

**Dreidimensionale Analysen der
Chromatinanordnung in normalen und
neoplastischen humanen Kolonepithelzellen
anhand von Paraffinschnitten**

Dissertation

**der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von
Babett Wagler
Januar 2006

Dreidimensionale Analysen der Chromatinanordnung in normalen und neoplastischen humanen Kolonepithelzellen anhand von Paraffinschnitten

Dissertation am Department Biologie II der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dipl. Biol. Babett Wagler

aus Chemnitz

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Cremer

2. Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.08

We don't see things as they are,
we see things as we are.

Anaïs Nin
(französisch-amerikanische Autorin, 1903-1977)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Abkürzungen	8
Zusammenfassung	9
1. Einleitung	11
1.1 Struktur, Funktion und Entartung des menschlichen Kolonepithels	11
1.2 Die dreidimensionale Struktur des Zellkerns	17
1.3 Histologie und Mikroskopie im Spiegel der Geschichte	19
1.4 Artefaktisiken bei der Arbeit mit menschlichem Gewebe	22
1.5 Ziel dieser Arbeit	27
2. Material und Methoden	29
2.1 Geräte	29
2.2 Optische Geräte	29
2.3 Verbrauchsmaterial und Zubehör	30
2.4 Chemikalien und Biochemikalien	31
2.5 Lösungen und Puffer	32
2.6 Software	34
2.7 Gewebeschnitte	34
2.7.1 Entfernung des Paraffins und Rehydrierung des Gewebes	35
2.7.2 Gewebeaufbreitung für Hybridisierungen und Immunhistochemische Färbungen	36
2.7.2.1 Chemische Permeabilisierung und Autofluoreszenzminderung	36
2.7.2.2 Aufbereitung von Gewebeschnitten in der Mikrowelle	37
2.8 Fluoreszenz <i>in situ</i>-Hybridisierung (FISH)	38
2.8.1 Generierung von DNA-Sonden	39
2.8.2 Markierung von DNA-Sonden	40
2.8.2.1 Markierung mittels Nick Translation	40
2.8.2.2 Markierung mittels PCR	41
2.8.3 Sondenpräzipitation und Herstellung der Hybridisierungslösung	42
2.8.4 Hybridisierung von Metaphasepräparaten (2D-FISH)	43
2.8.5 Hybridisierung von Gewebeschnitten	43
2.8.5.1 FISH nach chemischer Gewebeaufbereitung	44
2.8.6 Visualisierung der Hybridisierungsergebnisse	45

2.9	Immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten	47
2.9.1	Färbungen ohne nachfolgende FISH	47
2.9.2	Färbungen mit nachfolgender FISH	48
2.10	Mikroskopie	48
2.10.1	Phasenkontrastmikroskopie	48
2.10.2	Epifluoreszenzmikroskopie	48
2.10.3	Konfokale <i>Laser Scanning</i> -Mikroskopie	48
2.11	Bildbearbeitung, Bildanalyse und Datenevaluierung	49
2.11.1	Bildbearbeitung unter Verwendung der Software ImageJ	49
2.11.2	Bestimmung der relativen Kerngröße mittels ImageJ	50
2.11.3	Bildsegmentierung mittels Amira 3.0 bzw. 3.1.1 (TGS)	50
2.11.4	Bestimmung der Anzahl und des Volumens von Zentromersignalen durch Amira 3.1.1	51
2.11.5	Analyse der relativen radialen DNA-Verteilung mittels 3D-RRD	51
3.	<i>Ergebnisse</i>	52
3.1	Chemische Aufbereitung und Mikrowellenbehandlung von Gewebeschnitten	52
3.2	Segmentierung und Bildbearbeitung	57
3.3	Methodisch bedingte Veränderungen der Chromatintextur, Kernmorphologie und Kerngröße	62
3.4	Die radiale Verteilung von Chromosomen im menschlichen Kolonepithel	67
3.5	Positionierung und räumliche Assoziation von Zentromeren während Differenzierung und Kanzerogenese	77
4.	<i>Diskussion</i>	82
4.1	Zellkernarchitektonische Analysen an Paraffinschnitten erfordern eine flexible Gewebeaufbereitung	83
4.2	Die Mikrowellenbehandlung ist der chemischen Aufbereitung des Gewebes überlegen	86
4.3	Die Evaluierung konfokalmikroskopischer Bilddaten	93
4.3.1	Die Segmentierung des Bildmaterials scheint nur interaktiv möglich zu sein	93
4.3.2	Quantitative Auswertungsverfahren erfordern eine Einflussnahme auf die Rohdaten	96
4.4	Positionierung von Chromosomenterritorien und Zentromeren in humanem Kolonepithel und Karzinomgewebe	97
4.4.1	Die radiale Verteilung von Chromosomenterritorien im Kolonepithel scheint gendichteabhängig zu sein	98

4.4.2	Zentromerpositionierung und Chromozentrenzahl lassen keine Rückschlüsse auf differenzierungsbedingte Änderungen zu _____	100
5.	<i>Ausblick</i> _____	102
6.	<i>Anhang</i> _____	103
	<i>Literaturverzeichnis</i> _____	105

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Epithelstruktur im menschlichen Kolon. _____	12
Abb. 3-1 Immunhistochemischer Nachweis von Mucin-2 in normalem Gewebe des menschlichen Kolonepithels. _____	55
Abb. 3-2 Segmentierungsprozess mittels Amira 3.1 (TGS). _____	58
Abb. 3-3 Konturen verschiedener Segmentierungsergebnisse und Laminfärbung von normalem Kolonepithel. _____	59
Abb. 3-4 Gegenüberstellung der Ergebnisse einer Kernsegmentierung unter Verwendung von ImageJ und Amira 3.1 (TGS). _____	60
Abb. 3-5 Schnittmenge zwischen zwei benachbarten, segmentierten Kernen. _____	61
Abb. 3-6 Bearbeitung des Bildmaterials von Chromosomenterritorien. _____	62
Abb. 3-7 Einzelne Zellkerne aus normalem Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe vor und nach Hitzedenaturierung. _____	64
Abb. 3-8 Methodisch bedingte Veränderungen der Morphologie einzelner Zellkerne in normalem Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe. _____	65
Abb. 3-9 Methodisch bedingte Volumenänderung einzelner Zellkerne in normalem Kolongewebe. _____	66
Abb. 3-10 Unterschiede in der Größe und Morphologie von Zellkernen in menschlichem Kolonkarzinomgewebe. _____	69
Abb. 3-11 Relative radiale DNA-Verteilung der Chromosomenterritorien 18 und 19 in normalem Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe. _____	70
Abb. 3-12 Darstellung der relativen radialen DNA-Verteilung der Chromosomenterritorien 18 und 19 als kumulative Häufigkeitskurven. _____	71
Abb. 3-13 Relative radiale DNA-Verteilung der Chromosomenterritorien 1 und 20 in normalem Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe. _____	73
Abb. 3-14 Die Anordnung von Chromosom 20 in Kolonkarzinomgewebe. _____	73
Abb. 3-15 Relative radiale DNA-Verteilung der Territorien von Chromosom 11 in normalem Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe. _____	76
Abb. 3-16 Relative radiale DNA-Verteilung von Zentromeren in zyklisierenden und differenzierten Zellen des normalen Kolonepithels und in Kolonkarzinomgewebe. _____	79
Abb. 6-1 Darstellung der relativen radialen DNA-Verteilung der Chromosomenterritorien 1, 11, 18, 19 und 20 sowie der Zentromere in normalem und neoplastischem Kolonepithel als kumulative Häufigkeitskurven. _____	104

Abkürzungen

3D	dreidimensional
3D-RRD	<i>3 dimensional relative radial distribution</i>
Abb.	Abbildung
Bio	Biotin
Bp, kb, Mb	Basenpaare, Kilobasenpaare, Megabasenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CT, CTs	Chromosomenterritorium, -territorien
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
Dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, RNA	Desoxyribonukleinsäure, Ribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteres
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
h, min	Stunde(n), Minute(n)
HCl	Salzsäure
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LSM	Laser <i>Scanning</i> Mikroskop
M, mM	Molar, Millimolar
Mm, µm, nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer
mosm	Milliosmol
MUC-2	Mucin-2
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaSCN	Natriumisothiozyanat
NT	Nicktranslation
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PCR, DOP-PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>Degenerate oligonucleotide primed PCR</i>
RT	Raumtemperatur
SSC	Sodium-Saline-Citrate, Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
Tab.	Tabelle
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propandiol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Anordnung von Chromatin in Zellkernen des menschlichen Kolonepithels während zellulärer Differenzierung und Kanzerogenese. Dazu wurden Paraffinschnitte normaler Kolonschleimhaut sowie Kolonkarzinomgewebes einer Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) zum Zweck der Visualisierung spezifischer DNA-Abschnitte unterzogen und nach konfokalmikroskopischer Datenerhebung hinsichtlich der kerninternen, radialen Signalverteilung quantitativ evaluiert.

Dreidimensionale Analysen der Zellkernarchitektur erfordern eine möglichst gute Erhaltung der Kernstruktur. Da sich derartige Untersuchungen meist auf Zelllinien oder primäre menschliche Zellen beschränken und Gewebeschnitte bisher mangels etablierter Techniken kaum in solchen Analysen Verwendung fanden, wurde die Eignung verschiedener Gewebeaufbereitungsmethoden und 3D FISH-Protokolle für Paraffinschnitte menschlichen Kolonepithels und Kolonkarzinomgewebes getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass bereits durch den Experimentator nicht beeinflussbare Parameter, wie etwa die individuell unterschiedliche Beschaffenheit des Gewebes oder die Verwendung nicht eigens für zellkernarchitektonischer Analysen fixierten Gewebematerials, einer erfolgreichen Untersuchung der Zellkernarchitektur entgegenstehen können. Auch die Vorbereitung der Schnittpräparate für Hybridisierungsexperimente sowie deren Durchführung selbst erforderten zum Teil verhältnismäßig harsche Behandlungsmethoden, die sich zerstörerisch auf die Gewebestruktur auswirkten. Die Mikrowellenbehandlung von Gewebe anstelle einer chemischen Aufbereitung gewährleistete eine weitaus bessere Morphologieerhaltung. Diese Technik erlaubte überdies auch die für eine exakte Untersuchung potentieller differenzierungsbedingter Änderungen in der Chromatinanordnung unerlässliche Identifizierung der verschiedenen, im Kolonepithel nebeneinander vorliegenden Epithelzelltypen bzw. Zellpopulationen unterschiedlichen Reifegrades anhand des immunhistochemischen Nachweises spezifischer Markerproteine. Jedoch ließ diese Behandlung die Durchführung von FISH-Experimenten außer im Falle von Zentromerhybridisierungen meist nicht zu, so dass für die Visualisierung von Chromosomenterritorien auf die Gewebe- und Kernmorphologie betreffend, destruktivere chemische Vorbehandlung der Schnittpräparate zurückgegriffen werden musste.

Quantitative dreidimensionale Auswertungen des konfokalen Datenmaterials, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, benötigen einzeln vorliegende Zellkerne. Die in Überlappungen von Kernen resultierende, hohe Kerndichte im Gewebe erforderte daher eine Segmentierung anhand des Bildmaterials der die Kerne repräsentierenden DNA-Gegenfärbung, um die je-

weils interessierenden Zellkerne optisch zu isolieren. Das hierfür eingesetzte interaktive, halbautomatische Verfahren lieferte relativ zuverlässige Resultate und erwies sich gegenüber einer rein manuellen Bildsegmentierung als deutlich überlegen.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Gewebeanalysen scheinen die bisher bekannten Befunde aus Zellkulturmaterial hinsichtlich einer Gendichteabhängigkeit der relativen radialen Positionierung der Chromosomenterritorien innerhalb des Zellkerns zu bestätigen. Im Gegensatz dazu war die bisher vor allem für murine Zelltypen und Gewebe gezeigte Aggregations- und Positionierungsdynamik von Chromozentren im Verlauf der zellulären Differenzierung in humanem Kolonepithel und Karzinomgewebe nicht festzustellen.

1. Einleitung

1.1 Struktur, Funktion und Entartung des menschlichen Kolonepithels

Der etwa 1.5m lange Grimmdarm (*Colon*) stellt den Hauptanteil des Dickdarms, der überdies auch den vorgeschalteten Blinddarm (*Caecum*; 6-8cm) mit dem Wurmfortsatz (*Appendix vermiformis*; 5-8cm) umfasst. Im menschlichen Körper verläuft der Grimmdarm zunächst aufsteigend in der rechten Körperhälfte (*Colon ascendens*), geht danach in einen quer liegenden Abschnitt (*Colon transversum*) über, steigt in der linken Körperhälfte ab (*Colon descendens*) und mündet darauf über die Sigmaschlinge (*Colon sigmoideum*) in den Mastdarm (*Rectum*).

Die primär in der Eindickung des Darminhaltes sowie dessen Transport zum Mastdarm liegende Funktion macht im Kolon die sehr stark Oberflächenvergrößernden Faltungen (Zotten) der Schleimhaut (*Mucosa*) überflüssig, die im Dünndarm die Nährstoffresorption fördern. Die Kolonmukosa besteht aus einer dünnen Muskelschicht (*Muscularis mucosae*), der die bindegewebige *Lamina propria* aufgelagert ist. Diese wiederum ist von einem mit der Außenwelt in Kontakt stehenden, einschichtigen Zylinderepithel bedeckt. Die Schleimhautoberfläche erscheint glatt und besteht aus jeweils polaren absorbierenden Zellen und Schleimsezernierenden Becherzellen (Fenoglio *et al.*, 1975; Kaye *et al.*, 1973; Shamsuddin *et al.*, 1982). Terminal differenzierte absorbierende Zellen (s. Abb. 1-1C, S. 12) sind durch ovale, basal orientierte Kerne einheitlicher Größe gekennzeichnet, die oft Nukleoli aufweisen und deren lange Achse parallel zur Längsachse der Zellen verläuft (Levine & Haggitt, 1989). Die auch als Enterozyten (im Dünndarm) oder Kolonozyten (im Kolon) bezeichneten Zellen stellen den häufigsten epithelialen Zelltyp dar (Brittan & Wright, 2004) und tragen aufgrund ihrer Wasser- und Ionentransport umfassenden Aufgaben an ihrer apikalen, dem Lumen zugewandten Membran einen unregelmäßigen, kurzen Bürstensaum (Mikrovilli). Eine zweite wichtige Funktion des Kolonepithels besteht in der Herstellung und Aufrechterhaltung einer Schleimschicht zum Schutz des Epithels vor Verletzung sowie mikrobiellen Angriffen. Dies wird durch die verstreut im Epithel vorkommenden Becherzellen bewerkstelligt (s. Abb. 1-1C, S.12), die zu diesem Zweck Glykoproteine (Mucine) herstellen, in zytoplasmatischen Granula speichern und bei Bedarf an ihrer apikalen Membran freisetzen. Die basal lokalisierten Kerne dieser Zellen erfahren durch den von den Schleimgranula ausgeübten Druck oft starke Deformationen (Levine & Haggitt, 1989).

Nähere Betrachtungen offenbaren in der Mukosa viele tubuläre Einstülpungen (s. Abb. 1-1A, S. 12), deren Zellzahl durchschnittlich 63 pro Längsseite beträgt und innerhalb eines Individuums relativ konstant ist (Becciolini *et al.*, 1998). Diese in Dünn- und Dickdarmschleimhaut auftretenden Drüsen werden auch als *Glandulae intestinales Lieberkuehni* oder Lieberkühnsche Krypten bezeichnet. Der deutsche Anatom Johann Lieberkühn (1711-1756) beschrieb ihre Struktur und Funktion erstmals im Detail (Lieberkühn, 1745), entdeckt wurden sie jedoch bereits 1688 von Marcello Malpighi (Malpighi, 1690). Während Krypten in gesundem Gewebe in Konfiguration und Abstand zueinander variieren oder auch zu mehreren in einer Schleimhauteinsenkung münden können, sind verzweigte Krypten das Resultat pathologischer Veränderungen (Levine & Haggitt, 1989).

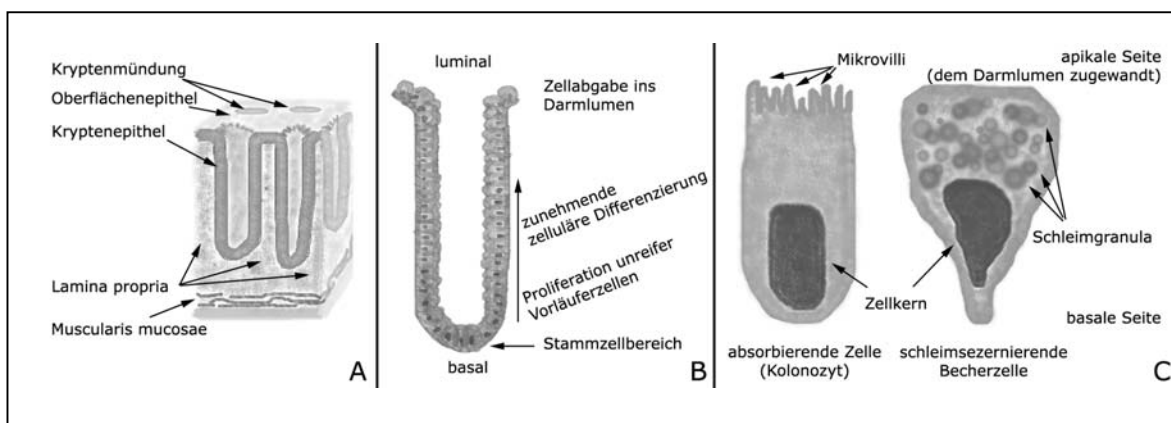


Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Epithelstruktur im menschlichen Kolon.

Teilabbildung A) zeigt eine Übersichtsdarstellung der Kolonmukosa, während Teilabbildung B) die Architektur einer einzelnen Krypte darlegt. Abb. 1-1C) spiegelt die idealisierte Morphologie der beiden vorherrschenden terminal differenzierten Zelltypen absorbierender Kolonozyten und schleimsezernierender Becherzellen wider.

Die Funktion der Krypten besteht in der kontinuierlichen Erneuerung des Epithels, dessen Zellen nach Ablauf ihrer relativ begrenzten Lebensdauer ins Lumen abgegeben werden (Bristol & Williamson, 1984; Eastwood, 1977; Lipkin, 1987). Insgesamt dauert ein Erneuerungszyklus im Kolonepithel etwa drei bis acht Tage (Lipkin, 1987). Die durch diese Aufgabe begründete Notwendigkeit fortwährend verschiedene hochspezialisierte Zelltypen hervorbringen zu müssen, bedingt die Struktur des Kryptenepithels als ein sich selbst erhaltendes, im Fließgleichgewicht befindliches Differenzierungssystem (s. Abb. 1-1B, S. 12). Zu diesem Zweck fügen sich die Zellen innerhalb der Krypte in ein fundamentales Muster hierarchischer Prägung, das durch kontinuierliche Aufwärtmigration der Zellen (Heath, 1996) im Verlauf von Proliferation und Differenzierung zustande kommt. Stammzellen an der Kryptenbasis produzieren dabei unreife Vorläuferzellen, deren Population stark expandiert, bevor diese Zellen schließlich den Zellzyklus verlassen und sich während ihrer

Wanderung zur luminalen Oberfläche zu absorbierenden Zellen, Becherzellen oder seltener enteroendokrinen Zellen entwickeln (Gordon & Hermiston, 1994). Stammzellen definieren sich in diesem Zusammenhang dadurch, dass sie relativ zu den anderen epithelialen Zellen undifferenziert sind, die Fähigkeit zu Proliferation und Selbsterhaltung besitzen, verschiedene spezialisierte Zelltypen erzeugen können und im Verletzungsfall die Regeneration des Gewebes anregen (Potten & Loeffler, 1990). Das hierarchische Kryptenmuster wird anhand verschiedener Methoden, wie etwa immunhistochemischer Analysen, auch visuell zugänglich. So ist das in zyklierenden, nicht aber in ruhenden Zellen exprimierte Protein KI-67 in hohem Maße im basalen Kryptendrittel zu finden, dünnt im mittleren Bereich etwas aus und fehlt im luminalen Drittel schließlich ganz (Johnston *et al.*, 1989). Die stark vereinfachte Beschreibung des Differenzierungsprozesses unterschlägt dessen graduellen Charakter, der eine klare Unterscheidung der verschiedenen Reifestadien sowie die zweifelsfreie Abgrenzung dieser von den Stammzellen erschwert. Auch verfügen Stammzellnachkommen der ersten bis dritten Generation noch über ein ausreichendes Stammzellpotential, um notfalls die Erhaltung bzw. Regeneration der Krypte zu gewährleisten (Booth & Potten, 2000; Potten, 1998). Dies spiegelt ebenfalls die nahtlose Veränderung des zellulären Phänotyps wider.

Die Kryptenarchitektur unterliegt einer vielschichtigen migrationsgekoppelten Regulation, durch welche die Aufrechterhaltung des Stammzellstatus, das Verlassen des Zellzyklus von Vorläuferzellen nach der Proliferationsphase und die Festlegung der verschiedenen Zellschicksale sichergestellt werden. Da sich verschiedene Signalwege in unterschiedlichem Ausmaß an diesen Vorgängen beteiligen, sind die konkreten Aufgaben der einzelnen Akteure schwierig zu definieren und zueinander in Beziehung zu setzen. Vereinfacht ausgedrückt bestimmt jedoch der Wnt-Signalweg über Proliferation oder Differenzierung der Vorläuferzellen, während in einem damit räumlich und zeitlich überlappenden Vorgang Komponenten des Notch-Signalweges die Entscheidung zugunsten der absorbierenden oder sekretorischen Spezialisierung der Zellen fällen (Sancho *et al.*, 2003, 2004). Die durch die Bindung von WNT-Proteinen induzierte Aktivierung ihrer zur *Frizzled*-Familie gehörenden Rezeptoren inhibiert den Abbau von β -Catenin, das daraufhin in den Zellkern wandert und in Verbindung mit Proteinen der TCF/LEF-Familie (*T cell factor/lymphoid enhancer factor*) Zielgene transkriptionell aktiviert (de Santa Barbara *et al.*, 2003; Peifer & Polakis, 2000). Zu diesen gehört auch *c-myc*, dessen Genprodukt durch Unterdrückung der Expression von $p21^{waf1/cip1}$ eine Zellzyklusarretierung verhindert und unter Umständen so zur Erhaltung des proliferativen Kryptenkompartiments beiträgt (Peifer, 2002; van de Wetering *et al.*, 2002). Entfernen sich die Zellen im Zuge ihrer Aufwärtsbewegung aus dem Einflussbereich der vermutlich unterhalb der Krypte lokalisierten, hypothetischen Wnt-Signalquelle, ziehen sie sich zunehmend zugunsten der Differenzierung aus dem

Zellzyklus zurück (Peifer, 2002). Ebenfalls innerhalb der im unteren und mittleren Kryptendrittel befindlichen Region steuert der durch den Transmembranrezeptor Notch vermittelte Signalweg binäre Differenzierungsentscheidungen infolge zellulärer Wechselwirkungen der zu diesem Zeitpunkt noch äquivalenten Vorläuferzellen. Dies wird durch eine simultane Rezeptor- und Ligandenexpression ermöglicht. Relative quantitative Expressionsunterschiede zwischen interagierenden Zellen regen kraft eines Rückkopplungsmechanismus die Bildung von noch mehr Rezeptoren in einem Teil der Zellen an, während der andere Teil eine starke Ligandenvermehrung durchläuft. Große Mengen an Notch aktivieren den entsprechenden Signalweg und resultieren in der Herstellung des Transkriptionsrepressors HES-1 (*Hairy/Enhancer of split-1*) (Kageyama *et al.*, 2000), was das Verbleiben solcher Zellen im Vorläuferstadium nach sich zieht (Skipper & Lewis, 2000). Ihnen steht später nur der absorbierende Weg offen (van Den Brink *et al.*, 2001). Die Liganden tragenden Zellen dagegen erhalten kein Notch-Signal und können daher den andernfalls durch HES-1 unterdrückten Transkriptionsfaktor MATH-1 (*mammalian atonal homolog 1*) produzieren, wodurch eine Festlegung der Zellen auf den sekretorischen Differenzierungsweg erfolgt (van Den Brink *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). Neben der Bestimmung des Zellschicksals ist der Notch-Signalweg auch für die Aufrechterhaltung des Stammzellstatus von Bedeutung. Das Protein MSI-1 (*Musashi-1*) verhindert durch Bindung der mRNA des Inhibitors *numb* eine Signalweghemmung und potenziert darüber hinaus die Promoteraktivität von *hes-1*, was ebenfalls einer Differenzierung entgegen steht (Imai *et al.*, 2001). Immunhistochemische Untersuchungen offenbarten überwiegend im unteren Kryptenteil verstreut liegende MSI-1 positive Zellen zwischen den Zellpositionen 1 und 10, wobei die Verteilung bei den Positionen 3 bis 4 gipfelte und somit meist unterhalb des proliferativen Kompartiments liegt (Nishimura *et al.*, 2003). Dieses umfasst nach BrdU-Markierungen etwa die Region zwischen den Positionen 4 und 43, wobei das Maximum bei Zellposition 15 liegt (Potten *et al.*, 1992). MSI-1 scheint daher zur Markierung von intestinalen Stammzellen geeignet zu sein, wenn auch die Anzahl positiver Zellen mit etwa 19 pro Krypte relativ hoch ist, und die Färbung von Stammzellnachkommen nicht völlig ausgeschlossen werden kann (Nishimura *et al.*, 2003). Dennoch kann der Nachweis von MSI-1 in Kombination mit einer basisnahen Lokalisation der Zellen die Interpretation von Gewebeschnittdaten enorm erleichtern, da dies zumindest ein objektives Unterscheidungskriterium darstellt. Morphologische Eigenschaften sowie Lokalisierung einer Zelle innerhalb der Krypte allein sind hingegen viel unzuverlässigere Merkmale, da die Stammzellen mit ihren noch verhältnismäßig undifferenzierten Nachkommen vermutlich die embryonalen Züge teilen. Diese äußern sich in einem im Verhältnis zum Zytoplasma großen Zellkern, diffus erscheinendem Chromatin und relativ großen Nukleoli (Karam, 1995; Leblond, 1981).

Langlebigkeit und Teilungsaktivität der Stammzellen bilden die Voraussetzung für die stetige Erneuerung des stark beanspruchten Kolonepithels, bergen aber auch das Risiko der Gewebeentartung. Störungen der homöostatischen Proliferationsmechanismen dieser Zellen können das Gleichgewicht von Zellneubildung an der Kryptenbasis und apoptotischem Zellverlust an der Schleimhautoberfläche zugunsten des Nettozuwachses von Zellen (Neoplasie) verschieben und als Spätfolge schließlich Karzinome nach sich ziehen. Diese Bezeichnung für Krebsgeschwüre geht auf Hippokrates (460-370 v. Chr.) zurück, der sich durch das solide Zentrum des Tumors und seine dornenartigen Fortsätze an das Krustentier erinnert fühlte. Kolorektale Karzinome stellen den Endpunkt eines komplexen, progressiven und noch nicht völlig entschlüsselten Prozesses dar. In dessen langwierigem Verlauf werden klinisch und histologisch definierbare Stadien vom gutartigen Polyp bis hin zum bösartigen, metastasierenden Karzinom durchlaufen (Morson, 1974). Die normale Epithelstruktur geht dabei zunehmend in einen chaotischen Zustand über und verschwindet schließlich ganz. Der folgende Abschnitt soll den Vorgang der Kanzerogenese sowie seine Begleiterscheinungen lediglich kurz beleuchten, nicht aber in allen Einzelheiten erklären.

Tumore im Kolon werden am häufigsten durch Veränderungen von Komponenten des Wnt-Signalwegs initiiert (Grady & Markowitz, 2002). Hierbei kommt dem vielseitigen *Adenomatous Polyposis Coli*-Protein (APC) eine besondere Bedeutung zu. Es fungiert bei der Kontrolle der Zellproliferation im Kolon als Torwächter oder *gatekeeper* (Kinzler & Vogelstein, 1996), der unter anderem durch Kontrolle des Abbaus von β -Catenin auf den Wnt-Signalweg Einfluss nimmt und auf diese Weise das balancierte Verhältnis zwischen Zellzuwachs und Zellverlust aufrechterhält. Kann das APC-Protein dieser Aufgabe nicht nachkommen, stellt sich aufgrund der fehlenden Degradierung von β -Catenin und der daraus folgenden permanenten Signalwegaktivierung ein Wachstumsförderndes Ungleichgewicht ein. In einem verkürzten Protein resultierende Mutationen des *apc*-Gens treten in etwa 80% der sporadischen kolorektalen Tumore auf und sind ein sehr frühes Ereignis in der Kanzerogenese (Bach *et al.*, 2000). Tatsächlich kann die Inaktivierung von APC bereits in adenomatösen Krypten (*dysplastic aberrant crypt foci*), den frühesten neoplastischen Veränderungen nachgewiesen werden (Jen *et al.*, 1994). Bei diesen handelt es sich wahrscheinlich um die Vorläufer von gutartigen Adenomen oder adenomatösen Polypen, die jedoch durch Anhäufung weiterer Mutationen ein malignes Potential entwickeln und zur Bildung von Karzinomen führen können. Neben der Beteiligung am Wnt-Signalweg spielt das APC-Protein auch bei der Zellmigration und -adhäsion eine Rolle, indem es regulierend auf die Organisation des Zytoskeletts wirkt (Dikovskaya *et al.*, 2001; Narayan & Roy, 2003). Epitheliale Zellen zeigen im Falle des Funktionsverlustes von APC ein gestörtes Migrationsverhalten, das von einer Abwärtswanderung innerhalb der Krypte

geprägt ist (Moss *et al.*, 1996). Darüber hinaus scheint mutiertes APC seine Fähigkeit verloren zu haben, in mitotischen Zellen eine korrekte Verbindung zwischen Spindelmikrotubuli und Kinetochoren herzustellen (Narayan & Roy, 2003), was eine fehlerhafte Chromosomensegregation begünstigt und somit Aneuploidien Vorschub leistet (Fodde *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2001). Derartige Abweichungen von der normalen Chromosomenzahl aufgrund asymmetrischer Mitosen in Tumorzellen wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts von David von Hanseemann (1858-1920) beschrieben (Hanseemann, 1890). Theodor Boveri betrachtete den fehlerhaften Chromosomenbestand als ursächlich für das Tumorstadium (Boveri, 1914). Überdies stellte er etliche bemerkenswerte und zum Teil erst sehr viel später verifizierte Hypothesen auf, wie beispielsweise das Vorhandensein „Teilungshemmender Chromosomen“ sowie deren Verlust im Verlauf der Tumorentstehung oder die Abstammung der Tumorzellen von normalen Zellen (Wunderlich, 2002). Die Theorie der Aneuploidie als krebserregender Faktor ist zwar auch heute noch Gegenstand von Analysen (Duesberg *et al.*, 2000), wurde aber größtenteils von der Annahme akkumulierender Genmutationen als Tumorerregender abgelöst. Dennoch stellt der Verlust der genomischen Stabilität ein weiteres frühes Schlüsselereignis während der Kanzerogenese dar (Lengauer *et al.*, 1998). Er äußert sich in zwei phänotypisch unterschiedlichen Varianten. Dabei handelt es sich zum einen um die bereits erwähnte, Aneuploidien nach sich ziehende Chromosomeninstabilität (CIN) aufgrund numerischer oder struktureller Aberrationen, in deren Folge Onkogene häufig amplifiziert werden, und Tumorsuppressorgene oft verloren gehen. Der zugrunde liegende, ursächliche Mechanismus ist komplex und noch nicht restlos verstanden. Viel seltener kommt es stattdessen zu einer Mikrosatelliteninstabilität (MIN), die das Resultat einer defekten Fehlpaarungsreparatur von Nukleotiden ist (*Mismatch Repair*, MMR). Die genetische Instabilität scheint nach der Adenomentstehung, aber vor dem Erwerb der malignen Eigenschaften aufzutreten und erlaubt die Akkumulation genetischer Veränderungen, welche die Tumorbildung sowie das Fortschreiten der Krankheit vorantreiben (Grady & Markowitz, 2002). Die Untersuchung zweier verschiedener erblicher Formen von Kolonkarzinomen beleuchtet die Rolle der beiden genannten Instabilitätsvarianten bei der Kanzerogenese. Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) repräsentiert den CIN-Typ, folgt einem autosomal dominanten Vererbungsmuster und wird durch Mutationen im *apc*-Gen verursacht. Das drastisch gesteigerte Krebsrisiko der Betroffenen ist die Folge der Entstehung hunderter bis tausender von Polypen in der zweiten und dritten Lebensdekade, die insgesamt die Entartungswahrscheinlichkeit stark erhöhen und dadurch die Tumorentstehung beschleunigen (Kinzler & Vogelstein, 1996). *Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer* (HNPCC) resultiert aus erblichen Mutationen in Genen des MMR-Komplexes, wie beispielsweise *hms2* und *hmlh1*, und verkörpert demzufolge den MIN-Typ. Die Betroffenen weisen keine

größere Anzahl an Adenomen als gesunde Individuen auf. Die Anhäufung von Mutationen erfolgt jedoch aufgrund des Reparaturdefekts zwei- bis dreimal schneller und zieht ein beschleunigtes Fortschreiten vom benignen Adenom zum malignen Karzinom nach sich (Kinzler & Vogelstein, 1996).

Die beschriebenen genetischen und biochemischen Irrungen im Verlauf der Kanzerogenese gehen mit charakteristischen, diagnostisch relevanten morphologischen und architektonischen Veränderungen im Zellkern einher. Da auch während des normalen Differenzierungsprozesses dynamische Anpassungen auftreten, kann eine nähere Betrachtung dieses Zellorganells lohnend sein.

1.2 Die dreidimensionale Struktur des Zellkerns

Der Zellkern integriert Informationen aus dem Zellinneren sowie der Außenwelt und steuert das Verhalten der Zelle gemäß den jeweiligen Erfordernissen. Seine Architektur ist von einer dynamischen Stabilität geprägt, welche die für Wachstums- und Differenzierungsvorgänge notwendige Flexibilität funktionaler Kerndomänen und die ebenso essentielle Aufrechterhaltung einer geordneten Kernstruktur gleichermaßen gewährleistet. Die komplexen Zusammenhänge zwischen der dynamischen Zellkernarchitektur und den verschiedenen Vorgängen im Kern sind bis heute nicht verstanden. Jedoch wurden Vermutungen bezüglich der zentralen Rolle dieses Zellorganells schon vor mehr als 165 Jahren angestellt. Matthias Schleiden (1804-1881) schrieb dem Zellkern eine wichtige Funktion bei der Entstehung von Zellen zu und sah in ihm den „Zellbildner“ (Schleiden, 1838). Die wirkliche Bedeutung des Nukleus für die Zellteilung offenbarte sich jedoch erst in den 70er Jahren des 19. Jahrhunderts, da der Kern seine Struktur aufgrund der begrenzten Anzahl histologischer Farbstoffe und der relativ geringen optischen Qualität der Mikroskope nur zögerlich preisgab. William Henry Perkin (1838-1907) revolutionierte 1856 die Färbindustrie und lieferte auch der Entwicklung der Mikroskopie wichtige Impulse, als er bei dem Versuch der Chininherstellung aus Steinkohlenteer unbeabsichtigt den ersten synthetischen Farbstoff (Anilinpurpur, auch bekannt als Mauve oder Mauvein) erzeugte (Garfield, 2000). In der Folge erlaubten die sich rasch entwickelnden histologischen Färbemethoden zunehmend die lichtmikroskopische Betrachtung zellulärer Momentaufnahmen. Walther Flemming (1843 - 1905) führte für die Farbstoffabsorbierende Substanz im Zellkern den Begriff *Chromatin* ein, beschrieb die Längsteilung dieser Strukturen im Verlauf der Kernteilung und prägte 1882 den Ausdruck *Mitose* (Flemming, 1882). Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz (1836-1921) bezeichnete das färbbare fadenartige Kernmaterial 1888 als *Chromosomen*. Der Beginn des 20. Jahrhunderts sah die Synthese zwischen den akkumulierten botanischen und zoologischen Forschungsergebnissen bezüglich des Verhaltens und der

Struktur von Chromosomen sowie den wiederentdeckten Vererbungsregeln Mendels, an der Theodor Boveri (1862-1915) maßgeblich beteiligt war (Cremer T., 1985; Schulz, 2000). Er verknüpfte eigene Beobachtungen an Seeigeleiern sowie Befunde von Thomas Harrison Montgomery (1873-1912) und Walter Stanborough Sutton (1877-1916) an Insekten mit den Mendelschen Regeln und leitete daraus die Theorie der Chromosomenindividualität ab (Boveri, 1904, 1909). In Verbindung mit Carl Rabls Theorie der Kontinuität der Chromosomen (Rabl, 1885) begründete diese Hypothese das Konzept der territorialen Organisation der Chromosomen während der Interphase. Hinweise für dessen tatsächliche Gültigkeit lieferten jedoch erst UV-Mikrobestrahlungsexperimente mehr als 60 Jahre später (Cremer T. *et al.*, 1984; Cremer T. *et al.*, 1982; Zorn *et al.*, 1979; Zorn *et al.*, 1976). Die Verwendung chromosomenspezifischer Sonden in Hybridisierungsexperimenten erbrachte schließlich die endgültige Bestätigung individueller Chromosomenterritorien (CTs) im Interphasekern (Cremer T. *et al.*, 1988; Lichter *et al.*, 1988; Pinkel *et al.*, 1988), die einander wahrscheinlich nur marginal überlappen (Visser & Aten, 1999). Detaillierte Untersuchungen in der Folgezeit enthüllten auch innerhalb der CTs ein geordnetes Muster, das durch distinkt vorliegende chromosomale Subdomänen, wie beispielsweise Chromosomenarme oder -banden zustande kommt (Dietzel *et al.*, 1998; Visser & Aten, 1999).

Neben der organisierten Struktur der CTs trägt ferner deren nicht zufällige Positionierung innerhalb des Zellkerns zu dessen hoch geordnetem Erscheinungsbild bei. Chromosomen zeigen bezüglich ihrer radialen Anordnung relativ zum Kernmittelpunkt deutliche Präferenzen, während sie im Hinblick auf ihre direkten Nachbarn keine besonderen Vorlieben aufzuweisen scheinen. Genreiche Chromosomen bevorzugen interne Bereiche, Genarmut geht dagegen mit einer peripheren Lokalisation einher (Boyle *et al.*, 2001; Cremer M. *et al.*, 2001; Croft *et al.*, 1999). Besonders deutlich wird dies anhand der menschlichen Chromosomen 18 und 19, die bei ähnlichem DNA-Gehalt (76 bzw. 64Mbp) eine sehr unterschiedliche Gendichte (5.2 bzw. 24.9 Gene pro Mb¹) haben. In der Tat scheint es sich bei Chromosom 18 um das genärmste aller Chromosomen zu handeln (Nusbaum *et al.*, 2005), während Chromosom 19 das genreichste ist (Grimwood *et al.*, 2004). Auch in anderen Primatenarten zeigen homologe Abschnitte der beiden Chromosomen dieses Positionierungsverhalten, obwohl sich im Verlauf der Evolution teilweise sehr ausgeprägte und komplexe Karyotypveränderungen ereignet haben (Tanabe *et al.*, 2002). Dennoch weisen nicht alle Zelltypen ein von der Gendichte des jeweils betrachteten Chromosoms abhängiges radiales Verteilungsmuster auf. In menschlichen Fibroblasten und Fruchtwasserzellen nehmen kleinere Chromosomen eher

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>

interne Positionen ein, während größere Chromosomen die Kernperipherie bevorzugen (Bolzer *et al.*, 2005; Cremer M. *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2000). Eine weitere wichtige Rolle in der Zellkernarchitektur spielen neben den territorial geordneten und nicht zufällig radial positionierten CTs die Zentromere, für die eine organisierende Funktion bei der räumlichen Chromatinanordnung vermutet wird (Haaf & Schmid, 1991; He & Brinkley, 1996). Sie zeigen ein dynamisches Verhalten, das sowohl zellzyklusabhängig als auch differenzierungsbedingt sein kann. Im Verlauf der G1-Phase und der frühen S-Phase verlassen die Zentromere den zentralen Kernbereich und lagern sich in der Peripherie zu Trauben zusammen, während in der späten S-Phase und der G2-Phase ein umgekehrtes Verhalten zu beobachten ist (Solovei *et al.*, 2004b). Die periphere Positionierung und die durch räumliche Assoziation von Zentromeren entstehenden Chromozentren treten am deutlichsten in Zellen zutage, die sich in der G0-Phase befinden oder/und terminal differenziert sind (Solovei *et al.*, 2004b). Jedoch offenbaren Zentromere auch in postmitotischen und sich differenzierenden Zellen eine Positionierungs- und Aggregationsdynamik. So geht die Reifung postmitotischer Purkinjezellen des Mauskleinhirns mit einer abnehmenden Anzahl an Chromozentren sowie einer Verlagerung dieser Zentromeraggregate von der Kernperipherie ins Innere des Kerns einher, wo sie eine perinucleoläre Position einnehmen (Manuelidis, 1985; Martou & De Boni, 2000; Solovei *et al.*, 2004a). Auch während der Differenzierung muriner Myoblasten zu Myotuben sinkt die Anzahl an Chromozentren, wobei ihr Volumen gleichzeitig zunimmt (Brero *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu den Befunden bezüglich der dynamischen Positionierung von Zentromeren, basieren die oben beschriebenen Befunde hinsichtlich der radialen Anordnung von Chromosomen auf Untersuchungen von Zelllinien oder primären menschlichen Zellen. Die mikroskopische Analyse menschlichen Gewebes ist nach wie vor problematisch, obwohl die Anfänge derartiger histologischer Untersuchungen bereits etwa 150 Jahre zurückliegen.

1.3 Histologie und Mikroskopie im Spiegel der Geschichte

Die nach modernem Verständnis wissenschaftliche Analyse menschlicher Gewebe begann in der als Renaissance bezeichneten Übergangsepoche vom Mittelalter zur Neuzeit (ca. 1400-1600). Mit der Wandlung des *Viator mundi* (Pilger zur himmlischen Heimat) zum *Faber mundi* (Schöpfer und Beherrscher der Welt) stellte sich ein grundlegend anderes Lebensgefühl als im europäischen Mittelalter ein (Kinder & Hilgemann, 1964). Dies ging mit einer Hinwendung zum Diesseits, zur Welt und zum Menschen einher und leistete durch Überwindung der vorbehaltlosen Autoritätsgläubigkeit auch naturwissenschaftlichen Methoden im heutigen Sinne Vorschub. Als ein herausragender

Vertreter jener Ära und Wegbereiter der modernen Anatomie sei hier der belgische Anatom Andreas Vesalius (1514-1564) genannt. Seine genau dokumentierten Sektionen menschlicher Körper enthüllten über 200 Irrtümer des damals tonangebenden Galen von Pergamon (129-201 v. Chr.) und legten den Grundstein für eine Anatomie, die nicht länger auf Analogieschlüssen aus Tiersektionen beruhte (Tan & Yeow, 2003).

Eine systematische Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Krankheitssymptomen und Autopsiebefunden erfolgte erst im 18. Jahrhundert. Giovanni Battista Morgagni (1682-1771) identifizierte die pathologische Veränderung von Organen als Krankheitsauslösenden Faktor. Marie-Francois-Xavier Bichat (1771-1802), der „Vater der Histologie“, definierte Gewebe, Organe und Organsysteme als anatomische Organisationsstufen und erweiterte Morgagni's Ausführungen um die Erkenntnis, dass Organerkrankungen die Folge von Läsionen einzelner Gewebe innerhalb des betroffenen Organs sind. Mit Rudolf Virchow (1821-1902) erreichte die Pathologie schließlich die zelluläre Ebene (Virchow, 1858), was allerdings erst durch Überwindung technischer Limitierungen möglich werden konnte. Dies war im Prinzip bereits mit der Erfindung des eine Objektiv- und eine Okularlinse enthaltenden, zusammengesetzten Mikroskops um 1600 gegeben. Jedoch geschieht die Entwicklung in Richtung eines lediglich retrospektiv definierbaren Endpunkts nicht zielgerichtet, sondern wird von zufälligen Parametern beeinflusst, durch technische Fortschritte angeschoben oder durch Beschränkungen verzögert. Auch erfolgt Wissenszuwachs durch Einzelbeobachtungen, die sich zu einem Gesamtbild verdichten und in der Formulierung eines allgemeinen Konzepts gipfeln. Ein Beispiel hierfür ist die 1839 von Matthias Schleiden und Theodor Schwann etablierte Zelltheorie, deren Entwicklung im Grunde schon 1665 mit der Prägung des Begriffs *cellulae* für die „Kämmerchen“ in einer mikroskopisch betrachteten Korkscheibe durch den brillanten englischen Wissenschaftler Robert Hooke (1635-1703) ihren Anfang nahm. Dieser veröffentlichte in seiner einflussreichen *Micrographia* Beschreibungen und Zeichnungen mikroskopischer Beobachtungen und Experimente (Hooke, 1665). Nicht nur wissenschaftlich wertvoll, sondern aufgrund der lebendigen, einfachen Sprache und der neuartigen bildhaften Darstellung auch überaus populär, begründete die *Micrographia* möglicherweise die Tradition der visuellen Wissensvermittlung und inspirierte viele Menschen (Chapman, 1996). So auch den holländischen Tuchhändler Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723), dessen lediglich eine Sammellinse enthaltende, einfache Mikroskope bis zu 266fach vergrößerten und folglich eine Auflösung von 1.35µm erreichten, was jedoch mit einer winzigen Linsengröße und einer geringen Brennweite von 9mm einherging. Neben vielen eindrucksvollen Entdeckungen lieferte er 1700 vermutlich die erste Beschreibung von Zellkernen, die er als klare, helle Zone in Fischblutzellen wahrnahm (Baker, 1948; Ford, 1992). Der schottische Botaniker Robert Brown (1773-

1858) erkannte in diesem Merkmal einen wesentlichen Bestandteil von Pflanzenzellen und prägte dafür den Begriff *Nukleus* (Brown, 1831).

Obwohl die Bedeutsamkeit des Mikroskops für viele wegweisende Entdeckungen in der biomedizinischen Forschung außer Frage steht, avancierte es nicht sofort zu dem heute so geschätzten Hilfsmittel. Abbildungen durch Linsen sind in Abhängigkeit von Vergrößerung und verwendeter Linsenanzahl mehr oder minder stark fehlerbehaftet, was zunächst nicht kompensiert werden konnte und die Geltung mikroskopischer Beobachtungen stark beeinträchtigte. Die Etablierung zusammengesetzter Mikroskope wurde besonders durch sphärische und chromatische Abbildungsfehler lange verzögert. Erstere äußern sich in Unschärfe, während Letztere aufgrund der wellenlängenabhängigen Brechung des Lichts in Farbsäumen an den Objekträndern resultieren. Eine weitgehende Korrektur kann durch Verwendung insgesamt sammelnder Linsensysteme aus verschiedenen Glassorten unterschiedlicher optischer Eigenschaften erzielt werden. Elementar hierfür sind jedoch das Verstehen der ursächlichen optischen Phänomene sowie die Verfügbarkeit verschiedener Glassorten, was erst etwa Mitte des 18. Jahrhunderts erfüllt war. Ein achromatisches Linsensystem, das rote und blaue Lichtstrahlen in einem Brennpunkt zusammenführt, wurde 1774 von Benjamin Martin (1704-1782) realisiert. Den entscheidenden Impuls zur Abkehr von der durch Versuch und Irrtum geprägten Mikroskopherstellung lieferte die von dem deutschen Physiker Ernst Abbe entwickelte Theorie der Bildentstehung am Mikroskop (Abbe, 1873) sowie seine Berechnung apochromatischer Objektive, die drei Wellenlängen in einem Brennpunkt vereinigen. Kombiniert mit der Verwendung von Immersionsöl mit einem glasähnlichen Brechungsindex (1878) verschob sich das Auflösungsvermögen des klassischen, zusammengesetzten Mikroskops schließlich bis an das theoretische Limit von etwa $0.2\mu\text{m}$. Das von August Köhler (1866-1948) entwickelte Beleuchtungsverfahren (Köhler, 1893) ermöglichte zudem eine homogene Objektabbildung mit maximaler Helligkeit bei optimalem Kontrast. Inzwischen ermöglichen neue Entwicklungen eine lichtmikroskopische Auflösung, die das Abbe-Limit unterschreitet (Wells, 2004).

Im Zuge der Mikroskopentwicklung verbesserten sich auch Gewebepräparation und Schnittherstellung, die ihrerseits Impulsgeber für die Mikroskoptechnologie waren. Der deutsche Pathologe Edwin Klebs verwendete 1869 erstmals Paraffin zur stabilisierenden Einbettung von Gewebe. Die Präparationstechnik bestand ursprünglich aus dem Eintauchen des meist alkoholfixierten Gewebes in Paraffin, ohne die heute übliche Infiltration des gesamten Gewebes. Derart präpariert wurde es in einen Wachsblock eingesetzt, um die Schnitthanfertigung zu erleichtern. Im Prinzip blieb das Verfahren ohne grundlegende Änderungen und stellt heute, kombiniert mit der Formaldehydfixierung, die gebräuchlichste Methode der histologischen Gewebepräparation dar. Das Fixierungspotential von Formaldehyd wurde 1893 von dem deutschen Mediziner Ferdinand Blum

entdeckt, als er dessen antiseptische Eigenschaften untersuchte und dabei zufällig die „härtende“ Wirkung auf Gewebe bemerkte. Es wies dieselbe Konsistenz wie nach einer Alkoholfixierung auf, war jedoch weniger stark geschrumpft (Blum, 1893, 1894). Erstmals war eine reproduzierbare Fixierung vieler Gewebearten, ohne die Zerstörung zellulärer Strukturen durch Präzipitationsprodukte möglich (Fox *et al.*, 1985). Das Mikrotom (1858) erlaubte zunehmend die Herstellung dünnerer Schnitte. Dies verbesserte die Auflösung histologischer Details, reduzierte jedoch den Kontrast. Die durch die noch geringe Anzahl geeigneter Farbstoffe limitierte, aber bereits zu Demonstrationszwecken angewandte Gewebefärbung war eine Möglichkeit, sichtbaren Kontrast einzuführen. Ab etwa 1850 waren zahlreiche neue Farbstoffe verfügbar, die aufgrund spezifischer Farbstoffaffinitäten zu Zellstrukturen neue Analysemöglichkeiten eröffneten. Kontrastverbesserungen ließen sich später auch anders erzielen, wie beispielsweise durch Phasenkontrast (Zernike, 1935) oder Fluoreszenz. 1941 gelang die Herstellung des ersten Antikörper-Fluorochrom-Konjugats (Coons *et al.*, 1941). Fluoreszenzmikroskope wurden ab etwa 1960 hergestellt und trieben die Entwicklung der Immunfluoreszenz voran.

Die Bewahrung der natürlichen dreidimensionalen Struktur macht den Reiz von Gewebeschnitten aus. Bei Anfärbung der Zellen innerhalb eines dicken Gewebeschnittes verhinderte jedoch Streulicht das Erkennen der Strukturen. Die Lösung dieses Problems inspirierte Marvin Minsky 1955 zur Erfindung des konfokalen Mikroskops (Minsky, 1988). Leider blieb diese Innovation fast 30 Jahre relativ unbeachtet und konnte sich erst durch Fortschritte der Computer- und Lasertechnologie endgültig etablieren (Brakenhoff *et al.*, 1985; Cremer C. & Cremer, 1978). Dennoch unterliegt die Arbeit mit Gewebeschnitten nach wie vor etlichen Einschränkungen. Die notwendige, im Vergleich zu kultivierten Zellen relativ harsche Behandlung des Gewebes bringt Artefaktisiken mit sich und kann sowohl die Datenerhebung als auch die Ergebnisinterpretation beträchtlich erschweren. Auch ist die Evaluierung des Bildmaterials erst nach Anwendung interaktiver Segmentierungsverfahren möglich, was der Objektivität und Vergleichbarkeit der Ergebnisse abträglich ist.

1.4 Artefaktisiken bei der Arbeit mit menschlichem Gewebe

Eingedenk der durch interindividuelle Unterschiede bedingten Heterogenität des Gewebes sowie der Vielzahl an Einfluss nehmenden Parametern während des chirurgischen Eingriffs, der Präparation und der Durchführung von Experimenten können an Gewebeschnitten erhobene Daten lediglich näherungsweise die tatsächlichen Verhältnisse widerspiegeln. Obwohl deshalb eine völlige Vermeidung von Artefakten unmöglich ist, kann im Einzelfall die erzielte Annäherung an die Realität vollkommen ausreichend sein. Nicht jede durch die

Behandlung des Gewebes induzierte Veränderung verursacht zwangsläufig Fehlinterpretationen des Datenmaterials. Die Möglichkeit der Entstehung von Artefakten kann im Falle von menschlichem Gewebe schon durch den chirurgischen Eingriff gegeben sein. Die notwendige Unterbindung der Blutzufuhr zieht eine Sauerstoffunterversorgung des Gewebes nach sich. Diese und andere Parameter, wie etwa Änderungen des pH-Wertes, können zu Veränderungen in der Genexpression führen (Srinivasan *et al.*, 2002). Das Ausmaß der so induzierten Veränderungen könnte innerhalb des Gewebeblocks zunehmen, da die intern lokalisierten Zellen dem Sauerstoffmangel aufgrund der verzögerten Penetration des Fixativs länger ausgesetzt sind. Des Weiteren könnte es im Zellkern zu einer Änderung der Kondensierung und Anordnung des Chromatins kommen. Diese Faktoren sind durch die klinischen Anforderungen festgelegt und liegen demzufolge außerhalb des Einflussbereiches eines Experimentators. Sie müssen jedoch bei der Interpretation von Ergebnissen berücksichtigt werden.

Ziel jeder Fixierung ist die dauerhafte Konservierung des Gewebes mit einer möglichst lebensnahen Strukturhaltung durch die Immobilisierung von Zell- bzw. Kerninhalten. Da bald nach dem Zelltod die autolytische Zerstörung des Gewebes einsetzt, sollte sich die Fixierung möglichst direkt an die chirurgische Entnahme anschließen. Verzögerungen begünstigen proteolytischen Abbau, der in unspezifischer Antikörperbindung und schwacher oder fehlender Färbung bei immunhistochemischen Experimenten resultieren kann (Werner *et al.*, 2000). In unfixiertem Gewebe können überdies Diffusionsvorgänge Lokalisationsveränderungen von Zellinhalten bewirken, was fehlende oder diffuse Signale zur Folge haben kann (Berod *et al.*, 1981). Der durch diese Ansprüche begründeten Forderung nach einer raschen und kompletten Fixierung stehen die Notwendigkeit der Zugänglichkeit des Gewebes für Reagenzien sowie die Erhaltung der Nachweisbarkeit von Gewebestandteilen (Antigenen) gegenüber. Beides ist bei einem niedrigeren Fixierungsgrad besser erfüllt. Demnach stellt die optimale Fixierung stets eine Kompromisslösung dar, die jedoch in der pathologischen Praxis unmöglich für jedes Gewebe individuell bestimmt werden kann. Andererseits ist aus Gründen der Vergleichbarkeit die Standardisierung der Fixierungsqualität unerlässlich. Beispielsweise hängen Texturanalysen von reproduzierbaren und identischen Färbeeigenschaften der Zellen und Kerne innerhalb des untersuchten Gewebes ab, was aber für viele formaldehydfixierte Präparate nicht notwendigerweise gegeben ist (Fox *et al.*, 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich formaldehydfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe verwendet. Daher befassen sich die folgenden Abschnitte lediglich mit diesem Fixativ. Formaldehydlösungen penetrieren Gewebe schnell und relativ unabhängig von der Konzentration (Medawar, 1941). Vor Ort resultiert die verhältnismäßig langsame Fixierung im Grunde aus dem Zusammenspiel zweier chemischer Vorgänge. Dies ist zum einen die Reaktion

von Formaldehydmolekülen mit Gewebekomponenten, die unter anderem die für die Immobilisierung ausschlaggebende Vernetzung bewirkt. Dabei werden in einer ersten reversiblen Reaktion primäre Amine ($R-NH_2$) an Formaldehyd addiert, wodurch zunächst sehr labile Aminomethylolderivate ($R-NH-CH_2OH$) entstehen (Puchtler & Meloan, 1985). Diese reagieren weiter zu Iminen (Schiff-Basen; $R-N=CH_2$), die bei geeigneten sterischen Bedingungen in einer langsameren Sekundärreaktion mit Amid- oder zahlreichen anderen funktionellen Gruppen zu stabilen Methylenbrücken ($R-NH-CH_2-R'$) kondensieren und dadurch eine Vernetzung bewirken können (Feldman, 1973; French & Edsall, 1945; Gustavson, 1956). Der zweite oben erwähnte chemische Vorgang beinhaltet keine direkte Reaktion mit Gewebebestandteilen. Wässrige Formaldehydlösungen bestehen zu 99.9% aus dessen Monohydrat, dem Methylenglykol, dem die reaktive Carbonylgruppe ($R-C=O$) fehlt. Der durch die Reaktion mit dem Gewebe verursachte Entzug von Formaldehyd aus der Fixierlösung bewirkt im Zuge der Wiederherstellung des chemischen Gleichgewichts die Dissoziation von Methylenglykol und ermöglicht den dadurch entstehenden Formaldehydmolekülen eine Beteiligung an der Fixierung (Jones, 1973).

Verschiedene Parameter können Rate, Grad und Güte der Fixierung beeinflussen. Beispielsweise zeigt die Reaktion eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung, da dieser das Ausmaß der Protonierung von Aminogruppen bestimmt. Die Affinität von Formaldehyd zu ungeladenen NH_2 -Gruppen ist zwei- bis dreimal höher als zu protonierten (Kallen, 1966). Deshalb entwickelt sich Formaldehyd bei hohen pH-Werten zu einem sehr starken Fixativ, was aber einen unerwünschten heterogenen Fixierungsgrad innerhalb des Gewebes nach sich zieht (Berod *et al.*, 1981). Routinemäßige Fixierungen erfolgen in der Regel in neutral gepufferter Formaldehydlösung (4%) bzw. der entsprechenden Formalinlösung (10%), da dies eine für viele Zwecke adäquate Strukturkonservierung verschiedener Gewebearten erlaubt. Allerdings könnte der durch die Lösung ausgeübte osmotische Druck relativ extreme Werte annehmen, weil sich die ohnehin schon unphysiologische Osmolarität einer ungepufferten Formaldehydlösung (4%) von 1300 Milliosmol (mosm) durch Zusatz von Puffersalzen weiter erhöht (Fox *et al.*, 1985). Auch hier könnte daher eine globale Chromatinkondensation induziert und fixiert werden. Ferner bewirkt Formaldehyd eine DNA-Fragmentierung (Werner *et al.*, 1997), was unter Umständen einen Verlust von Ziel-DNA auslöst.

Neben den genannten Einflussfaktoren spielt auch die Fixierdauer eine nicht zu unterschätzende Rolle. Es wird angenommen, dass die Fixierung mindestens eine Stunde pro Millimeter Gewebe in Anspruch nimmt (Srinivasan *et al.*, 2002). Nach etwa 24 Stunden hat eine vierprozentige Formaldehydlösung gewebeartige Substanzen von 20 Millimeter Dicke oder mehr penetriert, und ein Gleichgewicht stellt sich ein (Fox *et al.*, 1985). In der pathologischen Praxis wird Gewebe in der Regel 24 bis 48 Stunden fixiert. Eine zu kurz

gewählte, den Vernetzungsprozess unterbrechende Fixierdauer resultiert in teilweise unfixiertem Material und/oder in einer Fixierungsvollendung durch den nachfolgend zur Gewebedehydrierung eingesetzten Ethanol. Dies verursacht variable Mischfixierungen aus Quervernetzung und Proteinpräzipitation und kann schwankende oder inkonsistente Immunfärbungsergebnisse zur Folge haben (Werner *et al.*, 2000). Auch eine zu lange Fixierung kann Auslöser von Komplikationen sein. Die exzessive Vernetzung macht unter Umständen Epitope unzugänglich und verursacht dadurch schwache oder fehlende Antikörpersignale (Werner *et al.*, 2000). Tatsächlich sind jedoch immunhistochemische Proteinnachweise selbst bei sachgemäßer Formaldehydfixierung problematisch und ohne Wiederherstellung der nötigen Epitope mittels Protease- oder Mikrowellenbehandlung nicht selten unmöglich.

Das fixierte Gewebe weist noch nicht die zur Schnittherstellung notwendige stabile Konsistenz auf. Diese wird erst durch Infiltration des Gewebes mit und nachfolgende Einbettung in Paraffin erzielt. Da das Wachs nicht wasserlöslich ist, wird das Wasser im Gewebe zunächst durch Ethanol ersetzt. Wie bereits erwähnt birgt dieser Dehydrierungsschritt die Gefahr einer zusätzlichen unerwünschten Fixierung durch Proteindenaturierung. Ethanol ist ebenfalls nicht mit Paraffin mischbar und wird aus diesem Grunde gegen das organische Lösungsmittel Xylol (Dimethylbenzol) ausgetauscht, das als *clearing agent* auch die Transparenz des Gewebes erhöht und ein tieferes Eindringen des Laserstrahls während der konfokalmikroskopischen Datenerfassung gestattet. Auch hier kann eine weitere Denaturierung von Gewebekomponenten auftreten (Wynnchuk, 1993). Die Infiltration mit Paraffin verleiht dem Gewebe nicht nur die nötige Stabilität, sondern hält auch die natürliche Relation der Gewebekomponenten zueinander aufrecht und verhindert deren Verzerrung während der Schnittanfertigung. Zu langsames Abkühlen des flüssigen Paraffins nach der Infiltration und Einbettung resultiert in zu großen Paraffinkristallen, was vor allem im Inneren des Gewebeblocks die Stabilität vermindert (Wynnchuk, 1993). Beim Aufbringen des Schnittes auf einen Objektträger wird dieser gestreckt, wodurch das Gewebe eine starke mechanische Beanspruchung erfährt. Hybridisierungsexperimente erfordern weitere, zum Teil verhältnismäßig harsche Behandlungsmethoden. Nach der Entfernung des Paraffins und schrittweisen Rehydrierung muss das Gewebe für DNA-Sonden und Antikörper durchlässig gemacht werden. Dies erfolgt in der Regel durch Inkubation in einer heißen Lösung von Natriumisothiozyanat (NaSCN), welches ein chaotropes Salz darstellt. Die Unterscheidung von kosmotropen (Ordnung fördernden) und chaotropen (Unordnung generierenden) Salzen basiert auf ihren stabilisierenden bzw. destabilisierenden Einflüssen auf die relativ geordnete Wasserstruktur, bezieht sich jedoch auch auf die gleiche Wirkung der Salze auf Proteine. Da das Ausmaß der Effekte nicht nur konzentrations-, sondern auch ionenabhängig ist, lassen sich die Ionen entlang eines kosmotrop-chaotropen

Spektrums anordnen. Dadurch ergeben sich so genannte Hofmeister-Reihen, die erstmals von dem deutschen Pharmakologen Franz Hofmeister (1850-1922) aufgrund des ionenspezifischen Einflusses von Salzen auf die Proteinlöslichkeit aufgestellt wurden (Hofmeister, 1888). Eine Vielzahl sehr unterschiedliche, als Hofmeister-Effekte bezeichnete Phänomene beruhen ebenfalls auf solchen salzspezifischen Wirkungen. Die zugrunde liegenden Gesetzmäßigkeiten sind jedoch sehr komplex und bis heute unzureichend verstanden. Obwohl daher an dieser Stelle mögliche Wirkungsmechanismen unerwähnt bleiben, können einige Beobachtungen doch Artefakttrisiken bei der Arbeit mit Gewebeschnitten beleuchten. Kosmotrope Salze stabilisieren zunächst die Proteinstruktur, vermindern jedoch ab einer bestimmten proteinabhängigen Konzentration die Löslichkeit der Proteine und fällen sie, was auch als Aussalzen bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu haben chaotrope Salze einen konträren Effekt. Sie destabilisieren die Struktur von Proteinen und bewirken schließlich deren Entfaltung. Das Thiozyanat-Anion (Rhodanid, SCN^-) verfügt über ein äußerst hohes Denaturierungspotential, während das Natrium-Kation (Na^+) in der Hofmeister-Reihe eine mittlere Position einnimmt. Da Anionen gegenüber Kationen derselben Ladung einen dominanten Effekt aufweisen (Collins & Washabaugh, 1985), wirkt NaSCN insgesamt denaturierend. Es ist nicht bekannt, ob die im Verlauf der Formaldehydfixierung ausgebildeten, sehr stabilen Methylenbrücken durch die Behandlung mit NaSCN zerstört werden. Ist dies nicht der Fall, könnten infolge der Proteindenaturierung Zugkräfte auf andere, mit den Proteinen vernetzte Gewebekomponenten einwirken und Lokalisationsveränderungen dieser hervorrufen. Eine solche Auswirkung auf das Chromatin kann nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus kann die Proteindenaturierung die für immunhistochemische Färbungen essentiellen Epitope zerstören und auf diese Weise den spezifischen Nachweis von Proteinen verhindern. Die durch die nachfolgende, massive Pepsinbehandlung induzierte Proteinhydrolyse verschärft dieses Problem für viele Antigene weiter. Ferner kann ein zu langes Einwirken der Protease die Morphologie empfindlich beeinträchtigen oder gar zur Ablösung des Gewebes vom Objektträger führen.

Eine Alternative zur chemischen Aufbereitung bietet die Mikrowellenbehandlung rehydrierten Gewebes in Gegenwart eines Zitratpuffers, deren entscheidender Vorteil die Wiederherstellung fixierungsbedingt maskierter Proteinepitope ist. Daher erlaubt diese Methode eine Kombination von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie (Bull & Harnden, 1999; Dundas *et al.*, 2001; Nolte *et al.*, 1996). Bei Mikrowellen handelt es sich um elektromagnetische Strahlen innerhalb eines Frequenzbereiches von 300 Megahertz (MHz) bis 300 Gigahertz (GHz). Für Mikrowellengeräte wurde eine Frequenz von 2.45GHz festgelegt, was einer Wellenlänge von 12.2cm entspricht. Das physikalische Prinzip des Mikrowellenofens beruht auf der Erzeugung eines elektromagnetischen Feldes, dessen hochfrequente Umpolung polare Moleküle

bis zu fünf Milliarden Mal pro Sekunde oszillieren lässt, da sie sich entsprechend ihrer Ladung ausrichten müssen. Dies resultiert in Reibungshitze, die das Gewebe von innen heraus erwärmt. Konkrete Untersuchungen bezüglich der genauen Auswirkungen dieser Bestrahlungsart auf Proteine, Chromatin und andere Gewebestandteile sind relativ spärlich und teilweise widersprüchlich. Einige beobachtete Phänomene lassen sich nicht allein durch die Erhitzung des Gewebes erklären und legen nicht-thermische Mikrowellen-Effekte nahe, die jedoch Gegenstand von Kontroversen sind. Die Quantenergie der Mikrowellen ist mit 10^{-5} Elektronenvolt (eV) sehr viel geringer als die zum Aufbrechen kovalenter Bindungen benötigte Energie von 10eV. Dennoch erfährt virale DNA durch Mikrowellenbehandlung eine exzessive Fragmentierung die bei externer Erwärmung auf dieselbe Temperatur nicht zu beobachten ist (Kakita *et al.*, 1995). Eine zu ausgedehnte Behandlung dieser Art könnte demnach einen Verlust von Ziel-DNA auslösen, der erfolgreiche Hybridisierungsexperimente sowie deren Interpretation erschwert oder gar verhindert.

Auch nach Beendigung von Gewebeaufbereitung, Hybridisierung sowie Sonden- und/oder Proteinnachweis bleibt die Handhabung von Gewebeschnittpräparaten problematisch. Eine exakte Datenerhebung mittels konfokaler *Laser Scanning* Mikroskopie (CLSM) unterliegt gewissen Beschränkungen. Im Allgemeinen sind Ölimmersionsojektive mit hoher numerischer Apertur konstruiert, um für Fokussierungsebenen von etwa 15-20µm unterhalb des Deckglases verwendet zu werden (<http://www.olympusfluoview.com/theory/confocalobjectives.html>). Allerdings beeinträchtigen die mit zunehmender Distanz zur Deckglasunterseite in wachsendem Maße auftretenden sphärischen Aberrationen die Qualität des konfokalen Bildmaterials, indem sie Kontrast, Signalintensität und Auflösung mindern. Ferner rufen unterschiedliche Brechungsindices von Immersionsöl und Einbettungsmedium bereits in wesentlich näher am Deckglas lokalisierten Fokussierungsebenen Abbildungsfehler hervor und verringern auf diese Weise den für eine optimale Struktur Erfassung nutzbaren Abstand von der Deckglasunterseite. Das unvermeidliche Vorhandensein von Einbettungsmedium zwischen Deckglas und Gewebe schmälert zusätzlich die Stärke der relativ fehlerfrei erfassbaren Gewebeschicht. Auch die Beschaffenheit des Gewebes selbst ist von Bedeutung. Ein geringerer Grad an Transparenz geht mit stärkerer Lichtstreuung einher, was die Gewebepenetration durch den Laser limitiert.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) wird für dreidimensionale Analysen der Zellkernarchitektur vielfach verwendet. Da sich derartige Untersuchungen meist auf Zelllinien oder primäre menschliche Zellen beschränken, sollte die

Eignung verschiedener Aufbereitungsmethoden und 3D FISH-Protokolle für ca. 15-20µm dicke Paraffinschnitte menschlichen Kolonepithels getestet werden. Ein weiteres Ziel bestand in der Identifikation terminal differenzierter Zelltypen und ihrer unreifen, proliferierenden Vorläuferzellen innerhalb des Differenzierungssystems der tubulären Krypten des Kolonepithels durch den Nachweis geeigneter Markerproteine. Die hierfür nötige Mikrowellenbehandlung des Gewebes sollte hinsichtlich ihrer Tauglichkeit für die Durchführung von FISH getestet werden, da die Kombination von Proteinnachweis und FISH für zuverlässige zellkernarchitektonische Analysen einzelner Zelltypen unerlässlich ist.

Die Evaluierung des konfokalmikroskopisch erhobenen Datenmaterials ist infolge der hohen Kerndichte im Gewebe komplizierter als im Falle von Zellkulturmaterial, weil die Erfassung einzelner Kerne unmöglich ist. Auf Einzelkernbasis durchgeführte Auswertungsverfahren erfordern deshalb die Entfernung überzähliger Kerne durch Bildsegmentierung. Hierfür sollten zwei interaktive Verfahren eingesetzt und hinsichtlich der Güte der erzielten Segmentierungsergebnisse verglichen werden.

Die für erfolgreiche FISH-Experimente auf Schnittpräparaten nötige, harsche Gewebebehandlung könnte methodisch bedingte Veränderungen der Chromatinanordnung und/oder Kernmorphologie nach sich ziehen. Deshalb sollten Morphologie, Größe und Chromatintextur einzelner Zellkerne vor und nach FISH anhand von DNA-Gegenfärbungen verglichen werden.

Außerdem sollte die radiale Positionierung von Chromosomenterritorien in normalem Kolonepithel sowie Kolonkarzinomgewebe bezüglich einer Abhängigkeit von Gendichte oder Chromosomengröße untersucht werden. Dazu sollten einerseits die ähnlich großen, jedoch unterschiedlich genreichen Chromosomen 18 und 19 simultan visualisiert werden, und andererseits die unterschiedlich großen, aber ähnlich genreichen Chromosomen 1 und 20. Ferner sollte auch Chromosom 11 analysiert werden, da dieses eine ausgeprägte Unterteilung in genreiche und genarme Bereiche aufweist. Auch trägt es einen Cluster von Mucingenen, die zum Teil in Becherzellen des Kolonepithels exprimiert werden. Schließlich sollte auch die radiale Positionierung von Zentromeren sowie die Anzahl an Chromozentren in normalem Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe bestimmt werden, um mögliche Veränderungen in der Zentromeranordnung im Verlauf zellulärer Differenzierungsprozesse sowie der Entstehung von Karzinomen zu erfassen. Bislang konzentrierten sich derartige Analysen überwiegend auf murine Zellen oder Gewebe.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Tab. 2-1 Geräte

Geräte	Hersteller
Eismaschine	Scotsman, Bettolino di Pogliano
Gefrierschrank (-20°C)	Privileg/Quelle, Fürth AEG, Frankfurt a. M.
Geldokumentationsgerät	MWG-Biotech, Ebersberg
Gelelektrophoresekammern und Zubehör	Owl Scientific Inc., Portsmouth
Haushaltsmikrowelle	
Heizblock	Techne, Cambridge
Kühlschrank (4°C)	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Magnetrührer	Ika Labortechnik, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten (0.2, 10, 200, 1000µl)	Gilson, Inc., Middleton
Schüttler	Snijders, Tilburg
Thermocycler/Teche Progene	Techne, Cambridge
Vakuumentrifuge/BaVaco M Mini 30	Bachhofer, Reutlingen
Vortexer	Ika Labortechnik, Staufen
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	GFL, Burgwedel; Julabo, Seelbach; Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge	Kendro, Langenselbold

2.2 Optische Geräte

Tab. 2-2 Optische Geräte

Optische Geräte	Typ	Hersteller
Durchlicht-/ Phasenkontrastmikroskop	Axiovert 25c	Zeiss, Jena
Objektive	CP Achromat x5/0.12 CP Achromat x10/0.25 Ph1 LD Achrostigmat x20/0.3 Ph1 Achrostigmat x40/0.55 Ph2	
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot 2	Zeiss, Jena

Optische Geräte	Typ	Hersteller
Objektive	Plan-NEOFLUAR 16x/0.5 Plan-NEOFLUAR 40x oil/1.3 Plan-NEOFLUAR 63x oil/1.4 Plan-NEOFLUAR 100x oil/1.3	
Fluoreszenzfilter	DAPI (BP 365, FT 395, LP 450-490nm) FITC (BP 450-490, FT 510, LP 515-565nm) Cy3 (BP 546, FT 580, LP 590nm) Cy5 (BP 575-625, FT 645, BP 660-710nm) Triple-Filter (TBP 400/495/570, FT 410/505/585, TBP460/530/610)	
CCD-Kamera		Coolview CCD Camera System
Konfokales Laser Scanning-Mikroskop	Zeiss LSM-410	Zeiss, Jena
Objektiv	Plan-APOCHROMAT 63x oil / 1,4	

2.3 Verbrauchsmaterial und Zubehör

Tab. 2-3 Verbrauchsmaterial und Zubehör

Verbrauchsmaterial und Zubehör	Bezugsquelle
Deckgläser 12x12mm	Hecht Assistent, Sondheim
Deckgläser 15x15mm, 24x60mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Diamantstift	Kraus & Winter, Hamburg
Fixogum	Marabu, Tamm
Glasküvetten	Hecht Assistent, Sondheim
Metallbehälter mit Deckel für medizinische Geräte	Schubert Medizinprodukte GmbH
Nagellack	Manhattan, Müller GmbH & Co. KG, Ulm-Jungingen
Paraffinschnitte des menschlichen Kolons	Prof. Dr. J. Diebold, Institut f. Pathologie, LMU München
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc., Neenah
Pasteurpipetten	Falcon/Becton Dickinson, S. Jose
PCR-Reaktionsgefäße	Molecular Bioproducts, S. Diego
Pinzetten	Dumont, Montignez
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1.5ml/2ml	Eppendorf, Hamburg

2.4 Chemikalien und Biochemikalien

Tab. 2-4 Chemikalien, Enzyme, Lösungen

Chemikalien, Enzyme und Lösungen	Bezugsquelle
Agarose	FMC Rockland, Maine, USA
Antifade-Medium Vectashield	Vector, Burlingame CA, USA
Bovines Serumalbumin (BSA) für PBS-Lösungen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BSA für SSC-Lösungen	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Cetus-II-Puffer	Roche, Mannheim
DNA-Polymerase I	Roche, Mannheim
Deergenz W1	Gibco-BRL, Karlsruhe
Dextransulfat	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Dimethoxysulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNase I	Roche, Mannheim
Ethanol absolut p.a.	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, München
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formamid	Merck, Darmstadt
Gel-Laufpuffer (6x)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roche, Mannheim
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumborhydrid	
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumzitat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumisothiozyanat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nicktranslationspuffer (10x)	Roche, Mannheim
PCR-Puffer (10x)	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Pepsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Puffer D (5x)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Salzsäure (1N)	Merck, Darmstadt
Taq-Polymerase	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
Xylol	
Nukleotide & DNA	Bezugsquelle
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim

dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100mM)	Roche, Mannheim
dNTP-Mix (je 2.5 mM)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Digoxigenin-11-dUTP	Roche, Mannheim
Humane C ₀ t-1 DNA	Gibco-BRL, Karlsruhe
6MW-Primer	MWG-Biotech, Ebersberg
Lamda/Hind III Marker	Roche, Mannheim
Salmonsperm-DNA	Gibco-BRL, Karlsruhe
DNA-Farbstoffe	Bezugsquelle
DAPI (4,6 Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SYTO 16	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
TO-PRO-3	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Antikörper (verwendete Verdünnung)	Bezugsquelle
Avidin-Alexa488 (1:200)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Avidin-Cy5 (1:200)	Dianova, Hamburg
Esel- α Ziege-Alexa488 (1:250)	Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon
Maus- α B23 (1:50)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
Maus- α Cytokeratin 20 (1:20)	Acris, Hiddenhausen
Maus- α Digoxigenin (1:500)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Maus- α Digoxigenin-Cy3 (1:100)	Diananova, Hamburg
Maus- α KI67 (1:25)	DAKO, Hamburg
Maus- α Mucin 2 (1:20)	Acris, Hiddenhausen
Schaf- α Maus-Cy3 (1:500)	Dianova, Hamburg
Zeige- α LaminB (1:20)	Santa Cruz Biotechnology,
Ziege- α Avidin-Biotin (1:200)	Vector, Burlingame CA, USA

2.5 Lösungen und Puffer

Tab. 2-5 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Bestandteile
Pepsinlösung für Gewebeschnitte	8mg/ml Pepsin in 0.01N HCl: 80 μ l einer 10% Pepsinstocklösung, 920 μ l 0.01N HCl
Natriumisothiocyanat (1M)	8.1g ad 100ml H ₂ O

Lösungen und Puffer	Bestandteile
Kupfersulfatlösung (100mM)	20µl 1M Kupfersulfatlösung, 180µl H ₂ O bidest
Natriumborhydridlösung (0.2%)	0.2g NaBH ₄ in 100ml H ₂ O lösen
Ethanolreihe (70, 90%)	70 oder 90ml Ethanol (Typ 642 oder 510) ad 100ml mit H ₂ O bidest
Natriumzitratlösung 10mM	2.95g ad 1000ml H ₂ O bidest, pH mit HCl bzw. NaOH auf 6.0 einstellen
BSA-Blockierungslösung 4% (in SSC/T) BSA-Blockierungslösung 2% (in PBS/T)	4g BSA (ICN) in 100ml 4xSSC/T lösen 2g BSA (Sigma) in 100ml 1xPBS/T lösen
Hybridisierungsmastermix	20% Dextransulfat in 2xSSC: 8g Dextransulfat in 40ml 2xSSC lösen, vortexen, mit 0,45µm Filter filtrieren
Label-ACG-Mix (je 2mM)	je 100mM dATP, dCTP, dGTP: für 500µl-Ansatz je 10µl ATP, CTP, GTP und 470µl PCR-H ₂ O
dNTP-Mix für Nick Translation	je 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP: für 1ml-Ansatz je 250µl dATP, dCTP, dGTP, 50µl TTP und 200µl PCR-H ₂ O einsetzen
NT-Puffer	1M Tris-HCl (pH 7.5), 1M MgCl ₂ , BSA für 100ml-Ansatz 50ml 1M Tris-HCl, 50mg BSA und 45ml H ₂ O einsetzen
PBS-Puffer (pH 7,4)	140mM NaCl; 2.7mM KCl; 6,5mM Na ₂ HPO ₄ ; 1.5mM KH ₂ PO ₄ : 20xPBS: 320g NaCl, 8g KCl, 57.6g Na ₂ HPO ₄ , 9.6g KH ₂ PO ₄ , ad 2l H ₂ O bidest; mit HCl auf pH 7.4 einstellen; 1x PBS Aliquots autoklavieren
PBS/T-Puffer (0.01% Tween)	1l Ansatz: 1000ml 1x PBS und 100µl Tween

Lösungen und Puffer	Bestandteile
SSC-Puffer (pH 7,0)	150mM NaCl, 15mM Na-Zitrat: 20x SSC: 350.6g NaCl, 176.4g NaCitrat ad 2l H ₂ O bidest; mit NaOH pH 7.0 einstellen; 4x, 2x, 0,1x SSC-Aliquots verdünnen und autoklavieren
SSC/T-Puffer (0,2% Tween)	4x SSC, Tween 20: 1l Ansatz: 1000ml 4x SSC, 2ml Tween 20
TAE-Puffer (pH 8,0)	40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA : 50x TAE: 242g Tris, 18.6g EDTA, 57.1ml Eisessig ad 1l H ₂ O bidest
Agarosegel (1%)	1% Agarose in TAE Puffer: 5g in 500ml TAE Puffer, in der Mikrowelle aufkochen bis die Lösung klar ist, Gel heiß gießen

2.6 Software

Tab. 2-6 Software

Software	Hersteller
3D-RRD	J. von Hase / Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg (von Hase, 2002)
Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems, Inc., S. Jose
Amira 3.0 und 3.1.1	TGS Europe, Merignac Cedex
Cytovision	Applied Imaging International Ltd., Newcastle Upon Tyne
Image J 1.30u	National Institute of Health, USA
Irfan View 3.91	Irfan Skiljan, Wiener Neustadt
LSM 410 software version 3.95	Zeiss, Jena

2.7 Gewebeschnitte

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gewebeschnitte wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Joachim Diebold, Institut für Pathologie der Universität München, zur Verfügung gestellt. Es handelte sich stets um formaldehydfixiertes, in Paraffin eingebettetes, menschliches Gewebe, das auf Objektträger oder Deckgläser aufgebracht worden war. Die nominale Schnittdicke betrug 8 bzw. 10µm, konnte jedoch tatsächlich bis zu 20µm ausmachen. Mit

Hilfe eines Lichtmikroskops wurden Areale für spätere Hybridisierungsexperimente ausfindig gemacht und mit einem Diamantstift eingerahmt. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Gewebeschnitte in einem geschlossenen Behältnis bei 4°C aufbewahrt.

2.7.1 Entfernung des Paraffins und Rehydrierung des Gewebes

Gegenstand histologischer und pathologischer Untersuchungen ist zumeist Gewebe, das nach Formaldehydfixierung in Paraffinwachs eingebettet und später in Schnitten auf Objektträger aufgebracht wird. Immunhistochemische Analysen solcher Gewebeschnitte und/oder Hybridisierungsexperimente sind jedoch erst nach Entfernung des Paraffins möglich, da das Gewebe andernfalls nicht in eine wässrige, gepufferte Umgebung überführt werden kann (s. Tab. 2-7, S. 35). Das Paraffin wurde unter Verwendung des organischen Lösungsmittels Xylols (Dimethylbenzol) aus dem Gewebe herausgelöst. Dazu wurden die Schnitte zweimal für jeweils 30min bei Raumtemperatur (RT) in Xylol gefüllten Glasküvetten inkubiert. Die letztlich angestrebte Rehydrierung des Gewebes erforderte zunächst die Substitution des Lösungsmittels durch Ethanol, da dieser sowohl mit Xylol als auch mit Wasser mischbar ist. Hierfür wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten zweimal für je 15min bei RT in absoluten Ethanol gestellt. Daran schloss sich die Inkubation des Gewebes in 70% Ethanol für mindestens 15min an, um eine zu sprunghafte Änderung des Milieus zu vermeiden. Falls die Gewebeschnitte nicht sofort in einem Experiment Verwendung fanden, wurden sie in der Ethanollösung stehend bei 4°C gelagert. Andernfalls wurden die Schnitte einige Minuten in bidestilliertem Wasser bei RT inkubiert, bevor sie ihrer weiteren Bestimmung zugeführt wurden.

Tab. 2-7 Paraffinentfernung und Rehydrierung des Gewebes.

Das verwendete Material ist in Tab. 2-4, S. 31 aufgeführt.

Entfernung des Paraffins und Rehydrierung des Gewebes

- Inkubation für 2x30min in Xylol bei RT
- 2x 15min in 100% Ethanol
- mindestens 15min in 70% Ethanol

2.7.2 Gewebeaufbreitung für Hybridisierungen und Immunhistochemische Färbungen

Nach Paraffinentfernung und Rehydrierung können zwar bereits die Zellkerne mit Hilfe von Nukleinsäurefarbstoffen, wie etwa 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), TO-PRO-3 oder auch SYTO 16, einer Texturanalyse unterzogen werden, für spezifische DNA-Sonden oder Antikörper ist das Gewebe jedoch noch nicht zugänglich. Aus diesem Grund ist vor der Durchführung von Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen (FISH) eine Permeabilisierung des Gewebes unerlässlich. Diese erfolgte entweder durch Inkubation in 1M Natriumisothiozyanat (NaSCN) mit nachfolgender Pepsinbehandlung (s. 2.7.2.1, S. 36) oder durch Erhitzen der Gewebeschnitte in einer Haushaltsmikrowelle (s. 2.7.2.2, S. 37). Darüber hinaus wurde zur Verminderung störender Eigenfluoreszenz des Gewebes Kupfersulfat (CuSO_4) und Natriumborhydrid (NaBH_4) eingesetzt. Im Falle der mikrowellenbehandelten Gewebeschnitte konnte auf die Verwendung dieser Chemikalien verzichtet werden, da das Gewebe keine nennenswerte Eigenfluoreszenz mehr aufwies.

Immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten erfordern ebenfalls zunächst eine weitere Vorbehandlung. Die Fixierung des Gewebes mittels Formaldehyd verursacht Quervernetzungen, die Proteinepitope verändern und so deren Erkennung durch Antikörper verhindern können. Erhitzen der Gewebeschnitte in der Mikrowelle stellt die ursprünglichen Epitope so weit wieder her, dass ein Proteinnachweis durch spezifische Antikörper möglich wird (s. 2.7.2.2, S. 37).

2.7.2.1 Chemische Permeabilisierung und Autofluoreszenzminderung

Die rehydrierten Gewebeschnitte wurden zum Zweck der Gewebepерmeabilisierung zuerst für 30min bei 80°C in 1M Natriumisothiozyanat (NaSCN) inkubiert und danach kurz in bidestilliertes Wasser (ddH_2O) überführt, wobei der letztere Arbeitsschritt stets den Übergang zwischen verschiedenen Chemikalien oder Lösungen bildete und in der Folge nicht mehr eigens erwähnt wird. Daran schloss sich eine 25-minütige Proteasebehandlung mit einer Pepsinlösung der Konzentration 8mg/ml an, die bei 37°C durchgeführt wurde.

Zur Verminderung der Autofluoreszenz des Gewebes wurde zunächst mit einer 0.01M Kupfersulfatlösung (CuSO_4) bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Dadurch sollte auf eine durch Lipofuscin verursachte Fluoreszenz Einfluss genommen werden, die zumindest in Hirngewebe von Affen erfolgreich durch CuSO_4 vermindert werden konnte (Schnell *et al.*, 1999). Es konnte nicht geklärt werden, ob Lipofuscin in den epithelialen Zellen des menschlichen Kolon vorkommt bzw. tatsächlich eine Autofluoreszenz des Gewebes bewirkt. Da jedoch ein zunächst verwendetes, für Kolonschnitte nicht funktionierendes Ausgangs-

protokoll schrittweise modifiziert wurde, und CuSO_4 im ersten erfolgreichen Hybridisierungsexperiment noch Bestandteil des Protokolls war, wurde aus Gründen der Gleichbehandlung der Gewebeschnitte auch in folgenden Experimenten CuSO_4 eingesetzt. Natriumborhydrid (NaBH_4) verringert ebenfalls störende Eigenfluoreszenz von Gehirnschnitten (Clancy & Cauller, 1998). Die diesbezügliche Wirksamkeit der Chemikalie wird dabei auf ihre Fähigkeit zurückgeführt, fluoreszierende Schiff-Basen (Imine) zu reduzieren, wie sie durch die Verbindung von Aminen mit Aldehyden des Fixativs entstehen (Beisker *et al.*, 1987; Willingham, 1983). In der vorliegenden Arbeit wurden die Gewebeschnitte 10min bei Raumtemperatur (RT) in 0.2% NaBH_4 inkubiert. Leider kann es dabei zu einem unerwünschten Ablösen des Gewebes vom Objektträger kommen. Traten derartige Probleme auf, wurde für alle Schnitte desselben Gewebblocks auf eine Verwendung von NaBH_4 verzichtet. Aus diesem Grund konnte in dieser Arbeit lediglich jener Gewebeschnitt von normalem Kolon mit NaBH_4 behandelt werden, der später mit Sonden für die Chromosomen 18 und 19 hybridisiert wurde. Der chemischen Aufbereitung des Gewebes schloss sich direkt die Durchführung von Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen (s. 2.8.5.1, S. 44) an.

Tab. 2-8 Chemische Permeabilisierung und Reduktion von Autofluoreszenz.

Die verwendeten Chemikalien sind Tab. 2-4, S. 31 aufgeführt.

Permeabilisierung
<ul style="list-style-type: none"> • 30min in 1M NaSCN (frisch hergestellt) bei 80°C • kurz in ddH₂O • 25min in 8mg/ml Pepsin/0.01N HCl bei 37°C • kurz in ddH₂O
Reduktion von Eigenfluoreszenz
<ul style="list-style-type: none"> • 60min in 0.01M CuSO_4 bei 37°C • kurz in ddH₂O • 10min in 0.2% NaBH_4 (frisch hergestellt) bei RT • kurz in ddH₂O

2.7.2.2 Aufbereitung von Gewebeschnitten in der Mikrowelle

Antigen Retrieval bezeichnet die Wiederherstellung von Antigenen bzw. Proteinepitopen, die infolge der Formaldehydfixierung maskiert vorliegen und deshalb für Antikörper unzugänglich sind. Die Methode basiert auf dem Erhitzen von Gewebeschnitten in Gegenwart eines Puffers in der Mikrowelle und wurde von (Shi *et al.*, 1991) beschrieben. Eine Mikrowellenbehandlung ist deshalb für eine erfolgreiche Durchführung vieler immunhistochemischer Färbungen unerlässlich und kann in Abhängigkeit von der nachzuweisenden DNA-

Region auch eine für Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen (FISH) ausreichende Permeabilisierung des Gewebes herbeiführen.

Die Gewebeschnitte wurden nach ihrer Rehydrierung in eine 0.01M Natriumzitratlösung des pH-Wertes 6.0 überführt und vier- oder fünfmal für jeweils 5min in einer handelsüblichen, für die Erwärmung von Speisen in der Mikrowelle konzipierten Plastikschaale in einem Haushaltsmikrowellengerät mit einer Leistung von 700W erhitzt. Zwischen den einzelnen Zyklen wurde vorgewärmter (65°C) Puffer nachgefüllt, um Austrocknen und Abkühlen des Gewebes unter allen Umständen zu vermeiden. Die Wahl der Behandlungsdauer sowie des Zitratpuffers erfolgte in Anlehnung an (Diebold *et al.*, 1994), da dieser Artikel einen erfolgreichen Nachweis von KI-67 auf Kolongewebeschnitten beschreibt. Im Anschluss an die Mikrowellenbehandlung kühlten die Gewebeschnitte im Zitratpuffer etwa 20min bei RT ab. Nach einer kurzen Überführung in bidestilliertes Wasser konnten die Präparate direkt für immunhistochemische Analysen verwendet (s. 2.9, S. 48) oder für Hybridisierungsexperimente in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert werden (s. 2.8.5, S. 44). Im letzteren Fall erfolgte die Dehydrierung der Präparate zum Teil ohne vorherige Abkühlung. Ferner besteht für die mikrowellenbehandelten Gewebeschnitte die Möglichkeit der Kombination von FISH und immunhistochemischem Proteinnachweis (s. 2.9.2, S. 48).

Tab. 2-9 Aufbereitung der Gewebeschnitte in der Mikrowelle.

Das verwendete Material ist in Tab. 2-4, S. 31 aufgeführt, das Gerät in Tab. 2-1, S. 29.

Mikrowellenbehandlung der Gewebeschnitte
<ul style="list-style-type: none">• 5x5min (Dauer von Gewebe und nachzuweisendem Antigen abhängig) in 0.01M Natriumzitat pH 6.0 bei 700W• jeweils nach 5min mit Natriumzitat (60°C) auffüllen, da das Gewebe nicht trocknen darf• ca. 20min bei RT abkühlen lassen

2.8 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die für diese Methode maßgebliche Reaktion der Hybridisierung einer DNA-Sonde mit einer gewünschten Ziel-DNA beruht auf dem natürlichen Bestreben einzelsträngiger DNA mit komplementären Sequenzen Doppelstränge zu bilden. Auf diese Weise können spezifische DNA-Abschnitte auf Metaphasechromosomen oder innerhalb des Interphasekerns sichtbar gemacht werden.

2.8.1 Generierung von DNA-Sonden

Als Ausgangsmaterial dienten stets bereits vorhandene Amplifikate verschiedener Chromosomenspezifischer Sonden, die mittels DOP-PCR (**d**egenerate **o**ligonucleotide-**p**rimed PCR) generiert worden waren (Telenius *et al.*, 1992). Die hierfür verwendeten partiell degenerierten Primer enthalten neben einem spezifischen, in der zu vervielfältigenden DNA häufig vorkommenden Hexamer am 3'-Ende in ihrem mittleren Bereich einen Abschnitt zufällig eingebauter Nukleotide. Dies gestattet im Verlauf der ersten Phase der DOP-PCR aufgrund einer relativ niedrig gewählten Primeranlagerungstemperatur eine Zufallsamplifikation der eingesetzten DNA. Die zweite Phase zeichnet sich durch eine deutlich höhere Anlagerungstemperatur aus, was sich in der Amplifikation Primertragender DNA-Fragmente niederschlägt. In einer so genannten sekundären DOP-PCR wurden die so entstandenen PCR-Produkte weiter vermehrt. Dazu wurden 48.5µl Mastermix (20x), 1µl Amplifikat sowie 0.5µl Taq-Polymerase (2.5U) in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist Tab. 2-10 zu entnehmen, das verwendete PCR-Programm Tab. 2-1. Im Anschluss an die PCR wurden jeweils 5µl des Amplifikats mit je 1µl Laufpuffer (6x) versetzt und auf einem TAE-Agarosegel (1%) hinsichtlich der Fragmentlänge überprüft. Als Größenmarker diente dabei λ/HindIII-DNA, von der 2µl aufgetragen wurden.

Tab. 2-10 Mastermix für sekundäre DOP-PCR

Die verwendeten Chemikalien sind in Tab. 2-4, S. 31 aufgeführt.

Mastermix (20x) für sekundäre DOP-PCR	
•	200µl Puffer D (5x)*, Endkonzentration 20%
•	120µl 6 MW-Primer (17µM), Endkonzentration 1.7-2µM
•	100µl Detergenz W1 (1%), Endkonzentration 0.1%
•	80µl dNTP-Mix (je 2.5mM), Endkonzentration 200µM
•	450µl H2O

* Tris-HCl (300mM), MgCl₂ (17.5mM), KCl(NH₄)₂SO₃ (15mM), pH 8.5

Tab. 2-11 Sekundäre DOP-PCR

PCR-Programm für sekundäre DOP-PCR				
Programm	Zyklen	Beschreibung	Temperatur	Zeit
# 1	1	Start-Denaturierung	96°C	3min
		Denaturierung	94°C	1min
# 11	35	Primeranlagerung	56°C	2min
		Extension	72°C	2min
# 4	1	Extension	72°C	5min
		Gesamtdauer		180min

2.8.2 Markierung von DNA-Sonden

Die Visualisierung der DNA-Sonden im Anschluss an die Hybridisierung setzt deren Markierung mittels modifizierter Thymidinanaloga (dUTPs) voraus. Dies erfolgt entweder durch Nick Translation oder mittels PCR. Die Sonden tragen danach entweder ein Fluorochrom oder ein Hapten, wie Digoxigenin oder Biotin. Letztere werden durch fluorochromgekoppelte Moleküle sichtbar gemacht, die eine Affinität zu dem verwendeten Hapten aufweisen. Hierbei handelt es sich um Antikörper oder Avidin.

2.8.2.1 Markierung mittels Nick Translation

Die Nick Translation bezeichnet ursprünglich eine für die korrekte Replikation und DNA-Reparatur wichtige Funktion der *E. Coli* DNA-Polymerase I. Die Fähigkeit des Enzyms an der freien 3'-Hydroxylgruppe eines Einzelstrangbruches (*nick*) Nukleotide anzufügen, während es simultan mittels seiner 5'→3' Exonukleaseaktivität am benachbarten 5'-Ende Nukleotide entfernt, bewirkt eine Verschiebung des Bruches (*nick translation*) entlang des Doppelstranges in 5'→3' Richtung (Kelly *et al.*, 1970). *In vitro* wird diese Reaktion zum Einbau markierter Nukleotide in DNA-Sonden genutzt, wobei zur Einführung der notwendigen Einzelstrangbrüche die Desoxyribonuklease I (DNase I,) verwendet wird (Rigby *et al.*, 1977).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Nick Translation zur Markierung sowohl von Zentromersonden als auch von chromosomenspezifischen DNA-Sonden eingesetzt. Dabei wurde ein wie in tab. 2-12 beschriebener Reaktionsansatz für 90min in einem 15°C kalten Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Überführung des Ansatzes auf Eis, während der Erfolg der Nick Translation durch Elektrophorese von 5µl des Reaktionsproduktes auf einem TAE-Agarosegel (1%) getestet wurde. Wurde die gewünschte Fragmentlänge von etwa 300-800 Basenpaaren (bp) überschritten, konnte durch erneute Zugabe von DNase I eine Verminderung der Fragmentlänge erzielt werden. Andernfalls wurde die Reaktion eine Hitzschockbehandlung bei 65°C (10min) endgültig gestoppt.

Tab. 2-12 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für Nick Translationen.

Das verwendete Material ist Tab. 2-4, S. 31 aufgeführt.

Reaktionsansatz für Nick Translationen (50µl)

- xµl DNA (Volumen entspricht 1µg DNA)
- 5µl Nicktranslationspuffer (10x)
- 5µl β-Mercaptoethanol (0.1M)
- 5µl dNTP-Mix

Reaktionsansatz für Nick Translationen (50µl)

- 1µl markiertes dUTP
- (32-xµl) H₂O bidest
- 1µl DNase I (1:250 Verdünnung in H₂O bidest)
- 1µl DNA-Polymerase I

2.8.2.2 Markierung mittels PCR

Für den Einbau modifizierter Thymidinanaloga in die jeweilige Sonden-DNA wurden 47.5µl Mastermix (Tab. 2-13), 2µl Sonden-DNA und 0.5µl Taq-Polymerase vereinigt und einer PCR (Tab. 2-14, S. 41) unterzogen. Die Fragmentlänge wurden wie unter 2.8.1, S. 39 auf einem Agarosegel überprüft.

Tab. 2-13 Mastermix für Sondenmarkierung mittels PCR.

Das verwendete Material ist in Tab. 2-4, S. 31 aufgeführt.

Mastermix für Sondenmarkierung mittels PCR

- 100µl Cetus II-Puffer, Endkonzentration 50mM KCl, 10mM Tris
- 80µl MgCl₂ (25mM), Endkonzentration 2mM
- 100µl 6 MW-Primer (17µM), Endkonzentration 1,7µM
- 50µl ACG-Mix (je 2mM), Endkonzentration 100µM
- 80µl dTTP (1mM), Endkonzentration 80µM
- 20µl modifiziertes dUTP (1mM), Endkonzentration 20µM
- 530µl H₂O
- **Σ** 960 µl

Tab. 2-14 PCR-Programm für DNA-Sondenmarkierung.**PCR-Programm für die Markierung von DNA-Sonden**

Programm	Zyklen	Beschreibung	Temperatur	Zeit
# 2	1	Startdenaturierung	96°C	1min
		Denaturierung	94°C	1min
# 14	35	Primeranlagerung	56°C	1min
		Extension	72°C	30sec
# 4	1	Schlussexension	72°C	5min
		Gesamtdauer		75min

2.8.3 Sondenpräzipitation und Herstellung der Hybridisierungslösung

Die markierten DNA-Sonden wurden zunächst mittels Ethanolfällung aufgereinigt. Dazu wurde jenes Volumen der gewünschten Sonde eingesetzt, das in der Hybridisierungslösung eine Sondenkonzentration von 20-30ng/ μ l gewährleistet. Die Zugabe eines 20-50fachen Überschusses an humaner C_0t-1 DNA diente der Absättigung repetitiver Sequenzen in der Sonde, die sonst eine unerwünschte Hybridisierungsreaktion mit anderen genomischen Bereichen als der Ziel-DNA bewirken könnten. Im Falle der aus Tandemwiederholungen bestehenden α -Satelliten-DNA der Zentromerregionen wurde auf die C_0t-1 DNA verzichtet. Ferner erleichterten 2 μ l *Salmon Sperm*-DNA als Träger-DNA das Ausfällen der Sonde. Anschließend wurde dem Reaktionsansatz das 2.5fache seines Volumens an Ethanol (100%) zugegeben. Durch eine 30minütige Inkubation bei -20°C wurde die DNA gefällt. Danach wurden der Ansatz 20-30min bei 13000rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und der Niederschlag etwa 10min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von Formamid, das die Denaturierungstemperatur senkt und somit die Hybridisierungsstringenz erhöht. Die eingesetzte Menge betrug dabei 50% des gewünschten Endvolumens der Hybridisierungslösung. Der Ansatz wurde bei 42°C auf dem Schüttler inkubiert, bis sich der Niederschlag vollständig gelöst hatte. Schließlich wurde eine dem Formamid entsprechende Menge an Hybridisierungsmastermix (s. Tab. 2-5, S. 32) zugegeben, der zur Erhöhung von Viskosität und Volumen Dextransulfat enthält. Die Hybridisierungslösung wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Tab. 2-15 Sondenpräzipitation und Herstellung der Hybridisierungslösung.

Das verwendete Material ist in Tab. 2-4, S. 31 und Tab. 2-5, S. 32 aufgeführt.

Sondenpräzipitation und Herstellung der Hybridisierungslösung
<ul style="list-style-type: none">• xμl DNA-Sonde (Endkonzentration soll 20-30ng/μl betragen)• 20-50facher Überschuss an C_0t-1 DNA (nicht bei Zentromersonden)• 2μl <i>Salmon Sperm</i>-DNA• 2.5fache Menge des Reaktionsansatzvolumens an Ethanol (100%) zugeben• 30min bei -20°C inkubieren• 20-30min bei 13000rpm zentrifugieren• Überstand entfernen und verwerfen• Niederschlag etwa 10min in der Vakuumzentrifuge trocknen• 50% des gewünschten Endvolumens an Formamid zusetzen• bis zur vollständigen Lösung des Pellets auf dem Schüttler (42°C) inkubieren• 50% des gewünschten Endvolumens an Hybridisierungsmastermix zugeben

2.8.4 Hybridisierung von Metaphasepräparaten (2D-FISH)

Die Hybridisierung von Metaphasepräparaten diene lediglich der Qualitätskontrolle der für die Hybridisierung von Gewebeschnitten vorgesehenen DNA-Sonden. Dazu wurden bereits vorhandene Metaphasepräparate aufgetaut. Die Markierung geeigneter Hybridisierungsareale mit vielen gut gespreiteten Metaphasen erfolgte mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops. Danach wurden etwa 2µl der für 5min bei 80°C denaturierten Hybridisierungslösung auf das Areal aufgebracht, das anschließend luftblasenfrei mit einem Deckglas bedeckt und mit Fixogum versiegelt wurde. Die Denaturierung des Präparates für 1.5min bei 75°C auf dem Heizblock erfolgte erst nachdem das Fixogum vollständig getrocknet war, da es sonst zu einer unerwünschten Blasenbildung kommt. Anschließend inkubierte das Präparat über Nacht bei 37°C in einem Metallbehälter im Wasserbad, um die Hybridisierung der Sonden mit den komplementären Chromosomenbereichen zu erreichen.

Tab. 2-16 Hybridisierung von Metaphasepräparaten.

Die verwendeten Lösungen, Materialien und Geräte sind in Tab. 2-15, S. 42, Tab. 2-3, S. 30 und Tab. 2-1, S. 29 aufgeführt.

Hybridisierung von Metaphasepräparaten
<ul style="list-style-type: none">• Präparat auftauen und Hybridisierungsareal markieren• 1-2µl Hybridisierungslösung auf das Areal aufbringen• mit Deckglas luftblasenfrei abdecken, mit Fixogum versiegeln, trocknen lassen• bei 75°C für 1.5min auf dem Heizblock denaturieren• Inkubation über Nacht bei 37°C in einem Metallbehälter im Wasserbad

2.8.5 Hybridisierung von Gewebeschnitten

Die Durchführung der Hybridisierung war für chemisch aufbereitetes Gewebe (s. 2.7.2.1, S. 36) und mikrowellenbehandelte Schnitte (s. 2.7.2.2, S. 37) im Prinzip identisch. Die Präparate wurden jeweils fünf Minuten in kaltem Ethanol der Konzentration 70%, 90% und 100% inkubiert, um eine vollständige Gewebedehydrierung herbeizuführen. Danach trockneten die Präparate bei Raumtemperatur, während die Hybridisierungslösung (s. Tab. 2-15, S. 43) 5min bei 80°C denaturierte. Anschließend wurde eine ausreichende Menge der Lösung (etwa 10µl) auf das Hybridisierungsareal aufgebracht, das bereits vor der Entfernung des Paraffins mittels eines Diamantstiftes unter dem Phasenkontrastmikroskop markiert worden war. Ein auf die Größe des jeweiligen Areals zugeschnittenes und luftblasenfrei platziertes Deckgläschen sollte nach Versiegelung mit Fixogum die Hybridisierungslösung im Areal festhalten und auch

deren Austrocknen verhindern. Die Gewebeschnitte inkubierten über Nacht bei 37°C, um vor der Denaturierung der Präparate ein möglichst voll-ständiges Eindringen der Sonden in das Gewebe zu erreichen. Die Denaturierung erfolgte im Falle einer angestrebten Visualisierung kompletter Chromosomenterritorien auf einem Heizblock bei 80°C für 15-20 Minuten, während für eine erfolgreiche Hybridisierung der Zentromerbereiche 7 Minuten bei 75°C als ausreichend waren. Daran schloss sich die eigentliche Hybridisierung bei 37°C für drei bis fünf Tage an.

Tab. 2-17 Hybridisierung von Gewebeschnitten.

Die verwendeten Chemikalien und Materialien sind in Tab. 2-3, S. 30 aufgeführt, der Heizblock in Tab. 2-1, S. 29.

Hybridisierung von Gewebeschnitten
<ul style="list-style-type: none">• Präparate jeweils 5min in 70%, 90% und 100% kaltem Ethanol inkubieren• bei RT trocknen lassen• Hybridisierungslösung (Herstellung s. 2.8.3, S.42) 5min bei 80°C denaturieren• Lösung (ca. 10µl) auf das zuvor mit Diamantstift markierte Hybridisierungsareal aufbringen• ein auf das Areal zugeschnittenes Deckglas luftblasenfrei auflegen und mit Fixogum versiegeln• über Nacht bei 37°C inkubieren• Denaturierung auf dem Heizblock: zur Hybridisierung von Territorien 15-20min bei 80°C, im Falle von Zentromeren 7min bei 75°C• 3-5 Tage bei 37°C inkubieren

2.8.5.1 FISH nach chemischer Gewebeaufbereitung

Die chemisch aufbereiteten Schnittpräparate (s. 2.7.2.1, S. 36) wurden jeweils fünf Minuten in kaltem Ethanol der Konzentration 70%, 90% und 100% inkubiert, um eine vollständige Gewebedehydrierung herbeizuführen. Danach trockneten die Präparate bei Raumtemperatur, während die Hybridisierungslösung (s. 2.8.3, S. 42) fünf Minuten bei 80°C denaturierte. Anschließend wurde eine ausreichende Menge der Lösung (etwa 10µl) auf das Hybridisierungsareal aufgebracht, das bereits vor der Entfernung des Paraffins mittels eines Diamantstiftes markiert worden war. Ein auf die Größe des jeweiligen Areals zugeschnittenes und luftblasenfrei platziertes Deckgläschen sollte nach Versiegelung mit Fixogum die Hybridisierungslösung im Areal festhalten und auch deren Austrocknen verhindern. Die Gewebeschnitte inkubierten über Nacht bei

37°C, um vor der Denaturierung der Präparate ein möglichst vollständiges Eindringen der Sonden in das Gewebe zu erreichen. Die Denaturierung erfolgte auf einem Heizblock bei 80°C für 20 Minuten. Daran schloss sich die eigentliche Hybridisierung bei 37°C für drei bis fünf Tage an.

Tab. 2-18 FISH nach chemischer Gewebeaufbereitung.

Die verwendeten Materialien sind in Tab. 2-4, S.31 aufgeführt, der Heizblock in Tab. 2-1, S. 29.

FISH an chemisch aufbereiteten Präparaten
<ul style="list-style-type: none">• Präparate jeweils 5min in 70%, 90% und 100% kaltem Ethanol inkubieren• bei RT trocknen lassen• Hybridisierungslösung (Herstellung s. 2.8.3,S. 42) 5min bei 80°C denaturieren• Lösung (ca. 10µl) auf das zuvor mit Diamantstift markierte Hybridisierungsareal aufbringen• ein auf das Areal zugeschnittenes Deckglas luftblasenfrei auflegen und mit Fixogum versiegeln• über Nacht bei 37°C inkubieren• 20min auf dem Heizblock bei 80°C denaturieren• 3-5 Tage bei 37°C inkubieren

2.8.6 Visualisierung der Hybridisierungsergebnisse

Nach der Entfernung des zur Versiegelung der Hybridisierungsareale auf den Metaphase- oder Gewebeschnittpräparaten eingesetzten Fixogums wurde das Deckglas vorsichtig abgehoben. Daran schloss sich die sofortige Überführung des jeweiligen Präparates in eine 2xSSC-Lösung (s. Tab. 2-5, S. 32) an. Die nachfolgenden Waschschriffe erfolgten alle in puffergefüllten Glasküvetten auf einem Schüttler. Dazu wurden die Präparate zunächst dreimal 5min bei 37°C in einer 2xSSC-Lösung inkubiert. Die anschließende wiederholte (3x5min) Inkubation in 0.1xSSC bei 62°C bewirkt aufgrund der höheren Temperatur und dem niedrigeren Salzgehalt die Beseitigung unspezifisch gebundener Sonden-DNA, da solche Bedingungen den DNA-Doppelstrang umso stärker destabilisieren je weniger komplementär die beteiligten Stränge sind. Danach wurden die Präparate in 4xSSC überführt und kurz bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Vor der Detektion der gebundenen Sonden mittels Antikörpern wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine 20minütige Inkubation in einer 4% bovines Serumalbumin (BSA) enthaltenden Blockierungslösung (Tab. 2-5, S. 32) bei 37°C abgesättigt. Für die nachfolgende Detektion wurden die jeweils benötigten Antikörper bzw. das Avidin in der BSA-Blockierungslösung entsprechend

der Herstellerangaben oder eigener Erfahrungswerte verdünnt (s. Tab. 2-4, S. 31). Danach wurden 150-200µl der Verdünnungslösung appliziert, mit Parafilm abgedeckt und bei 37°C für 30min (Metaphasepräparate) oder 60min (Gewebeschnitte) in einer feuchten Kammer inkubiert. Ungebundene Nachweismoleküle wurden durch anschließendes, dreimaliges (je 5min) Waschen in 4xSSC/0.2% Tween (s. Tab. 2-5, S. 32) bei 37°C auf dem Schüttler entfernt. Gegebenenfalls schlossen sich daran weitere Antikörper- bzw. Avidininkubationen nach dem gleichen Prinzip an. Die verwendeten Nachweisschemata für Metaphasepräparate und Gewebeschnitte sind in Tab. 2-19 aufgeführt. Bei Verwendung fluorochromgekoppelter Nachweismoleküle erfolgte die Inkubation im Dunkeln. Dem letzten Waschschrift folgte eine DNA-Gegenfärbung, die für Metaphasepräparate und Gewebeschnitte geringfügig unterschiedlich war. Erstere wurden mittels einer DAPI-Lösung (0.05µg/ml) gegengefärbt, wobei 200µl auf die Präparate aufgebracht, mit Parafilm abgedeckt und 5min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Nach Entfernung überschüssiger Färbelösung mit destilliertem Wasser trockneten die Präparate im Dunkeln. Gewebeschnitte dagegen wurden entweder 5min bei 37°C in einer DAPI (0.05µg/ml) und TO-PRO-3 (Endkonzentration 5µM) oder 10min in einer SYTO 16 enthaltenden Färbelösung inkubiert. Danach erfolgte eine kurze Überführung in 4xSSC/0.2% Tween, um überschüssige Gegenfärbungslösung zu entfernen. Zuletzt wurden die Präparate luftblasenfrei mit der Metaphasen- bzw. Gewebetragenden Seite auf mit 1-3 Tropfen Antifademedium versehene Deckgläschen passender Größe gelegt. Nach der Entfernung von überschüssigem Antifademedium wurden die Präparate mit Nagellack luftdicht versiegelt und bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Tab. 2-19 Visualisierung der Hybridisierungsergebnisse.

Die verwendeten Materialien und Lösungen sind in Tab. 2-3, S. 30, Tab. 2-4, S. 31 und Tab. 2-5, S. 32

Visualisierung der Hybridisierungsergebnisse		
<ul style="list-style-type: none"> • nach Fixogumentfernung 3x5min bei 37°C schüttelnd in 2xSSC inkubieren • 3x5min in 0.1xSSC bei 62°C inkubieren 8stringenter Waschschrift) • kurz in 4xSSC/0.2% Tween • 20min bei 37°C in 4% BSA-Blockierungslösung • Detektion durch 1 -3 Schichten Avidin- bzw. Antikörperlösungen (s. unten aufgeführte Nachweisschemata), jeweils unterbrochen durch 3x5min in 4xSSC/0.2% Tween bei 37°C auf dem Schüttler 		
Nachweis-	Metaphase-	Dig-Markierung: 30min Mouse- α -Dig-Cy3
schemata	präparate	Bio-Markierung: 30min Avidin-Alexa488
	Gewebe-	Dig-Markierung: 1. 60min Mouse- α -Dig,
	schnitte	2. 60min Sheep- α -Mouse-Cy3

Visualisierung der Hybridisierungsergebnisse

Bio-Markierung:

Territorien: 1. 60min Avidin-Cy5
2. 60min Goat- α -Avidin-Bio
3. 60min Avidin-Cy5

Zentromere: 1. 60min Avidin-Alexa488
2. 60min Goat- α -Avidin-Bio
3. 60min Avidin- Alexa488

- 3x5min in 4xSSC/0.2% Tween bei 37°C auf dem Schüttler
- Gegenfärbung:
Metaphasepräparate: 5min bei 37°C mit DAPI, mit H₂O dest. abspülen, im Dunkeln trocknen lassen
Gewebeschnitte: 5min bei 37°C mit DAPI und TO-PRO-3 oder 10min mit SYTO 16, kurz in 4xSSC/0.2% Tween
- Hybridisiertes Areal mit Antifademedium und Deckglas versehen und mit Nagellack luftdicht versiegeln

2.9 Immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten**2.9.1 Färbungen ohne nachfolgende FISH**

Die Gewebeschnitte wurden nach Paraffinentfernung und Rehydrierung (s. 2.7.1, S. 35 und anschließender Mikrowellenbehandlung (s. 2.7.2.2, S. 37) in 1xPBS und danach in 1xPBS/0.01% Tween (s. Tab. 2-5, S. 32) überführt. Daran schloss sich eine 20minütige Inkubation in einer 2% BSA enthaltenden Lösung an (s. Tab. 2-5, S. 32), um unspezifische Antikörperbindungsstellen im Gewebe zu blockieren. Anschließend wurden je 200 μ l einer den Herstellerangaben oder eigenen Erfahrungen entsprechenden Verdünnung des primären, gegen das jeweilige Protein gerichteten Antikörpers (s. Tab. 2-4, S. 31) auf die Objektträger aufgebracht und mit ausreichend großen Deckgläsern luftblasenfrei bedeckt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen (3x) in PBS/0.01% Tween bei 37°C auf dem Schüttler entfernt. Nach Auftragen der verdünnten Lösung des sekundären, fluorochromgekoppelten Antikörpers inkubierten die Objektträger 60min bei 37°C in einer feuchten, dunklen Kammer. Danach wurden die Präparate erneut 3x mit PBS/Tween bei 37°C auf dem Schüttler gewaschen. Die DNA-Gegenfärbung sowie Aufbringen von Antifademedium und Versiegelung der Präparate erfolgte wie unter 2.8.6, S. 45 beschrieben.

2.9.2 Färbungen mit nachfolgender FISH

Sollte der Nachweis eines Proteins mit einer nachfolgenden FISH kombiniert werden, erfolgte nach der Durchführung der immunhistochemischen Färbung keine DNA-Gegenfärbung. Stattdessen wurden die Präparate in kurz 1xPBS überführt und danach in 1% Formalin/1xPBS für 10min bei Raumtemperatur im Dunkeln nachfixiert. Das weitere Vorgehen entsprach 2.8.5, S. 43 und 2.8.6, S. 45.

2.10 Mikroskopie

2.10.1 Phasenkontrastmikroskopie

Das Phasenkontrastmikroskop (s. Tab. 2-2, S. 29) wurde zur Markierung geeigneter Hybridisierungsareale auf Metaphasepräparaten sowie Gewebeschnitten verwendet.

2.10.2 Epifluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops Axiophot 2 (s. Tab. 2-2, S. 29) wurden lediglich der Erfolg der Hybridisierungsexperimente sowie die Qualität der Hybridisierungsergebnisse visuell überprüft, bevor die eigentliche Datenerhebung am konfokalen Mikroskop erfolgte.

2.10.3 Konfokale *Laser Scanning*-Mikroskopie

Die dreidimensionale Analyse der Gewebeschnittpräparate erfolgte an dem konfokalen *Laser Scanning*-Mikroskop Zeiss LSM 410 (s. Tab. 2-2, S. 29). Dabei wurden als Scanparameter stets eine Bildgröße von 512x512 Pixel und eine Pixelgröße von 66x66nm gewählt. Der Abstand in z-Richtung zwischen den einzelnen Fokusebenen betrug immer 200nm. Somit wiesen alle in der vorliegenden Arbeit konfokalmikroskopischen Bilddaten dieselbe Voxelgröße auf. Des Weiteren wurde ein *Average* von 4 gewählt, d.h. das jeweils eine Fokusebene repräsentierende, vom Computer erfasste und gespeicherte Bild entsprach einer Mittelung von vier Scan-Durchläufen des Lasers in dieser Fokusebene. Dies stellte einen relativ guten Kompromiss zwischen der Verminderung des elektronischen Rauschens und dem mit einer höheren Anzahl von Scan-Durchläufen einhergehenden unerwünschten Ausbleichen des jeweiligen Fluorochroms dar. Helligkeit und Kontrast wurden für jedes zu erfassende Objekt individuell angepasst, um eine möglichst optimale Bildqualität zu erzielen.

2.11 Bildbearbeitung, Bildanalyse und Datenevaluierung

2.11.1 Bildbearbeitung unter Verwendung der Software ImageJ

Vor jeder Auswertung wurden die aus der konfokalmikroskopischen Datenerhebung resultierenden Bilder mit Hilfe von *ImageJ* 1.30u (Tab. 2-6, S. 34) zu Grauwertbilderstapeln (8bit) zusammengefasst, die jeweils einen Farbkanal eines erfassten Objekts repräsentieren. Die Korrektur axialer chromatischer Aberrationen erfolgte durch nachträgliche Verschiebung der Bilder der einzelnen Farbkanäle gegeneinander. Zu diesem Zweck wurden jeweils aus Bilderstapeln der infrarot emittierenden Farbstoffe TO-PRO-3 oder Cy5 die ersten beiden Einzelbilder, aus Stapeln der grün emittierenden Fluorochrome SYTO 16 oder Alexa488 die letzten beiden Einzelbilder und aus jenen des rot emittierenden Cy3 das erste und das letzte Einzelbild entfernt.

Alle Bilderstapel wurden zunächst einer linearen Normalisierung unterzogen, die dem höchsten Grauwert im Bilderstapel einen neuen Grauwert von 255 zuordnet, während der niedrigste einen Grauwert von 0 erhält. Alle anderen im Stapel vorkommenden Grauwerte werden mittels eines Skalierungsfaktors neu berechnet. Insgesamt gleicht diese Vorgehensweise Schwankungen infolge unterschiedlicher Hybridisierungsqualität und Mikroskopeinstellung sowie des mit der Scantiefe zunehmenden Farbstoffausbleichens aus. Das Ausmaß der weiteren Bearbeitung der Rohdaten richtete sich nach der Datenqualität und dem Verwendungszweck. Im Falle der Zentromerdaten erwiesen sich oft bereits die Setzung eines minimalen Schwellwertes sowie der Einsatz eines Medianfilters als ausreichend, um störendes Hintergrundrauschen zu entfernen. In den für die Segmentierung vorgesehenen Bilderstapeln der Kerngegenfärbungen wurden vor der Medianfilterung Helligkeit und Kontrast so angepasst, dass die Kerngrenze möglichst deutlich sichtbar war. Der stärksten subjektiven Einflussnahme unterlagen die Rohdaten der Chromosomenterritorien, da das Hintergrundrauschen andernfalls keine quantitative Auswertung zugelassen hätte. Die Territorien wurden nach Anpassung von Helligkeit und Kontrast und Medianfilterung in jedem Einzelbild des jeweiligen Stapels ausgeschnitten. Alle Bilderstapel wurden vor ihrer weiteren Verwendung nochmals normalisiert.

2.11.2 Bestimmung der relativen Kerngröße mittels ImageJ

Zur Bestimmung der relativen Kerngröße mittels *ImageJ* 1.30u wurde in jenem Bild des Stapels, in dem Länge und Breite des zu analysierenden Kerns maximal waren, ein tangierendes Rechteck um den Kern gelegt. Die Länge und Breite dieses Rechtecks wurden jeweils in μm umgerechnet. Die Tiefe des Kerneinschließenden Quaders ergab sich durch die Anzahl an Bildern des Stapels, die den entsprechenden Kern enthielten, multipliziert mit dem verwendeten z-Abstand von $0.2\mu\text{m}$. Die Multiplikation von Länge, Breite und Tiefe resultierte in dem durch das Volumen des Quaders repräsentierten relativen Kernvolumen in μm^3 .

2.11.3 Bildsegmentierung mittels Amira 3.0 bzw. 3.1.1 (TGS)

Die konfokalmikroskopische Erfassung einzelner Kerne ist bei Gewebeschnitten nicht möglich, da die Zellkerne sehr dicht beisammen liegen. Für quantitative Evaluierungen unter Verwendung der 3D-RRD Software (s. 2.11.5, S. 51) müssen die Kerne einer Stichprobe jedoch einzeln vorliegen. Daher wurde das Bildmaterial der Kerngegenfärbung jeden auszuwertenden Zellkerns einer halbautomatischen, dreidimensionalen Segmentierung mittels Amira 3.0 bzw. 3.1.1 (Tab. 2-6, S. 34) unterzogen. Diese blendete im Prinzip durch Zuordnung aller als nicht kernintern definierten Pixel zum Bildhintergrund störende benachbarte Kerne aus, indem derartige Bildpunkte einen neuen Grauwert von 0 erhielten und somit schwarz erschienen. Kerninternen Pixeln dagegen wurde ein Grauwert von 255 zugewiesen, was einer weißen Farbe entspricht.

Mit Hilfe des *Segmentation Editor* des Amira-Programms kann ein Stapel aus Einzelbildern in allen drei möglichen Raumrichtungen dargestellt und bearbeitet werden. Die interaktive Markierung einzelner Ebenen des jeweils zu isolierenden Kerns mit Hilfe eines Pinselwerkzeuges in drei oder mehr geeigneten Einzelbildern pro Stapel pro räumlicher Orientierung resultiert in einem Gerüst senkrecht aufeinander stehender Ebenen. Dieses bildet den Ausgangspunkt für eine automatische Interpolation, welche zu den markierten Ebenen die am besten passende Oberfläche generiert und somit das Gerüst zu einem dreidimensionalen Objekt ergänzt. Das Segmentierungsergebnis wurde dreidimensional rekonstruiert, um eine Speicherung als Bildfolge durchführen zu können. Diese wiederum wurde mittels *ImageJ* zu einem Bilderstapel zusammengefügt, der als artifizielle Gegenfärbung Eingang in die quantitative Analyse der relativen radialen DNA-Verteilung fand.

2.11.4 Bestimmung der Anzahl und des Volumens von Zentromersignalen durch Amira 3.1.1

Das *LabelVoxel*-Modul der Amira-Software erlaubt die Segmentierung eines Bilderstapels mittels eines vorher zu definierenden Schwellwertes ohne weitere interaktive Eingriffe. Dieser bezeichnet einen Grauwert zwischen 0 und 255. Der Schwellwert wurde innerhalb eines Bildstapels möglichst so gewählt, dass einerseits die Ränder intensiver und klar vom Hintergrund abgrenzbarer Signale den Grenzen der daraus resultierenden segmentierten Objekte entsprachen, andererseits jedoch schwächere Signale nicht von der Segmentierung ausgeschlossen waren. Die Software ermöglicht für die segmentierten Objekte eine Volumenmessung, welche die Einzelvolumina aller im jeweils betrachteten Bildstapel enthaltenen Objekte auflistet. Daraus kann auch die Signalanzahl abgeleitet werden. Objekte mit einer Voxelanzahl von 10 oder mehr wurden in die Signalzählung einbezogen, wobei dadurch die tatsächliche Anzahl an spezifischen Signalen sehr wahrscheinlich überschätzt wurde.

2.11.5 Analyse der relativen radialen DNA-Verteilung mittels 3D-RRD

Die dreidimensionale Verteilung von Signalen innerhalb normaler Zellkerne des menschlichen Kolonepithels sowie in Kolonkarzinomzellkernen wurde mit Hilfe der Software 3D-RRD (**3D relative radial distribution**) bestimmt, welche die relativen radialen Abstände der Signale zum Kernmittelpunkt anhand der Voxelverteilung der Signale misst (von Hase, 2002). Der relative Abstand eines Objektvoxels ergibt sich dabei aus der Division der absoluten Distanz dieses Voxels zum Kernmittelpunkt durch den Abstand jenes Kernvoxels am Außenrand des segmentierten Kerns, das auf einer Geraden mit dem Kernmittelpunkt und dem analysierten Objektvoxel liegt. Auf diese Weise erhalten direkt im Kernmittelpunkt lokalisierte Objektvoxel einen Wert von 0 bzw. 0%, während jene am äußersten Kernrand einen Wert von 1 bzw. 100% erhalten. Der segmentierte Kern wird dann automatisch in 25 äquidistante Schalen unterteilt, denen die nach ihrer Grauwertintensität gewichteten Objektvoxel entsprechend ihrer relativen Distanz zum Kernmittelpunkt zugeordnet werden. Der relative DNA-Gehalt des analysierten Objekts resultiert dabei aus der Division der Anzahl und Intensität der Objektvoxel in der jeweils betrachteten Schale durch Anzahl und Intensität aller Voxel des Untersuchungsobjekts. Die Resultate der einzelnen analysierten Kerne werden von dem Programm gemittelt und erlauben eine graphische Darstellung, bei welcher der relative Kernradius die Abszisse bildet, und der durchschnittliche, relative DNA-Gehalt die Ordinate.

3. Ergebnisse

Sämtliche im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente erfolgten an 10 bis 20 Mikrometer (μm) dicken Schnitten menschlichen Kolongewebes, das zuvor formaldehydfixiert und in Paraffin eingebettet worden war. Neben als normal klassifiziertem Gewebe der Kolonmukosa wurde auch Karzinomgewebe analysiert. Alle Gewebeschnitte wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Joachim Diebold, Pathologisches Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt. Aus diesem Grund konnte auf die Fixierungsbedingungen oder die nachfolgend zur Paraffineinbettung beitragenden Schritte kein Einfluss genommen werden, obwohl diese Parameter die Qualität von Hybridisierungen und immunhistochemischen Analysen nachhaltig beeinflussen können (s. 1.4, S. 22ff).

3.1 Chemische Aufbereitung und Mikrowellenbehandlung von Gewebeschnitten

Unabhängig von der Art der durchzuführenden Experimente ist zunächst die Entfernung des Paraffins mit Hilfe des Lösungsmittels Xylol (Methylbenzol) sowie die Rehydrierung der Gewebeschnitte in einer absteigenden Ethanolreihe erforderlich. Danach stehen mit der chemischen Aufbereitung und der Mikrowellenbehandlung zwei grundsätzlich verschiedene Methoden der weiteren Gewebehandhabung zur Verfügung.

Die Aufbereitung der Schnittpräparate mittels Chemikalien bzw. Biochemikalien umfasste die Permeabilisierung des Gewebes sowie die Verminderung störender Eigenfluoreszenz. Erstere wurde durch eine halbstündige Inkubation der Schnitte in einer 1M Lösung von Natriumisothiozyanat (NaSCN) bei 80°C sowie einer nachfolgenden Proteasebehandlung bei 37°C für 25min mittels einer Pepsinlösung der Konzentration 8mg/ml erzielt. Die Eigenfluoreszenz sollte durch Inkubationen in einer 0.1M Kupfersulfatlösung (CuSO_4) bei 37°C und einer 0.2% Natriumborhydridlösung (NaBH_4) bei Raumtemperatur unterdrückt werden. Eine Hybridisierung derart behandelter Schnittpräparate war jedoch erst nach deren Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe und anschließendem Lufttrocknen möglich. Des Weiteren erforderte die erfolgreiche Durchführung von Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen (FISH) eine im Vergleich zu Zellkulturpräparaten ausgedehnte Denaturierung von 20min bei 80°C auf einem Heizblock.

Trotz überaus vorsichtiger Entfernung des Deckglases im Anschluss an die Hybridisierung kam es im Falle des normalen Kolongewebes nicht selten zu unerwünschten Ablösungen desselben vom Objektträger. Besonders die für die

Analyse der Zellkernarchitektur maßgeblichen, longitudinal angeschnittenen Krypten waren davon betroffen. Obwohl der völlige Verlust des sich ablösenden Gewebes häufig vermieden werden konnte, beeinträchtigte die mit der Ablösung einhergehende starke Beanspruchung die Morphologie des auf dem Objektträger verbliebenen Gewebes und zerfetzte besonders in den luminalen Kryptenbereichen die Epithelstruktur. Daher beschränkte sich die konfokalmikroskopische Datenerhebung bei derart in Mitleidenschaft gezogenen Präparaten größtenteils auf die wenigen unversehrten Krypten, was sich insgesamt sehr limitierend auf die Stichprobengröße auswirkte. Die Datenerhebung gestaltete sich im basalen Kryptendrittel etwas einfacher als im oberen Drittel, obwohl die Kerndichte dort viel höher ist. Jedoch kennzeichnet die Basalmembran selbst im Falle nicht völlig longitudinal angeschnittener Krypten jene Epithelbereiche eindeutig als Kryptenbasis, die in unmittelbarer Nachbarschaft dieser Membran lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu waren luminale Kryptendrittel aufgrund der durch Gewebeablösung hervorgerufenen Zerstörung der Kryptenarchitektur weitaus schwieriger zu definieren. Neben der unerwünschten Ablösung des Gewebes schränkte auch die teilweise sehr ungleichmäßige Verteilung Signaltragender Zellen innerhalb des jeweiligen Hybridisierungsareals die Anzahl an auswertbaren Epithelkernen ein. Dies traf gleichermaßen auf normales Kolongewebe und Karzinomgewebe zu, obwohl Letzteres zumindest keine ausgeprägte Neigung zur Ablösung vom Objektträger aufwies. Während das heterogene Signalverteilungsmuster unabhängig von der Gewebart auftrat, zeigte es eine deutliche Abhängigkeit von der Markierungs- bzw. Nachweismethode. Mittels Digoxigenin markierte und durch ein zweistufiges Antikörpernachweissystem visualisierte Chromosomen blieben häufig auf Epithelkerne nahe der Schnittoberfläche oder angeschnittene und demnach für Zellkernarchitekturanalysen unbrauchbare Zellkerne beschränkt. Die Lokalisierung des jeweils betrachteten Kerns innerhalb der Krypte oder die dortige Kerndichte war dabei nicht ausschlaggebend. Biotinmarkierungen hingegen gingen mit einer viel gleichmäßigeren Verteilung Signaltragender Zellen innerhalb des hybridisierten Areal einher. Derartig markierte Chromosomen wurden mit Hilfe eines dreistufigen Nachweisverfahrens sichtbar gemacht, das aus zwei Inkubationen mit fluoreszenzmarkiertem Avidin sowie einem aus Gründen der Signalverstärkung zwischengeschalteten, mit Biotin gekoppelten Antikörper bestand. Die beschriebenen Beobachtungen legen eine schlechtere Zugänglichkeit des Gewebes für Antikörper nahe. Demgegenüber scheinen die im Vergleich dazu kleineren Avidinmoleküle derartige Probleme nicht in einem solchen Ausmaß zu haben. Dafür spricht auch die geringere Signalintensität Biotinmarkierter Chromosomen, die möglicherweise durch die ausbleibende Signalverstärkung aufgrund der mit der Entfernung von der Schnittoberfläche zunehmenden Unzugänglichkeit für Antikörper zustande kommt. Es sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, dass auch die Art der gewählten

Fluoreszenzmarkierung Einfluss auf die Signalverteilung nehmen könnte. Die Wellenlänge des verwendeten Laserlichts korreliert mit dessen Eindringtiefe ins Gewebe, wobei längerwelliges Licht kürzeren Wellenlängen diesbezüglich überlegen ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Biotinmarkierungen stets durch den Fluoreszenzfarbstoff Cy5 visualisiert, während für Digoxigeninmarkierungen ausschließlich das durch eine kürzere Wellenlänge charakterisierte Cy3 verwendet wurde. Die beschriebenen Phänomene traten bei chemisch aufbereiteten Schnittpräparaten normalen Kolongewebes in Erscheinung, die mit Sonden für die Chromosomen 1 und 20 sowie 11 hybridisiert worden sind. Die simultan visualisierten Chromosomen 18 und 19 zeigten derartige Beeinträchtigungen nur im Falle des Karzinomgewebes, während das Normalgewebe eine in Bezug auf die Signalverteilung deutlich bessere Qualität aufwies und auch keine so ausgeprägte Neigung zur Gewebeablösung bei Entfernung des Deckglases nach erfolgter Hybridisierung zeigte. Allerdings stammte der dafür verwendete Gewebeschnitt von einem anderen Block als die für den Nachweis der Chromosomen 1 und 20 bzw. 11 eingesetzten Normalgewebepräparate. Beschaffenheit und Widerstandsfähigkeit dieses Präparates schienen für die chemische Gewebeaufbereitung und anschließende Hybridisierungsexperimente besser geeignet zu sein, zumal dieser Gewebeschnitt auch eine Inkubation mit NaBH_4 zuließ. Im Falle der empfindlicheren, der Visualisierung der Chromosomen 1 und 20 bzw. 11 zugeordneten Schnittpräparate ging dies stets mit einer Ablösung des Gewebes vom Objektträger einher und musste daher unterbleiben. Prinzipiell könnte dies eine Minderung der Hybridisierungsqualität verursacht haben, da die Natriumborhydridlösung aufgrund der Freisetzung von Wasserstoff leicht perlt und infolgedessen eine gewisse mechanische Permeabilisierung des Gewebes bewirken könnte.

Die Mikrowellenbehandlung beeinträchtigte die Gesamtmorphologie sehr viel weniger als die chemische Bearbeitung und führte auch nicht zur Ablösung des Gewebes vom Objektträger. Neben der relativ robusten Basalmembran blieben auch die empfindlichen longitudinal angeschnittenen Krypten gut erhalten, was insgesamt auf eine deutlich geringere mechanische Beanspruchung des Gewebes hindeutet. Der entscheidende Vorteil der Mikrowellenbehandlung gegenüber der chemischen Gewebeaufbereitung besteht in der prinzipiell möglichen Kombination von FISH und immunhistochemischem Proteinnachweis. Die angestrebten Analysen der Zellkernarchitektur des Kolonepithels im Verlauf von Differenzierung und Kanzerogenese hängen in hohem Maße von der simultanen Visualisierung der Ziel-DNA und Markerproteinen ab, die eine zweifelsfreie Bestimmung von Zelltyp, Differenzierungsgrad und Zellzyklusphase gestatten. Die Erhitzung deparaffinierter und rehydrierter Gewebeschnitte in der Mikrowelle in Gegenwart eines Puffers wird als *Antigen Retrieval* bezeichnet und bewirkt eine Wiederherstellung von Proteinepitopen, die infolge der Formaldehydfixierung maskiert oder verändert vorliegen und deswegen nicht direkt

nachweisbar sind (Cattoretti *et al.*, 1992; Gerdes *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 1991). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Gewebeschnitte für insgesamt 20 bis 25 Minuten in einer mit einem Zitratpuffer der Konzentration 10mM und einem pH-Wert von 6,0 gefüllten Plastikschaale bei 700 Watt in einer Haushaltsmikrowelle erhitzt. Dies diente neben der Vorbereitung des Gewebes für FISH-Experimente besonders der Wiederherstellung von Epitopen der Markerproteine KI-67 und MUC-2 (Mucin-2). Das erstgenannte Protein ist in zyklierenden, nicht aber in ruhenden Zellen im Zellkern nachweisbar und zeigt dabei ein spezifisches, von der Zellzyklusphase abhängiges Färbemuster (Verheijen *et al.*, 1989). Obwohl der Nachweis von KI-67 in dieser Arbeit grundsätzlich gelang, konnte infolge der stets relativ diffusen Signalverteilung die für die frühe G1-Phase charakteristische, punktförmige Verteilung des Proteins innerhalb des Nukleoplasmas und seine ausschließlich nukleoläre Lokalisation in den späteren Zellzyklusphasen nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund erfolgte in den Experimenten lediglich eine Unterteilung in KI-67 positive und negative Zellkerne. Mögliche Einflüsse der Zellzyklusphase auf die Verteilung von Ziel-DNA konnten somit nicht untersucht werden. MUC-2 kann als Marker für terminal differenzierte, Schleimsezernierende Becherzellen verwendet werden (Chang *et al.*, 1994; Devine *et al.*, 1993; Gambus *et al.*, 1993). Aufgrund seiner perinukleären Lokalisierung eignet sich das Protein im Prinzip auch für Analysen der Zellkernarchitektur. Problematisch war jedoch die Beschränkung der Proteinsignale auf Bereiche nahe der Schnittoberfläche (Abb. 3-1, S. 55) was sich insgesamt sehr limitierend auf die Stichprobengröße auswirkte.

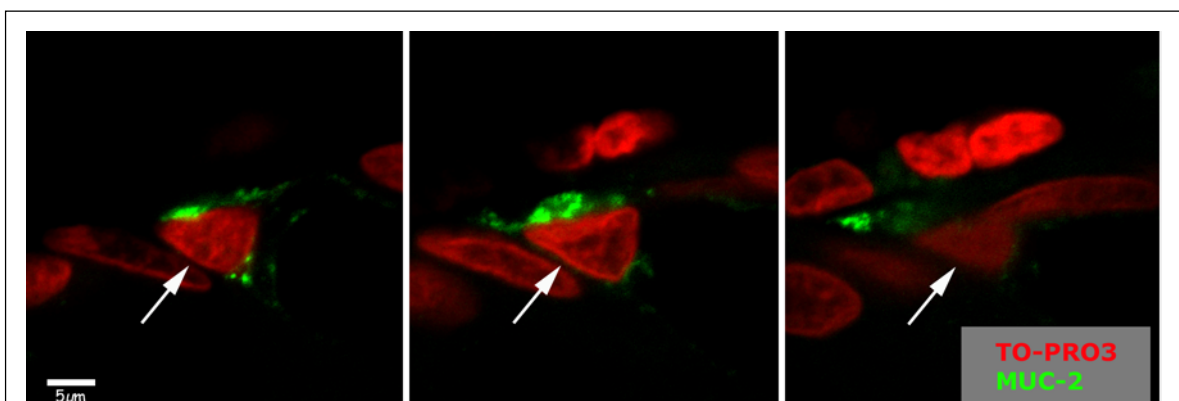


Abb. 3-1 Immunhistochemischer Nachweis von Mucin-2 in normalem Gewebe des menschlichen Kolonepithels.

Dargestellt sind drei Schnittebenen eines mittels TO-PRO3 visualisierten, etwa 9.4 μ m dicken Becherzellkerns (s. Pfeil) einer normalen Darmkrypte des Kolonepithels. Die von links nach rechts angeordneten Kernebenen waren etwa 2.6 μ m, 5.2 μ m und 8.4 μ m von der Kernoberfläche entfernt lokalisiert. Das nachgewiesene Protein Mucin-2 (MUC-2) dient als Marker für terminal differenzierte Becherzellen und ist hier grün dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Intensität der Proteinsignale im oberen Kernbereich deutlich höher ist als im unteren. In noch tieferen Gewebeschichten waren in der Regel kaum noch Signale vorhanden.

Ein weitaus größeres Problem ergab sich durch die mangelnde Hybridisierbarkeit der mikrowellenbehandelten Präparate. Lediglich Zentromere ließen sich stets erfolgreich mit einer relativ hohen Signalqualität visualisieren und erlaubten deshalb die Kombination von FISH und immunhistochemischem Nachweis von KI-67 oder MUC-2. Im Falle kompletter Chromosomenterritorien lieferte nur ein einziger Kolonkarzinomschnitt nach Hybridisierung mit einem Sonden-gemisch für Chromosom 11 hinreichend gute Signale für eine quantitative Erfassung der relativen radialen DNA-Verteilung, wobei jedoch kein Nachweis von KI-67 erfolgte. Der Hybridisierung dieses Chromosoms gelang zwar auch auf einen Normalgewebeschnitt, von einer konfokalmikroskopischen Datenerhebung wurde aber wegen der großen Zahl unspezifischer Signale abgesehen. Im Falle eines Karzinomschnittes verhinderten die äußerst schwachen Signale für die Chromosomen 18 und 19 weitere experimentelle Schritte. Der sehr begrenzten Anzahl einigermaßen gelungener Visualisierungen von Chromosomenterritorien stehen viele Hybridisierungen gegenüber, die durch völlige Abwesenheit von Signalen gekennzeichnet waren. Dies deutet insgesamt auf eine mikrowellenbedingte Zerstörung der Ziel-DNA hin.

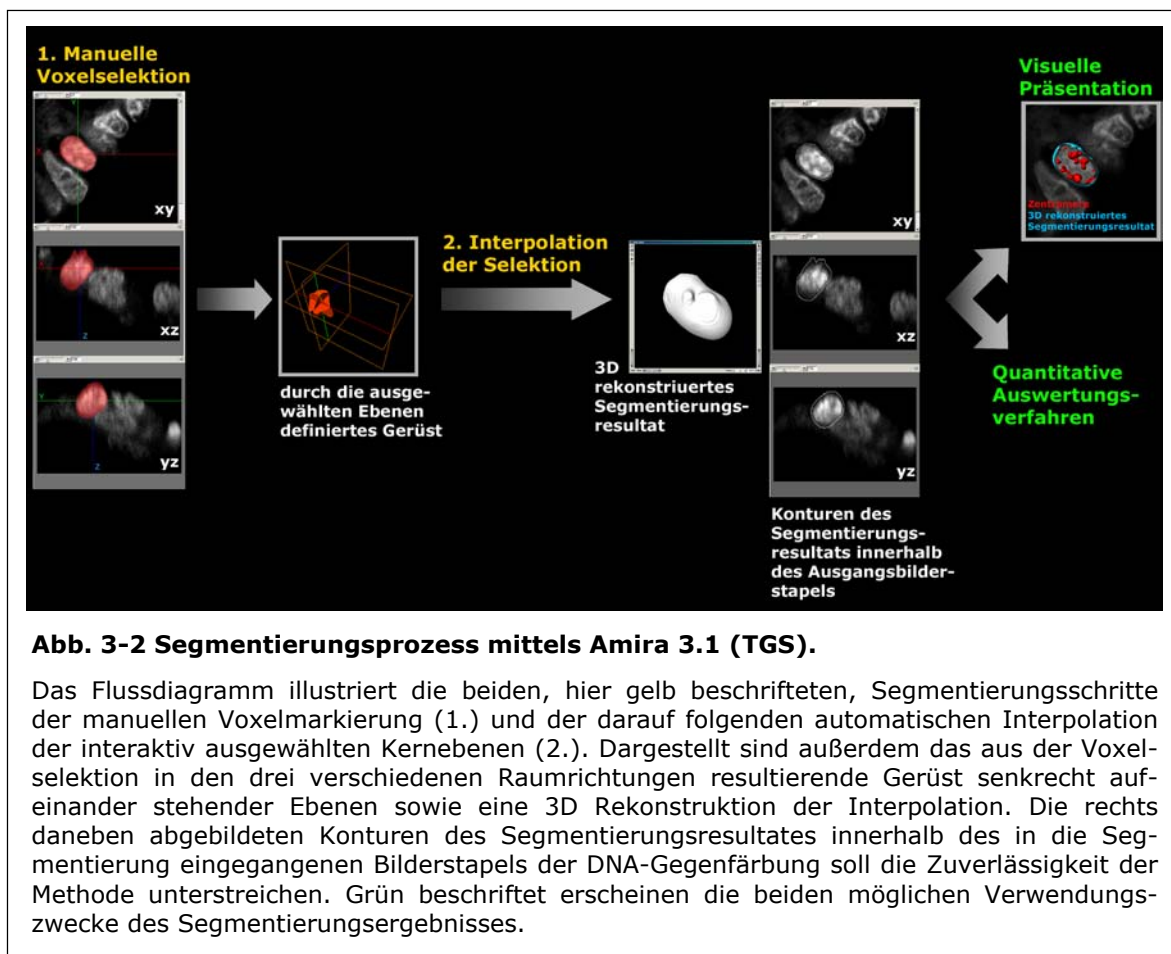
Tab. 3-1 Gegenüberstellung der chemischen Gewebeaufbereitung und der Mikrowellenbehandlung.

Die Tabelle zeigt einen Vergleich der Resultate der beiden verwendeten Gewebeaufbereitungsmethoden hinsichtlich der Erhaltung der Gewebestruktur und der Durchführung von Protein-nachweisen sowie FISH-Analysen.

Gegenüberstellung der chemischen Gewebeaufbereitung und der Mikrowellenbehandlung		
	Chemische Gewebeaufbereitung	Mikrowellenbehandlung
Erhaltung der Gewebestruktur	schlecht	gut
Immunhistochemischer Proteinnachweis	nicht nachweisbar	gut bis mäßig nachweisbar
Visualisierung von Chromosomenterritorien	möglich, aber schwierig	fast unmöglich
Visualisierung von Zentromeren	gut	gut bis sehr gut

3.2 Segmentierung und Bildbearbeitung

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte zellkernarchitektonische Analysen bestanden aus der Visualisierung aller Zentromere oder einzelner Chromosomenterritorien (CTs) in Zellkernen des menschlichen Kolonepithels mit Hilfe von Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen. Neben der qualitativen Beurteilung von Chromatintextur und Kern- bzw. Gewebemorphologie wurde auch ein quantitatives Evaluierungsverfahren eingesetzt. Das zu diesem Zweck verwendete Computerprogramm (*three dimensional relative radial distribution*; 3D-RRD) bestimmt die radiale, dreidimensionale Verteilung der durch die konfokalmikroskopisch erfassten Fluoreszenzsignale repräsentierten DNA-Abschnitte im Zellkern (Cremer M. *et al.*, 2003; Cremer M. *et al.*, 2001). Die Software ist für die Auswertung von Bildstapeln konzipiert, die jeweils nur einen einzigen Kern enthalten. Anders als bei Zellkulturpräparaten ist jedoch im Falle von Gewebeschnitten keine konfokalmikroskopische Erfassung einzelner Kerne möglich, da diese sehr dicht beisammen liegen und einander häufig überlappen. Aus diesem Grund ist eine Segmentierung des Bildmaterials anhand der Gegenfärbung jeden auszuwertenden Kerns notwendig. Die Zellkerne können auf diese Weise optisch aus dem Gewebeverband isoliert und bei Bedarf auch dreidimensional rekonstruiert werden. Im Prinzip werden dabei lediglich sämtliche als nicht kernintern definierten Pixel dem Bildhintergrund zugeordnet und erhalten einen Grauwert von Null. In vorliegender Arbeit wurde zu diesem Zweck das Softwarepaket Amira 3.0 bzw. 3.1.1 (TGS) eingesetzt. Das Programm verfügt über einen *Segmentation Editor*, der eine interaktive Segmentierung digitaler Bilddaten gestattet (s. Abb. 3-2, S. 58). Hierfür wurde der zu segmentierende Bilderstapel zunächst simultan in drei verschiedenen Stapeln dargestellt, die den drei räumlichen Orientierungen xy, xz und yz des Ausgangsbilderstapels entsprechen. Nach der simultanen Zentrierung des jeweils interessierenden Kerns in allen drei Stapeln erfolgte eine manuelle Pixelmarkierung einzelner optischer Ebenen des Kerns in jeder der drei Orientierungen, wobei das Vorhandensein deutlich sichtbarer Kerngrenzen das wichtigste Auswahlkriterium für die zu markierenden Schnittebenen darstellte. Überdies wurden die Ebenen möglichst so gewählt, dass sie über den gesamten Kern verteilt waren. Insgesamt wurden etwa zwischen 9 und 15 Ebenen pro Kern markiert. Der manuelle Pixelselektionsprozess resultierte in einem Gerüst aus rechtwinklig aufeinander stehenden Ebenen, das als Ausgangspunkt der nachfolgenden Interpolation diente. Im Verlauf dieses automatischen Prozesses generierte Amira jenes dreidimensionale Objekt, das am besten zu den markierten Ebenen passte. Das Segmentierungsergebnis wurde als Bildsequenz abgespeichert und fungierte im Rahmen der quantitativen Evaluierung mittels 3D-RRD-Software als artifizielle Kerngegenfärbung.



Die Form der durch die Segmentierung geschaffenen Objekte stellte eine gute Annäherung an die tatsächliche Gestalt der jeweils bearbeiteten Kerne dar. Die Objektkonturen offenbarten eine relativ gute Übereinstimmung mit Laminfärbungen der segmentierten Kerne (s. Abb. 3-3, S. 59), die der Visualisierung der Kernmembran dienten. Dadurch sollte geklärt werden, ob unter Umständen automatische Konturerkennungsprogramme zum Zweck der Kernsegmentierung eingesetzt werden könnten. Leider versagte die Laminfärbung in den der automatischen Segmentierung entgegenstehenden Überlappungsbereichen der Zellkerne regelmäßig und lieferte dort nicht die charakteristische ringförmige Struktur, sondern zeigte allenfalls eine diffuse Signalverteilung ohne eindeutigen Bezug zu einer Kernmembran.

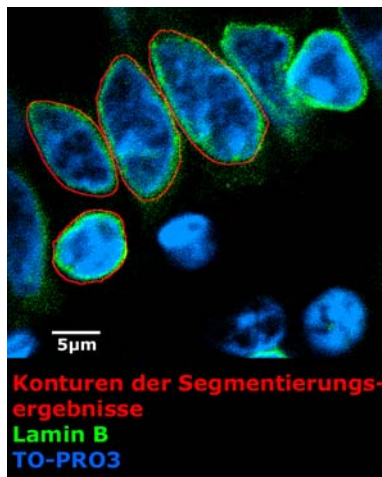


Abb. 3-3 Konturen verschiedener Segmentierungsergebnisse und Laminfärbung von normalem Kolonepithel.

Die rot dargestellten Konturen kolokalisieren relativ gut mit dem in grün abgebildeten Lamin B, dessen der Visualisierung der Kernmembran diene. Die durch die Färbung mittels TO-PRO3 repräsentierten Epithelkerne erscheinen in blau.

Das Segmentierungsergebnis ist aufgrund der von markierten Ebenen unterschiedlicher räumlicher Orientierung aus beginnenden Interpolation exakter als eine rein manuelle Segmentierung anhand des Ausgangsbildstapels, wie sie zum Vergleich mit ImageJ durchgeführt wurde (Abb. 3-4, S. 60). Mit diesem Programm kann ein Zellkern lediglich durch Ausschneiden des Kerns in jedem einzelnen Bild des Stapels optisch isoliert werden. Der Zeitaufwand war bedeutend höher als bei Verwendung von Amira. Ausschlaggebend für die Überlegenheit der halbautomatischen, dreidimensionalen Segmentierung mit Hilfe von Amira ist jedoch die Tatsache, dass dabei Bereiche mit unklarem Verlauf der Kerngrenze ausgespart werden können. ImageJ erlaubt dies nicht, da keine Interpolation stattfindet. Die Festlegung der Kerngrenze unterliegt daher einer subjektiven Einflussnahme seitens des Experimentators, wodurch sich unter Umständen signifikante Abweichungen von der tatsächlichen Kernform ergeben können. Überdies wiesen mittels ImageJ isolierte Kerne eine unrealistisch kantige Oberfläche mit teilweise sehr ausgeprägten Stufen auf.

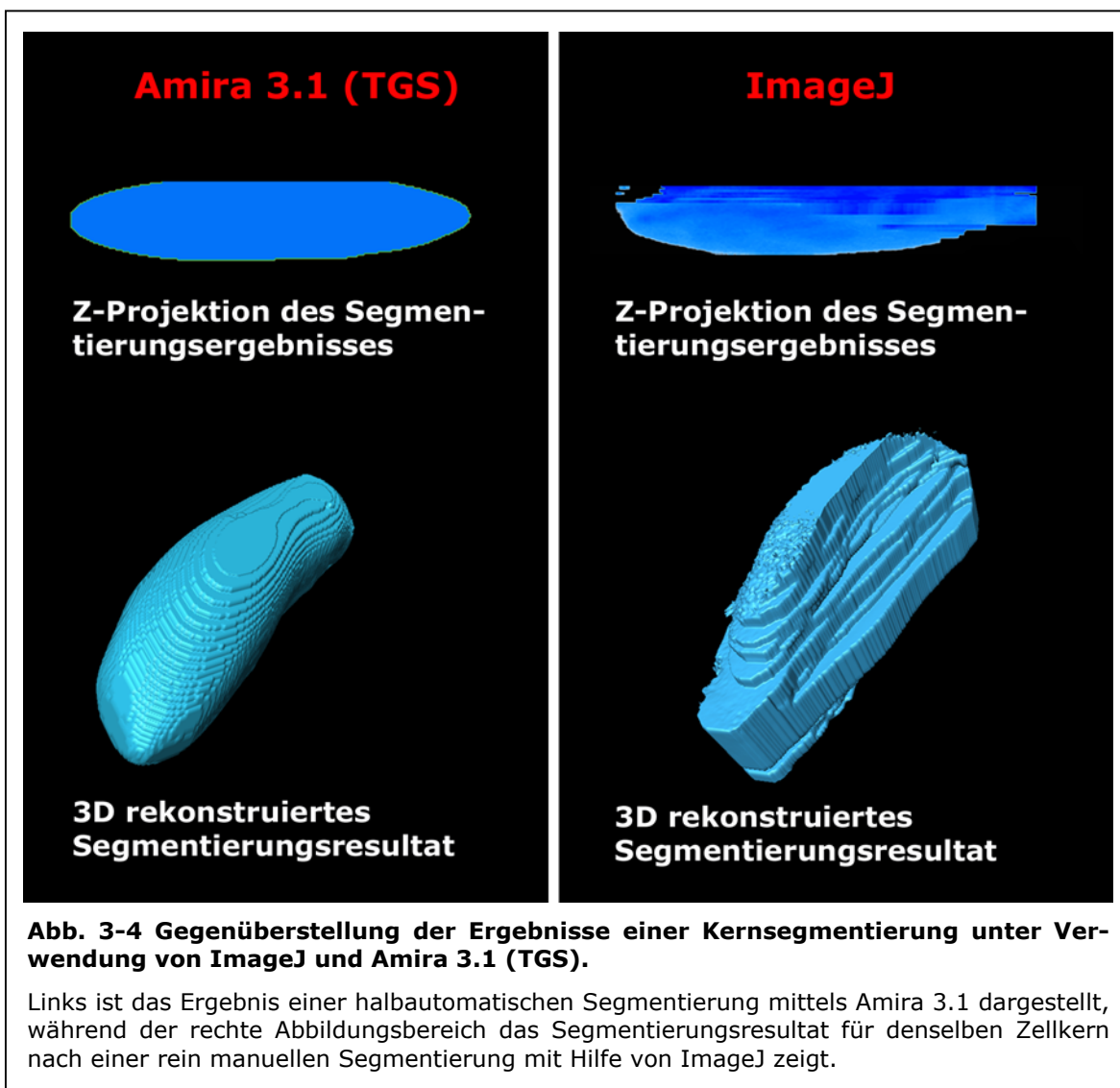


Abb. 3-4 Gegenüberstellung der Ergebnisse einer Kernsegmentierung unter Verwendung von ImageJ und Amira 3.1 (TGS).

Links ist das Ergebnis einer halbautomatischen Segmentierung mittels Amira 3.1 dargestellt, während der rechte Abbildungsbereich das Segmentierungsergebnis für denselben Zellkern nach einer rein manuellen Segmentierung mit Hilfe von ImageJ zeigt.

Ein generelles Problem bei der optischen Isolierung der Zellkerne aus Bildmaterial von Gewebeschnitten bestand darin, dass alle anderen im Bildstapel enthaltenen Kerne lediglich ausgeblendet wurden. Die Überlappungsbereiche zwischen verschiedenen Kernen konnten nicht den beteiligten Kernen zugeordnet werden. Deshalb führte die Segmentierung benachbarter Zellkerne nicht selten zu Schnittmengen zwischen den Segmentierungsergebnissen, innerhalb derer eine eindeutige Zuordnung von Signalen nur eingeschränkt möglich war (Abb. 3-5, S. 61). Um Fehlzuordnungen möglichst zu vermeiden, mussten die Signale für jeden auszuwertenden Kern in einem sowohl die Gegenfärbung aller Kerne, als auch die Signale des segmentierten Kerns sowie die Konturen des Segmentierungsergebnisses enthaltenden Bildstapel hinsichtlich ihrer Kernzugehörigkeit überprüft werden. Während dies für komplette Chromosomen relativ unkompliziert war, erwiesen sich Zentromere in dieser Hinsicht als problematisch. Die simultane Visualisierung aller Zentromere resultiert in einer variablen Anzahl meist peripher lokalisierter Signale. Da diese im Vergleich zu Chromosomenterritorien eine viel geringere Größe aufweisen, sind im Falle

von Segmentierungsschnittmengen unter Umständen in den beteiligten artifizialen Kernen Signalteile ähnlicher Größe lokalisiert. Deshalb wurde bei den Zentromeranalysen der den artifizialen Kern enthaltende, invertierte Bildstapel von dem Bildstapel der gesamten Zentromersignale subtrahiert. In dem resultierenden Bildstapel waren lediglich jene Zentromersignale enthalten, die ganz oder teilweise innerhalb des segmentierten Kerns lokalisiert waren. Auf diese Weise konnte zumindest eine objektive, nachvollziehbare Signalzuordnung erreicht werden. Um grobe Fehlzuordnungen zu vermeiden, wurde das Subtraktionsresultat einer visuellen Überprüfung unterzogen.

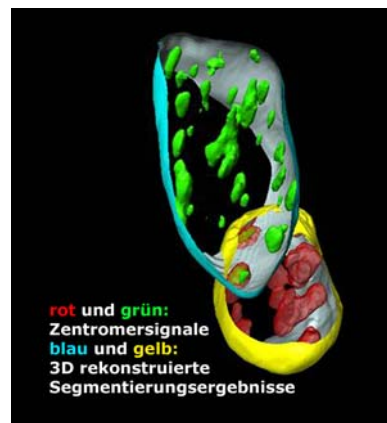
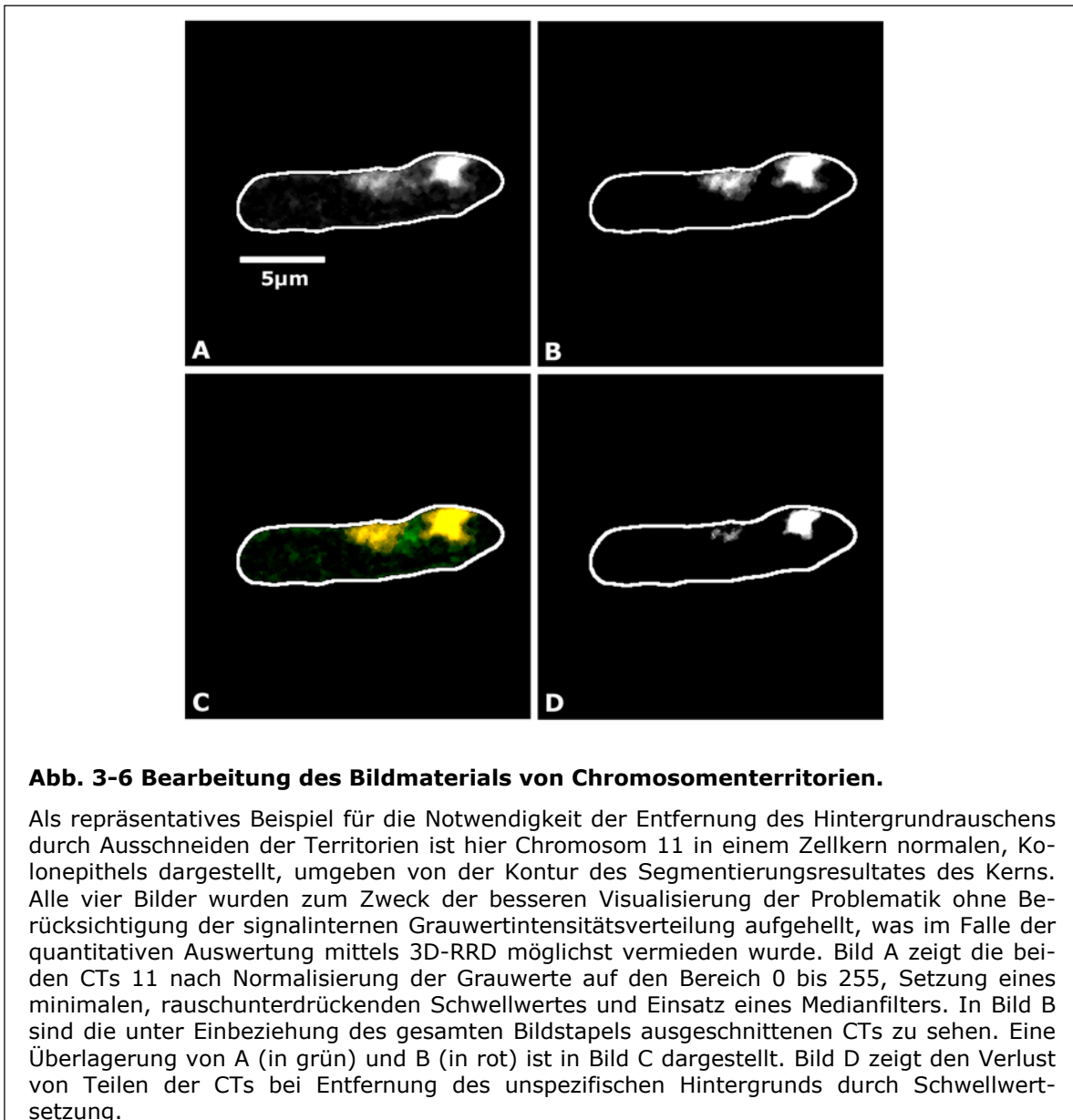


Abb. 3-5 Schnittmenge zwischen zwei benachbarten, segmentierten Kernen.

Dargestellt sind zwei benachbarte Epithelkerne, deren 3D rekonstruierte Segmentierungsergebnisse eine Schnittmenge bilden, die einer zweifelsfreien Signalzuordnung entgegenstehen kann. Die in rot und grün abgebildeten Zentromersignale veranschaulichen dieses Problem.

Neben der optischen Isolierung einzelner Zellkern anhand der DNA-Gegenfärbung, erfordert eine quantitative Bestimmung der radialen DNA-Verteilung mittels 3D-RRD auch eine relativ umfangreiche Bearbeitung der FISH-Signale. Diese Notwendigkeit resultiert aus der schlechteren Signalqualität von Gewebeschnittpräparaten im Vergleich zu Zellkulturmaterial. Lediglich im Falle der Zentromerhybridisierungen erwiesen sich bereits wenige, verhältnismäßig objektive Bearbeitungsschritte als ausreichend. Im Gegensatz dazu benötigten Chromosomenterritorien eine weitaus umfangreichere Bearbeitung des Bildmaterials. Das ausgeprägte Hintergrundrauschen konnte nicht selten nur durch Ausschneiden des Territoriums in jedem Einzelbild des Stapels entfernt werden, was insbesondere für solche Chromosomen galt, die mittels Digoxigenin markiert und durch Antikörpergekoppeltes Cy3 visualisiert worden waren (Abb. 3-6, S. 62). Eine gewisse subjektive Einflussnahme auf das auszuwertende Datenmaterial ließ sich daher nicht vermeiden.



3.3 Methodisch bedingte Veränderungen der Chromatintextur, Kernmorphologie und Kerngröße

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analysen der Chromatintextur sowie der Kernmorphologie sollten Auswirkungen der Gewebeaufbereitung und FISH-Prozedur auf die Zellkernstruktur aufdecken. Für Zellkulturmaterial konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Hitzedenaturierung mit dem Verlust von Proteinen und vermutlich auch DNA einhergeht und eine Auflockerung des Chromatins zur Folge hat (Mongelard *et al.*, 1999). Insgesamt bleibt jedoch die ursprüngliche DNA-Verteilung nach Formaldehydfixierung und auch nach Durchführung von Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen (FISH) relativ gut

erhalten (Solovei *et al.*, 2002). Da Gewebeschnitte im Vergleich zu Zellkulturpräparaten viel härteren Einflüssen ausgesetzt sind, ist die Bestimmung des Ausmaßes möglicher Beeinträchtigungen der Kernstruktur infolge dieser für die Interpretation der Ergebnisse zellkernarchitektonischer Analysen wichtig. Darum wurden Chromatintextur und Morphologie einzelner Kerne in normalem Kolongewebe und in Kolonkarzinomgewebe in verschiedenen Bearbeitungsstadien anhand simultaner DNA-Fluoreszenzfärbungen mit TO-PRO-3, SYTO 16 und Propidiumiodid (PI) sowie einer Einzelfärbung durch TO-PRO-3 untersucht (s. Abb. 3-7, S. 64 und Abb. 3-8, S. 65).

Das Chromatin erschien direkt nach Paraffinentfernung und Rehydrierung des Gewebes mehr oder weniger stark kondensiert, was sich sowohl im normalen, als auch im entarteten Gewebe in einer relativ randständigen DNA-Gegenfärbung, mit Strukturen im Kerninneren niederschlug. Nach einer simulierten FISH-Prozedur mit einer Hitzdenaturierung von 7min bei 75°C auf dem Heizblock, die sich einer Mikrowellenbehandlung von 20 Minuten bei 700Watt (W) und einer nachfolgenden Gewebedehydrierung anschloss, war das Chromatin insgesamt deutlich diffuser verteilt. Die zuvor sichtbaren Strukturen konnten jedoch meist auch nach der simulierten FISH identifiziert werden. Dies galt gleichermaßen für alle drei verwendeten Farbstoffe, wobei auch die Färbemuster fast identisch waren. Dennoch traten gewisse Unterschiede im Ausmaß der Veränderung des Chromatinmusters auf. TO-PRO-3 lieferte nach der Denaturierung stets viel diffusere Färbemuster als PI und SYTO 16, die einander hinsichtlich der Strukturen im Kerninneren stärker ähnelten.

Da PI und SYTO 16 nicht auswaschbar sind und eine Beeinflussung der verschiedenen Farbstoffe untereinander nicht völlig ausgeschlossen werden kann, wurde in einem weiteren Experiment normales Kolongewebe und Kolonkarzinomgewebe einer Einzelfärbung mit TO-PRO-3 unterzogen. Das beschriebene Chromatinmuster sowie dessen Veränderung nach simulierter FISH-Prozedur waren auch hier ersichtlich, jedoch weniger stark ausgeprägt. Die im Vergleich zu der vorherigen Analyse viel weniger auffälligen Strukturen im Kerninneren konnten in vielen betrachteten Kernen nach der simulierten FISH nicht oder nicht eindeutig wieder aufgefunden werden. Allerdings betrug die Denaturierungszeit in diesem Experiment 20 Minuten bei 80°C. Auch handelte es sich um andere Gewebelöcke als in dem vorangegangenen Experiment, was auf Einflüsse der natürlichen Gewebheterogenität und/oder der Fixierung auf das nach Paraffinentfernung und Rehydrierung beobachtete Chromatinmuster schließen lässt.

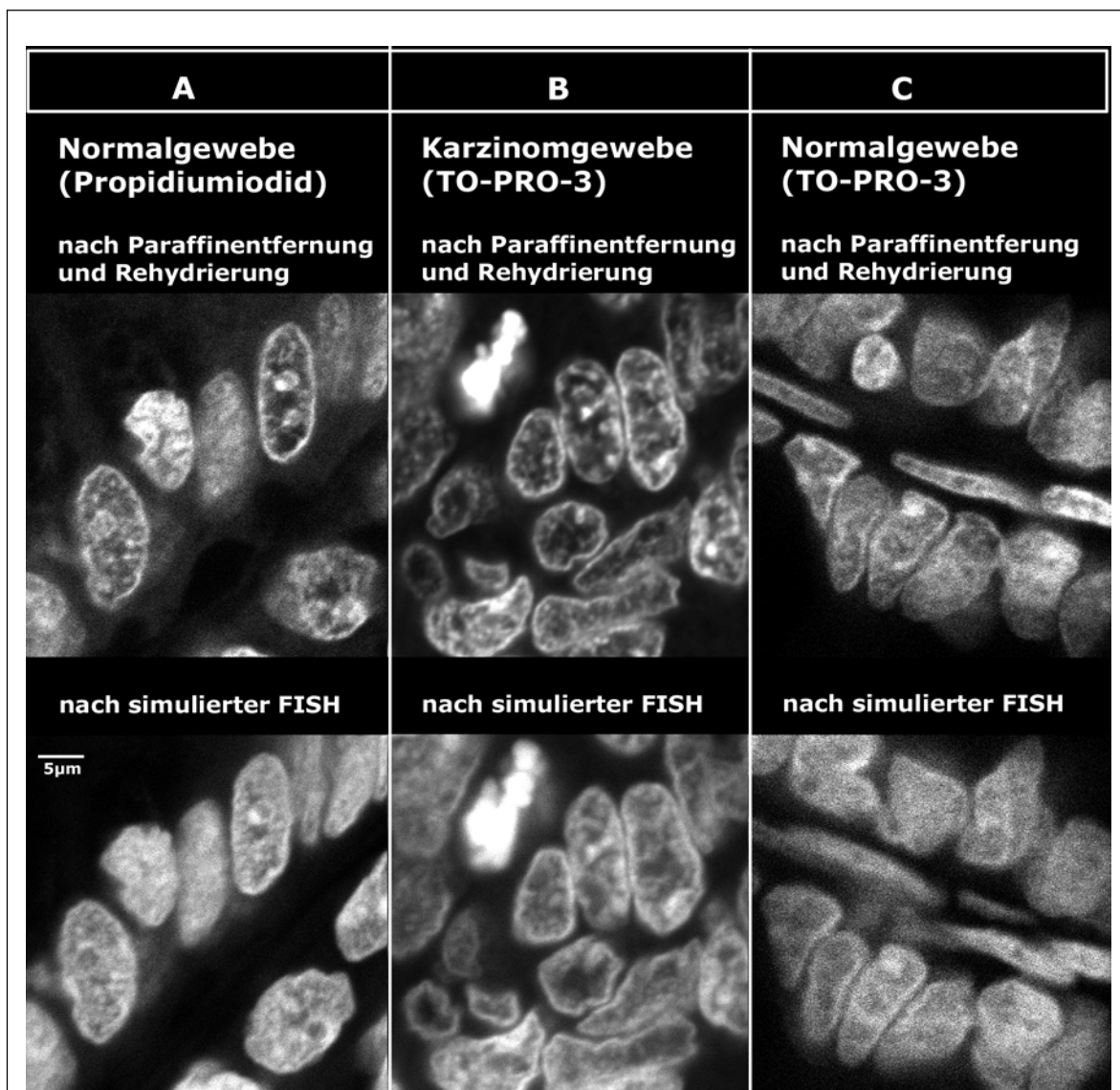
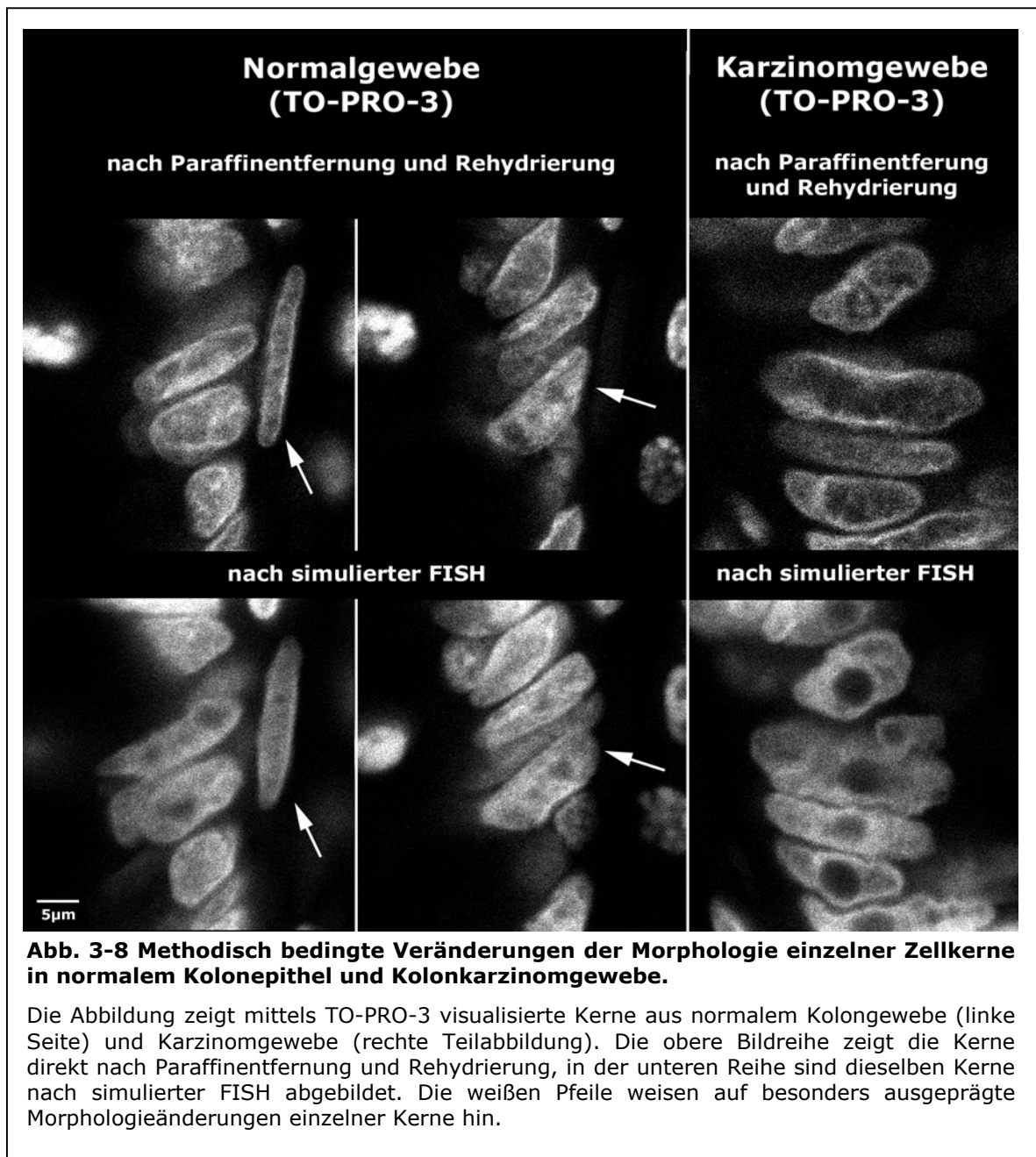


Abb. 3-7 Einzelne Zellkerne aus normalem Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe vor und nach Hitzedenaturierung.

Dargestellt sind repräsentative Zellkerne aus normalem Kolonepithel und Karzinomgewebe nach Paraffinentfernung und Rehydrierung (obere Reihe) sowie nach Hitzedenaturierung bzw. simulierter FISH. Die Kerne der Teilabbildungen A und B wurden simultan mit Propidiumiodid, TO-PRO-3 und SYTO 16 (nicht gezeigt) visualisiert, während in Teilabbildung C nur TO-PRO-3 verwendet wurde. Die Chromatinverteilung ist nach der Denaturierung stets diffuser, wobei der Unterschied im Färbemuster vor und nach Denaturierung in Teilabbildung C am geringsten ausfällt. Im Karzinomgewebe in Teilabbildung B sind die vorher sichtbaren Strukturen nach der Denaturierung besser erkennbar als im gleich behandelten Normalgewebe in Teilabbildung A. Dies traf jedoch nicht für alle analysierten Kerne zu.

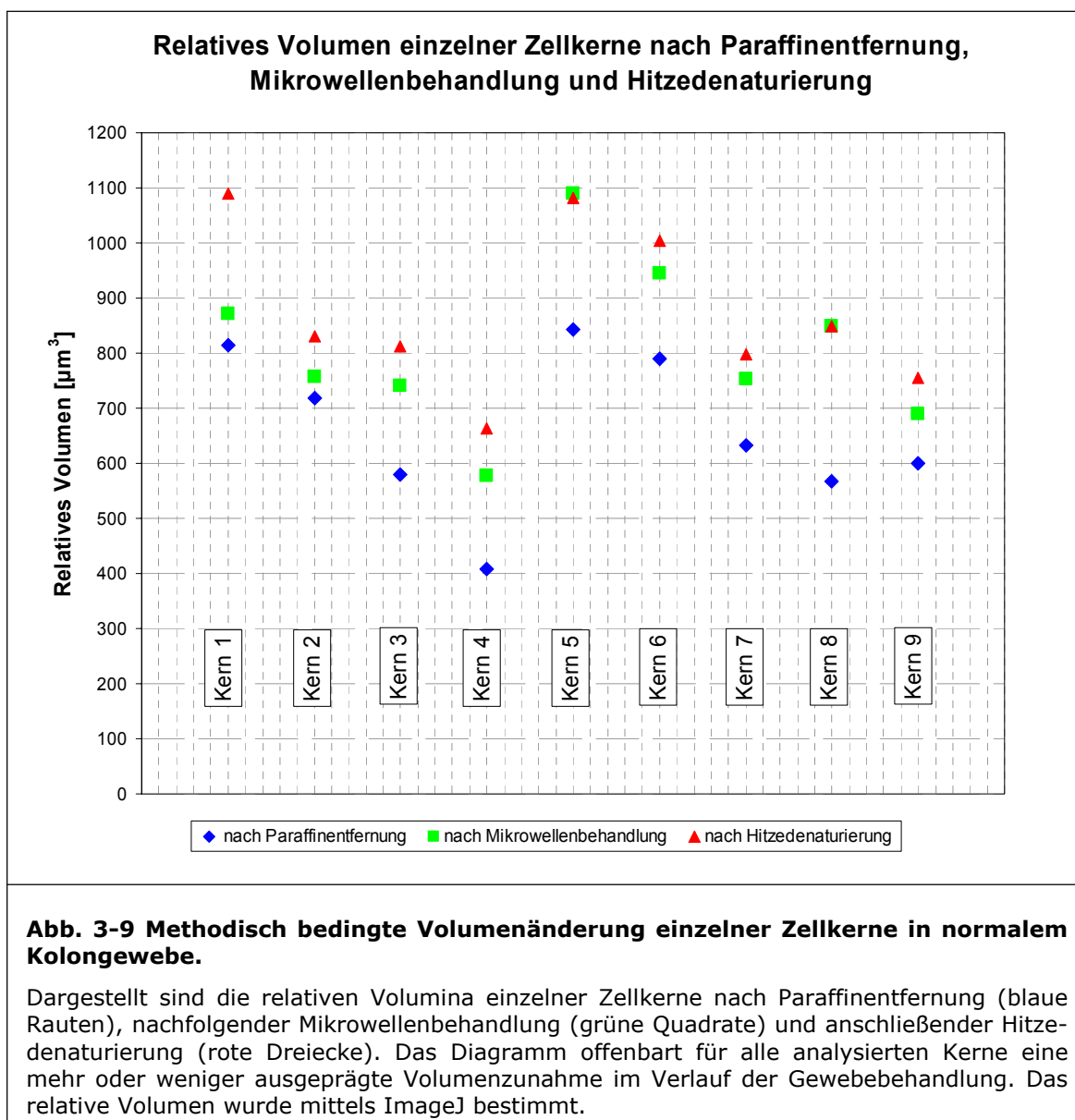
Auch in Bezug auf die Kernmorphologie zeigten sich methodisch bedingte Veränderungen. Im Falle der zweiten Analyse unterschied sich das Aussehen mancher Kerne nach simulierter FISH derart von ihrem ursprünglichen Erscheinungsbild, dass diese nur im Kontext mit benachbarten, morphologisch nicht oder nur geringfügig veränderten Kernen identifiziert werden konnten (s. Abb. 3-8, S. 65). Auch die Bestimmung der korrespondierenden optischen

Kernebenen vor und nach FISH bereitete häufig große Schwierigkeiten oder war gar nicht möglich. Im Gegensatz dazu wiesen die im ersten Experiment untersuchten Kerne in morphologischer Hinsicht weit weniger Veränderungen auf. Überdies konnten hier die auch nach der FISH noch relativ deutlichen Chromatinstrukturen im Kerninneren infolge der Färbung mit PI und SYTO 16 zur Identifikation der korrespondierenden Ebenen herangezogen werden.



Die beobachteten Veränderungen in Chromatinstruktur und Kernmorphologie warfen die Frage nach potentiellen Volumenänderungen auf. Deshalb wurde die relative Größe einzelner Kerne normalen Kolonepithels mittels ImageJ anhand der PI-Färbung bestimmt. Dabei wurde ein Rechteck dergestalt um den zu untersuchenden Kern gelegt, dass es diesen gerade tangierte. Die Aus-

dehnung in z-Richtung wurde durch Abzählen der Schnittebenen des Kerns bestimmt. Der Rauminhalt des resultierenden Quaders repräsentiert das relative Volumen des betrachteten Kerns. Die Analyse offenbarte für alle untersuchten Kerne eine Zunahme des relativen Volumens nach Mikrowellenbehandlung und simulierter FISH. Die in Abb. 3-9 dargestellte Änderung der einzelnen Kernvolumina dient lediglich der Veranschaulichung. Für eine zuverlässige statistische Auswertung müsste aufgrund der starken Schwankungen der Volumenzunahme eine größere Stichprobe untersucht werden.



Während die beschriebenen Veränderungen der Chromatinstruktur, der Kernmorphologie und des Kernvolumens auf die methodische Vorgehensweise zurückzuführen sind, konnte nicht geklärt werden, ob das unmittelbar nach Paraffinentfernung und Rehydrierung des Gewebes beobachtete, randständige Chromatinmuster natürlicher oder artifizieller Natur ist. Der Vergleich zweier Schnittpräparate aus dem äußeren und dem inneren Bereich eines Gewebblocks sollte Aufschluss geben über eine mögliche globale Chromatinkondensation infolge der gegenüber den äußeren Blockbereichen zeitlich verzögert einsetzenden Fixierung im Inneren des Blocks. Jedoch wiesen die beiden Präparate hinsichtlich ihrer Chromatinanordnung keine signifikanten Unterschiede auf.

3.4 Die radiale Verteilung von Chromosomen im menschlichen Kolonepithel

Die radialen Verteilungsmuster von Chromosomenterritorien (CTs) zeigen im Falle von Lymphozyten und lymphoblastoiden Zellen eine evolutionär konservierte Abhängigkeit von der Gendichte, die sich in einer relativ internen Lokalisierung genreicher und einer überwiegend peripheren Positionierung genarmer DNA-Abschnitte niederschlägt (Boyle *et al.*, 2001; Cremer M. *et al.*, 2001; Croft *et al.*, 1999; Tanabe *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu weisen menschliche Fibroblasten und Fruchtwasserzellen eine größenabhängige Verteilung mit eher zentral positionierten kleinen und stärker peripher orientierten großen Chromosomen auf (Bolzer *et al.*, 2005; Cremer M. *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2000). Diese Resultate beruhen ausschließlich auf Analysen von isolierten, primären menschlichen Zellen oder Zelllinien. Direkte Untersuchungen bezüglich einer gendichte- oder größenabhängigen DNA-Verteilung in menschlichem Gewebe waren hingegen nicht beschrieben. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Chromosomen 18 und 19, 1 und 20 sowie 11 mittels Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) auf Schnitten normalen Kolongewebes und Karzinomgewebes visualisiert und hinsichtlich ihrer radialen Anordnung in Epithelkernen der Kolonschleimhaut analysiert. Dabei sollten die relativ gleich großen Chromosomen 18 und 19 aufgrund ihrer stark unterschiedlichen Gendichte eine potentielle Abhängigkeit der radialen Chromosomenpositionierung von der Gendichte aufzeigen. Im Gegensatz dazu sollte die relativ ähnliche Gendichte, aber unterschiedliche Größe der Chromosomen 1 und 20 mögliche Abhängigkeiten von der Chromosomenlänge offenbaren.

Die Visualisierung der CTs 18 und 19 bzw. 1 und 20 mittels Cy3-markierter Antikörper oder Cy5-markiertem Avidin erfolgte nach chemischer Aufbereitung der Gewebeschnittpräparate und nachfolgender FISH. Im Anschluss daran wurden im Falle des Normalgewebes jeweils zwei verschiedene Gruppen von

Epithelkernen der Kolonmukosa konfokalmikroskopisch erfasst. Dabei handelte es sich zum einen um Kerne, die im unteren, basalen Drittel longitudinal angeschnittener, tubulärer Darmkrypten lokalisiert waren. Dieser Kryptenabschnitt enthält eine vergleichsweise große Anzahl zyklischer Zellen, deren Differenzierungsgrad relativ niedrig sein sollte. Zum anderen wurden Kerne aus dem oberen Kryptendrittel erfasst, das eine größere räumliche Nähe zur Schleimhautoberfläche aufweist und größtenteils terminal differenzierte Zellen enthält. Der immunhistochemische Nachweis von KI-67 bestätigte die beschriebene Verteilung zyklischer und ruhender Zellen, konnte jedoch nicht mit FISH-Analysen chemisch aufbereiteter Präparate kombiniert werden, da diese Behandlungsmethode den Nachweis dieses Proteins nicht erlaubte.

Im Falle des Karzinomgewebes stellte im Grunde die Signalqualität das einzige Kriterium bei der Datenerhebung dar. Anders als in normalem Kolonepithel, zeigen die Zellkerne in Karzinomen zum Teil eine ausgeprägte Variabilität hinsichtlich ihrer Morphologie und Größe (s. Abb. 3-10, S. 69). Möglicherweise nimmt das Ausmaß der Abweichung vom normalen, eher lang gestreckten Erscheinungsbild der differenzierten Epithelkerne mit dem Entartungsgrad und dem Verlust der geordneten Struktur zu. Die Kerne wurden jedoch ungeachtet ihrer unterschiedlichen Morphologie und Größe konfokalmikroskopisch erfasst, um eine subjektive Einflussnahme auf die Ergebnisse möglichst zu vermeiden. Von der Analyse ausgeschlossen wurden lediglich Kerne mit ausgeprägten „Löchern“ im Inneren, weil in solchen Fällen aufgrund der daraus resultierenden Beschränkung des Chromatins auf den Kernrand die Bestimmung einer radialen Signalverteilung unsinnig wäre (s. Abb. 3-10, S. 69). Derartige „Löcher“ traten in Karzinomgewebe relativ häufig in Erscheinung, während Normalgewebe weitestgehend frei davon war. Demnach könnte es sich entweder um sehr große, echte Nukleoli handeln, oder um artifizielle Zusammenschlüsse mehrerer kleiner Nukleoli in teilweise kollabierten Kernen. Die „Löcher“ konnten jedoch nicht als Nukleoli bzw. Derivate dieser klassifiziert werden. Der hierfür eingesetzte, gegen das nukleoläre Phosphoprotein B23 (Nukleophosmin) gerichtete Antikörper ist allerdings nicht für Paraffinschnitte konzipiert und lieferte unter Umständen deshalb keine Signale.

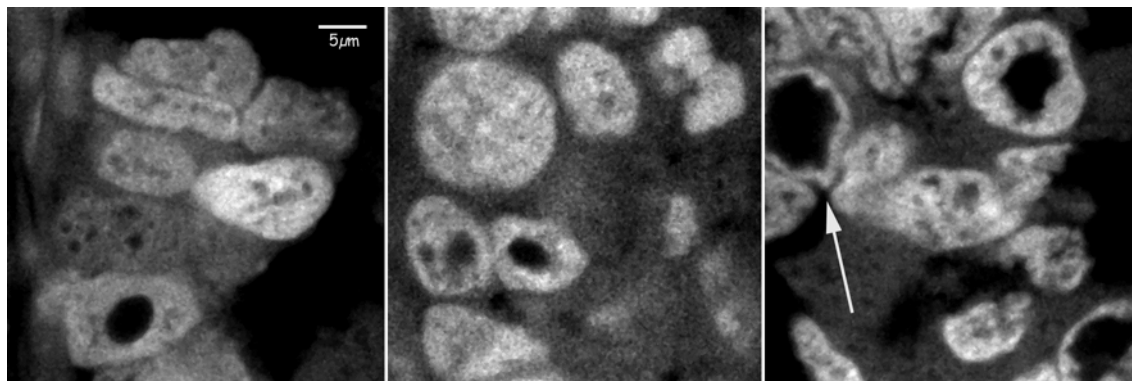


Abb. 3-10 Unterschiede in der Größe und Morphologie von Zellkernen in menschlichem Kolonkarzinomgewebe.

Die beiden linken Teilbereiche der Abbildung zeigen zwei Beispiele für die zum Teil recht unterschiedliche Größe und Gestalt benachbarter Zellkerne in einem Kolonkarzinom. Im rechten Bild ist ein Zellkern zu sehen, der lediglich einen dünnen peripheren Chromatinbereich aufweist (s. weißer Pfeil). Worauf derartige „Löcher“ in etlichen Karzinomkernen zurückzuführen sind, konnte nicht geklärt werden.

Das mittels Konfokalmikroskopie generierte Bildmaterial wurde unter Verwendung der Software 3D-RRD (**3 dimensional relative radial distribution**) quantitativ ausgewertet. Basierend auf der Voxelverteilung der jeweils zu evaluierenden kerninternen Objekte misst das Programm die relativen radialen Abstände der Signale zum Kernmittelpunkt. Dazu wird der segmentierte Kern automatisch in 25 äquidistante Schalen unterteilt, denen die nach ihrer Grauwertintensität gewichteten Objektvoxel entsprechend ihrer radialen Position zugeordnet werden. Details bezüglich der Funktionsweise dieses Programms sind in verschiedenen Publikationen zu finden (Cremer M. *et al.*, 2003; Cremer M. *et al.*, 2001; von Hase, 2002) und werden deshalb an dieser Stelle nicht beschrieben.

Die quantitative Auswertung offenbarte für die CTs 18 und 19 sowohl für das Normalgewebe als auch für das untersuchte Karzinom eine unterschiedliche Positionierung der beiden Territorien innerhalb des Zellkerns (s. Abb. 3-11, S. 70). Beide Gewebearten weisen eine im Vergleich zu CT 19 stärker periphere Lokalisierung von CT 18 auf, wobei die Differenz zwischen den durchschnittlichen relativen Radien der beiden Chromosomen in Kernen des basalen Kryptendrittels am größten und in Karzinomzellkernen am kleinsten ist (s. Tab. 3-2, S. 70). Der durchschnittliche relative Radius der evaluierten Stichprobe spiegelt jenen prozentualen Abstand zum Kernmittelpunkt wider, in dem genau 50% des jeweils betrachteten Chromosomenmaterials näher am Kernmittelpunkt und 50% weiter außen lokalisiert sind. Der Verteilungsunterschied zwischen den Kernen des basalen und des luminalen Kryptendrittels kommt dadurch zustande, dass CT 18 im basalen Drittel geringfügig weiter peripher und CT 19 ein wenig weiter intern positioniert ist als im luminalen Drittel.

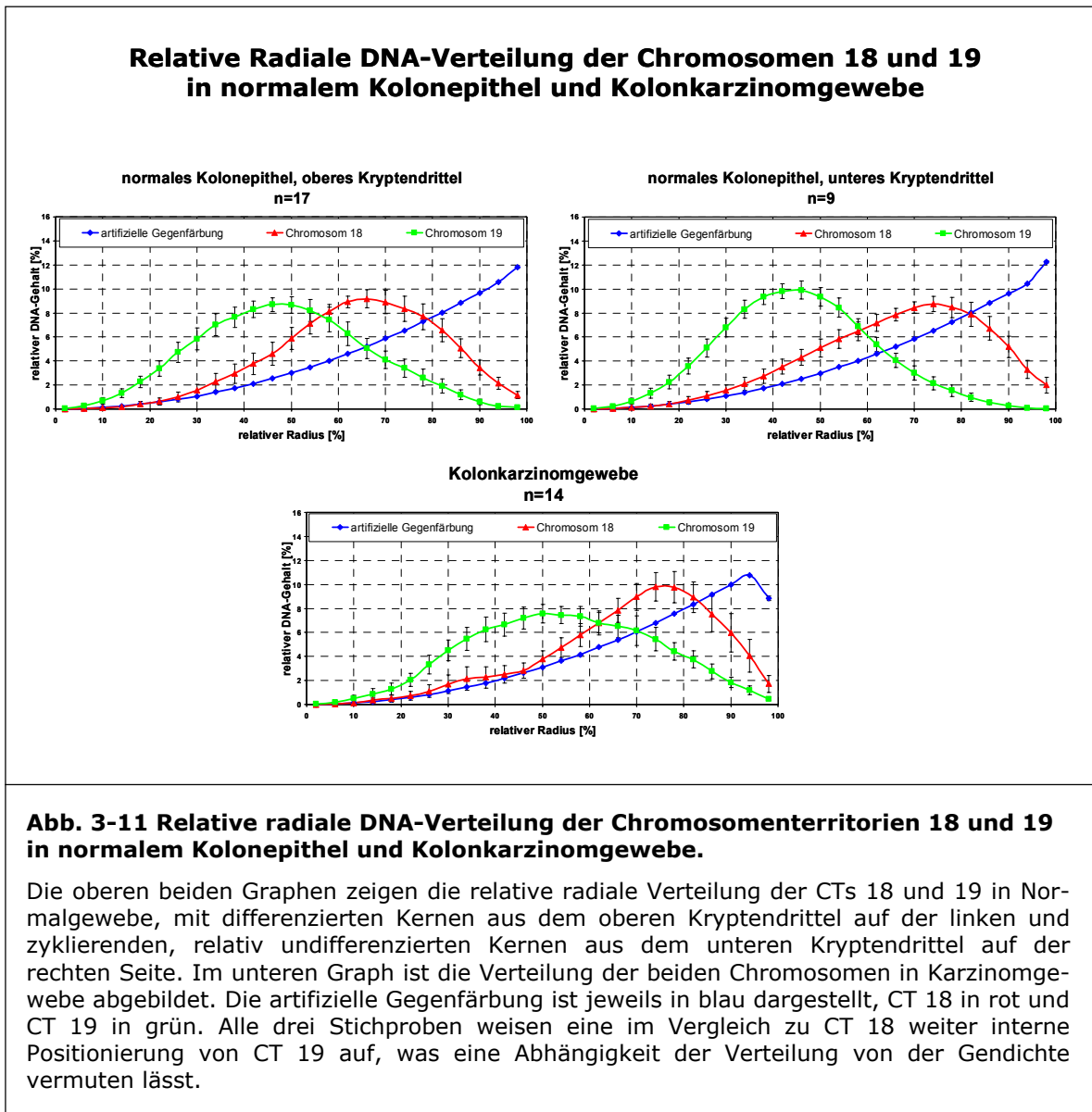


Abb. 3-11 Relative radiale DNA-Verteilung der Chromosomenterritorien 18 und 19 in normalem Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe.

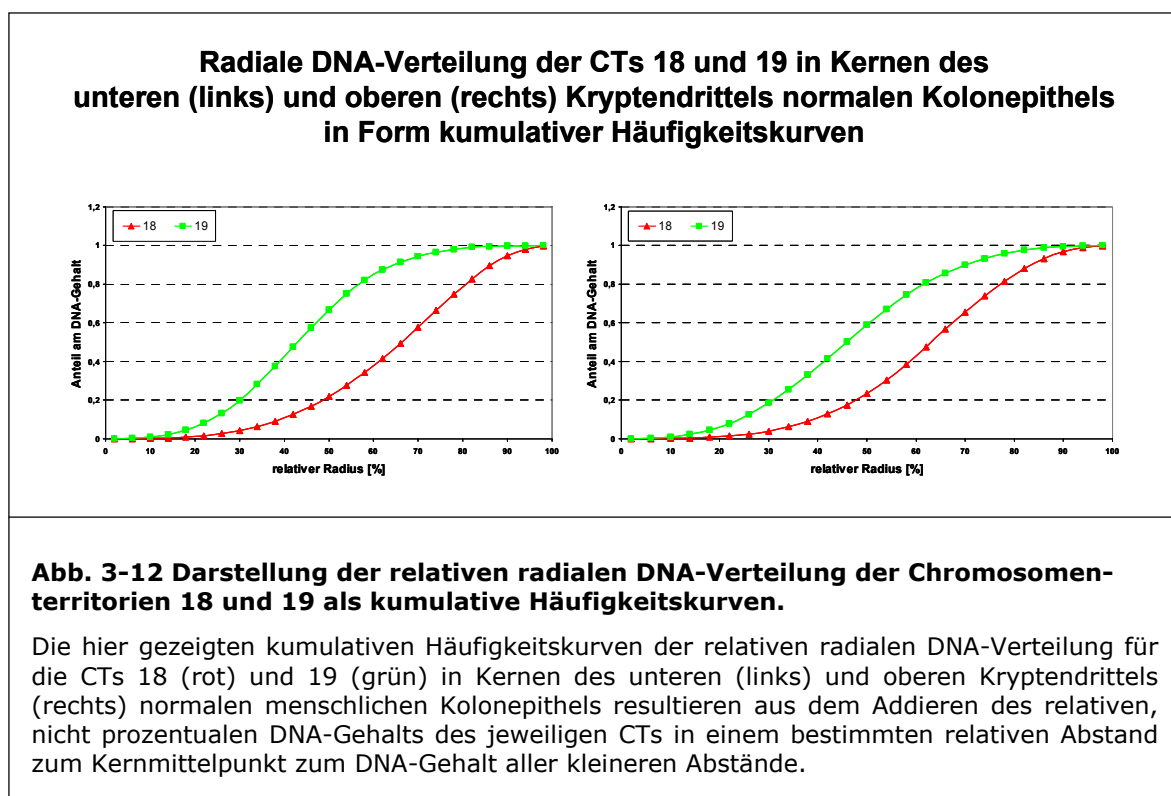
Die oberen beiden Graphen zeigen die relative radiale Verteilung der CTs 18 und 19 in Normalgewebe, mit differenzierten Kernen aus dem oberen Kryptendrittel auf der linken und zyklierenden, relativ undifferenzierten Kernen aus dem unteren Kryptendrittel auf der rechten Seite. Im unteren Graph ist die Verteilung der beiden Chromosomen in Karzinomgewebe abgebildet. Die artifizielle Gegenfärbung ist jeweils in blau dargestellt, CT 18 in rot und CT 19 in grün. Alle drei Stichproben weisen eine im Vergleich zu CT 18 weiter interne Positionierung von CT 19 auf, was eine Abhängigkeit der Verteilung von der Gendichte vermuten lässt.

Tab. 3-2 Durchschnittliche relative Radien der Chromosomen 18 und 19 in humanem Kolongewebe.

Der durchschnittliche relative Radius bezeichnet jene prozentuale Distanz zum Kernmittelpunkt, in der 50% des jeweils betrachteten Chromosomenmaterials zentraler und 50% peripherer lokalisiert sind. Der Radius wurde für Kerne des unteren (basalen) und des oberen (luminalen) Drittels von Darmkrypten im menschlichen Kolonepithel sowie für Kerne aus Kolonkarzinomen bestimmt, die mit Sonden für Chromosom 18 und 19 hybridisiert worden waren. Δ bezeichnet jeweils die Differenz zwischen dem Radius für Chromosom 18 und 19 derselben Stichprobe.

Durchschnittliche relative Radien für die Chromosomenterritorien (CTs) 18 und 19 in normalem Kolongewebe und Kolonkarzinomgewebe			
	CT18	CT19	Δ
Normalgewebe, basales Kryptendrittel	66.3	45.6	20.7
Normalgewebe, luminales Kryptendrittel	64.0	48.4	15.6
Karzinomgewebe	68.1	54.4	13.6

Die beobachteten Unterschiede in der DNA-Verteilung der CTs 18 und 19 sind im Falle des unteren, basalen Kryptendrittels mit $p=0.05$ statistisch signifikant, während dies im Falle des oberen, luminalen Kryptenbereiches mit $p=0.1$ nicht der Fall ist (Cremer M. *et al.*, 2003). Bei dem verwendeten Test handelte es sich um einen Zwei-Stichproben Kolmogorov-Smirnov-Test (KS-Test), der sich der kumulativen Häufigkeiten der zu vergleichenden CTs bediente (s. Abb. 3-12, S. 71). Diese erhält man jeweils durch Aufsummieren des relativen DNA-Gehaltes des CTs in einer bestimmten Schale zum relativen DNA-Gehalt aller weiter im Kerninneren lokalisierten Schalen. Die graphische Darstellung resultiert deshalb in einer mit zunehmendem Radius ansteigenden Kurve. Der maximale Abstand zwischen den beiden Häufigkeitskurven stellt den kritischen Parameter für den KS-Test dar. Für das im Hinblick auf die radiale Positionierung der CTs 18 und 19 analysierte Karzinomgewebe entspricht dieser Abstand in etwa dem des oberen Kryptenbereiches (Graphen s. Anhang, S. 103). Daher ist der beobachtete Verteilungsunterschied sehr wahrscheinlich ebenfalls nicht statistisch signifikant.



Die CTs 1 und 20 zeigten im oberen Kryptendrittel normalen Kolonepithels ein sehr ähnliches Verteilungsmuster, während Chromosom 20 im basalen Kryptendrittel eine etwas zentralere Position einnimmt (s. Abb. 3-13, S. 73 und Tab. 3-3, S. 72). Der daraus resultierende Unterschied zwischen den durchschnittlichen relativen Radien der beiden Territorien ist jedoch im Vergleich zu dem zwischen CT 18 und 19 nur etwas mehr als halb so groß (57%). Der

Graph des relativen DNA-Gehaltes bezogen auf den relativen Kernradius zeigt nicht einfach eine Linksverschiebung hin zu einer zentraleren Lokalisierung von CT 20, sondern weist vielmehr zwei lokale Maxima auf. Eine visuelle Inspektion des Datenmaterials offenbarte für 9 von 14 bzw. 64.3% der evaluierten Epithelkerne des basalen Kryptendrittels mehr oder weniger stark ausgeprägte Unterschiede in der Positionierung der beiden homologen Chromosomen 20. Im oberen, luminalen Kryptendritteln gehörten lediglich 5 von 15 Kernen (33.3%) dieser Fraktion an.

Die Abstände zwischen den Kurven der kumulativen Häufigkeiten der CTs 1 und 20 sind in normalem Kolonepithel deutlich geringer als im Falle der CTs 18 und 19 im oberen Kryptendritteln normalen Kolonepithels (Graphen s. Anhang, S. 103). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die radialen Positionierungsunterschiede zwischen den CTs 1 und 20 ebenfalls nicht statistisch signifikant sind. Dasselbe gilt für die leicht unterschiedliche Verteilung des CTs 20 im unteren und oberen Kryptendritteln.

Tab. 3-3 Durchschnittliche relative Radien der Chromosomen 1 und 20 in humanem Kolongewebe.

Der durchschnittliche relative Radius bezeichnet jene prozentuale Distanz zum Kernmittelpunkt, in der 50% des jeweiligen Chromosomenmaterials zentraler und 50% peripherer lokalisiert sind. Der Radius wurde für Kerne des unteren (basalen) und oberen (luminalen) Drittels von Darmkrypten in menschlichem Kolonepithel sowie für Kolonkarzinomkerne bestimmt, die mit Sonden für Chromosom 1 und 20 hybridisiert worden waren. Δ bezeichnet jeweils die Differenz zwischen dem Radius für Chromosom 1 und 20 derselben Stichprobe. Da das Karzinomgewebe keine Hybridisierung von Chromosom 1 zuließ, konnte der Radius in diesem Fall nicht bestimmt werden.

Durchschnittliche relative Radien für die Chromosomenterritorien (CTs) 1 und 20 in normalem Kolongewebe und Kolonkarzinomgewebe			
	CT1	CT20	Δ
Normalgewebe, basales Kryptendritteln	66.1	54.4	11.7
Normalgewebe, luminales Kryptendritteln	65.0	62.0	3.0
Karzinomgewebe	—	57.8	—

Das analysierte Karzinom wies eine erhöhte, nicht genau definierbare Kopienzahl von Chromosom 20 auf, wobei die CTs in 11 von 17 Fällen einen Großteil des zentralen und subperipheren Kernbereichs ausfüllten (s. Abb. 3-14, S. 73). Obwohl somit der zentrale Kernbereich nicht notwendigerweise weniger DNA aufwies als benachbarte Areale, nimmt der DNA-Gehalt scheinbar erst relativ gleichmäßig mit dem Radius zu und fällt dann in einem größeren Abstand zum Kernmittelpunkt ab, da dort meist viel weniger DNA-Material vorhanden war (s. Abb. 3-13, S. 73). Der Kurvenverlauf resultiert aus der durch das 3D-RRD-Programm durchgeführten Unterteilung der Kerne in gleichdicke Schalen. Deren Volumen wächst zwangsläufig mit zunehmender Distanz von Kernmittelpunkt, was mit einer größeren darin fassbaren DNA-Menge einhergeht.

Relative radiale DNA-Verteilung der Chromosomenterritorien 1 und 20 in normalem Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe

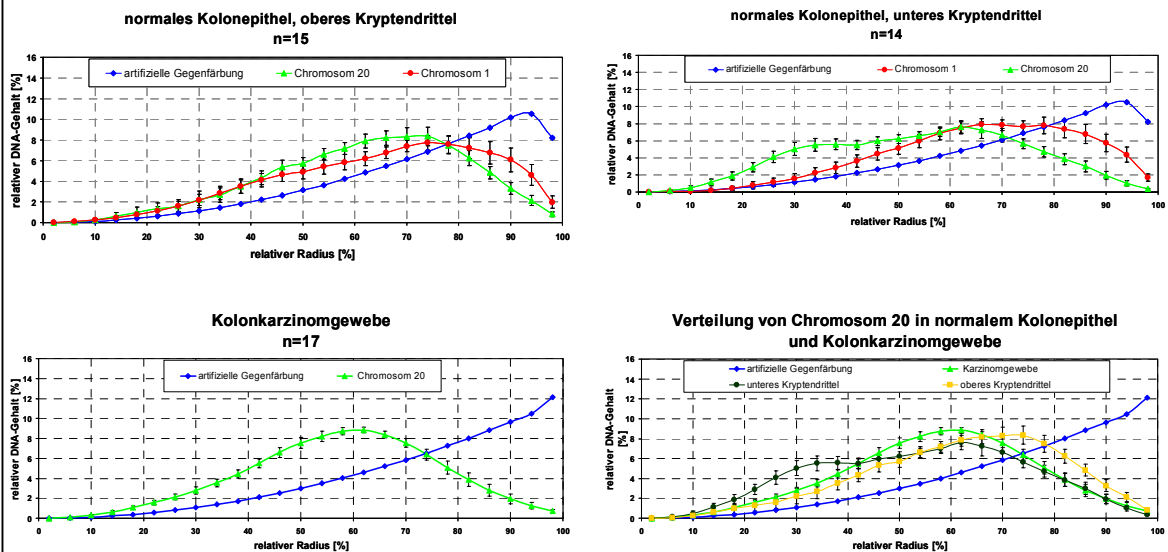


Abb. 3-13 Relative radiale DNA-Verteilung der Chromosomenterritorien 1 und 20 in normalem Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe.

Die oberen beiden Graphen zeigen die relative radiale Verteilung der CTs 1 und 20 in Normalgewebe, mit differenzierten Kernen des oberen Kryptendrittels auf der linken und zyklisierenden, relativ undifferenzierten Kernen des unteren Kryptendrittels auf der rechten Seite. Im unteren linken Graph ist die Verteilung von Chromosom 20 in Karzinomgewebe abgebildet. Die artifizielle Gegenfärbung ist jeweils blau dargestellt, CT 1 rot und CT 20 grün. Die Verteilung von CT 1 ändert sich im Verlauf der Differenzierung nicht, während der Graph von CT 20 in den undifferenzierten Zellen zugunsten einer stärker internen Lokalisierung verschoben ist. In Karzinomgewebe nimmt CT 20 eine mittlere Position ein, ähnelt in seiner Verteilung jedoch eher der Stichprobe des oberen Kryptendrittels. Der rechte untere Graph verdeutlicht dies, wobei hier die Verteilung des unteren Kryptendrittels dunkelgrün, die des oberen Drittels gelb und die des Karzinomgewebes hellgrün dargestellt ist.

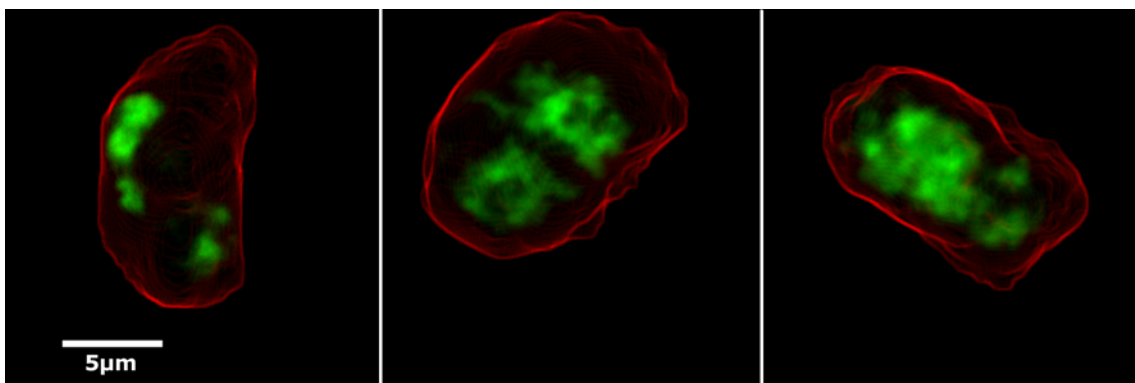


Abb. 3-14 Die Anordnung von Chromosom 20 in Kolonkarzinomgewebe.

Dargestellt sind Z-Projektionen (Sum Slices) dreier Zellkerne aus einem Kolonkarzinom. Während der linke Kern eine herkömmliche Chromosomenanordnung aufweist, nehmen die Territorien in den beiden anderen Kernen einen Großteil des Kernvolumens ein.

Humane Fibroblasten und Fruchtwasserzellen weisen eine größenabhängige Chromosomenpositionierung auf (Bolzer *et al.*, 2005; Cremer M. *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2000). Diese Zelltypen verfügen über sehr flache Kerne von etwa 3-5µm (Cremer M. *et al.*, 2003). Da die Zellkerne in normalem menschlichen Kolonepithel zum Teil eine sehr lang gestreckte Form aufweisen, wurden die in die Auswertung bezüglich der radialen Positionierung der CTs 18 und 19 eingegangenen Kerne einer Größenmessung unterzogen (s. Tab. 3-4, S. 75). Im Gegensatz zu Zellkulturpräparaten liegen die Zellkerne im Gewebe nicht notwendigerweise parallel zur Objektträgeroberfläche vor. Deshalb könnte es zu Überschätzungen der Höhe der Kerne gekommen sein. Des Weiteren muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die hier als Höhe definierte z-Ausdehnung der Kerne im Bildstapel nicht unbedingt die tatsächliche Kernhöhe darstellt. Liegen die Kerne im Gewebestapel mit ihrer Längsseite parallel zur Basis der tubulären Krypten bzw. zur Schleimhautoberfläche, so würde in longitudinal angeschnittenen Krypten der gemessene z-Abstand die Breite der Kerne erfassen. Dies liegt in der Schnittrichtung bei der Anfertigung der Präparate begründet, die in etwa parallel zur Schleimhautoberfläche verläuft. Ist diese Annahme zutreffend, erscheint die tatsächliche Höhe der Kerne im Bildstapel als Breite. Dessen ungeachtet wiesen jedoch die höchstwahrscheinlich zyklisierenden Kerne des basalen Kryptenbereichs eine durchschnittliche minimale Ausdehnung von 8.1µm, was die Höhe menschlicher Fibroblasten und Fruchtwasserzellen deutlich überschreitet. Das Verhältnis der gemessenen Breite bzw. Höhe zur Länge von 0.8 bzw. 0.9 deutet eher auf eine sphärische, als auf eine sehr flache Kernform hin. Die Kerne des luminalen Kryptenbereichs waren zum Teil flacher bzw. schmaler als die des basalen Bereichs. Da diese Kerne jedoch nicht mehr zyklisieren und die Chromosomen ihre radiale Lage bereits nach der letzten Mitose eingenommen haben sollten, ist ein Einfluss der in diesen Kernen gemessenen Höhe bzw. Breite auf die Chromosomenpositionierung eher unwahrscheinlich.

Tab. 3-4 Zellkerngrößen im basalen und luminalen Kryptendrittel normalen menschlichen Kolonepithels.

Gemessen wurden die durchschnittliche Länge, Breite und Höhe der in die Auswertung hinsichtlich der radialen Positionierung der CTs 18 und 19 in normalem menschlichen Kolonepithel eingegangenen Kerne. Es ist zu beachten, dass es sich bei der hier gemessenen Breite um die tatsächliche Höhe der Kerne handelt und umgekehrt (Erklärung s. Text).

Zellkerngrößen im basalen und luminalen Kryptendrittel normalen menschlichen Kolonepithels		
	basales Kryptendrittel	luminales Kryptendrittel
Durchschnittliche Länge [μm]	10.6	13.8
(Minimum/Maximum)	(8.8/13.4)	(11.3/16.8)
Durchschnittliche Breite [μm]	8.1	5.6
(Minimum/Maximum)	(6.6/10.5)	(2.9/8.0)
Verhältnis Breite/Länge	0.8	0.4
Durchschnittliche Höhe (z-Ausdehnung) [μm]	9.3	9.86
(Minimum/Maximum)	(7.8/12.6)	(8.2/12.2)
Verhältnis Höhe/Länge	0.9	0.7

Wie bereits erwähnt wurde neben den stark unterschiedlich genreichen Chromosomen 18 und 19 sowie den unterschiedlich großen Chromosomen 1 und 20 auch Chromosom 11 hinsichtlich seiner radialen Positionierung analysiert. Dieses zeichnet sich durch nachbarschaftliches Vorliegen genreicher und genarmer Bereiche aus und beherbergt auf seinem kurzen Arm (11p15.5) einen Gencluster für die sekretorischen Mucine MUC-2, -5AC, -5B und -6 (Pigny *et al.*, 1996). Von diesen wird im Kolonepithel nur MUC-2 stark exprimiert (Audie *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1994; Tytgat *et al.*, 1994). Jedoch gibt es Hinweise, dass MUC-5B und MUC-6 in geringen Mengen exprimiert werden (Bartman *et al.*, 1999; Carrato *et al.*, 1994; van Klinken *et al.*, 1998). Es stellt sich die Frage, ob die transkriptionell aktiven Abschnitte die radiale Positionierung des CTs 11 bestimmen oder beeinflussen. Auch ist es von Interesse, ob sich die radiale Positionierung im Verlauf der zellulären Differenzierung ändert.

Für die Untersuchung der DNA-Verteilung von CT 11 wurde normales Kolonepithel nach chemischer Gewebeaufbereitung einer FISH unterzogen. Die Visualisierung hybridisierter, mittels Digoxigenin markierter Sonden erfolgte durch einen Cy3-gekoppelten Antikörper. Wie bereits zu Beginn dieses Gliederungspunktes für die CTs 18, 19, 1 und 20 beschrieben, wurden auch im Falle von CT 11 Epithelkerne des unteren und oberen Kryptendrittels konfokalmikroskopisch erfasst. Leider schränkten die starke Zerstörung der relevanten Epithelbereiche infolge der chemischen Gewebeaufbereitung sowie die vermutlich

durch eine relativ geringe Antikörperpermeabilität des Gewebes hervorgerufene, oberflächennahe Signalverteilung die Stichprobengröße ein. Das Karzinomgewebe war durch Mikrowellenbehandlung für die FISH vorbereitet worden und wies kaum zerstörungsbedingte Gewebeverluste auf. Auch Hybridisierungsqualität und Signalverteilung waren jener des Normalgewebes überlegen. Allerdings wies die eingesetzte Sonde eine Biotinmarkierung auf und wurde demzufolge mit dem im Vergleich zu Antikörpermolekülen kleinerem, Cy5-gekoppeltem Avidin nachgewiesen. Aus diesem Grund kann die scheinbar bessere Durchlässigkeit des Gewebes nicht zweifelsfrei auf die Mikrowellenbehandlung zurückgeführt werden. Die quantitative Auswertung der genannten Stichproben mit Hilfe der 3D-RRD Software offenbarte für Kerne des unteren, basalen Kryptendrittels normalen Kolonepithels eine stärker interne Positionierung von CT 11 als für Kerne des oberen, luminalen Kryptendrittels (s. Abb. 3-15, S. 76). Die Differenz zwischen den durchschnittlichen relativen Radien beträgt 12.59 (s. Tab. 3-5, S. 77). Ein Signifikanztest wurde nicht durchgeführt, da der Abstand zwischen den beiden Kurven der kumulativen Häufigkeiten (Graph s. Anhang, S. 103) auch hier geringer ist als im Falle der CTs 18 und 19 im oberen Kryptendrittels (s. Abb. 3-12, S. 71), die keinen statistisch signifikanten Unterschied aufwiesen. Die DNA-Verteilung von CT 11 im Karzinomgewebe ähnelt stark der peripheren Positionierung dieses Chromosoms in Epithelkernen des oberen Kryptendrittels.

CT 11 in Kernen des unteren (n=8) und oberen Kryptendrittels (n=13) normalen menschlichen Kolonepithels sowie in Kolonkarzinomgewebe (n=11)

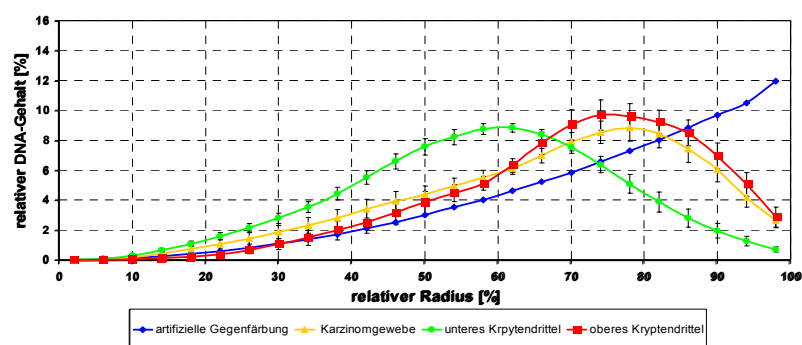


Abb. 3-15 Relative radiale DNA-Verteilung der Territorien von Chromosom 11 in normalem Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe.

Die drei Graphen zeigen die relative radiale DNA-Verteilung von Chromosom 11 in Kernen relativ undifferenzierter Zellen des unteren Kryptendrittels normalen Kolonepithels (grün), in Kernen vermutlich terminal differenzierter Epithelzellen des oberen Kryptendrittels (rot) und in Kernen eines Kolonkarzinoms (gelb). Die artifizielle Gegenfärbung ist blau dargestellt. In den Zellen des unteren Kryptendrittels ist CT 11 etwas weiter im Kerninneren positioniert als in Zellen des oberen Drittels. Die DNA-Verteilung im Karzinom ähnelt stark der des oberen Kryptendrittels.

Tab. 3-5 Durchschnittliche relative Radien der radialen DNA-Verteilung von Chromosom 11 in normalem menschlichen Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe.

Der durchschnittliche relative Radius bezeichnet jene prozentuale Distanz zum Kernmittelpunkt, in der 50% des jeweiligen Chromosomenmaterials zentraler und 50% peripherer lokalisiert sind. Der Radius wurde für Kerne des unteren (basalen) und oberen (luminalen) Drittels von Darmkrypten in menschlichem Kolonepithel sowie für Kolonkarzinomkerne bestimmt, die mit Sonden für Chromosom 11 hybridisiert worden waren. Δ bezeichnet jeweils die Differenz zwischen den Radien für die drei verschiedenen Zelltypen.

Durchschnittliche relative Radien für die Territorien von Chromosom 11 in normalem Kolonepithel und Kolonkarzinomgewebe				
	CT11	Δ 1.-2.	Δ 2.-3.	Δ 1.-3.
1. Normalgewebe, basales Kryptendrittel	57.77	12.61		
2. Normalgewebe, luminales Kryptendrittel	70.38		3.56	
3. Karzinomgewebe	66.82			9.05

3.5 Positionierung und räumliche Assoziation von Zentromeren während Differenzierung und Kanzerogenese

Analysen von Geweben bezüglich der räumlichen Assoziation von Zentromeren und der dynamischen Positionierung solcher Chromozentren im Verlauf des Zellzyklus sowie der terminalen Differenzierung von Zellen erfolgten bisher überwiegend an Mausgewebe. Das zentromerisches Heterochromatin muriner Purkinjoneuronen durchläuft während der Reifung dieser bereits postmitotischen Zellen eine Positionsänderung von der Kernperipherie zu einem zentralen Nukleolus (Manuelidis, 1985; Martou & De Boni, 2000; Solovei *et al.*, 2004a). Dabei nimmt die Anzahl der Chromozentren ab, während deren Volumen wächst.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeschnitte von normalem Kolongewebe sowie eines Kolonkarzinoms nach einer Mikrowellenbehandlung mit Panzentromersonden hybridisiert, um eine potentielle Dynamik in der Zentromerpositionierung sowie der Anzahl und des Volumens von Chromozentren im Verlauf der Differenzierung zu analysieren. Wie bereits unter 3.1 erwähnt, erwiesen sich Zentromerhybridisierung und Mikrowellenbehandlung als sehr gut miteinander vereinbar und erlaubten daher eine Kombination von Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) und Immunhistochemie. In Normalgewebe erfolgte deshalb neben der Visualisierung der Zentromere außerdem ein Nachweis entweder des Zellzyklusmarker KI-67 oder des Becherzellmarkers MUC-2 (Mucin-2). Im Anschluss daran wurden KI-67 positive Kerne aus dem unteren (basalen) sowie dem mittleren Kryptendrittel konfokalmikroskopisch erfasst. Die Zellen des unteren Kryptendrittels weisen vermutlich einen niedrigeren Reifungsgrad als die des mittleren Drittels auf. Zum Vergleich wurden auch KI-

67 negative Zellkerne derselben Kryptenabschnitte analysiert. Die Erfassung von Zellkernen aus dem oberen (luminalen) Kryptendrittel erfolgte anhand eines Schnittpräparates, auf dem kein simultaner Nachweis von KI-67 durchgeführt worden war. Allerdings erwies sich dieser Kryptenbereich in anderen immunhistochemisch gefärbten Präparaten stets als frei von KI-67-Signalen. Im Falle von MUC-2 wurde die Lokalisierung der positiven Zellen innerhalb der Krypten nicht berücksichtigt, weil dieses Protein als Marker für terminal differenzierte, Schleimfreisetzende Becherzellen dient. Der Karzinomschnitt war keinem Proteinnachweis unterzogen worden, da in dieser Gewebeart von einer regen Teilungsaktivität ausgegangen werden kann.

Im Hinblick auf ihre mit Hilfe der 3D-RRD Software ermittelte radiale Verteilung zeigen die Zentromere in den KI-67 positiven Kernen eine stärker interne Positionierung als ihre KI-67 negativen Nachbarn (s. Abb. 3-16, S. 79). Es ist erwähnenswert, dass der durchschnittliche relative Radius für die Zentromerverteilung in der Stichprobe der KI-67 positiven Kerne des mittleren Kryptendrittels (67.9%) geringfügig größer als in der des unteren Kryptenbereichs (63.4%) ist. Die Verteilung in den KI-67 negativen Stichproben der beiden Kryptenabschnitte unterscheidet sich hingegen kaum. Der durchschnittliche relative Radius beträgt hier 70.5% an der Kryptenbasis und 72.6% im mittleren Kryptenbereich. Die am stärksten ausgeprägte periphere Positionierung weisen die mehr oder weniger über die gesamte Krypte verteilten MUC-2 positiven, terminal differenzierten Becherzellkerne auf (s. Abb. 3-16, S. 79). Der durchschnittliche relative Radius dieser Stichprobe beträgt 75.3%. Eine sehr ähnliche DNA-Verteilung zeigen mit einem durchschnittlichen relativen Radius von 74.16 auch die Kerne der Stichprobe des oberen Kryptendrittels. Die Auswertung des Karzinomgewebes ergab für diese Kerne zwar einen durchschnittlichen relativen Radius, der mit 67.3% jenen der zyklierenden Zellen in normalem Kolongewebe stark ähnelt, der Kurvenverlauf unterscheidet sich jedoch von diesen (s. Abb. 3-16, S. 79). Während dieser im Normalgewebe sowohl für KI-67 positive Kerne des unteren Kryptendrittels als auch des mittleren Bereichs relativ gleichmäßig ist, weisen die Karzinomkerne ein deutliches Maximum in der Peripherie und ein sehr flaches, stärker intern lokalisiertes Maximum auf. Insgesamt nehmen die Karzinomkerne hinsichtlich ihrer radialen Zentromerverteilung eine mittlere Position zwischen den KI-67 positiven, relativ undifferenzierten Zellen des unteren Kryptendrittels und den MUC-2 positiven, terminal differenzierten Becherzellen ein.

Signifikanztests wurden nicht durchgeführt, da aufgrund des im Vergleich zu den CTs 18 und 19 im oberen Kryptendrittel (s. Abb. 3-12, S. 71) geringeren oder höchstens ähnlich großen Abstandes zwischen den jeweils relevanten Kurven der kumulativen Häufigkeiten (Graphen s. Anhang, S. 103) auch hier die beobachteten Unterschiede in der radialen Positionierung wahrscheinlich nicht statistisch signifikant sind.

Relative radiale DNA-Verteilung von Zentromeren in zyklierenden und differenzierten Zellen des normalen Kolonepithels sowie in Kolonkarzinomkernen

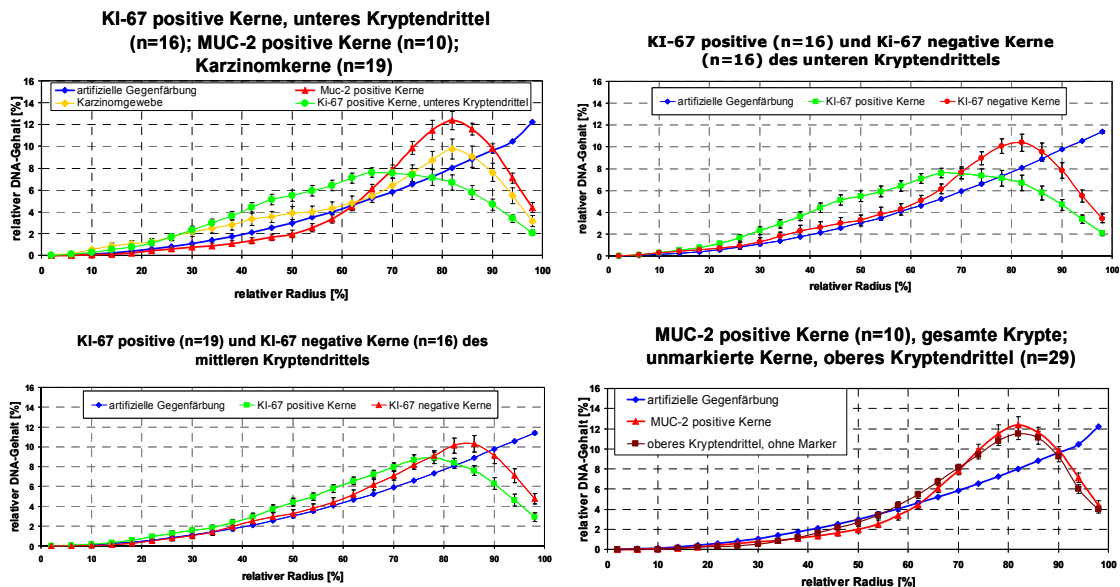


Abb. 3-16 Relative radiale DNA-Verteilung von Zentromeren in zyklierenden und differenzierten Zellen des normalen Kolonepithels und in Kolonkarzinomgewebe.

Die linke obere Teilabbildung zeigt die Graphen der relativen radialen Zentromerverteilung für KI-67 positive, vermutlich undifferenzierte Zellen des unteren Kryptendrittels normalen Kolonepithels (grün) und MUC-2 positiver, terminal differenzierter Becherzellen der gesamten Krypte (rot). Ferner ist der Graph für die Zentromerverteilung in Karzinomgewebe (gelb) abgebildet. Die Darstellung verdeutlicht die relativ unterschiedliche Zentromerpositionierung in undifferenzierten, zyklierenden und nicht zyklierenden, terminal differenzierenden Zellen und zeigt außerdem die im Vergleich dazu mittlere Stellung der Karzinomzellen. Die anderen Teilabbildung umfassen die Graphen der Zentromerverteilung KI-67 positiver (grün) und negativer Kerne (rot) des unteren (rechts oben) und mittleren Kryptendrittels (links unten). Die rechte untere Teilabbildung zeigt eine Gegenüberstellung der Graphen für die Zentromerverteilung in MUC-2 positiven Kernen (rot) und Kernen des oberen Kryptendrittels (rotbraun).

Für die Analyse der Signalanzahl und des Volumens der Chromozentren wurden die konfokalmikroskopisch erfassten Stichproben KI-67 positiver Kerne des unteren Kryptendrittels, MUC-2 positiver Kerne des gesamten Kryptenepithels sowie die Zellkerne des Karzinoms herangezogen. Die Bestimmung von Signalanzahl und -volumen erfolgte mittels Amira (TGS), um die subjektive Einflussnahme seitens des Experimentators möglichst auf ein Minimum zu reduzieren. Das Programm erlaubt neben der bereits beschriebenen interaktiven Segmentierung (3.2, S. 57) auch die Segmentierung von Bildstapeln mittels eines vorher zu definierenden Schwellwertes ohne weitere interaktive Eingriffe. Dieser bezeichnet einen Grauwert zwischen 0 und 255, der alle Pixel niedrigerer Intensität durch Zuordnung eines neuen Grauwertes von Null als Hintergrund definiert und somit aus dem Segmentierungsergebnis ausblendet.

Die Festlegung eines geeigneten Schwellwertes war besonders problematisch, falls aufgrund des visuellen Eindrucks eine Signalakkumulation als getrennt vorliegende, sehr eng benachbarte Chromozentren eingestuft werden konnte, jedoch auch als eine einzelne, durch viel weniger intensiv gefärbte Bereiche verbundene Signaltraube. Eine zweifelsfreie Entscheidung zugunsten einer der beiden Annahmen war unmöglich, da es sich bei den niedrigeren Grauwerten der Zwischenbereiche nicht unbedingt um Hintergrundrauschen handeln muss. Die ohnehin subjektive Schwellwertsetzung könnte in solchen Fällen neben der unvermeidlichen Über- bzw. Unterschätzung des Signalvolumens eine Fehleinschätzung der Anzahl an Signalen nach sich ziehen. Bei niedrigeren Schwellwerten bewirkt der verwendete Segmentierungsalgorithmus die Darstellung der fraglichen Signalanhäufung als ein einziges, größeres Objekt. Bei höheren Schwellwerten kann dieses zwar in mehrere kleinere Objekte zerfallen, jedoch werden weniger intensive Signale oder Signalbereiche nicht mehr in die Segmentierung einbezogen. Der Schwellwert wurde innerhalb eines Bildstapels möglichst so gewählt, dass einerseits die Ränder intensiver und klar vom Hintergrund abgrenzbarer Signale den Grenzen der daraus resultierenden segmentierten Objekte entsprachen, andererseits jedoch schwächere Signale nicht von der Segmentierung ausgeschlossen waren.

Die Software ermöglicht für die segmentierten Objekte auch eine automatische Volumenmessung, welche die Einzelvolumina aller im jeweils betrachteten Bildstapel enthaltenen Objekte auflistet. Daraus kann auch die Signalanzahl abgeleitet werden. Objekte mit einer Voxelzahl von 10 oder mehr wurden in die Signalzählung einbezogen, wobei dadurch die tatsächliche Anzahl an spezifischen Signalen sehr wahrscheinlich überschätzt wurde. Da es sich jedoch um einen relativen Vergleich der verschiedenen Zellpopulationen handelt, sollte diese Fehleinschätzung keine signifikanten Auswirkungen haben. Es ist jedoch anzumerken, dass die Karzinomkerne eine schlechtere Hybridisierungsqualität aufwiesen als die beiden anderen betrachteten Stichproben. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei diesen mehr unspezifische Signale Eingang in die Auswertung fanden.

Die Anzahl an Chromozentren unterscheidet sich zwischen den drei betrachteten Zellpopulationen kaum (s. Tab. 3-6, S. 81). Das Gesamtvolumen aller pro Kern enthaltenen Objekte schwankt auch innerhalb eines Zelltyps sehr stark. Insgesamt war es nicht möglich aus den vorhandenen Daten auf eine geringere Signalanzahl und/oder größere Signaltrauben in differenzierteren Zellen zu schließen. Der visuelle Eindruck ließ bei Karzinomkernen zunächst eine höhere Anzahl an Signalen vermuten, was jedoch durch das stärkere Hintergrundrauschen hervorgerufen worden sein könnte.

Tab. 3-6 Chromozentrenanzahl und Signalvolumen in relativ undifferenzierten Zellen, terminal differenzierten Becherzellen und Karzinomzellen des humanen Kolonepithels.

Die Anzahl an Zentromersignalen sowie deren Volumen wurde nach Verwendung eines schwellwertabhängigen Segmentierungsalgorithmus mittels Amira bestimmt. Analysiert wurden 16 KI-67 positive Zellkerne des unteren Kryptendrittels (bezeichnet als KI-67), 10 MUC-2 positive Kerne des gesamten Kryptenepithels (bezeichnet als MUC-2) sowie 19 Kerne aus einem Kolonkarzinom (bezeichnet als CA). Angeben sind jeweils der Medianwert, der minimale und der maximale Wert sowie als Streuungsmaß der halbe Abstand zwischen dem 3. und dem 1. Quartil.

Chromozentrenanzahl und Signalvolumen in KI-67 positiven und MUC-2 positiven Kernen normalen Kolonepithels sowie Karzinomgewebe				
		KI-67	MUC-2	CA
Anzahl an Chromozentren	Median	21	23.00	22.00
	Halber Quartilabstand	5.88	1.75	3.75
	Minimum	10	15	12
	Maximum	42	31	40
Gesamtvolumen [μm^3] der jeweils im Bildstapel enthaltenen Signale	Median	27.02	22.81	15.62
	Halber Quartilabstand	7.97	4.60	4.35
	Minimum	14.09	11.15	6.06
	Maximum	67.25	34.55	34.77

4. **Diskussion**

Zytogenetische Erkenntnisse basieren im Falle des Menschen überwiegend auf Untersuchungen an Zelllinien oder leicht isolierbaren primären Zellen, wie etwa Lymphozyten oder Fibroblasten. Die innerhalb eines Gewebeverbandes auftretenden Einflüsse sowie die damit einhergehende morphologische Heterogenität der Zellen müssen dabei außer Acht gelassen werden. Das Untersuchungsmaterial weist demzufolge eine geringere Komplexität auf, was die Enthüllung fundamentaler zellkernarchitektonischer Muster bzw. Vorgänge erleichtert. Allerdings verhindert diese Vorgehensweise unter Umständen die Erfassung aller Schattierungen eines Grundmusters bzw. -verhaltens. Ferner variieren die Zellkerne in Tumorgewebe zum Teil sehr stark hinsichtlich ihrer Größe und Form. Der Verlust dieser Vielfalt in Zelllinien hemmt die Erforschung einer potentiellen Korrelation zwischen morphologischen und genetischen oder zellkernarchitektonischen Veränderungen. Gewebeschnitte gestatten hingegen im Prinzip derartige Untersuchungen. Auch besteht die Möglichkeit viele verschiedene normale Zelltypen zu betrachten. Dies ist bei Verwendung isolierter Zellen nur sehr eingeschränkt möglich, da sich die Kultivierung normaler Zellen als äußerst schwierig erwiesen hat und für Kolonzzellen bisher nicht mit Sicherheit gelungen ist.

Gegenüber anderen Gewebepräparationstechniken bieten Paraffinschnitte den Vorteil der müheloser Materialbeschaffung, da Formaldehydfixierung mit nachfolgender Einbettung in Paraffin in der Pathologie routinemäßig durchgeführt wird. Auch bleibt die Morphologie besser erhalten als z.B. bei Kryoschnitten (Beobachtungen der Arbeitsgruppe Cremer). Dennoch kann der Nutzen von Paraffinschnitten in Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung mehr oder minder stark limitiert sein. Ausschlaggebend ist dabei das für das Experiment erforderliche Ausmaß an Strukturkonservierung. So können Erkenntnisse hinsichtlich der Veränderung von DNA-Abschnitten durch Amplifikation, Deletion oder Translokation im Verlauf der Kanzerogenese relativ gut an Paraffinmaterial gewonnen werden, da die Aufrechterhaltung der Zellkernstruktur für das Ergebnis keine entscheidende Rolle spielt. Aufgrund der besseren Hybridisierungsqualität werden Untersuchungen zur Aufdeckung numerischer oder struktureller Chromosomenveränderungen mittels Interphase-FISH oft nicht direkt an Gewebeschnitten durchgeführt, sondern an isolierten und vereinzelt Zellkernen (Lukasova *et al.*, 2004; Parada *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu bedürfen zellkernarchitektonische Analysen einer möglichst guten Strukturhaltung, was jedoch zumeist mit den ebenfalls angestrebten optimalen Hybridisierungsergebnissen kollidiert.

4.1 Zellkernarchitektonische Analysen an Paraffinschnitten erfordern eine flexible Gewebeaufbereitung

Unabhängig von der jeweils verwendeten Prozessierungsmethode erschwert die natürliche Heterogenität des Gewebes die Analyse von definierten Zelltypen. Die unterschiedliche Konsistenz verschiedener Gewebearten zieht die Notwendigkeit einer flexiblen, im Hinblick auf bestimmte Fragestellungen optimierten Behandlung des Untersuchungsmaterials nach sich, was jedoch mit einem relativ hohen Zeit- und Materialaufwand einhergeht. Erwartungsgemäß ist auch die Beschaffenheit einer Gewebeart bei verschiedenen Individuen nicht identisch. Dies schlägt sich in einem lediglich begrenzt kalkulierbaren Verhalten verschiedener Paraffinblöcke im Verlauf der Prozessierung nieder. Im Grunde erfordern deshalb auch in diesem Fall die ungewissen Voraussetzungen fortlaufende Angleichungen der jeweils verwendeten Methoden, die aber aufgrund der dann nicht mehr gewährleisteten Gleichbehandlung zu Lasten der Vergleichbarkeit gehen. Selbst innerhalb eines Paraffinblockes sind die Färbereigenschaften und die Hybridisierbarkeit des Gewebes zum Teil recht uneinheitlich.

Neben der natürlichen interindividuellen Heterogenität können auch chirurgische, fixierungs- oder andere experimentbedingte Einflüsse ursächlich für Unterschiede zwischen verschiedenen Paraffinblöcken derselben Gewebeart sein oder gar zur Quelle von Artefakten werden. So offenbarten direkt nach Paraffinentfernung und Rehydrierung der formaldehydfixierten Kolonpräparate durchgeführte Färbungen der gesamten DNA im Zellkern randständige Verteilungsmuster mit Strukturen im Kerninneren (s. 3.3, S. 62). Hierbei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um die normale Anordnung der DNA. Dieser Phänotyp erinnert im Gegenteil an eine globale Chromatinkondensation durch Erhöhung der Osmolarität des Mediums (Albiez, 2003). Bereits die unvermeidliche Sauerstoffunterversorgung oder Änderungen des pH-Werts im Gewebe während des chirurgischen Eingriffs könnten eine derartige Chromatinanordnung bewirken. Ist das beobachtete Chromatinmuster tatsächlich die Folge der medizinischen Vorgehensweise, kann der Experimentator dessen Auftreten nicht verhindern. In anderen Fällen könnte jedoch auch eine verzögerte Überführung des Biopsiematerials in die Fixierlösung für die Chromatinkondensation verantwortlich sein. Dies sollte unbedingt vermieden werden, zumal proteolytischer Abbau (Werner *et al.*, 2000) und Diffusionsvorgänge im unfixierten Gewebe (Berod *et al.*, 1981) auch die Signalqualität in immunhistochemischen Experimenten mindern. Eine weitere mutmaßliche, jedoch begrenzt beeinflussbare Ursache des kondensierten Erscheinungsbildes des Chromatins könnte durch das räumliche Ausmaß des zu fixierenden Materials bedingt sein. Das Fixativ muss zunächst in das Gewebe eindringen, ehe vor

Ort die Fixierungsreaktion einsetzen kann. Da die Dauer des Penetrationsvorganges mit der zurückzulegenden Distanz zunimmt, beginnt die Fixierung im Inneren des Gewebeblocks zeitlich verzögert. Löst dies eine globale Chromatinkondensation im Zellkern aus, sollten die äußeren Schichten eines Gewebeblocks das beschriebene Arrangement der DNA nicht oder nur in geringerem Ausmaß aufweisen als im Zentralbereich des Blocks lokalisiertes Gewebe. Eine dahingehende Analyse eines Gewebeblocks ergab jedoch keine derartigen Unterschiede im Verteilungsmuster des Chromatins. Eine Erklärung hierfür bietet möglicherweise das so genannte Penetrations-Fixierungs-Paradoxon des Formaldehyds. Das niedrige Molekulargewicht von nur 30 sollte eine rasche und relativ konzentrationsunabhängige Penetration erlauben, wobei binnen etwa 24 Stunden gewebeartige Substanzen von 20mm Dicke oder mehr durchdrungen werden (Fox *et al.*, 1985). Das ist jedoch nicht gleichbedeutend mit der Fixierung des Gewebes. Bei dieser handelt es sich um einen vergleichsweise langsamen Vorgang. Die immobilisierende Wirkung von Formaldehyd beruht auf der Vernetzung von Proteinen und anderen Gewebekomponenten, die durch Ausbildung äußerst stabiler intermolekularer Methylenbrücken ($R-CH_2-R'$) erzielt wird (Feldman, 1973; French & Edsall, 1945; Gustavson, 1956). Diese relativ langsam verlaufende Kondensationsreaktion bestimmt die Dauer der Fixierung und könnte daher unter Umständen für das auch in den äußeren Schichten des Gewebeblockes beobachtete, kondensierte Chromatinverteilungsmuster verantwortlich sein. Schließlich kann der DNA-Kondensationseffekt auch aus der unphysiologischen Osmolarität der Formaldehydlösung resultieren. Im Allgemeinen handelt es sich dabei um eine vierprozentige Lösung, deren Osmolarität bereits in ungepuffertem Zustand etwa 1300 Milliosmol (mosm) beträgt und somit deutlich größer ist als die der zirka 250-350mO aufweisenden Kulturmedien oder physiologischen Salzlösungen (Fox *et al.*, 1985). Gegen eine kausale Beteiligung der Osmolarität an dem beobachteten Phänomen spricht indes die Tatsache, dass formaldehydfixierte Kerne in Zellkulturpräparaten kein derartiges Chromatinmuster zeigen. Allerdings erlaubten Untersuchungen an synthetischen Peptiden erst nach etwa 48 Stunden den Nachweis aller drei zu erwartenden Typen von Reaktionsprodukten mit Formaldehyd, wobei jedoch nicht die Standardbedingungen für Formaldehydfixierungen verwendet wurden (Metz *et al.*, 2004). Bei den genannten Produkten handelt es sich um labile Aminomethylol-derivate ($R-NH-CH_2OH$) und Imine (Schiff-Basen; $R-N=CH_2$) sowie um die weiter oben erwähnten, stabilen Methylenbrücken. Die beiden erstgenannten Produkte bewirken nur dann eine inter- oder intramolekulare Vernetzung, wenn die sterischen Bedingungen und die Fixierdauer die zu Methylenbrücken führende Kondensation mit Amid- oder anderen funktionellen Gruppen zulassen. Auch eine andere Studie offenbarte für Peptide eine verhältnismäßig lange Fixierdauer. Unter Verwendung der in der pathologischen Praxis üblichen zehnprozentigen, neutral gepufferten

Formalinlösung nahm eine vollständige Fixierung der auf Objektträgern verankerten Peptide zwischen 6 und 16 Stunden in Anspruch (Sompuram *et al.*, 2004). Die Fixierdauer von Zellkulturmaterial für eine erfolgreiche Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) beträgt hingegen in der Regel nur ungefähr 20 Minuten. Demnach ist der Fixierungsgrad, gemessen an der Anzahl an Methylenbrücken, unter Umständen sehr viel niedriger als in Gewebepreparaten. Zellkulturmaterial ist deshalb gegebenenfalls nicht in demselben Ausmaß immobilisiert wie Gewebestandteile. Dies wiederum könnte mit einer gewissen passiven, diffusionsbedingten Auflockerung des Chromatins in nachfolgenden Waschschritten einhergehen, während im Gewebe der kondensierte Zustand durch die zahlreicheren Methylenbrücken stärker konserviert wird und somit deutlicher in Erscheinung tritt.

Die potentiellen Auswirkungen einer globalen Chromatinkondensation auf die Ergebnisse von Hybridisierungsexperimenten variieren in Abhängigkeit von der Ebene der Analyse. Während die relativen Positionen kompletter Chromosomenterritorien (CTs) dadurch höchstwahrscheinlich keine grundlegende Verschiebung erfahren, könnten kleinere Genomabschnitte durchaus Lokalisationsveränderungen erleiden. Auch könnte sich die Form der CTs zugunsten eines kompakteren Aussehens ändern. Infolgedessen können Gestaltunterschiede von Territorien verschiedener Chromosomen verloren gehen. FISH-Experimente offenbarten zum Beispiel ein voluminöseres, flockigeres Erscheinungsbild für das Territorium des genreichen Chromosoms 19 verglichen mit dem des ähnlich viel DNA enthaltenden, aber genarmen Chromosoms 18 (Croft *et al.*, 1999). Gewebeschnittpräparate ließen diesen Unterschied nicht erkennen. Allerdings kann dies auch durch das im Vergleich zu Zellkulturpräparaten grundsätzlich ausgeprägtere Hintergrundrauschen erklärt werden, das eine sichere Abgrenzung chromosomaler Feinstrukturen nur sehr bedingt zuläßt.

Die Formaldehydfixierung nimmt Einfluss auf die spätere Zugänglichkeit des Gewebes für Sonden und Antikörper sowie dessen Strapazierfähigkeit während der Prozessierung. Eine längere Fixierdauer geht mit einem höheren Grad an Vernetzung einher, was wiederum den Einsatz härterer Permeabilisierungsmethoden erfordert. Längere Einwirkzeiten oder höhere Konzentrationen der zu diesem Zweck verwendeten Chemikalien steigern jedoch das Artefaktrisiko und ziehen die Morphologie des Gewebes stärker in Mitleidenschaft. Andererseits bewirkt eine zu kurz gewählte Fixierdauer Mischfixierungen aus formaldehydinduzierter Vernetzung und alkoholbedingter Proteinpäzipitation, was eine unkalkulierbare Variabilität immunhistochemischer Färbungen zur Folge hat. Da die nachgewiesenen Proteine in der Regel der Identifikation bestimmter Zelltypen oder Zellzyklusstadien im Rahmen von FISH-Experimenten dienen, erfährt die Anzahl auswertbarer Zellkerne dadurch unter Umständen eine empfindliche Einschränkung, die sich in einer geringen Stichprobengröße

niederschlägt. Obwohl in der pathologischen Praxis eine individuelle Anpassung der Fixierungsbedingungen unmöglich ist, könnte zumindest für eine Konstanz aller beeinflussbaren Parameter gesorgt werden. Zu diesen gehören beispielsweise die Größe der Gewebeblöcke, der pH-Wert und die Osmolarität der Fixierlösung sowie die Fixierdauer. Alle für eine Studie verwendeten Präparate sollten nach Möglichkeit von einem einzigen Experimentator hergestellt und prozessiert werden. Dadurch kann der Heterogenitätsgrad verschiedener Paraffinblöcke einer Gewebeart auf den der natürlich vorkommenden, interindividuellen Unterschiede beschränkt und somit eine darüber hinausgehende Schmälerung der Ergebnisvergleichbarkeit vermieden werden. Zumindest sollten jedoch Fixierung und Prozessierung jeweils in den Händen einer einzigen Person liegen, um innerhalb dieser beiden Arbeitsblöcke eine Gleichbehandlung aller Präparate zu gewährleisten. Dieser Kompromiss erlaubt überdies auch die Verwendung archivierten Gewebematerials. Allerdings erfordern die ungewissen Fixierungsbedingungen solcher Gewebeblöcke stets eine experimentelle Bestimmung der optimalen Prozessierungsparameter.

4.2 Die Mikrowellenbehandlung ist der chemischen Aufbereitung des Gewebes überlegen

Chemisch aufbereitete Präparate weisen im Vergleich zu mikrowellenbehandelten Gewebeschnitten eine deutlich schlechtere Allgemeinmorphologie auf. Die Basalmembran ist teilweise nicht mehr oder nur noch bruchstückhaft sichtbar, was besonders die Datenerhebung an Karzinomschnitten erschwert. Das jeweilige Hybridisierungsareal wurde im Vorfeld der Gewebeprozessierung durch Vergleich des ungefärbten Paraffinschnittes mit einem Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbten Schnitt desselben Karzinomgewebesblocks weitgehend auf den Tumor beschränkt. Dennoch erstrecken sich die Randbezirke des markierten Areals meist in benachbartes Normalgewebe. Die Randbereiche des Karzinoms müssen aber aufgrund der ungleichmäßigen Hybridisierungs- bzw. Signalqualität sowie der daraus resultierenden relativ begrenzten Anzahl Signaltragender Zellkerne unbedingt in die Analyse einbezogen werden. Da die geordnete Epithelstruktur der Kolonmukosa im Verlauf der Kanzerogenese zunehmend einer chaotischen Anordnung der Zellen weicht, stellt die Basalmembran unter Umständen die einzige Orientierungshilfe bei der Abgrenzung der Tumorzellkerne von jenen angrenzender normaler Zellen dar. Auch die Struktur normalen Kolongewebes ist infolge der chemischen Behandlung zum Teil stark beeinträchtigt. Insbesondere die für die Datenerhebung maßgeblichen, longitudinal angeschnittenen Krypten sind davon betroffen. Häufig kommt es zu einem zerstörungsbedingten Verlust der oberen, luminalen Bereiche der Krypten, wodurch die Anzahl auswertbarer Zellkerne eine zum Teil

empfindliche Einschränkung erfährt. Ferner könnte die starke Beanspruchung des Gewebes Veränderungen der Chromatinanordnung im Zellkern verursachen, wenn auch die Ergebnisse der radialen DNA-Verteilung von Chromosomenterritorien nicht auf grobe Abweichungen von den in primären menschlichen Zellen und Zelllinien beobachteten Mustern hindeuten (s. 3.2, S. 57ff). Dennoch könnten geringfügige Änderungen die Position von kleinen Chromatinabschnitten innerhalb des Kerns beeinflussen und somit zu artefaktbehafteten Ergebnissen führen.

Die chemische Prozessierung des Gewebes erfordert den Einsatz verschiedener Substanzen, deren konkrete Auswirkungen auf das Gewebe häufig nicht oder nur teilweise bekannt sind. Dies verhindert unter Umständen das Erkennen und die korrekte Einschätzung möglicher Artefaktisiken. Die Optimierung der Gesamtwirkung dieser Aufbereitungsmethode ist allerdings selbst ohne Berücksichtigung dieser Tatsachen sehr schwierig. Jede verwendete chemische Verbindung bzw. Biochemikalie steuert mehrere variierbare Parameter bei, die hinsichtlich ihres bestmöglichen Zusammenspiels koordiniert werden müssen. Eine steigende Zahl an Einflussfaktoren zieht eine verminderte Kalkulierbarkeit des Gesamtergebnisses nach sich und erschwert auf diese Weise die Festlegung der optimalen Einzelparameter. Obwohl deshalb lediglich Einwirkdauer und Konzentration der jeweiligen Substanz korrigiert wurden, ließ sich selbst für eine einzige Gewebeart kein generelles Protokoll definieren. Wie bereits dargelegt (s. 4.1, S. 83ff), können hierfür jedoch auch unterschiedliche Fixierungsbedingungen der verschiedenen Gewebeblöcke ursächlich sein. Ferner erlaubt das fehlende Verständnis der Wirkung der verwendeten Substanzen kaum eine auf konkreten Überlegungen basierende Protokollmodifizierung, sondern lediglich eine sowohl zeit- als auch materialaufwendige, von Versuch und Irrtum geprägte Anpassung. Als Beispiel sei hier die ionische Verbindung Natriumborhydrid (NaBH_4) genannt, die zu den salzartigen Hydriden gehört. Sie weist als Anion ein Wasserstoff-Bor-Komplexion (BH_4^-) auf, das aufgrund der polarisierten Bindung zwischen Bor und Wasserstoff als Donator für nukleophile Hydridionen (H^-) fungieren kann. Die Bezeichnung *nukleophil* bezieht sich auf den Angriffsort eines solchen elektronenreichen Moleküls oder Anions an besonders elektronenarmen Stellen des Reaktionspartners, nahe eines Atomkerns (Kaufmann & Hädener, 1996). Im Verlauf der Reaktion gibt das Nukleophil Elektronen ganz oder teilweise ab. Darauf beruht auch die reduzierende Wirkung des NaBH_4 , kraft derer das Hydrid menschliches Gewebe angreift. Im Rahmen der chemischen Aufbereitung von Schnittpräparaten werden wässrige Lösungen der Verbindung zur Verminderung störender Eigenfluoreszenz eingesetzt. NaBH_4 reduziert dabei vermutlich fluoreszierende Imine (Schiff-Basen, $\text{R-N}=\text{CH}_2$), die im Verlauf der Gewebefixierung durch Verbindung von Aminen mit Aldehyden des Fixativs entstehen (Beisker *et al.*, 1987; Willingham, 1983). Ferner ist auch der partiell positiv geladene und daher ein

Elektronendefizit aufweisende Kohlenstoff der polaren Carbonylgruppe ($R_2C=O$) in Aldehyden und Ketonen Ziel nukleophiler Angriffe durch $NaBH_4$, wobei letztlich Alkohole (R_2CH-OH) entstehen. Recherchen hinsichtlich einer reduzierenden Wirkung von $NaBH_4$ auf andere biochemisch relevante, organische Verbindungen erbrachten spärliche und zum Teil widersprüchliche Resultate. Karbonsäuren und Karbonsäureester scheinen trotz vorhandener Carbonylgruppe durch $NaBH_4$ keine Reduktion zu erfahren. Prinzipiell ist auch die Reduktion von Amiden zu Aminen denkbar, wobei $NaBH_4$ ein dafür ausreichendes Reduktionspotential überwiegend abgesprochen wird. Aus diesem Grund erscheint ein nukleophiler Angriff auf die Aminosäuren verknüpfende Amidbindung in Proteinen eher unwahrscheinlich, so dass nicht von einem permeabilisierenden Einfluss des $NaBH_4$ auf das Gewebe infolge einer Destabilisierung der Proteinstruktur ausgegangen werden kann. Allerdings wird $NaBH_4$ durch Wasser unter Bildung von elementarem Wasserstoff zersetzt, wodurch sich ein leichter Sprudeleffekt ergibt. Dieser könnte eine gewisse mechanische Permeabilisierung bewirken. Für diese Ansicht spricht die homogenere Signalverteilung innerhalb des Hybridisierungsareals im Falle des mit Sonden für die Chromosomen 18 und 19 hybridisierten Normalgewebes. Alle anderen im Rahmen dieser Arbeit in FISH-Experimenten verwendeten Kolonschnitte ließen den Einsatz von $NaBH_4$ nicht zu, weil die damit einhergehende mechanische Beanspruchung die Ablösung des Gewebes vom Objektträger nach sich zog. Die Signaltragenden Kerne dieser Präparate waren heterogener im Hybridisierungsareal verteilt und befanden sich überdies häufig nahe an der Schnittoberfläche, was insgesamt eine eingeschränktere Gewebedurchlässigkeit andeutet.

Während die scheinbar bessere Zugänglichkeit des Gewebes für Reagenzien nach Inkubation in einer wässrigen $NaBH_4$ -Lösung eine zufällige Beobachtung darstellt, wird Natriumisothiozyanat ($NaSCN$) gezielt zu diesem Zweck eingesetzt. Als Anion enthält diese Verbindung SCN^- (Rhodanid), das ebenfalls zu den Nukleophilen gehört (Kaufmann & Hädener, 1996). Demnach könnten die im Gewebe hervorgerufenen Reaktionen jenen der durch $NaBH_4$ verursachten ähneln, was jedoch vom Reduktionspotential des Rhodanids abhängig ist. $NaSCN$ gehört ferner zu den chaotropen (Unordnung generierenden) Salzen, die einen destabilisierenden Einfluss auf Proteine und Membranen ausüben. Eine Behandlung mit $NaSCN$ schlägt sich deshalb in der Denaturierung von Proteinen nieder, wobei die meisten formaldehydinduzierten Methylenbrücken aufgrund ihrer Stabilität vermutlich überdauern. Tatsächlich trotzen solche Bindungen im Allgemeinen selbst verhältnismäßig starken, im Rahmen einer konventionellen histologischen Vorgehensweise nicht zu erwartenden, zersetzenden Einflüssen durch relativ konzentrierte Säuren oder Harnstoff (Puchtler & Meloan, 1985). Infolgedessen können unter Umständen Zugkräfte auf andere, mit dem denaturierten Protein vernetzte, Gewebekomponenten

einwirken und deren Lokalisation verändern. Da die tatsächlichen Aufenthaltsorte der Proteine innerhalb der Zellen variabel und dementsprechend auch die intrazellulären Positionen der Methylenbrücken nicht immer gleich sind, sollten denaturierungsbedingte Lokalisationsveränderungen eher zufällig ausfallen. Deshalb lässt sich durch Erfassung einer größeren Anzahl an Zellkernen gegebenenfalls ein Ausgleich erzielen, der eine korrekte Interpretation von Ergebnissen ermöglicht. Dem werden allerdings durch die bereits erwähnte, relativ geringe Anzahl an auswertbaren Zellkernen in Schnittpräparaten enge Grenzen gesetzt. Darüber hinaus könnten signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen, Reifestadien oder zwischen normalen und entarteten Zellen durch die willkürlich veränderten Positionen der ausschlaggebenden DNA-Abschnitte derart vernebelt werden, dass sie unerkannt bleiben. In der vorliegenden Arbeit spielte dies indes keine Rolle, da die Optimierung der Prozessierung des Gewebes hinsichtlich einer Hybridisierung kurzer, singulärer DNA-Abschnitte erfolglos verlief. Signifikante, artifiziell induzierte Positionsänderungen kompletter Chromosomenterritorien scheinen nach Vergleichen mit Zellkulturpräparaten ausgeschlossen.

Der wohl schwerwiegendste Nachteil der chemischen Aufbereitung des Gewebes stellt die Zerstörung von Proteinepitopen dar, die vermutlich durch NaSCN induziert und durch die ebenfalls permeabilisierend wirkende Proteinhydrolyse infolge der vergleichsweise massiven Pepsinbehandlung weiter verschärft wird. Der Nachweis von Markerproteinen ist deshalb nicht möglich. Zellkernarchitektonische Analysen des im Rahmen dieser Arbeit betrachteten, durch die tubulären Darmkrypten repräsentierten Differenzierungssystems hängen jedoch in hohem Maße von der sorgfältigen Unterscheidung verschiedener zellulärer Reifestadien sowie unterschiedlicher Zelltypen und Zellzyklusphasen anhand zuverlässiger, objektiver Kriterien ab. Die als Einstülpungen in der Schleimhaut in Erscheinung tretenden Krypten dienen der fortlaufenden Erneuerung des Oberflächenepithels, dessen unmittelbar mit dem Darmlumen und somit der Außenwelt in Kontakt stehende Zellen aufgrund der dort herrschenden rauen Bedingungen nur eine relativ begrenzte Lebensdauer haben. Das daraus resultierende Gebot der kontinuierlichen Produktion und exakten Platzierung spezialisierter Zelltypen sowie die fundamentale Fähigkeit zur Selbsterhaltung zwingen dem Kryptenepithel eine hierarchisch geprägte Struktur auf. Die Kopplung von Proliferation, Differenzierung und Zellmigration schafft im Allgemeinen ein von der Kryptenbasis bis zur Schleimhautoberfläche reichendes Zellspektrum mit Stammzellen im basalen und terminal differenzierten Zellen im luminalen Kryptenbereich. Die Stammzellen erzeugen unreife Vorläuferzellen, die während ihrer Aufwärtswanderung zur luminalen Oberfläche zunächst eine Proliferationsphase durchlaufen, dann aber den Zellzyklus verlassen und zunehmend die phänotypischen Eigenschaften absorbierender, Schleimfreisetzender oder manchmal enteroendokriner Zellen erwerben

(Gordon & Hermiston, 1994). Zwar lässt die Lokalisation einer Zelle innerhalb der Krypte aufgrund dieser Hierarchie gewisse Rückschlüsse auf ihren Reifungsgrad zu, eine zweifelsfreie Zuordnung wird jedoch durch den nahtlosen Verlauf des Differenzierungsprozesses verhindert. Dazu gesellen sich Unklarheiten bezüglich des tatsächlichen Aufenthaltsortes der Stammzellen in der Krypte, der scheinbar nicht in allen Abschnitten des Kolon mit deren Basis zusammenfällt. Stattdessen nehmen sie im aufsteigenden Kolon von Ratten eine Position in der Kryptenmitte ein (Altmann .G.G., 1983; Altmann G.G., 1990; Sato & Ahnen, 1992; Yamada *et al.*, 1992). Dies trifft zwar nicht notwendigerweise auf den menschlichen Kolon zu, kann aber auch nicht völlig ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund ist es unerlässlich die Lokalisation dieser Zellen in den Krypten mittels eines Stammzellmarkers zweifelsfrei zu definieren. Dies sollte zumindest an einem Schnitt des jeweiligen Gewebelocks erfolgen, da andernfalls die Lage einer Zelle innerhalb der Krypte ein relativ unzuverlässiges Markerkriterium darstellt. Die Untersuchung morphologischer Eigenschaften, wie etwa Kernform oder Anzahl bzw. Größe der Nukleoli, kann die Klassifizierung der Zelltypen oder Reifestadien allenfalls unterstützen, nicht jedoch spezifische Marker ersetzen. Im Falle der Stammzellen ist eine Abgrenzung von den ebenfalls vergleichsweise undifferenzierten Vorläuferzellen auch unter Einbeziehung sowohl der Zellposition innerhalb der Krypte als auch der Kernmorphologie kritisch, da neben großer räumlicher Nähe für alle diese Zellen ein eher embryonaler Phänotyp zu erwarten ist. Grundsätzlich ist inzwischen die Identifikation potentieller Stammzellen im Kolonepithel mittels immunohistochemischer Verfahren möglich (Nishimura *et al.*, 2003). Das RNA-bindende Protein MSI-1 (*Musashi-1*) spielt in Säugetieren eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des unreifen Zustandes der Stammzellen, indem es Einfluss auf den Notch-Signalweg nimmt (Imai *et al.*, 2001). Der nötige Antikörper ist jedoch leider nicht kommerziell erhältlich und konnte deshalb in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet werden. Mit MUC-2 (*Mucin-2*) und CK20 (*Cytokeratin-20*) stehen im Prinzip zumindest für terminal differenzierte Becherzellen (Chang *et al.*, 1994; Devine *et al.*, 1993; Gambus *et al.*, 1993) bzw. absorbierende Zellen nachweisbare Marker zur Verfügung. Eine Zelltypbestimmung mittels dieser in zellkernarchitektonischen Analysen erfordert allerdings eine Kombination von Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) und immunohistochemischem Proteinnachweis. Dies gilt auch für das in zyklierenden, nicht aber in ruhenden Zellen exprimierte KI-67, das der Abgrenzung zellzyklusabhängiger Veränderungen von differenzierungsbedingten dient. Ohne derartige Klassifizierungsmöglichkeiten sind die Verteilungsmuster von FISH-Signalen nur bedingt vergleichbar, da der Einfluss eines bestimmten Faktors auf das Ergebnis nur *ceteris paribus* untersucht werden kann. Jede zusätzliche Variable erhöht die Komplexität des Experiments und verschleiert so unter Umständen das Ausmaß der Beteiligung ursächlicher Parameter an

beobachteten Unterschieden in den Ergebnissen verschiedener Experimente. Dies mindert die Überzeugungskraft von Ergebnisinterpretationen.

Die Mikrowellenbehandlung des Gewebes anstelle der chemischen Aufbereitung gestattet im Prinzip die simultane Durchführung von FISH-Experimenten und immunhistochemischem Proteinnachweis (Bull & Harnden, 1999; Dundas *et al.*, 2001; Nolte *et al.*, 1996), was der Hauptgrund für die Überlegenheit dieser Methode ist. Das Verfahren induziert dabei eine Wiederherstellung von Proteinepitopen, die infolge der formaldehydbedingten Vernetzung von Gewebekomponenten maskiert oder verändert und somit einem direkten Nachweis nicht mehr zugänglich sind. Die als *Antigen Retrieval* bezeichnete Technik besteht in einer starken Erhitzung formaldehydfixierter, in Paraffin eingebetteter Gewebeschnitte in der Mikrowelle und wurde ursprünglich in Gegenwart zink-sulfat- oder bleihaltiger Lösungen durchgeführt (Shi *et al.*, 1991). Bald gelang erstmal der Nachweis des bis dahin auf Paraffinschnitten als unzugänglich geltenden Zellzyklusmarkers KI-67, wobei überdies ein Zitratpuffer die gesundheitsschädlichen Schwermetalle ersetzte (Gerdes *et al.*, 1992). Als kritische Parameter des *Antigen Retrieval* kristallisierten sich die durch die Behandlung erzielte Temperatur sowie der pH-Wert der Pufferlösung heraus (Evers & Uylings, 1994), während der zugrunde liegende Mechanismus weiter ungeklärt ist. Möglicherweise bewirkt die starke Erhitzung des Gewebes eine zur Wiederherstellung der Epitope ausreichende Rückbildung von formaldehydinduzierten Konformationsänderungen (Shi *et al.*, 1997). Ein hydrolytisches Aufbrechen der Vernetzungen zwischen Proteinen ist zumindest für bestimmte kovalente Bindungen dieser Art mittels Hitze oder Alkalibehandlung erreichbar (Fraenkel-Conrat H. *et al.*, 1947; Fraenkel-Conrat H. & Olcott, 1948; Sompuram *et al.*, 2004). Dagegen ist ein solcher Effekt durch die Bestrahlung kaum erklärbar, da Mikrowellen nicht die zur Auflösung kovalenter Bindungen nötige Energie aufweisen.

Den Vorteilen einer wesentlich besseren Allgemeinmorphologie und dem prinzipiell möglichen Nachweis von Markerproteinen steht der Nachteil einer potentiellen DNA-Fragmentierung infolge der Bestrahlung mit Mikrowellen gegenüber. Die Erwärmung von Gewebe in Mikrowellengeräten basiert auf einer hochfrequenten Umpolung eines elektromagnetischen Feldes, die polare Moleküle in sehr starke Schwingungen versetzt und so Reibungshitze erzeugt. Andere strahlungsbedingte Auswirkungen auf Gewebestandteile sind kaum erforscht und überdies häufig Gegenstand von Kontroversen. Hierzu zählen insbesondere als nicht-thermische Mikrowelleneffekte bezeichnete Phänomene, die nicht allein auf die Erhitzung des Gewebes zurückzuführen sind. Die Bestrahlung viraler DNA in einem herkömmlichen Mikrowellengerät der Frequenz 2.45 Gigahertz (GHz) bewirkte deren exzessive Fragmentierung, während eine externe Erwärmung auf dieselbe Temperatur keine derart zerstörerischen Folgen hatte (Kakita *et al.*, 1995). Ein solcher Effekt ist grundsätzlich auch für

Gewebeschnitte denkbar, da in FISH-Experimenten lediglich zentromerisches Heterochromatin zuverlässig Signale von guter Qualität lieferte. Die Hybridisierungen kompletter Chromosomen schlugen dagegen trotz Modifikation von Behandlungsdauer und -intensität meist fehl. Eine der wenigen Ausnahmen bildete dabei ein Kolonkarzinomschnitt, der einer Hybridisierung mit einem Sondengemisch für Chromosom 11 unterzogen worden war. Dieses Chromosom konnte auch auf einem normalen Kolongewebeschnitt nachgewiesen werden, wobei jedoch störende unspezifische, punktförmige Signale im gesamten Hybridisierungsareal eine quantitative Erfassung verhinderten. Ähnliches gilt für die Hybridisierung eines Kolonkarzinomschnittes mit Sonden für die Chromosomen 18 und 19, deren Anwesenheit lediglich erahnt, nicht aber konfokalmikroskopisch nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise nimmt der fragmentierungsbedingte Verlust von Ziel-DNA in den meisten Fällen ein Ausmaß an, das keine gesamtchromosomale Hybridisierung mehr zulässt. Im Gegensatz zu einem Chromosomenterritorium (CT) liegt das durch die α -Satelliten-DNA repräsentierte, zentromerische Heterochromatin sehr stark kondensiert vor und besteht darüber hinaus aus Tandemwiederholungen von Monomeren, die insgesamt einen relativ großen Zielbereich von mehreren 100 Kilobasen (kb) definieren können. Demnach könnten Zentromere auch dann noch Signale liefern, wenn die mikrowelleninduzierte Zerstörung der DNA einen Nachweis vollständiger CTs bereits nicht mehr erlaubt. In der Literatur beschriebene FISH-Experimente nach Mikrowellenbehandlung beziehen sich ebenfalls auf Zentromere (Aubele *et al.*, 1997; Bull & Harnden, 1999) oder das sehr kleine, kondensierte Y-Chromosom (Dundas *et al.*, 2001), was diese Annahme unterstreicht. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelungene Hybridisierung von Chromosom 11 deutet jedoch darauf hin, dass grundsätzlich die notwendige Permeabilisierung des Gewebes mit einer ausreichenden Erhaltung der DNA vereinbar ist. Allerdings erschweren oder verhindern die vielfältigen Unterschiede zwischen verschiedenen Gewebelöcken sowie die nicht identische Chromatinanordnung in den einzelnen Chromosomen die Entwicklung einer reproduzierbaren Vorgehensweise. Des Weiteren besteht die Notwendigkeit der Optimierung von Dauer und Intensität der Mikrowellenbehandlung nicht nur für jeden Gewebelöck oder jedes Chromosom, sondern auch für jedes Antigen bzw. jeden Antikörper. So bedarf die Wiederherstellung von Epitopen im Falle von KI-67 oder MUC-2 einer relativ langen Behandlung von zirka 20 Minuten bei einer relativ hohen Leistung von 700 Watt, während etwa CK-20 dies nicht zu tolerieren scheint und deshalb nicht mehr nachweisbar ist. Eine für das jeweilige Antigen zu ausgedehnte Erhitzung kann sich jedoch auch in falsch-positiven oder unspezifischen Färbungen niederschlagen (Ezaki, 2000), weshalb die genaue Kenntnis der Antigenlokalisation im Gewebe bzw. des Färbemusters wichtige Voraussetzungen darstellen. Ferner sind nicht alle durch Formaldehyd modifizierten Antigenstrukturen durch *Antigen Retrieval*

restaurierbar (Shi *et al.*, 2001). Demzufolge sind FISH-Experimente und der Nachweis des jeweils benötigten Markerproteins unter Umständen nicht kompatibel.

4.3 Die Evaluierung konfokalmikroskopischer Bilddaten

Die Auswertung konfokalmikroskopisch an Gewebeschnitten erhobener Daten ist in zweierlei Hinsicht problematisch. Zum einen liegen die Zellen und somit auch deren Kerne im Gewebeverband dicht gedrängt vor, was die Erfassung individueller Zellkerne unmöglich macht und infolgedessen deren artifizielle Isolierung durch Segmentierung des Bildmaterials erfordert. Zum anderen beeinträchtigt unspezifisches Hintergrundrauschen nach Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen die Signalqualität im Falle von Gewebeschnitten viel stärker als bei Zellkulturpräparaten, wodurch verhältnismäßig umfassende und zum Teil auch subjektive Maßnahmen der Bildbearbeitung notwendig werden.

Neben dem stärker ausgeprägten Rauschen beeinträchtigt ferner die scheinbar schlechtere Zugänglichkeit des Gewebes für die im Vergleich zu Avidin größeren Antikörpermoleküle das Hybridisierungsergebnis sowohl von chemisch aufbereiteten als auch von mikrowellenbehandelten Präparaten. Eine eventuell dadurch verursachte Beschränkung der Signale auf Gewebebereiche nahe der Schnittoberfläche stellte keine Seltenheit dar. Innerhalb dieser Areale lagen zudem vergleichsweise viele Kerne angeschnitten vor. Eine konfokalmikroskopische Erfassung dieser musste unterbleiben, da eine korrekte Bestimmung der kerninternen radialen Signal- bzw. DNA-Verteilung auf vollständigen Kernen beruht. Im Falle von entartetem Gewebe verbot darüber hinaus die infolge möglicher Aberrationen bestehende Unsicherheit bezüglich der Signalanzahl die Auswertung angeschnittener Kerne.

4.3.1 Die Segmentierung des Bildmaterials scheint nur interaktiv möglich zu sein

Die Identifizierung bzw. artifizielle Trennung verschiedener, gemeinsam in einem digitalen Bild erfasster Objekte kann durch Segmentierung des Datenmaterials erzielt werden. Das Bildmaterial wird dabei in verschiedene Unterregionen oder Segmente zerlegt, die mehrere Objekte oder auch ein Objekt und den Bildhintergrund repräsentieren können. Obwohl diese Beschreibung den Eindruck eines verhältnismäßig einfach durchzuführenden Prozesses vermittelt, handelt es sich in Wahrheit um ein überaus komplexes Informatikproblem. Die im Bild enthaltenen Objektinformationen bestehen in der Regel aus Pixelgrauwertintensitäten, die allenfalls binäre Klassifizierungsentscheidungen

bezüglich der Zugehörigkeit des jeweils betrachteten Pixels zu einem Objekt bzw. zum Hintergrund zulassen. Lediglich im Falle deutlich vom Hintergrund sowie von anderen Gebilden abgegrenzter, statischer Objekte erlauben verschiedene automatische Methoden eine relativ zuverlässige Segmentierung, obwohl kein für alle Bilder gleichermaßen geeignetes Verfahren existiert. Repräsentiert dagegen eine konfokalmikroskopische Bildfolge dreidimensionale, dicht gedrängt vorliegende Objekte, erscheinen diese meist als Trauben mit zum Teil optisch untrennbaren Überlappungsbereichen infolge der Auflösungsgrenzen des Mikroskops. Automatische Segmentierungsmethoden versagen in solchen Fällen. Die für eine quantitative Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellkernarchitekturanalysen unerlässliche, optische Isolierung vollständiger Zellkerne aus dem Gewebeverband konnte deshalb nur mittels einer interaktiven Segmentierung der dreidimensionalen Bilddaten erzielt werden. Dabei fand das Softwarepaket Amira 3.0 bzw. 3.1.1 (TGS) Verwendung, das eine halbautomatische, relativ zeitsparende und einfache Vorgehensweise gestattet. Eine bereits im Vorfeld der Segmentierung zu einem Stapel zusammengefügte Bildserie kann simultan in allen drei möglichen räumlichen Orientierungen dargestellt und bearbeitet werden. Die manuelle Markierung einzelner Schnittflächen des zu isolierenden Zellkerns in einigen Bildern des Stapels resultiert in einem Gerüst senkrecht aufeinander stehender Ebenen, für welches das Programm mittels eines Interpolationsalgorithmus die am besten passende Oberfläche generiert (s. Abb. 3-2, S. 58). Ausschlaggebend für die Auswahl der zum Gerüst beitragenden Ebenen ist das Vorliegen einer möglichst vollständigen Objektgrenze. Prinzipiell ermöglicht zwar ein immunhistochemischer Nachweis von Lamin B die Visualisierung der Kernmembran auf Schnittpräparaten, in den Überlappungsbereichen schlägt dieser jedoch größtenteils fehl und liefert bestenfalls diffuse Signale. Deshalb sollte der Einsatz automatischer Konturerkennungsverfahren keine verwendbaren Ergebnisse liefern. Darüber hinaus erscheint die Kerngrenze auf den entsprechend gefärbten Gewebeschnitten als ein im Hinblick auf Breite und Intensität teilweise sehr unregelmäßiger Ring. Aus diesen Gründen erfolgten die obligaten artifiziellen Kernisolierungen in der vorliegenden Arbeit anhand von Fluoreszenzfärbungen der gesamten Kern-DNA. Da bereits die relativ geringe Anzahl von etwa neun markierten Ebenen pro Zellkern hinreichend gute Segmentierungsergebnisse gewährleistet, können Bereiche scheinbar ineinander übergehender Kerne ausgespart werden und stellen somit kein unüberwindliches Hindernis mehr dar. Hier offenbart sich der entscheidende Vorteil dieser Methode gegenüber einer rein manuellen Segmentierung, die in jedem Einzelbild des Stapels erfolgen muss. Die zum Teil stark subjektive Festlegung der Kerngrenzen in Überlappungsbereichen kann unter Umständen in einer fehlerhaften Darstellung der Kernform resultieren und zieht darüber hinaus auch eine begrenzte Reproduzierbarkeit der Segmentierungsergebnisse

nach sich. Ferner handelt es sich bei dem manuellen Verfahren im Grunde lediglich um eine serielle zweidimensionale Segmentierung. Die Erfassung der Einzelresultate in einem Bildstapel kann nur eine grobe Annäherung an die wahre Kernform liefern, da zwischen aufeinander folgenden Bildern innerhalb des Stapels zum Teil recht sprunghafte Veränderungen in der Lokalisation der Kerngrenzen auftreten können. Dreidimensionale Rekonstruktionen derartiger Segmentierungsergebnisse bringen Objekte mit einer unrealistisch kantigen oder stufigen Oberflächenstruktur hervor (s. Abb. 3-4, S. 60), während die echte dreidimensionale, halbautomatische Segmentierung mittels Amira fließende Bildübergänge schafft und somit eine glatte Oberfläche erzeugt. Tatsächlich vorhandene Vertiefungen oder andere Abweichungen von der idealen sphärischen bzw. ovalen Gestalt der Kerne unterliegen dabei keiner Glättung, weil sie im Zuge der manuellen Ebenenmarkierung Eingang in die Oberflächenberechnung finden.

Das aus der Segmentierung resultierende, isolierte Objekt spiegelt in Gestalt und Volumen den Zellkern wider, wie er durch eine DNA-Gegenfärbung mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes repräsentiert wird. Die nach einer solchen Färbung im Kerninneren sichtbaren Grauschattierungen werden durch die Segmentierung gänzlich durch weiße Bildpunkte mit dem Grauwert 255 ersetzt, während alle nicht zu dem jeweiligen Kern gehörenden Pixel bzw. Voxel den Grauwert 0 erhalten und somit schwarz erscheinen. Informationen hinsichtlich des durch die DNA-Verteilung bedingten Musters der Grauwertintensitäten gehen dabei zwangsläufig verloren. Eine Wiederherstellung der ursprünglichen Grauwerte im isolierten Kern ist jedoch möglich, indem der Bildstapel des artifiziellen, weißen Kerns invertiert und vom Bildstapel der Originalgegenfärbung subtrahiert wird. Auf diese Weise bleiben lediglich innerhalb des artifiziellen Kerns die ursprünglichen Grauwerte erhalten, während alle anderen Voxel des aus der Subtraktion resultierenden Bildstapels einen Grauwert von Null annehmen und daher ausgeblendet werden. Allerdings besteht für eine derartiges Vorgehen keinerlei Notwendigkeit, da die Pixelintensitäten in den Überlagerungsbereichen zwischen verschiedenen Kernen neben der DNA des isolierten Kernes auch die des damit überlappenden widerspiegeln. Daher ist das dortige Verteilungsmuster für Analysen nicht nutzbar. Im Gegensatz dazu bietet ein analoges Subtraktionsverfahren zwischen dem Bildstapel der invertierten, artifiziellen Gegenfärbung und einem spezifische kerninterne Signale enthaltenden Bildstapel die Möglichkeit einer verhältnismäßig objektiven Signalzuordnung. Dies stellt besonders im Falle einer simultanen Hybridisierung aller Zentromere eine enorme Erleichterung dar, weil die Signalanzahl aufgrund der Zusammenlagerung einzelner Zentromere variabel und überdies relativ umfangreich ist. Dennoch muss das Subtraktionsresultat anhand des originalen, unsegmentierten Bildstapels der DNA-Gegenfärbung überprüft werden, um zumindest eindeutige Fehlzuordnungen von Signalen zu vermeiden.

Derartige Fehler stellen eine unmittelbare Folge der optischen Kernisolierung dar, die andere im Bildstapel enthaltene Kerne lediglich ausblendet, nicht aber die Überlappungsbereiche zwischen diesen eindeutig auf die beteiligten Kerne verteilt. Infolgedessen bilden Segmentierungsergebnisse benachbarter Kerne häufig Schnittmengen, innerhalb derer eine Signalzuordnung nur individuell und verhältnismäßig subjektiv durchgeführt werden kann (s. Abb. 3-5, S. 61).

4.3.2 Quantitative Auswertungsverfahren erfordern eine Einflussnahme auf die Rohdaten

Hybridisierungen kompletter Chromosomenterritorien (CTs) erfolgten in der vorliegenden Arbeit überwiegend an chemisch aufbereiteten Gewebeschnitten. Konfokalmikroskopisches Bildmaterial derartiger Präparate wies grundsätzlich verhältnismäßig viele unspezifische Hintergrundsignale auf, wobei das Ausmaß des Rauschens vom verwendeten Nachweisverfahren abhängig zu sein schien. Der Einsatz von Antikörpern lieferte dabei weniger saubere Hybridisierungsergebnisse als das auf der hohen Affinität von Avidin zu Biotin beruhende System. Möglicherweise bleiben trotz der Behandlung der Gewebeschnitte mit bovinem Serumalbumin (BSA) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen noch genügend derartige Epitope übrig, um durch Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörpermoleküle das beobachtete Hintergrundrauschen zu verursachen. Avidin sollte dagegen mit Ausnahme von Biotin keine Bindungspartner im Gewebe aufweisen. Die dennoch auch bei dieser Nachweismethode auftretenden unspezifischen Signale lassen sich durch Verwendung eines dreistufigen Verfahrens erklären, das aus Gründen der Signalverstärkung den Einsatz eines Biotin tragenden Antikörpers zwischen zwei Inkubationen mit fluoreszenzmarkiertem Avidin erforderte.

Das digitale Bildmaterial der CTs musste aufgrund des ausgeprägten Hintergrundrauschens relativ weit reichenden Bearbeitungsmaßnahmen unterzogen werden. Im Falle mittels Avidin-Biotin-System nachgewiesener und durch den Farbstoff Cy5 visualisierter CTs reduzierte zumindest manchmal bereits der Einsatz eines Medianfilters das Rauschen auf ein vertretbares Maß. Meistens mussten jedoch in jedem Einzelbild des Stapels alle vermutlich nicht zu einem CT gehörenden Bereiche durch Einrahmen und nachfolgende Zuordnung eines Pixelgrauwertes von 0 ausgeblendet werden. Dies kommt einem Ausschneiden der CTs gleich, was nicht nur sehr zeitraubend, sondern auch einer objektiven Datenbeurteilung abträglich ist. Das Evaluierungsprogramm 3D-RRD (**3D relative radial distribution**) bestimmt jedoch lediglich die relative Position von Signalen innerhalb des Kerns, während die exakte Signalgestalt nicht ausschlaggebend ist. Die durch das Ausschneiden der CTs verursachten Abweichungen von der tatsächlichen Gestalt sollten demnach keine erhebliche

Verfälschung des Ergebnisses nach sich ziehen. Die beschriebene Vorgehensweise ist indes nur für Normalgewebe zulässig, da die Anzahl der CTs bekannt ist. Karzinomgewebe weist dagegen nicht selten Aneuploidien auf, was die Chromosomenzahl zu einer im Vorfeld unbekanntem Größe macht. Zudem können kleinere Signale nicht zweifelsfrei als unspezifischer Hintergrund klassifiziert werden, da es sich auch um translozierte Chromosomenbereiche handeln kann. Aus diesen Gründen war eine Reduzierung des störenden Hintergrundrauschens im Falle von Karzinomgewebe nur durch Verwendung eines Medianfilters und minimaler Schwellwertsetzung möglich. Damit geht jedoch die stark erhöhte Wahrscheinlichkeit einher, dass unspezifische Signale in die Auswertung einfließen. Die Aussagekraft derartiger Ergebnisse ist somit aufgrund der größeren Artefaktanfälligkeit geringer als die der Resultate des Normalgewebes.

4.4 Positionierung von Chromosomenterritorien und Zentromeren in humanem Kolonepithel und Karzinomgewebe

Zellkernarchitektonische Untersuchungen bezüglich einer möglichen Umgestaltung der Anordnung bzw. Positionierung spezifischer Chromatinbereiche im Verlauf von Zelldifferenzierung oder Kanzerogenese bedürfen der Bestimmung der einzelnen Zellzyklusphasen, um zyklusabhängige Veränderungen von differenzierungsbedingten unterscheiden zu können. Im Falle der in dieser Arbeit visualisierten Chromosomenterritorien (CTs) war dies nicht möglich, da die für eine erfolgreiche Hybridisierung nötige chemische Aufbereitung des Gewebes keinen Proteinnachweis mehr gestattet. Deshalb konnte lediglich die Position der erfassten Zellkerne innerhalb des Differenzierungssystems der tubulären Krypten des Kolonepithels als Marker für den zellulären Reifungsgrad herangezogen werden. Zellen aus dem unteren, basalen Kryptendrittel weisen wahrscheinlich einen ziemlich niedrigen Differenzierungsgrad auf, während solche aus dem oberen, luminalen Kryptendrittel mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit terminal differenziert sind. Um mögliche differenzierungsbedingte Änderungen in der radialen Anordnung der CTs zu ermitteln, wurden daher Stichproben aus diesen beiden Kryptenbereichen konfokalmikroskopisch erfasst.

Im Gegensatz zu den CTs ließen sich Zentromere auch nach einer Mikrowellenbehandlung anstelle der chemischen Aufbereitung des Gewebes visualisieren. Diese Methode erlaubte zwar grundsätzlich den Nachweis des Zellzyklusmarkers KI-67, eine Abgrenzung einzelner Zellzyklusphasen anhand des zyklus-spezifischen Färbemusters (Verheijen *et al.*, 1989) war aber aufgrund der meist diffusen Signalverteilung nicht möglich. Ein in dieser Hinsicht besseres Ergebnis könnte möglicherweise durch Erhitzung des Gewebes in der Mikrowelle unter Hochdruck erzielt werden, was Temperaturen über 100°C gestattet

und offenbar eine Visualisierung der verschiedenen Zellzyklusstadien erlaubt (Suurmeijer & Boon, 1999). Dies setzt allerdings die Verfügbarkeit entsprechender Geräte voraus, was im Falle der vorliegenden Arbeit nicht gegeben war. Daher erfolgte lediglich eine Unterteilung in KI-67 positive und negative Zellen. Dies ist insofern problematisch, als ein ursächlicher Zusammenhang zwischen eventuell beobachteten Veränderungen in der Chromatinanordnung und der Zellzyklusphase somit nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann. Darüber hinaus deutet die Abwesenheit eines Proteinsignals lediglich auf eine ruhende Zelle hin, stellt jedoch keinen Beweis für diese Annahme dar. Trotz der beschriebenen Einschränkungen ermöglichen jedoch die Hybridisierungsergebnisse einzelner CTs sowie der Zentromere Aussagen hinsichtlich gewisser fundamentaler Muster in der Zellkernarchitektur.

4.4.1 Die radiale Verteilung von Chromosomenterritorien im Kolonepithel scheint gendichteabhängig zu sein

Die Bestimmung der radialen Verteilungsmuster von Chromosomenterritorien (CTs) innerhalb des Zellkerns stellt eine Möglichkeit dar, Gesetzmäßigkeiten der Zellkernarchitektur aufzudecken. Je nach betrachtetem Zelltyp scheint dabei entweder die Gendichte des analysierten Chromosoms oder dessen Größe ausschlaggebend für die radiale Positionierung zu sein. Um den Einfluss dieser beiden Faktoren in normalen und entarteten Epithelzellen direkt in menschlichem Gewebe zu untersuchen, wurde in vorliegender Arbeit die DNA-Verteilung der CTs 1, 11, 18, 19 und 20 in normalem Kolonepithel sowie Kolonkarzinomgewebe ermittelt.

Die simultan visualisierten CTs 18 und 19 weisen sowohl in den beiden verschieden stark differenzierten Zellpopulationen des normalen Kolonepithels als auch in Kolonkarzinomgewebe eine unterschiedliche Verteilung auf (s. Abb. 3-11, S. 70). CT 18 ist dabei stets stärker peripher positioniert als CT 19, wobei der Verteilungsunterschied in Kernen aus dem unteren, basalen Kryptendrittel am größten und in Karzinomkernen am kleinsten ist (s. Tab. 3-2, S. 70). Dies legt die Vermutung einer Abhängigkeit der radialen Chromatinanordnung von der Gendichte des jeweils analysierten Chromosoms nahe, wenn auch die Unterschiede in der Positionierung lediglich im Falle des basalen Kryptendrittels statistisch signifikant zu sein scheinen.

Ein gendichteabhängiges Verteilungsmuster wurde bereits für Lymphozyten und lymphoblastoide Zellen (Boyle *et al.*, 2001; Cremer M. *et al.*, 2001; Croft *et al.*, 1999) sowie hämatopoietische Vorläuferzellen und dermale Zellen beschrieben (Cremer M. *et al.*, 2003). Offenbar handelt es sich um ein fundamentales Muster, das verschiedene Zelltypen teilen. Dafür spricht auch dessen evolutionäre Konserviertheit (Tanabe *et al.*, 2002). Ferner unterstreicht die

grundsätzliche Beibehaltung dieses Positionierungsverhaltens in dem hier untersuchten, größtenteils triploiden Karzinomgewebe sowie in verschiedenen, teilweise von Translokationen betroffenen Tumorzelllinien (Cremer M. *et al.*, 2003) dessen Unverzichtbarkeit.

Im Gegensatz zu den CTs 18 und 19 zeigen die ebenfalls simultan nachgewiesenen CTs 1 und 20 kein derart unterschiedliches DNA-Verteilungsmuster (s. Abb. 3-13 und Tab. 3-3, S. 72). In der Tat weisen die beiden CTs in den vermutlich terminal differenzierten Kernen des oberen Kryptendrittels eine sehr ähnliche DNA-Verteilung auf. Im unteren Kryptendrittels offenbart sich für Chromosom 20 zwar eine etwas weniger periphere Positionierung, jedoch ist der daraus resultierende Verteilungsunterschied zu Chromosom 1 deutlich kleiner als der für die CTs 18 und 19 beobachtete. Diese Befunde sprechen ebenfalls eher für eine von der Gendichte abhängige Chromatinanordnung in den Zellkernen des Kolonepithels, als für eine größenabhängige Chromosomenpositionierung. Ein derartiges Muster schlägt sich in eher zentral lokalisierten, kleinen und stärker peripher orientierten, großen Chromosomen nieder und wurde in den sehr flachen Kernen menschlicher Fibroblasten und Fruchtwasserzellen beobachtet (Sun *et al.*, 2000; Cremer M. *et al.*, 2001; Bolzer *et al.*, 2005). Zwar weisen auch viele Kerne zyklischer, relativ undifferenzierter Zellen in den unteren Kryptenbereichen des Kolonepithels eine ovale, zum Teil recht lang gestreckte Form auf, jedoch sind mit einer durchschnittlichen minimalen Ausdehnung von $8.1\mu\text{m}$ (s. Tab. 3-4, S. 75) deutlich weniger flach als beispielsweise Fibroblasten mit $3-4\mu\text{m}$ (Cremer M. *et al.*, 2001).

Chromosom 11 zeigt in den überwiegend zyklischen und verhältnismäßig undifferenzierten Zellen des basalen Kryptendrittels eine im Vergleich zu den höchstwahrscheinlich terminal differenzierten Zellen des luminalen Kryptendrittels eine stärker interne radiale Positionierung. Die Verschiebung in die Kernperipherie könnte eine Folge der zellulären Differenzierung sein, die mit der Stilllegung von Genen einhergeht. Dies wiederum würde einen Einfluss der genreichen Chromosomenabschnitte auf die radiale Anordnung des CTs 11 in undifferenzierten Zellen voraussetzen. Aus dem vorhandenen Datenmaterial können indes keine diesbezüglichen Schlüsse gezogen werden. Dazu müssten zur Visualisierung des CTs zwei unterschiedlich markierte Sonden verwendet werden, die eine zweifelsfreie Abgrenzung genarmer Bereiche von genreichen Chromosomenabschnitten erlauben. Eine derartige Analyse sollte ein potentielles, von der Gendichte der einzelnen chromosomalen Abschnitte abhängiges Positionierungsverhalten aufdecken.

Die der Anordnung im luminalen Kryptendrittels des normalen Kolonepithels ähnelnde DNA-Verteilung von Chromosom 11 in dem untersuchten Kolonkarzinom ist etwas erstaunlich, da es sich bei den Karzinomzellen um zyklische Zellen handelt. Möglicherweise wies die Ursprungszelle des Karzinoms eine eher periphere Positionierung von CT 11 auf, was von den Karzinomzellen

aufrechterhalten wurde. Denkbar ist prinzipiell auch eine fehlende Bedeutung des Positionierungsverhaltens dieses Chromosoms für das Tumorstadium. Es ist jedoch anzumerken, dass ein einziges analysiertes Karzinom keine Rückschlüsse auf ein generelles Muster erlaubt.

Insgesamt bestätigen die Befunde der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen menschlichen Kolongewebes die an Zellkulturmaterial gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich einer Abhängigkeit der radialen Anordnung der CTs von der Gendichte. Sie zeigen ferner auch deren Gültigkeit für Epithelzellkerne auf. Überdies deutet die Aufrechterhaltung des Verteilungsmusters in dem untersuchten Karzinom auf eine Unverzichtbarkeit dessen hin, zumal die Zellkerne meist je drei Kopien der beiden Chromosomen 18 und 19 enthielten. Auch diesbezüglich lagen bisher lediglich Resultate von Tumorzelllinien vor (Cremer *M. et al.*, 2003).

4.4.2 Zentromerpositionierung und Chromozentrenzahl lassen keine Rückschlüsse auf differenzierungsbedingte Änderungen zu

Die Analyse normalen menschlichen Kolonepithels und Kolonkarzinomgewebes hinsichtlich einer Aggregationsdynamik von Zentromeren erbrachte für relativ undifferenzierte und für terminal differenzierte Epithelzellen sowie für Karzinomzellen sehr ähnliche Resultate (s. Tab. 3-6, S. 81). Die in Mausgeweben beobachtete Abnahme der Anzahl und Zunahme des Volumens der als Chromozentren bezeichneten Zentromertrauben im Verlauf der zellulären Differenzierung (Manuelidis, 1985, Martou & De Boni, 2000, Solovei *et al.*, 2004; Brero *et al.*, 2005) zeigen die drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelltypen nicht.

Die relative radiale DNA-Verteilung der Zentromere in normalem Kolonepithel (s. Abb. 3-16, S. 79) lässt im Prinzip die Annahme einer differenzierungsbedingten Dynamik zu. Die geringfügig stärker periphere Lokalisierung der Zentromere in KI-67 positiven und somit zyklierenden Zellen des mittleren Drittels tubulärer Kolonkrypten im Vergleich zum unteren, basalen Drittel könnte die Folge von Differenzierungsvorgängen sein, da die Zellen innerhalb des Kryptenepithels ein Spektrum mit einem von basal zu luminal wachsenden zellulären Reifegrad bilden. Auch die stark ausgeprägte periphere Zentromerpositionierung in MUC-2 positiven und daher terminal differenzierten Becherzellen spricht für diese Annahme. Allerdings ließe sich die beobachtete Dynamik im Prinzip auch durch eine Veränderung der Zellzyklisdauer infolge einer im Vergleich zum unteren Kryptendrittel geringeren Proliferationsaktivität der Zellen erklären. Die Dauer der G1-Phase ist offenbar relativ eng an die Teilungsrate von Zellen gekoppelt, da langsam wachsende Zellen in der Regel deutlich länger in dieser Zellzyklusphase verbleiben als solche, die sich häufig teilen.

Demnach könnten sich die beiden im Rahmen dieser Arbeit analysierten KI-67 positiven Stichproben in ihrer Zusammensetzung bezüglich der verschiedenen Zellzyklusphasen unterscheiden, da die einzelnen Phasen nicht voneinander abgegrenzt werden konnten. Teilen sich die Zellen im unteren Kryptendrittel schneller, sollte die Wahrscheinlichkeit der Erfassung von Zellen in der S- und G2-Phase dort höher sein als im mittleren Kryptenabschnitt. Demgegenüber sollte der Anteil an Zellen in der G1-Phase in der Stichprobe des mittleren Kryptendrittels größer sein als in der des unteren. Im Verlauf der späten S- und der G2-Phase kommt es in verschiedenen Zelltypen zu einer Zentromer-migration in Richtung des Kerninneren, während in der späten G1- und frühen S-Phase eine Bewegung der Zentromere in die Kernperipherie zu beobachten ist (Solovei *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist für stark proliferierende Zellen eine erhöhte Proteinsynthese anzunehmen. Diese könnte aufgrund der Herstellung der für die Translation benötigten Ribosomen mit einer vermehrten Bildung aktiver NORs (*nucleolus organising regions*) unter Beteiligung einer größeren Zahl rDNA tragender Chromosomen einhergehen, was die nukleoläre Assoziation der Zentromere dieser Chromosomen zur Folge hätte (Brero, 2004) und deren eher interne radiale Positionierung nach sich zieht.

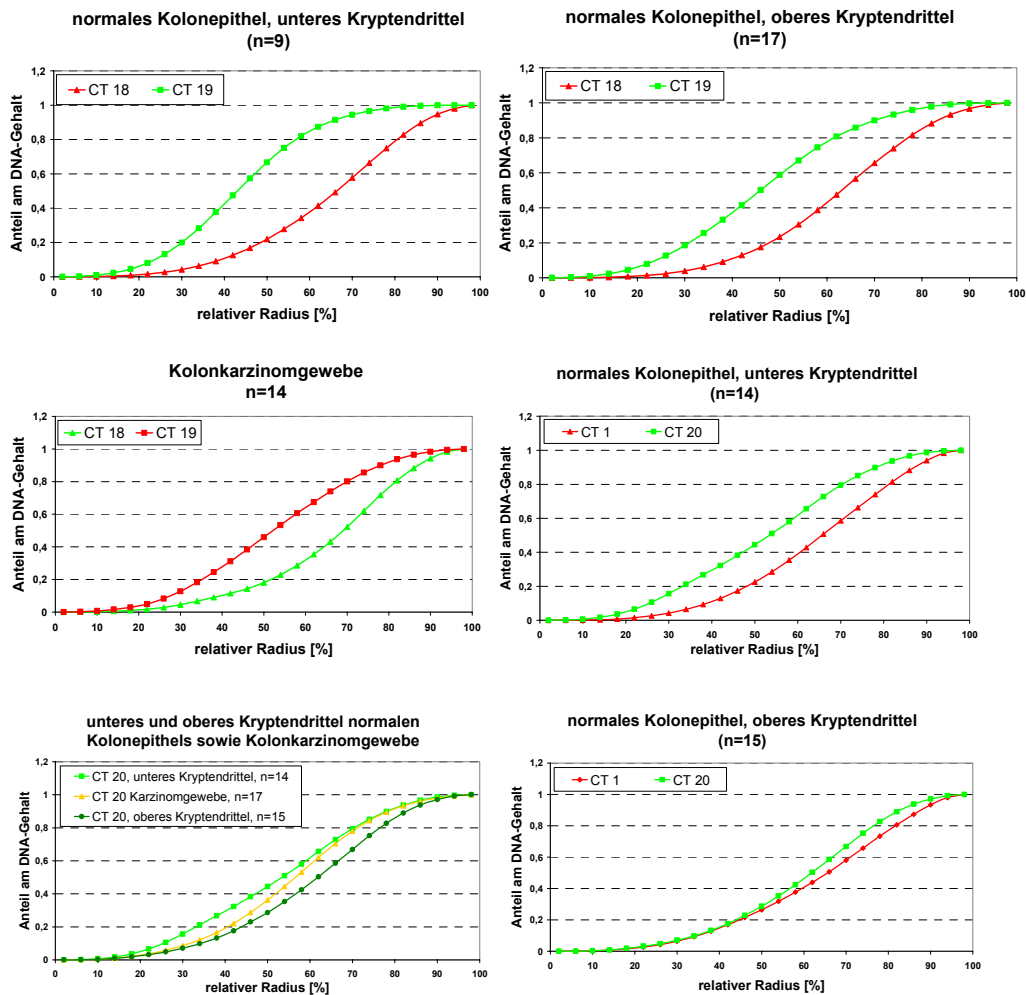
5. *Ausblick*

Analysen zur Zellkernarchitektur an formaldehydfixierten Paraffinschnitten sind nur schwer durchführbar und liefern aufgrund der zahlreichen Möglichkeiten für die Entstehung von Artefakten während der gesamten experimentellen Prozedur selbst im Erfolgsfall keine zweifelsfrei zuverlässigen Ergebnisse. Die Gründe hierfür sind nicht zuletzt auch bei der Formaldehydfixierung zu suchen, die zwar insgesamt eine gute Erhaltung der Morphologie gewährleistet, andererseits aber infolge der vernetzenden Eigenschaften dieses Fixativs die spätere Zugänglichkeit des Gewebes für Antikörper und andere Reagenzien sehr negativ beeinflussen kann. Auch für neuere molekulare Analyseverfahren, die auf intakter RNA oder DNA beruhen, ist die Fixierung mit Formaldehyd suboptimal (Gillespie *et al.*, 2002). In der Pathologie gibt es deshalb Bemühungen die Formaldehydfixierung durch ein Verfahren zu ersetzen, das eine bessere Erhaltung von DNA, RNA und Proteinen sowie eine dem Formaldehyd vergleichbare Bewahrung der Gewebemorphologie gewährleistet (Nadji *et al.*, 2005; Vincek *et al.*, 2005; Vincek *et al.*, 2003). Allerdings sind derartige Änderungen nicht ohne weiteres umsetzbar, da sie sich in die pathologische Routine integrieren lassen müssen, ohne das Wohlergehen des Patienten zu gefährden oder die Diagnose- und Prognosequalität zu mindern. Ferner handelt es sich bei der Pathologie um einen ungleich viel größeren und somit trägeren Apparat als beispielsweise ein Forschungslabor, das mit Tiermodellen arbeitet. Anders als in der klinischen Praxis, können dort alternative Methoden oder auch individuelle Präparationswünsche weitaus problemloser umgesetzt werden.

6. Anhang

Als Ergänzung seien an dieser Stelle die radialen DNA-Verteilungen aller in der vorliegenden Arbeit visualisierten Chromosomenterritorien sowie der Zentromere in Form kumulativer Häufigkeitskurven aufgeführt, sofern sie für die Annahme bzw. Ablehnung statistischer Signifikanz von Bedeutung sind.

Radiale DNA-Verteilung der CTs 1, 11, 18, 19 und 20 sowie von Zentromeren in Kernen des unteren und oberen Kryptendrittels normalen Kolonepithels sowie in Kolonkarzinomgewebe in Form kumulativer Häufigkeitskurven



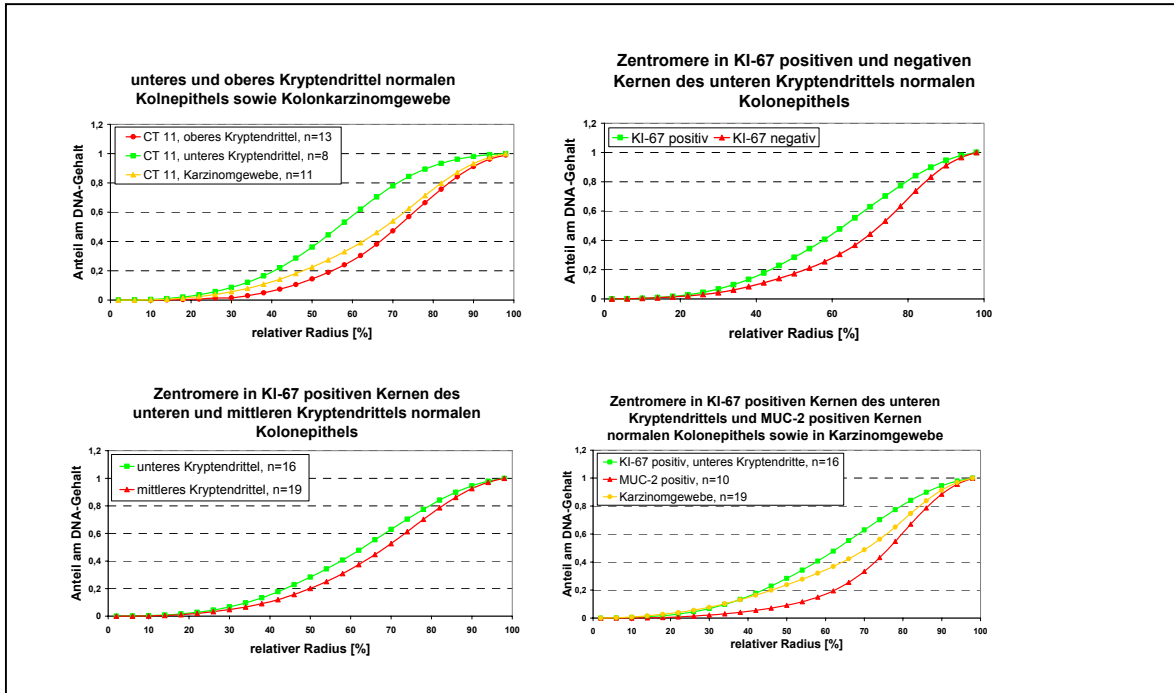


Abb. 6-1 Darstellung der relativen radialen DNA-Verteilung der Chromosomenterritorien 1, 11, 18, 19 und 20 sowie der Zentromere in normalem und neoplastischem Kolonepithel als kumulative Häufigkeitskurven.

Die hier gezeigten kumulativen Häufigkeitskurven der relativen radialen DNA-Verteilung in Kernen normalen und neoplastischen menschlichen Kolonepithels resultieren aus dem Addieren des relativen, nicht prozentualen DNA-Gehalts des jeweiligen CTs bzw. der Zentromere in einem bestimmten relativen Abstand zum Kernmittelpunkt zum DNA-Gehalt aller kleineren Abstände.

Literaturverzeichnis

- Abbe E.** (1873). Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch Mikrosk Anatomie* **9**: 413.
- Albiez H.** (2003). "Induzierte Chromatinkondensation". Diplomarbeit, Institut für Humangenetik, Department II Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Altmann G. G.** (1983). Morphological observations on mucus-secreting nongoblet cells in deep crypts of the rat ascending colon. *Am J Anat* **167**: 95-117.
- Altmann G. G.** (1990). Renewal of intestinal epithelium: New aspects as indicated by recent ultrastructural observations. *J Elec Mic Tech* **16**: 2-14.
- Aubele M., Zitzelsberger H., Szucs S., Werner M., Braselmann H., Hutzler P., Rodenacker K., Lehmann L., Minkus G., and Hofler H.** (1997). Comparative FISH analysis of numerical chromosome 7 abnormalities in 5-micron and 15-micron paraffin-embedded tissue sections from prostatic carcinoma. *Histochem Cell Biol* **107** (2): 121-6.
- Audie J. P., Janin A., Porchet N., Copin M. C., Gosselin B., and Aubert J. P.** (1993). Expression of human mucin genes in respiratory, digestive and reproductive tracts ascertained by in situ hybridisation. *J Histochem Cytochem* **41**: 1479-85.
- Bach S. P., Renehan A. G., and Potten C. S.** (2000). Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* **21** (3): 469-76.
- Baker J. R.** (1948). The cell-theory: a Restatement, History and Critique, Part 1. *Quart J Microsc Sci* **89**: 103-25.
- Bartman A. E., Sanderson S. J., Ewing S. L., Niehans G. A., Wiehr C. L., Evans M. K., and Ho S. B.** (1999). Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps. *Int J Cancer* **80** (2): 210-8.
- Becciolini A., Balzi M., Faraoni P., Tisti E., Zappoli Thyron G., Giache V., Bandettini L., and Potten C. S.** (1998). Colonic cell proliferation in normal mucosa of patients with colon cancer. *Acta Oncol* **37** (1): 65-71.
- Beisker W., Dolbeare F., and Gray J. W.** (1987). An improved immunocytochemical procedure for high-sensitivity detection of incorporated bromodeoxyuridine. *Cytometry* **8** (2): 235-9.
- Berod A., Hartman B. K., and Pujol J. F.** (1981). Importance of Fixation in Immunohistochemistry: Use of Formaldehyde Solutions at Variable pH for the Localization of Tyrosine Hydroxylase. *J Histochem Cytochem* **29** (7): 844-50.
- Blum F.** (1893). Der Formaldehyd als Härtungsmittel. *Z Wiss Mikrosk* **10**: 314-15.
- Blum F.** (1894). Notiz über die Anwendung des Formaldehyds (Formol) als Härtungs- und Konservierungsmittel. *Anat Anz* **9**: 229.
- Bolzer A., Kreth G., Solovei I., Koehler D., Saracoglu K., Fauth C., Müller S., Eils R., Cremer C., Speicher M. R., and Cremer T.** (2005). Three-

- Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes. *PLoS Biol* **3** (5): e157.
- Booth C., and Potten C. S.** (2000). Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* **105** (11): 1493-9.
- Boveri T.** (1904). "Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns," Jena.
- Boveri T.** (1909). Die Blastomerenkern von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch Exp Zellforschung* **3**: 181-268.
- Boveri T.** (1914). "Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren," Fischer, Jena.
- Boyle S., Gilchrist S., Bridger J. M., Mahy N. L., Ellis J. A., and Bickmore W. A.** (2001). The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet* **10** (3): 211-19.
- Brabletz T., Herrmann K., Jung A., Faller G., and Kirchner T.** (2000). Expression of nuclear beta-catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas. *Am J Pathol* **156** (3): 865-70.
- Brakenhoff G. J., van der Voort H. T., van Spronsen E. A., Linnemans W. A., and Nanninga N.** (1985). Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. *Nature* **317** (6039): 748-9.
- Brero A.** (2004). "Nuclear topology during cellular differentiation in mouse". Dissertation, Institut für Humangenetik, Department II Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Brero A., Easwaran H. P., Nowak D., Grunewald I., Cremer T., Leonhardt H., and Cardoso M. C.** (2005). Methyl CpG-binding proteins induce large-scale chromatin reorganization during terminal differentiation. *J Cell Biol* **169**: 733-743.
- Bristol J. B., and Williamson R. C. N.** (1984). Large bowel Growth. *Scand J Gastroenterol* **19** (suppl 93): 25-34.
- Brittan M., and Wright N. A.** (2004). The gastrointestinal stem cell. *Cell Prolif* **37**: 35-53.
- Brown R.** (1831). Observations on the organs and mode of fecundation in Orchideae and Asclepiadeae. *Transactions of the Linnean Society* **16** (3): 709-37.
- Bull J. H., and Harnden P.** (1999). Efficient nuclear FISH on paraffin-embedded tissue sections using microwave pretreatment. *Biotechniques* **26** (3): 416-8, 422.
- Carrato C., Balagué C., De Bolòs C., Gonzales E., Gambùs G., Planas J., Périni J. M., Andreu D., and Real F. X.** (1994). Differential apomucin expression in normal and neoplastic human epithelial tissues. *Gastroenterology* **107**: 160-72.
- Cattoretti G., Becker M. H. G., Key G., Duchrow M., Schluter C., Galle J., and Gerdes J.** (1992). Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* **168**: 357-363.

- Chang S. K., Dohrman A. F., Basbaum C. B., Ho S. B., Tsuda T., Toribara N. W., Gum J. R., and Kim Y. S.** (1994). Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer. *Gastroenterology* **107**: 28-36.
- Chapman A.** (1996). England's Leonardo: Robert Hooke (1635-1703) and the art of experiment in Restoration England. *Proceedings of the Royal Institution of Great Britain* **67**: 239 - 75.
- Clancy B., and Cauller L. J.** (1998). Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. *J Neurosci Methods* **83** (2): 97-102.
- Collins K. D., and Washabaugh M. W.** (1985). The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Q Rev Biophys* **18**: 323- 422.
- Coons A. H., Creech H. J., and Jones R. N.** (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* **47**: 200 - 2.
- Cremer C., and Cremer T.** (1978). Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field. *Microsc Acta* **81** (1): 31-44.
- Cremer M., Kupper K., Wagler B., Wizelman L., von Hase J., Weiland Y., Kreja L., Diebold J., Speicher M. R., and Cremer T.** (2003). Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* **162** (5): 809-20.
- Cremer M., v. Hase J., Volm T., Brero A., Kreth G., Walter J., Fischer C., Solovei I., Cremer C., and Cremer T.** (2001). Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res* **9**: 541-567.
- Cremer T.** (1985). "Von der Zellenlehre zur Chromosomentheorie," Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Tokyo.
- Cremer T., Baumann H., Nakanishi K., and Cremer C.** (1984). Correlation between interphase and metaphase chromosome arrangements as studied by laser-UVmicrobeam experiments. *Chrom Today* **8**: 203-12.
- Cremer T., Cremer C., Schneider T., Baumann H., Luedtke E. K., Sperling K., Teuber V., and Zorn C.** (1982). 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**: 46-56.
- Cremer T., Lichter P., Borden J., Ward D. C., and Manuelidis L.** (1988). Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome specific library probes. *Hum Genet* **80**: 235-46.
- Croft J. A., Bridger J. M., Boyle S., Perry P., Teague P., and Bickmore W. A.** (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* **145** (6): 1119-31.
- de Santa Barbara P., van den Brink G. R., and Roberts D. J.** (2003). Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* **60** (7): 1322-32.

- Devine P. L., McGuckin M. A., Birrell G. W., Whitehead R. H., Sachdev G. P., Shield P., and Ward B. G.** (1993). Monoclonal antibodies reacting with the MUC2 mucin core protein. *Br J Cancer* **67**: 1182-8.
- Diebold J., Dopfer K., Lai M., and Lohrs U.** (1994). Comparison of different monoclonal antibodies for the immunohistochemical assessment of cell proliferation in routine colorectal biopsy specimens. *Scand J Gastroenterol* **29**: 47-53.
- Dietzel S., Jauch A., Kienle D., Qu G. Q., HoltgreveGreze H., Eils R., Munkel C., Bittner M., Meltzer P. S., Trent J. M., and Cremer T.** (1998). Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei. *Chrom Res* **6**: 25-33.
- Dikovskaya D., Zumbunn J., Penman G. A., and Nathke I. S.** (2001). The adenomatous polyposis coli protein: in the limelight out at the edge. *Trends Cell Biol* **11** (9): 378-84.
- Duesberg P., Li R., Rasnick D., Rausch C., Willer A., Kraemer A., Yerganian G., and Heilmann R.** (2000). Aneuploidy Precedes and Segregates with Chemical Carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* **119**: 83-93.
- Dundas S. R., Boyle S., Bellamy C. O., Hawkins W., Garden O. J., Ross J. A., and Bickmore W.** (2001). Dual Y-chromosome painting and immunofluorescence staining of archival human liver transplant biopsies. *J Histochem Cytochem* **49** (10): 1321-2.
- Eastwood G. L.** (1977). Gastrointestinal epithelial renewal. *Gastroenterol* **72**: 962-75.
- Evers P., and Uylings H. B.** (1994). Microwave-stimulated antigen retrieval is pH and temperature dependent. *J Histochem Cytochem* **42** (12): 1555-63.
- Ezaki T.** (2000). Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: its potential drawbacks and optimization for double immunostaining. *Micron* **31** (6): 639-49.
- Feldman M. Y.** (1973). Reactions of Nucleic Acids and Nucleoproteins with Formaldehyde. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **13**: 1.
- Fenoglio C. M., Richart R. M., and Kaye G. I.** (1975). Comparative electron microscopic features of normal, hyperplastic and adenomatous human colonic epithelium II: Variations in surface architecture found by scanning electron microscopy. *Gastroenterol* **69**: 100-9.
- Flemming W.** (1882). "Zellsubstanz, Kern und Zellteilung," F. C. W. Vogel, Leipzig.
- Fodde R., Kuipers J., Rosenberg C., Smits R., Kielman M., Gaspar C., van Es J. H., Breukel C., Wiegant J., Giles R. H., and Clevers H.** (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* **3**: 433-438.
- Ford B. J.** (1992). From Dilettante to Diligent Experimenter, a Reappraisal of Leeuwenhoek as microscopist and investigator. *Biology History* **5** (3).
- Fox C. H., Johnson F. B., Whiting J., and Roller P. P.** (1985). Formaldehyde Fixation. *J Histochem Cytochem* **33** (8): 845-53.

- Fraenkel-Conrat H., Brandon B., and Olcott H. S.** (1947). The reaction of formaldehyde with proteins, IV: participation of indole groups: gramicidin. *J Biol Chem* **168**: 99-118.
- Fraenkel-Conrat H., and Olcott H. S.** (1948). Reaction of formaldehyde with proteins. VI Cross-linking of amino groups with phenole, imidazole or indole groups. *J Biol Chem* **174**: 827-43.
- French D., and Edsall J. T.** (1945). The reaction of formaldehyde with amino acids and proteins. *Adv Protein Chem* **2**: 277-335.
- Gambus G., Bolos C. D., Andreu D., Franci C., Egea G., and Real F. X.** (1993). Detection of the MUC2 apomucin tandem repeat with a mouse monoclonal antibody. *Gastroenterology* **104**: 93-102.
- Garfield S.** (2000). "Mauve: How One Man Invented a Color That Changed the World," Faber and Faber, London.
- Gerdes J., Becker M. H. G., Key G., and Cattoretti G.** (1992). Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67) in formalinixed and routinely processed tissues. *J Pathol* **168**: 85-87.
- Gillespie J. W., Best C. J. M., Bichsel V. E., Cole K. A., Greenhut S. F., Hewitt S. M., Ahram M., Gathright Y. B., Merino M. J., Strausberg R. L., Epstein J. I., Hamilton S. R., Gannot G., Baibakova G. V., Calvert V. S., Flaig M. J., Chuaqui R. F., Herring J. C., Pfeifer J., Petricoin E. F., Linehan W. M., Duray P. H., Bova G. S., and Emmert-Buck M. R.** (2002). Evaluation of Non-Formalin Tissue Fixation for Molecular Profiling Studies. *Am J Pathol* **160** (2): 449-57.
- Gordon G. I., and Hermiston M. L.** (1994). Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* **6**: 795-803.
- Grady W. M., and Markowitz S. D.** (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **3**: 101-28.
- Grimwood J., Gordon L. A., Olsen A., Terry A., Schmutz J., Lamerdin J., Hellsten U., Goodstein D., Couronne O., Tran-Gyamfi M., Aerts A., Altherr M., Ashworth L., Bajorek E., Black S., Branscomb E., Caenepeel S., Carrano A., Caoile C., Chan Y. M., Christensen M., Cleland C. A., Copeland A., Dalin E., Dehal P., Denys M., Detter J. C., Escobar J., Flowers D., Fotopulos D., Garcia C., Georgescu A. M., Glavina T., Gomez M., Gonzales E., Groza M., Hammon N., Hawkins T., Haydu L., Ho I., Huang W., Israni S., Jett J., Kadner K., Kimball H., Kobayashi A., Larionov V., Leem S. H., Lopez F., Lou Y., Lowry S., Malfatti S., Martinez D., McCready P., Medina C., Morgan J., Nelson K., Nolan M., Ovcharenko I., Pitluck S., Pollard M., Popkie A. P., Predki P., Quan G., Ramirez L., Rash S., Retterer J., Rodriguez A., Rogers S., Salamov A., Salazar A., She X., Smith D., Slezak T., Solovyev V., Thayer N., Tice H., Tsai M., Ustaszewska A., Vo N., Wagner M., Wheeler J., Wu K., Xie G., Yang J., Dubchak I., Furey T. S., DeJong P., Dickson M., Gordon D., Eichler E. E., Pennacchio L. A., Richardson P., Stubbs L., Rokhsar D. S., Myers R. M., Rubin E. M., and Lucas S. M.** (2004). The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature* **428** (6982): 529-35.
- Gustavson K. H.** (1956). Aldehyde Tanning. In "The chemistry of tanning processes", pp. 244-282, Academic Press, New York.

- Haaf T., and Schmid M.** (1991). Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. *Exp Cell Res* **192** (2): 325-332.
- Hansemann D. v.** (1890). Über asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchows Arch Pathol Anat* **119**: 299-326.
- He D., and Brinkley B. R.** (1996). Structure and dynamic organization of centromeres/prekinetochores in the nucleus of mammalian cells. *J Cell Biol* **109** (Pt11): 2693-2704.
- Heath J. P.** (1996). Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int* **20**: 139-46.
- Hofmeister F.** (1888). Zur Lehre von der Wirkung der Salze. II. *Arch Exp Pathol Pharmacol* **24**: 247-260.
- Hooke R.** (1665). "Micrographia, or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries thereupon," London.
- Imai T., Tokunaga A., Yoshida T., Hashimoto M., Mikoshiba K., Weinmaster G., Nakafuku M., and Okano H.** (2001). The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA. *Mol Cell Biol* **21**: 3888-900.
- Jen J., Powell S. M., Papadopoulos N., Smith K. J., Hamilton S. R., Vogelstein B., and Kinzler K. W.** (1994). Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* **54**: 5523-5526.
- Johnston P. G., O'Brien M. J., Dervan P. A., and Carney D. N.** (1989). Immunohistochemical Analysis of Cell Kinetic Parameters in Colonic Adenocarcinomas, Adenomas and Normal Mucosa. *Hum Pathol* **20** (7): 696-700.
- Jones D.** (1973). Reactions of aldehydes with unsaturated fatty acids during histological fixation. In "Fixation in Histochemistry" (P. J. Stoward, Ed.), Chapman and Hall, London.
- Kageyama R., Ohtsuka T., and Tomita K.** (2000). The bHLH gene Hes1 regulates differentiation of multiple cell types. *Mol Cells* **10**: 1-7.
- Kakita Y., Kashige N., Murata K., Kuroiwa A., Funatsu M., and Watanabe K.** (1995). Inactivation of Lactobacillus bacteriophage PL-1 by microwave irradiation. *Microbiol. Immunol* **39**: 571-6.
- Kallen R. G., Jencks, W. P.** (1966). Equilibria for the reactions of amines with formaldehyde and protons in aqueous solution. *J Biol Chem* **241**: 5864.
- Kaplan K. B., Burds A. A., Swedlow J. R., Bekir S. S., Sorger P. K., and Näthke I. S.** (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **3**: 429-432.
- Karam S. M.** (1995). New insights into the stem cells and the precursors of the gastric epithelium. *Nutrition* **11**: 607-13.
- Kaufmann H., and Hädener A.** (1996). "Grundlagen der organischen Chemie," Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.

- Kaye G. I., Fenoglio C. M., Pascal R. R., and Lane N.** (1973). Comparative electron microscopic features of normal, hyperplastic and adenomatous human colonic epithelium. Variations in cellular structure relative to the process of epithelial differentiation. *Gastroenterol* **64**: 926-45.
- Kelly R. B., Cozzarelli N. R., Deutscher M. P., Lehman I. R., and Kornberg A.** (1970). Enzymatic synthesis of Deoxyribonucleic Acid. *J. Biol Chem* **245** (1): 39-45.
- Kinder H., and Hilgemann W.** (1964). "dtv-Atlas zur Weltgeschichte," Deutscher Taschenbuch Verlag GmbH & Co. KG, München.
- Kinzler K. W., and Vogelstein B.** (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87** (2): 159-70.
- Köhler A.** (1893). Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke. *Z Wiss Mikrosk u Mikroskop Tech* **10**: 433-40.
- Leblond C. P.** (1981). Life history of renewing cells. *Am J Anat* **160**: 113-58.
- Lengauer C., Kinzler K. W., and Vogelstein B.** (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396** (6712): 643-9.
- Levine D. S., and Haggitt R. C.** (1989). Normal Histology of the Colon. *Am J Surg Pathol* **13** (11).
- Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L., and Ward D. C.** (1988). 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.
- Lieberkühn J. N.** (1745). "Dissertatio de fabrica et actione villorum intestinorum tenuium hominis," C. & G. J. Wishof, Lugduni Batavorum (Leiden).
- Lipkin M.** (1987). Proliferation and differentiation of normal and diseased gastrointestinal cells. In "Physiology of the gastrointestinal tract" (L. R. Johnson, Ed.), pp. 255-84, Raven, New York.
- Lukasova E., Kozubek S., Falk M., Kozubek M., Zaloudik J., Vagunda V., and Pavlovsky Z.** (2004). Topography of genetic loci in the nuclei of cells of colorectal carcinoma and adjacent tissue of colonic epithelium. *Chromosoma* **112** (5): 221-30.
- Malpighi M.** (1690). "De structura glandularum conglobatarum consimiliumque partium epistolae," London, 1689; Leyden, 1690.
- Manuelidis L.** (1985). Indications of centromere movement during interphase and differentiation. *Ann N Y Acad Sci* **450**: 205-221.
- Martou G., and De Boni U.** (2000). Nuclear topology of murine, cerebellar Purkinje neurons: changes as a function of development. *Exp Cell Res* **256** (1): 131-9.
- Medawar P. B.** (1941). The rate of penetration of fixatives. *J R Microsc Soc* **61**: 46.
- Metz B., Kersten G. F. A., Hoogerhout P., Brugghe H. F., Timmermans H. A. M., de Jong A., Meiring H., ten Hove J., Hennink W. E., Crommelin D. J. A., and Jiskoot W.** (2004). Identification of Formaldehyde-induced Modifications in Proteins. *J Biol Chem* **279** (8): 6235-43.

- Minsky M.** (1988). Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning* **10**: 128-38.
- Mongelard F., Vourc'h C., Robert-Nicoud M., and Usson Y.** (1999). Quantitative assessment of the alteration of chromatin during the course of FISH procedures. Fluorescent in situ hybridization. *Cytometry* **36** (2): 96-101.
- Morson B. C.** (1974). The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med* **67**: 451-4.
- Moss S. F., Liu T. C., Petrotos A., Hsu T. M., Gold L. I., and Holt P. R.** (1996). Inward growth of colonic adenomatous polyps. *Gastroenterology* **111** (6): 1425-32.
- Nadji M., Nassiri M., Vincek V., Kanhoush R., and Morales A. R.** (2005). Immunohistochemistry of Tissue Prepared by a Molecular-Friendly Fixation and Processing System. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **13**: 277-82.
- Narayan S., and Roy D.** (2003). Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer* **2** (1): 41.
- Nishimura S., Wakabayashi N., Toyoda K., Kashima K., and Mitsufuji S.** (2003). Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci* **48** (8): 1523-9.
- Nolte M., Werner M., Wasieleski R. v., Nietgen G., Wilkens L., and Georgii A.** (1996). Detection of numerical karyotype changes in the giant cells of Hodgkin's lymphomas by a combination of FISH and immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* **105**: 401-4.
- Nusbaum C., Zody M. C., Borowsky M. L., Kamal M., Kodira C. D., Taylor T. D., Whittaker C. A., Chang J. L., Cuomo C. A., Dewar K., FitzGerald M. G., Yang X., Abouelleil A., Allen N. R., Anderson S., Bloom T., Bugalter B., Butler J., Cook A., DeCaprio D., Engels R., Garber M., Gnirke A., Hafez N., Hall J. L., Hosage Norman C., Itoh T., Jaffe D. B., Kuroki Y., Lehoczky J., Lui A., Macdonald P., Mauceli E., Mikkelsen T. S., Naylor J. W., Nicol R., Nguyen C., Noguchi H., O'Leary S. B., Pqani B., Smith C. L., Talamas J. A., Topham K., Totoki Y., Toyoda A., Wain H. M., Young S. K., Zeng Q., Zimmer A. R., Fujiyama A., Hattori M., Birren B. W., Sakaki Y., and Lander E. S.** (2005). DNA sequence and analysis of human chromosome 18. *Nature* **437**: 551-5.
- Parada L. A., McQueen P. G., and Misteli T.** (2004). Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol* **5** (7): R44.
- Peifer M.** (2002). Developmental biology: colon construction. *Nature* **420** (6913): 274-5.
- Peifer M., and Polakis P.** (2000). Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* **287** (5458): 1606-9.
- Pigny P., Guyonnet-Duperat V., Hill A. S., Pratt W. S., Galiegue-Zouitina S., d'Hooge M. C., Laine A., Van-Seuningen I., Degand P., Gum J. R., Kim Y. S., Swallow D. M., Aubert J. P., and Porchet N.** (1996). Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics* **38** (3): 340-52.

- Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Segraves R., Lucas J., and Gray J. W.** (1988). Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **85**: 9138 - 9142.
- Potten C. S.** (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353** (1370): 821-30.
- Potten C. S., Kellett M., Roberts S. A., Rew D. A., and Wilson G. D.** (1992). Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut* **33**: 71-8.
- Potten C. S., and Loeffler M.** (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**: 1001-20.
- Puchtler H., and Meloan S. N.** (1985). On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* **82**: 201-4.
- Rabl C.** (1885). Ueber Zelltheilung. *Morphologisches Jahrbuch* **10**: 214-330.
- Rigby P. W., Dieckmann M., Rhodes C., and Berg P.** (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* **113** (1): 237-51.
- Sancho E., Batlle E., and Clevers H.** (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* **15** (6): 763-70.
- Sancho E., Batlle E., and Clevers H.** (2004). Signaling Pathways In Intestinal Development And Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 695-723.
- Sato M., and Ahnen D. J.** (1992). Regional variability of colonocyte growth and differentiation in the rat. *Anat Rec* **233**: 409-14.
- Schleiden M. J.** (1838). Beiträge zur Phytogenesis. *A Anat Physiol Wiss Med* **5**: 137-77.
- Schnell S. A., Staines W. A., and Wessendorf M. W.** (1999). Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem* **47** (6): 719-30.
- Schulz J.** (2000). Begründung und Entwicklung der Genetik nach der Entdeckung der Mendelschen Gesetze. In "Geschichte der Biologie" (I. Jahn, Ed.), Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Shamsuddin A. M., Phelps P. C., and Trump B. F.** (1982). Human large intestinal epithelium: light microscopy, histochemistry and ultrastructure. *Hum Pathol* **13**: 790-803.
- Shi S. R., Cote R. J., and Taylor C. R.** (1997). Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem* **45** (3): 327-43.
- Shi S. R., Cote R. J., and Taylor C. R.** (2001). Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem* **49** (8): 931-7.
- Shi S. R., Key M. E., and Kalra K. L.** (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical

- staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* **39** (6): 741-8.
- Skipper M., and Lewis J.** (2000). Getting to the guts of enteroendocrine differentiation. *Nat Genet* **24**: 3-4.
- Solovei I., Cavallo A., Schermelleh L., Jaunin F., Scasselati C., Cmarko D., Cremer C., Fakan S., and Cremer T.** (2002). Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH). *Exp Cell Res* **276** (1): 10-23.
- Solovei I., Grandi N., Knoth R., Volk B., and Cremer T.** (2004a). Positional changes of pericentromeric heterochromatin and nucleoli in postmitotic Purkinje cells during murine cerebellum development. *Cytogenet and Genome Res* **105**.
- Solovei I., Schermelleh L., During K., Engelhardt A., Stein S., Cremer C., and Cremer T.** (2004b). Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. *Chromosoma* **112** (8): 410-23.
- Sompuram S. R., Vani K., Messana E., and Bogen S. A.** (2004). A Molecular Mechanism of Formalin Fixation and Antigen Retrieval. *Am J Clin Pathol* **121**: 190-9.
- Srinivasan M., Sedmak D., and Jewell S.** (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* **161** (6): 1961-71.
- Sun H. B., Shen J., and Yokota H.** (2000). Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys. J.* **79** (1): 184-90.
- Suurmeijer A. J. H., and Boon M. E.** (1999). Pretreatment in a High-pressure Microwave Processor for MIB-1 Immunostaining of Cytological Smears and Paraffin Tissue Sections to Visualize the Various Phases of the Mitotic Cycle. *J Histochem Cytochem* **47** (8): 1015-20.
- Tan S. Y., and Yeow M. E.** (2003). Medicine in Stamps. Andreas Vesalius (1514-1564): Father of Modern Anatomy. *Singapore Med J* **44** (5): 229-230.
- Tanabe H., Muller S., Neusser M., von Hase J., Calcagno E., Cremer M., Solovei I., Cremer C., and Cremer T.** (2002). Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (7): 4424-9.
- Telenius H., Carter N. P., Bebb C. E., Nordenskjold M., Ponder B. A., and Tunnacliffe A.** (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* **13** (3): 718-25.
- Tytgat K. M. A. J., Buller H. A., Opdam F. J. M., Kim Y. S., Einerhand A. W. C., and Dekker J.** (1994). Biosynthesis of colonic mucin: MUC2 is the predominant secretory mucin. *Gastroenterology* **107**: 1352-63.
- van de Wetering M., Sancho E., Verweij C., de Lau W., Oving I., Hurlstone A., van der Horn K., Batlle E., Coudreuse D., Haramis A. P., Tjon-Pon-Fong M., Moerer P., van den Born M., Soete G., Pals S., Eilers M., Medema R., and Clevers H.** (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111** (2): 241-50.

- van Den Brink G. R., de Santa Barbara P., and Roberts D. J.** (2001). Development. Epithelial cell differentiation--a Mather of choice. *Science* **294** (5549): 2115-6.
- van Klinken B. J., Dekker J., van Gool S. A., van Marle J., Buller H. A., and Einerhand A. W.** (1998). MUC5B is the prominent mucin in human gallbladder and is also expressed in a subset of colonic goblet cells. *Am J Physiol* **274** (5 Pt 1): G871-8.
- Verheijen R., Kuijpers H. J., van Driel R., Beck J. L., van Dierendonck J. H., Brakenhoff G. J., and Ramaekers F. C.** (1989). Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* **92** (4): 531-40.
- Vincek V., Nassiri M., Block N., Welsh C. F., Nadji M., and Morales A. R.** (2005). Methodology for Preservation of High Molecular-Weight RNA in Paraffin-Embedded Tissue. *Diagn Mol Pathol* **14** (3): 127-33.
- Vincek V., Nassiri M., Nadji M., and Morales A. R.** (2003). A Tissue Fixativ that Protects Macromolecules (DNA, RNA and Protein) and Histomorphology in Clinical Samples. *Lab Invest* **83** (10): 1427-35.
- Virchow R.** (1858). "Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre," Berlin.
- Visser A. E., and Aten J. A.** (1999). Chromosomes as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei. *J Cell Sci* **112** (Pt 19): 3353-60.
- von Hase J.-P.** (2002). "Digitale Bildanalyse der radialen Verteilung von spezifischen Subregionen im Zellkern". Dissertation, Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
- Wells W. A.** (2004). Man the nanoscopes. *J Cell Biol* **164** (3): 337-40.
- Werner M., Chott A., Fabiano A., and Battifora H.** (2000). Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* **24** (7): 1016-9.
- Werner M., Wilkens L., Aubele M., Nolte M., Zitzelsberger H., and Komminoth P.** (1997). Interphase cytogenetics in pathology: principles, methods, and applications of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Histochem Cell Biol* **108**: 381-90.
- Willingham M. C.** (1983). An alternative fixation-processing method for preembedding ultrastructural immunocytochemistry of cytoplasmic antigens: the GBS (glutaraldehyde-borohydride-saponin) procedure. *J Histochem Cytochem* **31** (6): 791-8.
- Wunderlich V.** (2002). Chromosomes and cancer: Theodor Boveri's predictions 100 years later. *J Mol Med* **80**: 545-8.
- Wynnchuk M.** (1993). Minimizing Artifacts in Tissue Processing: The Theory of Tissue Processing. *J Histotechnol* **16**: 71.
- Yamada K., Yoshitaka K., Sato M., and Ahnen D.** (1992). Proliferating cell nuclear antigen in normal, preneoplastic and neoplastic colonic epithelium of the rat. *Gastroenterol* **103**: 160-7.

- Yang Q., Bermingham N. A., Finegold M. J., and Zoghbi H. Y.** (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* **294**: 2155-58.
- Zernike F.** (1935). Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung. *Z techn Physik* **16**: 454-57.
- Zorn C., Cremer C., Cremer T., and Zimmer J.** (1979). DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. *Exp Cell Res* **124** (1): 111-9.
- Zorn C., Cremer T., Cremer C., and Zimmer J.** (1976). Laser UV microirradiation of interphase nuclei and post-treatment with caffeine. A new approach to establish the arrangement of interphase chromosomes. *Hum Genet* **35**: 83-9.

Danke!

Zunächst möchte ich mich bei *Prof. Dr. Thomas Cremer* für die Vergabe des interessanten Themas, für die freundliche Aufnahme in sein Institut und die wohlwollende Unterstützung bedanken.

Ich danke *Prof. Dr. Heinrich Leonhardt* für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Für die Einarbeitung in das Thema, ihren betreuerischen Einsatz und die tatkräftige Unterstützung danke ich *Dr. Marion Cremer*.

Ich danke *Prof. Dr. Joachim Diebold* für die Bereitstellung der Gewebeschnitte, die Einführung in die Histologie des Kolonepithels und das Feedback sowie die freundlichen Worte in der Schlussphase der Arbeit.

Dr. Steffen Dietzel danke ich für die großartige Hilfe in allen möglichen Computerangelegenheiten.

Ein herzliches Dankeschön geht an *Daniela Köhler, Katrin Küpper und Claudia Weierich* für die Unterstützung, den Spaß und überhaupt das freundliche Klima im „Doktorandenstüberl“; *Claudia* danke ich außerdem fürs Korrekturlesen. *Dr. Christian Lanctot* danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und das Feedback. Bei *Heiner Albiez, Carolin Bleese, Dorothee Biener, Dr. Sandro Brero, Tina Friederich, Norma Grandi, Florian Grasser, Claudia Hepperger, Roy, Hessing, Heidi Jahn-Henninger, Nandy Klier-Choroba, Suleyman Kösem, Robert Mayer, Dr. Stefan Müller, Saban Musoski, Dr. Michaela Neusser, Simone Otten, Dr. Irina Solovej, Dr. Lothar Schermelleh, Verena Schwarz, Kathrin Teller, Dr. Joachim Walter, Gabriele Weisser, Roman Zinner, Ming Zhao* und *Kourosh Zolghadr* bedanke ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt gleichermaßen *Petra Kopp* und *Ingrid Peller* sowie *Klaus Düring* für den jederzeitigen freundschaftlichen Beistand, grenzenlose Geduld und, wann immer möglich, fachlichen Rat.

Nicht zuletzt danke ich sehr herzlich meiner Familie und insbesondere meinen Eltern für die Unterstützung während meines gesamten Studiums und für die Freiheit, meine Interessen verfolgen zu können.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

Babett Wagler

Publikationen

Cremer M., Kupper K., Wagler B., Wizelman L., von Hase J., Weiland Y., Kreja L., Diebold J., Speicher M. R., and Cremer T. (2003). Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* 162 (5):809-20

Cremer M., Zinner R., Stein S., Albiez H., Wagler B., Cremer C. and Cremer T (2004). Three dimensional analysis of histone methylation patterns in normal and tumor cell nuclei. *Eur J Histochem* 48(1):15-28

Babett Wagler, Joachim Diebold, Thomas Cremer. Evaluation of entire Nuclei in Tissue Sections facilitated by interactive 3D Segmentation of confocal Images. *Annual Meeting of the German Society of Cell Biology, March 2004*