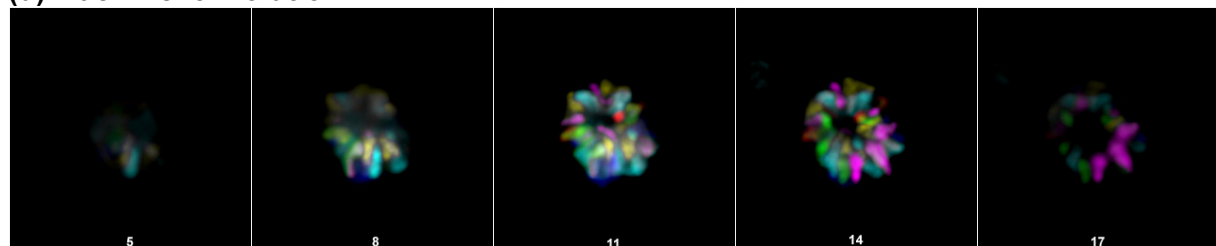
(b) 3D-Rekonstruktion



(c) Vor Dekonvolution



(d) Nach Dekonvolution



(e) Klassifizierung

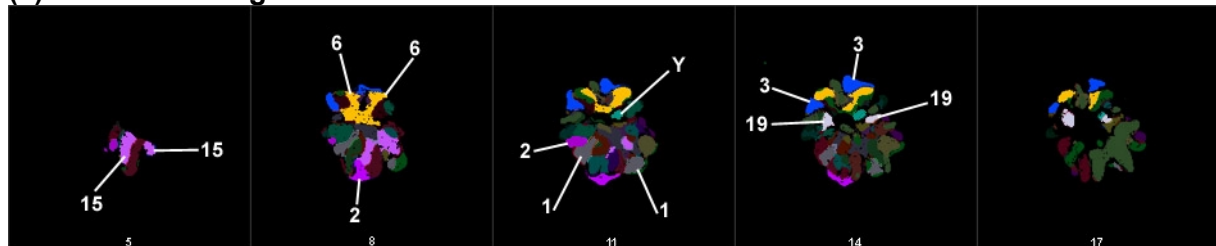


Abb. 3-44 M-FISH Klassifikation von Prometaphaserosetten. (a) Zwei Beispiele für aufgenommene und klassifizierte Prometaphaserosetten. Zunächst entsteht durch RGB-Überlagerung das „true color“-Bild. Nach Klassifikation mit *mfish3d* werden den CT Falschfarben zugeordnet, entsprechend den verschiedenen Chromosomen. Zur besseren Darstellung wurden die meisten CT abgedunkelt und nur einige Farben gelassen. (b) 3D-Rekonstruktion einer weiteren klassifizierten Prometaphaserosette. (c) True color lichtoptische Serienaufnahme durch eine andere Rosette, ohne Dekonvolution. (d) Die gleiche Serie nach Dekonvolution mit dem Huygens ICTM-Algorithmus. (e) Nach Klassifikation mit *mfish3d*. Zur besseren Darstellung wurden die meisten CT abgedunkelt und nur einige in ihren Farben gelassen.

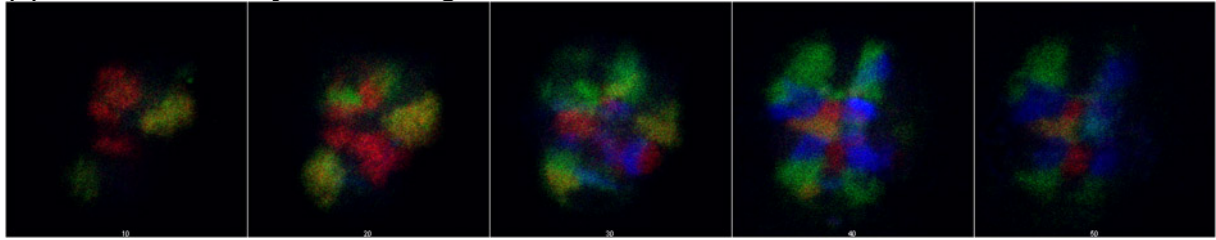
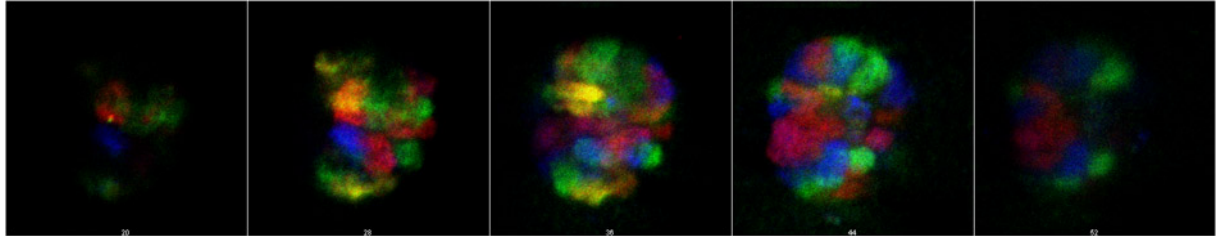
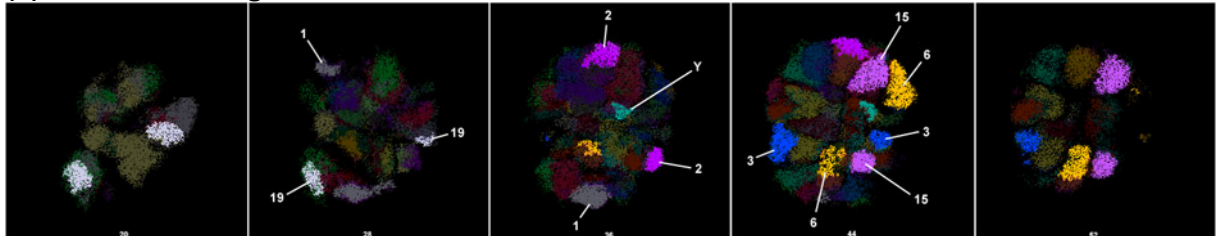
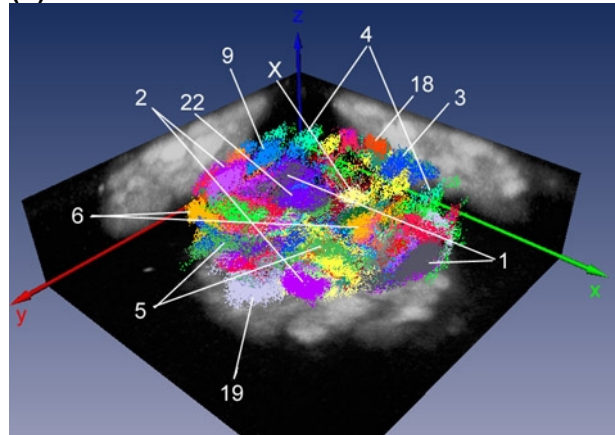
(a) Erste ReFISH-Hybridisierung**(b) Zweite ReFISH-Hybridisierung****(c) Klassifizierung**

Abb. 3-45 ReFISH Klassifikation einer Prometaphaserosette. (a) Lichtoptische Serienaufnahme nach der 1. Hybridisierung eines Fibroblasten (RGB-Darstellung). (b) Die gleiche Serie nach der 2. Hybridisierung. (c) Nach Klassifikation mit *mfish3d*. Zur besseren Darstellung wurden die meisten CT abgedunkelt und nur sieben in ihren Farben gelassen. (d) Amira 3D-Rekonstruktion der klassifizierten Prometaphaserosette. Aus Übersichtlichkeitsgründen sind nicht alle klassifizierten Chromosomen dargestellt. Insgesamt konnten in dieser Rosette alle 46 Chromosomen identifiziert werden. An den Wänden sieht man S/W-Projektionen.

(d) 3D-Rekonstruktion**3.5.3.3 Volumina der Territorien**

In den Prometaphaserosetten wurde versucht, mithilfe des Volumens Rückschlüsse auf die Größe und den Kondensationsgrad der Chromosomen zu ziehen. In der G₀-Interphase ist dieses Unterfangen noch problematischer, weil die Chromosomen dekondensierter sind und je nach Transkriptionsstatus unterschiedliche Volumina einnehmen, wie Koss (1998) in Flächenmessungen zeigte. Bislang gibt es meines Wissens nur zwei Publikationen aus demselben Labor, in denen mittels EM-Aufnahmen das Volumen von Chromo-

somen in mitotischen Figuren bestimmt wurde, wobei die spätere auf den Daten der früheren aufbaut (Heslop-Harrison et al. 1989; Leitch et al. 1994).

Das Programm *mfish3d* gab zusätzlich zu den Schwerpunkten der klassifizierten Regionen auch deren Volumina aus. Da es meist mehr als zwei Regionen pro Chromosom klassifizierte, wurden mithilfe der Originalbilder die zwei homologen Chromosomen bestimmt und deren Volumen in die Ergebnistabelle eingetragen. In der Regel waren dies die größten, in dieser Farbe klassifizierten Regionen.

Das Volumen der Chromosomen wurde in Relation zu dem Volumen der gesamten Prometaphaserosette gesetzt. Dieses Gesamtvolumen wurde wiederum auf mehrere Arten experimentell bestimmt bzw. berechnet: (i) durch die Gegenfärbung DAPI, (ii) durch das Maximage (Summe aller Hybridisierungssignale) und (iii) durch die Annahme, der Fibroblast sei näherungsweise ein Ellipsoid mit den gemessenen Halbachsen in x-, y- und z-Richtung. Im Mittel ergaben sich dabei folgende Volumina (MW \pm SD):

- (i) Dapi (n=23): $554 \pm 252,3 \mu\text{m}^3$
- (ii) Maximage (n=28): $708 \pm 236,1 \mu\text{m}^3$
- (iii) Ellipsoid (n=28): $614 \pm 190,7 \mu\text{m}^3$

Daraus ergab sich eine Reihenfolge der Größe nach von „Maximage > Ellipsoid > Dapi“, wobei die Standardabweichung teils bis zu 50% betrug. Dabei waren die am konfokalen Mikroskop aufgenommenen Zellkerne „Cell 1 – 4“ relativ homogen und insgesamt größer als die anderen Zellkerne (siehe Abb. 3-46). Die Größen der restlichen Zellkerne waren variabler und ein Einfluss der Dekonvolution konnte nicht prinzipiell ausgeschlossen werden. Elektronenmikroskopische Daten mitotischer Chromosomen im Zellkern gelangten zu einem weit geringeren Gesamtvolumen (durchschnittlich $91,6 \mu\text{m}^3$; Heslop-Harrison et al. 1989). Im Vergleich zu den hier gefundenen Beträgen war dieses Volumen etwa 5- bis 7-mal kleiner.

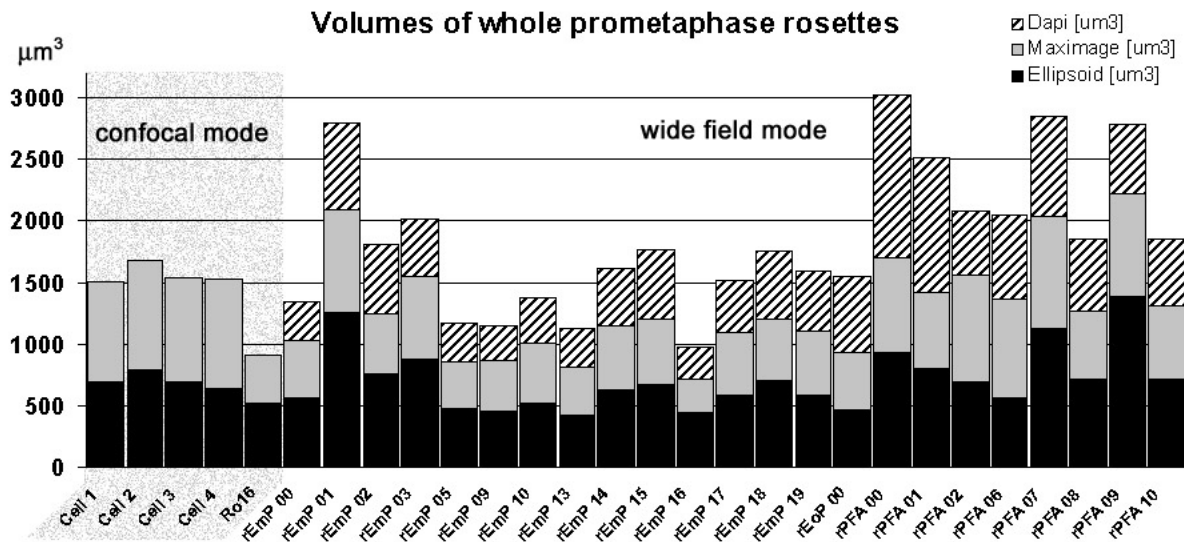


Abb. 3-46 Vergleich der gemessenen, bzw. berechneten Volumina ganzer Prometaphaserosetten. Die Volumina der 26 Rosetten sind auf der Ordinate, deren Namen auf der Abszisse angegeben. Da Dapi nur am Epifluoreszenzmikroskop aufgenommen werden konnte, fehlt dieser Balken bei den konfokalen Daten. „Maximage“ ist die Summe aller Hybridisierungssignale und „Ellipsoid“ das Volumen, berechnet aus den gemessenen Längen der Halbachsen.

Die Ergebnisse der Volumenberechnung sind in Abb. 3-47 zusammen mit einem Vergleich der Daten aus Heslop-Harrison et al. (1989) dargestellt. Die gemessenen Chromosomenvolumen wurden zum Dapi-Volumen (siehe oben) in Relation gesetzt, bzw. bei den konfokalen Bildern zu Maximage. Die mit *mfish3d* gemessenen relativen Chromosomenvolumen zeigten variable Beiträge mit hohen Standardabweichungen. Ein Trend von den großen zu den kleinen Chromosomen war jedoch erkennbar.

Die Volumina aus Heslop-Harrison et al. (1989) wurden aus EM-Bildern mitotischer Figuren von 10 fetalen Lungenfibroblastenkernen mit einer Schnittdicke von $0,1\mu\text{m}$ berechnet. Die nach Standardfixierung mit 5% Glutaraldehyd durchgeführte Dehydrierung durch eine Ethanolserie könnte in diesen Experimenten zu Fixierungsartefakten geführt haben. Die Autoren verglichen jedoch ihre Volumenangaben mit den Längenangaben der ISCN-Nomenklatur (ISCN 1985) und kamen dabei auf eine gute Übereinstimmung. Im Vergleich zu den hier bestimmten Werten, betrug vor allem bei den großen Chromosomen 1 bis 10 der Unterschied ein 2- bis 3-fach geringeres Volumen gegenüber den Literaturdaten (Abb. 3-47). Dies war vermutlich auf ein zu großes Gesamtvolumen der hier gemessenen Daten zurückzuführen (siehe vorige Seite).

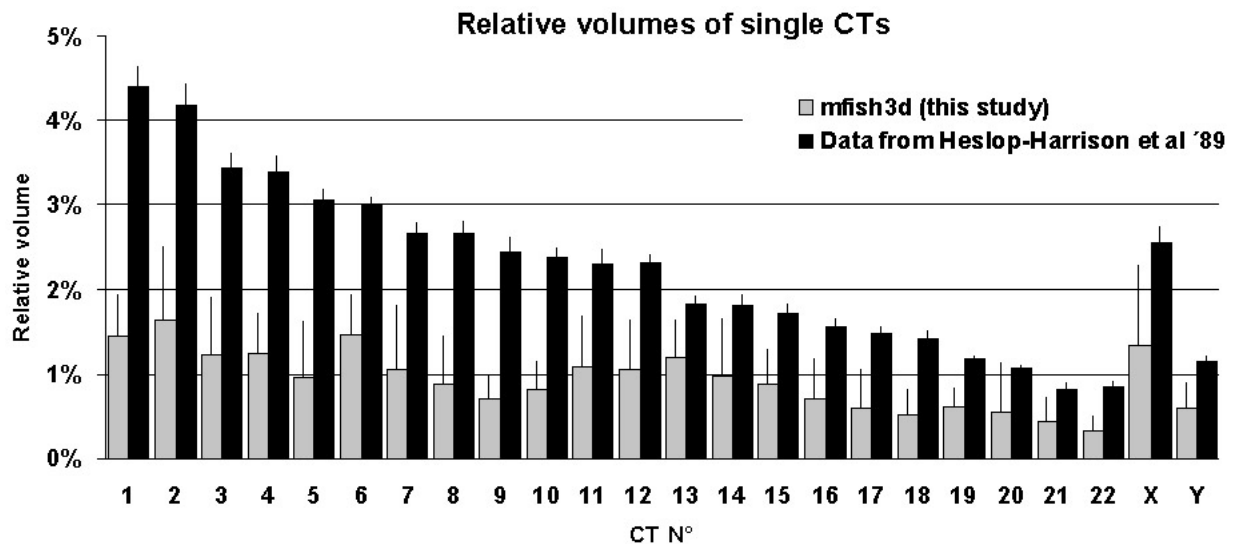


Abb. 3-47 Vergleich der Volumina der von mfish3d klassifizierten Chromosomen von Prometaphaserosetten mit denen aus der EM-Studie Leitch et al. (1994). Die Chromosomenvolumen wurden in Relation zum Dapi-Volumen, bzw. bei den konfokalen Daten zu Mamage gesetzt. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Obwohl der Trend der Volumina in den M-FISH Daten erkennbar ist (die nach ISCN (1985) großen Chromosomen haben auch ein größeres Volumen als die kleinen), gibt es „Ausreißer“ wie z. B. Chr. 6. Die Werte aus Heslop-Harrison et al. (1989) sind im Schnitt etwa zwei bis dreimal größer als die hier gefundenen.

3.5.3.4 Abstände zum Rosettenmittelpunkt

Histogramme

In Abb. 3-48 sind die Abstände der Chromosomen zum Mittelpunkt der Prometaphaserosette CT-CN analog den G0-Fibroblasten dargestellt. Auch hier war es so, dass die Chromosomen umso zentraler lagen, je kleiner sie waren. Zum Beispiel lag Chr. 1 in 81% der Fälle in den Klassen 0,7 - 1,0 (70 - 100% des Radius) und damit fast ganz außen. In der äußersten Klasse 1,0 nahm die Kurve wieder ab, da die Schwerpunkte großer Chromosomen nicht ganz am Rand zu liegen kommen können. Im Gegensatz zu Chr. 1 hatte die Häufigkeit des kleinen Chr. Y eine Verteilung, die vom Mittelpunkt bis zur Klasse 0,5 (0-50% des Radius) bereits 71% aller Schwerpunkte enthielt.

Streudiagramme

Eine anschaulichere Form der Darstellung wird in Abb. 3-49 gezeigt. Die Rosette wurde behandelt, wie eine zweidimensionale Fläche, wobei die z-Komponente außer Acht gelassen werden musste. Ein 3D-Streudiagramm zeigte keine wesentliche Abweichung von dem hier gezeigten 2D-Muster (Datei „3DStreudiagramm_AlleMediane.jpg“ auf der CDROM zu diesem Verzeichnis). Der durchschnittliche Achsendurchmesser der Rosetten betrug $d_x = 22,1\mu\text{m}$, $d_y = 11,6\mu\text{m}$ und $d_z = 5,8\mu\text{m}$. Am Beispiel der beiden Chromosomen 1 und Y konnte man gut erkennen, dass Chr. 1 weiter außen lag als Y (Abb. 3-49 a). Bei den beiden etwa gleich großen Chr. 18 und 19 wurde dieser radia-

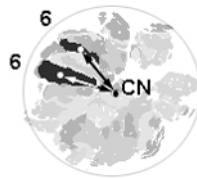
le Unterschied im Vergleich zu den G0-Fibroblasten nicht mehr gefunden (b). Die am weitesten innen liegenden Mediane (c) waren die kleinen Chr. 20, 21 und Y, am äußersten lagen die großen bzw. mittelgroßen Chromosomen 1, 3, 4, 9 und 13.

Signifikante Größenunterschiede

Für alle Kombinationsmöglichkeiten wurde analog den G0-Fibroblasten ermittelt, ob sie sich signifikant voneinander unterschieden. In den G0-Fibroblastenkernen wurde gefunden, dass etwa ab Chr. 11 ein radialer Unterschied zwischen den Positionen der großen und kleinen Chromosomen signifikant wurde (Tab. 3-7, S. 154). Bei Prometaphaserosetten zeigte der Signifikanztest, dass die Signifikanzgrenzen weiter in Richtung der kleineren Chromosomen verschoben waren (detaillierte Ergebnisse in der Tabelle „Signifikanz hom Abstände Rosetten.doc“ auf der CDROM zu diesem Verzeichnis). Ein Unterschied wurde hier erst ab Chr. 17 signifikant.

Radiale 3D-Abstände in Prometaphaserosetten

(a)



(b)

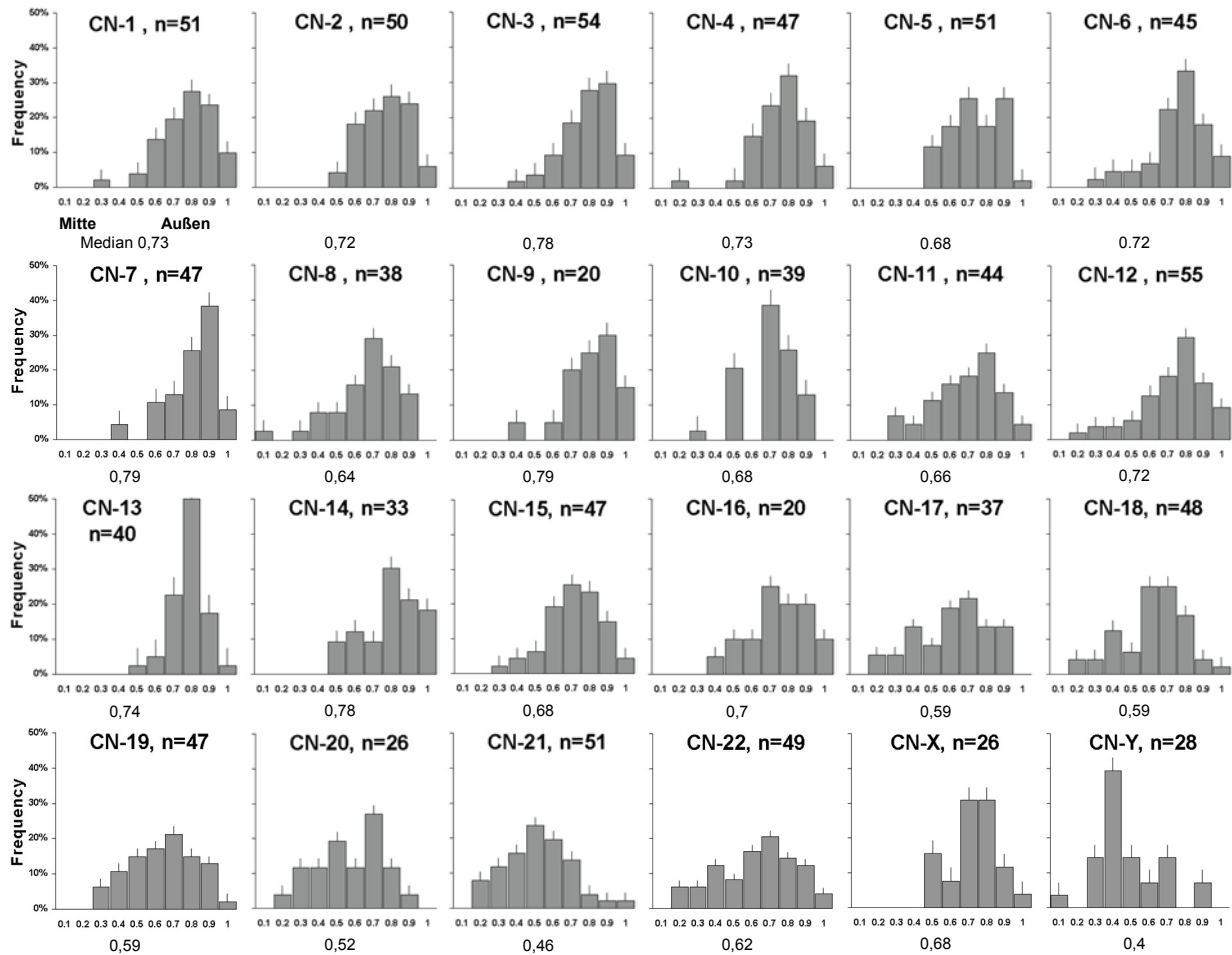


Abb. 3-48 Abstände der Chromosomen in Prometaphaserosetten zum Mittelpunkt. (a) Beispiele für die Datenerhebung aus den Bildern. Es werden die Abstände der beiden Chr. 6 zum Mittelpunkt der Rosette dargestellt. (b) Häufigkeiten der Schwerpunktabstände vom Mittelpunkt, normalisiert auf den Radius und anschließend in 10 Klassen eingeteilt, wobei z. B. die Klasse 0,1r die Abstände 0 - 10% des Radius beinhaltet. Die Fallzahlen n, sowie der Median sind angegeben. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Positionen aller Chromosomen in Prometaphaserosetten

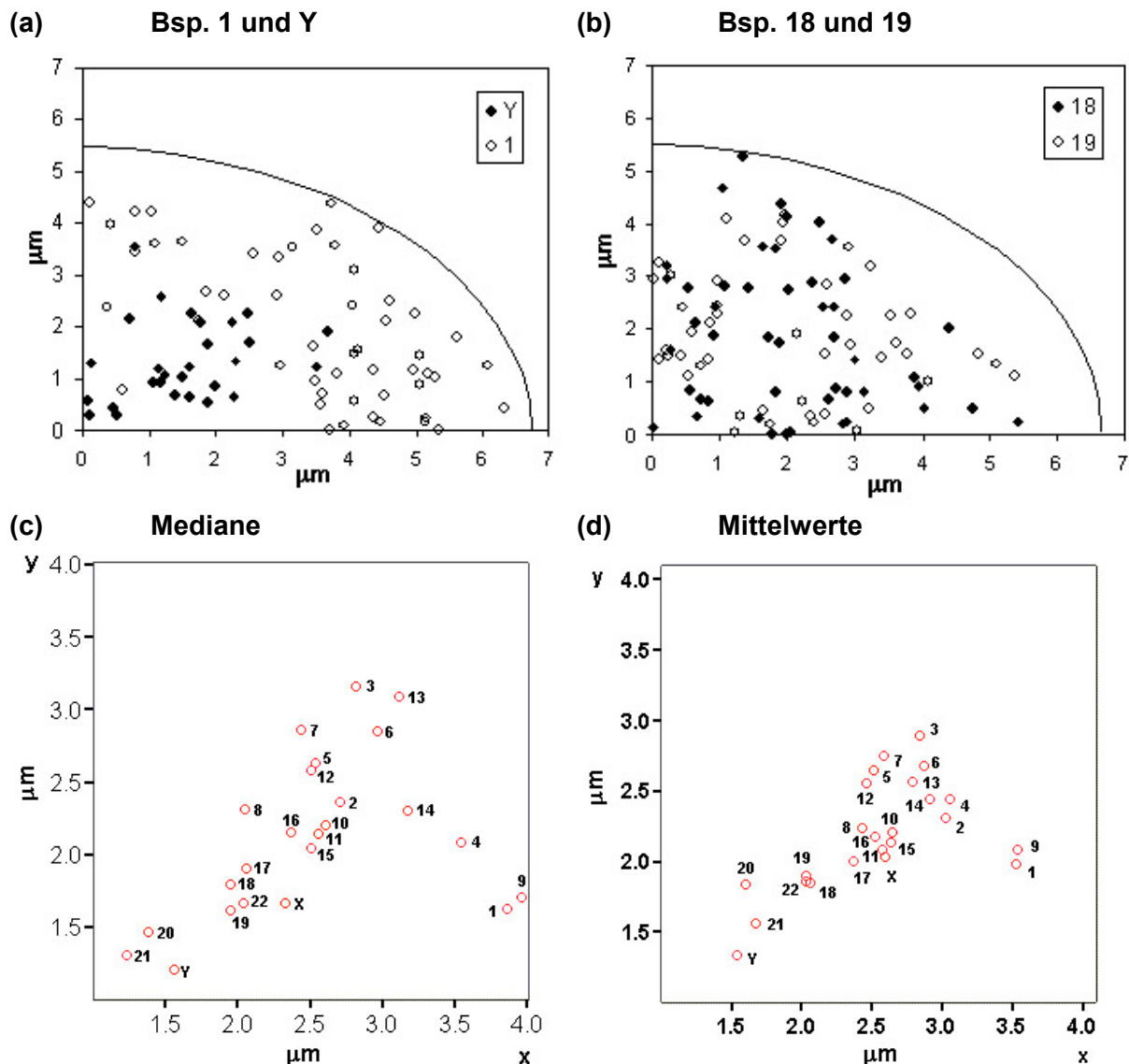


Abb. 3-49 XY-Positionen aller Chromosomen-Schwerpunkte in menschlichen Prometaphaserosetten. Die Koordinaten wurden gedreht, so dass die lange Achse mit der x-Achse übereinstimmt, auf einen durchschnittlichen Radius normalisiert und als Punkte im ersten Quadranten dargestellt. (a) Die meisten Y-Positionen sind weiter in der Mitte zu finden als die 1-Positionen. (b) 18- und 19-Positionen wurden sowohl innen als auch außen beobachtet. (c) Mediane und (d) Mittelwerte aller Chromosomenpositionen in der Rosette. Zur besseren Visualisierung wurden die Achsen nur von 0,5 – 4 μm skaliert.

3.5.3.5 Abstände der homologen Chromosomen zueinander

Aufgrund der kreisförmigen Gestalt der Rosetten sollte, je näher sich zwei homologe Chromosomen an der Mitte der Rosette befinden, ihr Abstand zueinander kleiner ausfallen. Weiter kann mit den Abständen der homologen Chromosomen eine mögliche Homologenassoziation untersucht werden. Wären die Abstände immer klein mit einer geringen Standardabweichung, so lägen die zwei Homologen nahe beieinander, was für eine Assoziation sprechen würde.

Histogramme

Die Häufigkeiten der Abstände der homologen Chromosomen wurden wieder als Histogramme dargestellt und sind detailliert in der Tabelle „Abstände der homologen Chr in Rosetten.doc“ auf der CDROM zu diesem Verzeichnis aufgelistet. Die Ergebnisse waren analog denen der G0-Fibroblasten. Alle Distanzhäufigkeiten der homologen Chromosomen zeigten sich normalverteilt (Shapiro-Wilks-Anpassungstest, $p > 0,01$) mit einer großen Standardabweichung. Dieses Ergebnis sprach gegen eine Homologenassoziation in Prometaphaserosetten.

Lagen die Chromosomen näher der Rosettenmitte (z. B. Chromosomen 20, 21, Y, siehe Abb. 3-48 vorige Seite), so waren auch ihre homologen Abstände geringer. Am deutlichsten war dieser Trend bei den Homologen des Chr. 20 sichtbar, die nur einen durchschnittlichen Abstand von 22% des Durchmessers hatten. Der Umkehrschluss, weit außen liegende Chromosomen wären auch immer weit voneinander entfernt, ist nicht gültig, denn die Anordnung kann an der Kernhülle variabel sein, von gegenüber bis benachbart. Bei zufälliger Nachbarschaft sollte sich eine Normalverteilung mit dem Mittelwert um 50% des Durchmessers ergeben, was auch der Fall war. Eine Ausnahme stellte das Chr. 1 dar, wobei der Mittelwert 0,37d eine extrem breitere Standardabweichung ($\pm 0,24d$) besaß.

Die Tatsache, dass bei einigen Chromosomen zwei Klassen prominent auftraten (z. B. bei Chr. 6 die Klassen 0,2d und 0,6d) bedeutet, dass die Schwerpunkte einerseits häufig nebeneinander, andererseits häufig im rechten Winkel zueinander lagen. Keine der Kurven wich jedoch signifikant von einer Normalverteilung ab, so dass diese Werte wahrscheinlich „Ausreißer“ darstellten.

3.5.3.6 Winkel der homologen Chromosomen zueinander

Der Winkel, den zwei homologe Chromosomenterritorien vom Mittelpunkt aus gesehen einschließen, ist ein Maß für die nachbarschaftliche Nähe. Die Winkel werden benützt, um herauszufinden, ob zwei homologe Chromosomen immer starr gegenüber angeordnet sind, so wie von Nagele et al. (1995) behauptet. In einem solchen Fall würde man erwarten, dass die homologen Chromosomen einen Winkel von etwa 180° haben.

Aus Tab. 3-9 geht hervor, dass dies nicht der Fall war: Alle Homologen schließen einen mittleren Winkel von $88,5^\circ$ ein, wobei die Spannweite von 5° bis 177° reicht. Zusammen mit der hohen Standardabweichung ist kein Hinweis auf eine starre Separation erkennbar.

Prometaphase rosettes						
Mean homologe separation						
Chr	n	Mean	Range			SD
1	24	70,3	10	-	164	55,4
2	23	79,1	14	-	172	50,4
3	26	81,1	16	-	176	45,7
4	23	91,2	5	-	176	50,8
5	23	81,2	8	-	164	46,4
6	21	80,3	11	-	175	54,7
7	22	104	10	-	175	54,7
8	16	103	18	-	156	47,8
9	11	113	25	-	177	46,3
10	17	79,8	12	-	166	41,9
11	20	101	9	-	172	55
12	27	109	11	-	173	55,5
13	18	67,2	12	-	174	46,7
14	14	83,9	8	-	151	42,6
15	21	106	11	-	171	49,9
16	15	92,4	21	-	140	43,1
17	15	80,5	9	-	150	36,7
18	21	93,8	29	-	174	48,7
19	21	91,5	14	-	163	48,5
20	12	47,2	8	-	151	45,4
21	24	90	14	-	170	52,5
22	23	97,9	26	-	172	41,2
X-Y	26	93,6	23	-	174	46,6

Tab. 3-9 *Winkel der homologen Chromosomen in menschlichen Prometaphaserosetten.*

3.5.3.7 Abstände der heterologen Chromosomen

Distanzen zwischen bestimmten heterologen Chromosomenpaaren könnten einen Hinweis für eine nachbarschaftliche Anordnung liefern. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass zwei Chromosomen enger beieinander sind, wenn sie in der Mitte der Rosette liegen. Die Assoziation solcher Chromosomen wäre dann die indirekte Folge einer nicht-zufälligen radialen Anordnung. Eine zusätzliche Analyse der Winkel würde helfen, direkte nachbarschaftliche Beziehungen aufzuklären.

MDS-Plot

Aus der Tabelle der heterologen Abstände konnte ein MDS-Plot erstellt werden, der eine „Landkarte“ der gefundenen Schwerpunkte darstellt. Durch Zahlensimulation verschiedener Möglichkeiten wurde herausgefunden, dass, würden alle Chromosomen in der Rosette eine starre Anordnung haben (1 neben 2 neben 3 neben 4 usw.), die Abfolge im MDS-Plot eine lineare Reihe von Chr. 1 bis Y wäre (siehe Datei „MDS_StarreVerteilung.jpg“ auf der CDROM zu diesem Verzeichnis). Simuliert man so eine Clusterung der akrozentrischen Chromosomen {13, 14, 15, 21, 22}, belässt die Abstände der restlichen Chromosomen aber starr, so ergibt sich ein Halbkreis, auf dem die Chromosomen

linear angeordnet sind, nur die akrozentrischen würden eine eigene Gruppe bilden („MDS_StarreVerteilung_Acro1.jpg“). Der MDS-Plot der experimentell gefundenen heterologen Positionen zeigt kein derartiges Verhalten (Abb. 3-50). Vielmehr ist die radiale Anordnung der kleinen und großen Chromosomen gut sichtbar. Eine nachbarschaftliche Beziehung ist im MDS-Plot möglicherweise zwischen den Chr. {1, 9} oder {2, 5, 13} zu erkennen. Erstere Paarung könnte aufgrund der heterochromatischen Blöcke (1q12, 9q12) zustande kommen, den die beiden Chromosomen tragen (Arnoldus et al. 1989). Gegen diese Assoziation spricht allerdings die weite Entfernung von Chr.16, das ebenfalls einen solchen Heterochromatinblock (16q12) enthält. Für die zweite Paarung gibt es keine Erklärung in der Literatur. Weil im MDS Plot der G0-Fibroblastenkerne (Abb. 3-42, S. 161) diese drei Chromosomen weit auseinanderliegen, handelt es sich hier eventuell um ein Artefakt.

MDS-Plot heterologer Chromosomen in Rosetten

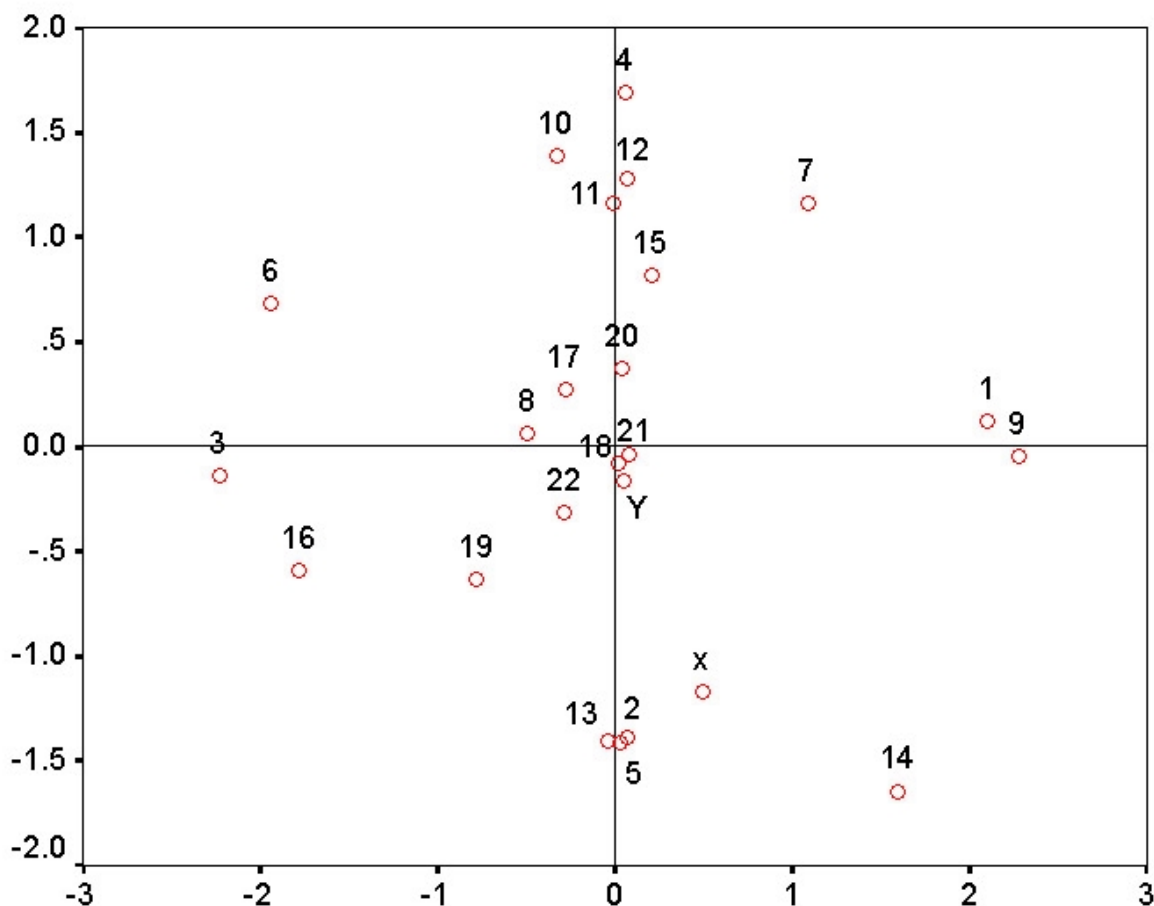


Abb. 3-50 Abstände heterologer Chromosomen in Prometaphaserosetten, dargestellt als MDS-Plot. Die Einheiten sind standardisiert und deswegen dimensionslos.

3.5.3.8 Winkel der heterologen Chromosomen zueinander

Ein letztes Maß für die Nachbarschaft zweier heterologer Chromosomen ist ihr Winkel zueinander. Das bereits zuvor gesagte, gilt auch hier: kleine Winkel lassen auf eine enge relative Nachbarschaft schließen, große auf eine Tren-

nung. Bei einer starren Anordnung dürfte die Standardabweichung der Winkel nur gering sein. Es wurden die Winkel aller 275 möglichen Kombinationen bestimmt. Die gemessenen Winkelabstände lagen zwischen 66°-111° im Mittel bei etwa 90°. Eine SD von $\pm 50^\circ$ lässt auf eine hohe Variabilität zurückschließen. Diese hohe Variabilität ist nicht vereinbar mit einer starren nachbarschaftlichen Anordnung der Chromosomen in den Prometaphaserosetten (detaillierte Ergebnisse als Entfernungstabelle auf der CDROM in der Datei „Winkel der heterologen Chr in Rosetten.doc“).

4. DISKUSSION

4.1 Chromosomen- und Zellpräparation, FISH Vorbehandlung

Synchronisation

Zellkulturen sind weit davon entfernt, „homogene“ Zellpopulationen zu darstellen. Eine Fibroblastenzellkultur enthält zwar nur einen Zelltyp, die einzelnen Zellen können sich jedoch in unterschiedlichen Zellzyklusstadien befinden (M, G1, S oder G2) oder den Zellzyklus verlassen haben (G0). Außerdem können Fibroblasten einer Kultur unterschiedlich stark gealtert sein. Da der mögliche Einfluß dieser Parameter auf die Zellkernarchitektur unbekannt war, sollte, soweit möglich, eine homogene Zellpopulation untersucht werden. Von den verschiedenen Methoden zur Synchronisation (Isoleucinentzug, Abschüteln mitotischer Zellen, Hydroxyharnstoff (Cao et al. 1991), Mimosin (Fauth 1998; Valdes et al. 2002), Serummangel) wurde die Konfluenz nach Serummangel verwendet (Nagele et al. 1999). Durch Wachsenlassen einer Fibroblastenkultur bis zur Konfluenz ist eine Synchronisation in der G0-Phase des Zellzyklus möglich, die dem ausdifferenzierten Stadium im Lebenslauf der Fibroblasten entspricht (Vishwanath et al. 1999). Mittels FACS-Analyse einer konfluenten und einer wachsenden Kultur konnte gezeigt werden, dass in einer konfluent gewachsenen Schale sich nahezu alle Zellen (~97%) in der G0-Phase befanden. In einer Diplomarbeit (Engelhardt 2001) konnte mit dem Antikörper pKi-67 (Bridger et al. 1998; Endl und Gerdes 2000) gezeigt werden, dass in solch einer Kultur kaum noch proliferierende Zellen vorhanden sind.

Fixierung

In zahlreichen Arbeiten zur Chromosomentopologie im Zellkern wurde eine Methanol-Eisessig (MAA) - Fixierung benützt (Spaeter 1975; Emmerich et al. 1989; Popp et al. 1990; Croft et al. 1999; Boyle et al. 2001). Die Hybridisierungssignale sehen etwas homogener aus als bei Paraformaldehyd (PFA) - fixierten Zellen. Im Vergleich zur PFA-Fixierung ist der Nachteil der Methode jedoch eine Schrumpfung der Zellkerne. Zusätzlich beschreiben Raap et al. (1986) einen 40%-igen DNA-Verlust nach der Hitze-Denaturierung MAA-fixierter Zellen und Bourgeois et al. (1981), dass im Zellkern 3D-Strukturen kollabieren, wenn sie an der Luft austrocknen.

Um solche Artefakte zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit eine wässrige PFA-Fixierung angewandt (Solovei et al. 2002b). Während der gesamten 3D-FISH Prozedur wurde ständig auf die Morphologie der Zelle bzw. des Zellkerns geachtet. Zellkerne, die als Folge einer zu langen HCl-Behandlung oder Überdenaturierung offensichtliche Artefakte zeigten, wie z. B. DNA-Ausbuchtungen ins Zytoplasma oder Halos um die Zellkerngrenzen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Die hier verwendeten Zellen wurden sorgfältig auf 3D-FISH-induzierte Artefakte untersucht (Solovei et al. 2002a). Während auf lichtmikroskopischer Ebene keine drastische Umverteilung des Chromatins nach 3D-FISH zu erkennen war, war die Ultrastruktur im EM stark beeinträchtigt. Es ergab sich eine netzartige Struktur mit einer Maschenweite von 80 - 200 nm, die zuvor nicht vorhanden war. Da aber im LM nach der 3D-FISH Prozedur keine Veränderung der Anordnung von Territorien beobachtet wurde, die zuvor in denselben Zellen im lebenden Zustand sichtbar gemacht worden waren, konnte davon ausgegangen werden, dass zumindest auf LM-Ebene Chromosomenpositionen im Zellkern ihre Gültigkeit und Reproduzierbarkeit besaßen.

In Popp et al. (1993) wird beschrieben, dass trotz unterschiedlicher Fixierungen die relativen Abstände zwischen Chromosom 18 Centromerregionen im Zellkern immer gleich blieben. Sogar in Zellen, die hypoton behandelt wurden, und bei denen folglich die Zellkernfläche in 2D um etwa das 2,5-fache größer war, blieben die Verhältnisse der gemessenen Distanzen vergleichbar. Ein ähnliches Ergebnis wird auch in Solovei et al. (2002a) berichtet. Im Zuge der Permeabilisierung schwoll der Zellkern leicht an, schrumpfte dann aber während der 3D-FISH Prozedur wieder, so dass er am Ende etwa 80% des Lebendvolumens einnahm. Die relativen Distanzen von FISH Signalen blieben jedoch erhalten, vermutlich weil durch das Formaldehyd eine gute Quervernetzung von Proteinen und DNA erreicht wurde.

Mit der 3D-FISH Methode konnte ein Standardprotokoll für die Erforschung der Zellkerntopologie erstellt werden. Die generelle Anwendung eines solchen sorgfältig getesteten Protokolls in den verschiedenen Arbeitsgruppen sollte einen Vergleich der Ergebnisse in der Literatur erleichtern.

4.2 Hybridisierung und Detektion

4.2.1 Verbesserung der Spezifität mit Hilfe von „repeat depleted“

Painting Sonden

Geläufige FISH-Protokolle für komplexe SONDENSÄTZE benötigen die Zugabe einer Kompetitor-DNA, meist C₀t-1 DNA. Im Laufe dieser Arbeit wurde ein verbesserter SONDENSATZ generiert, der einen verminderten Anteil an repetitiven Elementen besaß und keine Kreuzhybridisierungen mehr aufwies. Die Prozedur basierte auf der Subtraktion repetitiver Elemente aus PCR-amplifizierbaren chromosomalen Painting Sonden. Die bestehenden Protokolle (Chen-Liu et al. 1995; Rouquier et al. 1995; Craig et al. 1997) wurden verbessert und zum ersten Mal für alle 24 menschlichen Painting Sonden angewandt (Bolzer et al. 1999).

Im Rahmen des Auflösungsvermögens mikroskopischer und radioaktiver Techniken ist die Aussage gerechtfertigt, dass alle repetitiven Sequenzen aus den Painting Sonden entfernt wurden (Abb. 3-1, S. 89). Auch eine mehrfache Reamplifikation lieferte keinen erkennbaren Zuwachs dieser Elemente mehr.

Der im Laufe dieser Arbeit entstandene Satz an „repeat depleted“ Painting Sonden erhöhte die benötigte Flexibilität für das Design von M-FISH-Experimenten und führte zu einer deutlichen Verbesserung des Signal- zu Hintergrund-Verhältnisses. Er wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente für die Hybridisierungen an Lymphozyten und Fibroblasten verwendet, mit der Ausnahme der mit dem neu entwickelten 7-Fluor Mix durchgeführten Experimente an Fibroblasten. Der 7-Fluor Ansatz wurde parallel zu der „repeat depletion“ entwickelt und es wurden dabei noch normale Painting Sonden verwendet.

Alternative: Längere Preannealingphase

In der Literatur gab es einen Hinweis darauf, dass einige WCP-Sonden spezifisch hybridisieren, nachdem die Preannealingphase verlängert wurde (Wienberg et al. 1997). In den durchgeführten M-FISH-Experimenten wurde diese Möglichkeit ausgetestet. Sie führte jedoch zu keinem akzeptablen Resultat. Nach 3 h „preannealing“ wurden immer noch Kreuzhybridisierung und eine starke Fluoreszenz in vielen Centromerregionen beobachtet. Die unzureichende Qualität dieser Hybridisierungen ließ keine reproduzierbare Klassifikation zu.

4.2.2 Fluorochrome und Filter

Von entscheidender Bedeutung war die Wahl der Fluorochromkombination und die darauf abgestimmten Filtersätze. Es wurden bis zu sieben Fluorochrome plus DAPI verwendet, die im Spektrum teils sehr eng nebeneinander lagen. Das bedeutet, dass die Filter nur ein extrem kurzes Lichtband durchlassen durften und hohe Anforderungen an ihre Beschichtung gestellt werden (Reichman 2000).

Signalintensitäten

Die in dieser Arbeit erstmals durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Vielfarben 3D Darstellungen von CT zeigten, dass der Zellkern fast vollständig mit Chromosomen ausgefüllt war. Dagegen wurde in TEM Rekonstruktionen gezeigt, dass Chromatin nur etwa 50% des Zellkernvolumens einnimmt (Lopez-Velazquez et al. 1996; Visser et al. 2000; Solovei et al. 2002a). Die kürzlich entwickelten Verfahren zur *in vivo* Darstellung von CT zeigen, dass diese oft von Hohlräumen umgeben sind, und dass sich dieser Interchromatinraum bis ins Innere eines CT fortsetzen kann (Cremer T. et al. 2000; Solovei et al. 2000; Visser et al. 2000; Schermelleh et al. 2001).

Wie ist der Unterschied zwischen „fast vollständiger“ Ausfüllung im LM und „lediglich 50%-igem“ Volumen im TEM zu erklären? Erstens waren die Messungen des Volumens der CT und der Zellkerne sehr variabel, was durch die Schwellwertabhängigkeit der Messung zustande kam (ausführliche Diskussion siehe Kapitel 4.3.4, S. 186). Das bedeutet, dass wahrscheinlich ein zu großes Volumen im LM detektiert wurde.

Zweitens hängt die Intensität eines Fluorochroms von physikalischen Eigenschaften, wie dem Extinktionskoeffizienten oder der Quantenausbeute („quantum yield“) ab. Je schwächer ein Fluorochrom ist, desto mehr Belichtungszeit ist also notwendig, um die gleichen Signalintensitäten zu erreichen. Gleichzeitig streut das Signal eines intensiveren Fluorochroms mehr in andere Bildbereiche aus, und führt damit bei Volumenmessungen zu überhöhten Werten, weil Pixel mitgezählt werden, die eigentlich kein Signal beinhalten. Dass z. B. das mit Cy3.5 dargestellte Chr. 12 in etwa das gleiche Volumen wie das mit Fitc dargestellte Chr. 3 besaß (Abb. 3-47, S. 169), ist vermutlich auf die höhere Intensität des Fluorochroms Cy3.5 zurückzuführen. Im Idealfall hätten alle verwendeten Fluorochrome die gleiche Intensität besitzen sollen, was in der Praxis jedoch nicht erreichbar war.

4.2.3 M-FISH und ReFISH

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Hybridisierungsmethoden verwendet, die zwar beide einen kombinatorischen Ansatz verfolgten, jedoch technisch gesehen unterschiedlich waren. Mit beiden Methoden gelang es, alle Chromosomen im Fibroblastenzellkern aufzunehmen.

Während nach M-FISH lichtoptische Schnitte für alle Fluorochrome in einer Sitzung aufgenommen werden konnten, mussten bei ReFISH nach der 1. Hybridisierung zunächst eine Vielzahl an Zellkernen aufgenommen werden. Anschließend wurde das Präparat entdeckelt, gewaschen, denaturiert und mit dem komplementären Mix erneut hybridisiert (Müller et al. 2002). Die bereits aufgenommenen Zellen mussten auf dem Präparat wiedergefunden werden. Dies war mithilfe eines automatischen xy-Tisches und mit einem feinen Tischraster erreichbar. Dagegen war es praktisch unmöglich, eine wiedergefundene Zelle in exakt demselben Rahmen erneut aufzunehmen. Sie hatte im Vergleich zur ersten Aufnahme immer einen leichten lateralen Pixelshift. Deshalb wurde das beschriebene Alignment der beiden Aufnahmebildstapel nötig (Abb. 3-36, S. 148).

Vorteil dieser Methode war, dass nur drei Fluorochrome verwendet wurden und deshalb ein CLSM mit seinen drei Standard-Laserlinien zur Aufnahme verwendet werden konnte. Man erhielt konfokale Bilder, die aufgrund der Lochblende eine hohe Auflösung mit geringem „flaring“ besaßen, so dass die Klassifikationsergebnisse eindeutig wurden.

Farbspezifität

Im Kapitel 2.2.1 (S.46) wird die Farbauflösung („color discrimination efficiency“) für einzelne Markierungsschemata theoretisch hergeleitet. Dabei konnte der Grenzfall für ein komplettes Markierungsschema, in dem Zweier- und Dreiermarkierungen vorkommen berechnet werden, im Vergleich zu einem Schema, in dem nur Zweierkombinationen vorkommen.

Beispielsweise waren bei dem verwendeten ReFISH-Markierungsschema (Tab. 2-3, S. 53) Dreiermarkierungen erforderlich, um alle 24 Painting Sonden eindeutig zu markieren, denn mit zwei mal drei Fluorochromen sind nur 15

Zweiermarkierungen möglich (Gleichung 2-1, S. 46). Durch die erforderlichen Dreiermarkierungen verschlechterte sich die Auflösung im Farbsinn um 14% gegenüber einer ausschließlichen Zweiermarkierung (Gleichung 2-4, S. 47; Saracoglu et al. 2001). Für das Klassifikationsprogramm (und das menschliche Auge) war es schwieriger, eindeutige Kombinationen zu finden.

Dies spiegelte sich in der Zahl klassifizierter Territorien wider: In M-FISH Bildern konnten 83% aller Territorien zugeordnet werden, bei ReFISH sank der Wert auf 78% (Tab. 4-1, S. 188). Damit konnte der in Müller et al. (2002) beschriebene Wert von über 90% klassifizierter CT bei ReFISH-Bildern nicht erreicht werden.

Der Wert von ReFISH (78%) war jedoch nicht um die erwarteten 14% schlechter als M-FISH (83%), was vermutlich auf die höhere Auflösung des konfokalen Mikroskops im Gegensatz zum Weitfeldmikroskop zurückzuführen war. So hat vermutlich die optische Auflösungsverbesserung einer Verschlechterung der Farbauflösung entgegengewirkt.

4.3 3D-Mikroskopie und Dekonvolution

Während die konfokale Mikroskopie zu Beginn der Arbeit bereits etabliert war, mußten die Aufnahmen lichtoptischer Schnitte mit dem Weitfeldmikroskop und die anschließende Dekonvolution in unserem Labor erst etabliert werden. 3D-Vielfarben FISH wurde als eine Möglichkeit angesehen, dieses Feld zu erschließen und damit die höhere Auflösung bei Verwendung von sieben Fluorochromen zu nutzen, um die drei-dimensionale Chromosomentopologie im Zellkern zu ergründen.

4.3.1 Konfokale Vielfarben-Mikroskopie

Vielfarben-Ansätze

Mit den verwendeten CLSM konnten je drei Fluorochrome sichtbar gemacht werden: Fitc, Cy3 und Cy5. Mit einem kombinatorischen Ansatz wurde bereits gezeigt, dass es möglich ist, sieben Chromosomenterritorien im Zellkern von Hühnerfibroblasten gleichzeitig zu visualisieren (Habermann et al. 2001). Neben dem Ergebnis, dass eine radiale Anordnung der Makrochromosomen außen und der Mikrochromosomen innen gefunden wurde, zeigte sich dass die CT in der G1-Phase zweier Tochterzellen eine parallele oder anti-parallele Anordnung einnehmen.

Der in dieser Arbeit verwendete ReFISH Ansatz verband die Vorzüge des CLSM mit einer hohen Sondenanzahl, allerdings auf Kosten eines langwierigen Experiment- und Aufnahmeprozesses (Müller et al. 2002). Während der Aufnahme der 2. Hybridisierung stellte sich heraus, dass durchschnittlich 4 Schnittebenen ($\sim 1 \mu\text{m}$) weniger benötigt wurden, als bei den ersten Aufnahmen. Dies war ein Indiz dafür, dass der Kern durch die erneute Vorbehandlung geschrumpft war (Müller et al. 2002). Die Autoren geben für diese Schrump-

fung zwischen der 1. und 2. Hybridisierung einen Wert von 10% in z-Richtung und 5% in xy-Richtung an. Die Proportionen insbesondere der Territoriums-grenzen blieben jedoch gleich. Andere Experimente aus der Literatur demonstrierten ebenso, dass selbst bei einer leichten Schrumpfung die relativen Proportionen und Abstände von Hybridisierungssignalen gleich blieben (Popp et al. 1990; Solovei et al. 2002b). Das durchgeführte Alignment (mit dem Programm *correlator.cc* siehe Abb. 3-36, S. 148) zwischen beiden Bildstapeln glich die Folgen der Schrumpfung nachträglich wieder aus.

Leica TCS SP

Eine Neuentwicklung zur Zeit der Experimentdurchführung war das CLSM Leica TCS SP. Es verwendet keine Filter, sondern spaltet das emittierte Licht über ein Prisma auf (für einen Vergleich mit anderen Systemen siehe Zucker und Price, 2001). Mittels eines verstellbaren Schlitzspalts kann man das Licht bestimmen, das auf den Photomultiplier treffen soll. Eine Überlegung dieser Arbeit war, ob man damit mehr als die üblichen drei Fluorochrome anregen und über einen kombinatorischen Ansatz sogar alle 24 menschlichen Chromosomen sichtbar machen könnte. Es stellte sich jedoch heraus, dass keine Diskriminierung zwischen Cy3 und Cy3.5, bzw. zwischen Cy5 und Cy5.5 erreicht werden konnte.

4.3.2 Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskopie

CCD-Kamera

Ein Vorteil gegenüber konfokalen Geräten ist die bessere Lichtausbeute durch die CCD-Kamera, da sie viel sensitiver als ein Photomultiplier ist. Dadurch können die Expositionszeiten herabgesetzt, und ein Ausbleichen vermieden werden (Agard et al. 1989).

Partiell konfokaler Effekt

Schließt man die Leuchtfeldblende so weit wie möglich um den aufzunehmenden Zellkern herum, so tritt ein partiell konfokaler Effekt ein (Hiraoka et al. 1990). Da dies gleichzeitig den Vorteil hatte, dass Zellen in anderen Bereichen nicht bestrahlt wurden und damit auch nicht ausbleichen konnten, wurde die Beleuchtungsblende immer so weit wie möglich geschlossen.

Dekonvolution

Kennt man die PSF (point spread function) des zur Bildaufnahme verwendeten Objektivs, kann mittels Dekonvolution der Anteil der „out-of-focus“ Fluoreszenz in jeder Bildebene nachträglich eliminiert und so die Qualität der Bilder erhöht werden. Deshalb gehen 3D-Epifluoreszenzmikroskopie und Dekonvolution Hand in Hand (siehe nächster Abschnitt). Der geradlinigste dieser Bildverarbeitungswege benutzt die Informationen der beiden in z-Richtung benachbarten Ebenen, um die mittlere Ebene zu korrigieren (Agard et al. 1989). Auf die-

se Weise wurden bereits 1983 alle sechs Chromosomen im polytären Zellkern von *Drosophila* aufgenommen und rekonstruiert (Agard und Sedat 1983; Hochstrasser et al. 1986).

Nipkow-Scheibe und Programmable Array Microscope (PAM)

Zwei neue Entwicklungen versuchen die Vorteile des konfokalen und eines Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskops zu vereinen. Das erste Gerät kann eine konfokale Nipkow-Scheibe in den Strahlengang eines normales Epifluoreszenzmikroskop einschwenken (Kozubek et al. 2001). Eine Quecksilberlampe sorgt für die Beleuchtung und eine CCD-Kamera für die Aufnahme. In der erwähnten Veröffentlichung wurden allerdings nur die drei Standardfilter verwendet und kein kombinatorischer Ansatz verfolgt.

Das zweite Gerät, das „Dual-path programmable array microscope“ (PAM), ist technisch noch anspruchsvoller und befindet sich erst im Prototypenstadium (Heintzmann et al. 2001). Bei seinem Einsatz werden zwei Bilder pro Ebene aufgenommen. Das eine enthält das Licht aus der Objektebene, das andere enthält das „out-of-focus“-Licht. Dies wird durch ein neues Gerät, den „spatial light modulator“, ermöglicht. Er besteht aus vielen kleinen Spiegeln, die in zwei Richtungen ausgelenkt werden können. Das erste Bild entspricht dem eines konfokalen, das zweite dem eines Weitfeldbildes. Letzteres wird nach der Aufnahme entfaltet und trägt nach einem Abgleich mit dem ersten Bild zu dessen Auflösungsverbesserung bei.

4.3.3 Dekonvolution

Die unterschiedlichen Eigenschaften konfokaler und Weitfeldsysteme sind in der Theorie bekannt, in der Praxis gibt es jedoch kaum Vergleiche zwischen diesen beiden Aufnahmemöglichkeiten. Deswegen wurden Softwarepakete von drei Herstellern (*Huygens* von SVI, *KS400* von Zeiss Vision und *TILLVISION* von T.I.L.L. Photonics) und eine nicht-kommerzielle Software (*axialrec* von R. Heintzmann, Göttingen) untereinander verglichen. Die Ergebnisse der Dekonvolution mit simulierten Territorien, Bildern mit aufgenommenen „beads“ und wirklichen Territorien wurden dargestellt. Mit einem umfassenden Betrachtungsversuch zur Qualität der gewonnenen Bildstapel konnten die besten Parameter der jeweiligen Dekonvolution gefunden werden. Dabei stellte vor allem die Modellsimulation einen eleganten Ansatz für eine objektive Beurteilung dar, weil das Originalbild a priori bekannt war. Dadurch wurde es überhaupt erst möglich, den Gütefaktor „Relative Energy Regain“ (siehe unten) zu verwenden, denn dieser Wert wird berechnet aus der Differenz des entfalteteten Bilds von dem Originalbild.

„Visual Inspection“

Ein auf dem visuellen Eindruck basierender Vergleich wurde von L. Schäfer (Carl Zeiss Vision, Imaging Consultant) durchgeführt und ist auf der CDROM in der Datei „articles\www_Ischafer_VergleichDCV\Ischafer.html“ zu finden.

Die Dekonvolution wurde dort mit dem Programm *KS400* (Zeiss Vision) durchgeführt. Die Voraussetzungen der Eingangsbilder waren jedoch nicht die gleichen wie hier. Erstens wurde das Bild mit einem konfokalen Mikroskop im Weitfeldmodus aufgenommen, d. h. die Anregung fand mit einem Laser statt und nicht mit einer Quecksilberlampe. Zweitens zeigte das Ausgangsbild längliche Strukturen (Aktin) und nicht wie hier eher globuläre Territorien.

Schäfer kam bei seinem auf subjektiven Gesichtspunkten basierenden Vergleich zu dem Schluß, dass der Maximum Likelihood Algorithmus die besten Dekonvolutionsergebnisse lieferte. Auch in dem hier angestellten Vergleich war dieser Algorithmus derjenige, welcher die besten Resultate innerhalb dieses Programmpakets erbrachte (S. 98 bis S. 106).

Gütefaktoren (Figures of merit)

Ein anderer Ansatz, die Bilder zu vergleichen besteht darin, Gütefaktoren (Figures of Merits, FoM) zu erstellen (Markham und Conchello 1997; Kriete et al. 2001). Ein nützliches Kriterium ist hierbei die „Fehlerenergie“, definiert als die Quadratdifferenz aller Pixel des entfalteten Bildes minus dem Originalbild (Holmes 1988). Um die Bildqualität bestimmter Objektfrequenzen zu beurteilen, wurde dieser Faktor weiter modifiziert in den „Relative Energy Regain“ (RER; Heintzmann 1999). Der berechnete Wert liegt bei „1“ für eine perfekte räumliche Rekonstruktion und beträgt „0“ für keine Veränderung zum Ursprungsbild. Artefakte können leicht erkannt werden, wenn der Wert in den negativen Bereich abgeleitet (siehe Abb. 2-7, S. 71). Für die Skalierung der x-Achse der RER-Graphen wurde eine Faustregel angewandt: zur Bestimmung des Wertes „1“ (= Grenzfrequenz; dort, wo zwei Punkte gerade noch als zwei Punkte aufgelöst werden können; der RER-Wert muss an diesem Punkt im Graphen „Faltungsbild minus Originalbild“ den Wert „0“ annehmen) wurde der erste Nullwert des OTF-Graphen verwendet. Völlig korrekt wäre eine Berechnung dieses Nullwerts mithilfe der Nyquist-Formel (Gleichung 1-1, S. 33). Der manuell bestimmte Wert ist aber eine praktische Näherung und die theoretische Berechnung würde nichts am Aussehen der Graphen selbst ändern, sondern nur die x-Skala etwas verschieben.

Beste Parameter

Verschiedene Eingangsbilder wurden mit den unterschiedlichen Softwarepaketen entfaltet und die jeweils besten Parameter herausgefunden. Die besten Ergebnisse zusammen mit einer guten Benutzerfreundlichkeit ergab das *Huygens* System, weshalb es sich im Lauf der Zeit als Standarddekonvolution etablierte. Zwei Arten dieser Dekonvolution führten mit folgenden Parametern zu den besten Ergebnissen:

- (1) *Huygens* MLE-Algorithmus, Max N° of Iterations 100, SNR 200
- (2) *Huygens* ICTM-Algorithmus, Max N° of Iterations 12, SNR 200
(SNR: signal to noise ratio)

Der ICTM-Algorithmus ist der schnellere von beiden, weshalb dieser Algorithmus in dieser Arbeit bevorzugt verwendet wurde.

Die Dekonvolution mit den anderen Softwarepaketen brachte durchwachsende Ergebnisse (siehe Kapitel 3.3, S. 97). Teilweise erreichten die durch *KS400* und *axialrec* entfalteten Bilder eine ebenso gute Qualität wie zuvor *Huygens*. Bei anderen Bildern war jedoch die Restauration aus unklaren Gründen schlechter, so dass die Reproduzierbarkeit nicht mit der nötigen Sicherheit gegeben war. Bei der Dekonvolution mit dem Programm *TILLvisION* wurden helle Linien konzentrisch um die Objekte herum beobachtet, und unterschiedliche Grauwerte in den Bildern führten zu einem Flackern, wenn man in der z-Richtung durch den Bildstapel navigierte (Abb. 3-13, S. 106). Obwohl die Restauration von „beads“ sogar besser zu sein schien als mit *Huygens*, konnten die genannten Artefakte auch nach Rücksprache mit der Firma nicht ausgeräumt werden.

CT-Positionen vor und nach der Dekonvolution

Befinden sich die Territoriumsschwerpunkte vor und nach der Dekonvolution an der gleichen Stelle? Theoretisch sollten sich die Schwerpunkte für die einzelnen CT vor und nach der Dekonvolution kaum ändern, da die Restauration hauptsächlich über- und unterhalb der Fokusebene stattfindet. Ein Vergleich mit fünf Painting Sonden in Lymphozyten zeigte, dass Territorien in konfokalen Bildern und in Weitfeldbildern mit nachgeschalteter Dekonvolution tatsächlich kaum Unterschiede in der Verteilung ihrer Schwerpunkte besaßen (Abb. 3-30, S. 138). Damit könnte die Meinung entstehen, die Dekonvolution sei im Hinblick auf die Bestimmung der Schwerpunkte überflüssig. Dies ist jedoch nicht der Fall, da *mfish3d* nur mit entfalteten Bildern eine sinnvolle Klassifikation lieferte. Bei nicht-entfalteten Bildern wurden meist zu wenige und zu große Territorien klassifiziert. Die Schwerpunkte entfalteter Vielfarben-Bilderstapel konnten daher Aufschluss über die Anordnung der Chromosomen im Zellkern liefern.

Feinstrukturen

Die Dekonvolution mit dem *Huygens* MLE-Algorithmus zeigte bei Bildern zweier Veröffentlichungen (Verschure et al. 1999, dort Fig. 3; Habermann et al. 2001) verbundene schnur-ähnliche Feinstrukturen, die bei anderer Dekonvolutionssoftware nicht erkennbar waren. Diese hier ebenfalls beobachtete Besonderheit scheint eine Eigenart der *Huygens*-Software zu sein, und es könnte sich um ein Artefakt handeln. Weitere Untersuchungen zu diesem Phänomen wären angebracht.

Die Dekonvolution von Weitfeldbildern zeigte bei den durchgeführten Untersuchungen ein weites Spektrum an Ergebnissen, je nach Hersteller und eingestellten Parametern. In dem sich rasch entwickelnden Feld der Dekonvolution sind immer weitere Verbesserungen zu erwarten (Schaefer et al. 2001). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass vergleichende Untersuchungen zur Dekonvolution, die mit aktueller Software arbeiten, schnell veraltet sein werden.

4.3.4 Schwellwerte und Volumenberechnungen

Es ist möglich, genomisch große und kleine Sonden aufgrund ihrer Signalgröße im Kern zu unterscheiden (van Dekken et al. 1989). Bei Painting Sonden allerdings sind die Unterschiede vor allem bei Chromosomen der gleichen Größengruppe (ISCN 1985) zu gering, um sie allein aufgrund der Größe richtig klassifizieren zu können. Hätten CT ein Volumen proportional zu ihrer genomischen Größe, so könnte durch eine Volumenmessung ein zusätzlicher Klassifikationshinweis erhalten werden.

Um eine korrekte Volumenberechnung durchzuführen, müsste ein geeigneter Schwellwert gesetzt werden. Das Problem eines „geeigneten Schwellwerts“ taucht in der Literatur immer wieder auf und wurde durch den Vergleich mehrerer Schwellwerte eher umgangen als gelöst (Bischoff et al. 1993; Cremer T. et al. 1993; Eils et al. 1996). Aus konfokalen lichtoptischen Schnitten weiblicher Zellkerne wurden die beiden X-Territorien in einem Kanal rekonstruiert und deren Volumina gemessen (Eils et al. 1996). Der Schwellwert wurde so gesetzt, dass kein Hintergrund mehr zu sehen war, die beiden CT aber eindeutige Einheiten bildeten. Daraus ergab sich ein Volumen für das aktive X (analog für das inaktive X) von $34,5 \mu\text{m}^3 \pm 19,9 \mu\text{m}^3$ (MW \pm SD). Maß man hingegen das Volumen beim „Full-Width at Half-Maximum“ (FWHM; in diesem Fall Grauwert 128), so ergab sich nur noch ein Betrag von etwa $9 \mu\text{m}^3$, also 1- bis 6-mal kleiner. Diese Spanne wäre für die hier durchgeführte Untersuchung viel zu groß für eine verlässliche Volumenbestimmung.

Die Ergebnisse der mit dem Klassifikationsprogramm *mfish3d* erzielten Messungen zeigten zwar, dass das Volumen der größeren Chromosomen zu den kleineren hin tendenziell abnahm (Abb. 3-47, S. 169), jedoch waren z. B. die Chr. 3 Territorien genauso groß wie die Chr. 12 Territorien, obwohl nach den genomischen Kenndaten ein Größenunterschied von $221 \text{ Mb} / 142 \text{ Mb} = 1,55$ vorhanden war (The Genome International Sequencing CONSORTIUM 2001b). Die Schwellwertabhängigkeit der gemessenen Voxel in den verschiedenen Kanälen tritt hier deutlich zu Tage. Es fehlt ein zuverlässiges Kriterium für die Wahl desjenigen Schwellwerts, der zum richtigen Volumen führt. Dies führt zu erheblichen Schwierigkeiten, wenn das Volumen eines CT ins Verhältnis zum DAPI-Volumen des Zellkerns gesetzt werden soll (Abb. 3-47, S. 169). Dann müssen zwei Schwellwerte gewählt werden, einen für den Kanal des Territoriums, und einen für den DAPI-Kanal. Überschätzt man das DAPI-Volumen, bekommt man für die relativen Volumina zu kleine Werte, was vermutlich hier der Fall war. Eine Alternative wäre eine automatische Schwellwertbestimmung für jeden Kanal nach der Methode, beschrieben in Cremer M. et al. (2001).

Volumina der Prometaphaserosetten im Vergleich mit Literaturdaten

Es wurde zusätzlich versucht, die Volumenmessungen der Chromosomen in den Prometaphaserosetten mit Daten aus der Literatur zu vergleichen.

Im Vergleich zu den hier gemessenen Gesamtvolumina ($550 - 700 \mu\text{m}^3$; siehe Abb. 3-46, S. 168) lag der Wert in der Arbeit von Heslop-Harrison et al.

(1989) im Mittel bei $92\mu\text{m}^3$ und war damit 5- bis 7-mal kleiner. Erklären könnte man dieses Phänomen mit dem „flaring“ starker Fluorochrome, wie Cy3.5. Der Begriff beschreibt das Ausstrahlen eines Fluorochroms in benachbarte Bereiche. Das „flaring“ trägt zur Vergrößerung des gemessenen Volumens bei und ist von Fluorochrom zu Fluorochrom unterschiedlich.

Die Ergebnisse der relativen Chromosomenvolumina wurden mit den Daten von Heslop-Harrison et al. (1989) verglichen (Abb. 3-47, S. 169). Es zeigte sich, dass das relative Volumen überall deutlich kleiner waren, als in der EM-Studie. Gründe für diese Diskrepanz könnten sein: (i) unterschiedliche Fixierung, (ii) unterschiedliches Zellzyklusstadium, (iii) Überschätzung des DAPI-Volumens oder (iv) Unterschätzung der Territorien durch *mfish3d*.

Die gemessenen Volumina konnten auch nicht mit genomischen Kenndaten in Einklang gebracht werden (Morton 1991; The Genome International Sequencing CONSORTIUM 2001b; Venter et al. 2001). Die aus den Megabasen berechneten relativen Chromosomengrößen hatten Beträge zwischen 8,5% (Chr. 1) und 1,4% (Chr. 21), was weit über den in dieser Arbeit (1,5% bis 0,4%), aber auch noch über denen aus Heslop-Harrison et al. (1989) (4,5% bis 0,8%) lag. Es war daher nicht möglich, aus den genomischen Daten in Mb auf das relative Volumen im Zellkern zurückzuschließen.

In einer an Zellkernen von Neutrophilen durchgeführten Arbeit wurde betont, dass die Größen der Territorien nicht proportional zur Chromosomenlänge waren (Aguiles-Sanchez et al. 1997). Es kann darüber spekuliert werden, ob jedes Chromosom in seinem Packungsgrad je nach Aktivitätszustand seiner Gene individuell variiert. Damit liessen sich die „Ausreißerwerte“ (z. B. Chr.6, 10 - 15 in Abb. 3-47, S. 169) erklären.

Aufgrund all dieser Überlegungen wurden die Volumina der CT nicht weiter in die Auswertung miteinbezogen, sondern nur ihre Schwerpunkte als verlässliches Maß für die Position der Chromosomen im Zellkern verwendet.

4.4 Klassifikation mit *mfish3d*

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Versuch unternommen, eine simultane Klassifikation aller Territorien im Zellkern durchzuführen. Bei Metaphasechromosomen sind solche Klassifizierungen in Karyotypen bereits gut etabliert (Garini et al. 1999; Roberts et al. 1999; Azofeifa et al. 2000; Saracoglu et al. 2001). Im Zellkern gestaltete sich die Klassifikation wesentlich komplizierter, da Form und Ausdehnung der Territorien sich nicht so wie bei Metaphasechromosomen bestimmen liessen. Die dichte Lage der CT neben- und übereinander, trägt zu Fehlermöglichkeiten in der Klassifikation bei, die bei normalen Metaphasespreitungen mit gut getrennten Chromosomen vermieden werden können.

Fehleranalyse

Es war interessant, ob Klassifikationsfehler vorkamen, und von wem sie gemacht wurden (*mfish3d* oder Experimentator). Das Programm *mfish3d* benö-

tigte für korrekte Ergebnisse die richtigen Parameter (*angle*, *background*, *min-size*; zur Definition siehe Kapitel 2.8.2, S. 73), die für jede Aufnahmeserie neu herausgefunden werden mussten. Kritisch war diesbezüglich der Überlappungsbereich der CT, denn hier konnte es zu falschpositiven Klassifikationen kommen (siehe Kapitel 3.4.1, S. 124). Die Messung ergaben, dass Dreiermarkierungen möglichst zu vermeiden waren, um nicht zu großen Überlappungsbereichen zwischen den Markierungen zu führen (Tab. 3-4, S. 126). Dies hatten auch bereits theoretische Überlegungen zur Farbauflösung nahe gelegt (siehe S. 46).

Waren die besten Parameter für *mfish3d* zur Klassifizierung einer Experimentserie herausgefunden, wurden die Ergebnisse mit den Originaldaten verglichen. Dieser retrospektiver Vergleich mündete in einen Bestimmungsschlüssel, der in Kapitel 2.8.4 (S. 76) erklärt ist. Dabei kam es vor, dass eine *mfish3d* Klassifizierung als falsch eingeschätzt, und durch eine *visuelle* Klassifizierung ersetzt wurde. Der Anteil, den *visuelle* und *mfish3d* Klassifizierungen insgesamt hatten, ist in Tab. 4-1 dargestellt. Im Weitfeldmodus wurden insgesamt 1426 CT ausgewertet, wovon 55% sowohl mit dem Programm *mfish3d* als auch bei der anschließenden Betrachtung der Originalbilder *visuell* eindeutig zugeordnet werden konnten. Von den übrigen wurden weitere 21% entweder automatisch oder *visuell* erkannt. Ein kleiner Anteil aller CT (7%) konnte aufgrund der Größe und der Lage als zwei benachbart liegende Homologe identifiziert werden. Insgesamt wurden auf diese Art 83% der CT klassifiziert. Die Zahlen waren bei den konfokalen Daten ähnlich, mit dem Unterschied, dass *visuell* mehr CT klassifiziert wurden (39%) und der Anteil, bei dem keine Klassifikation erfolgreich war, auf 22% anstieg. Beides lag daran, dass gelegentlich noch Hybridisierungssignale aus der 1. Hybridisierung in der zweiten vorhanden waren. Das Programm *mfish3d* ordnete diesen Regionen dann eine falsche Farbe zu, obwohl aus den Originalbildern eine eindeutig andere Kombination zu erkennen war.

Aufnahme- modus	Anzahl aus- gewerteter Kerne / CT	Klassifikationserfolg				Keine Klassifika- tion erfolg- reich
		CT klassifi- ziert: <i>mfish3d</i> UND <i>visuell</i>	ENTWEDER <i>mfish3d</i> ODER <i>visuell</i>	Aufgrund der Größe und Lage <i>visuell</i> unterschie- den	Summe	
Weitfeld	31 / 1426 100%	788 55%	307 21%	95 7%	1190 83%	236 17%
Konfokal	23 / 1059 100%	349 33%	410 39%	67 6%	826 78%	233 22%

Tab. 4-1 Klassifikationsvergleich zwischen *mfish3d* und manueller Zuordnung aus den Fibroblastendaten. Es wurden immer nur *mfish3d*-Bilder mit den Originalbildern verglichen, nie umgekehrt. D. h. eine manuelle Klassifikation fand erst nach der automatischen statt, was einen Einfluss nicht ganz ausschloss. Der Anteil nicht klassifizierbarer Territorien war bei den konfokalen Daten etwas höher.

Wieviel von den als richtig klassifiziert eingestuften Territorien tatsächlich falsch waren, lässt sich nicht einfach abschätzen. Es wurde durch Mehrfachkontrolle versucht, falsch Positive so gering wie möglich zu halten. Einen Hinweis auf die Fehlerrate lieferten die Ergebnisse der sequenziellen Hybridisierung zur Kontrolle der Schwerpunktpositionen (Kapitel 3.5.2.1, S. 141). Wenn in einem M-FISH Experiment beide CT pro Chromosom und Zellkern klassifizierte wurden, konnten diese in 96% der darauffolgenden Einzelhybridisierungen bestätigt werden (Fall c). Geht man folglich von einer Fehlerrate von 4% aus, wurden von den 2016 klassifizierten Regionen etwa 80 falsch klassifiziert. Anders gesagt, es wurden pro Chromosom im Mittel 43 Territorien identifiziert, wovon ein bis zwei falsch sein könnten.

Aus den Experimenten zur Positionskontrolle konnte auch der Grad geometrischer Abweichung der Schwerpunktskoordinaten festgestellt werden (Abb. 3-33, S. 144). Es ergab sich eine Differenz der Schwerpunkte von maximal 1,3 µm. Viele Werte schwankten um den Nullpunkt. Dies war ein starker Hinweis dafür, dass die Klassifikation mit *mfish3d* aus M-FISH und ReFISH-Bildern korrekte Koordinaten lieferte.

Verbesserungsmöglichkeiten

- Als Klassifikationsergebnis kamen neben den „richtigen“ Territorien auch kleine Regionen vor, die zufällig dieselbe Kombination besaßen und den Eindruck erweckten, sie würden in mehr als zwei Regionen des Zellkerns auftauchen. Könnte man dem Programm die maximal mögliche Zahl der Regionen pro Falschfarbe eingeben (z. B. „2“ für jedes Autosom und die beiden X Chromosomen in weiblichen Zellen, „1“ für die Geschlechtschromosomen X und Y in männlichen Zellen), so würde dies die Auswertung einfacher gestalten. Allerdings müsste diese Eingabe flexibel zu handhaben sein, damit das Programm auch für die Auswertung einer unbekanntesten Konstellation in Zelllinien mit numerischer Chromosomenaberration oder Translokationen brauchbar wäre. Analog Metaphasekaryogrammen würde so eine „3D-Karyotypisierung“ in den Bereich des Möglichen kommen.
- Zur Markierung der Zellkerngrenzen wäre eine Lamin-Antikörperfärbung unter Umständen besser geeignet, als eine Färbung der Zellkern-DNA mit DAPI, weil die Ränder schärfer abgegrenzt werden würden (Paddy et al. 1990). Da aber ein Lamin-AK mit einem UV-Fluorophor zur Zeit der Experimente nicht verfügbar war, wäre ein weiterer Kanal im sichtbaren Bereich für diese Gegenfärbung benötigt worden.
- Bei der Erstellung des Markierungsschemas sollte vermieden werden, dass ähnlich große Chromosomen eine ähnliche Kombination haben. So ist unter Umständen durch Größenunterschiede ein Klassifikationsergebnis erreichbar, selbst wenn ein Kanal ausfallen sollte. Dieses Verfahren bleibt jedoch solange schwierig, bis die Volumina der CT genau beurteilt werden können.
- Alle weiterführenden Berechnungen wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel durchgeführt. Eine vollautomatische Kenndatenberechnung bereits im Programm *mfish3d* würde zu erheblicher Zeitersparnis und geringerer Fehleranfälligkeit durch den Datentransfer führen. Zum Beispiel berechnet

das Programm *3DLP* (Nomura et al. 1996) alle geometrischen Eigenschaften markierter Objekte in mikroskopischen Bildern im 3-dimensionalen Raum automatisch.

- Einer Verbreitung der hier entwickelten Vielfarbentechniken müsste eine weitere Vereinfachung und Automatisierung vorangehen. In Bezug auf die Aufnahme gibt es Ansätze mit Bilderkennungssystemen, die beispielsweise über Nacht ein gesamtes Präparat aufnehmen können (Piper et al. 1994; Huber et al. 1998). Da vor allem in der Krebsforschung Zellen im Gewebe beobachtet werden sollen, weist die Richtung dort von Zellkulturzellen weg, hin zu Zellen in Gewebeschnitten und zu Gewebe-Microarrays (Kononen et al. 1998; Kallioniemi et al. 2001). Mit diesen ist es in Einzel- und Doppelhybridisierungen bereits gelungen die 3D-Topologie verschiedener Loci im Darmgewebe zu untersuchen (Koutna et al. 2000).

4.5 Zellkernarchitektur: Chromosomenpositionen im Zellkern

Seit der experimentellen Bestätigung der von Theodor Boveri postulierten Chromosomenterritorien (Stack et al. 1977; Zorn et al. 1979; Cremer T. et al. 1982a) wurden Versuche unternommen, die Frage ihrer Anordnung zu klären. Mittels M-FISH und ReFISH konnten in dieser Arbeit die Positionen aller 46 Chromosomen simultan im Zellkern menschlicher Fibroblasten und in Prometaphaserosetten bestimmt werden.

4.5.1 Fünf Chromosomenterritorien in Lymphozyten

Konfokale versus Weitfeldfelaufnahmen

Um zu überprüfen, ob der in dieser Arbeit neu entwickelte Weitfeld-Aufnahmemodus mit anschließender Dekonvolution die gleichen Ergebnisse im Hinblick auf Chromosomenpositionen lieferte, wie ein bekannter konfokaler Aufbau, wurden die fünf Painting Sonden 1, 3, 10, 12 und 20 in einem kombinatorischen Markierungsansatz in Lymphozyten so hybridisiert, dass sie sowohl mit einem konfokalen, als auch mit einem Weitfeldmikroskop aufgenommen werden konnten (Kapitel 3.5.1, S. 131). Ein Vergleich der kumulativen Häufigkeiten erbrachte keinen Unterschied in der Verteilung der Chromosomenpositionen zwischen den beiden Aufnahmesystemen (Abb. 3-30 a und b, S. 138).

Bei dem einfach markierten, im Weitfeld aufgenommenen Präparat stellte sich heraus, dass die Schwerpunkte insgesamt näher zusammen in der Mitte des Zellkerns lagen, als bei dem Experiment mit kombinatorischer Markierung, wobei die radiale Reihenfolge der Intensitätsschwerpunkte bis auf den Fall von Chr. 3 identisch war (Abb. 3-30 c). Vor dem Hintergrund, dass die Ergebnisse des kombinatorischen Präparats sowohl im Weitfeld- als auch am konfokalen Mikroskop dieselben waren, wurde die gefundene engere Verteilung und die

etwas andere Reihenfolge von Chr. 3 bei diesem Experiment als präparat-abhängig eingestuft.

Positionen in den Lymphozyten

In Boyle et al. (2001) wurden alle 24 menschlichen Painting Sonden in Lymphozyten einzeln hybridisiert und die radialen Positionen mit der Gendichte der Chromosomen korreliert (Abb. 4-1). Die Reihenfolge der fünf hier untersuchten Chromosomen von der Zellkernmitte aus war daraus ersichtlich: 1 – 12 – 20 – 10 – 3.

Mit den Ergebnissen der durchgeführten Experimente wurde versucht, diese radiale Verteilung nachzuvollziehen. In dem kumulativen Gesamtgraphen (Abb. 3-30 d, S. 138) wird die Abfolge der 3D Positionen aller 153 aufgenommenen Kerne nochmals verdeutlicht. Die Reihenfolge ist von der Zellkernmitte aus 1 – 20 – 3 – 10 – 12 und deckt sich mit der aus Boyle et al. (2001) bekannten nur teilweise.

In dem konfokal aufgenommenen, kombinatorisch markierten Präparat war die optische Auflösung hoch, und die Kurven waren weit genug getrennt, so dass die Daten eindeutig erschienen (Abb. 3-30 a, S. 138). Bei dem im Weitfeld-Mikroskop aufgenommenen Präparat wurden wie in Boyle et al. (2001) Painting Sonden mit Einfachmarkierung verwendet. Der Unterschied zu den eigenen Experimenten lag darin, dass bei Boyle et al. (2001) pro Präparat nur eine Sonde hybridisiert wurde, MAA-fixierte und hypoton behandelte Lymphozyten verwendet wurden, die eine platte Form hatten. Zudem wurden nur die 2D-Abstände der Chromosomenschwerpunkte von der Zellkernmitte gemessen wurden. Ein gemeinsames Ergebnis ist jedoch die zentrale Lage des reichen Chr. 1.

Als Grund für die Diskrepanz ist ein Einfluss des Transkriptionsstatus in Betracht zu ziehen, denn Boyle et al. (2001) verwendeten lymphoblastoide Zelllinien, während in dieser Studie periphere Blutlymphozyten, die sich in G0 befanden (Tashiro et al. 1996), untersucht wurden. Einen Zellzykluseffekt auf die Chromosomenpositionen in Fibroblasten finden beispielsweise Bridger et al. (2000).

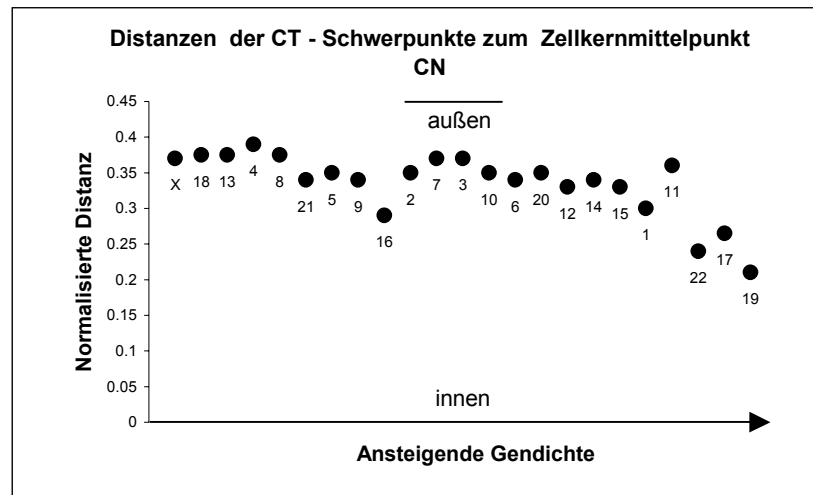


Abb. 4-1 Distanzen der CT-Schwerpunkte zum Zellkernmittelpunkt (CN) aus Boyle et al. (2001). Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 50 MAA-fixierten Lymphozyten dar. „Normalisiert“ heißt, dass die Distanz CT-CN [Pixel] durch die Zellkerngröße [Pixel²] dividiert wurde, um Größenschwankungen allein aufgrund unterschiedlicher Kerngrößen auszuschließen. Die Abszissenwerte reichen vom Kernmittelpunkt (0, „innen“) bis zu seiner Kernhülle (0,45, „außen“). Die genarmen Chromosomen X und 18 liegen eher peripher, die genreichen Chromosomen 17 und 19 zentraler.

Versuch einer Korrelation der radialen Distanz mit der Größe oder der Gendichte

Beim Versuch, eine größer werdende radiale Distanz mit der zunehmenden Größe der Chromosomen zu korrelieren (Abb. 4-2 b), bildet das Chr. 1 die Ausnahme, da es am weitesten in der Kernmitte zu finden ist, obwohl es am größten ist. Besser lassen sich die Daten mit der Gendichte korrelieren (Abb. 4-2 a), wenn auch nicht so gut wie in Boyle et al. (2001). Das genarme Chr. 3 entspricht hier nicht der Erwartung, weil es zentraler liegt, als das (etwas) genreichere Chr. 10.

Die in dieser Arbeit simultan aufgenommenen Bilder 3D-fixierter Lymphozyten spiegeln vermutlich die Verhältnisse zuverlässiger wider, als die Daten aus der zitierten Veröffentlichung, bei der pro Experiment nur jeweils ein Chromosom dargestellt wurde. Wünschenswert wäre die simultane Bestimmung aller Chromosomenpositionen in einem M-FISH Experiment auf 3D-fixierten Lymphozyten. Trotz mehrmaliger Versuche gelang dies mit den verwendeten Mitteln nicht, da die Farbdiskriminierung in den kleinen Lymphozytenkernen nicht ausreichend war.

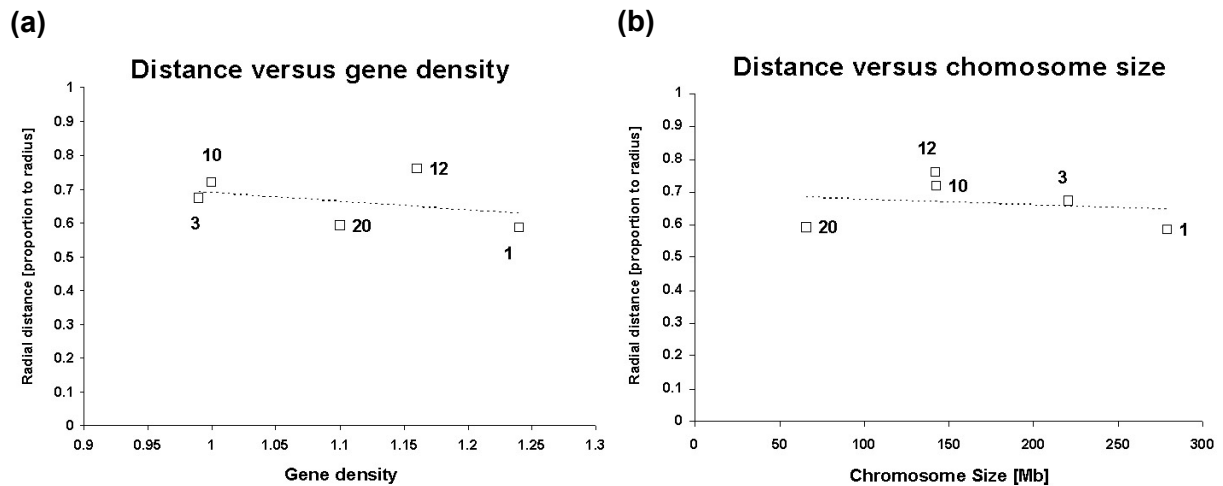


Abb. 4-2 Korrelation der radialen Positionen der fünf untersuchten Chromosomen in Lymphozyten. (a) Korrelation mit der Gendichte (Deloukas et al. 1998). (b) Korrelation mit dem DNA Gehalt der Chromosomen (The Genome International Sequencing CONSORTIUM 2001b).

4.5.2 Homologenassoziation

Eine überzufällige Assoziation homologer Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte wurde in Säugern bislang in ausdifferenzierten Neuronen des Cerebellums (mit Sonde 1q12, Arnoldus et al. 1989), in Astrocyten (mit der Sonde 7cen, Arnoldus et al. 1991) und Sertoli-Zellen (mit den Painting Sonden 3, 7, 8, 13, 17 und 21, Chandley et al. 1996) gefunden.

Keine Studie, in der dies untersucht wurde, fand jedoch in Lymphozyten oder Fibroblasten eine überzufällig häufige Homologenassoziationen (Emmerich et al. 1989; Popp et al. 1990; Ferguson und Ward 1992; Vourc'h et al. 1993; Leitch et al. 1994; Lesko et al. 1995; Chandley et al. 1996; Alcobia et al. 2000). Eine Annäherung einzelner CT kann dadurch zustande kommen konnte, dass bestimmte CT tendenziell zentraler im Zellkern liegen, und deswegen auch näher zusammen sind. Eine Nachbarschaft ist weiterhin zu erwarten bei den akrocentrischen Chromosomen, deren p-Arme NORs tragen. Z. B. wurde in Fibroblasten die Probe 15cen immer mit den Nukleoli assoziiert gefunden (Emmerich et al. 1989), weshalb die dortigen kleineren homologen Abstände von Chr. 15-15 wahrscheinlich auf die Assoziation mit den Nukleoli zurückzuführen sind und keine echte Homologenassoziation bedeuten. Dieser Verdacht wurde in einer darauf folgenden Studie bestätigt (Popp et al. 1990), in der das Chromosom 18, das keine NOR-Region trägt, auch keine Homologenassoziation zeigte.

Eine direkte Homologenassoziation konnte in dieser Arbeit weder bei Lymphozyten, noch bei Fibroblasten gefunden werden. In den untersuchten Fibroblasten lagen zwar kleinere Chromosomen näher zusammen, jedoch war das eher eine Folge der zentraleren Lage, als der einer Aneinanderlagerung *per se* (siehe Kapitel 3.5.2.4, S. 155). Die Abweichungen von einer theoretischen Modellverteilung (Abb. 3-41, S. 157) bezogen sich vor allem auf die mittelgroßen und kleinen Chromosomen 10, 12, 16, 20, 21 und 22. Weil für die

Messung einer direkten Homologenpaarung die Größe und die Form der Territorien benötigt worden wäre, diese aber aus den M-FISH Bildern nicht in ausreichender Qualität abgeleitet werden konnte, ist eine überzufällig häufige Homologenassoziation der kleinen Chromosomen 16 oder 22 zwar nicht sehr wahrscheinlich, aber auch nicht völlig auszuschließen. Das Homologenpaar 5-5 lag weiter voneinander entfernt, als vom Modell postuliert wird. Dafür ist kein offensichtlicher Grund bekannt.

Ein weiterer Hinweis gegen eine Homologenassoziation in Fibroblasten ist der Winkel, den die Homologen mit dem Mittelpunkt einschließen (Tab. 3-8, S. 159). Die Spannweite der Winkel reichte von 0° bis 180° . Diese Winkelmessungen sprechen gegen eine präferenzielle Nachbarschaft homologer CT. Der in Nagele et al. (1999) vorgestellte Erklärungsversuch, eine Genomseparation durch mehrmaliges Umdrehen („flip-flop“) des flachen Zellkerns zu erreichen und damit die gefundene Verteilung auf einen starren Winkel von $\sim 150^\circ$ festzulegen, ist mit den hier gemessenen Winkeln (Tab. 3-8, S. 159) nicht zu vereinbaren. Diese sprechen weder für eine starr gegenüberliegende Position, noch für eine Assoziation homologer Territorien, sondern eher für eine zufällige nachbarschaftliche Anordnung der Territorien im Zellkern. Dies wurde bereits von Allison und Nestor (1999) behauptet.

4.5.3 Positionen aller Chromosomen in 46 XY-Fibroblasten

Mit dieser Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, alle menschlichen Chromosomen in primären 46, XY G0-Fibroblasten simultan sichtbar zu machen. Durch die Bestimmung der Schwerpunkte aller CT konnten die kontrovers diskutierte Fragen entschieden werden, ob es erstens eine signifikant unterschiedliche Verteilung in Bezug auf eine mehr periphere oder zentrale Lage der Chromosomen gibt, und zweitens, ob eine signifikant nicht-zufällige nachbarschaftliche Anordnung im Zellkern existiert oder nicht (siehe Einleitung 1.1.1, S. 21).

Abstände vom Kernmittelpunkt (radiale Verteilung)

Zur Beantwortung der Frage einer radialen Verteilung wurden zunächst die Abstände CT-CN im Verhältnis zum Radius berechnet und mit einer zufälligen Modellverteilung (G. Kreth, Heidelberg) verglichen (Abb. 3-38, S. 151). Je größer die Chromosomen waren, desto mehr zeigten sie die Tendenz, sich peripher im Zellkern zu positionieren. Versucht man dagegen, die Chromosomengröße mit der Gendichte (Deloukas et al. 1998) zu korrelieren (Abb. 3-40, S. 154), findet man nur einen schwachen Zusammenhang. Aufgrund der Tatsache, dass die in Sun et al. (2000) gemessenen Positionen der Chromosomen 1 – 3, 7, 11, 12, 18, 19 und 21 einen positiven Zusammenhang zwischen der Größe und der peripheren Position der Chromosomen zeigten, drängte sich der Verdacht auf, dass größere Chromosomen nur weiter außen liegen können, weil sie größer sind. Aus der geometrischen Eigenschaft einer Kugel und eines Ellipsoids folgt, dass der zentrale Bereich ein geringeres Volumen besitzt, als der äußere Bereich. In einem Vergleich mit einer von G. Kreth (Hei-

delberg) durchgeführten Modellverteilung, welche die Chromosomengröße und die Kerngeometrie mitberücksichtigte, stellte sich jedoch heraus, dass dort kleine Chromosomen präferenziell außen und große Chromosomen etwas weiter innen zu liegen kommen (Abb. 3-40 a, S. 154). In der Modellierung ergeben sich also Verhältnisse der radialen Anordnung, die genau umgekehrt zu den experimentellen Daten waren (Abb. 3-40 a, S. 154). Die gefundene experimentelle Verteilung ist nicht einfach mit der geometrischen Eigenschaften einer Kugel oder eines Ellipsoids zu erklären.

Verglichen mit einer zufälligen Verteilung im Ellipsoid- und Zylindermodell konnte in Amnionzellen bereits eine Abhängigkeit der radialen Chromosomenposition von den Chromosomengrößen gefunden werden (Volm 1992; Cremer M. et al. 2001). Sonden für centromerisches bzw. centromernahes Heterochromatin der Chromosomen 1 - 4, 7, 8, 12, 15, 16 - 18, X und Y, wurden hybridisiert und deren 2D - Position bestimmt. Dabei ergab sich eine signifikante Abweichung der Abstände CT-CN ab Chr. 15. Auch die heterologen Abstände waren ab Chr. 15 kleiner als von den Modellen vorherberechnet. Die Zellkerne von Amnionzellen und Fibroblasten ähneln sich in ihrer Form. In der vorliegenden Arbeit wurde bei allen Chromosomen ein signifikanter Unterschied zu den simulierten SCD - Modelldaten gefunden (Abb. 3-38, S. 151). Innerhalb der experimentell ermittelten Daten ergab sich ein signifikanter Unterschied der Abstände CT-CN ab Chr. 11 (Tab. 3-7, S. 154). Dieser Vergleich spricht dafür, dass in Amnionzellen und in Fibroblasten eine ähnliche radiale Verteilung der Chromosomen vorliegt.

Die in dieser Studie gefundenen Ergebnisse an Fibroblastenkernen sind im Einklang mit denen aus Bridger et al. (2000). Dort wurden beide Territorien der Chromosomen 18 und 19 (gleich groß, aber unterschiedlich gendicht) in G0-Fibroblasten präferenziell in der Mitte gefunden. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls beide mittig gefunden (Abb. 3-39, S. 152), Chr. 18 noch zentraler als Chr. 19, worüber die eben genannte Publikation keine Aussage macht.

Bereits 1982 wurde in einer Publikation bei Chromosomenspreitungen eine Anordnung von Metaphasechromosomen gefunden (Hens et al. 1982), die der heutigen Kenntnislage in Lymphozyten (Boyle et al. 2001) entspricht. Kleine, früh-replizierende, gendichte Chromosomen wurden präferenziell im Zentrum der Metaphasen gefunden, umgeben von den längeren, genärmeren Chromosomen, die ihre Replikation später in der S-Phase beenden. Aus diesen und anderen Daten ging das Konzept einer Interphasestruktur hervor, in der spät-replizierendes, genetisch wenig aktives Chromatin direkt mit der Kernhülle Kontakt hat, während aktives Chromatin mit der inneren nukleären Matrix verbunden ist.

Die „Bodyguard“-Hypothese, ursprünglich für konstitutives Heterochromatin konzipiert (Hsu 1975), besagt, dass die aktiven Gene so besser vor Umwelteinflüssen wie z. B. mutagenen Agentien oder Radikalen geschützt seien. Radikale könnten z. B. in Mitochondrien, die um den Kern gelagert sind, im Rahmen der Atmungskette produziert werden und von dort in den Zellkern diffundieren. Die Hypothese sagt eine differentielle Beteiligung ganzer Chromoso-

men oder chromosomaler Abschnitte bei chemisch induzierten Aberrationen voraus. Solche genetisch inaktiven, mutagenese-sensitiven Chromosomenabschnitte wurden tatsächlich gefunden (Brögger 1977). Darüberhinaus ist die radiale Ordnung in vielen Arten von *Gallus domesticus* bis zu diversen Primatenspecies konserviert (Tanabe et al. 2002a; Tanabe et al. 2002b), was einen funktionalen Grund vermuten lässt. Da beispielsweise Neuronen im ausdifferenzierten Status lange Zeit aktiv sind, ist es vorstellbar, dass sie Schutzmechanismen entwickelt haben, durch die Chromatin mit inaktiven Genen am Kernrand verbleibt, während Chromatin mit transkriptionell aktiven Genen mehr ins Innere des Zellkerns gelagert wird. Im mittel- und spät-replizierenden Chromatin liegen aber gewebespezifische Gene (Federico et al. 1998; Sadoni et al. 1999), die ebenso nicht geschädigt werden sollen. Es kann spekuliert werden, ob in solch einer „Barriere“ aus konstitutiven Heterochromatin (centromerisches Heterochromatin und fakultatives Heterochromatin, das sind Abschnitte der Autosomen und der Geschlechtschromosomen, die Gene enthalten, die bei einem bestimmten Zelltyp nicht aktiv sind) folglich nicht die Gendichte per se, sondern die Gendichte aktiver Gene eine Rolle spielt. Ein topologischer Unterschied zwischen aktiven und inaktiven X-Chromosomen weiblicher Zellen konnte bereits beobachtet werden (Eils et al. 1996).

Eine Polarisierung einzelner Chromosomenterritorien, insofern dass genreiche Abschnitte eher im Kerninneren zu liegen kommen, und genärmere eher an der Kernhülle, ist vorstellbar, aber bis jetzt nicht untersucht. Replikationsmuster zeigen in Fibroblasten die spät-replizierenden Bereiche am Kernrand und um den Nukleolus herum, wohingegen früh-replizierendes, genreiches Chromatin im Kerninneren zu finden ist (O'Keefe et al. 1992; Zink et al. 1998; Sadoni et al. 1999; Kennedy et al. 2000). Um zu ermitteln, ob genärmere Territorienbereiche bevorzugt an der Kernhülle liegen, müssten einzelne Klone (z. B. BACs; The BAC Resource CONSORTIUM 2001a), deren Gengehalt bekannt ist, zusammen mit ihren korrespondierenden Painting Sonden hybridisiert, und ihre 3D-Positionen bestimmt werden.

Fraglich ist, ob die Korrelation des radialen Abstandes mit der Gendichte, aus kugeligen Lymphozyten (Boyle et al. 2001) auf flache Fibroblasten übertragbar ist. Eine Transformation, welche eine kugelige Gestalt in eine ellipsoide umwandelt, und trotzdem die Anordnung der Territorien beibehält, ist nicht trivial durchzuführen. Dazu müssten Modelldaten in Abhängigkeit zur Gendichte generiert werden, deren Bearbeitung in der Durchführung ist.

Heterologe Chromosomenassoziationen

In der Literatur wurden spezifische, räumliche Anordnungen für einige Chromosomenpaare beschrieben. Die bekannteste dieser Anordnungen ist diejenige zwischen den NOR tragenden akrocentrischen Chromosomen {13, 14, 15, 21, 22} (Barton et al. 1965; Galperin 1968; Warburton et al. 1973; Kirsch-Volders et al. 1977; Rodman et al. 1978; Hager et al. 1982; Krystosek 1998). Für das Paar {8, 11} wurde in menschlichen G0-Fibroblasten eine Assoziation behauptet (Nagele et al. 1999), für {14, 18} in Lymphozyten

(Lukasova et al. 1999), ebenso wie für {13, 21} und {14, 22} (Alcobia et al. 2000).

Mithilfe der Distanz- und Winkelberechnungen zwischen den heterologen Chromosomen konnte in den Vielfarbenbildern die räumliche Lage der CT zueinander simultan bestimmt werden. Wie der MDS-Plot (Abb. 3-42, S. 161) zeigt, verringerten sich die heterologen Abstände von den großen Chromosomen hin zu den kleinen. Die heterologen Winkel schwankten bei allen Chromosomen zwischen 76° und 113° mit einer hohen Standardabweichung. Damit ließ sich keine feste nachbarschaftliche Beziehung zwischen bestimmten Chromosomenpaaren feststellen, die nicht durch die radiale Anordnung bedingt gewesen wäre.

Die akrocentrischen Chromosomen 14, 21 und 22 liegen eng zusammen in der Mitte, 13 und 15 etwas weiter außen und nicht in direkter Nachbarschaft (siehe Abb. 3-42, S. 161). Dieses Ergebnis stimmt überein mit zwei Publikationen (Vogel und Schroeder 1974; Hager et al. 1982), die in Lymphozyten gehäuft Translokationen zwischen 14 und 21 fanden. Jedoch fanden sie genauso häufig Translokationen zwischen 13 und 14, deren Nachbarschaft hier nicht nachvollzogen werden konnte. Die Arbeit Boyle S. et al. (2001) konnte im Zellkern von Lymphozyten ebenfalls keine Clusterung der akrocentrischen Chromosomen finden. Eine Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass nur der satelliten-tragende p-Arm am Nukleolus teilnimmt, und deswegen die hier untersuchten CT-Schwerpunkte nicht in direkter Nachbarschaft stehen müssen.

In Nagele et al. (1999) wurde die Assoziation {8, 11} genannt, jedoch wurde nur eine einzige Abbildung präsentiert und keine Angabe, aus der man diese bestimmte räumliche Anordnung überprüfen könnte. Die hier aufgenommenen Vielfarbenbilder ergaben für den Abstand zwischen den Schwerpunkten 8 und 11 den Wert $0,49d \pm 0,2d$ (MW \pm SD), und für den Winkel einen Betrag von $97^\circ \pm 54^\circ$ (siehe Kapitel 3.5.2.6, S. 159). Beide Werte sind keine „Ausreißer“ und somit kann eine überzufällige Assoziation nicht nachvollzogen werden.

4.5.4 Positionen aller Chromosomen in Prometaphaserosetten

Die Organisation der Chromosomen könnte generell von zwei Faktoren abhängen, (i) der Zellteilungsfrequenz und (ii) dem Status der Zelldifferenzierung. Weil eine Zellzyklus-Abhängigkeit in der räumlichen Anordnung wahrscheinlich ist (Bridger et al. 2000), das Stadium der Prometaphaserosette gut beschrieben wurde (Chaly und Brown 1988; Nagele et al. 1995) und die Hybridisierungssignale denen von Metaphasechromosomen ähnelten, wurden Vielfarben-Experimente an solchen Präparaten durchgeführt. Prometaphaserosetten waren nicht häufig auf den Präparaten, weshalb die Anzahl aufgenommener Bildstapel gering blieb. Obwohl nicht explizit Centromere und Telomere hybridisiert wurden, konnte die beschriebene Rabl-Konfiguration (Chaly und Brown 1988) bisweilen in den hier aufgenommenen Bildern nachvollzogen werden. Vor allem große Chromosomen waren häufig in der Mitte so gebogen, dass das Centromer nach innen und die Telomere nach außen orientiert lagen.

Keine starre Nachbarschaft in Prometaphaserosetten

Die Positionen homologer Chromosomen in Prometaphaserosetten wurde in zwei Arbeiten nicht nur als „nicht-zufällig“ beschrieben, sondern mit einem durchschnittlichen Winkel von etwa 150° als strikt getrennt gegenüber liegend (Nagele et al. 1995; Nagele et al. 1998). Dabei verwendeten die Autoren centromerische (punktförmige) Proben der Chromosomen 1, 9, 11, 15, 21, 22 und X, sowie die Painting Sonden 7, 8 und 16 in einzelnen Hybridisierungen. Die Fibroblasten wurden zwar mit PFA fixiert, danach aber dehydriert und in Ethanol gelagert, wodurch eine Artefaktbehaftung nicht ausgeschlossen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl 3D-fixierte (PFA, $n = 13$), als auch MAA-fixierte Prometaphaserosetten ($n = 15$) verwendet, wobei darauf geachtet wurde, dass die Zellen in keinem Fall austrockneten. Da kein offensichtlicher Unterschied in den beiden Präparationen gefunden wurde, trugen beide Datensätze zu den gefundenen Ergebnisse bei. Aus den berechneten Abständen und Winkeln geht eine radiale Chromosomenanordnung (Abb. 3-48, S. 171), aber keine starre nachbarschaftliche Anordnung hervor (Tab. 3-9, S. 174). Z. B. reicht die Spannweite der Winkel zwischen den Homologen von fast 0° bis fast 180° . Dieses Ergebnis stimmt mit dem aus Allison und Nestor (1999) überein, widerspricht aber klar den Daten aus Nagele et al. (1995).

Aus EM-Bildern aller 46 Chromosomen in 10 männlichen Fibroblasten (Mosgöller et al. 1991) konnte eine radiale Anordnung hergeleitet werden, in der große Chromosomen weiter außen sind, als kleine. Die Arbeit berichtet sogar von einem zunehmenden nach-außen-Wandern großer Chromosomen, je weiter die Mitose voranschreitet. Inwieweit eine Positionsverlagerung stattfindet, konnte hier nicht bestimmt werden, jedoch korreliert der radiale Abstand vom Zentrum mit der genomischen Größe auch in dieser Arbeit (Abb. 3-49, S. 172).

Aus den heterologen Abständen konnte ein MDS-Plot erstellt werden, der eine „Landkarte“ der gefundenen Schwerpunkte darstellt (Abb. 3-50, S. 175). Aus dieser kann die radiale Verteilung wiederum bestätigt werden, nicht aber eine nachbarschaftliche Beziehung. Es wurde auch keine Clusterung acrozentrischer Chromosomen {13, 14, 15, 21, 22} in Prometaphaserosetten gefunden (Mosgöller et al. 1991; Krystosek 1998). Dies könnte entweder daran liegen, dass die Nukleoli bereits aufgelöst wurden, oder daran, dass nur der kurze p-Arm jeweils an dem Nukleolus beteiligt ist, der hier gemessene Schwerpunkt des Gesamtchromosoms aber weit entfernt liegt.

Ausblick

Sowohl in Hefe als auch in *Drosophila* wurden extrem schnelle Bewegungen von CT mit mehr als $0,5\mu\text{m}$ innerhalb weniger Sekunden beobachtet (Buchenau et al. 1998; Heun et al. 2001a; Heun et al. 2001b). Im Gegensatz dazu lassen Lebendzelleexperimente mit GFP-H2B HeLa Zellen (Kanda et al. 1998) die Schlussfolgerung zu, dass Chromatin in der Interphase zwar aufgrund geometrischer Randbedingungen eingeschränkte Brown'sche Molekularbewegungen erfährt (Marshall et al. 1997; Vazquez et al. 2001; Chubb et al.

2002; Marshall 2002), jedoch keine großräumigen Bewegungen vollzieht (Bornfleth et al. 1999; Walter et al. 2002). Zu Beginn der Mitose findet vermutlich eine zufällige nachbarschaftliche Anordnung aller Chromosomen statt, wobei jedoch die radiale Anordnung erhalten bleibt. In der Cytokinese und der anschließenden Abflachung des Zellsomas können beide Kerne der Tochterzellen entweder parallel oder anti-parallel in eine Richtung „umfallen“. Dadurch kommt die in Habermann et al. (2001) gefundene eine G0 / G1 - Chromatinaordnung zustande. Sie bleibt wahrscheinlich bis zur nächsten Mitose bestehen. Dann werden die kondensierten Chromosomen wieder beliebig in der Prometaphaserosette angeordnet.

Literaturverzeichnis

A

- Agard D. A. (1984). *Optical sectioning microscopy: cellular architecture in three dimensions*. Annu Rev Biophys Bioeng 13: 191-219.
- Agard D. A., et al. (1989). *Fluorescence microscopy in three dimensions*. Methods Cell Biol 30: 353-77.
- Agard D. A. und Sedat J. W. (1983). *Three-dimensional architecture of a polytene nucleus*. Nature 302 (5910): 676-81.
- Alcobia I., et al. (2000). *Spatial associations of centromeres in the nuclei of hematopoietic cells: evidence for cell-type-specific organizational patterns*. Blood 95 (5): 1608-15.
- Alers J. C., et al. (1999). *Universal linkage system: an improved method for labeling archival DNA for comparative genomic hybridization*. Genes Chromosomes Cancer 25 (3): 301-5.
- Allison D. C. und Nestor A. L. (1999). *Evidence for a relatively random array of human chromosomes on the mitotic ring*. J Cell Biol 145 (1): 1-14.
- Aquiles Sanchez J., et al. (1997). *Fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of the relationship between chromosome location and nuclear morphology in human neutrophils*. Chromosoma 106 (3): 168-77.
- Arnoldus E. P., et al. (1991). *Interphase cytogenetics reveals somatic pairing of chromosome 17 centromeres in normal human brain tissue, but no trisomy 7 or sex-chromosome loss*. Cytogenet Cell Genet 56 (3-4): 214-6.
- Arnoldus E. P., et al. (1989). *Somatic pairing of chromosome 1 centromeres in interphase nuclei of human cerebellum*. Hum Genet 83 (3): 231-4.
- Azofeifa J., et al. (2000). *An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH*. Am J Hum Genet 66 (5): 1684-8.

B

- Barton D. E., et al. (1965). *The relative positions of the chromosomes in the human cell in mitosis*. Ann Hum Genet 29 (2): 139-46.
- Bartova E., et al. (2001). *Higher-order chromatin structure of human granulocytes*. Chromosoma 110 (5): 360-70.
- Belmont A. S. und Bruce K. (1994). *Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure*. J Cell Biol 127 (2): 287-302.
- Bernardi G. (1965). *Chromatography of nucleic acids on hydroxyapatite*. Nature 206 (986): 779-83.
- Bischoff A., et al. (1993). *Differences of size and shape of active and inactive X-chromosome domains in human amniotic fluid cell nuclei*. Microsc Res Tech 25 (1): 68-77.
- Bolzer A., et al. (1999). *A complete set of repeat-depleted, PCR-amplifiable, human chromosome-specific painting probes*. Cytogenet Cell Genet 84 (3-4): 233-40.
- Borden J. und Manuelidis L. (1988). *Movement of the X chromosome in epilepsy*. Science 242 (4886): 1687-91.
- Bornfleth H., et al. (1999). *Quantitative motion analysis of subchromosomal foci in living cells using four-dimensional microscopy*. Biophys J 77 (5): 2871-86.

- Bourgeois C. A., et al. (1981). *Biol Cell* 40: 229-232.
- Boveri T. (1909). *Die Blastomerenkern von Ascaris megalocephala und die Theorie der Chromosomenindividualität*. *Arch Exp Zellforschung* 3: 181-268.
- Boyle A. L., et al. (1990). *Differential distribution of long and short interspersed element sequences in the mouse genome: chromosome karyotyping by fluorescence in situ hybridization*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (19): 7757-61.
- Boyle S., et al. (2001). *The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerlin-mutant cells*. *Hum Mol Genet* 10 (3): 211-219.
- Brakenhoff G. J., et al. (1979). *Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses*. *J Microsc* 117: 219-232.
- Bridger J. M., et al. (2000). *Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts*. *Curr Biol* 10 (3): 149-52.
- Bridger J. M., et al. (1998). *Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells*. *Chromosome Res* 6 (1): 13-24.
- Britten R. J., et al. (1974). *Analysis of repeating DNA sequences by reassociation*. *Methods Enzymol* 29 (0): 363-418.
- Brögger A. (1977). *Non-random localisation of chromosome damage in human cells and target for clastogenic action*. *Chromosomes today*. A. d. I. Chappelle and M. Sorsa. Amsterdam, Elsevier. 6: 297-306.
- Buchenau P., et al. (1998). *The distribution of polycomb-group proteins during cell division and development in Drosophila embryos: impact on models for silencing*. *J Cell Biol* 141 (2): 469-81.

C

- Cao G., et al. (1991). *Modified method of mammalian cell synchronization improves yield and degree of synchronization*. *Exp Cell Res* 193 (2): 405-10.
- Carmo-Fonseca M., et al. (1996). *The topography of chromosomes and genes in the nucleus*. *Exp Cell Res* 229 (2): 247-52.
- Castleman K. R., et al. (2000). *Classification accuracy in multiple color fluorescence imaging microscopy*. *Cytometry* 41 (2): 139-47.
- Chaly N. und Brown D. L. (1988). *The prometaphase configuration and chromosome order in early mitosis*. *J Cell Sci* 91 (Pt 3): 325-35.
- Chandley A. C., et al. (1996). *Different distributions of homologous chromosomes in adult human Sertoli cells and in lymphocytes signify nuclear differentiation*. *J Cell Sci* 109 (Pt 4): 773-6.
- Chen-Liu L. W., et al. (1995). *Selection of hybrids by affinity capture (SHAC): a method for the generation of cDNAs enriched in sequences from a specific chromosome region*. *Genomics* 30 (2): 388-92.
- Chubb J. R., et al. (2002). *Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells*. *Curr Biol* 12 (6): 439-45.
- Cohen M. M., et al. (1972). *An investigation of somatic pairing in the muntjak (Muntiacus muntjak)*. *Cytogenetics* 11 (3): 145-52.
- Comings D. E. und Okada T. A. (1970). *Association of chromatin fibers with the annuli of the nuclear membrane*. *Exp Cell Res* 62 (2): 293-302.
- Conchello J. A. (1998). *Superresolution and convergence properties of the expectation-maximization algorithm for maximum-likelihood deconvolution of incoherent images*. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 15 (10): 2609-19.
- Conchello J. A., et al. (1997). *All models are wrong. An overview of methods for computational optical sectioning microscopy*.
http://rayleigh.wustl.edu/~josec/tutorials/msa_97.v2.pdf

- CONSORTIUM T. B. R., et al. (2001a). *Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome*. Nature 409 (6822): 953-8.
- CONSORTIUM T. G. I. S., et al. (2001b). *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature 409 (6822): 860-921.
- Craig J. M., et al. (1997). *Removal of repetitive sequences from FISH probes using PCR-assisted affinity chromatography*. Hum Genet 100 (3-4): 472-6.
- Cremer C. und Cremer T. (1978). *Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field*. Microsc Acta 81 (1): 31-44.
- Cremer C., et al. (1974). *An ultraviolet laser microbeam for 257 nm*. Microsc Acta 75 (4): 331-7.
- Cremer M., et al. (2001). *Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells*. Chromosome Res 9 (7): 541-67.
- Cremer T. (1985). *Von der Zellenlehre zur Chromosomentheorie. Naturwissenschaftliche Erkenntnis und Theorienwechsel in der frühen Zell- und Vererbungsforschung*. Berlin Heidelberg NewYork Tokio, Springer Verlag
- Cremer T., et al. (1984). *Correlation between interphase and metaphase chromosome arrangements as studied by laser-UV-microbeam experiments*. Chrom Today 8: 203-212.
- Cremer T. und Cremer C. (2001). *Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells*. Nat Rev Genet 2 (4): 292-301.
- Cremer T., et al. (1982a). *Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV- microbeam experiments*. Hum Genet 60 (1): 46-56.
- Cremer T., et al. (1982b). *Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of Chinese hamster cells by laser-UV-microirradiation experiments*. Hum Genet 62 (3): 201-9.
- Cremer T., et al. (2000). *Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 10 (2): 179-212.
- Cremer T., et al. (1993). *Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 58: 777-92.
- Cremer T., et al. (1988). *Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes*. Hum Genet 80 (3): 235-46.
- Croft J. A., et al. (1999). *Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus*. J Cell Biol 145 (6): 1119-31.

D

- De Boni U. (1994). *The interphase nucleus as a dynamic structure*. Int Rev Cytol 150: 149-71.
- Deloukas P., et al. (2001). *The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20*. Nature 414 (6866): 865-71.
- Deloukas P., et al. (1998). *A physical map of 30,000 human genes*. Science 282 (5389): 744-6.
- Dietzel S., et al. (1998a). *Evidence against a looped structure of the inactive human X-chromosome territory*. Exp Cell Res 240 (2): 187-96.
- Dietzel S., et al. (1998b). *Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei*. Chromosome Res 6 (1): 25-33.

- Dunham I., et al. (1992). *Rapid generation of chromosome-specific alphoid DNA probes using the polymerase chain reaction.* Hum Genet 88 (4): 457-62.
- Dunham I., et al. (1999). *The DNA sequence of human chromosome 22.* Nature 402 (6761): 489-95.

E

- Eils R., et al. (1996). *Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure.* J Cell Biol 135 (6 Pt 1): 1427-40.
- Eils R., et al. (1998). *An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH).* Cytogenet Cell Genet 82 (3-4): 160-71.
- Emmerich P., et al. (1989). *Double in situ hybridization in combination with digital image analysis: a new approach to study interphase chromosome topography.* Exp Cell Res 181 (1): 126-40.
- Endl E. und Gerdes J. (2000). *The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function.* Exp Cell Res 257 (2): 231-7.
- Engelhardt A. (2001). *Vergleich der Zellkernarchitektur proliferierender und nicht proliferierender menschlicher Fibroblasten.* Diplomarbeit. Institut für Anthropologie und Humangenetik, LMU
- Entwistle A. (2000). *Confocal Microscopy: an overview with a biological and fluorescence microscopy bias.* Queckett J Microsc 38: 445-456.
- Epstein L., et al. (1995). *Reutilization of previously hybridized slides for fluorescence in situ hybridization.* Cytometry 21 (4): 378-81.

F

- Fauth C. (1998). *Evaluierung eines Verfahrens zur Darstellung von Chromosomen in lebenden Säugetierzellen.* Diplomarbeit. Inst. für Anthropologie und Humangenetik, LMU
- Federico C., et al. (1998). *The gene-richest bands of human chromosomes replicate at the onset of the S-phase.* Cytogenet Cell Genet 80 (1-4): 83-8.
- Felsenfeld G. und McGhee J. D. (1986). *Structure of the 30 nm chromatin fiber.* Cell 44 (3): 375-7.
- Ferguson M. und Ward D. C. (1992). *Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T- lymphocyte nuclei.* Chromosoma 101 (9): 557-65.
- Funabiki H., et al. (1993). *Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast.* J Cell Biol 121 (5): 961-76.

G

- Galperin H. (1968). *[Study of the general distribution of the 46 chromosomes in human cells in metaphase].* Humangenetik 6 (2): 118-30.
- Garini Y., et al. (1999). *Signal to noise analysis of multiple color fluorescence imaging microscopy.* Cytometry 35 (3): 214-26.
- Garini Y., et al. (1996). *Spectral karyotyping.* Bioimaging.
- Graziano V., et al. (1994). *Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30-nm filament.* Nature 368 (6469): 351-4.
- Guan X. Y., et al. (1994). *Rapid generation of whole chromosome painting probes (WCPs) by chromosome microdissection.* Genomics 22 (1): 101-7.
- Guan X. Y., et al. (1996). *Chromosome arm painting probes.* Nat Genet 12 (1): 10-1.

H

- Haaf T. (2001). *The battle of the sexes after fertilization: behaviour of paternal and maternal chromosomes in the early mammalian embryo*. Chromosome Res 9 (4): 263-71.
- Haaf T. und Schmid M. (1991). *Chromosome topology in mammalian interphase nuclei*. Exp Cell Res 192 (2): 325-32.
- Habermann F. A., et al. (2001). *Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells*. Chromosome Res 9 (7): 569-84.
- Hager H. D., et al. (1982). *Position of chromosomes in the human interphase nucleus. An analysis of nonhomologous chromatid translocations in lymphocyte cultures after Trenimon treatment and from patients with Fanconi's anemia and Bloom's syndrome*. Hum Genet 61 (4): 342-56.
- Hara E., et al. (1993). *DNA-DNA subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-Latex and PCR: identification of cellular genes which are overexpressed in senescent human diploid fibroblasts*. Anal Biochem 214 (1): 58-64.
- Hattori M. und Taylor T. (2001). *The human genome: Part three in the book of genes*. Nature 414: 854-855.
- Heintzmann R. (1999). *Resolution Enhancement of Biological Light Microscopic Data*. Dissertation. Kirchhoff-Institut für Physik, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- Heintzmann R., et al. (2001). *A dual path programmable array microscope (PAM): simultaneous acquisition of conjugate and non-conjugate images*. J Microsc 204 (Pt 2): 119-35.
- Heintzmann R., et al. (2000). *Reconstruction of axial tomographic high resolution data from confocal fluorescence microscopy: a method for improving 3D FISH images*. Anal Cell Pathol 20 (1): 7-15.
- Heneen W. K. und Nichols W. W. (1972). *Nonrandom arrangement of metaphase chromosomes in cultured cells of the Indian deer, Muntiacus muntjak*. Cytogenetics 11 (3): 153-64.
- Henegariu O., et al. (1999). *Colour-changing karyotyping: an alternative to M-FISH/SKY*. Nat Genet 23 (3): 263-4.
- Henikoff S. (1997). *Nuclear organization and gene expression: homologous pairing and long-range interactions*. Curr Opin Cell Biol 9 (3): 388-95.
- Hens L. (1976). *Chromosome distribution in a23 Chinese hamster fibroblasts*. Chromosoma 57 (3): 205-17.
- Hens L., et al. (1982). *The central localization of the small and early replicating chromosomes in human diploid metaphase figures*. Hum Genet 60 (3): 249-56.
- Heslop-Harrison J. S., et al. (1992). *Reprobing of DNA : DNA in situ hybridization preparations*. Trends Genet 8 (11): 372-3.
- Heslop-Harrison J. S., et al. (1989). *The volumes and morphology of human chromosomes in mitotic reconstructions*. Hum Genet 84 (1): 27-34.
- Heun P., et al. (2001a). *Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus*. Science 294 (5549): 2181-6.
- Heun P., et al. (2001b). *From snapshots to moving pictures: new perspectives on nuclear organization*. Trends Cell Biol 11 (12): 519-25.
- Hiraoka Y., et al. (1993). *The onset of homologous chromosome pairing during Drosophila melanogaster embryogenesis*. J Cell Biol 120 (3): 591-600.
- Hiraoka Y., et al. (1990). *Determination of three-dimensional imaging properties of a light microscope system. Partial confocal behavior in epifluorescence microscopy*. Biophys J 57 (2): 325-33.

- Hochstrasser M., et al. (1986). *Spatial organization of chromosomes in the salivary gland nuclei of Drosophila melanogaster*. J Cell Biol 102 (1): 112-23.
- Höfers C., et al. (1993a). *The localisation of chromosome domains in human interphase nuclei. 3D distance determinations of FISH signals from CLSM*. Bioimaging 1: 96-106.
- Höfers C., et al. (1993b). *The localisation of chromosome domains in human interphase nuclei. Semin automated 2D image acquisition and analysis of FISH signals*. Bioimaging 1: 107-118.
- Holmes T. J. (1988). *Maximum Likelihood image restoration adapted for non-coherent optical imaging*. J Opt Soc Am A A5 (5): 666-673.
- Holmes T. J. (1992). *Blind deconvolution of quantum-limited incoherent imagery: maximum-likelihood approach*. J Opt Soc Am A 9 (7): 1052-61.
- Holmes T. J. und Liu Y. (1991). *Acceleration of maximum-likelihood image restoration for fluorescence microscopy and other noncoherent imagery*. J Opt Soc Am A A 8: 893-907.
- Holmes T. J. und O'Connor N. J. (2000). *Blind deconvolution of 3D transmitted light brightfield micrographs*. J Microsc 200 (2): 114-27.
- Hoo J. J. und Cramer H. (1971). *On the position of chromosomes in prepared mitosis figures of human fibroblasts*. Humangenetik 13 (2): 166-70.
- Horowitz R. A., et al. (1994). *The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon*. J Cell Biol 125 (1): 1-10.
- Hsu T. C. (1975). *A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis*. Genetics 79 Suppl: 137-50.
- Huber R., et al. (1998). *Technical report: automated classification of first and second cycle metaphases*. Mutat Res 419 (1-3): 27-32.

I

- ISCN, Ed. (1985). *An international system for human cytogenetic nomenclature: report of the standing committee on human cytogenetic nomenclature*. Basel, published in collaboration with Cytogenet Cell Genet, Karger.

J

- Juricek D. K. (1975). *Non-random chromosome distribution in radial metaphases from the chinese hamster. I. Uncultured cells*. Chromosoma 50 (3): 313-26.

K

- Kallioniemi O. P., et al. (2001). *Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer*. Hum Mol Genet 10 (7): 657-62.
- Kanda T., et al. (1998). *Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells*. Curr Biol 8 (7): 377-85.
- Kennedy B. K., et al. (2000). *Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells*. Genes Dev 14 (22): 2855-68.
- Kirsch-Volders M., et al. (1977). *Stability of centromere-center distances in normal human metaphases*. Cytogenet Cell Genet 18 (2): 61-74.
- Kononen J., et al. (1998). *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. Nat Med 4 (7): 844-7.
- Korf B. R. und Diacumakos E. G. (1977). *Random arrangement of mitotic chromosomes in radial metaphases of the Indian muntjac*. Cytogenet Cell Genet 19 (6): 335-43.

- Koss L. G. (1998). *Characteristics of chromosomes in polarized normal human bronchial cells provide a blueprint for nuclear organization*. Cytogenet Cell Genet 82 (3-4): 230-7.
- Koutna I., et al. (2000). *Topography of genetic loci in tissue samples: towards new diagnostic tool using interphase FISH and high-resolution image analysis techniques*. Anal Cell Pathol 20 (4): 173-85.
- Kozubek S., et al. (2001). *Spatial distribution of selected genetic loci in nuclei of human leukemia cells after irradiation*. Radiat Res 155 (2): 311-9.
- Kreth G., et al. (2001). *Towards a dynamical approach for the simulation of large scale, cancer correlated chromatin structures*. Ital J Anat Embryol 106 (2): 21-30.
- Kreth G., et al. (1998). *Chromatin structure and chromosome aberrations: modeling of damage induced by isotropic and localized irradiation*. Mutat Res 404 (1-2): 77-88.
- Kriete A., et al. (2001). *Quality measures in applications of image restoration*. Scanning 23 (5): 313-9.
- Krystosek A. (1998). *Repositioning of human interphase chromosomes by nucleolar dynamics in the reverse transformation of HT1080 fibrosarcoma cells*. Exp Cell Res 241 (1): 202-9.

L

- LaSalle J. M. und Lalonde M. (1996). *Homologous association of oppositely imprinted chromosomal domains*. Science 272 (5262): 725-8.
- Leitch A. R., et al. (1994). *The spatial localization of homologous chromosomes in human fibroblasts at mitosis*. Hum Genet 93 (3): 275-80.
- Leitch A. R., et al. (1991). *Parental genomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid*. Chromosoma 101 (4): 206-213.
- Lengauer C., et al. (1991). *Painting of defined chromosomal regions by in situ suppression hybridization of libraries from laser-microdissected chromosomes*. Cytogenet Cell Genet 56 (1): 27-30.
- Lengauer C., et al. (1992). *Metaphase and interphase cytogenetics with Alu-PCR-amplified yeast artificial chromosome clones containing the BCR gene and the protooncogenes c-raf-1, c-fms, and c-erbB-2*. Cancer Res 52 (9): 2590-6.
- Leonhardt H., et al. (2000). *Dynamics of DNA replication factories in living cells*. J Cell Biol 149 (2): 271-80.
- Lesko S. A., et al. (1995). *The experimental homologous and heterologous separation distance histograms for the centromeres of chromosomes 7, 11, and 17 in interphase human T-lymphocytes*. Exp Cell Res 219 (2): 499-506.
- Lewin B. (2000). *Genes VII*. Oxford; New York, Oxford University Press
- Lichter P., et al. (1991). *Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic in situ hybridization*. Genet Anal Tech Appl 8 (1): 24-35.
- Lichter P., et al. (1988a). *Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries*. Hum Genet 80 (3): 224-34.
- Lichter P., et al. (1988b). *Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A 85 (24): 9664-8.
- Lopez-Velazquez G., et al. (1996). *Three-dimensional analysis of the arrangement of compact chromatin in the nucleus of G0 rat lymphocytes*. Histochem Cell Biol 105 (2): 153-61.
- Lovett M. (1994). *Fishing for complements: finding genes by direct selection*. Trends Genet 10 (10): 352-7.

Lukasova E., et al. (1999). *Chromosomes participating in translocations typical of malignant hemoblastoses are also involved in exchange aberrations induced by fast neutrons.* Radiat Res 151 (4): 375-84.

M

Majlof L. und Forsgren P. O. (1993). *Confocal microscopy: important considerations for accurate imaging.* Methods Cell Biol 38: 79-95.

Malik Z., et al. (1996). *Fourier transform multipixel spectroscopy for quantitative cytology.* J Microsc.

Manders E. M., et al. (1999). *Direct imaging of DNA in living cells reveals the dynamics of chromosome formation.* J Cell Biol 144 (5): 813-21.

Maniatis T., et al. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press

Manuelidis L. (1984). *Different central nervous system cell types display distinct and nonrandom arrangements of satellite DNA sequences.* Proc Natl Acad Sci U S A 81 (10): 3123-7.

Manuelidis L. (1985). *Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization.* Hum Genet 71 (4): 288-93.

Manuelidis L. (1990). *A view of interphase chromosomes.* Science 250 (4987): 1533-40.

Manuelidis L. und Borden J. (1988). *Reproducible compartmentalization of individual chromosome domains in human CNS cells revealed by in situ hybridization and three-dimensional reconstruction.* Chromosoma 96 (6): 397-410.

Markham J. und Conchello J. A., Eds. (1997). *Tradeoffs in regularized maximum-likelihood image restoration.* Proc SPIE.

Marshall W. F. (2002). *Order and disorder in the nucleus.* Curr Biol 12 (5): R185-92.

Marshall W. F., et al. (1996). *Specific interactions of chromatin with the nuclear envelope: positional determination within the nucleus in *Drosophila melanogaster*.* Mol Biol Cell 7 (5): 825-42.

Marshall W. F., et al. (1997). *Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells.* Curr Biol 7 (12): 930-9.

McNally J. G., et al. (1999). *Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy.* Methods 19 (3): 373-85.

Minsky M. (1961). *Microscopy apparatus.* US, 3013467.

Misteli T. (2000). *Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function.* J Cell Sci 113 (Pt 11): 1841-9.

Mongelard F., et al. (1999). *Quantitative assessment of the alteration of chromatin during the course of FISH procedures.* Cytometry 36 (2): 96-101.

Morgan J. G., et al. (1992). *The selective isolation of novel cDNAs encoded by the regions surrounding the human interleukin 4 and 5 genes.* Nucleic Acids Res 20 (19): 5173-9.

Morton N. E. (1991). *Parameters of the human genome.* Proc Natl Acad Sci U S A 88 (17): 7474-6.

Mosgöller W., et al. (1991). *Chromosome arrangements in human fibroblasts at mitosis.* Hum Genet 88 (1): 27-33.

Müller S., et al. (2002). *Towards unlimited colors for fluorescence in-situ hybridization (FISH).* Chromosome Res 10 (3): 223-32.

Münkel C., et al. (1999). *Compartmentalization of interphase chromosomes observed in simulation and experiment.* J Mol Biol 285 (3): 1053-65.

Münkel C. und Langowski J. (1998). *Chromosome structure predicted by a polymer model.* Phys. Rev. E 57: 5888-5896.

Murken J. und Wilmowski H. (1973). *Die Chromosomen des Menschen. Die Geschichte Ihrer Erforschung*. München, Werner Fritsch Verlag

N

- Nagele R. G., et al. (1998). *Chromosome spatial order in human cells: evidence for early origin and faithful propagation*. Chromosoma 107 (5): 330-8.
- Nagele R. G., et al. (1995). *Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order*. Science 270 (5243): 1831-5.
- Nagele R. G., et al. (1999). *Chromosomes exhibit preferential positioning in nuclei of quiescent human cells*. J Cell Sci 112 (Pt 4): 525-35.
- Nederlof P. M., et al. (1989). *Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences*. Cytometry 10 (1): 20-7.
- Nederlof P. M., et al. (1990). *Multiple fluorescence in situ hybridization*. Cytometry 11 (1): 126-31.
- Nie W., et al. (2001). *Conserved chromosome segments in *Hylobates hoolock* revealed by human and *H. leucogenys* paint probes*. Cytogenet Cell Genet 92 (3-4): 248-53.
- Nomura A., et al. (1996). *Three-dimensional labeling program for elucidation of the geometric properties of biological particles in three-dimensional space*. Exp Cell Res 227 (2): 256-63.

O

- Okada T. A. und Comings D. E. (1979). *Higher order structure of chromosomes*. Chromosoma 72 (1): 1-14.
- O'Keefe R. T., et al. (1992). *Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences*. J Cell Biol 116 (5): 1095-110.
- Ostashevsky J. Y. (2000). *Higher-order structure of interphase chromosomes and radiation-induced chromosomal exchange aberrations*. Int J Radiat Biol 76 (9): 1179-87.

P

- Paddy M. R., et al. (1990). *Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery*. Cell 62 (1): 89-106.
- Parimoo S., et al. (1991). *cDNA selection: efficient PCR approach for the selection of cDNAs encoded in large chromosomal DNA fragments*. Proc Natl Acad Sci U S A 88 (21): 9623-7.
- Pawley J. B., Ed. (1995). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. New York, Plenum.
- Pinkel D., et al. (1988). *Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4*. Proc Natl Acad Sci U S A 85 (23): 9138-42.
- Pinkel D., et al. (1986). *Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A 83 (9): 2934-8.
- Piper J., et al. (1994). *Automatic fluorescence metaphase finder speeds translocation scoring in FISH painted chromosomes*. Cytometry 16 (1): 7-16.
- Popp S., et al. (1993). *A strategy for the characterization of minute chromosome rearrangements using multiple color fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA libraries and YAC clones*. Hum Genet 92 (6): 527-32.

Popp S., et al. (1990). *Distribution of chromosome 18 and X centric heterochromatin in the interphase nucleus of cultured human cells.* Exp Cell Res 189 (1): 1-12.

R

- Raap A. K. (1998). *Advances in fluorescence in situ hybridization.* Mutat Res 400 (1-2): 287-98.
- Raap A. K., et al. (1986). *Denaturation, renaturation, and loss of DNA during in situ hybridization procedures.* Cytometry 7 (3): 235-42.
- Rabl C. (1885). *Ueber Zelltheilung.* Morphologisches Jahrbuch. **10**: 214-330.
- Rappold G. A., et al. (1984). *Sex chromosome positions in human interphase nuclei as studied by in situ hybridization with chromosome specific DNA probes.* Hum Genet 67 (3): 317-25.
- Reichman J. (2000). *Handbook of optical filters for fluorescence microscopy.* Brattleboro, USA, CHROMA INC. (<http://www.Chroma.com/handbook.html>)
- Ried T., et al. (1992). *Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy.* Proc Natl Acad Sci U S A 89 (4): 1388-92.
- Robenek H., Ed. (1995). *Mikroskopie in Forschung und Praxis.* Darmstadt, GIT Verlag GmbH.
- Roberts I., et al. (1999). *Novel method for the production of multiple colour chromosome paints for use in karyotyping by fluorescence in situ hybridisation.* Genes Chromosomes Cancer 25 (3): 241-50.
- Robinson J. P. (2001). *Principles of confocal microscopy.* Methods Cell Biol 63: 89-106.
- Rodman T. C., et al. (1978). *Patterns of association in the human metaphase complement: ring analysis and estimation of associativity of specific chromosome regions.* Hum Genet 41 (1): 19-34.
- Rohlf F. J., et al. (1980). *The use of nonmetric multidimensional scaling for the analysis of chromosomal associations.* Comput Biomed Res 13 (1): 19-35.
- Rouquier S., et al. (1995). *Direct selection of cDNAs using whole chromosomes.* Nucleic Acids Res 23 (21): 4415-20.
- Russ J. C. (1995). *The Image Processing Handbook.* Boca Raton, Florida, CRC Press Inc., US

S

- Sachs L. (1968). *Angewandte Statistik.* Berlin, Springer-Verlag
- Sachs R. K., et al. (2000). *Radiation-produced chromosome aberrations: colourful clues.* Trends Genet 16 (4): 143-6.
- Sachs R. K., et al. (1995). *A random-walk/giant-loop model for interphase chromosomes.* Proc Natl Acad Sci U S A 92 (7): 2710-4.
- Sadoni N., et al. (1999). *Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments.* J Cell Biol 146 (6): 1211-26.
- Saracoglu K. (2001). *Bildanalyse M-FISH markierter Chromosomen und chromosomaler Bereiche in Zellen.* Dissertation. Fakultät für Physik und Astronomie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- Saracoglu K., et al. (2001). *New concepts to improve resolution and sensitivity of molecular cytogenetic diagnostics by multicolor fluorescence in situ hybridization.* Cytometry 44 (1): 7-15.

- Schaefer L. (1997). *Increased spatial resolution by using advanced restoration methods for microscopical data sets*. Microscopical Society of Canada 25 (3): 19.
- Schaefer L. (2000). *Deconvolution algorithm comparison*. Advanced Imaging Methodology Consultation. <http://www.home.golden.net/~lschafer>
- Schaefer L. H., et al. (2001). *Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy*. J Microsc 204 (Pt 2): 99-107.
- Schardin M., et al. (1985). *Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories*. Hum Genet 71 (4): 281-7.
- Schermelleh L., et al. (2001). *Two-color fluorescence labeling of early and mid-to-late replicating chromatin in living cells*. Chromosome Res 9 (1): 77-80.
- Schneiderman C. J. und Smith C. A. B. (1962). *Non-random distribution of certain homologous pairs of normal human chromosomes in metaphase*. Nature 195: 1229-1230.
- Schrock E., et al. (1996). *Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes*. Science.
- Scientific-Volume-Imaging (1999). *The Huygens System 2 Owner's Guide*. Hilversum, Scientific Volume Imaging b.v. (<http://www.svi.nl>)
- Shaw P. J. und Rawlins D. J. (1991). *The PSF of a confocal microscope; its measurement and use in deconvolution of 3D-data*. J Microsc 163 (3): 151-165.
- Shotton D. und White N. (1989). *Confocal scanning microscopy: three-dimensional biological imaging*. Trends Biochem Sci 14 (11): 435-9.
- Skoglund U., et al. (1996). *Maximum-entropy three-dimensional reconstruction with deconvolution of the contrast transfer function: a test application with adenovirus*. J Struct Biol 117 (3): 173-88.
- Solovei I., et al. (2002a). *Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH)*. Exp Cell Res 276 (1): 10-23.
- Solovei I., et al. (2000). *Topology of double minutes (dmins) and homogeneously staining regions (HSRs) in nuclei of human neuroblastoma cell lines*. Genes Chromosomes Cancer 29 (4): 297-308.
- Solovei I., et al. (2002b). *FISH on three-dimensionally preserved nuclei*. FISH. J. Squire, et al. Oxford, Oxford University press. **260**: 255.
- Spaeter M. (1975). *[Non-random position of homologous chromosomes (no. 9 and YY) in interphase nuclei of human fibroblasts (author's transl)]*. Humangenetik 27 (2): 111-8.
- Spector D. L. (1993). *Nuclear organization of pre-mRNA processing*. Curr Opin Cell Biol 5 (3): 442-7.
- Spector D. L. (2001). *Nuclear domains*. J Cell Sci 114 (Pt 16): 2891-3.
- Speicher M. R., et al. (1996). *Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH*. Nat Genet 12 (4): 368-75.
- Speicher M. R. und Ward D. C. (1996). *The coloring of cytogenetics*. Nat Med 2 (9): 1046-8.
- Sperling K. und Ludtke E. K. (1981). *Arrangement of prematurely condensed chromosomes in cultured cells and lymphocytes of the Indian muntjac*. Chromosoma 83 (4): 541-53.

- Stack S. M., et al. (1977). *Visualization of interphase chromosomes*. J Cell Sci 26: 281-99.
- Stelzer E. und Wijnaendts van Resandt R. W., Eds. (1987). *Nondestructive sectioning of fixed and living specimen using a confocal scanning laser microscope: microtomoscopy*. Proc SPIE.
- Stelzer E. H., et al. (1991). *Confocal fluorescence microscopy in modern cell biology*. Semin Cell Biol 2 (3): 145-52.
- Suja J. A., et al. (1997). *Relative distribution of rDNA and proteins of the RNA polymerase I transcription machinery at chromosomal NORs*. Chromosoma 105 (7-8): 459-69.
- Sun H. B., et al. (2000). *Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei*. Biophys J 79 (1): 184-90.

T

- T.I.L.L.-Photonics-GmbH (2001). *TILLvisION - Deconvolution Extension*. Dokumentation. Munich, T.I.L.L. Photonics GmbH.
- Tanabe H., et al. (2002a). *Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications*. Mutat Res 504 (1-2): 37-45.
- Tanabe H., et al. (2002b). *Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates*. Proc Natl Acad Sci U S A 99 (7): 4424-4429.
- Tanke H. J., et al. (1999). *New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: COmbined Binary RAtio labelling*. Eur J Hum Genet 7 (1): 2-11.
- Tashiro S., et al. (1996). *S phase specific formation of the human Rad51 protein nuclear foci in lymphocytes*. Oncogene 12 (10): 2165-70.
- Telenius H., et al. (1992a). *Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer*. Genomics 13 (3): 718-25.
- Telenius H., et al. (1992b). *Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes*. Genes Chromosomes Cancer 4 (3): 257-63.
- Tumbar T. und Belmont A. S. (2001). *Interphase movements of a DNA chromosome region modulated by VP16 transcriptional activator*. Nat Cell Biol 3 (2): 134-9.
- Turner J. N., et al. (1994). *Three-dimensional imaging and image analysis of hippocampal neurons: confocal and digitally enhanced wide field microscopy*. Microsc Res Tech 29 (4): 269-78.

V

- Valdes R., et al. (2002). *Cell-cycle-dependent regulation of CNT1, a concentrative nucleoside transporter involved in the uptake of cell-cycle-dependent nucleoside-derived anticancer drugs*. Biochem Biophys Res Commun 296 (3): 575.
- van Dekken H., et al. (1989). *Three-dimensional analysis of the organization of human chromosome domains in human and human-hamster hybrid interphase nuclei*. J Cell Sci 94 (Pt 2): 299-306.
- van der Voort H. T., et al. (1989). *Three-dimensional visualization methods for confocal microscopy*. J Microsc 153 (Pt 2): 123-32.
- Vazquez J., et al. (2001). *Multiple regimes of constrained chromosome motion are regulated in the interphase Drosophila nucleus*. Curr Biol 11 (16): 1227-39.

- Venter J. C., et al. (2001). *The sequence of the human genome*. Science 291 (5507): 1304-51.
- Verschure P. J., et al. (1999). *Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories*. J Cell Biol 147 (1): 13-24.
- Vishwanath R., et al. (1999). *The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum*. Science 283 (5398): 83-7.
- Visser A. E. und Aten J. A. (1999). *Chromosomes as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei*. J Cell Sci 112 (Pt 19): 3353-60.
- Visser A. E., et al. (2000). *High resolution analysis of interphase chromosome domains*. J Cell Sci 113 (Pt 14): 2585-93.
- Vogel F. und Schroeder T. M. (1974). *The internal order of the interphase nucleus*. Hum Genet 25 (4): 265-97.
- Volm T. (1992). *Gibt es eine größenabhängige Verteilung von Chromosomen in menschlichen Fruchtwasserzellkernen?* Dissertation. Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universität Heidelberg
- Vourc'h C., et al. (1993). *Cell cycle-dependent distribution of telomeres, centromeres, and chromosome-specific subsatellite domains in the interphase nucleus of mouse lymphocytes*. Exp Cell Res 205 (1): 142-51.

W

- Wallace W., et al. (2001). *Workingperson's Guide to Deconvolution in Light Microscopy*. BioTechniques 31: 1076-1097.
- Walter J., et al. (2002). *Chromosome dynamics studied in human cells during cell cycle and recombinational DNA repair*. submitted.
- Wang M. R., et al. (1995). *Rehybridization on metaphases studied previously by FISH. An approach to analyze chromosome aberrations*. Cancer Genet Cytogenet 85 (1): 58-60.
- Warburton D. und Henderson A. S. (1979). *Sequential silver staining and hybridization in situ on nucleolus organizing regions in human cells*. Cytogenet Cell Genet 24 (3): 168-75.
- Warburton D., et al. (1973). *Spatial relations of human chromosomes identified by quinacrine fluorescence at metaphase. I. Mean interchromosomal distances and distances from the cell center*. Humangenetik 18 (4): 297-306.
- Weatley S. und Wang Y.-L. (1998). *Indirect Immunofluorescence Mikroskopie in Cultured Cells*. Animal Cell Culture Methods. J. P. Mather and D. Barnes, Academic Press. **57**: Chapter 18.
- Welcher A. A., et al. (1986). *Selective enrichment of specific DNA, cDNA and RNA sequences using biotinylated probes, avidin and copper-chelate agarose*. Nucleic Acids Res 14 (24): 10027-44.
- Widom J. und Klug A. (1985). *Structure of the 300A chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples*. Cell 43 (1): 207-13.
- Wiegant J. C., et al. (1999). *ULS: a versatile method of labeling nucleic acids for FISH based on a monofunctional reaction of cisplatin derivatives with guanine moieties*. Cytogenet Cell Genet 87 (1-2): 47-52.
- Wienberg J., et al. (1997). *Chromosome painting without competitor DNA*. Tech Tips online: T 40065.
- Wijnaendts van Resandt R. W., et al. (1985). *Optical fluorescence microscopy in three dimensions: microtomoscopy*. J Microsc 138: 29-34.
- Williams B. J., et al. (1995). *Homologous centromere association of chromosomes 9 and 17 in prostate cancer*. Cancer Genet Cytogenet 85 (2): 143-51.

Wollenberg C., et al. (1982). *Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. IX. Arrangement of chromosomes with and without spindle apparatus.* Hum Genet 62 (4): 310-5.

Y

Yokota H., et al. (1995). *Evidence for the organization of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along a random walk path in the human G0/G1 interphase nucleus.* J Cell Biol 130 (6): 1239-49.

Young I. T. (1977). *Proof without prejudice: use of the Kolmogorov-Smirnov test for the analysis of histograms from flow systems and other sources.* J Histochem Cytochem 25 (7): 935-41.

Z

Zhen D. K., et al. (1998). *Poly-FISH: a technique of repeated hybridizations that improves cytogenetic analysis of fetal cells in maternal blood.* Prenat Diagn 18 (11): 1181-5.

Zink D., et al. (1999). *Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories.* Exp Cell Res 247 (1): 176-88.

Zink D., et al. (1998). *Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo.* Hum Genet 102 (2): 241-51.

Zirbel R. M., et al. (1993). *Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries.* Chromosome Res 1 (2): 93-106.

Zorn C., et al. (1979). *Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase.* Exp Cell Res 124 (1): 111-9.

Zucker R. M. und Price O. (2001). *Evaluation of confocal microscopy system performance.* Cytometry 44 (4): 273-94.

Publikationen

- Zink D., **Bolzer A.**, Mayr C., Hofmann W., Sadoni N. und Überla K. (2001). *Mammalian genome organization and its implications for the development of gene therapy vectors*. Gene Therapy and Molecular Biology 6: 1-24.
- Azofeifa J., Fauth C., Kraus J., Maierhofer C., Langer S., **Bolzer A.**, Reichman J., Schuffenhauer S. und Speicher M. R. (2000). *An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH*. Am J Hum Genet 66(5): 1684-8.
- Bolzer A.**, Craig J. M., Cremer T. und Speicher M. R. (1999). *A complete set of repeat-depleted, PCR-amplifiable, human chromosome-specific painting probes*. Cytogenet Cell Genet 84(3-4): 233-40.
- Eils R., Uhrig S., Saracoglu K., Satzler K., **Bolzer A.**, Petersen I., Chassery J., Ganser M. und Speicher M. R. (1998). *An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH)*. Cytogenet Cell Genet 82(3-4): 160-71.
- Uhrig S., **Bolzer A.**, Cleve B. und Speicher M. R. (1997). *Einsatz von Vielfarben-FISH Techniken in der klinischen Diagnostik*. Med Genetik 9: 563-569.
- Bolzer A.**, Melzer R. R. und Bosch T. C. (1994). *A SEM analysis of DMSO treated hydra polyps*. Biol Cell 81(1): 83-6.

Lebenslauf

Name	Andreas Gerhard Bolzer
Geburtsdatum:	03.11.1969
Geburtsort:	München
<i>Schulausbildung:</i>	
09 / 76 - 07 / 80	Grundschule am Lehrer- Götz-Weg München
09 / 80 - 07 / 89	Michaeli-Gymnasium München
Wehrdienst:	09 / 89 - 09 / 90
<i>Hochschulausbildung:</i>	
11 / 90 - 08 / 96	Diplom-Studiengang Biologie an der LMU München
11 / 96 – 03 / 97	Aufbaustudium Informatik an der TU München
seit 03 / 97	Promotionsstudiengang Department Biologie II der LMU München
<i>Praktische Tätigkeiten:</i>	
11 / 93 - 01 / 94	Großpraktikum am Rasterelektronenmikroskop
01 / 94 - 04 / 94	Mitarbeit an einem Forschungsprojekt des MPI Seewiesen in Kamerun über die molekulare Evolution der Buntbarsche
01/ 94 - 12 / 94	Betreuung verschiedener Praktika im zoologischen und genetischen Bereich
11 / 95 - 09 / 96	Molekularbiologische Diplomarbeit am Lehrstuhl für Entwicklungs-biologie der LMU in der Arbeitsgruppe von Prof. David / Bosch
11 / 98	Kurs: 3-D Bildverarbeitung und Visualisierung in der Mikroskopie
10 / 99	Kurs: Einführung in die Systemverwaltung unter UNIX
<i>Veröffentlichungen:</i>	
Biol. Cell (1994) 81, 83-86 und Titelblatt:	"A SEM analysis of DMSO treated hydra polyps"
Med. Genetik 9 (97), 563-569	"Einsatz von Vielfarben-FISH Techniken in der klinischen Diagnostik"
Cytogenet Cell Genet 82 (98), 160-171.	"An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH)"
Cytogenet Cell Genet 84 (99), 233-240	"A complete set of repeat-depleted PCR-amplifiable, human chromosome-specific painting probes"
Am. J. Hum. Genet. 66 (00), 1684-1688	"An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH"
Gene Therapy and Molecular Biology, Vol 6 (01), 1-24	"Mammalian genome organization and its implications for the development of gene therapy vectors"
Diverse Poster auf verschiedenen Kongressen.	
<i>Sprachen</i>	Englisch (fließend in Wort und Schrift), Spanisch (Grundkenntnisse)
<i>Hobbies</i>	Fußball, Bergsteigen, Entomologie