

**Kernpositionierung und funktionelle Regulation
von Genen der humanen CFTR-Region
auf Chromosom 7**

Dissertation

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

vorgelegt von
Andreas Englmann
aus München
Oktober 2005

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Andreas Englmann

München, Oktober 2005

Kernpositionierung und funktionelle Regulation von Genen der humanen CFTR-Region auf Chromosom 7

Dissertation an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)

vorgelegt von

Dipl. Biol. Andreas Englmann
aus München

Dissertation eingereicht am: 17. 10. 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 12. 2005

Erstgutachter: PD Dr. Daniele Zink

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei
(1564 – 1642, italienischer Physiker und Astronom)

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	8
1.1. Zellkern-Architektur und Chromosomen-Organisation	8
1.2. Genpositionierung und transkriptionelle Aktivität	14
1.3. DNA-Replikation und transkriptionelle Aktivität	17
1.4. Die Zellkernlamina und Laminopathien	20
1.5. Zielsetzung	24
MATERIAL UND METHODEN	25
2.1. Materialien	25
2.1.1. Chemikalien, Lösungen und Kulturmedien	25
2.1.2. Enzyme	26
2.1.3. Antikörper und Konjugate	27
2.1.4. Nukleotide, Nukleinsäuren und Vektoren	28
2.1.5. Marker, Farbstoffe und Auftragspuffer	29
2.1.6. Kits	30
2.1.7. Lösungen und Puffer	30
2.1.8. Mikroskope und Geräte	33
2.1.9. Glas- und Plastikwaren, Hilfsmittel	34
2.1.10. Software	35
2.1.11. Zelllinien und primäre Zellen	36
2.1.11.1. SH-EP N14	36
2.1.11.2. HEK-293	36
2.1.11.3. HeLa S6	37
2.1.11.4. Calu-3	37
2.1.11.5. HT-1080	38
2.1.11.6. K-562	38
2.1.11.7. Lymphozyten	39
2.1.11.8. Primäre Fibroblasten	39
2.1.11.9. Primäre Fibroblasten MA-2	40
2.1.11.10. Primäre Nasenepithel-Zellen	40
2.2. Methoden	41
2.2.1. Zellkultur	41
2.2.1.1. Propagation von adherenten Säugerzellen	41
2.2.1.2. Einfrieren und Auftauen von adherenten Säugerzellen	41
2.2.1.3. Aussähen von Zellen auf Deckgläsern	42
2.2.1.4. Synchronisation	42
2.2.1.5. Applikation von DRB und TSA	43
2.2.2. Replikations-Pulsmarkierung	43
2.2.2.1. Replikations-Pulsmarkierung mit BrdU	44
2.2.2.2. Replikations-Pulsmarkierung mit fluoreszierenden Nukleotiden (SRL)	44
2.2.3. Zell-Fixierung unter Erhalt der dreidimensionalen Struktur	45
2.2.4. Immunfärbung	46
2.2.5. Zell-Fixierung nach hypotoner Behandlung mit Methanol/Eisessig	48
2.2.6. Vorbereitung von Formaldehyd-fixierten Präparaten für die FISH	49
2.2.7. Vorbereitung von Methanol/Eisessig-fixierten Präparaten für die FISH	51
2.2.8. Vorbereitung von DNA Sonden für die FISH	52
2.2.8.1. DOP- und Alu-PCR	52
2.2.8.2. PCR-Amplifikation humaner perizentrischer α -Satelliten-Repeats	54

2.2.8.3.	Nicktranslation	55
2.2.8.4.	Kontrolle der markierten DNA-Sonden	56
2.2.8.5.	Fällung des Hybridisierungsansatzes	58
2.2.9.	Durchführung der FISH	59
2.2.10.	Nachweis der FISH	60
2.2.11.	Isolierung intakter PAC-DNA	62
2.2.11.1.	PAC Präparation	62
2.2.11.2.	Präparation des BAC 305 (β -Globin Lokus)	64
2.2.12.	Long-Range-PCR	65
2.2.13.	Western Blot	69
2.2.14.	RNA Interferenz	70
2.2.15.	RNA-Präparation und RT-PCR	70
2.2.16.	Mikroskopie	71
2.2.16.1.	Aufnahmen am Epifluoreszenzmikroskop	71
2.2.16.2.	Aufnahmen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop	71
2.2.17.	Bildbearbeitung und 3D-Rekonstruktion	72
2.2.17.1.	Visuelle Inspektion mit der Zeiss LSM Meta Software	72
2.2.17.2.	3D-Rekonstruktion und 3D-Erosionsanalyse	72
2.2.17.3.	2D-Erosionsanalyse	73
2.2.17.4.	Abstandsmessungen und Kollokalisationsanalyse	74
3.	ERGEBNISSE	76
3.1.	Die Lokalisation von GASZ, CFTR und CORTBP2 im Zellkern	76
3.1.1.	Spezifität und Qualität der verwendeten genspezifischen DNA-Sonden	76
3.1.2.	2D-Erosionsanalyse zur Positionsbestimmung von GASZ, CFTR und CORTBP2	79
3.1.3.	3D-Erosionsanalyse zur Positionsbestimmung von GASZ, CFTR und CORTBP2	83
3.1.4.	Lokalisation im perinukleären Heterochromatin	87
3.1.4.1.	Besonderheiten bei HEK-293 Zellen	89
3.1.4.2.	Besonderheiten bei Calu-3 Zellen	90
3.1.5.	Vergleiche mit der Kernlokalisierung des β -Globin-Lokus	91
3.1.6.	Simultane Detektion und räumliche Orientierung der Gene der CFTR-Region	93
3.1.7.	Abstandsmessungen zwischen GASZ, CFTR und CORTBP2	97
3.1.7.1.	Messung der Zellkern- und CT 7 -Flächen	100
3.1.8.	Die Lokalisation von CFTR nach Behandlung mit den Inhibitoren DRB und TSA	101
3.2.	Untersuchungen zum Replikationszeitpunkt von GASZ, CFTR und CORTBP2	104
3.2.1.	Replikationsmarkierung und Klassifizierung der S-Phase Stadien	105
3.2.2.	Bestimmung der Replikationszeitpunkte von GASZ, CFTR und CORTBP2	106
3.2.3.	Kohäsionstest	108
3.2.4.	Bestimmung des Replikationszeitpunktes von CFTR nach TSA-Behandlung	109
3.3.	Der Einfluss der Zellkernlamina auf die Kernlokalisierung von CFTR	110
3.3.1.	Knockdown von Lamin A/C, Emerin und Lap2 β durch RNA-Interferenz	111
3.3.2.	Der Einfluss des Knockdowns von Lamina-Bestandteilen auf die Lokalisation von CFTR	113
3.3.2.1.	2D- und 3D-Erosionsanalyse	114
3.3.2.2.	Abstandsmessungen zwischen der Kernperipherie und dem CFTR-Lokus	116
3.4.	Untersuchungen von HGPS-Zellen	117
3.4.1.	Untersuchungen zur Morphologie von HGPS-Zellen	118
3.4.2.	Die Lokalisation von CFTR in HGPS-Zellen	121
3.4.2.1.	3D-Erosionsanalyse zur Positionierung von CFTR in Fibroblasten	121
3.4.2.2.	Abstandsmessungen zwischen der Zellkernlamina und dem CFTR-Lokus	122
3.4.2.3.	Die Lokalisation von CFTR in dem hyperazetylierten Euchromatin	123

4. DISKUSSION	125
4.1. Kernlokalisierung, Genaktivität und Replikationsverhalten	125
4.1.1. Die flexible Organisation der CFTR-Region	125
4.1.2. Das Replikationsverhalten von GASZ, CFTR und CORTBP2	129
4.1.3. Integration der Daten in ein Modell	132
4.2. Die Interaktion zwischen der Zellkernlamina und dem CFTR-Lokus	135
4.2.1. Die gezielte Manipulation von Komponenten der Zellkernlamina	135
4.2.2. Rückschlüsse aus der Untersuchung von HGPS-Zellen	136
5. ZUSAMMENFASSUNG	139
6. LITERATURVERZEICHNIS	141
7. ANHANG	157
7.1. Expressionsdaten von GASZ, CFTR und CORTBP2	157
7.2. Abkürzungsverzeichnis	158
Lebenslauf	160
Publikationen	161

1. Einleitung

Die Wiederentdeckung von Mendels Gesetzen der Vererbung zu Beginn des 20sten Jahrhunderts hat das Interesse an der Natur der genetischen Information geweckt und die Biologie in den letzten 100 Jahren grundlegend geprägt (Correns, 1900; Tschermak, 1900; Vries, 1900). In den 40er Jahren wurde durch die Erkenntnis, dass die Erbsubstanz aus einer Desoxyribonukleinsäure besteht, der Beginn der modernen Genetik eingeleitet (Avery *et al.*, 1944). Schon im nächsten Jahrzehnt sollte die Struktur der DNA-Doppelhelix aufgeklärt werden und sich der elegante Mechanismus der Speicherung und Weitergabe genetischer Informationen offenbaren (Brenner, 1961; Meselson and Stahl, 1958; Watson and Crick, 1953). Die Sequenzierung viraler und mitochondrialer Genome hat in den 80er Jahren den Grundstein für das ehrgeizige Human-Genom Projekt gelegt, das 50 Jahre nach der Aufklärung der DNA-Doppelhelix schließlich die erfolgreiche Entschlüsselung des humanen Genoms verzeichnen konnte (Anderson *et al.*, 1981; Lander *et al.*, 2001; Sanger *et al.*, 1977; Sanger *et al.*, 1978; Sanger *et al.*, 1982; Venter *et al.*, 2001). Trotz dieser beachtlichen Fortschritte hat sich gezeigt, dass die hoch koordinierte Genregulation im Zellkern, die unter anderem bei der zellulären Differenzierung die spezifische Aktivierung und Repression von tausenden von Genen steuert, rein auf der Ebene der linearen DNA-Sequenz schwierig zu erklären ist. Erst seit wenigen Jahren beginnt man die übergeordneten, epigenetischen Mechanismen zu verstehen, welche die funktionalen Eigenschaften eines Genoms maßgeblich bestimmen. Sowohl die chromosomale Position, Kernlokalisierung und Chromatinstruktur von Genloci, als auch ihr Replikationsverhalten weisen komplexe Zusammenhänge mit der transkriptionellen Regulation auf. Die Untersuchung dieser Vorgänge ist unerlässlich für das Verständnis der Genregulation.

1.1. Zellkern-Architektur und Chromosomen-Organisation

Schon sehr früh begannen Zellbiologen sich mit der Frage zu beschäftigen, wie die lichtmikroskopisch sehr gut einzeln erkennbaren mitotischen Chromosomen in Interphase-Zellkernen organisiert sein könnten. Bereits gegen Ende des 19ten Jahrhunderts wurde durch Rabl und Boveri vorgeschlagen, dass Chromosomen im Interphase-Zellkern nicht miteinander vermischt vorliegen, sondern distinkte Chromosomen-Territorien (CTs) besetzen (Boveri, 1909; Rabl, 1885). Die frühen Studien von Rabl zur Chromosomenorganisation an Salamander-Zellkernen hatten gezeigt, dass Telomere und Zentromere in diesen Zellen an gegenüberliegenden Seiten des Zellkerns mit der Kernperipherie assoziiert sind.

Später sollte sich herausstellen, dass diese nach ihrem Entdecker benannte Rabl-Konfiguration vor allem in Pflanzen und auch in *Drosophila* eine Rolle spielt, nicht aber in Säugerzellen (Haaf and Schmid, 1991). Erst in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts gelangen deutliche Fortschritte bei der Untersuchung der Frage, ob Chromosomen im Zellkern als distinkte Territorien vorliegen, wie ursprünglich von Rabl und Boveri vorgeschlagen wurde. Durch UV-Mikroirradiation begrenzter Bereiche des Zellkerns kultivierter Hamsterzellen wurden die ersten deutlichen experimentellen Hinweise erbracht, dass Chromosomen in Interphasekernen tatsächlich als individuelle, voneinander getrennte Strukturen vorliegen (Cremer *et al.*, 1982). Auf der Grundlage der Entwicklung neuer Techniken der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) konnte dies bestätigt werden. So wurde mit Hilfe dieser Methodik gezeigt, dass Chromosomen im Zellkern diskrete Territorien einnehmen (Cremer *et al.*, 1988; Lichter *et al.*, 1988; Manuelidis, 1985; Schardin *et al.*, 1985). Andere Methoden erlaubten später die Visualisierung von CTs und definierten chromosomalen Regionen in lebenden Zellen (Belmont and Straight, 1998; Manders *et al.*, 1999; Zink *et al.*, 1998; Zink *et al.*, 2003).

Die Anordnung von Chromosomen im Interphase-Zellkern

Die räumliche Anordnung von CTs im dreidimensionalen Raum des Interphase-Zellkerns ist auf verschiedene Arten untersucht worden, wobei die Studien zum Teil zu unterschiedlichen Ergebnissen und Konzepten geführt haben. Ein Ansatz befasste sich mit der Untersuchung von Zellkernen während der Prometaphase. In diesem Zellzyklus-Stadium liegen die Chromosomen in Form einer Rosette vor (Bolzer *et al.*, 2005; Nagele *et al.*, 1998). Aus der Anordnung homologer Chromosomen in dieser Rosette wurden Rückschlüsse auf deren räumliche Beziehung im Interphase-Zellkern gezogen. Die Befunde waren jedoch zum Teil widersprüchlich. So wurde einerseits vorgeschlagen, dass homologe Chromosomen in einer hoch geordneten, antiparallelen Anordnung in der Rosette vorliegen und diese Anordnung die Chromosomenorganisation paternaler und maternaler Chromosomen im Zellkern, unabhängig vom Zelltyp und der Spezies, während des gesamten Zellzyklus beeinflusst (Nagele *et al.*, 1995). Andere Studien haben dagegen entweder eine Zelltyp-spezifische Topologie oder eine eher ungeordnete Organisation vorgeschlagen (Allison and Nestor, 1999; Chandley *et al.*, 1996). Ein anderer Ansatz befasste sich mit der radialen Position von Chromosomen im Interphase-Zellkern. Bickmore und Mitarbeiter konnten zeigen, dass in verschiedenen menschlichen Zelltypen ein Zusammenhang zwischen der radialen Positionierung von Chromosomen im Zellkern und der Gendichte besteht (Boyle *et al.*, 2001; Croft *et al.*, 1999).

Eine Untersuchung der etwa gleich großen Chromosomen 18 und 19 hat gezeigt, dass das genreiche Chromosom 19 bevorzugt im Kerninneren lokalisiert, das genarme Chromosom 18 dagegen peripherer positioniert war (Croft *et al.*, 1999). Die Untersuchung aller menschlicher Chromosomen hat diesen Zusammenhang zwischen der Gendichte und Kernpositionierung von Chromosomen bestätigt (Boyle *et al.*, 2001). In anderen Studien wurde dagegen beobachtet, dass die radiale Positionierung von Chromosomen mit der Chromosomen-Größe korrelierte (Cremer *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2000). Große Chromosomen lokalisierten hier bevorzugt an der Kernperipherie, kleinere Chromosomen weiter im Kerninneren. Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass die radiale Anordnung von Chromosomen nach ihrer Größe beziehungsweise Gendichte von der Form des Zellkerns abhängt und möglicherweise beide Mechanismen eine Rolle spielen (Bolzer *et al.*, 2005). So wurde beobachtet, dass in flachen, ellipsoiden Zellkernen bevorzugt eine radiale Positionierung entsprechend der Größe von Chromosomen erfolgte, in sphärischen Zellkernen dagegen die Kernlokalisierung mit der Gendichte von Chromosomen korrelierte.

Insgesamt zeigten diese Untersuchungen, dass Chromosomen im Interphase-Zellkern diskrete Territorien besetzen, die wahrscheinlich in vielen Zelltypen radial angeordnet sind. Diese Organisationsform ist vermutlich hoch konserviert und konnte durch die Untersuchung der Genome höherer Primaten über 30-40 Millionen Jahre zurückverfolgt werden (Tanabe *et al.*, 2002). Die spezifischen Interaktionen, welche die Position und Struktur von CTs beeinflussen, sind jedoch noch unklar. So wird sowohl der Zellkern-Matrix, als auch nukleoplasmatischen Laminen und der Zellkernlamina eine Funktion in der Positionierung von chromosomalen Regionen und CTs zugeordnet (Goldman *et al.*, 2002; Goldman *et al.*, 2004; Jackson, 2003; Sullivan *et al.*, 1999). In den letzten Jahren wurde außerdem gezeigt, dass Säugetiergenome im Zellkern eine definierte funktionelle Organisation aufweisen, die im engen Zusammenhang mit der Banden-Struktur mitotischer Chromosomen steht (Ferreira *et al.*, 1997; Sadoni *et al.*, 1999). Diese Zusammenhänge werden im Folgenden besprochen.

Die Bandenstruktur mitotischer Chromosomen und polare Chromosomen-Territorien

Durch differentielle Färbetechniken von mitotischen Chromosomen können spezifische Bandenmuster erzielt werden, die für jedes Chromosom charakteristisch sind. Die aus der G-Bänderung mit Giemsa und Trypsin resultierenden alternierenden dunklen G-Banden und hellen R-Banden wurden schon früh für die Identifizierung von Chromosomen eingesetzt. Vor einigen Jahren wurde gezeigt, dass sich G- und R-Banden in ihrem GC-Gehalt unterscheiden (Bickmore and Sumner, 1989; Craig and Bickmore, 1993). Dieser Befund konnte später durch

die Entschlüsselung des menschlichen Genoms bestätigt werden (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). So wurde gezeigt, dass sich im menschlichen Genom große Bereiche mit unterschiedlichem GC-Gehalt befinden, die als GC-Domänen bezeichnet wurden. Zytogenetische Untersuchungen der sequenzierten Klone haben gezeigt, dass GC-arme Bereiche (ca. 37 % GC-Gehalt) überwiegend mit G-Banden, GC-reiche Regionen (ca. 45 % GC-Gehalt) dagegen mit R-Banden korrelieren (Lander *et al.*, 2001). Daneben unterscheidet sich Chromatin unterschiedlicher chromosomaler Banden nicht nur in der DNA-Sequenz, sondern auch in den funktionellen Eigenschaften während der Interphase. So repliziert G-Banden-Chromatin vorwiegend später während der S-Phase als R-Banden-Chromatin. Ebenfalls spät replizieren auch die so genannten C-Banden, die hoch repetitive Satelliten-Sequenzen enthalten und konstitutivem Heterochromatin entsprechen (Camargo and Cervenka, 1982; Dutrillaux *et al.*, 1976; Kondra and Ray, 1978). Weiterhin wurde gezeigt, dass R-Banden eine höhere Gendichte und transkriptionelle Aktivität aufweisen als G-Banden und den größten Teil der Housekeeping-Gene beinhalten (Craig and Bickmore, 1994; Saccone *et al.*, 1996; Saccone *et al.*, 1993). Eine Subfraktion von R-Banden, die so genannten T-Banden, zeigt dabei den höchsten Gehalt an CpG-Inseln und dementsprechend die größte Gendichte (Craig and Bickmore, 1994; Saccone *et al.*, 1996; Lander *et al.*, 2001).

Untersuchungen zur Positionierung von chromosomalen Banden in menschlichen Interphase-Zellkernen haben gezeigt, dass die unterschiedlichen Banden mitotischer Chromosomen während der Interphase als distinkte und strukturell stabile Domänen vorliegen, die als subchromosomale Foci (SF) bezeichnet werden (Sadoni *et al.*, 2004; Sadoni and Zink, 2004; Zink *et al.*, 1999; Zink *et al.*, 1998). Weiterhin wurde gezeigt, dass sich die R- und G-/C-Banden im Interphasekern an unterschiedlichen „Polen“ der CTs konzentrieren und die CTs dementsprechend eine polare Substruktur aufweisen (Ferreira *et al.*, 1997; Sadoni *et al.*, 1999). Die polaren Territorien der einzelnen Chromosomen lagern sich im Zellkern in einer gleichen relativen Orientierung aneinander. Durch diese definierte räumliche Anordnung entstehen im Zellkern höher geordnete, interchromosomale Kompartimente mit spezifischen Eigenschaften (Sadoni *et al.*, 1999). Durch die Zusammenlagerung von R-/T-Banden entsteht im Kerninneren ein kohärentes Kompartiment, das transkriptionell aktiv ist und während der S-Phase überwiegend früh repliziert (Ferreira *et al.*, 1997; Sadoni *et al.*, 1999). Diese Chromatin-Fraktion wird oft als Euchromatin bezeichnet. Die sich vorwiegend an der Kernperipherie und an der Peripherie der Nukleoli zusammenlagernden G- und C-Banden bilden dagegen spät replizierende Kompartimente, die transkriptionell inaktiv sind (Ferreira *et al.*, 1997; Sadoni *et al.*, 1999). Diese spät replizierenden und transkriptionell inaktiven

Kompartimente werden oft auch als perinukleäres beziehungsweise perinukleoläres Heterochromatin bezeichnet.

Euchromatin, Heterochromatin und Histonmodifikationen

Wie oben beschrieben, befinden sich im Interphase-Zellkern verschiedene Chromatin-Fractionen, die oft vereinfacht in Euchromatin und Heterochromatin differenziert werden. Ursprünglich wurden die Begriffe Euchromatin und Heterochromatin durch die Beobachtung geprägt, dass sich bestimmte Bereiche im Interphase-Zellkern unterschiedlich stark anfärben lassen (Heitz, 1928). Seither haben verschiedene Studien nahe gelegt, dass diese Chromatin-Fractionen einen unterschiedlichen Grad an Kondensation aufweisen, wobei Euchromatin allgemein eine „offene“, dekondensierte Chromatinstruktur zugeschrieben wird, Heterochromatin dagegen eine stärker kondensierte Struktur besitzen soll (Dillon and Festenstein, 2002; Felsenfeld and Groudine, 2003; Vermaak *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass der Grad an Kondensation einen Einfluss auf die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren ausübt und somit die Aktivierung beziehungsweise Repression von Genen mitbestimmt (Horn and Peterson, 2002). Ein klassisches Beispiel, das diese Annahme unterstützt, ist die Ausbildung von dekondensierten „Puffs“ an transkriptionell aktiven Bereichen von polytären Chromosomen in *Drosophila melanogaster* (Anderson and Nüsslein-Volhard, 1984). Auch bei der Untersuchung von Säugerzellen wurde beobachtet, dass sowohl transgene, als auch endogene Sequenzen im transkriptionell aktiven Zustand eine weniger kondensierte Struktur aufweisen (Chambeyron and Bickmore, 2004; Chambeyron *et al.*, 2005; Nye *et al.*, 2002; Schübeler *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2001). Eine Genom-weite Untersuchung hat gezeigt, dass in menschlichen Zellkernen allgemein genreiche Domänen bevorzugt in einer „offenen“, weniger kondensierten Form vorliegen (Gilbert *et al.*, 2004).

Neuere Studien legen die Vermutung nahe, dass ein Netzwerk aus kovalenten Modifikationen von Histonen und der DNA und die Assoziation mit Nicht-Histon Proteinen einen wesentlichen Einfluss auf die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Chromatin ausüben. Es wird angenommen, dass diese epigenetischen Mechanismen letztlich auch die transkriptionelle Aktivität von DNA-Sequenzen mitbestimmen (Arney and Fisher, 2004; Fischle *et al.*, 2003; Jenuwein and Allis, 2001). Der N-Terminus von Histonen kann verschiedene posttranslationale Modifikationen, unter anderem Azetylierung, Methylierung und Phosphorylierung erfahren (Cheung *et al.*, 2000a; Cheung *et al.*, 2000b; Lachner *et al.*, 2003; Roth *et al.*, 2001; Stallcup, 2001). Ein populäres Modell, das diese epigenetischen

Mechanismen unter dem Begriff „Histon-Kode“ zusammenfasst, postuliert, dass die Kombination verschiedener Histonmodifikationen durch spezifische Proteine erkannt wird und die Assoziation mit diesen Faktoren weitere Prozesse auslöst, welche die Eigenschaften von Chromatin beeinflussen. Auf diese Weise soll der „Histon-Kode“ das Informations-Potential der DNA-Sequenz maßgeblich erweitern (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Histonmodifikationen und die beteiligten Enzyme und assoziierten Proteine aufgeklärt, von denen im Folgenden einige wichtige Beispiele genannt werden:

Der Methylierung von Lysin-Resten des Histons H3 wird eine zentrale Rolle in dem Netzwerk epigenetischer Modifikationen zugesprochen und wird -abhängig von der Position-sowohl mit transkriptioneller Aktivität, als auch Repression in Verbindung gebracht (Lachner *et al.*, 2003). In transkriptionell aktiven, euchromatischen Bereichen wird der N-Terminus von Histon H3 häufig am Lysin 4 methyliert (H3MeK4; (Santos-Rosa *et al.*, 2002). Diese Modifikation wird in menschlichen Zellen durch die Histon-Methyltransferase (HMT) SET7 katalysiert und scheint in verschiedenen Organismen ein Marker für Euchromatin zu sein (Briggs *et al.*, 2001; Strahl *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001a; Wang *et al.*, 2001b). Die Methylierung von Histon H3 an Lysin 9 (H3MeK9) durch Orthologe der HMT Su(var)3-9 findet sich dagegen häufig in transkriptionell inaktiven Bereichen und schafft eine Bindungsstelle für Heterochromatin Proteine, wie etwa HP1 (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2001; Rea *et al.*, 2000). HP1 erkennt diese Methylierung spezifisch durch ein Chromodomänen-Motiv und trägt durch die darauf folgende Dimerisierung möglicherweise zu der stabilen Aufrechterhaltung von Heterochromatin bei (Hall *et al.*, 2002a; Hall *et al.*, 2002b; Nakayama *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Su(var)3-9 HMTs und HP1 Proteine auch an der Repression von euchromatischen DNA-Sequenzen beteiligt sind (Nielsen *et al.*, 2001).

Ein seit längerem gut bekannter epigenetischer Marker für transkriptionell aktives Euchromatin ist die Hyperazetylierung der Histone H3 und H4, die unter anderem an Lysin 9 des Histons H3 (H3AcK9) und Lysin 8 des Histons H4 (H4AcK8) erfolgt (Struhl, 1998). Verschiedene transkriptionelle Koaktivatoren, unter anderem p300, PCAF und SAGA, besitzen Histon-Azetyltransferase (HAT) Aktivität und tragen hierdurch vermutlich zu der transkriptionellen Aktivität bei (Grant *et al.*, 1999a; Grant *et al.*, 1999b; Grant *et al.*, 1998; Schiltz *et al.*, 1999). Die Lysin-Azetylierung ist im Gegensatz zu der Lysin-Methylierung keine dauerhafte Modifikation, sondern wird durch Histon-Deazetylasen (HDAC) wieder entfernt. Es wird angenommen, dass in der Zelle ein Gleichgewicht zwischen der Aktivität

von HATs und HDACs besteht, das den Azetylierungsgrad der Histone beeinflusst (Im *et al.*, 2002; Katan-Khaykovich and Struhl, 2002). Ein interessanter Ansatz besteht darin, dieses Gleichgewicht durch Inhibitoren von HDACs zu verändern. Trichostatin A (TSA) hat sich dazu seit längerem bewährt (Furumai *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 1990a; Yoshida *et al.*, 1990b; Yoshida *et al.*, 2003). In verschiedenen Systemen konnte nach der Verwendung von TSA beobachtet werden, dass hierdurch die Histon-Azetylierung vor allem an der Zellkern-Peripherie zunimmt und im Gegenzug bestimmte heterochromatische Marker, wie unter anderem H3MeK9 und HP1, dort reduziert werden (Gilchrist *et al.*, 2004; Krouwels *et al.*, 2005; Maison *et al.*, 2002). Ebenso wurden verschiedene Auswirkungen von TSA auf die Genexpression und Replikation beobachtet (Bickmore and Carothers, 1995; Zhang *et al.*, 2002a). Nicht zuletzt ist die Methylierung von Cytosin (5MeC) durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) ein wichtiger epigenetischer Mechanismus auf der Ebene der DNA-Sequenz, welcher die vererbare Inaktivierung von Genen kennzeichnet (Leonhardt and Cardoso, 2000).

Insgesamt zeigen diese Befunde, dass epigenetische Modifikationen und die Chromatinstruktur einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation der Genexpression ausüben. In verschiedenen Systemen konnte beobachtet werden, dass die Nähe zu heterochromatischen Bereichen mit der Repression von Genen korreliert. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die „Positions-Effekt-Variegation“ (PEV) in *Drosophila melanogaster* (Csink and Henikoff, 1996). Doch auch in menschlichen und in Mäuse-Zellen konnte gezeigt werden, dass inaktive Zelltyp-spezifische Gene spezifisch mit Heterochromatin assoziieren (Brown *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 1997; Schübeler *et al.*, 2000). Auf die funktionelle Bedeutung der Genpositionierung, insbesondere der Assoziation mit Heterochromatin für die Regulation der Genexpression, wird im nächsten Kapitel ausführlicher eingegangen.

1.2. Genpositionierung und transkriptionelle Aktivität

Verschiedene Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Positionierung von Genen - sowohl in Bezug auf verschiedene Chromatin-Fraktionen, als auch im Kontext einer höher geordneten Chromatinorganisation - und der transkriptionellen Aktivität besteht. Im Folgenden werden einige Vorstellungen und Befunde zu diesen Prozessen dargelegt.

Das CT/IC-Modell

Ein populäres Modell, das die Organisation von Komponenten im Zellkern beschreibt und insbesondere einen Zusammenhang zwischen Genpositionierung und Expressionsverhalten postuliert, ist das von Thomas Cremer, Christoph Cremer und Peter Lichter entwickelte Interchromosomen-Domänen-Modell (ICD-Modell) (Cremer *et al.*, 1993; Cremer, 1995; Kurz *et al.*, 1996; Zirbel *et al.*, 1993), das kürzlich zum Chromosomen-Territorien / Interchromatin-Kompartiment Modell (CT/IC-Modell) (Cremer and Cremer, 2001) weiterentwickelt wurde.

Ausgehend von der experimentellen Beobachtung, dass Chromosomen im Zellkern als distinkte Territorien vorliegen (siehe erstes Kapitel dieser Einleitung), wurde in dem ICD-Modell postuliert, dass Chromosomen während der Interphase als voneinander getrennte, relativ kompakte Objekte vorliegen, zwischen denen sich ein Raum erstrecken sollte, der als Interchromosomen-Domäne (ICD-Raum) bezeichnet wurde (Cremer *et al.*, 1993; Zirbel *et al.*, 1993; Cremer *et al.*, 1995). Dieser Raum wurde als ein dreidimensionales Kanalsystem definiert, das an den Kernporen beginnt und sich zwischen den Oberflächen der CTs erstreckt. Es wurde postuliert, dass sich in dem ICD-Raum makromolekulare Komplexe befinden, die unter anderem an der DNA-Replikation, der Transkription und dem Spleißen beteiligt sind. Weiterhin wurde vorgeschlagen, dass die CTs für diese makromolekularen Komplexe impermeabel sind und bestimmte Prozesse, wie etwa die Expression von Genen, daher nur an der Oberfläche von CTs stattfinden können. Anfängliche Untersuchungen zur Lokalisation von Genen, RNA-Transkripten und Spleißing-Komponenten haben diese Hypothese zunächst gestützt (Zirbel *et al.*, 1993; Kurz *et al.*, 1996). Spätere Studien haben jedoch gezeigt, dass die Transkription auch im Inneren von CTs stattfinden kann (Abranches *et al.*, 1998; Cmarko *et al.*, 1999; Verschure *et al.*, 1999). Außerdem wurde gezeigt, dass die Mobilität von Proteinen im Zellkern nicht auf einen durch das ICD-Modell erklärbaren begrenzten Raum eingeschränkt ist (Misteli, 2001; Phair and Misteli, 2000).

In einer erweiterten Fassung des ICD-Modells wurde postuliert, dass sich der Interchromatinraum wie ein Netzwerk in die CTs hinein erstreckt und ein Interchromatin-Kompartiment (IC) bildet (Cremer and Cremer, 2001; Razin and Gromova, 1995; Verschure *et al.*, 1999; Visser *et al.*, 2000). Das aus dem ICD Modell weiterentwickelte CT/IC-Modell schlägt vor, dass das IC innerhalb von CTs ausgedehnte Lakunen bildet und in kleinsten Verzweigungen von wenigen Nanometern Durchmesser endet. Diese sollen innerhalb der CTs an Chromatindomänen mit einem DNA-Gehalt von ca. 1 Mbp grenzen, die wiederum aus Chromatinschlaufen mit einer Länge von ca. 100 kbp bestehen (Cremer und Cremer, 2001). Die Existenz stabiler 1Mbp-Domänen wurde zuerst durch eine Untersuchung von Sparvoli

und Mitarbeitern (Sparvoli *et al.*, 1994) auf lichtmikroskopischer Ebene nach Replikations-Pulsmarkierung nahe gelegt und später bewiesen (Jackson and Pombo, 1998; Ma *et al.*, 1998; Sadoni *et al.*, 2004). Weiterhin wurde im CT/IC-Modell postuliert, dass größere Proteinkomplexe nicht in das Innere der Chromatindomänen eindringen können und sich aktive Gene daher an der Oberfläche des weit verzweigten IC befinden (Cremer und Cremer, 2001). Neuere Ergebnisse legen allerdings nahe, dass RNA-Transkripte nicht bevorzugt im Chromatin-freien Raum vorliegen (Sadoni and Zink, 2004) und dass Chromatindomänen, selbst heterochromatische Bereiche, einen dynamischen Austausch von Proteinen erlauben und für relativ große Moleküle zugänglich sind (Cheutin *et al.*, 2003; Verschure *et al.*, 2003).

Die Kernlokalisierung von Genen und ihre Assoziation mit funktionellen Domänen

Verschiedene Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass weniger die Lokalisation innerhalb oder außerhalb von CTs, sondern vielmehr die räumliche Positionierung von DNA-Sequenzen im Zellkern und die Assoziation mit definierten funktionellen Domänen und Chromatin-Fractionen von Bedeutung für die Regulation der transkriptionellen Aktivität sind (Kosak and Groudine, 2004; Misteli, 2004; Misteli, 2005). Dabei hat sich herausgestellt, dass sowohl die Positionierung an der Zellkernperipherie, als auch die Assoziation mit Heterochromatin häufig mit der Inaktivierung von Genen korreliert. Die Rolle der Kernperipherie als repressives Zellkern-Kompartiment wurde schon früh in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt (Andrulis *et al.*, 1998; Cockell and Gasser, 1999; Palladino *et al.*, 1993). In menschlichen Zellen wurde gezeigt, dass transkriptionell inaktive Immunglobulin-Gene bevorzugt an der Kernperipherie lokalisieren, aktive Loci dagegen im Kerninneren positioniert sind (Kosak *et al.*, 2002).

Auch wenn die von Kosak *et al.* (2002) untersuchten Immunglobulin-Gene nicht mit zentromerischem Heterochromatin assoziiert waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Genloci mit anderen Formen des Heterochromatins interagierten. Häufig wurde beobachtet, dass besonders Zelltyp-spezifische Gene, abhängig von dem Zelltyp und der transkriptionellen Aktivität, mit euchromatischen beziehungsweise heterochromatischen Bereichen assoziieren. So wurde gezeigt, dass der β -Globin Locus im inaktiven Zustand mit perizentrischem Heterochromatin assoziiert ist (Brown *et al.*, 2001; Ragoczy *et al.*, 2003; Schübeler *et al.*, 2000). Auch für andere Zelltyp-spezifisch regulierte Gene, wie etwa T-Zell spezifische Gene, Immunglobulin-Gene oder das Brown-Allel bw^D in *Drosophila* wurde gezeigt, dass diese im inaktiven Zustand mit Heterochromatin assoziieren (Brown *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 1997; Cobb *et al.*, 2000; Csink and Henikoff, 1996; Skok *et al.*, 2001).

Insgesamt haben diese Daten die Vorstellung geprägt, dass die Positionierung von Genen in transkriptionell permissiven beziehungsweise repressiven Bereichen die transkriptionelle Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung wesentlich beeinflusst (Ragoczy *et al.*, 2003). Die oben angeführten Beispiele zeigen, dass vor allem die Assoziation mit Heterochromatin typisch ist für Gene, deren Inaktivierung von entscheidender Bedeutung für die zelluläre Differenzierung ist (Kosak und Groudine, 2004). Bei der Untersuchung von größeren subchromosomalen Regionen konnte noch ein anderes Phänomen beobachtet werden. So wurde gezeigt, dass bestimmte genreiche und transkriptionell aktive subchromosomale Regionen mit einer Größe im Bereich von mehreren Mbp im menschlichen Genom ausgedehnte Schleifen bilden, die zum Teil mehrere μm aus den entsprechenden CTs herausragen (Mahy *et al.*, 2002a; Volpi *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2002).

Es wird angenommen, dass auch diese Vorgänge dazu dienen, genreiche Regionen in ein transkriptionell permissives Umfeld zu positionieren (Kosak und Groudine, 2004; Misteli, 2005). Insgesamt zeigen diese Daten, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Genpositionierung und der transkriptionellen Aktivität besteht. Unklar ist jedoch, auf welcher Ebene die funktionelle Organisation von chromosomalen Loci im Zellkern reguliert wird. Studien zur radialen Organisation von ganzen Chromosomen (Croft *et al.*, 1999; Boyle *et al.*, 2001) beziehungsweise größeren subchromosomalen Regionen in der Größenordnung von mehreren hundert kbp bis hin zu einigen Mbp (Mahy *et al.*, 2002a; Mahy *et al.*, 2002b; Volpi *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2002) legen die Vermutung nahe, dass die Positionierung auf der Ebene der regionalen Gendichte und generellen transkriptionellen Aktivität größerer chromosomaler Bereiche reguliert wird. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass individuelle Gene unabhängig voneinander lokalisieren und die Position und Struktur größerer chromosomaler Bereiche die Summe der Positionen der einzelnen Genloci reflektiert.

1.3. DNA-Replikation und transkriptionelle Aktivität

Die Replikation des Genoms während der S-Phase des Zellzyklus ist ein komplexer und streng regulierter Vorgang, der sicherstellt, dass der gesamte Chromosomensatz vor der Mitose vollständig und korrekt dupliziert wurde. Während der molekulare Vorgang der Duplikation des DNA-Stranges schon seit einiger Zeit bekannt ist und in die meisten biologischen Lehrbücher Einzug gehalten hat (Alberts, 2002; Lewin, 2003), hat sich die Bedeutung der Replikation für die Regulation der transkriptionellen Aktivität erst seit

wenigen Jahren offenbart und ist immer noch ein wichtiger Aspekt wissenschaftlicher Diskussionen (Gilbert, 2002). Im Folgenden wird daher, neben einer kurzen Beschreibung der räumlichen und zeitlichen Organisation der Replikation in Säugerzellkernen, vor allem auf den Zusammenhang zwischen dem Replikationsverhalten und der transkriptionellen Aktivität von Genloci beziehungsweise chromosomalen Regionen eingegangen.

Replikationsfoci und Replikationsmuster

Die kleinste, lichtmikroskopisch sichtbare Einheit der DNA-Replikation im eukaryontischen Zellkern ist der so genannte Replikationsfokus (RF), mit einem Durchmesser von ca. 300-1000 nm und einem DNA-Gehalt von etwa 1 Mbp (Berezney *et al.*, 2000). Die RF bestehen aus mehreren aktiven Replicons und den für die DNA-Replikation benötigten Proteinen (Leonhardt *et al.*, 2000b). Aktive RF können in lebenden Zellen durch genetische Fusion von PCNA (einem zentralen Bestandteil von Replikationskomplexen) mit dem „green fluorescent protein“ (GFP, aus der Qualle *Aequorea victoria*) beziehungsweise dessen Derivaten dargestellt werden (Leonhardt *et al.*, 2000a; Sporbert *et al.*, 2002; Wyman and Botchan, 1995). Ein anderer Ansatz besteht darin, RF durch Replikations-Pulsmarkierung naszenter DNA zu detektieren. Durch Zugabe von halogenierten Basenanaloga zu kultivierten Zellen in der S-Phase konnte auf diese Weise erstmals die Existenz von RF in fixierten Zellen nachgewiesen werden (Gratzner, 1982; Nakamura *et al.*, 1986; Nakayasu and Berezney, 1989). Um naszente DNA und RF in lebenden Zellen nachzuweisen, bietet sich dagegen die Replikations-Pulsmarkierung (RPM) mit fluoreszierenden Nukleotiden an (Manders *et al.*, 1999; Zink *et al.*, 1998). Beide Markierungsverfahren führen zu charakteristischen räumlich-zeitlichen Replikationsmustern, die als Marker für die Bestimmung des S-Phase Stadiums eingesetzt werden können (O'Keefe *et al.*, 1992).

Es konnte gezeigt werden, dass die während der S-Phase durch RPM markierte DNA in folgenden Zellzyklen in RF-ähnlichen Strukturen organisiert ist, was die Vermutung nahe legte, dass die während der S-Phase in den RF organisierte DNA stabile Aggregate bildet (Berezney *et al.*, 1995; Jackson and Pombo, 1998; Sparvoli *et al.*, 1994; Zink *et al.*, 1998). Diese Vorstellung hat auch das CT/IC-Modell geprägt (Cremer und Cremer, 2001; Cremer *et al.*, 2004). Kürzlich wurde gezeigt, dass in der Tat die gesamte DNA im Zellkern in stabile Aggregate, so genannte subchromosomale Foci (SF) organisiert ist, die den RF äquivalent sind (Jackson and Pombo, 1998; Ma *et al.*, 1998; Sadoni *et al.*, 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass SF im Zellkern während der G1-Phase stabil positioniert werden (Dimitrova and Gilbert, 1999; Sadoni *et al.*, 2004; Sadoni *et al.*, 1999) und benachbarte SF während der

zeitlichen Progression durch die S-Phase sequentiell aktiviert werden und replizieren (Sadoni *et al.*, 2004; Sporbert *et al.*, 2002). Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass die Kernpositionierung von SF und deren DNA-Sequenzen den charakteristischen räumlich-zeitlichen Verlauf der DNA-Replikation im Säugerzellkern determinieren (Sadoni *et al.*, 2004). Insgesamt legen die in diesem und den vorhergehenden Kapiteln dargestellten Befunde die Vermutung nahe, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Kernlokalisierung, dem Replikationsverhalten und der transkriptionellen Aktivität von Genen beziehungsweise subchromosomalen Regionen besteht, auf den im Folgenden näher eingegangen wird.

Replikationsverhalten und transkriptionelle Aktivität

Schon früh wurde beobachtet, dass konstitutiv exprimierte „Housekeeping-Gene“ in höheren Eukaryonten vorwiegend während der ersten Hälfte der S-Phase replizieren. Gewebsspezifische Gene replizieren dagegen in nicht exprimierenden Zellen häufig später als in einem transkriptionell aktiven Zustand (Goldman *et al.*, 1984; Hatton *et al.*, 1988). Eine Studie des Replikationsverhaltens der humanen CFTR-Region auf Chromosom 7 hat gezeigt, dass ein größerer Bereich um den CFTR-Lokus zu einem frühen Zeitpunkt repliziert, wenn CFTR transkriptionell aktiv ist. In nicht exprimierenden Zelllinien replizierte die Region dagegen später (Selig *et al.*, 1992). Auch in *Drosophila melanogaster* konnte bei einer Genom-weiten Untersuchung eine entsprechende Korrelation zwischen der transkriptionellen Aktivität und dem Replikationsverhalten gezeigt werden (Schübeler *et al.*, 2002). In anderen Arbeiten wurde außerdem ein Zusammenhang zwischen dem Replikationsverhalten von genomischen Bereichen und dem Muster der Histonmodifikationen, der Chromatinstruktur und der Position im Zellkern aufgezeigt (Belyaev *et al.*, 1996; Cimbora *et al.*, 2000; Dimitrova and Gilbert, 1999; Ermakova *et al.*, 1999; Heun *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Sadoni *et al.*, 1999; Schübeler *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002). Die Untersuchung des β -Globin Lokus hat viel zu dem Verständnis der komplexen Interaktionen zwischen Histonmodifikationen, Chromatinstruktur, Replikationsverhalten und Genexpression beigetragen:

In nicht erythroiden Zellen ist der transkriptionell inaktive β -Globin Lokus eng mit perizentrischem Heterochromatin (PCH) assoziiert, nicht aber in Erythroblasten die β -Globin exprimieren (Brown *et al.*, 2001). Detaillierte Untersuchungen des β -Globin Lokus haben gezeigt, dass die Dissoziation des Lokus von PCH mit einer generellen Hyperazetylierung des Genlokus, einer Chromatin-Dekondensation und einem frühen Replikationszeitpunkt korrelieren. (Schübeler *et al.*, 2000; Cimbora *et al.*, 2000). Vermutlich sind *cis*-regulatorische Elemente, wie etwa die Lokus-Kontroll-Region (LCR) an der Regulation des

Replikationsverhaltens und der Chromatinstruktur des β -Globin Locus beteiligt (Simon *et al.*, 2001). Dennoch beeinträchtigen manche Deletionen der β -Globin LCR lediglich die transkriptionelle Aktivität, nicht jedoch das Replikationsverhalten und die Chromatinstruktur der Region (Cimbora *et al.*, 2000; Schübeler *et al.*, 2000; Schübeler *et al.*, 2001). Auch für monoallelisch exprimierte Gene, wie unter anderem „imprinted“ Gene, Gene für olfaktorische Rezeptoren, Immunglobulin- und T-Zell Rezeptor-Gene und das weibliche X-Chromosom konnte ein Zusammenhang zwischen dem Aktivitätsstatus und dem Replikationsverhalten gezeigt werden. Auch in diesen Fällen repliziert das exprimierte Allel generell früher als das reprimierte Allel (Avner and Heard, 2001; Boumil and Lee, 2001; Mostoslavsky *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 1999). All diese Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass das Replikationsverhalten eine wichtige Bedeutung für die epigenetische Regulation der Genexpression hat. Gleichzeitig scheinen jedoch auch Histonmodifikationen und der Chromatin-Kondensationsgrad eine Rolle für die Genregulation zu spielen.

Auch wenn die oben angeführten Arbeiten viel zu dem Verständnis dieser komplexen Interaktionen beigetragen haben, sind die beteiligten Prozesse dennoch nicht vollständig verstanden (Gilbert, 2002; Goren and Cedar, 2003; Wolffe, 1994). So wurde einerseits spekuliert, dass eine durch die DNA-Synthese dekondensierte Chromatinstruktur die Zugänglichkeit für transkriptionelle Aktivatoren erleichtert (Gilbert, 1986; Gilbert, 2002; Rountree *et al.*, 2000). Andererseits könnte jedoch auch die Regulation der Genexpression das Replikationsverhalten beeinflussen (Gilbert, 2001; Gilbert, 2002). Möglicherweise spielen beide Mechanismen eine Rolle und koordinieren die transkriptionelle Aktivität einer chromosomalen Region. Wie Genaktivität, Replikationsverhalten, DNA-Positionierung und Histonmodifikationen miteinander wechselwirken, wurde auch in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse und möglichen Zusammenhänge werden in der Diskussion ausgeführt.

1.4. Die Zellkernlamina und Laminopathien

Wie in den vorhergehenden Kapiteln schon angesprochen, kommt der Zellkernperipherie und wahrscheinlich auch der hier befindlichen Zellkernlamina eine wichtige Rolle bei der Positionierung und Regulation von Genen zu. Da auch dies Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, wird im Folgenden noch auf die Zellkernlamina eingegangen. Die Zellkernlamina ist ein komplexes, dreidimensionales Netzwerk aus Laminen und Lamina-assoziierten Proteinen das in eukaryontischen Zellen der inneren Kernmembran anliegt. Dieses zelluläre

Kompartiment hat in den letzten Jahren sehr viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da Bestandteile der Lamina, neben mechanischen und strukturellen Funktionen, vermutlich auch verschiedene Aufgaben in der Genregulation, DNA-Synthese und Transkription erfüllen. (Goldman *et al.*, 2002; Gruenbaum *et al.*, 2005; Zastrow *et al.*, 2004).

Die Zellkernlamina, Lamine und LEM-Domänen Proteine

Hauptbestandteil der Zellkernlamina sind Lamine, die zu den Typ-V Intermediär-Filamenten gehören und eine Form der evolutionär ursprünglichsten Intermediär-Filamente darstellen (Aebi *et al.*, 1986; Stuurman *et al.*, 1998). Säugerzellen besitzen drei Lamin Gene (LMNA, LMNB1 und LMNB2) von denen sieben verschiedene Isoformen der A-Typ Lamine (A, C, C2 und AΔ10) und B-Typ Lamine (B1-B3) exprimiert werden (Biamonti *et al.*, 1992; Fisher *et al.*, 1986; Furukawa and Hotta, 1993; Furukawa *et al.*, 1994; Machiels *et al.*, 1996; McKeon, 1987; Pollard *et al.*, 1990; Stuurman *et al.*, 1996). Die verschiedenen Isoformen sind strukturell eng verwandt, jedoch biochemisch und funktionell differenzierbar. Während alle Vertebratenzellen zumindest ein B-Typ Lamin exprimieren, werden A-Typ Lamine Zelltyp-spezifisch exprimiert und kommen vor allem in differenzierten Geweben vor (Harborth *et al.*, 2001; Rober *et al.*, 1989; Zastrow *et al.*, 2004).

Im Unterschied zu zytoplasmatischen Intermediär-Filamenten enthalten Lamine eine Kernlokalisierungssequenz und (bis auf Lamin C und C2) ein C-terminales CAAX-Motif, das eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen erfährt (unter anderem eine Farnesylierung), welche für die Bindung an die innere Kernmembran von Bedeutung sind (Hofemeister *et al.*, 2000; Holtz *et al.*, 1989; Kitten and Nigg, 1991; Stuurman *et al.*, 1998). Das „reife“ Lamin A entsteht schließlich aus dem farnesylierten pre-Lamin A durch eine proteolytische Abspaltung des Farnesyl-Restes und von weiteren 14 C-terminalen Aminosäuren (647-661) durch die Protease Zmpste24 (Pendas *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 1989). Lamine besitzen zahlreiche Bindungsstellen für Bestandteile der Kernhülle (unter anderem Emerin, Lap2 α und Lap2 β), für strukturelle Interaktionspartner (Aktin und Nesprin 1 α), sowie für DNA, Chromatin und Transkriptionsfaktoren (unter anderem Rb und SREBP1) (Zastrow *et al.*, 2004). Der Interaktion mit LEM-Domänen Proteinen kommt dabei eine besondere Bedeutung für die Integrität der Zellkernlamina und der Chromatinorganisation zu.

Die LEM-Domäne ist ein gemeinsames Motiv vieler integraler Proteine der inneren Kernmembran, die unter anderem die Assoziation mit dem DNA-bindenden Protein BAF vermittelt (Furukawa, 1999; Lee *et al.*, 2001; Lee and Wilson, 2004). BAF ist ein essentielles und hoch konserviertes Protein, das neben Laminen und LEM-Domänen Proteinen

doppelsträngige DNA bindet (Segura-Totten and Wilson, 2004). Alle bisher untersuchten LEM-Domänen Proteine (unter anderem Lap2 α , Lap2 β und Emerin) binden außerdem A- und / oder B-Typ Lamine (Dechat *et al.*, 2000; Foisner and Gerace, 1993; Lee *et al.*, 2001). Sowohl durch die direkte Bindung von DNA beziehungsweise Chromatin, als auch indirekt durch die Interaktion mit LEM-Domänen Proteinen und BAF wird Lamina eine Funktion in der Aufrechterhaltung der Kernarchitektur und der Organisation von Chromatin zugeordnet (Gruenbaum *et al.*, 2005). Diese Annahme wird unterstützt durch die Untersuchung von Lamin A/C defizienten Zellen, in denen beobachtet wurde, dass die Positionierung von Heterochromatin an der Kernperipherie stark beeinträchtigt ist (Goldman *et al.*, 2004; Nikolova *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 1999). Auch wenn Lamina beziehungsweise der Lamina vermutlich eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellkern-Architektur und Chromatinpositionierung zukommt, gibt es dennoch Unklarheiten darüber, inwiefern Bestandteile der Lamina an der Positionierung von einzelnen Genloci beziehungsweise subchromosomalen Regionen beteiligt sind und ob sie auf diese Weise auch indirekt einen Einfluss auf die Regulation der Genexpression nehmen.

Funktionen der Lamina für die Genregulation, Transkription und Replikation

Auch wenn noch unklar ist, wie und ob die Lamina einen Einfluss auf die Regulation der Genexpression hat, konnte gezeigt werden, dass Bestandteile der Lamina mit transkriptionellen Repressoren interagieren und somit möglicherweise an der Ausbildung von repressiven Chromatin-Bereichen beteiligt sind (Zastrow *et al.*, 2004). So wurde gezeigt, dass der transkriptionelle Repressor Retinoblastoma Protein (Rb) A-Typ Lamine bindet (Mancini *et al.*, 1994; Markiewicz *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 1994). Weiterhin wurde gezeigt, dass Lamin A, Lap2 β und Emerin einen tertiären Komplex mit dem Repressor GCL bilden (Holaska *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass Lamin A/C Filamente ein Gerüst für Protein-Komplexe bilden, welche die Genexpression regulieren (Cohen *et al.*, 2001). Die Beobachtung, dass HP1 Proteine mit dem Lamin B Rezeptor interagieren, unterstützt diese Vorstellung (Ye *et al.*, 1997). Möglicherweise erklärt dies auch, warum inaktive Gene häufig nahe der Kernperipherie lokalisieren (siehe zweites Kapitel dieser Einleitung).

Lamine bilden außerdem auch stabile nukleoplasmatische Strukturen und dienen möglicherweise als Gerüst-Struktur für makromolekulare Transkriptions- und Replikationskomplexe (Goldman *et al.*, 1992; Hozak *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2000; Moir *et al.*, 2000a; Moir *et al.*, 2000b; Spann *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2001). Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, dass N-terminale Deletionen von Lamin A/C zu einem Abbruch der

Elongationsphase der DNA-Replikation führen (Moir *et al.*, 2000) und die Transkription durch die RNA-Polymerase II hemmen (Spann *et al.*, 2002). Eine Reihe von Laminopathien verdeutlicht darüber hinaus die Beteiligung von Laminen an essentiellen zellulären Prozessen.

Laminopathien

Derzeit ist eine wachsende Anzahl von Krankheiten bekannt, die durch verschiedene Mutationen im LMNA-Gen verursacht werden (Burke and Stewart, 2002; Ostlund and Worman, 2003). Jede dieser Krankheiten betrifft unterschiedliche Gewebe und verursacht unter anderem die autosomale Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EMDM), Lipodystrophien und verschiedene Progerie-Syndrome (atypisches Werner-Syndrom und Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom, HGPS) (Smith *et al.*, 2005). Die verheerendste Laminopathie ist wohl das äußerst seltene HGPS-Syndrom, das multiple Gewebe und Organe betrifft und zu einem vorzeitigen Altern und einem frühen Tod führt (Eriksson *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2004). Dieses Krankheitsbild wurde ursprünglich von Jonathan Hutchinson 1886 beschrieben und 1904 von Hastings Gilford weiter charakterisiert (Badame, 1989). HGPS wird durch Punktmutationen im LMNA-Gen verursacht, wodurch eine stille Spleißing-Stelle aktiviert wird. Durch das fehlerhafte Spleißen wird die Protease-Stelle deletiert und die proteolytische Abspaltung des Farnesyl-Restes nicht ermöglicht. Es wird vermutet, dass HGPS durch die Akkumulation von unreifem pre-Lamin A verursacht wird (Goldman *et al.*, 2004).

Auf zellulärer Ebene zeigen Zellen von HGPS-Patienten auffällig deformierte Zellkerne, eine Delokalisation von heterochromatischen Markern, sowie eine zunehmend reduzierte Teilungsrate und Defekte in der Genexpression (Csoka *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2004; Scaffidi and Misteli, 2005). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Änderungen in der nukleären Organisation von Lamin A/C offenbar zu Defekten in der Transkription und der Elongationsphase der DNA-Replikation führen (Moir *et al.*, 2000a; Spann *et al.*, 2002; Spann *et al.*, 1997). Bisher ist nicht bekannt, ob in HGPS-Zellen die Kernlokalisierung von einzelnen Genloci verändert ist und diese Vorgänge an dem Krankheitsbild von HGPS beteiligt sind.

1.5. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten die Zusammenhänge zwischen dem Transkriptions- und Replikationsverhalten und der Zellkernlokalisierung menschlicher Gene analysiert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwiefern einzelne Komponenten der Zellkernlamina an der Positionierung eines Genlokus beteiligt sind.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Kernlokalisierung von drei benachbarten Genen der humanen CFTR-Region auf dem Chromosom 7q31 in verschiedenen menschlichen Zelltypen und Zelllinien untersucht werden. Bei den analysierten Genen handelte es sich um GASZ („**g**erm cell specific expression, presence of ANK, **S**AM and **b**ZIP domains“) (Yan *et al.*, 2002), um CFTR („**c**ystic **f**ibrosis **t**ransmembrane conductance **r**egulator“) (Engelhardt *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1988) und um CORTBP2 („**c**ortactin-**b**inding **p**rotein-**2**“) (Cheung *et al.*, 2001). Unter Verwendung optimierter 2D und 3D FISH-Protokolle und hoch auflösender Mikroskopie sollte die Kernlokalisierung dieser eng benachbarten, jedoch funktionell unabhängigen Gene in verschiedenen menschlichen Zelltypen und Zelllinien ermittelt und mit der transkriptionellen Aktivität verglichen werden. Dabei sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Kernlokalisierung dieser Gene unabhängig voneinander entsprechend ihrer transkriptionellen Aktivität reguliert wird oder die gesamte Region diesbezüglich ein gemeinsames Verhalten aufweist. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die Genloci mit unterschiedlichen Chromatin-Fractionen assoziieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte das Replikationsverhalten von GASZ, CFTR und CORTBP2 in verschiedenen menschlichen Zelllinien ermittelt werden. Dabei sollte durch die Anwendung differenzierter Fixierungsmethoden und FISH-Protokolle die exakte Einordnung der Replikationszeitpunkte dieser benachbarten Gene ermöglicht werden. Durch den Vergleich mit den im ersten Teil dieser Arbeit erhaltenen Daten sollten neue Einsichten in die Zusammenhänge zwischen Kernpositionierung, Replikationsverhalten und Regulation der Transkription gewonnen werden.

Der dritte Teil dieser Arbeit widmete sich der Frage, ob die Zellkernlamina an der Positionierung des CFTR-Lokus beteiligt ist. Mittels RNA-Interferenz sollte die Expression von Bestandteilen der Zellkernlamina unterdrückt werden und die Auswirkung dieser Manipulation auf die Kernlokalisierung von CFTR ermittelt werden. Zusätzlich sollte die Positionierung von CFTR in HGPS-Zellen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien, Lösungen und Kulturmedien

Chemikalien und Lösungen	Bezugsquelle
Acrylamid/Bisacrylamid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Agar	Fluka, Buchs
Agarose Ultrapure, low melting point	Gibco BRL
Agarose NEE0	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Barrycidal 36	Interchem, Zürich
Brij 58™	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
BSA (Fraktion V)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Coomassie Blue G250	Carl Roth, Karlsruhe
Colcemid (10 µg/ml)	Seromed Biochrom, Berlin
Desoxycholinsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dextransulfat	Pharmacia, Braunschweig
Diethylether	Merck, Darmstadt
DRB (5,6-dichloro-1-ribofuranosyl benzimidazole)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
EDTA (Titrplex III)	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Formaldehyd, stabilisiert	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Formamid, deionisiert	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glycerin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Fluka, Buchs
Heparin	Braun, Melsungen
IPTG	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Lauroylsarcosin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mimosin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Mineralöl für PCR	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-Citrat Dihydrat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

(Di-) Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumthiocyanat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Pepton	Fluka, Buchs
PMSF	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phytohaemagglutinin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Prestained SDS-Page Standart	BioRad, München
Salzsäure, rauchend (37%)	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tetramethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Trizma hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trizma base	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Trolox™	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypton	Fluka, Buchs
TSA (Trichostatin A)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tween 20	Merck, Darmstadt
Vectashield	Vector, Burlingame, USA

Kulturmedien und Zusätze	Bezugsquelle
DMEM (high glucose), MEM-1, RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Aminosäuren, nicht-essentiell, 100x	Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum, EU zertifiziert, inaktiviert	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin, 100x	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA Lösung mit HEPES, 1x	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2. Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
Agarase (0,5 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
Alu I (10 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
Asc I (10 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Bss HII (10 U/μl)	Roche, Mannheim
DNase I (1 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
Fse I (2 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Lysozym, lyophilisiert	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Not I (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Pdm I (10 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
Pepsin, lyophilisiert	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Proteinase K, lyophilisiert	Roche, Mannheim
RNase, DNase frei (500μg/ml)	Roche, Mannheim
Rsr II (4 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Amersham Biosciences, Freiburg

2.1.3. Antikörper und Konjugate

Primäre Antikörper	Bezugsquelle
Anti-Actin (MAB1501) (Maus monokl.) Verdünnung 1:1000 in Blockinglösung	Chemicon, Hampshire, UK
Anti-BrdU (Maus monokl.) Verdünnung 1:6 in PBSTT-BSA	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-BrdU konjugiert mit FITC / DNase I (Fastimmune™ System) (gebrauchsfertig)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Emerin (FL-254) (Kaninchen polykl.) Verdünnung 1:200 in Blockinglösung	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Histon H4 azetyliert an Lysin 8 8(R232/8) (Kaninchen monokl.) Verdünnung 1:100 in Blockinglösung	zur Verfügung gestellt von Prof. B. M. Turner, Univ. Birmingham, UK
Anti-Histon H4 azetyliert an Lysin 8 (Kaninchen monokl.) (Cat. 17-211) Verdünnung 1:200 in Blockinglösung	Biomol, Hamburg
Anti-Lamin A/C (636) (Maus monokl.) Verdünnung 1:150 in Blockinglösung	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Lap2β (Clone 27) (Maus monokl.) Verdünnung 1:150 in Blockinglösung	Becton Dickinson, Heidelberg

Sekundäre Antikörper und Konjugate	
Anti-Avidin-Biotin Konjugat (Ziege) Verdünnung 1:200 in Blockinglösung	Dianova, Hamburg
Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase Konjugat (Ziege) Verdünnung 1:500 in Blockinglösung	Roche, Mannheim
Anti-Digoxigenin-Fluorescein (Schaf) Verdünnung 1:75 in Blockinglösung	Roche, Mannheim
Anti-Kaninchen-Alexa-488™ (Ziege) Verdünnung 1:150 in Blockinglösung	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Kaninchen-alkalische-Phosphatase Konjugat (Ziege) Verdünnung 1:500 in Blockinglösung	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Kaninchen-IgG-Cy3™ (Ziege) Verdünnung 1:200 in Blockinglösung	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG-Fluorescein (Ziege) Verdünnung 1:150 in Blockinglösung	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-Alexa-488™ (Ziege) Verdünnung 1:150 in Blockinglösung	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Maus-alkalische-Phosphatase Konjugat (Ziege) Verdünnung 1:500 in Blockinglösung	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Maus-Cy3 (Schaf) Verdünnung 1:200 in Blockinglösung	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-TRITC (Ziege) Verdünnung 1:200 in Blockinglösung	Dianova, Hamburg
Avidin-Cy3™ Konjugat Verdünnung 1:300	Dianova, Hamburg

Avidin-Cy5™ Konjugat Verdünnung 1:100 in Blockinglösung	Dianova, Hamburg
Avidin-Fluorescein Konjugat Verdünnung 1:100 in Blockinglösung	Roche, Mannheim
Streptavidin-alkalische Phosphatase Konj. Verdünnung 1:500 in Blockinglösung	Roche, Mannheim

2.1.4. Nukleotide, Nukleinsäuren und Vektoren

Nukleotide	Bezugsquelle
Biotin-16-dUTP (1mM)	Roche, Mannheim
Bromodesoxyuridin (BrdU) (0,2 mM)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Cy3-dUTP, Cy5-dUTP (1mM)	Amersham Biosciences, Freiburg
dATP, dCTP, dGTP, dTTP Mix (je 10 mM)	Roche, Mannheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP einzeln (je 5 mM)	Roche, Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP (1mM)	Roche, Mannheim
Fluorescein-12-dUTP (1mM)	Roche, Mannheim

DNA	
Genomische DNA aus Fibroblasten	gesunder Proband
Humane COT-1 DNA (1 mg/ml)	GibcoBRL, Karlsruhe
Chromosom 7 Painting Probe	zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Müller, LMU München
Chromosom 11 Painting Probe	zur Verfügung gestellt von Dr. Michael Speicher, TU München
Hering Sperma DNA (10 mg/ml)	GibcoBRL, Karlsruhe

Oligo-Nukleotide	
------------------	--

Markierungs-PCR Primer:	
DOP-PCR: 6MW (5'- CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3')	Metabion, Martinsried
Alu-PCR: CL1 (5'- TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G-3')	Metabion, Martinsried
α-Satelliten-PCR: PAN A (5'- AGA AAC TTC TTT GTG ATG TGT GC-3')	Metabion, Martinsried
α-Satelliten-PCR: PAN D (5'- CTA GTT TTT ATG TGA AGA TAT TCC C-3')	Metabion, Martinsried

LR-PCR Primer:	
CF3': (Exon 21-24 CFTR) CF21F (Zielenski <i>et al.</i> , 1991) und a16BR (5'- TGC GCG CCT TGG TAA CCA TGT CCA GTT G-3')	Genzentrum München
GASZ: (Exon 2-5) G5R (5'- GTG ATT CTT TCA ATC CTA CCA ATT TG-3') und G2cF (5'-AGC AAT GAC CAT CGG AGA TGT TT C-3')	Genzentrum München

CORTBP2: (Exon 9-17) CO17cR (5'- AGA GCC CAG TCG ACA ATC TTG C-3') und CO9cF (5'- GCC TAG AAA TCT TGT GTA GGC AC-3')	Genzentrum München
--	--------------------

RT-PCR Primer:	siehe Zink <i>et al.</i> , 2004
-----------------------	---------------------------------

siRNAs:	
LAMIN A/C: (5'- CUG GAC UUC CAG AAG AAC A)dTdT-3'	Qiagen, Hilden
LAP 2 β : (5'- AGA CAA GUU GAA GAG UGA G)dTdT-3	Qiagen, Hilden
GFP-Rhodamine: (5'- GCA AGC UGA CCC UGA AGU UCA U)-3'-RhodaminyI	Qiagen, Hilden
Negativ Kontrolle: Alexa 488 (5'- UUC UCC GAA CGU GUC ACG U)dTdT-3'	Qiagen, Hilden
Emerin: (Sequenz nicht angegeben)	Santa Cruz, Heidelberg

Vektoren, PACs und BACs *	
Histon H2b-GFP Expressionsplasmid (Kanda <i>et al.</i> , 1998)	Zur Verfügung gestellt von Prof. Kevin Sullivan, Scripps Research Institute, La Jolla, USA
PAC CF1 (RPCIP 704F2220); 138 kbp; beinhaltet die Exons 1-9 von CFTR	Deutsches Ressourcen-Zentrum für Genomforschung, Heidelberg
PAC CF3 (RPCIP 704G2012); 230 kbp; beinhaltet die Exons 1-5 von GASZ, sowie die Exons 1-10 von CFTR	Deutsches Ressourcen-Zentrum für Genomforschung, Heidelberg
PAC CF7 (RPCIP 704C0424); 200 kbp; beinhaltet die Exons 12-24 von CFTR, sowie die Exons 3-23 von CORTBP2	Deutsches Ressourcen-Zentrum für Genomforschung, Heidelberg
PAC RP5 852D15; 44,5 kbp; beinhaltet eine intergenische Region telomerisch von CORTBP2	BACPAC Resources, Childrens Hospital, Oakland, USA
BAC 305; 174 kbp; beinhaltet die β -Globin-LCR und die Globin-Gene	Zur Verfügung gestellt von Prof. Mark Groudine, Universität Washington, USA

*Die PACs und BACs wurden in dem *E. coli* Stamm Dh5 α (Φ 80dlacZ Δ M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK-, mK+)) propagiert.

2.1.5. Marker, Farbstoffe und Auftragspuffer

Marker	Bezugsquelle
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
Mass Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Mid Range II PFGE Marker	New England Biolabs, Frankfurt
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, St. Leon-Rot

Farbstoffe und Auftragspuffer	
DAPI (4'6-Diamidino-2-Phenylindol) (2mg/ml)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Electrophoresis Sample Buffer (2 x)	Santa Cruz, Heidelberg
Loading Buffer Pack (5x, incl. DTT)	Fermentas, St. Leon-Rot
Loading Dye 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
NBT/BCIP-Stammlösung	Roche, Mannheim
TOPRO-3 (1mM)	Molecular Probes, Leiden, NL

2.1.6. Kits

Kit	Bezugsquelle
Anti-Digoxigenin Enhancer Kit	Roche, Mannheim
BIONICK Labeling System	Invitrogen, Karlsruhe
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
Fluorescent Enhancer Set for DIG Detection	Roche, Mannheim
Large Construct Kit	Qiagen, Hilden
M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent	Pierce-Perbio, Bonn
QiaEx II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNAiFect Transfection Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Protect Kit	Qiagen, Hilden
Wachstums-Medium Kit für bronchiale Zellen	Promocell

2.1.7. Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Herstellung / Konzentration
Acrylamid Gel: Sammelgel (5%)	3,4 ml dH ₂ O (total 5 ml) 0,83 ml Acrylamid/ Bisacrylamid (37:1) 0,63 ml 1 M Tris (pH 6,8) 50 µl 10% SDS 50 µl 10% Ammoniumpersulfat 5 µl TEMED
Acrylamid Gel: Trenngel (10%)	4 ml dH ₂ O (total 10 ml) 3,3 ml Acrylamid/ Bisacrylamid (37:1) 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 100 µl 10% SDS 100 µl 10% Ammoniumpersulfat 10 µl TEMED
Agarose Gel (Pulsfeld Gel)	1% iges Gel: 5 g Agarose werden in 500 ml 0,5 x TAE Puffer aufgekocht und bis zum Abkühlen langsam gerührt. Das Gel ohne Ethidiumbromid in die Gelform gießen.
Agarose Gel (Standard Gel)	1% iges Gel: 0,5 g Agarose werden in 50 ml 1 x TAE Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C 3µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugeben und in die Gelform gießen.

AP1 Puffer	0,1 M Tris HCl pH 7,5 0,1 M NaCl 2 mM MgCl ₂ 0,05% Triton X-100
AP2 Puffer	AP1 Puffer mit 3% BSA
AP3 Puffer	0,1 M Tris HCl pH 9,5 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂
Blockinglösung	4% BSA in 4 x SSC/Tween (0,2%)
Blotting-Puffer (Western Blot)	1 x Elektrophoresepuffer (nach Laemmli) mit 20% Methanol
BrdU-Stammlösung	200 µM in dH ₂ O
Chloramphenicol Stammlösung	34 mg/ml in Ethanol, Lagerung bei -20°C
Coomassie-Entfärber	50% Methanol 10% Essigsäure ad 100ml H ₂ O
Coomassie-Färbelösung	0,1% Coomassie Blue G 250 40% Methanol 10% Essigsäure ad 100 ml H ₂ O
DAPI Stammlösung	2 mg/ml in dH ₂ O
Denaturierungslösung (2D/3DFISH)	70 ml Formamid in 30 ml 2 x SSC, pH 7
DNA Färbelösungen	TOPRO-3 1:1000, in PBS DAPI Stammlösung 1:5000, in PBS
DRB Lösung	5 mg DRB in 1 ml EtOH (absolut) lösen Gebrauch: 50 µg/ml Medium
EC Lysis Puffer	6 mM Tris HCl (6 ml 1M, pH 7,6) 1 M NaCl (58,44 g) 100 mM EDTA (200 ml 0,5 M) 0,5% Brij 58 (50 ml 10% in dH ₂ O) 0,2% Desoxycholinsäure (50 ml 4% in dH ₂ O) 0,5% Lauroylsarcosin (2,5 ml 20% in dH ₂ O) ad 1000ml dH ₂ O, pH 7,6 kurz vor Gebrauch pro 10 ml zusetzen: 10 µl RNase Lösung (10 mg/ml) und eine Spatelspitze Lysozym (lyophilisiert)
EDTA 0,5M	18,6 g Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O in 70 ml dH ₂ O lösen pH-Wert auf 8,0 mit 10 M NaOH einstellen ad 100 ml dH ₂ O
Elektrophoresepuffer 10x (Western Blot) nach Laemmli	250 mM Tris Base (30,3 g) 2,5 M Glycin (187,5 g) 1% SDS (50 ml 20% in dH ₂ O) ad 1000 ml dH ₂ O, pH 8,3
Fixativ (2D FISH)	150 ml Methanol 50 ml Eisessig
Fixativ (3D FISH, Immunfluoreszenz)	1 ml 37% Formaldehyd (stabilisiert) 9 ml 1 x PBS, pH 7,4
Formamid-Waschlösung	50 ml Formamid 50 ml 1 x SSC, pH 7,0
HCl 1 N	86,2 ml HCl rauchend (36%) in 1 l dH ₂ O

Hybridisierungs-Mastermix (FISH)	20% Dextransulfat in 2 x SSC
IPTG Lösung	1 M in dH ₂ O (23,8 g/100ml)
Kanamycin Stammlösung	10 mg/ml in dH ₂ O, Lagerung bei -20°C
KCl-Lösung (hypotonische Lösung)	0,06 M KCL (0,45 g KCl in 100ml H ₂ O)
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl <i>ad</i> 1000 ml dH ₂ O, pH 7,0
MgCl ₂ 1M	20,3 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O, <i>ad</i> 100 ml dH ₂ O
Mimosin Stammlösung	200 mM L-Mimosin in 1M NH ₄ OH
NaCl 5M	29,2 g NaCl, <i>ad</i> 100 ml dH ₂ O
NBT/BCIP Färbelösung	200 µl NBT/BCIP-Stammlösung / 10 ml AP3
NDS	0,5 M EDTA, pH 9,0; autoklaviert, mit 1% Lauroylsarcosin
NDS-K	NDS mit 50 µg/ml Proteinase K (frisch ansetzen)
PBS 10x	1,37 M NaCl (80 g) 27 mM KCl (2 g) 100 mM Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O (14,4 g) 20 mM KH ₂ PO ₄ (2,4 g) <i>ad</i> 1000 ml dH ₂ O, pH 7,0 (HCl/NaOH)
PBS-Mg	50 mM MgCl ₂ (5 ml/100 ml 1 x PBS) in PBS
PBS-PMSF	PBS mit 1 mM PMSF
PBSTS	1xPBS pH 7,4 0,1 % Tween 20 0,1 % Saponin
PBSTT	1xPBS pH 7,4 0,2 % Triton X-100 0,2 % Tween 20
PBSTT-BSA	PBSTT mit 4% BSA
Pepsin-Stammlösung	10% in d H ₂ O
PettIV	10 mM Tris HCl 1 M NaCl <i>ad</i> 1000ml mit dH ₂ O, pH 7,6
PMSF	0,2 M in Ethanol absolut (3,5 g/100ml)
Probenpuffer 4 x (Western Blot)	250 mM Tris HCl (2,5 ml 1 M) 8% SDS (0,8 g) 40% Glycerin (4 ml) 20% β-Mercaptoethanol (2 ml) 1 Spatelspitze Bromphenolblau; <i>ad</i> 10 ml dH ₂ O
RNase Lösung	RNase (500µg/ml) 1:200 in 2 x SSC verdünnen
SSC 20x	3 M NaCl (175g) 0,3M tri-Natrium Citrat (88g) <i>ad</i> 1000ml dH ₂ O, pH 7,0
SSCT	200 ml 20 x SSC 0,2% Tween 20 (2ml) <i>ad</i> 1000 ml dH ₂ O, pH 7,0
TAE 50x	2M Tris (242 g Tris base) 57,1ml Eisessig 50mM EDTA (100ml 0,5M EDTA) <i>ad</i> 1000 ml dH ₂ O, pH 8,0

TBS 10x	0,5 M Tris (60,5 g Tris base) 1,5 M NaCl (87,66 g) ad 1000ml dH ₂ O, pH 7,5
TE 10x	100mM Tris (10 ml 1 M) 10mM EDTA (2 ml 0,5 M) ad 100 ml dH ₂ O, pH 7,4
TSA Lösung	1 mg TSA in 1ml EtOH (absolut) lösen Gebrauch: 10 ng/ml Medium
T-TBS	1 x TBS mit 0,05% Tween 20
T-TBS-Milk	T-TBS mit 5% Magermilchpulver
Tris HCl (1 M)	121,1 g Tris-Base in 800 ml dH ₂ O lösen, mit HCl conc. den gewünschten pH-Wert einstellen und auf 1000 ml mit dH ₂ O auffüllen
Trolox Stammlösung (100mM)	0,25 g Trolox in 9,8 ml dH ₂ O geben, 100 µl 1N NaOH zugeben und lösen mit 100 µl 1N HCl neutralisieren Gebrauch: 0,1 mM im Kulturmedium

2.1.8. Mikroskope und Geräte

Mikroskop/Zubehör	Typ	Firma
Epifluoreszenzmikroskop	<p>Axiovert 135 TV</p> <p>Objektive: Plan-Apochromat 63x, NA: 1.4, Ölimmersion Plan-Apochromat 40x, NA: 1.3, Ölimmersion</p> <p>Filtersätze: DAPI: (BP 365; FT 395; LP 420 nm*) FITC: (BP 450-490; FT 510; LP 515-565 nm*) TRITC: (BP 546; FT 560; LP 575-640 nm*) Cy5: (BP 575-625; FT 645; LP 660-710 nm*) (* Anregungsfilter; Farbteiler; Sperrfilter)</p> <p>CCD Kamera: MicroMAX Pixelgröße: 6,8 µm x 6,8 µm</p> <p>Shutter: Uniblitz D122</p> <p>Lampensteuerung: AttoArc Hg-Dampf Lampe: HBO 100W2</p>	<p>Carl Zeiss, Jena</p> <p>Princeton Instruments Monmouth, USA Vincent Associates, Rochester, USA Carl Zeiss, Jena Osram, München</p>
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	<p>LSM 510 Meta</p> <p>Objektiv: Plan-Apochromat 63x, NA: 1.4, Ölimmersion, DIC</p>	<p>Carl Zeiss, Jena</p>

	Laser: Helium-Neon 1/2, Argon-Ionen Filtersätze: Beamsplitter: HFT UV/488/543/ 633, NFT 545 Emissionsfilter: BP 505-530 LP 650 BP 560-615	
Phasenkontrastmikroskop	Dialux Objektive: 10x, 25x, 40x Phaco	Leitz, München

Gerät	Typ	Firma
Absauganlage Zellkultur		Neolab, Heidelberg
CO ₂ -Inkubator	Typ B 5060	Heraeus, Hanau
Bakterien-Inkubator	Typ B 5050 E	
Elektrophoresekammer DNA	He 33	Hofer, San Francisco, USA
Elektrophoresekammer Protein	Mini-Protean	BioRad, München
Lamina Air Flow	Steril Guard	Baker Co., Sanford, USA
PCR-Gerät	Hybias Omni Gene	MWG-Biotech, München
pH Meter	pH 526	WTW, Weilheim
Photometer	Genequant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Power-Supply	PowerPAC 300	BioRad, München
Pulsfeldgelelektrophorese-Kammer	CHEF-DR II (Contour-clamped homogeneous electric field)	BioRad, München
Schüttler	3015	GFL, Burgwedel
Semi-Dry-Blot	Trans-Blot SD	BioRad, München
Wasserbäder	digitale Temperatur-Kontrolle	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Biofuge pico Rotana/S J-21 B Vakuumkonzentrator	Heraeus, Hanau Hettich, Tuttlingen Beckmann, München Bachhofer, Reutlingen

2.1.9. Glas- und Plastikwaren, Hilfsmittel

Zubehör	Bezugsquelle
Deckgläser	Assistent, Sondheim
Einmalpipetten steril (5, 10 und 25ml)	Nunc, Wiesbaden
Multiwell (4, 6, 12 Wells) Schalen	Nunc, Wiesbaden
Nitrocellulose Membranen	BioRad, München
Nylon Membranen, positiv geladen	Roche, Mannheim
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Plug Molds	BioRad, München
Quadriperm	Nunc, Wiesbaden

Reaktionsgefäße (1,5 und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen Omnifix ,steril (10, 25 ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen steril (15ml / 50ml)	Nunc, Wiesbaden

Hilfsmittel	Bezugsquelle
Diamantstift	Neolab, Heidelberg
Fixogum	Marabu, Tamm
Glasküvetten	Neolab, Heidelberg
Kanülen (hypodermic)	Braun, Melsungen
Kimwipes Science (fusselfrei)	Neolab, Heidelberg
Laborhandschuhe Safeskin (puderfrei)	Neolab, Heidelberg
Metallbox	Neolab, Heidelberg
Nagellack (klar, farblos)	Drogeriehandel
Parafilm	Neolab, Heidelberg
Pasteurpipetten	Neolab, Heidelberg
Pinzetten	Neolab, Heidelberg
Pipettierhilfen	Eppendorf, Hamburg
Vectashield	Linaris, Wertheim-Bettingen
Whatman Papier	BioRad, München

2.1.10. Software

Software	Bezugsquelle	Verwendung
Metamorph 4.0/4.6	Visitron, München	Steuerung des Epifluoreszenzmikroskops Abstandsmessungen in 2D
Zeiss LSM Meta 3.1	Carl Zeiss, Jena	Steuerung des konfokalen Mikroskops Replikations-Analyse (Image Browser)
Amira 3.0	TGS, Paris	3D-Rekonstruktion, 3D-Erosionsanalyse
Photoshop 7.0	Adobe, München	Bildbearbeitung, 2D-Erosionsanalyse
ImageJ 1.34	http://rsb.info.nih.gov/ij/	Bildbearbeitung, Abstandsmessungen in 3D
Office 2003	Microsoft, München	Textbearbeitung und Tabellenkalkulation

2.1.11. Zelllinien und primäre Zellen

2.1.11.1. SH-EP N14

SH-EP N14 Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Schwab (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Organismus	Mensch
Bezeichnung	SH-EP N14
Gewebe	Gehirn
Zelltyp	Neuroblastomzellen, epithelial, SK-N-SH Derivat
Alter	4
Geschlecht	weiblich
Karyotyp	hyperdiploid (47 Chr.), Chromosom 17;22 Translokation Trisomie Chromosom 7 und 11
Kulturmedium	DMEM, 10% FCS, 1 x Penicillin/Streptomycin (P/S)
Einfriermedium	Kulturmedium mit 5% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Kommentar	Adherent, wachsen sehr rasch, häufiges Passagieren, mit CMV N-myc Expressionsvektor, G418 resistent.
Passage	1:10, 2 mal wöchentlich
Referenz	(Ross <i>et al.</i> , 1983; Wenzel <i>et al.</i> , 1991)

2.1.11.2. HEK-293

Organismus	Mensch
Bezeichnung	HEK-293 (Human Embryonic Kidney)
Gewebe	Niere
Zelltyp	embryonale Nierenzellen, fibroblastoid, Adenovirus Typ 5 transformiert
Alter	fetal
Karyotyp	hypotriploid (ca. 64 Chr.), Trisomie Chromosom 7; Translokation Chr. 7 (ohne CFTR)
Kulturmedium	DMEM, 5% FCS, 1x P/S
Einfriermedium	Kulturmedium mit 5% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Kommentar	Adherent, wachsen sehr rasch, lösen sich jedoch bei 100% Konfluenz ab, häufiges Passagieren, exprimieren den Vitronectin Rezeptor, Tumor-induzierend.
Passage	1:5, 2 mal wöchentlich
Referenz	(Graham <i>et al.</i> , 1977)

2.1.11.3. HeLa S6

Organismus	Mensch
Bezeichnung	HeLa S6 (Subklon S6)
Gewebe	Zervikalschleimhaut
Zelltyp	Zervixkarzinom, epithelial, HPV-18 Virus-Sequenzen
Alter	31 Jahre
Geschlecht	weiblich (schwarz)
Karyotyp	hypertriploid (ca. 82 Chr) metazentrische Marker-Chr. Trisomie Chromosom 7
Kulturmedium	DMEM, 10% FCS, 1x P/S
Einfriermedium	Kulturmedium mit 5% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Kommentar	Adherent, wachsen sehr rasch, häufiges Passagieren, exprimieren Keratin.
Passage	1:10, 2 mal wöchentlich
Referenz	(Scherer and Hoogasian, 1954)

2.1.11.4. Calu-3

Calu-3-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Rosenecker (LMU München) zur Verfügung gestellt.

Organismus	Mensch
Bezeichnung	Calu-3
Gewebe	Lunge
Zelltyp	Adenokarzinomzellen, epithelial
Alter	25 Jahre
Geschlecht	männlich
Karyotyp	hypotriploid, teilweise instabil, 2-4 Kopien von Chromosom 7
Kulturmedium	DMEM, 15% FCS, 1x P/S
Einfriermedium	Kulturmedium mit 5% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Kommentar	Adherent, wachsen langsam, schlecht ablösbar (Trypsin- EDTA), exprimieren CFTR, Tumor-induzierend.
Passage	1:5, 1 mal wöchentlich
Referenz	(Fogh <i>et al.</i> , 1977a; Fogh <i>et al.</i> , 1977b)

2.1.11.5. HT-1080

HT-1080-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Schindelhauer (TU München) zur Verfügung gestellt

Organismus	Mensch
Bezeichnung	HT-1080
Gewebe	Bindegewebe
Zelltyp	Fibrosarkomzellen, fibroblastoid
Alter	35 Jahre
Geschlecht	männlich
Karyotyp	Pseudodiploid (44 - 48 Chr.)
Kulturmedium	RPMI 1640; 20% FCS, 1x P/S
Einfriermedium	Kulturmedium mit 5% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Kommentar	Adherent, wachsen langsam, schlecht ablösbar (Trypsin-EDTA), N-ras Onkogen aktiviert.
Passage	1:5, 1 mal wöchentlich
Referenz	(Rasheed <i>et al.</i> , 1974)

2.1.11.6. K-562

K-562-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Mark Groudine (University of Washington, USA) zur Verfügung gestellt.

Organismus	Mensch
Bezeichnung	K-562
Gewebe	Knochenmark
Zelltyp	Chronische myelogene Leukämie (CML)
Alter	53
Geschlecht	weiblich
Karyotyp	triploid, Philadelphia Chromosom, Trisomie Chromosom 11
Kulturmedium	DMEM; 10% FCS, 1x P/S
Einfriermedium	Kulturmedium mit 5% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Kommentar	Suspension, wachsen rasch.
Passage	1:5, 2 mal wöchentlich (kein Trypsin-EDTA)
Referenz	(Lozzio and Lozzio, 1979; Lozzio <i>et al.</i> , 1979)

2.1.11.7. Lymphozyten

Lymphozyten wurden aus frisch entnommenem, heparinisiertem Vollblut gesunder Probanden gewonnen

Organismus	Mensch
Bezeichnung	Lymphozyten
Gewebe	Blut
Zelltyp	T-Lymphozyten
Alter	24
Geschlecht	weiblich
Karyotyp	normal
Kulturmedium	RPMI 1640; 20% FCS, 1% Phytohaemagglutinin
Einfriermedium	nicht durchgeführt
Sicherheitsstufe	1
Kommentar	Lymphozyten wurden stets frisch präpariert und für die FISH eingesetzt.
Passage	nicht passagiert

2.1.11.8. Primäre Fibroblasten

Folgende primäre Fibroblasten von gesunden Probanden und Patienten mit Hutchinson Gilford Progeria Syndrom (HGPS) wurden von den Coriell Cell Repositories (New Jersey, USA) bezogen.

Organismus	Mensch
Bezeichnung	AG08469
Gewebe	Epidermis (Haut)
Zelltyp	Fibroblasten eines gesunden Probanden, untransformiert
Alter	38
Geschlecht	männlich
Bezeichnung	AG01972
Gewebe	Epidermis (Haut)
Zelltyp	Fibroblasten, untransformiert, HGPS bestätigt
Alter	14
Geschlecht	weiblich
Bezeichnung	AG11498
Gewebe	Epidermis (Haut)
Zelltyp	Fibroblasten, untransformiert, HGPS bestätigt
Alter	14
Geschlecht	männlich
Kulturmedium	MEM-1, 15% FCS, 1xP/S, 1x nicht essentielle Aminosäuren
Einfriermedium	Kulturmedium mit 5% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Kommentar	Alle Linien sind adherent. Progressive morphologische Defekte und verminderte Teilungsrate bei den HGPS-Linien

	ab Passage 20-24 beobachtbar.
Passage	1:3, 1-2 mal wöchentlich ältere Passagen der HGPS-Linien seltener (ca. alle 10 Tage)
Referenz	http://ccr.coriell.org/nia/

2.1.11.9. Primäre Fibroblasten MA-2

Weitere, untransformierte Fibroblasten mit der Bezeichnung MA-2 wurden von Dr. Schindelhauer (TU München) zur Verfügung gestellt.

Organismus	Mensch
Bezeichnung	MA-2
Gewebe	Präputium
Zelltyp	Fibroblasten, untransformiert, normal
Alter	unbekannt
Geschlecht	männlich
Karyotyp	normal
Kulturmedium	DMEM, 10% FCS, 1x P/S
Einfriermedium	Kulturmedium mit 5% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Kommentar	Diese Zelllinie zeigte einen nahezu identischen Phänotyp und Wachstumsrate wie die Linie AG08469
Passage	1:3, 1-2 mal wöchentlich

2.1.11.10. Primäre Nasenepithel-Zellen

Primäre Nasenepithel-Zellen von gesunden Probanden wurden durch Dr. Joseph Rosenecker (LMU München) zur Verfügung gestellt.

Organismus	Mensch
Bezeichnung	Nasenepithelzellen
Gewebe	Schleimhaut von Nasen-Nebenhöhlen
Zelltyp	Fibroblasten, untransformiert, normal
Alter	unbekannt
Geschlecht	männlich
Karyotyp	normal
Kulturmedium	RPMI 1640, 10% FCS, 1x P/S, 100µg/ml Gentamycin und dem Wachstums-Medium Kit für bronchiale Zellen
Einfriermedium	Kulturmedium mit 5% DMSO
Sicherheitsstufe	1
Kommentar	Diese Zelllinie zeigte einen nahezu identischen Phänotyp und Wachstumsrate wie die Linie AG08469
Passage	1:3, 1-2 mal wöchentlich

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Propagation von adherenten Säugerzellen

Die Zellen wurden in dem entsprechend angereicherten Kulturmedium (Zusätze siehe 2.1.1. und 2.1.11.) in 25 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und ca. 80% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank kultiviert. Abhängig von der Teilungsrate wurden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz 1-2-mal wöchentlich mittels 1 x Trypsin-EDTA abgelöst (siehe unten), in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 mit frischem, temperiertem Kulturmedium verdünnt und in eine neue Kulturflasche überführt. Bei Bedarf konnten an dieser Stelle die suspendierten Zellen auf sterile Deckgläser ausgesät werden oder eingefroren werden. Die Zellen wurden darüber hinaus routinemäßig auf Kontaminationen geprüft. Dies erfolgte durch DNA Färbung mit DAPI Färbelösung und Epifluoreszenzmikroskopie. Eine Verunreinigung mit Bakterien war auf diese Weise gut feststellbar. Mycoplasmen sind als fädige Gebilde im Zytoplasma erkennbar. Befallene Kulturen wurden sofort entfernt. Unersetzbare Klone wurden durch mehrwöchige Inkubation mit Ciprofloxacin (10 mg/l Medium) behandelt.

Trypsinierung

Das Kulturmedium wurde in einen Flüssigabfallbehälter dekantiert beziehungsweise mit einer sterilen Absaugvorrichtung abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin-EDTA versehen und 2-5 Minuten im Inkubator gelassen. Durch leichtes Klopfen auf den Boden der Kulturflasche wurden die Zellen abgenommen und mit 2-9 ml temperiertem, frischem Medium aufgenommen. Davon wurde je 1 ml in eine sterile 25 cm² Kulturflasche mit 9 ml frischem Medium überführt und durch Schwenken verteilt.

2.2.1.2. Einfrieren und Auftauen von adherenten Säugerzellen

Kryopreservation

Die Zellen wurden in einer 75 cm² Kulturflasche inkubiert, bis ca. 80% Konfluenz erreicht waren. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen in einer logarithmischen Wachstumsphase befanden und das Kulturmedium noch relativ frisch war. Verbrauchtes Medium war an einer Gelbfärbung des Indikators Phenolrot erkennbar. Nach Trypsinierung der Zellen wurden diese in ein steriles 15 ml Zentrifugalröhrchen mit 10 ml frischem Medium

überführt und 2 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 6 ml Einfriermedium aufgenommen, auf 2 ml Kryoröhrchen verteilt und sofort auf Eis inkubiert. Die Röhrchen wurden durch Inkubation bei -20°C (mehrere Stunden) und -80°C (über Nacht) stufenweise abgekühlt. Daraufhin konnten die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Es empfiehlt sich, die Überlebensrate an einem Aliquot zu testen.

Auftauen der Zellen

Das Kryoröhrchen wurde aus dem Stickstofftank entnommen und mit leicht gelöstem Deckel rasch auf 37°C überführt. Nach dem Auftauen der Zellsuspension wurde diese sofort in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Kulturmedium überführt und für 10 min bei 1000 rpm pelletiert. Die Zellen wurden nun in 10 ml frischem Medium aufgenommen, in eine Kulturflasche gegeben und in dem CO_2 Inkubator inkubiert.

2.2.1.3. Aussähen von Zellen auf Deckgläsern

Vorbereitung der Deckgläser

Rechteckige Deckgläser (21 x 26 mm) wurden an einer definierten Stelle durch Abbrechen einer Ecke markiert, mit dH_2O gereinigt und in 80% EtOH eingelegt. Anschließend wurden die Gläschen unter dem Lamina Air Flow mit einer Feinpinzette entnommen und auf eine vorgereinigte Fläche zum Trocknen gestellt.

Aussähen der Zellen

Die vollständig getrockneten Deckgläser wurden in eine Multiwell Kulturschale gelegt und mit ca. 250 μl verdünnter Zellsuspension mit einer sterilen 1 ml Pipette bestrichen. Nach einer ca. 1 stündigen Inkubation im Brutschrank (nach erfolgter Anheftung der Zellen, bei Calu-3 mehrere Stunden) wurden die Kulturschalen mit temperiertem Medium aufgefüllt.

2.2.1.4. Synchronisation

Um Zellen in definierten Stadien der S-Phase mit BrdU zu markieren, wurden diese synchronisiert. Zur Synchronisation wurden die Zellen mit Mimosin (1 μl 200 mM Mimosin-Stammlösung/ml Medium) für 16 Stunden inkubiert und somit am Beginn der S-Phase arretiert, da Mimosin die Initiation der DNA Replikation hemmt. Um die Arretierung aufzuheben, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Um früh replizierende DNA mit BrdU zu markieren, wurde die Arretierung direkt vor der

Pulsmarkierung aufgehoben. Die Bestimmung des Replikationszeitpunktes von Genen in verschiedenen Zelllinien wurde jedoch mit nicht synchronisierten Zellen durchgeführt, um eine möglichst große Repräsentation verschiedener S-Phase Stadien zu erhalten.

2.2.1.5. Applikation von DRB und TSA

Bestimmte Fragestellungen erforderten die Behandlung der Zellen mit DRB (5,6-dichloro-1- β -ribofuranosylbenzimidazole) beziehungsweise TSA (Trichostatin A). Dazu wurde von exponentiell wachsenden Kulturen das Medium in ein Falcon-Röhrchen überführt, mit der Droge versehen (Endkonzentrationen: DRB 50 μ g/ml, TSA 10 ng/ml), gemischt und wieder in die Kulturflasche gegeben. Dies verhindert eine lokale Intoxikation mit der Droge und dem entsprechenden Lösungsmittel. Die Zellen wurden anschließend für eine definierte Zeit weiterkultiviert (DRB: 5 h, TSA: 10 h) und dem jeweiligen Verwendungszweck zugeführt.

2.2.2. Replikations-Pulsmarkierung

Die Replikations-Pulsmarkierung (RPM) erlaubt die Detektion von DNA in Zellkernen, die während der S-Phase des Zellzyklus zu dem Zeitpunkt der Markierung repliziert wurde. Dazu werden zu einer exponentiell wachsenden Zellkultur markierte desoxy-Nukleotide zugegeben (Markierungs-Puls) und nach einer definierten Zeit wieder entfernt. Die Replikations-Pulsmarkierung von nicht synchronisierten Zellkulturen hat zur Folge, dass die zugesetzten, markierten Nukleotide zu verschiedenen Stadien während der S-Phase von den Zellen in nascente DNA eingebaut werden. Auf diese Weise können nach Detektion der eingebauten Nukleotide die S-Phase Stadien der Zellen an Hand der resultierenden, typischen Muster im Zellkern identifiziert werden (Berezney *et al.*, 2000; Sadoni *et al.*, 1999; Berezney *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1986; Nakayasu und Berezney, 1989; O'Keefe *et al.*, 1992). Durch Kombination der RPM mit Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) können auf diese Weise die Replikationszeitpunkte von definierten chromosomalen Sequenzen beziehungsweise Genen bestimmt werden. In dieser Arbeit erfolgte die Pulsmarkierung entweder durch Zugabe von BrdU zum Kulturmedium beziehungsweise durch das Einbringen von Fluoreszenz-markierten Nukleotiden mit Hilfe des so genannten „Scratch Replication Labelling“ (SRL) Verfahrens (Schermelleh *et al.*, 2001).

2.2.2.1. Replikations-Pulsmarkierung mit BrdU

Halogenierte Thymidin-Analoga - wie BrdU - können von kultivierten Säugerzellen direkt aus dem Kulturmedium aufgenommen und während der S-Phase in die genomische DNA eingebaut werden. Für die RPM mit BrdU wurden die Zellen dünn auf vorgereinigte Deckgläser ausgebracht und bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % mindestens 24 Stunden inkubiert. Der Markierungspuls erfolgte durch Zugabe von BrdU in einer Endkonzentration von 10 μM direkt in das Kulturmedium und einer Folgeinkubation von 30 Minuten. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit temperiertem PBS gewaschen und durch Zugabe von Formaldehydlösung fixiert (siehe Kapitel 2.2.3). Das inkorporierte BrdU konnte nun mittels Immunfärbung detektiert werden (meist mit Hilfe des Fastimmune™ Systems von Becton Dickinson, siehe Kapitel 2.2.4.1.6).

2.2.2.2. Replikations-Pulsmarkierung mit fluoreszierenden Nukleotiden (SRL)

Bemerkungen

Um Zellen schnell und einfach mit fluoreszierenden Nukleotiden zu markieren, wurde alternativ zu der Markierung mit BrdU auch das SRL Protokoll (Schermele *et al.*, 2001) angewandt. Diese Methode erlaubt die Aufnahme fluoreszierender Nukleotide in adherent wachsende Zellen mittels einer kurzzeitigen mechanischen Schädigung der Zellmembran. Mit einem Fluorophor kovalent verbundene Nukleotide können nicht ohne eine temporäre Permeabilisierung der Zellen aufgenommen werden. Die während der S-Phase inkorporierten und eingebauten fluoreszierenden Nukleotide können direkt *in vivo* durch Lebendzellmikroskopie nachgewiesen werden (Zink *et al.*, 1998, 2003; Schermelle *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde diese Methode als Alternative zur Markierung mit BrdU für die *in situ* Hybridisierung fixierter Zellen herangezogen.

Durchführung des SRL

Die Zellen wurden dünn auf vorgereinigte Deckgläser ausgebracht und bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser mit den Zellen mittels einer sterilen Feinpinzette aus den Kulturschalen entnommen, überschüssiges Medium an der Unterseite mit einem sauberen Papiertuch abgenommen und in eine neue Kulturschale gelegt. Dies verhindert ein Verrutschen des Deckglases während der folgenden Markierung. Die Markierungslösung (10 μl 20 μM Cy3-dUTP beziehungsweise 50 μM FITC-dUTP, beides verdünnt in konditioniertem Kulturmedium) wurde auf die Zellen gegeben und vorsichtig

durch Schwenken verteilt. Anschließend wurden mit der Spitze einer sterilen, hypodermischen Nadel (z.B. Braun Sterican 0,90 x 40 mm) parallele „Kratzer“ durch die Zellschicht geführt. Diese sollten in wenigen Millimeter Abstand zueinander appliziert werden. Der gesamte Vorgang sollte nur wenige Minuten dauern, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Nach Beendigung des SRL wurde die Kulturschale mit 5 ml temperiertem Medium aufgefüllt und die Zellen wurden für ca. 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit Formaldehyd fixiert.

2.2.3. Zell-Fixierung unter Erhalt der dreidimensionalen Struktur

Bemerkungen

Die Voraussetzung für eine immunocytochemische Untersuchung von zellulären Strukturen ist eine Fixierung der Zellen unter größtmöglichem Erhalt der dreidimensionalen Struktur. Eine Reihe von Fixierungsmethoden findet dabei Verwendung in der Zellbiologie. Stark quervernetzende Agenzien, wie Glutaraldehyd und Paraformaldehyd sind gut geeignet zur Stabilisierung von lang gestreckten Polymeren, wie Mikrotubuli und F-Actin. Vor allem Glutaraldehyd kann aber im Zellkern zu unerwünschten fibrillären Chromatinartefakten führen (Sadoni *et al.* 2001). Methanol-Aceton Fixativa bewirken eine besonders gute Präsentation mancher Epitope (v. a. Proteine mit Lipidassoziation), sind jedoch stark dehydratisierend und bewirken somit strukturelle Veränderungen, etwa im Zellvolumen. Für Untersuchungen der dreidimensionalen Architektur des Zellkernes, auch verbunden mit FISH, ist eine Fixierung mit Formaldehyd meist die beste Wahl. Am gebräuchlichsten ist eine 10 minütige Konservierung mit 3,7 % gepufferter Formaldehydlösung in 1 x PBS. Die alternative Verwendung von 1,5 % Fixierlösung über einen längeren Zeitraum (mindestens 20 Minuten) soll eine spätere Penetration mit DNA-Sonden erleichtern. Dies konnte jedoch in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

Durchführung

Die Zellen wurden dünn auf Deckgläser ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 50–70 % mindestens 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium abgenommen und vorsichtig mit temperiertem PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch Zugabe von Formaldehydlösung (3,7 % in 1 x PBS) und 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) unter leichtem Schwenken. Das Fixativ wurde durch 3-maliges Waschen (je 3 Minuten) mit PBS wieder entfernt und die Präparate konnten in PBS mehrere Tage bei 4°C gelagert

werden. Bei längerer Lagerung ist die Zugabe von Natriumazid (0,04%) empfehlenswert. Während des gesamten Vorgangs wurde darauf geachtet, dass die Zellen nie trocknen und stets isotone Puffer und Lösungen verwendet wurden, um Veränderungen im Zellvolumen zu minimieren.

2.2.4. Immunfärbung

Bemerkungen

Die Immunfärbung zellulärer Strukturen folgt prinzipiell folgendem Ablauf: Die Zellen werden fixiert und permeabilisiert; unspezifische Bindungsstellen auf dem Präparat werden durch bovines Serum-Albumin (BSA) abgesättigt. Mit dem primären Antikörper werden im nächsten Schritt die interessierenden Proteine beziehungsweise markierten Nukleinsäuren in den Zellen gebunden. Der folgende Waschschrift entfernt ungebundene Antikörper. Der sekundäre Antikörper erkennt die nicht variable Region des ersten Antikörpers (ist folglich Spezies-spezifisch) und ist in der Regel fluoreszenzmarkiert. Nach einem weiteren Waschschrift kann dieser im Fluoreszenz-Mikroskop detektiert werden.

Permeabilisierung und Blockierung

Fixierte Präparate (siehe Kapitel 2.2.3.) wurden zunächst 10 Minuten bei RT unter leichtem Schwenken mit PBSTT inkubiert. Dies führt zu einer Permeabilisierung der Lipidmembranen und ermöglicht das Eindringen der Antikörper. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurden die Präparate im Anschluss 30 Minuten mit PBSTT-BSA Blockinglösung inkubiert.

Antikörper-Detektion

Die Inkubationen mit dem primären und sekundären Antikörper (AK) wurden in einer mit feuchten Papiertüchern ausgelegten Metallbox (bei 37°C im Wasserbad) durchgeführt. Dazu wurden gereinigte, trockene Objektträger auf zwei parallele Einmalpipetten gelegt (kein Kontakt zu den feuchten Tüchern) und darauf ca. 50 – 100 µl Antikörperlösung (AK nach Vorschrift in PBSTT-BSA verdünnt) pipettiert. Auf diesen Tropfen wurden nun vorsichtig die Präparate mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Die Lösung sollte sich möglichst ohne Einschluss von Luftblasen unter dem Deckglas verteilen.

Waschen

Nach jeder Inkubation (primärer AK: 90 Minuten, sekundärer AK: 60 Minuten) wurden die Deckgläser vorsichtig seitlich von den Objektträgern geschoben und mit den Zellen nach oben in eine saubere Kulturschale mit PBSTT gelegt und 3 mal 5 Minuten unter Schwenken bei RT gewaschen. Bei dem Austausch der Waschlösung wurde darauf geachtet, diese nicht direkt auf die Zellen zu applizieren. Bei Kombination verschiedener primärer Antikörper ist zu beachten, dass diese aus verschiedenen Spezies stammen müssen, um eine getrennte Detektion mit den sekundären Antikörpern zu erlauben.

Gegenfärben und Eindeckeln

Nach dem letzten Waschschrift wurde meist noch die DNA gefärbt (mit DAPI oder TOPRO-3, 1:5000 beziehungsweise 1:1000 verdünnt in PBS). Nach dem Entfernen ungebundener Farbstoffreste durch Waschen mit PBS wurden die Deckgläser aus den Schalen entnommen und überschüssige Flüssigkeit mit einem fusselreien Tuch (Kimwipe Science) entfernt. Die Zellseite sollte dabei nicht berührt und keinesfalls trocken werden. Anschließend wurden die Deckgläser mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger mit einem Tropfen (20 µl) Antifade (Vectashield) gelegt. Das Mountingmedium sollte sich gleichmäßig unter dem Deckglas verteilen. Zum Schluss wurde dieses mit etwas klarem Nagellack an den Rändern fixiert und nach dem Aushärten im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Besonderheiten bei dem Nachweis von inkorporiertem BrdU

Die immunologische Detektion von BrdU-markierter zellulärer DNA erfordert eine vorherige Denaturierung der DNA. Dies erfolgt entweder durch Zugabe von HCl (10 Minuten Inkubation in 2 M HCl, RT) oder durch verdünnte DNase-Lösung. Die Verwendung von HCl resultiert zwar in sehr intensiven Färbungsmustern, beeinflusst jedoch die Struktur des Zellkerns und des Chromatins sehr stark (Sadoni *et al.*, 2001). Eine strukturelle und räumliche Analyse verbietet sich bei dieser Methode. Daher wurde dieser Nachweis lediglich zur Bestimmung des S-Phase Anteils einer zyklisierenden Zellkultur durchgeführt. Die Detektion von inkorporiertem BrdU mit einem Gemisch aus DNaseI und Anti-BrdU-FITC Konjugaten (Fastimmune™, Becton-Dickinson) im Anschluss an eine Immunfärbung beziehungsweise Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (dreidimensionale-FISH) führte dagegen zu keinen erkennbaren strukturellen Veränderungen.

2.2.5. Zell-Fixierung nach hypotoner Behandlung mit Methanol/Eisessig

Bemerkungen

Die Fixierung kultivierter Zellen mittels Methanol/Eisessig erlaubt eine relativ zügige und saubere Präparation von Metaphase-Chromosomen und Interphase-Zellkernen. Allerdings werden bei dieser Methode Proteine stark denaturiert beziehungsweise entfernt, DNA dehydratisiert und Interphase Kerne stark abgeflacht. Eine nachfolgende FISH kann jedoch relativ rasch und unproblematisch durchgeführt werden und durch Epifluoreszenzmikroskopie zügig ausgewertet werden. Der Gebrauch dieser Methode ist durch die Verfälschung der dreidimensionalen Struktur nur in bestimmten Fragestellungen und nur unter Anwendung geeigneter Kontrollen empfehlenswert. In dieser Arbeit wurden auf diese Weise Informationen über die Lokalisation verschiedener Gene in zahlreichen Zelllinien gewonnen, welche durch die entsprechenden Kontrollen (3D-FISH, Immuno-FISH) interpretiert werden konnten.

Zellernte

Exponentiell wachsende Zellen wurden in einer 75 cm² Kulturflasche bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Optional kann für eine Anreicherung von Metaphasen Colchicin (0,1 µg/ml) in das Kulturmedium gegeben und die Zellen für weitere 30-45 Minuten inkubiert werden. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und 5 Minuten bei 1000 rpm in 10 ml frischem Medium in einem 50 ml Falcon Röhrchen pelletiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 5 ml abgenommen und die Zellen vorsichtig in dem Röhrchen resuspendiert.

Hypotone Behandlung

Zu der Zellsuspension wurden tropfenweise unter leichtem Schütteln 10 ml hypotone KCl Lösung (60 mM, 37°C) hinzu gegeben. Dies muss sehr vorsichtig geschehen, da die Zellen bei diesem Schritt sehr leicht platzen und verklumpen. Es kann auch bei niedriger Stufe gevortext werden. Nun wurde bis zu einem Volumen von 30 ml mit KCl Lösung langsam aufgefüllt und die Suspension ca. 18-20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dies bewirkt ein Quellen der Zellen (incl. der Zellkerne) durch Wasseraufnahme.

Fixierung

Zunächst wurden zu der Suspension 5 ml eiskaltes Fixativ (Methanol/Eisessig 3:1) vorsichtig unter Schwenken tropfenweise zugegeben (Farbwechsel!). Auch hier kann es leicht zum Verklumpen der Zellen kommen. Anschließend wurden die Zellen 7 Minuten bei 1100 rpm

(RT) pelletiert, der Überstand wurde bis auf ca. 5 ml abgenommen und die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde nun mit eiskaltem Fixativ wiederum bis zu einem Volumen von 30 ml unter Schwenken aufgefüllt und die Zellen wurden 7 Minuten bei 1500 rpm (RT) pelletiert. Der Überstand wurde bis auf 5 ml abgenommen, das Pellet wurde resuspendiert, mit Fixativ auf 30 ml aufgefüllt und erneut pelletiert. Dieser Schritt wurde ca. 3- 4-mal wiederholt bis die Präparate eine zufrieden stellende Reinheit aufwiesen. Um dies zu überprüfen wurden ca. 50 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetropft und nach dem Trocknen unter einem Phasenkontrastmikroskop überprüft. Die Zellen sollten frei von Verunreinigungen sein (verklumpte Zellen, Zellfetzen, etc.). Das Zytoplasma sollte sehr hell beziehungsweise vollständig entfernt sein.

Vorbemerkungen zur Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die nachfolgenden Abschnitte beschäftigen sich mit der Vorbereitung, Durchführung und Detektion der FISH. Die *Vorbereitung* umfasst dabei zwei Teile: Zum einen die Herstellung geeigneter Zellpräparate. In dieser Arbeit wurden die Zellen entweder mit Formaldehyd (3D-FISH) beziehungsweise mit Methanol/Eisessig (2D-FISH) fixiert. Die beiden Fixierungsmethoden erfordern jeweils eine leicht modifizierte Durchführung der FISH. Zum anderen müssen spezifische DNA-Sonden generiert werden. Die *Durchführung* der Hybridisierung besteht im Wesentlichen aus der Denaturierung der zellulären- und Sonden-DNA und der folgenden spezifischen Hybridisierung dieser Nukleinsäuren. Die *Detektion* spezifisch gebundener DNA-Sonden ist wiederum abhängig von der Art der verwendeten Sonde. Fluoreszenz-markierte Sonden können direkt mikroskopisch detektiert werden, während Hapten-markierte Sonden (Biotin oder Digoxigenin) durch geeignete Antikörper nachgewiesen werden.

2.2.6. Vorbereitung von Formaldehyd-fixierten Präparaten für die FISH

Bemerkungen

Eine Grundlegende, in dieser Arbeit verwendete Methode ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von fixierten Zellpräparaten mit erhaltener dreidimensionaler Struktur (3D-FISH). Diese wurde entweder direkt mit fixierten Zellen oder nach Immunfärbung beziehungsweise Replikationsmarkierung durchgeführt. Die Detektion von inkorporiertem BrdU erfolgte dabei generell **nach** der *in situ* Hybridisierung, in der Regel mit einem Gemisch aus DNaseI und Anti-BrdU-FITC Konjugat (Fastimmune™, Becton-Dickinson). Die

Immunfärbung anderer Antigene wurde immer **vor** der *in situ* Hybridisierung vorgenommen, da diese stark denaturierend wirkt und somit manche Epitope nicht mehr detektierbar sind. Außerdem wurden immungefärbte Präparate vor der *in situ* Hybridisierung nochmals mit Formaldehyd fixiert.

Fixierung und Permeabilisierung

Adherente Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und nach 24 - 48 Stunden Inkubation mit Formaldehyd fixiert (siehe Kapitel 2.2.3). An dieser Stelle kann bei Bedarf eine Immunfärbung mit anschließender erneuter Fixierung durchgeführt werden. Anschließend wurden die Präparate 2 mal 5 Minuten in PBSTS geschwenkt. Dieser Permeabilisierungsschritt ist nicht erforderlich, falls die Präparate immungefärbt wurden. Die Deckgläser wurden aus der Waschlösung entnommen, direkt in PBS mit 20 % Glycerin überführt und mindestens 20 Minuten bei RT (auch über Nacht bei 4°C) inkubiert. Dies verhindert die Bildung von Eiskristallen im folgenden „freeze-thaw“ Schritt. Dazu wurden die Präparate mit der Pinzette aus der Glycerinlösung entnommen und je 3 mal 5 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Es wurde darauf geachtet, dass die Deckgläser nach jedem Einfrier-Schritt vollständig in Glycerinlösung wieder auftauten („freeze-thaw“). Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Präparate 15 Minuten bei RT in wässriger Natriumthiocyanatlösung (1 M NaSCN in dest. Wasser) äquilibriert und anschließend in frischer NaSCN-Lösung über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

RNase und Pepsin Verdau

Nach der NaSCN-Inkubation wurden die Präparate 3 mal 5 Minuten in 2 x SSC Lösung (37°C) gewaschen und eine Stunde bei 37°C mit 100 µl RNase-Lösung auf einem Objektträger inkubiert. Der enzymatische Verdau von zytoplasmatischen und nukleären RNAs reduziert störende Hintergrundsignale bei der *in situ* Hybridisierung. Die RNase Lösung wurde durch dreimaliges kurzes Waschen in 2 x SSC bei RT entfernt. Anschließend wurden die Präparate kurz in destilliertem Wasser gespült und in Pepsinlösung (20 µl Pepsin-Stammlösung in 50 ml 10 mM HCl, 37°C) inkubiert. Der enzymatische Abbau des Zytoplasmas sollte unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert werden und nur solange durchgeführt werden (ca. 2-4 Minuten) bis eine Aufhellung des Zytoplasmas sichtbar ist. Dieser Schritt ist optional und sollte nur bei Zelllinien mit großem Anteil von Zytoplasma und extrazellulärer Matrix (Calu-3, primäre Fibroblasten) durchgeführt werden. Der Pepsin-Verdau wurde durch Spülen mit PBS-Mg gestoppt und die Zellen wurden 10 Minuten in 1 %

Formaldehydlösung (in PBS-Mg) postfixiert. Anschließend wurden die Präparate kurz mit 2 x SSC äquilibriert und mindestens 3 Nächte in Formamidlösung (50 % Formamid in 2 x SSC) bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dies bewirkt ein weiteres „Aufweichen“ der zellulären Strukturen und erleichtert die Denaturierung chromosomaler DNA bei der folgenden FISH.

2.2.7. Vorbereitung von Methanol/Eisessig-fixierten Präparaten für die FISH

Auftropfen

Zunächst wurde die Zellsuspension (aus Protokoll 2.2.5), abhängig von der gewünschten Zelldichte, auf ein bestimmtes Volumen eingengt (meist ca. 2-5 ml). Die Zelldichte lässt sich am besten nach Auftropfen einer kleinen Menge (50 µl) auf einen Objektträger unter dem Phasenkontrast-Mikroskop abschätzen. Ist die Zelldichte zu gering, lohnt sich eine FISH meist nicht. Vor dem Auftropfen der eigentlichen Präparate wurden die Objektträger mit einem Ethanol/Ether Gemisch (1:1) entfettet, unter fließendem destilliertem Wasser gespült und in destilliertes Eiswasser gestellt. Die feuchten und kalten Objektträger wurden leicht schräg am ausgestreckten Arm nach unten gehalten und wenige Tropfen der Zellsuspension (ca. 50-100 µl) wurden auf den Objektträger gleichmäßig getropft (Abstand 30-40 cm). Dieser wurde anschließend sofort leicht geschüttelt um die Suspension zu verteilen und zum Trocknen bei RT schräg auf ein Papiertuch gestellt. Vollständig getrocknete Präparate wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop begutachtet.

Reinigung

Ungenügend saubere Präparate sind an einem Zytoplasmahof um die Zellkerne erkennbar („Spiegelei-Morphologie“). Um anhaftende Zytoplasmareste zu entfernen, wurden die Zellen entweder wiederholt mit Fixativ gewaschen (siehe oben) oder nach dem Auftropfen kurz vor dem Antrocknen für wenige Sekunden in Essiglösung (70 % Eisessig in dest. Wasser) gehalten. Durch saure Hydrolyse konnten auf diese Weise sehr effizient Proteinreste entfernt werden. Zum Teil führte dies aber auch zum Ablösen ganzer Zellkerne und mitotischer Chromosomen. Eine weitere Möglichkeit war, die Präparate wenige Minuten in Pepsinlösung (20 µl Pepsin in 50 ml 37°C warme 10 mM HCl) zu inkubieren. Der Pepsin-Verdau sollte unter dem Phasenkontrast-Mikroskop beobachtet werden. Nach deutlichem Aufhellen des Zytoplasmas wurden die Präparate mit destilliertem Wasser gespült.

„Altern“ der Präparate

Saubere Präparate wurden nun in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dazu wurden die Objektträger jeweils 3 Minuten in eine Küvette mit eiskaltem 70 % - 80 % - und 90 % - Ethanol getaucht und anschließend zum Trocknen schräg auf ein Papiertuch gestellt. Die getrockneten Präparate wurden entweder über Nacht bei 37°C oder 1 Stunde bei 60°C im Trockenschrank „gealtert“. Dies führte, zusammen mit der Reinigung der Präparate, zu wesentlich besseren Ergebnissen in der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung.

2.2.8. Vorbereitung von DNA Sonden für die FISH

Bemerkungen

Der Nachweis genomischer DNA-Sequenzen in Zellkernen beziehungsweise auf Metaphase-Chromosomen erfolgte durch Hybridisierung mit spezifischen, markierten DNA Sonden. Diese wurden entweder durch DOP-PCR, (inter-)Alu-PCR oder Nicktranslation generiert. Die Wahl der Markierungsreaktion resultierte aus empirischen Erfahrungen. Dabei waren die Markierungseffizienz und die spezifische Hybridisierungseffizienz der markierten Sonden mit der genomischen DNA entscheidend für die Wahl der Markierungsreaktion. Als Template für die Markierungsreaktion wurden PACs und BACs herangezogen, deren Insert homolog zu der zu detektierenden Sequenz war. Eine weitere Methode war, durch Long-Range PCR (LR-PCR) von PACs Gen-spezifische Stücke zu amplifizieren und diese durch DOP-PCR zu markieren. Sonden für einzelne Chromosomen beziehungsweise Chromosomen-Territorien („Painting-Proben“) wurden durch PCR-Markierung von geeigneten Templates generiert. Painting-Proben sortierter Chromosomen wurden in dieser Arbeit durch Dr. Stefan Müller, LMU München zur Verfügung gestellt. In der Markierungsreaktion wurde ein Teil der Mononukleotide durch Fluorophor- (FITC-/ Cy3-/ Cy5-dUTP) oder Hapten- (Biotin-/ Digoxigenin-dUTP) gekoppelte Nukleotide ersetzt. Hapten-markierte Nukleotide sollten in einer definierten, nicht zu hohen Konzentration in der resultierenden Sonde vorhanden sein, um eine sterische Hinderung während der anschließenden Detektion durch Antikörper beziehungsweise Konjugate zu vermeiden.

2.2.8.1. DOP- und Alu-PCR

Mittels DOP-PCR („degenerative oligonucleotide primer PCR“) (Telenius *et al.*, 1992) lassen sich spezifische DNA-Sonden für die *in situ* Hybridisierung amplifizieren und markieren. Durch die Wahl gering stringenter Bedingungen bei der DOP-PCR Reaktion und den Einsatz

eines Primers (6MW), der eine partiell degenerierte (randomisierte) Nukleotidsequenz enthält, werden aus der Probe statistisch verteilt Sequenzen amplifiziert, die in ihrer Summe theoretisch die gesamte eingesetzte DNA als überlappende Fragmente repräsentieren. Mit dieser Methode wurden Sonden für GASZ und CORTBP2, sowie für Chromosom 7 generiert. Eine weitere Markierungs-Methode ist die inter-Alu-PCR (Lengauer *et al.*, 1992a; Lengauer *et al.*, 1992b). Ein großer Teil des humanen Genoms besteht aus repetitiven Sequenzen unterschiedlicher Länge. Alu-Sequenzen gehören zu der Familie der SINES (short interspersed repetitive elements) und zeichnen sich durch eine Länge von ca. 300 bp und eine Konsensus-Sequenz aus (Brookfield, 1994). Diese Sequenz wird durch das Restriktionsenzym AluI erkannt. Durch die Verwendung von Alu-spezifischen Primern (C11) können humane DNA Abschnitte zwischen den Alu Sequenzen sehr effizient amplifiziert und somit markiert werden. Allerdings wird durch die Amplifizierung repetitiver Sequenzen das zu markierende Template nicht absolut gleichmäßig markiert. Dadurch enthält das PCR-Produkt oft einige dominante Banden, die meist Vielfachen von Alu Bereichen (300bp) entsprechen. Außerdem wird durch die Amplifizierung repetitiver Anteile die Verwendung kompetitiver DNA (Cot-1) in der Hybridisierungsreaktion absolut notwendig, da ansonsten Alu-Sequenzen auf allen Chromosomen detektiert würden (Lichter *et al.*, 1988). In dieser Arbeit wurde die DNA-Sonde für CFTR durch inter-Alu-PCR des PACs CF1 hergestellt. Sowohl die DOP-PCR (Primer 6MW), als auch die inter-Alu-PCR (Primer CL1) wurden mit demselben PCR-Programm durchgeführt.

Pipettierschema

Lösung	Volumen (µl)
Aqua Ultrapure	31,2
10 x PCR Puffer (Roche)	5
Primer (50 µM) 6MW / C11	4
dATP/dGTP/dCTP Mix (5mM)	2
dTTP (5mM)	1,3
markiertes desoxy-Nukleotid (1mM) *	3,5
Template (siehe rechts) #	2
Taq DNA Polymerase (Roche)	1
Total	50

Sonde für	Template
GASZ	LR-PCR von PAC CF3
CFTR	PAC CF1
CORTBP2	LR-PCR von PAC CF7
Chr. 7	Painting Probe Chr. 7

* Genproben wurden bevorzugt mit Biotin-dUTP markiert; bei „dual-color“-FISH Experimenten wurde die zweite Sonde mit Digoxigenin-dUTP markiert. Painting-Proben wurden direkt fluoreszenzmarkiert (meist FITC-dUTP oder Cy- 5-dUTP).

Die Konzentration des verwendeten Templates sollte ca. 10 ng/µl betragen.

PCR-Programm

Zyklus	Phase	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1	Denaturierung	95°C	5 Minuten	1
2	Denaturierung Anlagerung Elongation	95°C 32°C 72°C	1 Minute 1 Minute 3 Minuten	5
3	Denaturierung Anlagerung Elongation	95°C 62°C 72°C	1 Minute 1 Minute 3 Minuten	35
4	Finale Elongation	72°C	5 Minuten	1
5	Kühlen	4°C	beliebig	1

2.2.8.2. PCR-Amplifikation humaner perizentrischer α -Satelliten-Repeats

Ein wesentlicher Bestandteil menschlicher perizentrischer DNA sind α -Satelliten-Repeats. Diese komplexe Familie repetitiver Sequenzen macht annähernd 5% des menschlichen Genoms aus und besteht aus einer tandemartigen Anordnung 171 Basenpaare langer Monomere (Gray *et al.*, 1985). In dieser Arbeit wurde markierte α -Satelliten DNA als DNA-Sonde für perizentrische Bereiche bei der FISH eingesetzt. Dazu wurde α -Satelliten DNA aus genomischer DNA zunächst ohne den Einsatz markierter Nukleotide amplifiziert und gereinigt (Qiagen PCR Purification Kit). Dieses gereinigte PCR-Produkt wurde in einer weiteren PCR-Reaktion mit Digoxigenin-dUTP markiert.

Pipettierschema

Lösung	Volumen (μ l) PCR1 / PCR2
Aqua Ultrapure	34 / 31,2
10xPCR Puffer (Roche)	5 / 5
Primer PAN-A (20 μ M)	2 / 2
Primer PAN-D (20 μ M)	2 / 2
dATP/dGTP/dCTP Mix (5mM) *	2 / 2
dTTP (5mM) *	2 / 1,3
Digoxigenin-dUTP (1mM) *	0 / 3,5
Template: genomische humane DNA/ gereinigtes PCR-Produkt *	2 / 2 (ca. 100 ng)
Taq DNA Polymerase (5U/ μ l, Roche)	1 / 1
Total	50

* In der ersten PCR-Reaktion (PCR1) wurden ausschließlich nicht markierte desoxy-Nukleotide eingesetzt. Nach der Reinigung des PCR-Produktes wurde dieses als Template eingesetzt und unter Verwendung von Digoxigenin-dUTP in einer weiteren PCR-Reaktion (PCR2) markiert. Die PCR-Bedingungen waren identisch.

PCR-Programm

Zyklus	Phase	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1	Denaturierung	95°C	5 Minuten	1
2	Denaturierung Anlagerung Elongation	95°C 54°C 72°C	1 Minute 1 Minute 2 Minuten	15
4	Finale Elongation	72°C	5 Minuten	1
5	Kühlen	4°C	beliebig	1

2.2.8.3. Nicktranslation

Ein Gemisch aus DNase I und DNA-Polymerase („Klenow Enzym“) setzt enzymatisch Einzelstrangbrüche in den Template-Strang, verdaut einen Teil des Doppelstrangs und füllt diesen mit desoxy-Nukleotiden wieder auf. Auf diese Weise lassen sich durch Zugabe von markierten Nukleotiden spezifische Sonden generieren, deren Länge abhängig ist von dem Mischungsverhältnis der Enzyme, der Reaktionstemperatur und Reaktionsdauer. Eine durchschnittliche Länge der erzielten Sonden von 500 bp erwies sich als optimal für die *in situ* Hybridisierung. Da es sich bei dieser Reaktion - im Gegensatz zu der PCR - um keine exponentielle Amplifizierung von DNA Molekülen handelt, mussten wesentlich größere Mengen an Template eingesetzt werden. Mit dieser Methode wurden Sonden für den humanen β -Globin Locus generiert.

Pipettierschema

Lösung	Volumen (μ l)
Aqua Ultrapure	variabel
dNTP Mix minus dUTP (5mM) (Invitrogen BIONICK Kit)	2
Digoxigenin-/ Biotin-dUTP (1mM)	1
Template: BAC 305	2 (ca. 100 ng)
Enzym Mix (Invitrogen BIONICK Kit)	5
Total	50

Reaktionsbedingungen

Der Ansatz wurde in einem PCR-Reaktionsgefäß zusammengefügt und in einem PCR Gerät 2 Stunden bei 15°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 60°C für 10 Minuten beendet und der Ansatz bei -20°C gelagert.

2.2.8.4. Kontrolle der markierten DNA-Sonden

Die Güte der eingesetzten Sonden ist von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der *in situ* Hybridisierung. Wichtige Faktoren sind die Sequenzhomologie, die Länge der Sondenfragmente und die Markierungseffizienz. Die Homologie zu der zu detektierenden Sequenz wird durch die Reinheit des Templates definiert. Die optimale Länge von ca. 200bp bis 700bp wurde bei der Nicktranslation durch die Wahl der Reaktionsbedingungen bestimmt (siehe dort). Die Markierung durch PCR führte jedoch meist zu wesentlich längeren Fragmenten. Diese wurden daher im Anschluss an die PCR noch enzymatisch degradiert.

Längenbestimmung der PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese

Jeweils 5 µl PCR-Produkt wurden mit 1 µl 6x Auftragspuffer (Fermentas) versehen und auf ein 1% Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetragen. Nach 45 Minuten Elektrophorese bei 100 Volt wurde das Gel entnommen und auf einem UV Transilluminator abfotografiert. Als Standard diente ein Größenmarker (Mass Ruler, Fermentas) mit dessen Hilfe sich die Größe und Menge der eingesetzten DNA abschätzen ließ (Abb. 1).

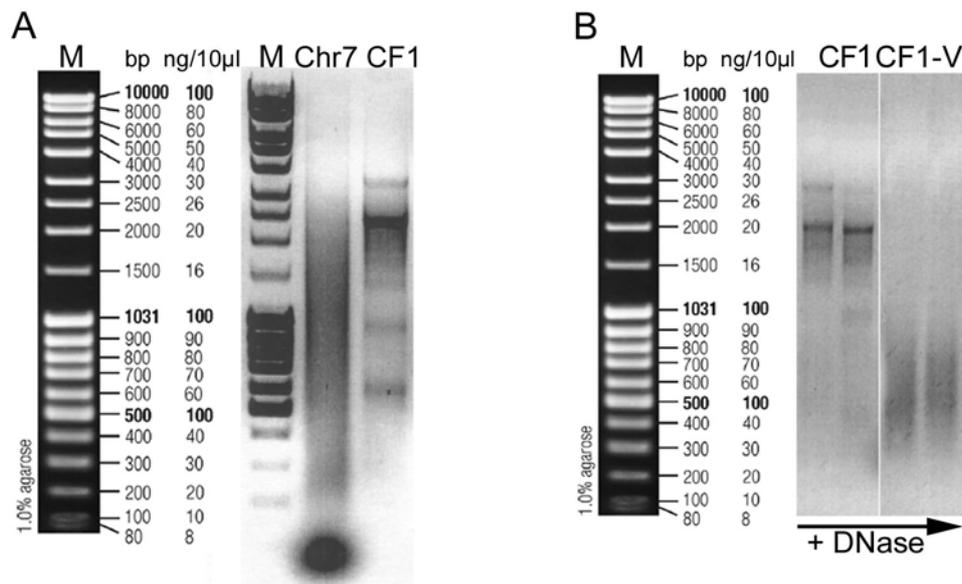


Abbildung 1: **Agarose-Gelelektrophorese von markierten DNA Sonden.** Es wurden je 5 µl PCR Produkt beziehungsweise Nuklease-Verdau mit 1 µl 6 x Auftragspuffer vermischt und zusammen mit einem Marker (M: Mass Ruler, Fermentas) auf ein 1% Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetragen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese (45 min bei 100 Volt) auf dem UV-Schirm abfotografiert. (A) Die DOP-PCR von Chromosom 7 (Chr7) resultiert in einer Vielzahl von Fragmenten unterschiedlicher Länge, erkennbar an dem typischen „DNA-Schmier“. Der niedermolekulare und stark fluoreszierende Bereich besteht aus nicht inkorporiertem FITC-dUTP. Die Markierung des PACs CF1 (CF1) mit Biotin-dUTP durch Alu-PCR resultiert in einigen hoch- und nieder-molekularen Banden (besonders dominant bei 0,6, 0,9, 2,1 und 3 kbp) und weiteren Fragmenten unterschiedlicher Länge. (B) Das linke Gel zeigt je ein Aliquot einer Markierung des PACs CF1 von parallelen Aufreinigungen (CF1). Das linke PCR Produkt weist einen etwas stärkeren Anteil im hochmolekularen Bereich auf. Dies ist ein Indiz für eine höhere Integrität des verwendeten PACs. Beide PCR Produkte eignen sich jedoch für die *in situ* Hybridisierung. Das rechte Gel zeigt den Nuklease-Verdau (CF1-V) der beiden PCR Produkte. Die daraus resultierenden niedermolekularen Fragmente sind ideal für eine *in situ* Hybridisierung.

Enzymatische Degradation der PCR-Produkte

Die Markierung des PACs CF1 durch Alu-PCR führte meist zu einigen hochmolekularen Banden (2,1 kbp und 3 kbp) und einem niedermolekularen Anteil. Vor allem die hochmolekularen Bereiche der Sonde können in der *in situ* Hybridisierung zu unerwünschten Hintergrundsignalen führen. Durch endonukleolytische Degradation mittels eines häufig schneidenden Restriktionsenzym konnten diese Fragmente meist bis auf Längen unter 1000bp verkleinert werden. Falls die Sonde auf einem Agarosegel noch zu große Anteile aufwies (>>800 bp) wurde eine weitere Degradation durch Inkubation mit DNase I erreicht. Im Einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

Zunächst wurde das PCR-Produkt 60 Minuten bei 37°C mit den Restriktionsenzymen PdmI und AluI (Fermentas, Puffer Tango, je 1,5 µl Enzym / 50 µl Ansatz) verdaut. Falls es erforderlich war, wurde das Produkt anschließend durch Zugabe von 5 µl DNase I Lösung und 5 µl 10x DNase-Puffer (Invitrogen, DNaseI Stammlösung vorher 1:100 in dest. Wasser verdünnen) maximal 4 Minuten bei RT weiter degradiert und sofort auf Eis gestellt. Meist konnte auf diese Weise die Länge der Fragmente auf ein geeignetes Maß reduziert werden. Generell ist darauf zu achten, den DNase Verdau nur sehr kurz durchzuführen und die Fragmente entweder sofort für eine Ethanol Präzipitation einzusetzen oder diese bei -20°C einzufrieren, um eine weitere Degradation der Sonden zu vermeiden. Sonden für Chromosom 7 mussten trotz ihrer Größe nicht verdaut werden. Eine Verkleinerung der Painting-Proben ergab kein verbessertes Signal zu Hintergrund Verhältnis. DOP-PCR Produkte von GASZ und CORTBP2 mussten auf Grund ihrer geringen Länge ebenfalls nicht verdaut werden.

Bestimmung der Markierungseffizienz

Der erfolgreiche Einbau Hapten-markierter Nukleotide in die Sonden wurde mittels Dot-Blot überprüft. Dazu wurden die markierten Sonden zunächst über eine Säule (Qiagen PCR Purification Kit) von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt und eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:10 bis 1:10000 in dest. Wasser). Je 1µl der einzelnen Verdünnungsschritte wurde auf eine Nylonmembran (positiv geladen) aufgetropft und 30 Minuten bei 80°C im Trockenofen immobilisiert. Anschließend wurden die Membranen in einer Petrischale zunächst kurz mit Puffer AP1 äquilibriert und für 10 Minuten in Puffer AP2 (3 % BSA) abgesättigt. Biotin-markierte Sonden wurden durch Inkubation mit Streptavidin-alkalische-Phosphatase Konjugaten (1:1000 in AP2) 30 Minuten bei RT unter Schwenken detektiert. Digoxigenin-markierte Sonden wurden durch anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase (1:5000 in AP2) nachgewiesen. Ungebundene Konjugate beziehungsweise Antikörper wurden

durch Waschen in Puffer AP1 (3 mal 5 Minuten) entfernt. Die Membranen wurden anschließend kurz in AP3 äquilibriert (basischer pH Wert für die Färbung erforderlich) und für 5 bis 60 Minuten im Dunkeln in NBT/BCIP Färbelösung gelegt. Nach ausreichender Färbung wurden die Membranen in destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Ein deutliches Signal bei einer Verdünnung von 1:1000 ist ein Indiz für eine gute Markierungseffizienz (Abb. 2).

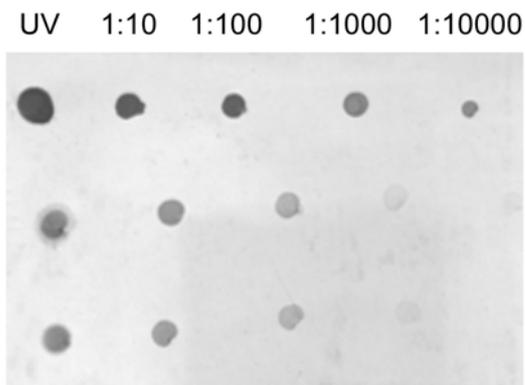


Abbildung 2: **Dot-Blot verschiedener Sonden**
Auf eine Nylonmembran wurden Verdünnungsstufen (UV: unverdünnt und Verdünnungen 1:10 bis 1:10000) von 3 verschiedenen Sonden aufgetragen. Die NBT/BCIP Färbelösung wird durch die alkalische Phosphatase zu einem schwarzen Farbstoff umgesetzt. Die Intensität der Färbung ist proportional zu der Menge an markierten Nukleotiden (hier: Digoxigenin-dUTP). Nur die erste Sonde (obere Reihe) besitzt eine ausreichende Markierungseffizienz und ist geeignet für die *in situ* Hybridisierung.

2.2.8.5. Fällung des Hybridisierungsansatzes

Der Hybridisierungsansatz besteht aus der markierten DNA-Sonde, hochrepetitiver Cot-1 DNA und kompetitiver Hering-Sperma-DNA in einer Lösung aus 10 % Dextransulfat, 1xSSC und 50 % deionisiertem Formamid. Die Zugabe von Cot-1 DNA verringert die unerwünschte Hybridisierung der Sonde mit repetitiven Sequenzen im humanen Genom (Lichter *et al.*, 1988). Hering-Sperma-DNA sättigt unspezifische DNA-Bindungsstellen ab. Um den Ansatz in der gewünschten Konzentration einzustellen, wurden die DNA-Bestandteile mittels Ethanol-Präzipitation gefällt (2h, -20°C) und anschließend in Formamid und Hybridisierungsmastermix gelöst.

Fällungsansatz

Lösung	Volumen (µl)
Gen-Sonde	ca. 15-30 (300-500 ng)
Chromosomen-Sonde (Chr. 7)	ca. 20-30 (ca. 500 ng)
Cot-1 DNA (1mg/ml)	30
Hering Sperma DNA (10 mg/ml)	10
	Σ A
Natriumacetat (3M)	1/10 Σ A
	Σ B
Ethanol absolut reinst	2,5 x Σ B

Dieser Ansatz ist beispielhaft und variiert erfahrungsgemäß je nach eingesetzter Sonde.

Der Ansatz wurde gevortext, mindestens 2 Stunden bei -20°C präzipitiert und 40 Minuten bei 13000 rpm/ 4°C pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in dem 2-fachen Volumen 80 % Ethanol (reinst, 4°C) gewaschen, nochmals 20 Minuten bei 13000 rpm/ 4°C pelletiert und der Überstand abgenommen. Nach kurzem Trocknen des gereinigten Pellets (maximal 5 Minuten bei 37°C) wurde dieses in 10 μl Formamid (deionisiert, reinst) aufgenommen und mindestens 30 Minuten im Schüttler bei 42°C resuspendiert. Es ist darauf zu achten, dass eine homogene Lösung erreicht wird. Vor allem zu stark getrocknete Pellets lösen sich sehr schwer. Anschließend wurden 10 μl des vorgewärmten Hybridisierungs-Mastermix zugegeben und für weitere 10 Minuten geschüttelt.

2.2.9. Durchführung der FISH

Denaturierung der DNA Sonde

Zunächst wurde unter dem Abzug ein Wasserbad auf 75°C vorgeheizt. Die vorbereiteten Sonden (gelöst im Hybridisierungs-Mastermix) wurden für 7 Minuten im Wasserbad denaturiert, kurz (3 Sekunden) abzentrifugiert und in einen 42°C Block überführt. Dort wurden sie weitere 20-30 Minuten inkubiert. In dieser Zeit hybridisieren repetitive Bereiche der Sonde mit der Cot-1 DNA Fraktion (Prähybridisierung).

Hybridisierung von Methanol/Eisessig-fixierten Präparaten

Während der Prähybridisierung der Sonden mit der Cot-1 DNA wurden die fixierten, gereinigten und gealterten Zellpräparate (siehe Kapitel 2.2.6.3) auf den Objektträgern denaturiert. Dazu wurden die Objektträger mit den Präparaten in eine auf 75°C vorgewärmte Küvette mit Denaturierungslösung gestellt und 3 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger entnommen, überschüssige Lösung abgenommen und für jeweils 3 Minuten in Küvetten mit 70 % - 80 % - 90 % eiskaltem Ethanol (reinst) überführt und luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Präparate auf der Wärmeplatte (42°C) vorgewärmt und 10 μl der prähybridisierten Sonde berührungsfrei aufgetropft. Auf den Tropfen wurde ein Deckglas (15x15 mm) gelegt und dieses an den Rändern mit Fixogum versiegelt. Die Sonde verteilt sich dabei gleichmäßig unter dem Deckglas. Der Hybridisierungsansatz wurde anschließend 24 - 72h in einer trockenen, geschlossenen Metallbox im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Dauer der Hybridisierung variiert mit der eingesetzten Sonde. Gen-Sonden wurden immer 72h inkubiert, während die Hybridisierung von perizentrischer DNA und Painting-Proben nach 24h schon sehr gute Ergebnisse lieferte.

Hybridisierung von Formaldehyd-fixierten Präparaten

In diesem Fall muss der zeitliche Ablauf der Sonden-Denaturierung und Prähybridisierung genau mit der Denaturierung der Zellpräparate abgestimmt werden. Dazu wurden die vorbereiteten Deckgläser mit den Zellen erst wenige Minuten vor dem Ende der Prähybridisierung der Sonden in eine auf 75°C vorgewärmte Küvette mit Denaturierungslösung gestellt und 3 Minuten denaturiert. Die Zellseite sollte dabei nicht mit der Innenseite der Küvette in Berührung kommen. Währenddessen wurden 10 µl der prähybridisierten Sonde auf einen temperierten Objektträger (42°C auf der Wärmeplatte) getropft. Im Anschluss an die Denaturierung wurden die Deckgläser mit der Feinpinzette aus der Küvette entnommen, überschüssige Flüssigkeit an einer Ecke und der Rückseite mit einem fusselreien Papiertuch (Kimwipes Science) abgenommen und dieses mit der Zellseite nach unten auf die aufgetropfte Sonde gelegt. Diese sollte sich möglichst gleichmäßig unter dem Deckglas verteilen. Das Deckglas wurde an den Rändern mit Fixogum abgedichtet und der Objektträger (Deckglas nach oben) in einer geschlossenen Metallbox 24 – 72h im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

2.2.10. Nachweis der FISH

Bemerkungen

Grundsätzlich müssen vor der Detektion zunächst unspezifisch gebundene Sonden von den Präparaten durch stringentes Waschen entfernt werden. Fluorophor markierte Proben können daraufhin direkt mikroskopisch detektiert werden. Hapten markierte Sonden werden durch Fluorophor-Konjugate detektiert. Zur Signalverstärkung kann das so genannte Sandwich-Verfahren angewendet werden. Dabei werden sequentiell 3 Lagen Antikörper-Konjugate aufgebracht, wobei die erste und letzte identisch ist und das Fluorophor trägt.

Stringentes Waschen

Zunächst wurde von den Präparaten mit der Feinpinzette das Fixogum entfernt. Ein Verrutschen des Deckglases ist dabei zu vermeiden. Methanol/Eisessig-fixierte Präparate wurden mit dem Deckglas in eine Küvette mit Formamid-Waschlösung (37°C) gestellt, bis sich dieses vom Objektträger ablöst. Das Deckglas wurde verworfen. Bei Formaldehyd fixierten Präparaten wurde das Deckglas (mit den Zellen) vorsichtig seitlich von dem Objektträger geschoben und –mit der Zellseite nach oben- in eine Kulturschale (Quadriperm) mit Formamid-Waschlösung (37°C) gelegt und 5 Minuten vorgereinigt. Das stringente Waschen erfolgte anschließend bei beiden Präparaten durch vorsichtigen Wechsel der

entsprechend temperierten Waschlösungen auf einem Schüttler. Zunächst wurde 2-mal mit 2xSSC / 42°C für 5 Minuten gewaschen. Anschließend folgten 3 Waschschritte mit 0,1xSSC / 60°C für jeweils 5 Minuten. Bei Formaldehyd fixierten Zellen können diese Schritte auch etwas verkürzt werden (ca. 4 Minuten), um ein Ablösen der Zellen zu vermeiden. Bei Verwendung Fluorophor-markierter Sonden konnten die Präparate nun direkt mit einem DNA Farbstoff gefärbt und eingedeckelt werden (siehe nächster Schritt).

Detektion

Im Folgenden wird der Sandwich-Nachweis Hapten-markierter Sonden beschrieben:

Die Präparate wurden nach den stringenten Waschschritten kurz in SSCT / 37°C äquilibriert und 40 Minuten mit Blockinglösung bei 37°C in einer feuchten Metallbox (im Wasserbad, siehe Kapitel 2.2.4) inkubiert. Methanol/Eisessig-fixierte Präparate wurden mit der Zellseite nach oben auf zwei parallele Pipetten gelegt, mit 100 µl Blockinglösung versehen und mit einem großen Deckglas (24x50 mm) abgedeckt. Formaldehyd-fixierte Präparate wurden mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger mit 60 µl SSC-Blockinglösung gelegt (siehe Kapitel 2.2.4). Nach der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen durch die BSA-Lösung wurden die Präparate ohne weitere Waschschritte mit den ersten Antikörpern inkubiert. Avidin und anti-Digoxigenin-Antikörper können mit unterschiedlichen Fluorophoren gekoppelt sein und wurden in einer Verdünnung von 1:100 (bei weniger intensiven Fluorophoren, wie FITC und Cy5) bis 1:300 (bei Cy3) angewendet.

Die Präparate wurden jeweils mit 100 µl (bei Methanol/Eisessig-fixierten Präparaten) beziehungsweise 60 µl (Formaldehyd fixierte Präparate) Antikörper-Lösung 45 Minuten bei 37°C in der feuchten Metallbox inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 3 mal 5 Minuten mit SSCT bei 37°C gewaschen und mit den sekundären Antikörpern (anti-Avidin-Biotin 1:200 beziehungsweise anti-Schaf-Digoxigenin, 1:50) inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde wieder 3 mal 5 Minuten mit SSCT gewaschen und der erste Antikörper-Schritt wiederholt. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Präparate in der Regel noch mit einem DNA-Farbstoff (TOPRO-3 oder DAPI, 1:1000 beziehungsweise 1:5000 in PBS) wenige Minuten gefärbt. Methanol/Eisessig-fixierte Präparate wurden nach dem Färben mit destilliertem Wasser gewaschen, luftgetrocknet und mit 20 µl Vectashield und einem Deckglas eingedeckelt. Das Deckglas wurde mit klarem Nagellack fixiert. Formaldehyd-fixierte Präparate wurden mit 1xPBS gespült und ohne vorheriges Antrocknen auf einen Objektträger mit einem Tropfen Vectashield gelegt und mit Nagellack fixiert.

2.2.11. Isolierung intakter PAC-DNA

2.2.11.1. PAC Präparation

Bemerkungen

Auf dem Phagen P1 basierende künstliche Chromosomen (PACs) und bakterielle künstliche Chromosomen (BACs) sind nützliche Vektoren zur *in vitro* Manipulation und Propagation sehr langer DNA-Inserts. Der Nachteil sehr langer DNA-Fragmente ist deren Empfindlichkeit gegenüber Scherkräften in wässriger Lösung. Daher werden PACs und BACs bevorzugt in einem Gel isoliert, gereinigt und manipuliert. Agarose mit einem sehr geringen Schmelzpunkt eignet sich dafür hervorragend, da diese in darauf folgenden Reaktionen (etwa Long-Range PCR) sehr leicht in Lösung geht. Im Folgenden wird die Präparation von PACs beschrieben.

Bakterienkultur

Escherichia coli DH10B Klone mit PACs (sich Kapitel 2.1.4) wurden entweder als Agarose Stabkulturen oder als Glycerinstocks bezogen (zur Verfügung gestellt durch Dr. Schindelhauer, TU München). Die Klone wurden mit einer sterilen Impföse auf LB-Agarplatten (mit 30 µg/ml Kanamycin, PACs tragen das Kanamycin Resistenz-Gen) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Von jedem Ausgangsklon wurden mehrere (ca. 6) Einzelkolonien mit der sterilen Impföse entnommen, in 5 ml LB-Flüssigmedium mit Kanamycin überführt und 6 Stunden bei 37°C geschüttelt. Von diesen Vorkulturen wurden 3 ml entnommen und 15 Minuten bei 4000 rpm/ 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 30 % sterilem Glycerin aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C archiviert. Die übrigen 2 ml der Vorkultur wurden in 200 ml LB-Flüssigmedium mit Kanamycin (30 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt (Hauptkultur). Nach 12 Stunden wurden zu den Hauptkulturen 200 ml frisches LB-Medium (supplementiert mit Kanamycin und IPTG, 10 µl Stammlösung/100 ml) hinzu gegeben und weitere 2 bis 3 Stunden inkubiert. Durch Zugabe von Chloramphenicol (100 µl Stammlösung/100 ml) 30 Minuten vor der Ernte der Bakterien wurde die Replikation der PACs vervollständigt aber nicht reinitiiert.

Bakterien-Lyse und Vorreinigung der PAC DNA

Die Hauptkulturen wurden 15 Minuten bei 4000 rpm/ 4°C abzentrifugiert, das Pellet in 1/10 Volumen eiskaltem Pett IV Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das nun gewaschene Pellet wurde 1:1 (v/v) in Pett IV Puffer (temperiert bei 42°C) resuspendiert und

wiederum im Verhältnis 1:1 (v/v) mit geschmolzener und temperierter (42°C) Low-Melting Agarose (Gibco Ultrapure, 2% in dH₂O) vermengt. Die Suspension wurde in - auf der Unterseite mit Tesafilm versiegelte - „Plug-Molds“ (BioRad „disposable plug-molds“) auf Eis gegossen. Nach dem Verfestigen der Gelstücke wurden diese durch Überdruck (Gummi-Saugstutzen von Pasteurpipetten) in 20 ml EC Lysis Puffer überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Gelstücke mit den lysierten Bakterien in 20 ml Puffer NDS gewaschen und 2 Tage bei 50°C in 20 ml Puffer NDS-K inkubiert. Dabei verloren die Gelstücke ihre gelbliche Färbung und wurden zunehmend durchsichtig. Die Gelstücke wurden nun 2 Wochen bei RT in 20 ml frischem Puffer NDS im Dunkeln gereinigt (Wechsel des Puffers alle 2 Tage), bis sie absolut farblos und klar waren.

Trennung der PACs von bakterieller DNA

Die intakten PACs wurden im Anschluss an die Bakterien-Lyse von fragmentierten PACs und bakterieller DNA gereinigt. Dazu wurden die Gelstücke aus der NDS Lösung entnommen, in TE äquilibriert (mindestens 4 Stunden unter Wechsel des Puffers, auf Eis) und mit einer Spatelspitze in die Taschen eines großen Pulsfeld-Agarosegels (PFG) gelegt. Während der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE; 6V/cm, switch time 1-100 Sekunden, 5-12 Stunden) wurden linearisierte DNA Fragmente entfernt („Pae-AscI-Gel“). Intakte, zirkuläre PACs mit großem Insert konnten unter diesen Bedingungen während der Elektrophorese auf Grund ihrer Größe und Struktur das Gelstück nicht verlassen. Anschließend wurden die Gelstücke aus den Taschen entnommen und in TE Puffer auf Eis überführt.

Das Gel wurde in Ethidiumbromid gefärbt und auf einem UV-Transilluminator abfotografiert (Schmier aus DNA Fragmenten). Die Gelstücke wurden kurz in TE gewaschen (auf Eis) und 4 mal 1 Stunde in AscI Puffer auf Eis äquilibriert. Anschließend wurden sie in 1,5 ml AscI Puffer mit 10-20 U AscI/ Gelstück (ca. 20 µl) über Nacht auf Eis inkubiert. Das Enzym diffundiert auf diese Weise in die Gelstücke. Am nächsten Tag wurden die Ansätze in ein 37°C Wasserbad überführt und 6-8 Stunden enzymatisch verdaut (AscI schneidet nur bakterielle DNA). Nach dem Restriktionsverdau wurden die Gelstücke über Nacht in 10 ml Puffer NDS-K bei 50°C inkubiert und 2 - 4 Tage in frischem NDS gewaschen. Nach Äquilibrieren in TE (mehrere Stunden auf Eis) wurden die Gelstücke wieder mittels PFGE (Bedingungen siehe oben) gereinigt („Post-AscI-Gel“; Abb. 3). Die nun von fragmentierter und bakterieller DNA gereinigten Gelstücke konnten mehrere Monate ohne merkliche Degradation der PACs in NDS bei RT im Dunkeln gelagert werden. Es ist zu beachten, dass die Gelstücke nicht mit Ethidiumbromid gefärbt und keinesfalls UV Strahlung ausgesetzt

werden dürfen. Die Lagerung im Hochsalz-Puffer mit EDTA (NDS) im Dunkeln ist dagegen unproblematisch.

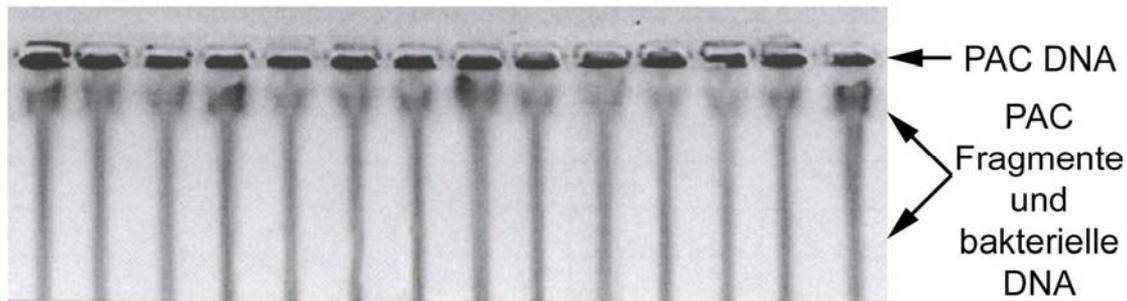


Abbildung 3: **Beispiel einer PFGE von AscI verdauten Gelstücken.**

Die Gelstücke wurden nach dem AscI Verdau in die Taschen eines Pulsfeldgels gelegt und 12 Stunden (6V/cm, switch time 1-100 Sekunden) von fragmentierter bakterieller DNA gereinigt. Anschließend wurde das Gel in Ethidiumbromid Lösung gefärbt und auf einem UV Schirm abfotografiert. Die intensive Fluoreszenz in den Geltaschen resultiert aus den enthaltenen PACs. Nur die fragmentierte bakterielle DNA kann während der Elektrophorese das Gelstück verlassen und erscheint als lang gezogener Schmier unterhalb der Taschen.

Enzymatische Kontrolle der isolierten PACs

Die Identität eines Inserts mit bekannter Sequenz wurde durch Restriktionsverdau verifiziert. Dazu wurde ein Gelstück in dem entsprechenden Puffer äquilibriert (siehe oben), durch Diffusion mit dem Enzym der Wahl versetzt und die im Gel enthaltene PAC-DNA endonukleolytisch verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden durch PFGE aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid auf einem UV-Schirm visualisiert.

2.2.11.2. Präparation des BAC 305 (β -Globin Lokus)

Der BAC 305 (174 kbp; siehe Kapitel 2.1.4) trägt die Lokus-Kontroll-Region (LCR), sowie die Globin-Gene des humanen β -Globin Lokus und wurde in dieser Arbeit als Template für die Generierung von DNA-Sonden durch Nicktranslation verwendet (Zur Verfügung gestellt von Prof. Mark Groudine, Universität Washington). Da für diese Reaktion, im Vergleich zur Long-Range-PCR, nicht unbedingt vollständig intakte DNA Fragmente vonnöten sind, wurden die BACs der Einfachheit halber mit dem Qiagen Large Construct Kit gemäß Packungsanleitung aufgereinigt. Bei der Anzucht der BAC-Klone (*E. coli* BAC305) wurde LB-Medium mit Chloramphenicol (20 μ g/ml) verwendet. Die durchschnittliche Ausbeute betrug 25 – 40 μ g aufgereinigte BAC-DNA pro 500 ml Bakterienkultur.

2.2.12. Long-Range-PCR

Bemerkungen

Die Standard-PCR wird in der Regel zur Amplifikation von DNA-Fragmenten bis zu einer Länge von wenigen Kilobasen herangezogen (< 5 kbp). Die Taq-DNA-Polymerase besitzt zwar eine hohe Prozessivität, erlaubt aber keine fehlerfreie Synthese längerer Fragmente. Durch die Kombination der Taq-DNA-Polymerase mit einer Polymerase mit Korrekturlesefunktion (z.B. Pfu-Polymerase) können auch wesentlich längere DNA-Fragmente amplifiziert werden (Barnes, 1994; Cheng *et al.*, 1994). Das im Folgenden erläuterte Protokoll ist eine modifizierte Version des Roche Expand Long Template Systems und erlaubt die Synthese von Fragmenten bis über 40 kbp. Die geringe Zyklenzahl verhindert die Akkumulation von Synthesefehlern und von Brüchen in den entstandenen Fragmenten, bedarf aber mehrerer paralleler Ansätze um eine ausreichende DNA Menge zu generieren.

Durchführung der Long-Range-PCR (LR-PCR)

Als Template diente ein gereinigtes und in TE äquilibriertes Gelstück (Post-AscI, siehe oben). Mit Hilfe eines sauberen Deckglases wurde ein Gelstück in 10 Teile geschnitten (kein Metall verwenden) und je 1/10 Block in ein PCR-Reaktionsgefäß gelegt. Die Low-Melting Agarose schmilzt während des ersten Denaturierungsschrittes und gibt die PACs frei. Der Erfolg der LR-PCR wurde durch PFGE überprüft. Da bei der LR-PCR auch zu einem geringen Teil unerwünschte Amplifikate entstehen, wurde die Bande mit dem PCR-Produkt der richtigen Länge durch Gelelution isoliert.

Pipettierschema

Lösung	Volumen (µl)
1/10 Gelstück	ca. 10
Aqua Ultrapure	28,2
10x Puffer 3 (Roche Expand System)	5
dNTP Mix (2 mM Amersham)	4
Primer Forward (10 µM)	1
Primer Backward (10 µM)	1
Taq DNA Polymerase (Amersham)	0,4
Enzym Mix (Roche Expand System)	0,4
Total	50

Die Elongationsdauer ist abhängig von der Länge des zu synthetisierenden Fragmentes. Als Richtwert gelten 1,2 – 1,6 kbp/ min beziehungsweise 1,8 kbp/ min für Stücke über 40 Kilobasen. Die Synthesetemperatur sollte nur 66°C betragen, um eine Denaturierung der

langen Stücke zu minimieren. Die Zahl der Wiederholungen sollte 9 nicht überschreiten (optimal 7-8), da sich sonst DNA-Brüche häufen. Die Werte wurden zum Teil empirisch ermittelt (Abb. 4) und müssen für weitere Long-Range-PCR Reaktionen neu bestimmt werden. Im Gegensatz zur Standard-PCR wurde im letzten Schritt nicht auf 4°C abgekühlt, da sich ansonsten die enthaltene Agarose verfestigt hätte. Im Folgenden werden die optimierten Reaktionsbedingungen für die in dieser Arbeit durchgeführten LR-PCR Reaktionen ausgeführt. Die verwendeten Primer und PACs werden im Kapitel 2.1.4 genauer ausgeführt.

LR-PCR-Programm zur Generierung von CORTBP2-Sonden

Zyklus	Phase	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1	Denaturierung	92°C	30 Sekunden	1
2	Denaturierung Anlagerung Elongation	92°C 62°C 66°C	10 Sekunden 1 Minute 30 Minuten	8
4	Finale Elongation	66°C	7 Minuten	1
5	Kühlen	25°C	beliebig	1

Primer: Co9cF, Co17cR
 Template: PAC CF7, 200 kbp
 Erwartete Länge: 35 kbp
 PFGE-Bedingungen: 1% Agarose, 0,5xTAE, 6V/cm,
 Switch: 2-3,5 Sekunden, 16h

LR-PCR-Programm zur Generierung von GASZ-Sonden

Zyklus	Phase	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1	Denaturierung	92°C	30 Sekunden	1
2	Denaturierung Anlagerung Elongation	92°C 62°C 66°C	10 Sekunden 1 Minute 28 Minuten	9
4	Finale Elongation	66°C	7 Minuten	1
5	Kühlen	25°C	beliebig	1

Primer: G2cF, G5R
 Template: PAC CF3, 230 kbp
 Erwartete Länge: 32,3 kbp
 PFGE-Bedingungen: 1% Agarose, 0,5xTAE, 6V/cm,
 Switch: 2-3,5 Sekunden, 16h

LR-PCR-Programm zur Generierung von CFTR 3'-Sonden

Zyklus	Phase	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1	Denaturierung	92°C	30 Sekunden	1
2	Denaturierung	92°C	10 Sekunden	8
	Anlagerung	62°C	1 Minute	
	Elongation	66°C	38 Minuten	
4	Finale Elongation	66°C	7 Minuten	1
5	Kühlen	25°C	beliebig	1

Primer: CF21F, a16BR
 Template: PAC CF7, 200 kbp
 Erwartete Länge: 41,44 kbp
 PFGE-Bedingungen: 1% Agarose, 0,5xTAE, 6V/cm,
 Switch: 2-3,5 Sekunden, 16h

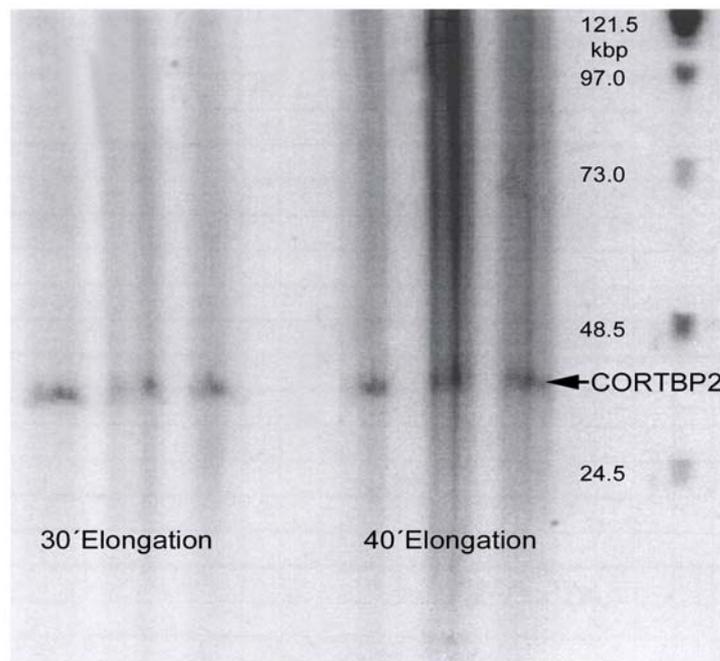


Abbildung 4: Test verschiedener Elongationszeiten bei der LR-PCR zur Herstellung der CORTBP2 spezifischen DNA-Sonden. Die optimalen Reaktionsbedingungen für die LR-PCR wurden empirisch ermittelt. In diesem Fall wurde die Elongationszeit für die Amplifizierung von CORTBP2-Sonden getestet. In zwei getrennten Ansätzen wurde entweder eine Elongation mit 30 Minuten beziehungsweise 40 Minuten durchgeführt. Die sonstigen Bedingungen waren identisch. Auf das Gel wurden jeweils 3 Aliquots von beiden Reaktionen aufgetragen. Eine Elongationszeit von 30 Minuten entspricht einer Prozessivität von 1,2 kbp/min. Unter diesen Bedingungen sind weniger unerwünschte Amplifikate (Schmier) aufgetreten als bei einer Elongationszeit von 40 Minuten (entspricht 0,8 kbp/min). Die Ausbeute an erwünschten Produkten (CORTBP2-Sonde, 35kbp) war bei beiden Ansätzen annähernd identisch. Am rechten Gelrand sind die Markerbanden erkennbar (Mid Range II PFGE Marker, NEB).

Gelisolierung der LR-PCR-Produkte

Die gewünschten Amplifikate wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgetrennt. Dazu wurde das LR-PCR-Produkt zunächst auf mehrere Taschen eines Pulsfeldgels verteilt. Generell sollten die LR-PCR-Produkte nur mit abgeschnittenen Pipettenspitzen pipettiert werden. Dies reduziert das Risiko von Brüchen in den langen DNA-Fragmenten. Nach dem Gellauf wurde das Gel durchgeschnitten und der Teil mit dem Marker und einem kleinen Aliquot des PCR Produktes in Ethidiumbromid gefärbt. Der Rest des Gels verblieb in TAE. Der gefärbte Gelteil wurde auf einen UV-Transilluminator gelegt und die Position des PCR Produktes mit einem Skalpell markiert. Anschließend wurden beide Gelteile nebeneinander gelegt und die entsprechenden Bereiche des ungefärbten Gels ausgeschnitten (Abb. 5). Der Erfolg wurde durch Färbung kontrolliert. Sollten die LR-PCR-Produkte für weitere *in vitro* Manipulationen intakt bleiben, erfolgten alle weiteren Schritte wieder im Gel. Wurden die Amplifikate jedoch für die DOP-PCR Markierung eingesetzt, wurde die DNA aus den Gelstücken eluiert. Die Gelelution erfolgte mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Qiagen, nach Packungsanleitung). Das Eluat wurde nur eingefroren, falls es für die DOP-PCR eingesetzt werden sollte. Mögliche Brüche in den DNA Molekülen spielen für diese PCR-Reaktion keine große Rolle.

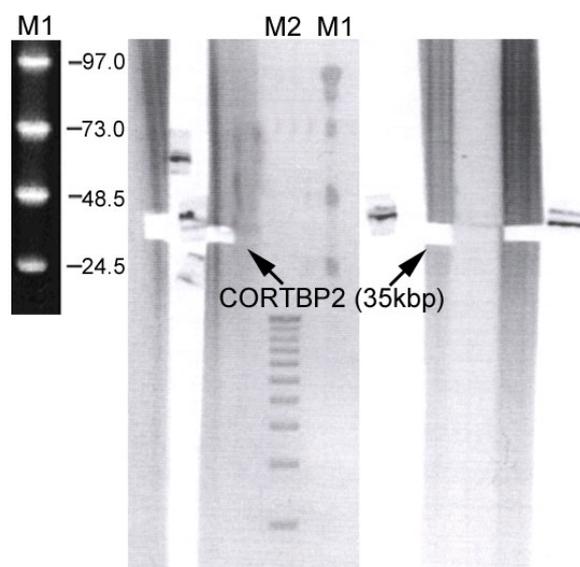


Abbildung 5: **Gelelution der CORTBP2-Sonden.** Auf ein Pulsfeldgel wurden mehrere Aliquots einer LR-PCR von CORTBP2-Sonden aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit einem Skalpell getrennt, die Abschnitte mit dem Marker und einem Teil des LR-PCR-Produktes mit Ethidiumbromid gefärbt und die Position des gewünschten Amplifikates markiert. Mit dieser Schablone wurde anschließend das Amplifikat aus dem ungefärbten Gel ausgeschnitten. Die abgebildeten Gelfragmente (Pfeile) beinhalten die herausgetrennten Banden des Amplifikates. M1: Mid Range II PFGE Marker (NEB); M2: 1 kb DNA Ladder Marker (NEB)

2.2.13. Western Blot

Protein-Extraktion aus Säugerzellen

Adhärenz Säugerzellen wurden in einer 6-Well Kulturschale bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Die Kulturschale wurde auf Eis gelegt und mit eiskaltem PBS-PMSF 3 mal gewaschen um Serumproteine zu entfernen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst, in 1 ml PBS-PMSF resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Die Zellsuspension wurde nun 10 Minuten bei 13000 rpm / 4°C pelletiert, in 25 µl PBS-PMSF durch „Schnippen“ resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Um störende genomische DNA zu entfernen, wurden anschließend 5 µl 10xDNase Puffer und 2 µl DNase I (beides Invitrogen) zugegeben und 30 Minuten bei RT enzymatisch verdaut. Nun wurden 25 µl 2 x SDS-Auftragspuffer (Santa Cruz) zu dem Zellextrakt gegeben, gemixt und die Suspension 10 Minuten im Wasserbad bei 95°C denaturiert. Die Proteine wurden entweder direkt auf ein Polyacrylamid Gel aufgetragen oder bei – 40°C aufbewahrt.

Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zunächst wurde der Gelgießstand aufgebaut. Die Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt, mit destilliertem Wasser gespült und zusammen mit den Spacern (0,75 mm) in den Gießstand eingespannt. Das Trenngel wurde vorbereitet und zwischen die Glasplatten gegossen (bis ca. 1 cm unterhalb der Geltaschen). Nach Aushärten des Trenngels wurde der Kamm (10 Taschen) eingesetzt und der Gießstand wurde mit Sammelgel aufgefüllt. Nach dem vollständigen Aushärten wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die frisch denaturierten Proben (eingefrorene Proben erneut kochen) wurden aufgetragen und ca. 60 Minuten bei 25 mA aufgetrennt.

Semi-Dry Blot und Antikörpernachweis

Nach der Elektrophorese wurde das Gel entnommen und kurz in Blotting-Puffer äquilibriert. Nun wurden auf die untere Blotting-Elektrode je eine Lage Whatman Papier (3 mm, kurz in Blotting-Puffer getaucht), Nitrocellulose, das Gel und eine zweite Lage Whatman Papier gelegt. Es wurde darauf geachtet, dass keine Lufteinschlüsse entstehen. Zum Schluss wurde die zweite Elektrode aufgelegt und die Proteine 90 Minuten bei maximal 20 Volt transferiert. Nach dem Proteintransfer wurde das Gel über Nacht mit Coomassie Färbelösung und die Membran kurz in Ponceau S gefärbt. Die Membran wurde nach ca. 3 Minuten unter

destilliertem Wasser gespült, Markerbanden und Spuren markiert und 1 Stunde bei RT in T-TBS-Milk gelegt. Der primäre Antikörper wurde nach Vorschrift in T-TBS-Milk verdünnt, auf die Membran gegeben und 1-2 Stunden bei RT (anti-Lamin A/C: 37°C) beziehungsweise über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-mal 5 Minuten mit T-TBS gewaschen. Nun wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper 1 Stunde bei RT inkubiert (anti-Maus-AP beziehungsweise anti-Kaninchen-AP, verdünnt nach Vorschrift in T-TBS-Milk) und wiederum gewaschen. Die Antikörperlösungen wurden eingefroren und mindestens ein weiteres Mal verwendet. Die Membran wurde anschließend einmal in TBS gespült, in AP3 Puffer äquilibriert und mit NBT/BCIP Färbelösung bis zum Sichtbarwerden der Banden gefärbt (siehe Dot-Blot 2.2.6.4). Bei ausreichender Färbung wurde die Membran in destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Das gefärbte Gel wurde mehrere Stunden unter Wechsel des Puffers mit Coomassie Entfärber entfärbt und in 50% Glycerin aufbewahrt.

2.2.14. RNA Interferenz

Der „Knockdown“ von zellulären Proteinen durch RNA Interferenz wurde mit dem RNAiFect Kit (Qiagen) nach Packungsbeilage durchgeführt. Die Zellen wurden vor Zugabe der siRNA-Transfektionskomplexe in 6-Well Platten bis zu einer Konfluenz von ca. 50 % mindestens 24 Stunden kultiviert. Nach Zugabe der Komplexe und 3 Tagen Inkubation wurde der Erfolg des Knockdowns mittels Immunfluoreszenz und Western Blot kontrolliert und ein paralleler Ansatz für die *in situ* Hybridisierung eingesetzt.

2.2.15. RNA-Präparation und RT-PCR

Für die RNA-Präparation wurden adherente Säugerzellen in 25 cm² Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Trypsinierung (siehe Kapitel 2.2.1.1). Die Zellen wurden bei 1000 rpm 3 Minuten pelletiert, mit sterilem, eiskaltem PBS gewaschen und erneut pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 100 µl PBS resuspendiert, mit 1000 µl RNAlater RNA Stabilisierungs-Reagenz (Qiagen) versetzt und bei -40°C eingefroren. Die RNA wurde für Expressionsstudien mittels quantitativer RT-PCR im Labor von Prof. Margarida D. Amaral, Universität von Lissabon, eingesetzt. Einzelheiten siehe Anhang und (Amaral *et al.*, 2004; Englmann *et al.*, 2005; Zink *et al.*, 2004).

2.2.16. Mikroskopie

2.2.16.1. Aufnahmen am Epifluoreszenzmikroskop

Hier wurden mit Hilfe einer CCD-Kamera (MicroMAX) und einer elektronischen Blende (UniblitZ), angesteuert durch die Software Metamorph (Version 4.0), zweidimensionale Aufnahmen der fixierten Präparate angefertigt. Dafür wurden die 40x (numerische Apertur 1,3) und 63x (numerische Apertur 1,4) Objektive verwendet (Filtersätze siehe Kapitel 2.1.8).

2.2.16.2. Aufnahmen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop

Die Aufnahmen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop LSM 510 Meta (Carl Zeiss) wurden unter identischen Grundeinstellungen vorgenommen. Es wurden stets die drei vorhandenen Laser aktiviert. Die Bildgröße betrug 512x512 Pixel (in der x/y Ebene); die Scan-Geschwindigkeit wurde meist auf 9 festgelegt und die Bilder wurden 4-mal gemittelt. Es wurde immer das 63x Objektiv (NA: 1,4; Ölimmersion, DIC) verwendet. Je nach Objektgröße und Färbungsintensität wurden jedoch der Scan-Bereich (in x-y-z), die Laser-Intensität und die Signal-Verstärkung angepasst. In Hinsicht auf ein möglichst optimales Signal/Rauschen-Verhältnis wurde die Laser-Intensität so hoch justiert, wie es das Fluorophor erlaubt. Die Signal-Verstärkung wurde dementsprechend niedrig eingestellt. Die Größe des „Pinhole“ wurde so verändert, dass eine maximale z-Auflösung erreicht werden konnte. Der z-Abstand der lichteptischen Schnitte wurde auf 250 nm gesetzt. Meist wurden, abhängig von der Dicke des Präparates, zwischen 20 und 40 Ebenen gescannt. Je nach Volumen des Zellkernes ergab sich somit eine Voxel-Größe von 40-70 nm in x/y und 250 nm in z-Orientierung. Die Einstellungen des LSM 510 erlauben den Gebrauch verschiedener Haupt-Strahlenteiler (Beamsplitter) für die jeweiligen Kanäle.

Eine optimale Signalintensität im Cy3-Kanal wurde durch einen eigenen Beamsplitter (HFT 488/543) für Cy3 und einen gemeinsamen Beamsplitter (HFT UV/488/543/633) für FITC und Cy5 erreicht. Durch den Gebrauch von mehrfach markierten, fluoreszierenden Kügelchen (1µm, Molecular Probes) konnte jedoch gezeigt werden, dass sich dadurch eine Verschiebung der Cy3- und FITC-Kanäle in x/y Richtung ergibt (Abb. 6), die vor allem bei den durchgeführten Abstandsmessungen zwischen verschiedenen FISH-Signalen sehr störend gewesen wäre. Daher wurde zu Gunsten der Positions-Genauigkeit, aber zu Ungunsten der Signalintensität ein gemeinsamer Beamsplitter (HFT UV/488/543/633) für die drei verwendeten Fluorophore benutzt. Die meist sehr hohe Signalintensität des Cy3-Fluorophors wurde dadurch aber nur unmaßgeblich geschmälert.

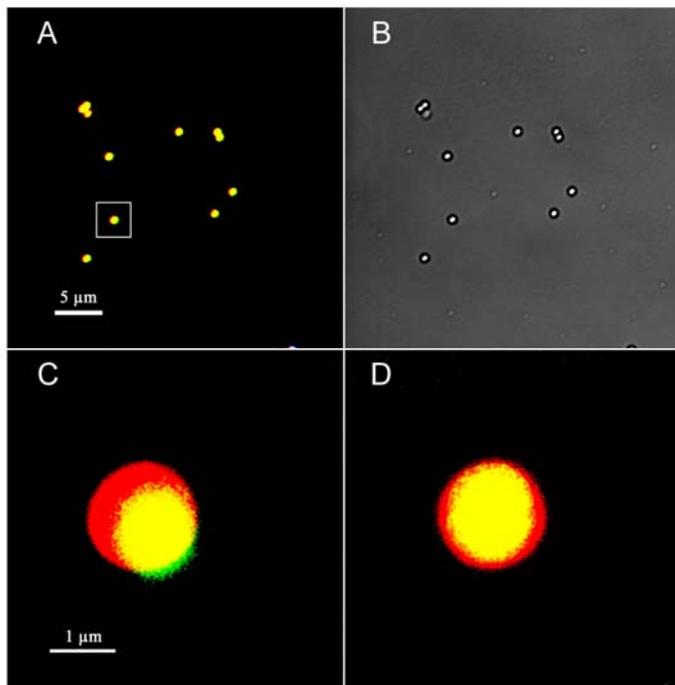


Abbildung 6: **Korrektur von chromatischen Aberrationen mit Hilfe von fluoreszierenden Kügelchen am LSM 510 Meta.**

Auf ein Deckglas wurde eine Suspension aus fluoreszierenden Kügelchen (Molecular Probes) aufgetragen, angetrocknet und mit Vectashield eingedeckelt.

A und B zeigen die Fluoreszenz-beziehungswise Phasenkontrast-Aufnahme der Kügelchen bei geringer Vergrößerung. Die Aufnahmen wurden ebenso wie in C mit verschiedenen Hauptstrahlungsteilern (Beamsplitter) durchgeführt.

(C) Die Vergrößerung (Kasten in A) zeigt die Verschiebung der Kanäle durch verschiedene Beamsplitter. (D) Durch Gebrauch eines gemeinsamen Beamsplitters konnte die Verschiebung deutlich reduziert werden.

2.2.17. Bildbearbeitung und 3D-Rekonstruktion

2.2.17.1. Visuelle Inspektion mit der Zeiss LSM Meta Software

Neben der Steuerung des Mikroskops wurde diese Software auch zur visuellen Bildanalyse eingesetzt. So lassen sich bequem sämtliche Bild-Daten abrufen, die verschiedenen Kanäle in x/y/z-Orientierung darstellen und Ausschnitte einzelner Ebenen vergrößern. Mit diesem Programm wurde vor allem die visuelle Identifizierung von Replikationsmustern und die Bestimmung von replizierten FISH-Signalen (Dubletten) bei der Analyse des Replikationsverhaltens verschiedener Gene vorgenommen. Auch die Kolo-kalisation von Immunfärbungen und FISH-Signalen ließ sich in der überlagerten Ansicht mehrerer Kanäle gut untersuchen.

2.2.17.2. 3D-Rekonstruktion und 3D-Erosionsanalyse

Die 3D-Rekonstruktion und 3D-Erosionsanalyse wurde mit Amira (3.0) vorgenommen. Dieses Programm ermittelt über Polygone ein dreidimensionales Abbild, das in beliebigen Perspektiven von außen oder innen betrachtet werden kann. Dazu wurden zunächst die konfokalen Bildstapel der einzelnen Kanäle eingelesen. Rauschanfällige Signale (z.B. DNA-Färbung durch TOPRO-3) wurden nun durch Gauß- oder Median-Filterung geglättet. Anschließend wurde die räumliche Begrenzung der entsprechenden Bereiche (DNA, FISH-Signale, Lamin, etc.) entweder durch Anlegen eines Schwellenwertes oder durch manuelle

Auswahl eines definierten Bereiches (z.B. FISH-Signal) definiert. Die Abbildungs-Genauigkeit der folgenden 3D-Rekonstruktion wurde durch Vorauswahl der darzustellenden Flächen-Anzahl eingestellt. Eine sehr oberflächenreiche Rekonstruktion verlangt allerdings eine enorme Rechenleistung und Speicherkapazität, welche für die weitere Auswertung keinen Vorteil bringt. Die gewonnene 3D-Rekonstruktion des Zellkerns wurde meist für die 3D-Erosion eingesetzt (Croft *et al.*, 1999). Dabei wurde die relative Position von FISH-Signalen im Zellkern in 3 Dimensionen bestimmt. Zunächst wurde das Zellkern-Volumen durch DNA-Färbung und Anlegen eines Schwellenwertes an die DNA-Färbung definiert.

Das in Amira errechnete dreidimensionale Abbild des Zellkerns wurde nun 5-mal dupliziert und die Größe der 5 Duplikate durch radiale, konzentrische Transformation zu 100%, 80 %, 60 %, 40 % und 20 % des Zellkern-Radius in x/y/z-Orientierung sequentiell reduziert. Die Abbildungen wurden zusammen mit der dreidimensionalen Rekonstruktion der FISH-Signale übereinander gelegt. Die Breite der resultierenden Schalen entspricht jeweils 20 % des Radius des Zellkerns. Durch die Überlagerung mit den FISH-Signalen konnte die Position des jeweiligen Signals in der entsprechenden radialen Schale ermittelt werden (Abb. 7).

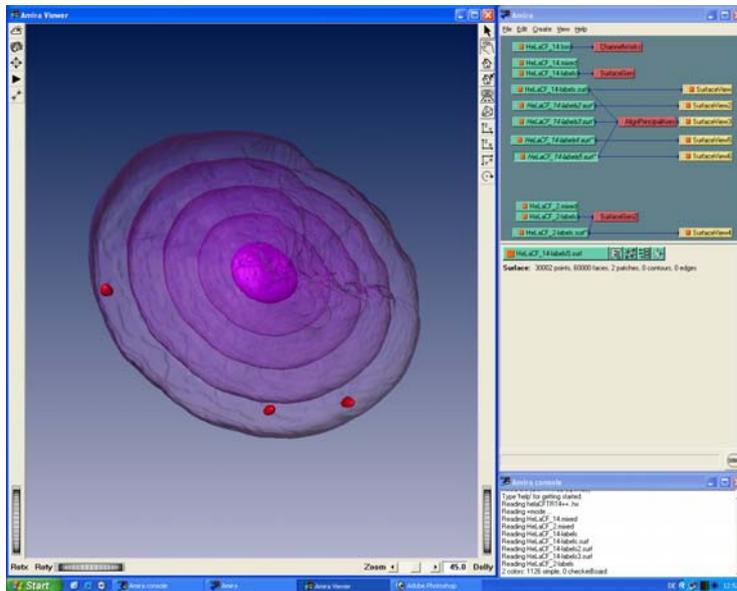


Abbildung 7:
3D-Rekonstruktion und 3D-Erosionsanalyse eines HeLa Zellkerns mit Hilfe der Amira (3.0) Software. HeLa Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert und CFTR durch eine FISH detektiert. Die DNA wurde mit TOPRO-3 gefärbt. Die am LSM 510 gewonnenen konfokalen Schnitte wurden in Amira eingelesen und dreidimensional rekonstruiert. Der Zellkern wurde nun in 5 konzentrische, radiale Schalen um je 20 % des Zellkern-Radius verkleinert und mit den FISH-Signalen überlagert. Auf diese Weise konnte die relative Position der CFTR-Loci im Zellkern ermittelt werden.

2.2.17.3. 2D-Erosionsanalyse

Die relative Position von FISH-Signalen in zweidimensionalen Aufnahmen wurde mit der Software Adobe Photoshop (7.0) ermittelt. Die 2D-Erosionsanalyse (Croft *et al.*, 1999) wurde nur von Bilddaten durchgeführt, die am Epifluoreszenzmikroskop von Methanol/Eisessig-fixierten Zellkernen gewonnen wurden. Wie schon im Kapitel 2.2.5 besprochen, erlaubt diese Fixierungsmethode eine relativ zügige Durchführung der FISH, führt aber zu stark

abgeflachten Zellkernen. Dadurch ist es möglich, alle FISH-Signale und den Zellkern in einer fokalen Ebene am Epifluoreszenzmikroskop aufzunehmen. Mit der Software Adobe Photoshop wurde anschließend –ähnlich wie in der 3D-Erosionsanalyse- die Zellkernfläche durch Anlegen eines Schwellenwertes definiert, 5-mal dupliziert und in 5 konzentrische, radiale Schalen um jeweils 20 % des Zellkern-Radius erodiert. Im Gegensatz zu der 3D-Erosionsanalyse geschieht dies allerdings nur in x/y-Orientierung. Ein Makro (geschrieben von Dr. N. Sadoni, LMU München) erlaubte die zügige 2D-Erosionsanalyse von zahlreichen Aufnahmen in relativ kurzer Zeit.

2.2.17.4. Abstandsmessungen und Kolokalisationsanalyse

Der physikalische Abstand zwischen FISH-Signalen beziehungsweise FISH-Signalen und definierten Bereichen im Zellkern (z.B. Lamina, spät replizierendes Heterochromatin) wurde mit den Programmen Metamorph (2D-Abstände) und ImageJ (3D-Abstände) ermittelt. Die Kolokalisationsanalyse von FISH-Signalen mit definierten Zellkern- beziehungsweise Chromatin-Fractionen wurde mit Formaldehyd-fixierten Präparaten nach Immunfärbung und FISH durchgeführt. Der Abstand zwischen FISH-Signalen benachbarter Genloci wurde in Methanol/Eisessig- und Formaldehyd-fixierten Zellen bestimmt. Der Abstand zwischen FISH-Signalen und definierten Zellkern-Bereichen wurde in Formaldehyd-fixierten Zellen analysiert. Die nötigen Bilddaten wurden, nach vorheriger Korrektur der Kanal-Verschiebung (siehe Kapitel 2.2.16.2), stets am konfokalen Mikroskop gewonnen. Da Methanol/Eisessig-fixierte Zellen auf Grund der Fixierungsmethode sehr flach sind und somit nur wenige konfokale Ebenen ergeben (5-10, anstatt 20-40 Ebenen bei Formaldehyd-fixierten Zellkernen), war es zweckmäßig, die gewonnen Daten vor den Abstandsmessungen zweidimensional zu projizieren. Bildstapel von Formaldehyd-fixierten Zellen wurden dagegen nicht projiziert und immer in x/y/z-Orientierung (in 3D) ausgewertet.

Zur Abstandsmessung wurden zunächst die Bildstapel beziehungsweise Projektionen in die Software Image J (1.34) beziehungsweise Metamorph (4.6) eingelesen und Graustufen-Bilder der einzelnen Kanäle generiert. Anschließend wurden die verschiedenen Signale durch Anlegen eines Schwellenwertes eingegrenzt und das Intensitätszentrum definiert. In Metamorph wurden nun die x/y-Positionen der Signalzentren bestimmt und die Datensätze automatisch in Excel 2000 übertragen. Der Abstand zwischen den definierten Punkten konnte anschließend trigonometrisch berechnet werden. Die Abstandsmessung in 3 Dimensionen wurde nach demselben Prinzip in ImageJ durchgeführt. Die Signale wurden durch Anlegen eines Schwellenwertes ausgewählt und die entsprechenden z-Ebenen bestimmt. Anschließend

konnte mit dem Werkzeug „Sync Measure 3D“ (geschrieben von Dr. J. Walter, LMU München) der Abstand in 3D gemessen werden. Der Abstand zwischen einem FISH-Signal und einer Immunfärbung (z.B. Lamina) wurde mit dem Werkzeug Lineal ermittelt. Dazu wurde von dem Intensitäts-Zentrum des FISH-Signals der kürzeste Abstand zu der Oberfläche des entsprechenden Kompartiments in 3D gemessen. Waren die Intensitätszentren von FISH-Signalen und Immunfärbung deckungsgleich, so wurde dies als Kolokalisation gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Die Lokalisation von GASZ, CFTR und CORTBP2 im Zellkern

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Aktivität und der Kernlokalisierung der Gene GASZ, CFTR und CORTBP2 in verschiedenen menschlichen Zelllinien und in primären Zelltypen ermittelt werden. Trotz der engen Nachbarschaft von GASZ, CFTR und CORTBP2 auf dem humanen Chromosom 7q31 (Abb. 8) besteht zwischen diesen Genen kein funktioneller Zusammenhang und sie zeigen sehr unterschiedliche Expressionsmuster. GASZ („germ cell specific expression, presence of ANK, SAM and bZIP domains“) liegt ca. 50 kbp zentromerisch von CFTR. Es wird nur in Keimzellen und ihren Vorläufern exprimiert und erfüllt wahrscheinlich eine Rolle bei der Reifung von Geschlechtszellen (Yan *et al.*, 2002). CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) kodiert für einen Chlorid-Kanal und wird hauptsächlich in spezialisierten Epithelien, wie unter anderem Bronchial- und Darmschleimhaut, exprimiert (Engelhardt *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1988). CORTBP2 („cortactin-binding protein-2“) liegt ca. 45 kbp telomerisch von CFTR, kodiert für ein Cortactin-bindendes Protein unbekannter Funktion und wird in vielen Zelltypen exprimiert (Cheung *et al.*, 2001). Es stellte sich die Frage, ob das individuelle Transkriptionsverhalten oder die chromosomale Position und enge Nachbarschaft zu anderen Genen die Lokalisation von GASZ, CFTR und CORTBP2 im Zellkern bestimmen.

3.1.1. Spezifität und Qualität der verwendeten genspezifischen DNA-Sonden

Die Lokalisation der Genloci und Chromosomen-Territorien (CT) in Interphase-Zellkernen und auf Metaphase-Chromosomen wurde durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) mit Methanol/Eisessig- beziehungsweise Formaldehyd-fixierten Zellkernen ermittelt. Maßgeblich für eine effiziente FISH sind die Spezifität und Qualität der verwendeten DNA-Sonden. Die Detektion des CFTR-Genlokus (CF1-Probe, Abb. 8), sowie einer intergenischen Region 200 kbp telomerisch von CORTBP2 auf Chromosom 7 (RP5, Abb. 8) und des β -Globin-Lokus auf Chromosom 11 (Abb. 9) erfolgte durch Markierung von „Phage-P1 artifizialen Chromosomen“ (PACs) beziehungsweise „bakteriellen artifizialen Chromosomen“ (BACs), deren Insert homolog zu den Loci war. Sonden für GASZ, CORTBP2, sowie das 3' Ende des CFTR-Genlokus (Abb. 8) wurden durch Markierung von Long-Range (LR) PCR-Produkten - basierend auf den PACs CF3 und CF7 - gewonnen.

Die Lage und Länge der Gene und FISH-Sonden, sowie die Anzahl und ungefähre Position der Exons ist in den Abbildungen 8 und 9 angegeben.

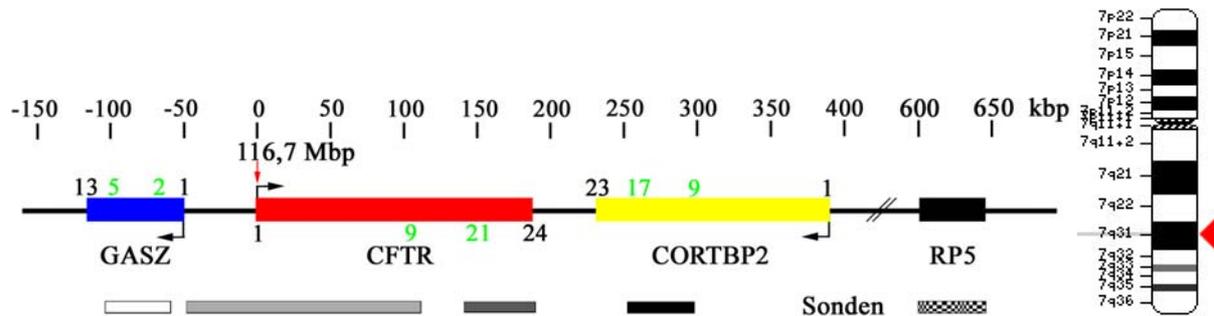


Abbildung 8: **Schematische Darstellung der humanen CFTR-Region auf Chromosom 7q31.2.**

Die chromosomale Lage von GASZ, CFTR, CORTBP2 und dem Insert des PAC RP5 852D15 (RP5) sind durch farbige beziehungsweise schwarze Boxen dargestellt. Pfeile geben die Richtung der Transkription an (RP5 entspricht keinem bekannten Gen). Die Lage der Exons ist durch Nummern angegeben, wobei grüne Nummern die Position der Exons angeben, die homolog zu den Enden der verwendeten FISH-Sonden sind. Die Lage der Sonden ist durch weiße, graue, gemusterte und schwarze Boxen angegeben (von links nach rechts: GASZ, CFTR 5'Ende (CF1), CFTR 3'Ende (CF3), CORTBP2 und RP5). Die chromosomale Lokalisation der verwendeten FISH-Sonden wurde durch Sequenzvergleiche mit der freien Software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verifiziert. Die Skala zeigt die Länge der Region in kbp an. Die chromosomale Position des Exons 1 von CFTR liegt bei ca. 116,7 Mbp von Chromosom 7 (roter Pfeil). Der rechte Bildrand zeigt eine schematische Darstellung des Chromosoms 7 und die Position des Locus (rotes Dreieck) (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>).

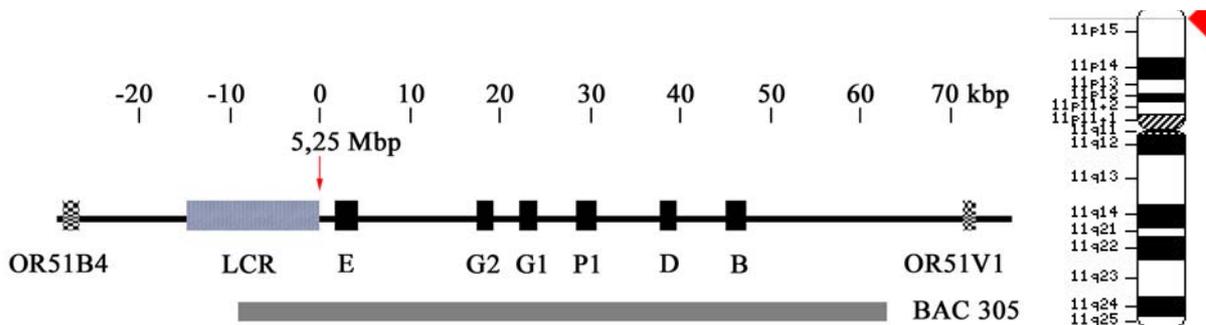


Abbildung 9: **Schematische Darstellung des humanen β -Globin-Lokus auf Chromosom 11p15.5.**

Die Gene des β -Globin-Lokus sind durch schwarze Boxen symbolisiert (von links: ϵ , γ 2 und γ 1, ϕ , δ und β -Globin). Die Lokus-Kontroll-Region (LCR) ist durch eine blau-schattierte Box dargestellt. Der β -Globin-Lokus wird durch mehrere Gene für olfaktorische Rezeptoren (OR) flankiert; hier wird je ein Gen gezeigt (gemusterte Boxen). Die Lage des als FISH-Sonde verwendeten BAC 305 ist unten durch eine graue Box angegeben. Die chromosomale Lokalisation der verwendeten FISH-Sonden wurde durch Sequenzvergleiche mit der freien Software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verifiziert. Die Skala zeigt die DNA-Länge in kbp; die Position auf Chromosom 11 ist am Beginn des Epsilon Gens angegeben (roter Pfeil). Der rechte Bildrand zeigt eine schematische Darstellung des Chromosoms 11 und die Position des Locus (rotes Dreieck) (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>).

Die Hybridisierungs-Spezifität und -Qualität der verwendeten FISH-Sonden (Abb. 8 und 9) wurde durch FISH an Methanol/Eisessig-fixierten Präparaten verschiedener Zelllinien bestimmt (Abb. 10). Da einige der verwendeten Zelllinien Aneuploidien und Polyploidien aufwiesen (Karyotypen siehe 2.1.11), wurde an Metaphase-Spreitungen durch Hybridisierung mit Chromosomen-spezifischen Proben (Painting-Proben) auch die Anzahl der Chromosomen 7 beziehungsweise 11 und das Auftreten von Translokationen ermittelt. Es konnte bei den verwendeten Zelllinien keine spezifische Hybridisierung der Gensonden für GASZ, CFTR,

CORTBP2 und den β -Globin-Lokus mit anderen Loci als den erwarteten auf Chromosom 7 beziehungsweise 11, beobachtet werden (Abb. 10). In Fällen, in denen kleinere Abschnitte von Chromosom 7 transloziert waren (HEK-293 und Calu-3 Zellen), zeigten diese keine CFTR-Signale.

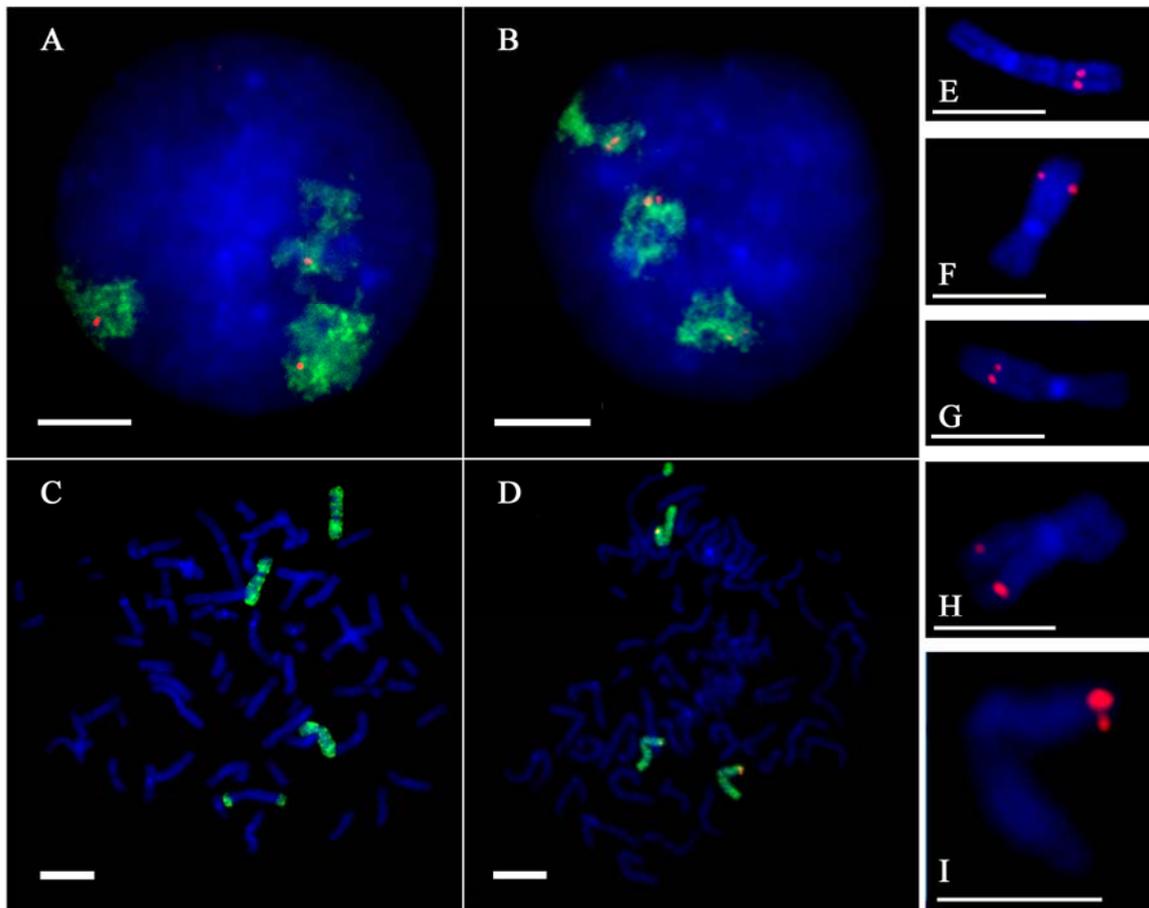


Abbildung 10: **Test der verwendeten Gen- und Chromosomen-Sonden.** Die Abbildung zeigt Methanol/Eisessig-fixierte Interphase-Zellkerne (A, B) und Metaphase-Spreitungen (C – I). In A und C sind HEK-293 Präparate nach Detektion von CFTR (rot) und Chromosom 7 (grün) durch FISH dargestellt. Diese Zelllinie besitzt 3 Kopien von Chromosom 7, sowie einen telomerischen, translozierten Abschnitt dieses Chromosoms. Der translozierte Bereich von Chromosom 7 beinhaltet nicht den CFTR-Lokus. In B und D sind K-562 Präparate nach Detektion des β -Globin-Lokus (rot) und des Chromosoms 11 (grün) gezeigt. Diese Zelllinie ist triploid und besitzt somit 3 Kopien von Chromosom 11, sowie einen translozierten Abschnitt dieses Chromosoms. Am rechten Bildrand sind einzelne Metaphase-Chromosomen (E-H: Chr. 7; I: Chr. 11) mit FISH-Signalen von GASZ (E), CFTR (F), CORTBP2 (G), dem PAC RP5 (H) und dem β -Globin-Lokus (I) vergrößert dargestellt. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Maßstäbe: 5 μ m.

Die Anzahl der Chromosomen 7 beziehungsweise 11 entsprach in allen Zelllinien dem (meist trisomen) Karyotyp. Die verwendeten primären Zelltypen (primäre Fibroblasten, Nasenepithelzellen, sowie T-Lymphozyten) wiesen den erwarteten diploiden Chromosomensatz auf. Die Position der Hybridisierungssignale der Gensonden auf den Metaphase-Chromosomen entsprach in allen Zelllinien und primären Zelltypen den Vorhersagen aus den Sequenzvergleichen. Die Anzahl der genspezifischen Signale in den Interphase-Zellkernen

entsprach weitgehend (ca. 80-90 %) der auf Grund des Karyotyps erwarteten Vorhersage, variierte jedoch wahrscheinlich auf Grund unterschiedlicher Hybridisierungseffizienzen. Die FISH mit Calu-3 Zellen erwies sich als besonders schwierig (Effizienz ca. 70-80 %). Diese Zelllinie bildete sehr dichte, zum Teil mehrlagige Zellverbände, wodurch das Eindringen der FISH-Sonden erschwert wurde. Um die korrekte Identifizierung und Lokalisation der genspezifischen FISH-Signale sicherzustellen, wurden in den folgenden Experimenten immer zusätzlich Painting-Proben zur Visualisierung der entsprechenden CTs verwendet.

3.1.2. 2D-Erosionsanalyse zur Positionsbestimmung von GASZ, CFTR und CORTBP2

Aus früheren Arbeiten in unserem Labor war bereits bekannt, dass der CFTR-Genlocus in einer dieses Gen exprimierenden Zelllinie (Calu-3) im Zellkerninneren lokalisierte, in einer nicht exprimierenden Zelllinie (SH-EP N14) dagegen eng mit der Zellkernperipherie assoziiert war. Dies wurde durch immunologische Detektion von definierten Zellkern-Bereichen, kombiniert mit einer Detektion von CFTR durch FISH (Immuno-FISH) gezeigt (Alt, 2002; Lang, 2003; Zink *et al.*, 2004). Es stellte sich die Frage, ob dieser Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Aktivität und der Kernlokalisierung von CFTR auch in anderen Zelllinien beobachtet werden kann. Außerdem sollte auch die transkriptionelle Aktivität und Kernlokalisierung der benachbarten, aber funktionell unabhängigen Gene GASZ und CORTBP2 untersucht werden. Um diesen Fragen nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Kernlokalisierung von GASZ, CFTR und CORTBP2 in den Zelllinien SH-EP N14, HEK-293, Calu-3, HeLa S6 und HT1080, sowie in primären Nasenepithelzellen und T-Lymphozyten gesunder Probanden durch eine zweidimensionale Erosionsanalyse (2D-Erosionsanalyse) ermittelt. Auf Grund des Umfangs dieser Analyse wurden diese Daten in Zusammenarbeit mit Felix Alt, Susanne Lang und Kathrin Luther (Alt, 2002; Lang, 2003; Luther, 2003) erhoben (Tabelle 1). Die 2D-Erosionsanalyse wurde an Methanol/Eisessigfixierten Präparaten durchgeführt (Abb. 11). Dieses Verfahren erlaubt eine rasche Bestimmung der Kernlokalisierung von Genloci und Chromosomen-Territorien und eignet sich daher gut für die Analyse größerer Probenmengen (Croft *et al.*, 1999). Die 2D-Erosionsanalyse gibt allerdings nur Auskunft über die relative radiale Positionierung von Genloci in Zellkernen. Der absolute Abstand zur Kernperipherie und die Assoziation mit definierten Chromatin-Fractionen konnte damit nicht ermittelt werden (Abb. 11). Um eine korrekte Interpretation der 2D-Erosionsanalyse zu ermöglichen, wurden daher zusätzliche 3D-Analysen durchgeführt (siehe folgende Kapitel). Simultan zu der Erosionsanalyse wurde die

Expression von GASZ, CFTR und CORTBP2 in den untersuchten Zelllinien in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Margarida D. Amaral (Universität Lissabon, Portugal) durch RT-PCR ermittelt (siehe Anhang und Zink *et al.*, 2004).

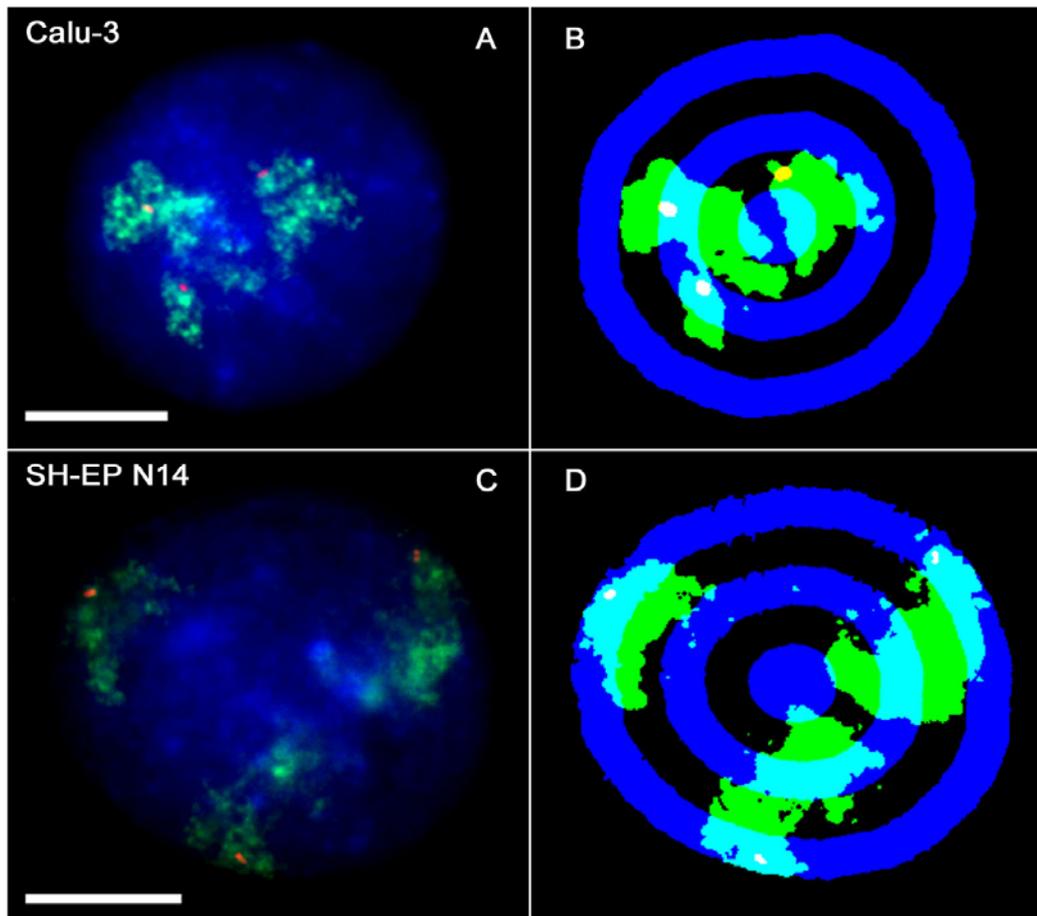


Abbildung 11: **2D-Erosionsanalyse.** Methanol/Eisessig-fixierte Zellen wurden nach der FISH am Epifluoreszenzmikroskop aufgenommen und mit der Software Adobe Photoshop (7.0) analysiert. Dazu wurde die Zellkernfläche (DAPI Färbung in A und C; blau) in 5 konzentrische radiale Schalen eingeteilt (alternierende blaue und schwarze Ringe in B und D). Der Durchmesser der Schalen betrug jeweils 20 % des Radius. Die Position der FISH-Signale (rote Signale) wurde darauf in Relation zu den Schalen bestimmt. Die CFTR-Loci in dem Calu-3 Zellkern (A, B) befinden sich hier in der 3. und 4. Schale. In dem abgebildeten SH-EP N14 Zellkern (C, D) lokalisiert CFTR in der peripheren 1. Schale. Zur Kontrolle wurde ebenfalls eine Painting-Probe (grüne Flächen) für Chromosom 7 verwendet. Maßstab: 5 μ m

Die Ergebnisse der Erosionsanalyse zeigten, dass ein hoher Anteil von CFTR-Signalen (ca. 47%) in SH-EP N14 Zellen in der ersten, peripheren Schale lokalisierte (Tabelle 1 und Abb. 12). Dieser Anteil nahm in den innen liegenden Schalen (zwei bis fünf) stetig ab. Aus vorangegangenen Immuno-FISH Experimenten (Alt, 2002; Lang, 2003) war bereits bekannt, dass CFTR in SH-EP N14 Zellen eng mit der Zellkernperipherie assoziiert war. Daraus ergab sich die Annahme, dass eine Verteilung in der 2D-Erosionsanalyse, wie sie in SH-EP N14 Zellen gefunden wurde (mehr als 40 % der FISH-Signale in der ersten Schale, konstanter Abfall zu den inneren Schalen hin) einer engen Assoziation des Genlokus mit der Kernperipherie entspricht.

Tabelle 1: 2D-Erosionsanalyse zur Positionsbestimmung von GASZ, CFTR und CORTBP2 in Zellkernen von verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	GASZ			CFTR			CORTBP2		
	MW	SD	Exp	MW	SD	Exp	MW	SD	Exp
Lymphozyt.									
1	46,61%	8,06%	SL	52,22%	3,94%	FA	28,56%	0,67%	SL
2	30,52%	1,83%		28,07%	1,31%	SL	38,04%	8,18%	
3	13,72%	4,17%		11,86%	4,04%		15,83%	6,5%	
4	7,63%	0,08%		6,52%	2,15%		15,39%	0,48%	
5	1,52%	2,14%		1,33%	0,94%		2,17%	1,49%	
HEK-293									
1	43,63%	1,70%	SL	43,26%	3,77%	AE	37,96%	0,39%	SL
2	31,64%	4,03%		31,15%	2,35%	KL	31,39%	1,36%	
3	17,61%	2,96%		14,06%	4,26%	SL	18,99%	2,26%	
4	6,37%	1,70%		6,81%	2,28%		9,48%	0,93%	
5	0,76%	1,07%		4,74%	2,32%		2,17%	3,07%	
SH-EPN14									
1	45,99%	2,19%	SL	47,6%	5,19%	AE	47,34%	7,12%	SL
2	32,93%	2,53%		29,4%	1,85%	FA	33,68%	9,48%	
3	13,75%	3,74%		16,0%	4,53%	KL	10,36%	1,06%	
4	6,63%	2,41%		6,5%	2,71%	SL	6,85%	1,53%	
5	0,69%	0,98%		1,4%	1,52%		0,96%	1,36%	
HeLa S6									
1				47,17%	2,53%	AE	30,7%	3,02%	SL
2				26,09%	0,65%		33,13%	2,53%	
3	n.d.			16,7%	3,72%		16,89%	1,44%	
4				7,53%	2,75%		13,16%	3,84%	
5				2,49%	2,17%		6,11%	1,91%	
HT1080									
1	41,08%	1,15%	SL	39,63%	9,0%	FA	31,98%	10,99%	SL
2	36,37%	3,66%		29,44%	6,28%	SL	31,15%	6,56%	
3	12,57%	0,58%		18,04%	1,46%		14,67%	1,4%	
4	8,65%	3,05%		9,31%	1,85%		13,02%	2,04%	
5	1,33%	0,04%		3,59%	0,58%		3,91%	0,42%	
Calu-3									
1	34,41%	7,91%	SL	22,21%	3,95%	AE	36,71%	2,29%	SL
2	36,96%	1,94%		34,22%	3,94%	FA	24,74%	2,73%	
3	15,13%	0,18%		24,4%	6,23%	KL	22,28%	3,23%	
4	10,96%	6,07%		14,9%	4,1%	SL	12,85%	1,67%	
5	2,54%	3,60%		6,1%	0,14%		3,42%	0,12%	
Nasenepith									
1				31,25%	2,21%	AE			
2				42,97%	1,1%				
3	n.d.			14,84	1,1		n.d.		
4				9,38%	2,21%				
5				1,56%	0,12%				

Angegeben sind die Mittelwerte (MW) der Anteile an FISH-Signalen in den Schalen 1 (Peripherie) bis 5 (Zentrum). Für jede Kombination (Gen und Zelltyp) wurden zwei bis acht unabhängige Experimente durchgeführt. SD gibt die entsprechende Standardabweichung an. Die Experimente wurden von den unter „Exp“ angegebenen Personen durchgeführt (AE: A. Englmann, FA: F. Alt, KL: K. Luther, SL: S. Lang). Die Anzahl der jeweils ausgewerteten FISH-Signale ist in Abbildung 12 angegeben. („n.d.“: nicht durchgeführt).

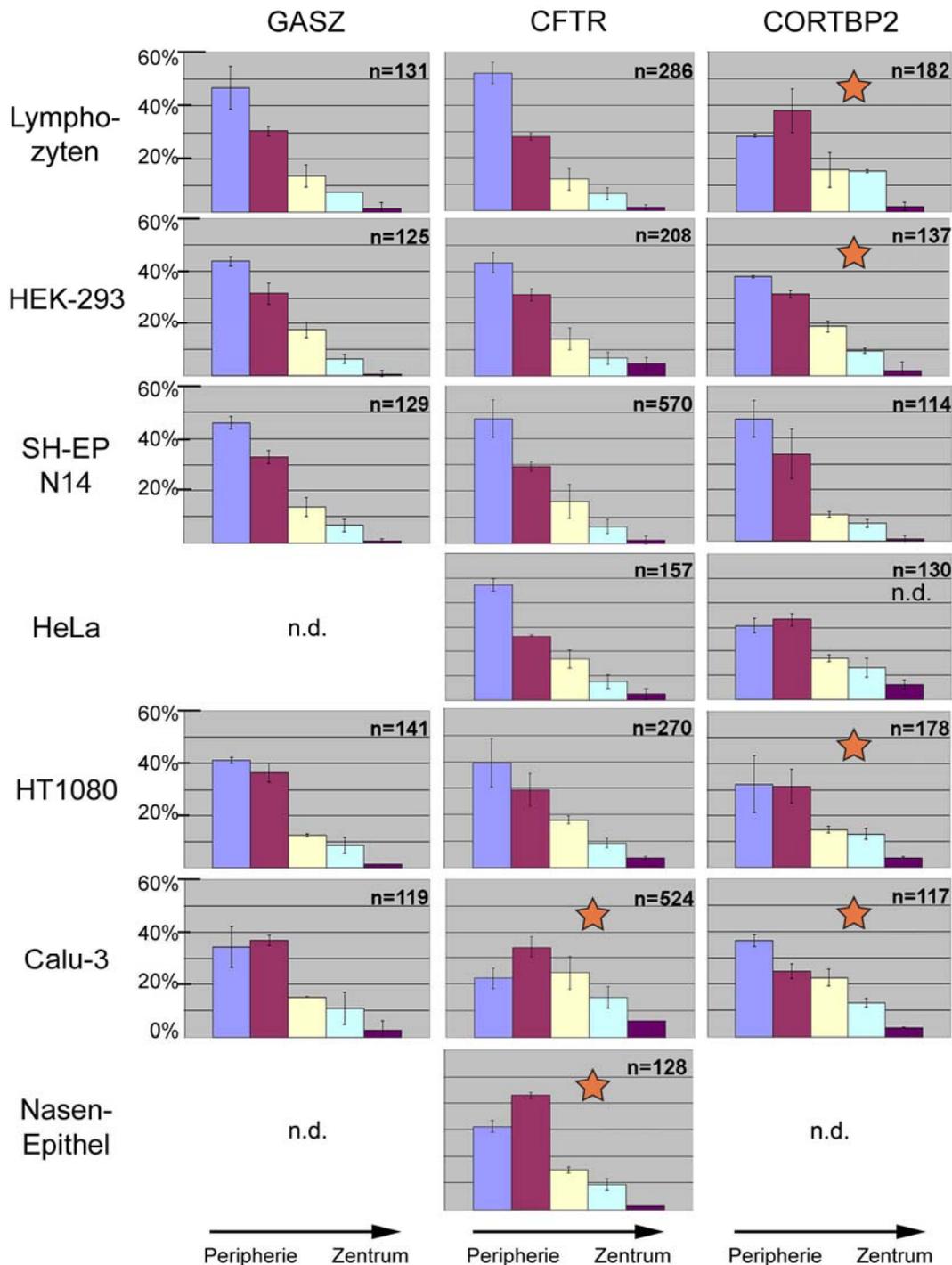


Abbildung 12: **Graphische Darstellung der Ergebnisse der 2D-Erosionsanalyse.** Methanol/Eisessigfixierte Präparate der angegebenen Zelllinien und primären Zelltypen wurden mit Proben gegen GASZ (linke Spalte), CFTR (CF1, mittlere Spalte) oder CORTBP2 (rechte Spalte) hybridisiert. Die Zellkerne wurden am Epifluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die zweidimensionalen Bilder der Zellkerne wurden mit dem Programm Adobe Photoshop (7.0) in 5 konzentrische radiale Schalen eingeteilt (siehe Abb. 11). Die Position der FISH-Signale wurde anschließend in Bezug auf die entsprechenden Schalen ausgewertet. Die Balken in den Diagrammen entsprechen dem Anteil (Mittelwerte \pm SD) an FISH-Signalen in den fünf Schalen (von links nach rechts: Peripherie bis Zentrum). Jede Kombination (Gen und Zelltyp) wurde in zwei bis acht unabhängigen Experimenten analysiert. Ein orangefarbener Stern zeigt an, dass ein Gen in der entsprechenden Zelllinie exprimiert wird. Dies wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Margarida D. Amaral (Universität Lissabon, Portugal) durch RT-PCR ermittelt (siehe Anhang und Zink *et al.*, 2004). („n.d.“: nicht durchgeführt) „n“ entspricht der Anzahl an ausgewerteten FISH-Signalen.

Diese Verteilung der FISH-Signale, die entsprechend „treppenartige“ Diagramme ergab, fand sich in allen Fällen in denen das untersuchte Gen nicht exprimiert wurde, mit Ausnahme von GASZ in Calu-3 Zellen (Abb. 12). In diesen Zellen deutete die Erosionsanalyse auf eine weniger starke Assoziation mit der Zellkernperipherie hin. Im Gegensatz zu der Situation in SH-EP N14 Zellen, fanden sich in Calu-3 Zellen lediglich 22 % der CFTR-Signale in der äußersten Schale, mit einem Maximum in der zweiten Schale (34 %, Abb. 12). Aus 3D-Analysen war bereits bekannt, dass CFTR in Calu-3 Zellen vorwiegend im Zellkerninneren lokalisiert (Alt, 2002). Daher wurde hier angenommen, dass diese Verteilung in der 2D-Erosionsanalyse einer Lokalisation eines Genlokus im Zellkerninneren entspricht.

Eine ähnliche Verteilung von CFTR-Signalen wurde in der Erosionsanalyse von Nasenepithelzellen gefunden (Abb. 12). Auch hier deutete ein Maximum in der zweiten Schale eine Lokalisation im Zellkerninneren an. Ebenso wie Calu-3 Zellen exprimieren diese Zellen CFTR. Außerdem wurde beobachtet, dass Gene, welche in der entsprechenden Zelllinie / Zelltyp exprimiert werden, stets zu einem Anteil von weniger als 40 % in der äußersten Schale lokalisierten. Dies deutete darauf hin, dass transkriptionell aktive Gene in den untersuchten Zellen weniger stark mit der Zellkernperipherie assoziiert waren. Da die Interpretation der 2D-Erosionsanalyse jedoch nicht ganz unproblematisch ist, wurden die hier erzielten Ergebnisse durch weitere 3D-Analysen kontrolliert.

3.1.3. 3D-Erosionsanalyse zur Positionsbestimmung von GASZ, CFTR und CORTBP2

Der Vorteil der 2D-Erosionsanalyse besteht in der raschen Durchführbarkeit und somit der Möglichkeit, große Datensätze zu erlangen. Allerdings können bei dieser Analyse keine Informationen zur dreidimensionalen Positionierung von Genloci gesammelt werden. Um die ermittelten Daten der 2D-Analysen besser interpretieren zu können, wurde die Kernlokalisierung von GASZ, CFTR und CORTBP2 in drei ausgewählten Zelllinien zusätzlich durch eine 3D-Erosionsanalyse bestimmt. Die 3D-Erosionsanalyse wurde mit Formaldehyd-fixierten SH-EP N14, Calu-3 und HEK-293 Zellen vorgenommen. In diesen Zelllinien werden GASZ, CFTR und CORTBP2 in unterschiedlichen Kombinationen exprimiert (Abb. 12 und 14; siehe auch Anhang und Zink *et al.*, 2004). Nach der FISH-Detektion wurden optische Bildstapel der Zellkerne am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM) aufgenommen. Die Zellkerne wurden dreidimensional rekonstruiert und - ebenso wie in der 2D-Erosionsanalyse - in Schalen mit einer Breite von jeweils 20 % des Radius eingeteilt (Abb. 13). Dies hatte zur Konsequenz, dass die Schalen zwar stets denselben Durchmesser besaßen,

jedoch von außen nach innen einen zunehmend kleineren Anteil des Zellkernvolumens repräsentierten (Abb. 13). Es erschien daher zunächst vernünftiger, die Zellkerne in Schalen mit identischen Volumina einzuteilen. Dies war prinzipiell möglich, erwies sich jedoch als nicht praktikabel. Eine Einteilung in Schalen mit identischen Volumina führte zu sehr schmalen äußeren Schalen, vor allem an der Zellkern-Ober- und Unterseite (nicht gezeigt). Nach der Überlagerung der Schalen mit den FISH-Signalen, erstreckten sich die in z-Orientierung meist tonnenförmigen Signale (bedingt durch die „point spread function“ bei Abbildung der Signale am CLSM) oft über mehrere Schalen. Dies machte eine eindeutige Zuordnung häufig unmöglich. Daher wurde die 3D-Erosionsanalyse durch Aufteilung der Zellkerne in Schalen mit einer Breite von jeweils 20 % des Radius durchgeführt. Bis auf wenige Ausnahmen (welche nicht in die Auswertung mit einbezogen wurden), konnten die FISH-Signale auf diese Weise eindeutig zugeordnet werden.

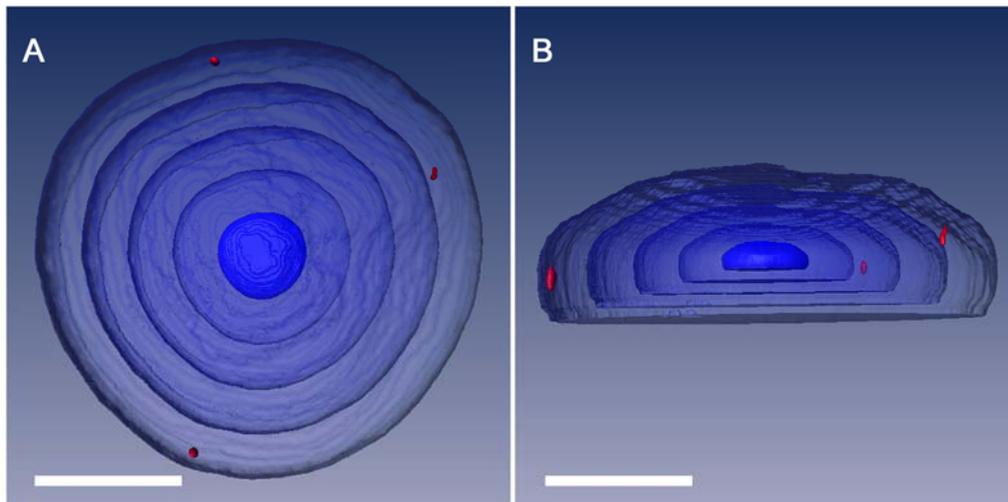


Abbildung 13: **3D-Erosionsanalyse.** Konfokale Bildstapel von Formaldehyd-fixierten Zellkernen wurden in das Programm Amira (4.6) eingelesen und die Zellkerne wurden dreidimensional rekonstruiert. Das Kernvolumen wurde durch TOPRO-3 Färbung definiert. Anschließend wurden die Zellkerne in 5 konzentrische, radiale Schalen eingeteilt (blau-schattierte Schalen). Die Breite der Schalen betrug jeweils 20 % des Radius. FISH-Signale von CFTR (rot) wurden manuell ausgewählt und mit den Schalen überlagert. Die Ansicht von oben (A) und der Seite (B) des Zellkerns zeigt, dass in der 3D-Erosionsanalyse die eindeutige positionelle Zuordnung der Signale gut möglich ist. Befand sich ein Signal auf der Grenze zwischen zwei Schalen, so wurde das Intensitätszentrum des Signals bestimmt und dieses wenn möglich einer Schale zugeordnet. Unklar positionierte Signale wurden nicht ausgewertet. Die abgeflachte untere Seite in der Seiten-Ansicht (B) entspricht der Zell-Adhäsions-Seite auf dem Deckglas. Die drei CFTR-Signale in A und B befinden sich hier in der ersten Schale. Abgebildet ist ein rekonstruierter SH-EP N14 Zellkern. Maßstab: 5 μ m

Die Daten der 3D-Erosionsanalyse (Abb. 14 und Tabelle 2) zeigten, im Vergleich zu der 2D-Erosionsanalyse (Abb. 12), deutlichere Unterschiede in der Verteilung von nicht exprimierten beziehungsweise exprimierten Genen. Die Verteilung von exprimierten Genen (z.B. alle drei Gene in SH-EP N14 Zellen) besaß hier ein ausgeprägtes Maximum (80-90 %) in der peripheren ersten Schale und zeigte einen rapiden Abfall zu den inneren Schalen hin. Dagegen zeigte die Verteilung von transkriptionell aktiven Genen in der 3D-Erosionsanalyse

eindeutig eine Lokalisation im Kerninneren an (Sterne in Abb. 14). So befanden sich in Calu-3 Zellen weniger als 30 % der CFTR-Signale in der ersten Schale. Auch CORTBP2 zeigte in HEK-293 Zellen in der 3D-Erosionsanalyse eine wesentlich zentralere Lokalisation, als die benachbarten inaktiven Gene GASZ und CFTR. In der 2D-Erosionsanalyse (Abb. 12, Tabelle 1) war der Unterschied zwischen der Lokalisation von CORTBP2 und GASZ beziehungsweise CFTR in HEK-293 Zellen weniger ausgeprägt.

Tabelle 2: 3D-Erosionsanalyse zur Positionsbestimmung von GASZ, CFTR und CORTBP2 in Zellkernen von verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	GASZ		CFTR		CORTBP2	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
SH-EPN14						
1	83,28%	1,12%	88,6%	1,54%	82,56%	4,21%
2	13,1%	1,03%	9,73%	2,2%	15,06%	2,5%
3	3,62%	0,52%	1,67%	1,45%	2,38%	2,06%
4						
5						
Allelität	61%		71%		61%	
HEK-293						
1	83,06%	2,72%	87,11%	1,19%	39,86%	2,05%
2	14,49%	2,35%	11,78%	1,91%	39,74%	2,93%
3	2,44%	2,14%	1,11%	1,92%	17,5%	0,77%
4					2,9%	2,52%
5						
Allelität	60%		63%		33% *	
Calu-3						
1	72,55%	4,29%	27,92%	2,89%	68,84%	2,41%
2	22,52%	2,98%	37,32%	1,24%	24,21%	3,38%
3	4,93%	1,33%	24,03%	0,96%	6,95%	3,12%
4			9,4%	2,69%		
5			1,33%	2,31%		
Allelität	52%		40%		50%	

Angegeben sind die Mittelwerte (MW) der Anteile an FISH-Signalen in den Schalen 1 (Peripherie) bis 5 (Zentrum). Es wurden für jede Kombination (Gen und Zelllinie) jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt; SD gibt die Standardabweichung an. Die Allelität gibt den durchschnittlichen Anteil an Signalen in derselben Schale eines Kernes wieder. Ein hoher Anteil bedeutet, dass die Allele eines Gens in einem Zellkern der entsprechenden Zelllinie zu einem hohen Prozentsatz in der 3D-Erosionsanalyse in derselben Schale vorgefunden wurden. * Diese relativ geringe Allelität beruht vermutlich darauf, dass CORTBP2 in HEK-293 Zellen sehr häufig nahe der Grenze zwischen der ersten und zweiten Schale vorgefunden wurde. So war häufig ein Allel in der einen Schale, das andere (die anderen) in der nächsten Schale. Dies spiegelt sich auch in der annähernd gleichen Verteilung in den Schalen eins und zwei wider. Die Anzahl der jeweils ausgewerteten FISH-Signale ist in Abbildung 14 angegeben.

In der 3D-Erosionsanalyse wurden in HEK-293 Zellen die CORTBP2-Allele häufig in demselben Zellkern sowohl in der ersten als auch in der zweiten Schale vorgefunden (Abb. 14). Dies äußerte sich in einer auffallend geringen Allelität der Signale (Tabelle 2). Im Vergleich zu den übrigen Zelllinien lokalisierten in Calu-3 Zellen alle drei Gene weiter im Zellkerninneren. Außerdem zeigte sich, dass CORTBP2 in Calu-3 Zellen trotz des

transkriptionell aktiven Status im Gegensatz zu CFTR relativ peripher lokalisierte (Abb. 14: ca. 69 % in der ersten Schale). Dies stimmt mit den Ergebnissen der 2D-Erosionsanalyse überein (Abb. 12). Weiterhin zeigte CORTBP2 in der 3D-Analyse eine nahezu identische Positionierung wie GASZ, obwohl GASZ in Calu-3 Zellen nicht exprimiert wird.

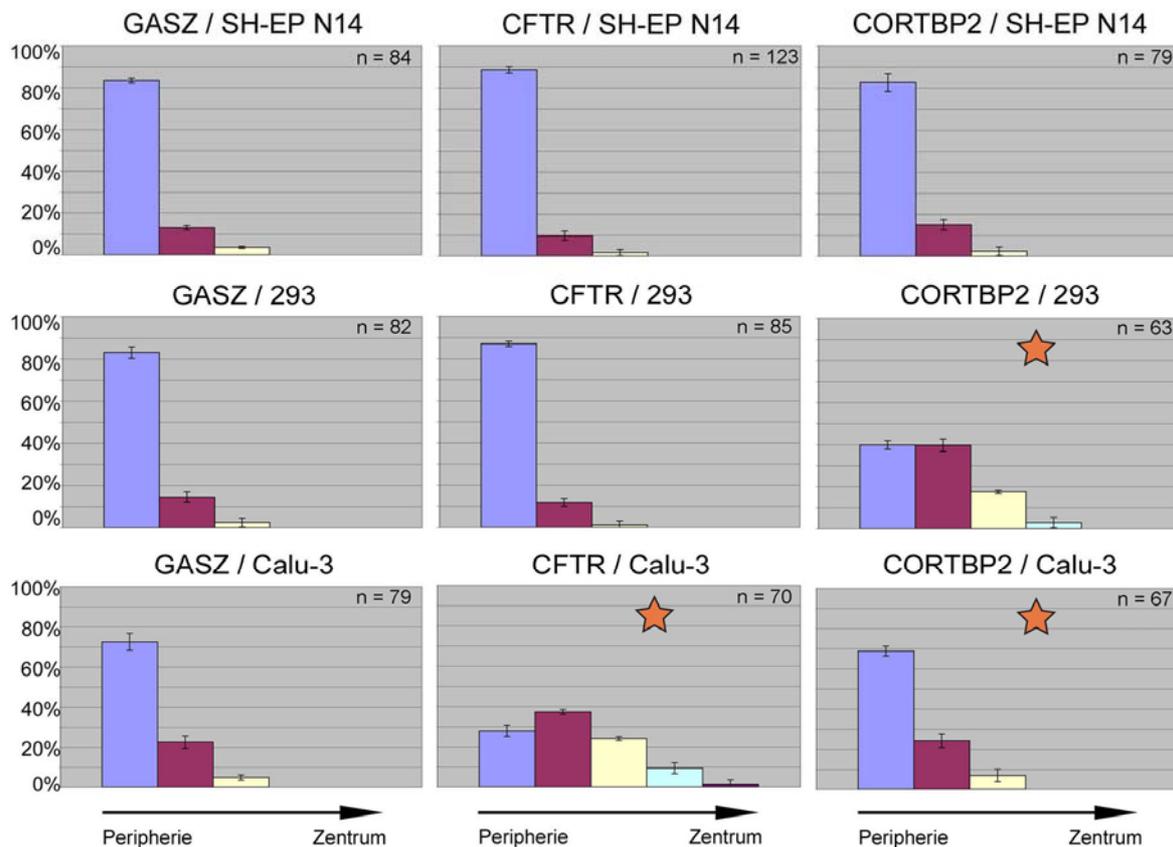


Abbildung 14: **Graphische Darstellung der Ergebnisse der 3D-Erosionsanalyse.** Formaldehyd-fixierte Präparate der Zelllinien SH-EP N14, HEK-293 und Calu-3 wurden mit Proben für GASZ (linke Spalte), CFTR (CF1, mittlere Spalte) oder CORTBP2 (rechte Spalte) hybridisiert. Die Zellkerne wurden am CLSM aufgenommen. Die Bildstapel der Zellkerne wurden mit dem Programm Amira dreidimensional rekonstruiert und in 5 konzentrische radiale Schalen eingeteilt (siehe Abb. 13). Die Position der FISH-Signale wurde anschließend in Bezug auf diese Schalen ausgewertet. Die Balken in den Diagrammen entsprechen dem Anteil (Mittelwerte \pm SD) an FISH-Signalen in den fünf Schalen (von links nach rechts: Peripherie bis Zentrum). „n“ entspricht der Anzahl an ausgewerteten FISH-Signalen. Ein orangefarbener Stern zeigt an, ob ein Gen in der jeweiligen Zelllinie exprimiert wird. (siehe Abb. 12, Anhang und Zink *et al.*, 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der 3D-Erosionsanalyse die Interpretation der Ergebnisse der 2D-Erosionsanalyse im Wesentlichen stützten. Darüber hinaus besaß die 3D-Analyse den Vorteil, dass sie die dreidimensionale Verteilung der Genloci eindeutig anzeigte. Dennoch ergaben sich vor allem in Bezug auf die nahezu identische Verteilung von GASZ und CORTBP2 in Calu-3 Zellen Unklarheiten. So erschien es ratsam noch weitere Methoden zur Untersuchung der Kernlokalisierung mit einzubeziehen um zu klären, ob hier tatsächlich eine gleiche Positionierung dieser unterschiedlich exprimierten Gene vorliegt. Dazu wurde die Assoziation der Genloci mit dem perinukleären Heterochromatin untersucht, wie im folgenden Kapitel beschrieben wird.

3.1.4. Lokalisation im perinukleären Heterochromatin

Die bisherigen Daten zeigten in der Regel einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Kernpositionierung und der transkriptionellen Regulation der untersuchten Genloci. Jedoch gab es auch Fälle, in denen weiterer Klärungsbedarf nötig war. Sinnvoll erschien, die Assoziation der Genloci mit perinukleärem Heterochromatin zu untersuchen, da dieses im Gegensatz zu den in den Kern hinein projizierten Schalen ein echtes zelluläres Kompartiment darstellt. Da das perinukleäre Heterochromatin transkriptionell inaktiv ist (Sadoni *et al.*, 1999), erschien eine Assoziation der inaktiven Genloci an der Kernperipherie mit diesem Kompartiment möglich. Das perinukleäre Heterochromatin grenzt an die Zellkernlamina, ist nicht angereichert an hochazetylierten Isoformen von Histon H4, ist transkriptionell inaktiv und repliziert während der zweiten Hälfte der S-Phase (Abb. 15; Sadoni *et al.*, 1999).

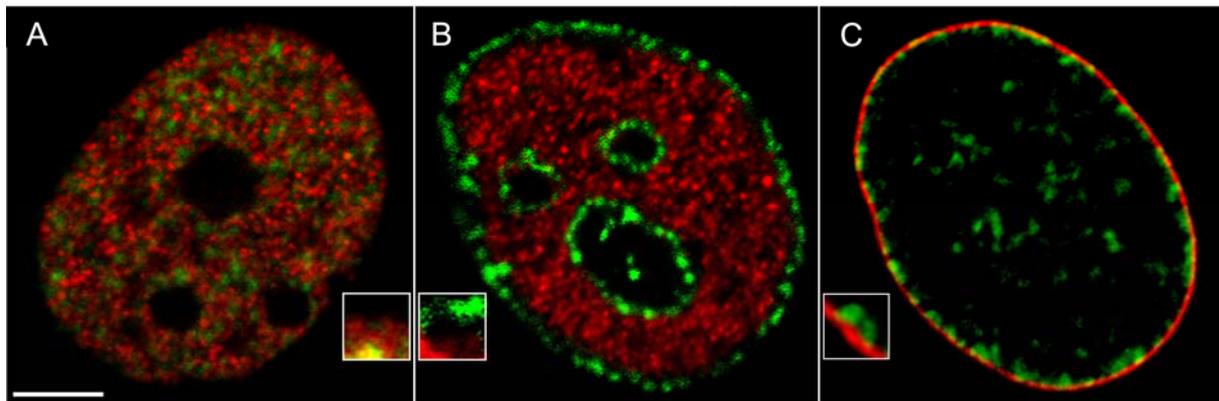


Abbildung 15: **Darstellung des perinukleären Heterochromatins.** Die Abbildung zeigt konfokale Schnitte von SH-EP N14 Zellkernen. Die Zellen wurden mit Antikörpern spezifisch für BrdU (grün in A, B und C), Histon H4 azetyliert an Lysin 8 (H4AcK8; rot in A und B) oder Lamina-assoziiertes Polypeptid 2 β (Lap2 β ; rot in C) immungefärbt. Die Replikations-Pulsmarkierung mit BrdU erlaubt die Identifizierung temporärer S-Phase Stadien. A zeigt einen Zellkern in der frühen S-Phase. Früh-replizierende DNA (grün) ist angereichert an H4AcK8 (rot). Der in B abgebildete Zellkern befindet sich in einem mittleren S-Phase Stadium (Typ III, Klassifizierung nach O'Keefe *et al.*, 1992 und Sadoni *et al.*, 1999). Das zu diesem Zeitpunkt replizierende perinukleäre Heterochromatin befindet sich an der Kernperipherie und ist nicht angereichert an H4AcK8 (keine Kolokalisation von BrdU und H4AcK8). (C) Das perinukleäre Heterochromatin (grün) liegt der Zellkernlamina an (visualisiert durch Färbung von Lap2 β , rot). Ausschnittvergrößerungen: 3x; Maßstab: 5 μ m

Im Folgenden wurde die Assoziation von GASZ, CFTR und CORTBP2 in SH-EP N14, HEK-293 und Calu-3 Zellen mit dem perinukleären Heterochromatin analysiert. Dies wurde durch eine Kolokalisationsanalyse ermöglicht (Abb.16). Dazu wurden SH-EP N14, HEK-293 und Calu-3 Zellen mit BrdU pulsmarkiert und GASZ, CFTR oder CORTBP2 mittels 3D-FISH detektiert. Die Replikations-Pulsmarkierung (RPM) mit BrdU ermöglichte die Identifizierung temporärer S-Phase Stadien. Für die Analyse wurden nur Zellkerne herangezogen, die sich in einem mittleren S-Phase Stadium befanden (Typ III, Klassifizierung nach O'Keefe *et al.*, 1992 und Sadoni *et al.*, 1999). Auf diese Weise konnte das perinukleäre Heterochromatin

verlässlich detektiert und eindeutig von dem früher replizierenden, hochazetylierten Euchromatin unterschieden werden (Abb. 15; Sadoni *et al.*, 1999; Zink *et al.*, 2003). In SH-EP N14 Zellen lokalisierte bei allen drei Genen ein hoher Anteil der FISH-Signale in dem perinukleären Heterochromatin (Tabelle 3, Abb. 16 und 17). Der Grad an Kolokalisation entsprach dabei ungefähr dem Anteil an Signalen in der äußersten Schale in der 3D-Erosionsanalyse (80-90 %; Tabelle 2, Abb. 14). GASZ und CFTR werden in HEK-293 Zellen nicht transkribiert und auch hier wiesen diese Genloci einen hohen Grad (80-90%) an Kolokalisation mit dem peripheren Heterochromatin auf. Im Gegensatz dazu lokalisierte der transkriptionell aktive CORTBP2-Lokus in diesen Zellen nur zu einem vergleichsweise geringen Grad (ca. 11 %) in dem perinukleären Heterochromatin (Tabelle 3, Abb. 16 und 17).

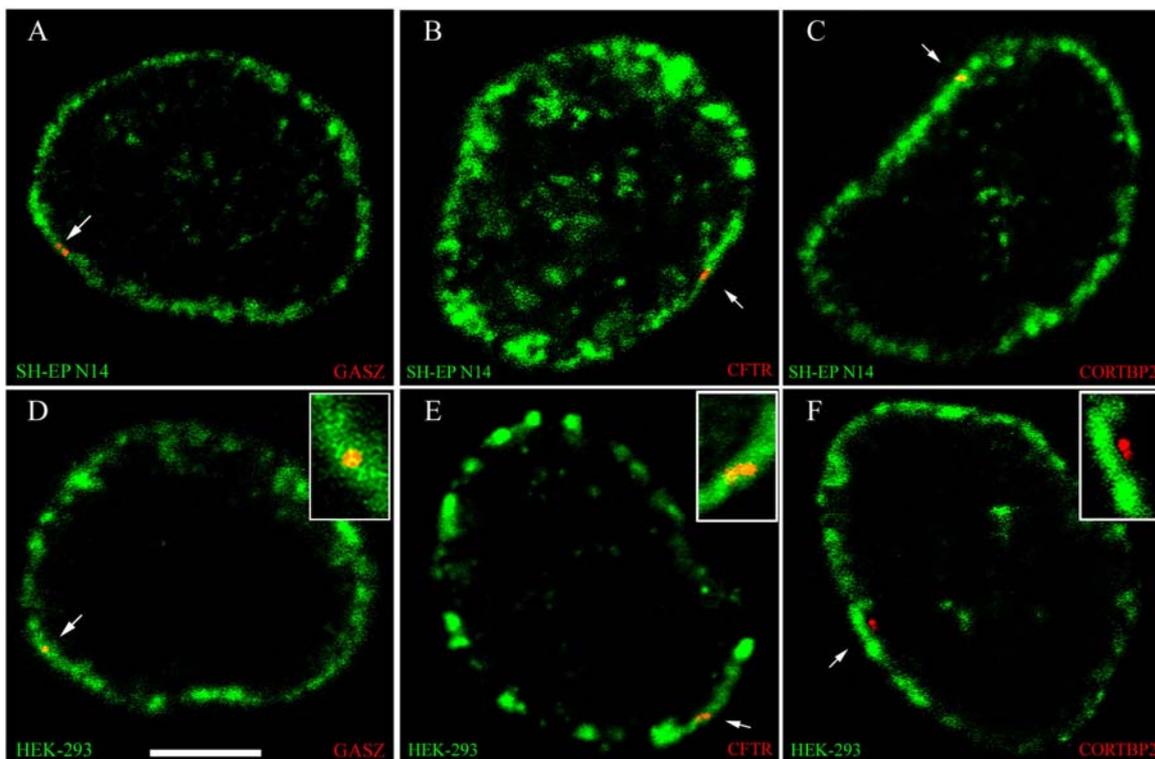


Abbildung 16: Kolokalisation von GASZ, CFTR und CORTBP2 mit perinukleärem Heterochromatin. Die Abbildung zeigt einzelne lichtoptische Schnitte von Formaldehyd-fixierten Zellkernen von SH-EP N14 (A-C) und HEK-293 (D-F) Zellen. GASZ (A, D), CFTR (B, E) und CORTBP2 (C, F) wurden durch FISH (rote Signale, Pfeile) detektiert. Perinukleäres und perinukleoläres Heterochromatin wurde durch RPM (BrdU, grün) visualisiert (s. Abb. 15). GASZ, CFTR und CORTBP2 waren in SH-EP N14 Zellen in das perinukleäre Heterochromatin eingebettet (Pfeile in A-C, Kolokalisation der FISH-Signale mit dem perinukleären Heterochromatin). Dies konnte auch bei GASZ und CFTR in HEK-293 Zellen beobachtet werden (D, E; Vergrößerungen). Der in diesen Zellen exprimierte CORTBP2-Lokus lokalisierte dagegen in dem angrenzenden Euchromatin (F; Vergrößerung). Ausschnittsvergrößerungen: 3x Maßstab: 5 µm

In Calu-3 Zellen befand sich die gesamte CFTR-Region weiter im Kerninneren (Abb. 14 und 17). Die Assoziation von GASZ, CFTR und CORTBP2 mit dem perinukleären Heterochromatin in Calu-3 Zellen wird in Kapitel 3.1.4.2 beschrieben.

Tabelle 3: **Lokalisation von GASZ, CFTR und CORTBP2 im perinukleären Heterochromatin**

Zelllinie	GASZ		CFTR		CORTBP2	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
SH-EPN14	81,54%	1,67%	90,00%	1,60%	82,26%	2,89%
HEK-293	81,82%	2,65%	88,00%	1,19%	11,11%	2,51%
Calu-3	62,26%	2,62%	3,64%	3,23%	39,02%	3,93%

Die Tabelle zeigt die Anteile der FISH-Signale (MW +/- SD), die mit dem perinukleären Heterochromatin kolokalisierten. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Für jede Kombination (Gen und Zelllinie) wurden ca. 50-60 FISH-Signale ausgewertet.

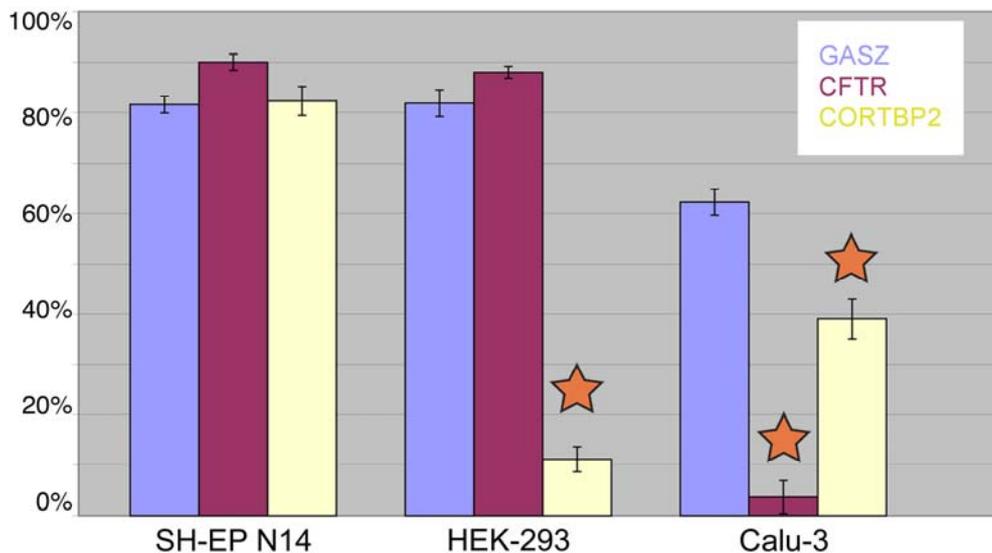


Abbildung 17: **Lokalisation von GASZ, CFTR und CORTBP2 im perinukleären Heterochromatin.**

Das Heterochromatin wurde durch RPM mit BrdU detektiert (siehe Abb. 15). Der BrdU-Nachweis erfolgte nach der FISH-Detektion der angegebenen Gene. Die Balken geben den Anteil an Kolokalisation der Genloci (GASZ: blau, CFTR: violett, CORTBP2: gelb; Mittelwerte +/- SD) mit dem perinukleären Heterochromatin in der jeweiligen Zelllinie an. Ein oranger Stern symbolisiert die Expression eines Gens in der entsprechenden Zelllinie. Es wurden jeweils ca. 50-60 FISH-Signale ausgewertet.

3.1.4.1. Besonderheiten bei HEK-293 Zellen

Die Kolokalisationsanalyse zeigte, dass in HEK-293 Zellen der CORTBP2-Lokus zwar noch relativ peripher lokalisierte, sich aber sehr häufig (ca. 90 %) außerhalb des Heterochromatins im angrenzenden, transkriptionell aktiven Euchromatin im Zellkerninneren befand (Abb. 16 F und Abb. 17). Die benachbarten Genloci (GASZ und CFTR) kolokalisierten dagegen, ebenso wie alle drei Loci in SH-EP N14 Zellen, mit dem perinukleären Heterochromatin (Abb. 16 A-E und Abb. 17). Diese Besonderheit der Kernlokalisierung von CORTBP2 in HEK-293 Zellen spiegelte sich wahrscheinlich schon in der 2D-Erosionsanalyse wieder (Abb. 12). Dort befanden sich weniger als 40 % der CORTBP2-Signale in HEK-293 Zellen in der äußersten Schale, obwohl auch hier die Verteilung eine relativ periphere Kernlokalisierung des Genlokus anzeigte.

3.1.4.2. Besonderheiten bei Calu-3 Zellen

In Calu-3 Zellen wird nur GASZ nicht transkribiert. Hier konnte eine Tendenz (Abb. 17 und Tabelle 3: ca. 60 %) zu einer bevorzugten Kolokalisation mit dem perinukleären Heterochromatin beobachtet werden. CORTBP2 wird in diesen Zellen exprimiert. Der Anteil an FISH-Signalen, die mit dem perinukleären Heterochromatin kolokalisierten, war aber relativ hoch (ca. 40 %), wenn auch geringer als bei GASZ. Der CFTR-Lokus war dagegen in den meisten Fällen (ca. 95 %) nicht mit dem perinukleären Heterochromatin assoziiert (Abb. 17). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Kolokalisationsanalyse zeigten GASZ und CORTBP2 in der 3D-Erosionsanalyse kaum Unterschiede bezüglich ihrer Verteilung (Abb. 14). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die hier durchgeführte Kolokalisationsanalyse die geeignetere Methode war, um die Kernlokalisierung dieser Gene zu untersuchen. Sicher war es auch die sinnvollere Methode, da hier die Assoziation mit biologischen Kompartimenten, und nicht mit artifiziellen Schalen untersucht wurde. Auf jeden Fall zeigten die Ergebnisse, dass in allen hier untersuchten Fällen die Kernlokalisierung eines Genlokus mit seiner transkriptionellen Aktivität korrelierte, wenn auch bei GASZ und CORTBP2 in Calu-3 Zellen weniger ausgeprägt als bei den anderen untersuchten Fällen. Es stellte sich nun die Frage, worauf diese in Calu-3 Zellen beobachteten Abweichungen beruhen.

Es war denkbar, dass die relativ interne Kernlokalisierung aller drei Genloci in Calu-3 Zellen aus einer Destabilisierung des perinukleären Heterochromatins oder einer veränderten Interaktionen der Chromosom-7-Territorien (CT 7) mit der Kernperipherie resultierten. Um diesen Fragen nachzugehen, wurden die Struktur und die Lage der CT 7 in diesen Zellen analysiert (Abb. 18). Bisher wurde beobachtet, dass in allen eingesetzten Zelllinien das CT 7 mit der Kernperipherie assoziiert war (nicht gezeigt). Auch in Calu-3 Zellen wurde dies beobachtet (Abb. 18). In diesen Zellen zeigten die CT 7 extensive Kontakte zu der Kernperipherie (Abb. 18 A, B). Der im Zellkerninneren lokalisierende CFTR-Lokus befand sich häufig an Extensionen des CT 7 in das Zellkerninnere hinein (Abb. 18 C). Diese Beobachtungen legten nahe, dass in Calu-3 Zellen spezifisch die CFTR-Region, nicht aber das gesamte CT 7 im Zellkerninneren positionierte. Daneben erschien auch die Ausbildung des perinukleären Heterochromatins in Calu-3 Zellen normal (Abb. 18 A, B).

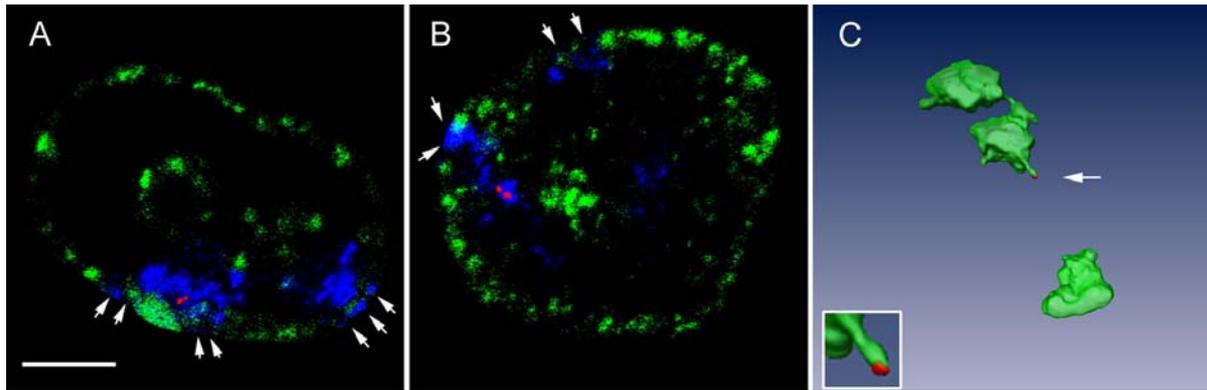


Abbildung 18: **Räumliche Anordnung der Chromosom-7-Territorien und der CFTR-Region in Calu-3 Zellen.** (A und B) Die Abbildungen zeigen lichtoptische Schnitte von Formaldehyd-fixierten Zellkernen von Calu-3 Zellen. CFTR (rote Signale) und CT 7 (blau) wurden durch FISH detektiert. Perinukleäres und perinukleoläres Heterochromatin wurde durch RPM mit BrdU visualisiert (grün). Die Territorien wiesen extensive Kontakte (Pfeile) mit der Zellkern-Peripherie auf. Dies wurde auch in den anderen untersuchten Zelllinien beobachtet (nicht gezeigt). (C) Die Abbildung zeigt eine mit der Software Amira (4.6) erstellte 3D-Rekonstruktion von drei CT 7 (grün) und einem CFTR-Signal (rot, Pfeil). CT 7 und CFTR wurden durch 3D-FISH detektiert. CFTR lokalisiert hier im Zellkerninneren an einer Extension eines Territoriums (rote Signale, Pfeil). Ausschnittvergrößerung: 3x Maßstab: 5 μ m

Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass es unwahrscheinlich ist, dass die relativ interne Kernlokalisierung aller drei Genloci in Calu-3 Zellen aus Störungen in der Bildung des perinukleären Heterochromatins oder der Struktur und Lage des CT 7 resultierten. Außerdem wurde eine vergleichbar interne Position von CFTR auch in primären Nasenepithelzellen beobachtet, die CFTR ebenfalls exprimieren (Abb. 12). Dies verdeutlicht, dass zumindest die interne Position von CFTR keine Besonderheit der Calu-3 Adenokarzinom-Zelllinie darstellte.

3.1.5. Vergleiche mit der Kernlokalisierung des β -Globin-Lokus

Als weitere Kontrolle wurde die Chromatinorganisation und Genpositionierung in Calu-3, HEK-293 und SH-EP N14 Zellen an einem von der CFTR-Region unabhängigen Genlokus untersucht. Dazu wurde die Kernlokalisierung des β -Globin-Lokus analysiert. Insbesondere sollte dabei auch geklärt werden, ob die Kernlokalisierung dieses Genlokus sich in Calu-3 Zellen von den weiteren untersuchten Zelllinien unterschied. Zunächst wurde die relative radiale Position des β -Globin-Lokus im Zellkern durch 2D-Erosionsanalyse bestimmt. Außerdem wurde in 3D-Analysen der Abstand des β -Globin-Lokus zum perizentrischen Heterochromatin gemessen. Es war bereits bekannt, dass in Zellen, welche β -Globin nicht exprimieren, dieser Lokus eng mit dem perizentrischen Heterochromatin assoziiert ist (Schübeler *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001). Es sollte nun in dieser Arbeit untersucht werden, ob dies bei den verwendeten Zelllinien, unabhängig von der Position der CFTR-Region,

ebenso beobachtet werden kann. Die Ergebnisse der 2D-Erosionsanalyse zeigten, dass der β -Globin-Lokus in allen untersuchten Zelllinien nicht mit der Kernperipherie assoziiert war. Die Kernlokalisierung des β -Globin-Lokus unterschied sich in Calu-3 Zellen nicht signifikant von der bei HEK-293 und SH-EP N14 Zellen beobachteten Positionierung (Abb. 19; ungepaarter t-Test; $p < 0,05$).

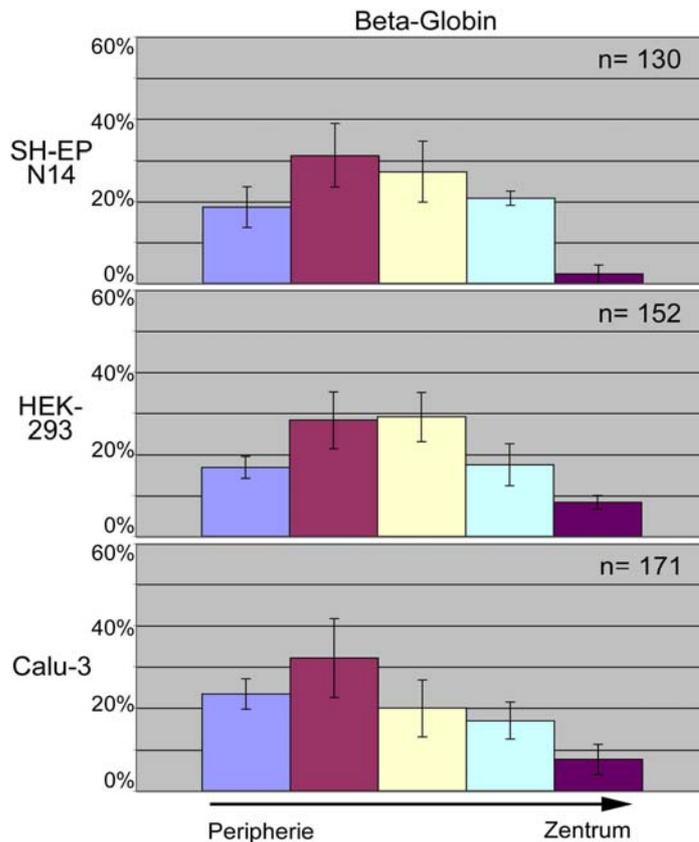


Abbildung 19: **Die Kernlokalisierung des β -Globin-Lokus.** Die 2D-Erosionsanalyse wurde durchgeführt wie unter Abb. 12 beschrieben. Die Balken geben den Anteil (Mittelwerte \pm SD) der FISH-Signale in den fünf Schalen (Peripherie bis Zentrum) bei den angegebenen Zelllinien wieder. „n“ entspricht der Anzahl an ausgewerteten FISH-Signalen. Die Zellkern-Position des β -Globin-Lokus war in den untersuchten Zelllinien nicht signifikant unterschiedlich (ungepaarter t-Test; $p < 0,05$). Die 2D-Erosionsanalyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Nicolas Sadoni durchgeführt.

Die 3D-Analysen (Abb. 20) zeigten, dass der β -Globin-Lokus in den untersuchten Zelllinien eine enge Assoziation mit dem perizentrischen Heterochromatin aufwies. Diese Heterochromatin-Fraktion wurde durch FISH-Sonden spezifisch für α -Satelliten DNA detektiert. In Calu-3 Zellen war diese Assoziation ausgeprägter als in SH-EP N14 Zellen. Insgesamt entsprach die Kernlokalisierung des β -Globin-Lokus dem auf Grund der Literaturdaten (Schübeler *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001) erwarteten Verhalten. Weiterhin zeigte auch diese Analyse keine generell unterschiedliche Chromatinorganisation und Genpositionierung in Calu-3 Zellen. Daneben lieferte diese Kontrolle ein weiteres, sehr interessantes Ergebnis: Offensichtlich assoziierte der inaktive β -Globin-Lokus in den untersuchten Zelllinien mit dem perizentrischen, aber nicht mit dem perinukleären Heterochromatin, während GASZ, CFTR und CORTBP2 im inaktiven Zustand mit dem perinukleären, aber nicht mit dem perizentrischen Heterochromatin kolokalisierten (siehe

auch Lang, 2003; Zink *et al.*, 2004). Somit assoziierten die verschiedenen Genloci im inaktiven Zustand spezifisch mit unterschiedlichen Subfraktionen von Heterochromatin.

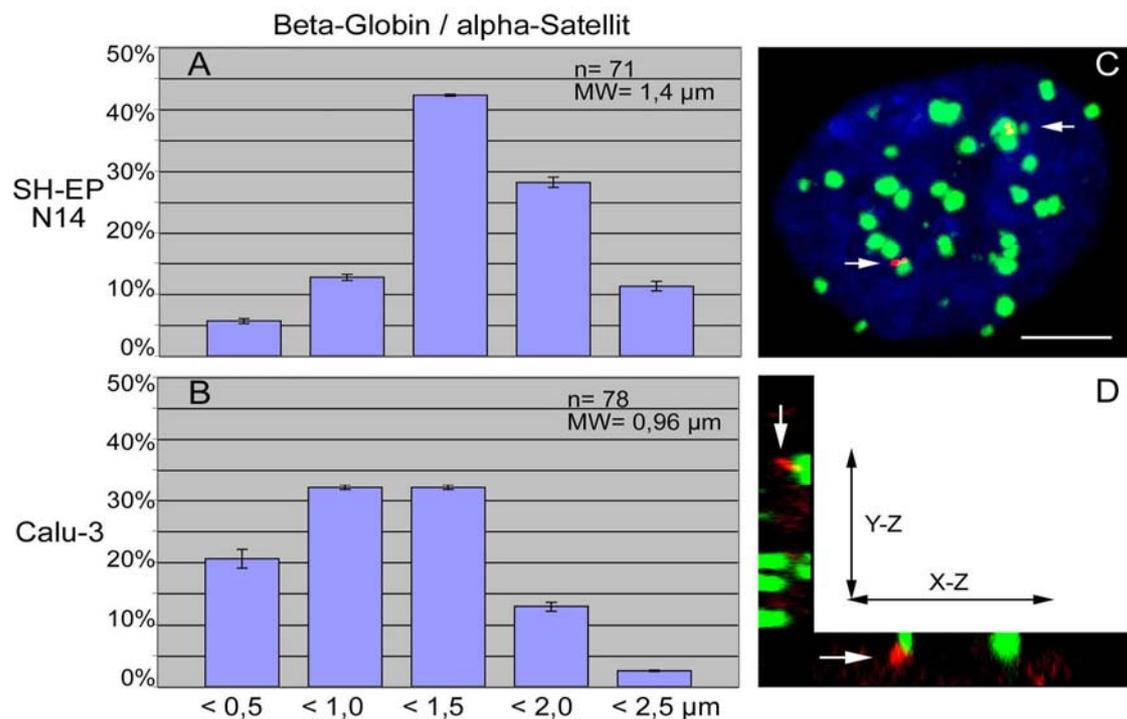


Abbildung 20: **3D-Abstandsmessungen zwischen dem β -Globin-Lokus und perizentrischem Heterochromatin.** Formaldehyd-fixierte SH-EP N14 und Calu-3 Zellen wurden mit Sonden gegen den β -Globin-Lokus und α -Satelliten DNA hybridisiert und am CLSM aufgenommen. (A und B) Die Diagramme zeigen die gemessenen Abstände zwischen dem β -Globin-Lokus und dem jeweils nächstgelegenen Signal der α -Satelliten DNA (in μm). Die Abstände wurden zwischen den Intensitätszentren der FISH-Signale in dreidimensional rekonstruierten Zellkernen mit der Software Image J (1.34) ermittelt. Die Balken geben die Prozentsätze (MW \pm SD) der gemessenen Abstände innerhalb eines angegebenen Intervalls an (x-Achse). „n“ entspricht der Anzahl an Messungen; MW gibt den Mittelwert aller gemessenen Abstände an. In C und D sind einzelne lichtoptische Schnitte eines Zellkerns (SH-EP N14) dargestellt (C: X-Y; D: Y-Z und X-Z). Die Pfeile deuten auf Bereiche enger Assoziation des β -Globin-Lokus (rot) mit perizentrischem Heterochromatin (grün). DNA-Färbung in C durch TOPRO-3 (blau) Maßstab: 5 μm .

3.1.6. Simultane Detektion und räumliche Orientierung der Gene der CFTR-Region

Die Daten aus den Erosions- und Kolokalisationsanalysen zeigten, dass die untersuchten Genloci der CFTR-Region in derselben Zelllinie im Einklang mit ihrer transkriptionellen Regulation eine distinkte Kernlokalisierung aufwiesen. So lokalisierte der aktive CORTBP2 Locus in HEK-293 Zellen vergleichsweise mehr im Zellkerninneren als die benachbarten Genloci GASZ und CFTR (besonders deutlich in der 3D-Erosionsanalyse, Abb. 14). Interessanterweise konnte analog zu dieser Beobachtung gezeigt werden, dass der weiter im Kerninneren liegende CORTBP2-Genlocus im Vergleich zu den benachbarten Genloci deutlich weniger mit dem peripheren Heterochromatin assoziiert war (Abb. 16 und 17). In Calu-3 Zellen lokalisierte die gesamte CFTR-Region im Unterschied zu den übrigen

untersuchten Zelllinien etwas weiter im Zellkerninneren (Abb. 14). Im Vergleich zu den benachbarten Genloci befand sich der CFTR-Lokus in dieser Zelllinie jedoch noch deutlich weiter im Zellkerninneren. Dies korrelierte, ähnlich wie bei CORTBP2 in HEK-293 Zellen, mit einem wesentlich geringeren Anteil an Kolokalisation der entsprechenden CFTR-Signale mit dem perinukleären Heterochromatin (Abb. 17). Diese Ergebnisse führten nun zu der Frage, ob diese benachbarten Genloci in einem gegebenen Zellkern simultan eine unterschiedliche Kernlokalisierung aufweisen. Um dieser Frage nachzugehen, war es nötig gleichzeitig unterschiedliche Genloci zu detektieren. Entsprechend wurden Dreifarben-FISH Experimente durchgeführt. Dabei wurden jeweils zwei benachbarte Gene der CFTR-Region und das CT 7 simultan durch FISH detektiert (Abb. 21). Anschließend wurde in Lymphozyten, HEK-293, SH-EP N14 und Calu-3 Zellen ermittelt, zu welchem Anteil eines der beiden detektierten Gene peripherer lokalisierte, als das benachbarte Gen. Besaßen die Signale beider Genloci annähernd (Differenz ≤ 50 nm) denselben Abstand zu der Kernperipherie, wurden die Genloci als nebeneinander liegend gewertet.

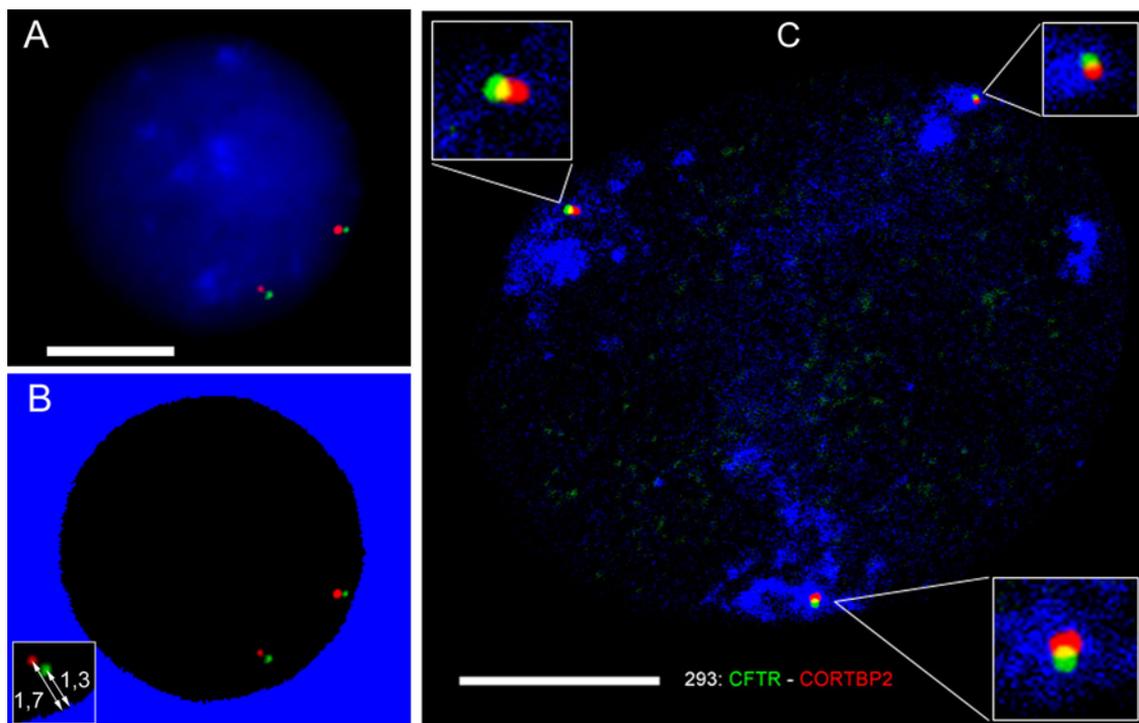


Abbildung 21: **Bestimmung der Orientierung benachbarter Genloci zueinander.** Lymphozyten (A, B) und HEK-293 Zellen (C) wurden mit Methanol/Eisessig-fixiert. Benachbarte Genloci (CFTR: grün, CORTBP2: rot), sowie die CT 7 (blau in C) wurden durch FISH detektiert. Die DNA wurde durch DAPI (blau in A) gefärbt und die Zellkerne wurden am CLSM aufgenommen. (A) Die erhaltenen Bildstapel (sehr flache Präparate, ca. 5 lichtoptische Schnitte / $\Delta z = 250$ nm) wurden mit dem Programm Metamorph zweidimensional projiziert und die Intensitätszentren der Signale wurden bestimmt. (B) Die Zellkernfläche wurde durch die DAPI Färbung definiert und der kürzeste Abstand der Signale zu der Peripherie wurde gemessen (Kasten in B: Abstände in μm). Dadurch konnte bestimmt werden, welcher der beiden Genloci eine mehr periphere Lokalisation einnimmt. War der Abstand annähernd gleich groß (Differenz ≤ 50 nm), wurden die Gene als nebeneinander liegend gewertet. C zeigt einen HEK-293 Zellkern, in dem die drei vorhandenen CORTBP2 Allele in Relation zu den benachbarten CFTR-Loci weiter im Zellkerninneren liegen. Maßstäbe: 5 μm

Auf diese Weise wurde die relative Position der Gene GASZ, CFTR und CORTBP2 zueinander bestimmt. Zusätzlich wurde noch die räumliche Lage der CFTR-Region in Relation zu einer ca. 200 kbp telomerisch von CORTBP2 gelegenen intergenischen Region untersucht (PAC RP5, siehe Abb. 8). Die Ergebnisse der Dreifarben-FISH Experimente zeigten, dass in Lymphozyten und HEK-293 Zellen die Mehrzahl der GASZ- und CFTR-Signale (60-70 %) nebeneinander lagen (Abb. 22 A, B). Keiner der beiden Genloci befand sich in diesem Fall näher an der Kernperipherie. CFTR zeigte dagegen im Vergleich zu CORTBP2 eine peripherere Lokalisation in diesen beiden Zelllinien. Dieses Ergebnis stimmt mit den bisherigen Daten der 2D- und 3D-Erosionsanalysen (Abb. 12 und 14) überein. Auch die beobachtete Position des CORTBP2-Lokus in HEK-293 Zellen außerhalb des perinukleären Heterochromatins (Abb. 16) spiegelte sich in der Orientierungsanalyse wider (Abb. 21 C und 22 B). In SH-EP N14 Zellen lokalisierten GASZ und CFTR beziehungsweise CFTR und CORTBP2 bevorzugt (70-80 %) nebeneinander (Abb. 22 C). Dieses Ergebnis war ebenfalls im Einklang mit den vorherigen Daten. Im Gegensatz dazu war in Calu-3 Zellen der CFTR-Lokus im Vergleich zu den GASZ- und CORTBP2-Genloci zum Zellkerninneren hin orientiert (Abb. 22 D). Auch dieses Resultat war in Übereinstimmung mit den Daten aus den Erosionsanalysen (Abb. 12 und 14) und der Kolokalisationsanalyse (Abb. 17).

Die Orientierungsanalyse bestätigte somit alle bisher erzielten Ergebnisse. Weiterhin zeigte sie, dass benachbarte Genloci tatsächlich simultan in demselben Zellkern unterschiedliche Positionen einnehmen und mit verschiedenen Chromatin-Fractionen assoziiert sein können. Insgesamt wiesen die Daten aus der Orientierungsanalyse auf eine unerwartete räumliche Flexibilität der CFTR-Region hin. Die Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass vor allem die intergenischen Regionen für diese Flexibilität verantwortlich waren. Um zu bestimmen, welcher Teil der Region als flexibler Linker zwischen CFTR und CORTBP2 fungieren könnte, wurde die Orientierung der beiden Enden des CFTR-Gens zueinander in HEK-293 Zellen bestimmt (Abb. 22 E). Die Resultate zeigten, dass die 5'- und 3'- Enden von CFTR meist (ca. 70 %) nebeneinander lokalisierten und den gleichen Abstand zu der Kernperipherie aufwiesen. Dieses Ergebnis war im Einklang mit der Vermutung, dass hauptsächlich die intergenische Region zwischen CFTR und CORTBP2 als flexibles Verbindungsglied fungierte. Um die räumliche Flexibilität der CFTR-Region noch weiter zu untersuchen, wurde in HEK-293 Zellen die Kernlokalisierung einer Region 200 kbp telomerisch von CORTBP2 mittels 2D-Erosionsanalyse bestimmt (PAC RP5, siehe Abb. 8).

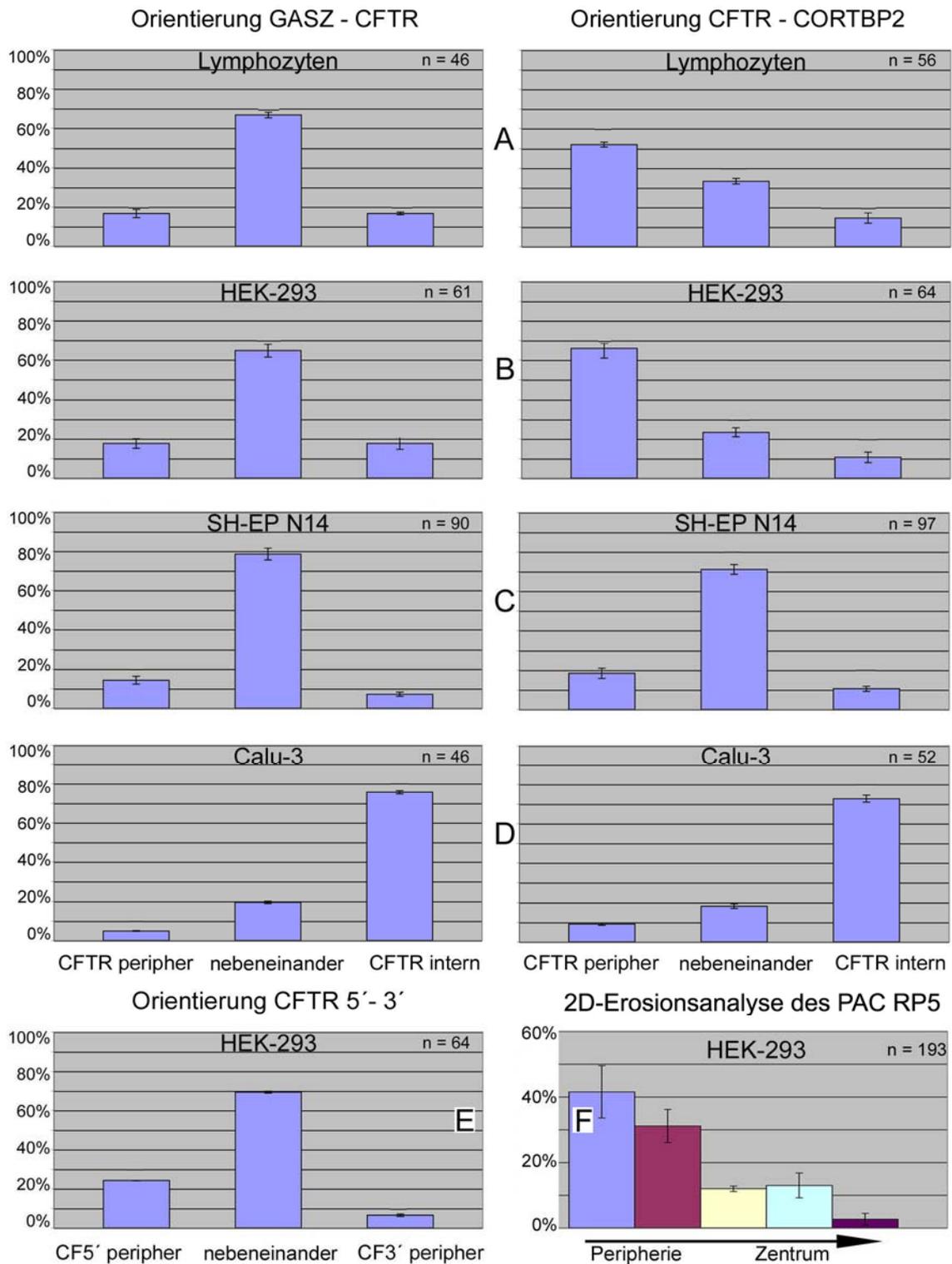


Abbildung 22: **Die Orientierung benachbarter Genloci der humanen CFTR-Region.** Die relative Position von GASZ, CFTR und CORTBP2 zueinander wurde durch Dreifarben-FISH ermittelt (siehe Abb. 21). Die jeweils simultan detektierten Genloci und untersuchten Zelllinien sind angegeben. In A-D wurde ermittelt, ob CFTR im Vergleich zu dem simultan detektierten, benachbarten Lokus peripher oder intern lokalisierte beziehungsweise beide Loci denselben Abstand zur Peripherie aufwiesen und damit nebeneinander lagen. CFTR wurde durch eine Sonde spezifisch für das 5' Ende von CFTR detektiert (CF1). E zeigt die Position des 5' und 3' Endes des CFTR-Lokus in HEK-293 Zellen (Sonden: CF1 und CF3). Das Diagramm in F zeigt das Ergebnis einer 2D-Erosionsanalyse zur Bestimmung der Position des durch den PAC RP5 repräsentierten Lokus in HEK-293 Zellen (2D-Erosionsanalyse siehe Abb. 12). Die Balken geben den Anteil der FISH-Signale in Prozent (MW +/- SD) an. „n“ gibt die Anzahl der untersuchten Lokus-Paare (beziehungsweise Loci in F) an. (alle verwendeten FISH-Sonden siehe Abb. 8)

Ein Vergleich der Ergebnisse (Abb. 22 F) mit den Resultaten der 2D-Erosionsanalyse von CORTBP2 in HEK-293 Zellen (Abb. 12) zeigte, dass diese Region enger mit der Kernperipherie assoziiert war als CORTBP2. Die 2D-Erosionsanalyse (Abb. 22 F) zeigte, dass 41 % der zu dem PAC RP5 homologen Region in der ersten Schale lokalisierte, wohingegen sich nur 38 % der CORTBP2-Signale in dieser Schale befanden. Die bisherigen Ergebnisse der Erosionsanalysen und Koloalisationsanalysen haben gezeigt, dass eine Lokalisation von über 40 % der FISH-Signale in der ersten Schale (in der 2D-Erosionsanalyse) eine enge Assoziation mit der Kernperipherie anzeigt, während eine Lokalisation von 38 % (CORTBP2 in HEK-293 Zellen) eine Dissoziation von dem perinukleären Heterochromatin andeutet. Zusammen mit den Daten der Orientierungsanalyse weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass lediglich der CORTBP2-Lokus in HEK-293 Zellen von der Peripherie in das Zellkerninnere delokalisiert und unterstreichen die Vermutung, dass die CFTR-Region eine hohe räumliche Flexibilität aufweist, die auf der Ebene einzelner Gene reguliert wird.

3.1.7. Abstandsmessungen zwischen GASZ, CFTR und CORTBP2

Um die räumliche Flexibilität der CFTR-Region weiter zu untersuchen, wurden im Folgenden die physikalischen Abstände zwischen GASZ, CFTR und CORTBP2 in verschiedenen Zelllinien gemessen. Dazu wurden jeweils zwei benachbarte Genloci gleichzeitig durch FISH unter Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome detektiert. Die Aufnahmen wurden bei allen Experimenten am CLSM vorgenommen. Anschließend wurden die Abstände zwischen den Intensitätsmaxima der Signale an 2D-Projektionen von Methanol/Eisessig-fixierten Präparaten mit der Software Image J ermittelt (Abb. 23A-D). Zusätzlich wurden in Calu-3 Zellen die Abstände zwischen den Genloci an 3D-Bildstapeln von Formaldehyd-fixierten Präparaten mit der Software Metamorph gemessen (Abb. 23 E).

Die geringsten Abstände zwischen GASZ und CFTR beziehungsweise CFTR und CORTBP2 wurden in SH-EP N14 Zellen gemessen (Abb. 23 C). Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass in diesen Zellen die drei Gene an der Kernperipherie nebeneinander lagen (Abb. 22) und zu einem hohen Anteil mit dem perinukleären Heterochromatin assoziiert waren (Abb. 17). Die ähnliche Lokalisation dieser eng benachbarten Gene stand im Einklang mit den hier gemessenen Abständen. Der im Vergleich zu GASZ-CFTR etwas größere Abstand zwischen CFTR und CORTBP2 in SH-EP N14 Zellen dürfte auf den größeren Abstand der verwendeten Sonden zurückzuführen sein (siehe Abb. 8). In HEK-293 Zellen wurden zwischen GASZ und CFTR ebenso wie in SH-EP N14 Zellen keine größeren Abstände als

200 nm gemessen. Die Abstände zwischen CFTR und CORTBP2 waren in HEK-293 Zellen jedoch deutlich größer (bis zu 900 nm) als in SH-EP N14 Zellen (bis zu 400 nm). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen bezüglich der Orientierung (Abb. 22) und Lokalisation (Abb. 12, 14 und 17) von CORTBP2 in HEK-293 Zellen. Dort wurde gezeigt, dass CORTBP2 im Gegensatz zu den benachbarten Genloci eine weiter im Kerninneren liegende Position aufweist. Zusammen mit der beobachteten Orientierung der 5' und 3' Enden des CFTR Locus (Abb. 22 E) in dieser Zelllinie, deutete dieser größere Abstand zwischen CFTR und CORTBP2 auf eine lokale Dekondensation der Linkerregion zwischen diesen Genen hin. Auch in T-Lymphozyten wurden zwischen CFTR und CORTBP2 im Vergleich zu SH-EP N14 Zellen relativ große Abstände (bis zu 1100 nm) gemessen. Der Abstand zwischen GASZ und CFTR lag dagegen in 90 % der Fälle in einem Bereich bis zu 200 nm (Abb. 23 A). Dies ist im Einklang mit früheren Beobachtungen, die gezeigt haben, dass in Lymphozyten CORTBP2 eine deutlich zentralere Lokalisation als CFTR und GASZ einnimmt (Abb. 12 und 22). Da CFTR in T-Lymphozyten und HEK-293 Zellen eng mit der Kernperipherie assoziiert war (Abb. 12), zeigten die gemessenen Abstände auch ungefähr den Abstand des aktiven CORTBP2-Locus zu der Kernperipherie an.

Die größten Abstände zwischen GASZ und CFTR beziehungsweise CFTR und CORTBP2 wurden in Calu-3 Zellen beobachtet (Abb. 23 D). In dieser Zelllinie wies der CFTR-Locus eine deutlich weiter innen liegende Kernlokalisierung als die benachbarten Genloci auf (Abb. 12, 14, 17 und 22 D). Dies drückte sich hier durch sehr große Abstände zwischen CFTR und GASZ beziehungsweise CORTBP2 (im letzteren Fall bis zu 2000 nm), aus. Diese Abstände (Abb. 23 A-D) wurden allerdings in Methanol/Eisessig-fixierten Präparaten gemessen. Die Abstände zwischen Genloci können unter Verwendung dieser Fixierungsmethode jedoch überschätzt werden (Mahy *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurden die Abstände zwischen den Genloci in Calu-3 Zellen darüber hinaus noch in Formaldehyd-fixierten Zellen dreidimensional vermessen, um einen Eindruck von den tatsächlichen maximalen Abständen zwischen den benachbarten Genloci zu erhalten (Abb. 23 E). Die Ergebnisse der dreidimensionalen Abstandsmessungen in Formaldehyd-fixierten Calu-3 Zellen (Abb. 23 E) zeigten, dass die größten gemessenen Abstände zwischen GASZ und CFTR im Bereich von 300 nm lagen, wohingegen die größten Abstände zwischen CFTR und CORTBP2 bis zu circa 500 nm betragen. Anhand dieser gemessenen Abstände und der Annahme, dass die Intensitätszentren der FISH-Signale den Mittelpunkten der verwendeten Sonden (Abb. 8) entsprechen, wurde der Kondensationsgrad der CFTR-Region abgeschätzt.

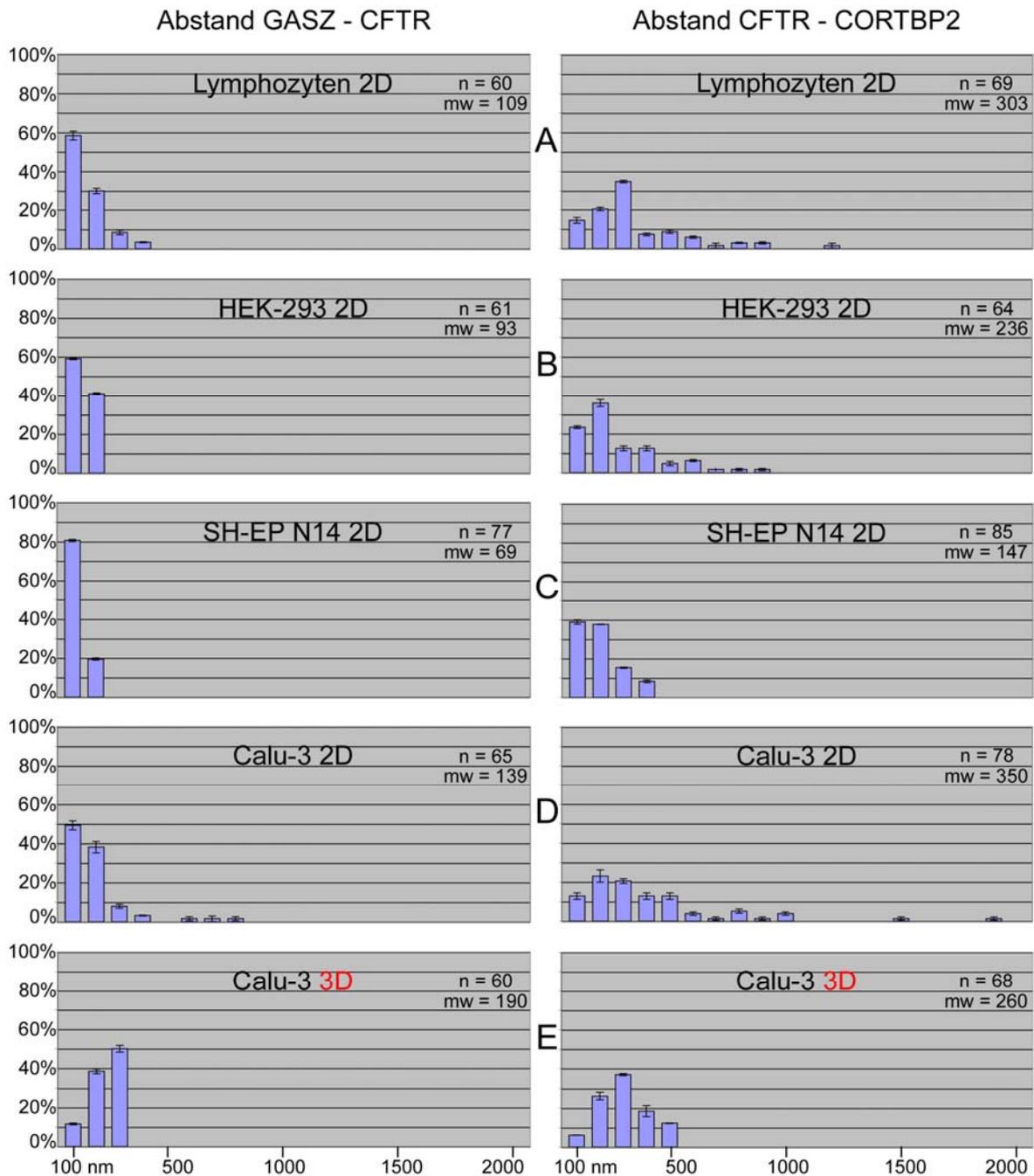


Abbildung 23: **Abstandsmessungen in der CFTR-Region.** Benachbarte Genloci der CFTR-Region wurden simultan durch FISH detektiert und am CLSM aufgenommen. Die Abstände zwischen den Intensitätsmaxima der Signale wurden an 2D-Projektionen der Bildstapel (A-D) beziehungsweise in 3D (E) gemessen. Es sind jeweils die untersuchten Loci und die Zelllinien angegeben. Die Balken geben den Anteil (Mittelwerte +/- SD) von gemessenen Abständen innerhalb eines bestimmten Intervalls (0-100 nm, 101-200 nm, etc.) an. Die Ziffern unterhalb der X-Achse geben die Abstandsintervalle (in nm) an. „n“ gibt die Anzahl an Messungen an. „mw“ gibt den Mittelwert aller Abstände an. Die Diagramme A-D zeigen die an Methanol/Eisessig-fixierten Präparaten gemessenen Abstände. Die Diagramme in E zeigen die gemessenen Abstände in Formaldehyd-fixierten Calu-3 Zellen. Hier wurden die Abstände zwischen den Signalen innerhalb der Bildstapel in x/y/z Orientierung dreidimensional gemessen.

Der Bereich, der GASZ und CFTR beinhaltet, würde demnach circa um den Faktor 100, der Bereich von CFTR und CORTBP2 circa um den Faktor 175 kompaktiert sein (unter der Voraussetzung, dass ein Mbp DNA eine Länge von $3,4 \times 10^5$ nm besitzt). Dies entspricht

theoretisch einem höheren Grad an Kompaktierung als es durch eine rein nukleosomale Verpackung (kompaktiert um den Faktor 7) beziehungsweise durch die 30 nm Faser (zusätzlich kompaktiert um den Faktor 6, insgesamt also um einen Faktor von ca. 40) erreicht werden könnte (Belmont *et al.*, 1989).

3.1.7.1. Messung der Zellkern- und CT 7 -Flächen

Die größten Abstände zwischen GASZ, CFTR und CORTBP2 wurden in Calu-3 Zellen gemessen (Abb. 23). Ebenso wurde in Calu-3 Zellen ein Trend zu einer zentraleren Lokalisation der gesamten CFTR-Region aufgezeigt. Es war unwahrscheinlich, dass diese Befunde auf eine generelle Desintegration und Relokalisation der CT 7 und des perinukleären Heterochromatins, sowie auf eine grundsätzlich unterschiedliche Positionierung und Assoziation von Genloci mit Heterochromatin zurückzuführen waren (Abb. 18, 19 und 20). Dennoch war es möglich, dass in diesen Zellen die zum Teil sehr großen Abstände zwischen den Genloci auf einer Dekondensation der CT 7 beziehungsweise des gesamten Chromatins, beruhten. Um dies zu untersuchen, wurden die Flächen der Zellkerne und der CT 7 in den verwendeten Zelllinien nach Methanol/Eisessig-Fixierung vermessen (Abb. 24).

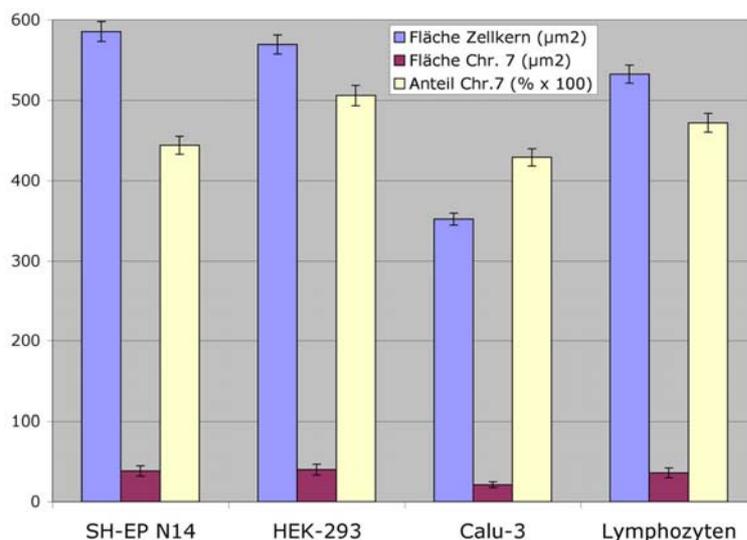


Abbildung 24: Flächenmessungen. Die angegebenen Zelllinien wurden mit Methanol/Eisessig-fixiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die CT 7 durch eine Painting-Probe detektiert. Die Präparate wurden am Epifluoreszenz-Mikroskop aufgenommen und die Flächen durch Anlegen eines Schwellenwertes definiert. Die Größe der Flächen wurde mit der Software Image J ermittelt. Die Balken (Mittelwerte \pm SD) geben die gemessene Fläche (in μm^2) beziehungsweise den Flächenanteil der CT 7 an der Zellkernfläche an (in % x 100).

Die Ergebnisse (Abb. 24) zeigten, dass Calu-3 Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien im Durchschnitt die kleinsten Zellkernflächen besaßen und auch der Anteil der CT 7 an der Zellkernfläche in dieser Zelllinie am geringsten war (4,29 % in Calu-3 im Vergleich zu 4,44% in SH-EP N14, 5,06 % in HEK-293 Zellen und 4,72 % in Lymphozyten). Diese Ergebnisse zeigten somit, dass die gemessenen Abstände in Calu-3 Zellen nicht auf eine generelle Dekondensation des Chromatins beziehungsweise der CT 7 zurückzuführen waren.

3.1.8. Die Lokalisation von CFTR nach Behandlung mit den Inhibitoren DRB und TSA

Die bisherigen Ergebnisse zeigten einen Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Aktivität und der Lokalisation von Genen der CFTR-Region in den untersuchten Zelllinien. Sowohl die räumliche Lage im Zellkern, als auch die Assoziation mit definierten Chromatin-Fractionen schienen dabei eine wesentliche Rolle zu spielen. Diese Beobachtungen erlaubten jedoch keine Rückschlüsse über den funktionellen Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsverhalten und der Kernlokalisierung dieser Genloci. Vor allem die Frage, inwiefern diese beiden Faktoren sich gegenseitig beeinflussen, konnte durch die Experimente nicht geklärt werden. Wir konnten kürzlich zeigen, dass die Behandlung von SH-EP N14 und HEK-293 Zellen mit dem Histon-Deazetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) zu einer signifikanten Relokalisation des CFTR-Lokus in das Zellkerninnere führte (Luther, 2003; Zink *et al.*, 2004). Die Behandlung der Zellen mit dem transkriptionellen Inhibitor 5,6-Dichloro-1-Ribofuranosyl-Benzimidazol (DRB) hatte dagegen in Zellen, in denen CFTR nicht transkribiert wird, keine signifikante Relokalisation des CFTR-Lokus zur Folge (Luther, 2003; Zink *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit sollten diese durch 2D-Erosionsanalysen erzielten Ergebnisse durch 3D-Erosionsanalysen noch eingehender untersucht werden. Außerdem sollte durch Immuno-FISH ermittelt werden, ob die beobachtete Relokalisation des CFTR-Lokus auch zu einer veränderten Assoziation des Genlokus mit definierten Chromatin-Fractionen führt. Die Ergebnisse der 3D-Erosionsanalysen zeigten, dass CFTR in unbehandelten SH-EP N14 und HEK-293 Zellen zum großen Teil an der Kernperipherie lokalisierte (Abb. 25, linke Spalte). Die Inkubation mit DRB führte zu keiner signifikanten Änderung (ungepaarter t-Test: $p = 0,159$) der perinukleären Lokalisation von CFTR in SH-EP N14 Zellen (Abb. 25, rechte Spalte). Dies war im Einklang mit den bereits bekannten Daten aus den 2D-Erosionsanalysen (Luther, 2003; Zink *et al.*, 2004). Nach Inkubation mit TSA konnte dagegen eine große Veränderung der Lokalisation von CFTR beobachtet werden. So lokalisierte CFTR in SH-EP N14 und HEK-293 Zellen nach Inkubation mit TSA signifikant (ungepaarter t-Test: jeweils $p < 0,002$) weiter im Zellkerninneren (Abb. 25, rechte Spalte). Dennoch konnte in diesen Zellen nach Inkubation mit TSA und trotz der veränderten Kern-Lokalisation kein CFTR-Transkript durch RT-PCR nachgewiesen werden (siehe Anhang und Zink *et al.*, 2004; Englmann *et al.*, 2005).

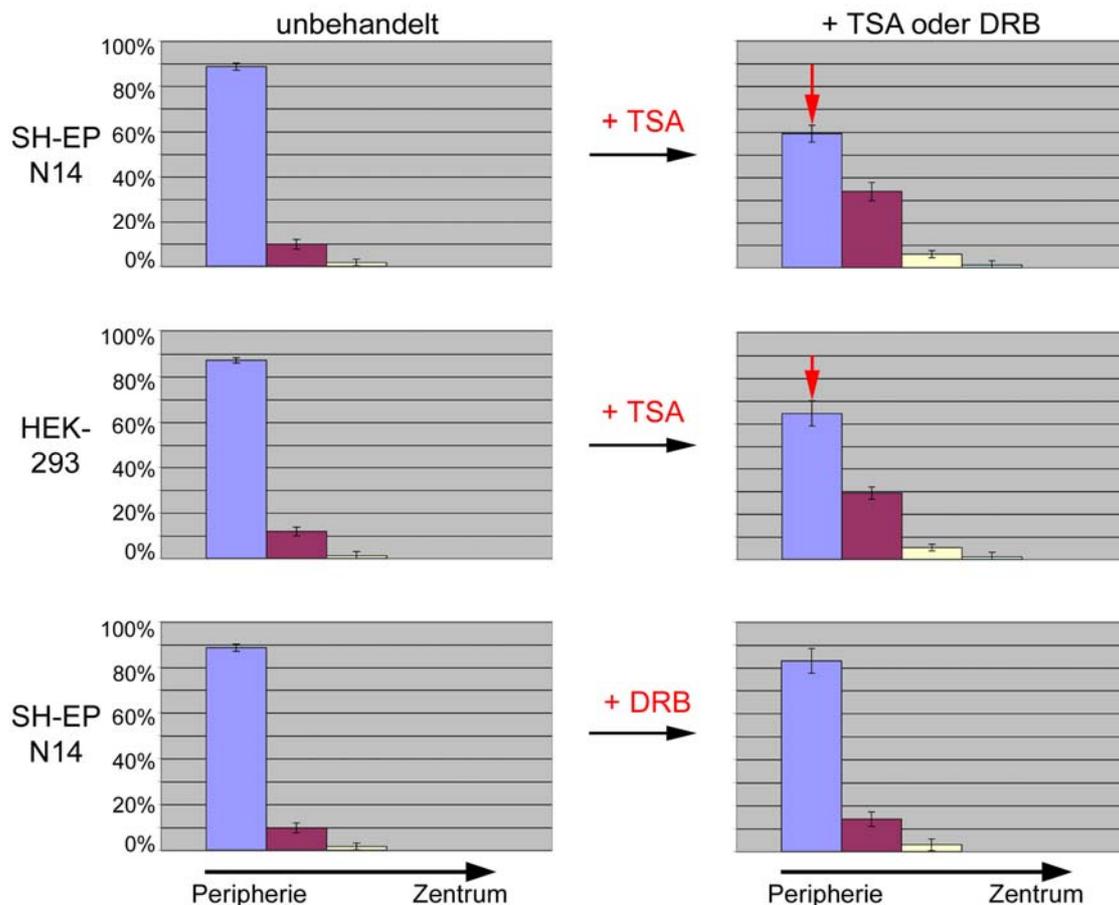


Abbildung 25: **Lokalisation von CFTR nach Inkubation mit TSA und DRB.** SH-EP N14 und HEK-293 Zellen wurden mit TSA (10 ng/ml; 10 h) beziehungsweise DRB (50 µg/ml; 5 h) behandelt und mit Formaldehyd fixiert. Der CFTR-Lokus wurde durch FISH nachgewiesen und die Zellkernposition durch eine 3D-Erosionsanalyse bestimmt (siehe Abb. 14). Die Balken geben den Anteil (Mittelwerte +/-SD) an Signalen in den entsprechenden Schalen an. „n“ gibt die Anzahl an ausgewerteten FISH-Signalen an. Der rote Pfeil hebt den beobachteten Effekt von TSA auf die Lokalisation von CFTR hervor.

Interessanterweise konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass in TSA behandelten Zellen der Anteil an Allelen, die sich in der 3D-Erosionsanalyse in derselben Schale befanden, deutlich verringert war. So befanden sich in unbehandelten SH-EP N14 Zellen 71% und in unbehandelten HEK-293 Zellen 63 % der CFTR-Signale in derselben Schale. In TSA behandelten Zellen ging dieser Anteil auf 34 % in SH-EP N14 und 36 % in HEK-293 Zellen zurück. Die Inkubation mit DRB bewirkte dagegen nur eine leichte Veränderung in der Allelität (SH-EP N14: 60 % der CFTR Signale in derselben Schale). Um die funktionelle Bedeutung dieser durch DRB und TSA ausgelösten Prozesse näher zu charakterisieren, wurde die Lokalisation von CFTR in SH-EP N14 und HEK-293 Zellen nach DRB- oder TSA-Behandlung in Bezug auf definierte Chromatin-Fractionen bestimmt. Hierzu wurde die Assoziation von CFTR mit dem perinukleären Heterochromatin ermittelt (Abb. 26).

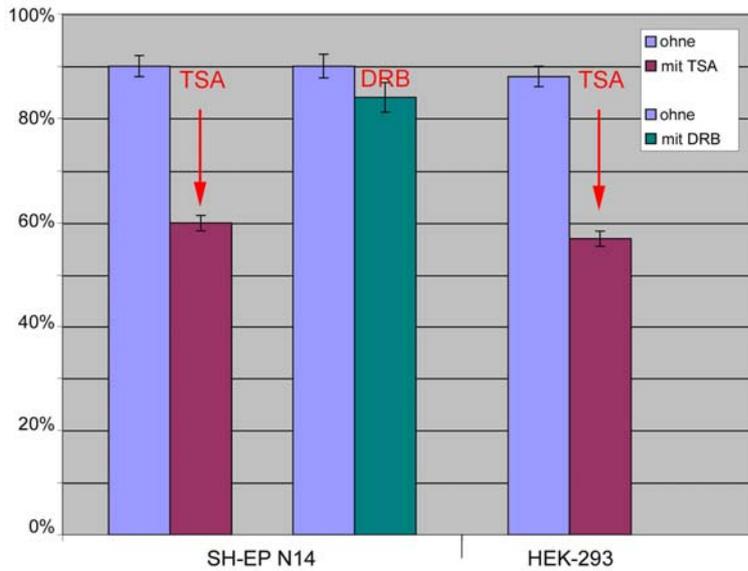


Abbildung 26: **Assoziation von CFTR mit dem perinukleären Heterochromatin nach TSA- und DRB-Behandlung.**

SH-EP N14 und HEK-293 Zellen wurden unbehandelt oder nach TSA-beziehungsweise DRB-Inkubation mit BrdU replikationsmarkiert.

CFTR wurde durch 3D-FISH detektiert und die Kolokalisation mit BrdU-pulsmarkiertem, perinukleärem Heterochromatin wurde bestimmt (siehe Abb. 16). Die Balken geben den Anteil (Mittelwerte \pm SD) der kolokalisierenden FISH-Signale an. Es wurden jeweils ca. 50-60 Signale ausgewertet. Die Pfeile verdeutlichen den durch TSA induzierten Effekt.

Die Ergebnisse zeigten, dass durch TSA-Behandlung von SH-EP N14 und HEK-293 Zellen der Anteil an Kolokalisation mit dem perinukleären Heterochromatin jeweils um ca. 30 % signifikant (ungepaarter t-Test, jeweils $p < 0,001$) verringert wurde (Abb. 26). Die Inkubation mit DRB reduzierte den Anteil an Kolokalisation in SH-EP N14 Zellen dagegen nicht signifikant (Abb. 26; ungepaarter t-Test, $p = 0,105$). Weiterhin wurde beobachtet, dass der CFTR-Lokus in SH-EP N14 und HEK-293 Zellen nach TSA-Behandlung häufig im hyperazetylierten Euchromatin im Zellkerninneren lokalisierte (Abb. 27 A, B). Dies wurde in unbehandelten Zellen nur sehr selten beobachtet (Abb. 17).

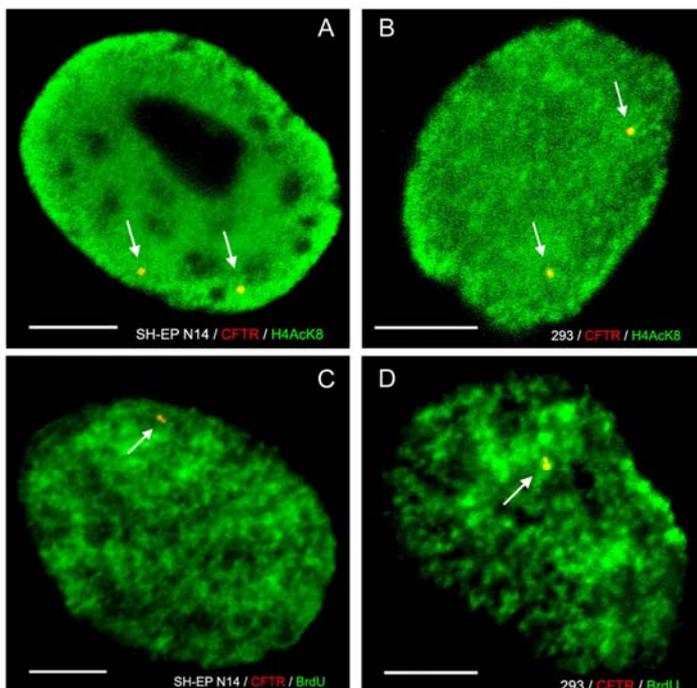


Abbildung 27: **Lokalisation von CFTR in SH-EP N14 Zellen nach TSA-Behandlung.**

SH-EP N14 Zellen wurden nach Inkubation mit TSA mit Antikörpern gegen H4AcK8 immungefärbt (A, B: grün). Früh replizierende DNA wurde durch BrdU markiert (C, D: grün). CFTR wurde durch 3D-FISH detektiert. Die Abbildungen zeigen lichtoptische Schnitte von SH-EP N14 Zellkernen nach der FISH. Die Pfeile deuten auf CFTR-Loci (Singletten in A, B; Dubletten in C, D). Die gelbe Farbe der Signale resultiert aus der Überlagerung der CFTR-Signale mit der Immunfärbung von H4AcK8 beziehungsweise der Replikationsmarkierung und zeigt eine Kolokalisation an. Maßstab: 5 μ m

Mit Hilfe der RPM konnte auch gezeigt werden, dass CFTR in beiden Zelllinien nach TSA-Behandlung häufig mit dem früh-replizierenden Euchromatin assoziiert war (Abb. 27 C, D). Die Ausbildung des perinukleären Heterochromatins (detektiert durch RPM) wurde durch die Inkubation mit TSA nicht sichtbar beeinflusst (nicht gezeigt). Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass eine durch TSA induzierte generelle Hyperazetylierung eine Dissoziation des Genlokus von dem perinukleären Heterochromatin und eine Assoziation mit dem hyperazetylierten Euchromatin bewirkt. Diese Positionsänderungen fanden unabhängig von Änderungen in der transkriptionellen Aktivität von CFTR statt (siehe auch Zink *et al.*, 2004).

3.2. Untersuchungen zum Replikationszeitpunkt von GASZ, CFTR und CORTBP2

Schon länger ist bekannt, dass bestimmte Regionen des eukaryontischen Genoms zu spezifischen Zeitpunkten während der S-Phase replizieren (Stanbrook und Flickinger, 1970; Fangman und Brewer 1992). Dennoch sind die Ursache und die funktionelle Bedeutung dieser unterschiedlichen Replikationszeitpunkte unklar. So wurden Zusammenhänge zwischen der transkriptionellen Aktivität von DNA Sequenzen und deren Replikationszeitpunkt beobachtet (Goldman *et al.*, 1984; Hatton *et al.*, 1984; Schübeler *et al.*, 2002), die zu der Hypothese führten, dass das Replikationsverhalten eine wichtige Rolle für die epigenetische Regulation der transkriptionellen Aktivität spielt (Gilbert, 2002; Goren und Cedar, 2003). Ebenso scheinen Wechselwirkungen zwischen Histonmodifikationen, der Chromatinstruktur, der Kernlokalisierung und dem Replikationsverhalten zu bestehen (Dimitrova und Gilbert 1999; Sadoni *et al.*, 1999; Cimbora *et al.*, 2000; Schübeler *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001).

Die bisherigen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Gene der CFTR-Region, abhängig von ihrer individuellen transkriptionellen Aktivität, eine unterschiedliche Kernlokalisierung aufwiesen und mit definierten Chromatin-Fraktionen assoziierten. Andere Daten zeigten, dass eine definierte Region auf dem humanen Chromosom 7 in der Größenordnung von 400-700 kbp, die den CFTR-Genlokus beinhaltet, zu einem früheren Zeitpunkt repliziert, wenn dieser transkriptionell aktiv ist (Selig *et al.*, 1992). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte nun der Frage nachgegangen werden, wie die Kernlokalisierung und die transkriptionelle Aktivität von GASZ, CFTR und CORTBP2 mit den Replikationszeitpunkten dieser Gene zusammenhängen. Außerdem sollte die von Selig *et al.* (1992) vorgeschlagene Replikations-Zeitzone durch die in dieser Arbeit verwendeten Gen-spezifischen Sonden genauer charakterisiert werden.

3.2.1. Replikationsmarkierung und Klassifizierung der S-Phase Stadien

Um die Replikationszeitpunkte von GASZ, CFTR und CORTBP2 zu bestimmen, wurden SH-EP N14, HEK-293 und Calu-3 Zellen mit BrdU für 30 Minuten pulsmarkiert und anschließend mit Formaldehyd fixiert. SH-EP N14 Zellen wurden alternativ auch durch das SRL Verfahren unter Verwendung von FITC-dUTP replikationsmarkiert (Schermelleh *et al.*, 2001). Dieses Verfahren eignete sich nicht für HEK-293 Zellen, da sich diese Zellen dabei leicht ablösten. Auch Calu-3 Zellen konnten auf Grund der geringen Teilungsrate nicht mit dem SRL-Verfahren effizient markiert werden. Es wurden stets nicht synchronisierte Zellen markiert, um die Analyse verschiedener S-Phase Stadien zu ermöglichen und um Synchronisations-Artefakte zu vermeiden.

Die aus der RPM resultierenden typischen Replikationsmuster wurden fünf unterschiedlichen Stadien zugeordnet, welche die zeitliche Progression durch die S-Phase von früh (I) bis spät (V) anzeigen (Abb. 28 und O'Keefe *et al.*, 1992; Sadoni *et al.*, 1999). Parallel zu der RPM wurden GASZ, CFTR und CORTBP2 durch 3D-FISH detektiert. Das Vorhandensein von FISH-Singletten (ein punktförmiges Signal) beziehungsweise Dubletten (ein lang gezogenes Signal oder zwei benachbarte punktförmige Signale) wurde mit dem entsprechenden Replikationsmuster korreliert (siehe vergrößerte Bildausschnitte in Abb. 28). Ein Dubletten-Signal zeigte an, dass der Lokus bereits repliziert war (Selig *et al.*, 1992).

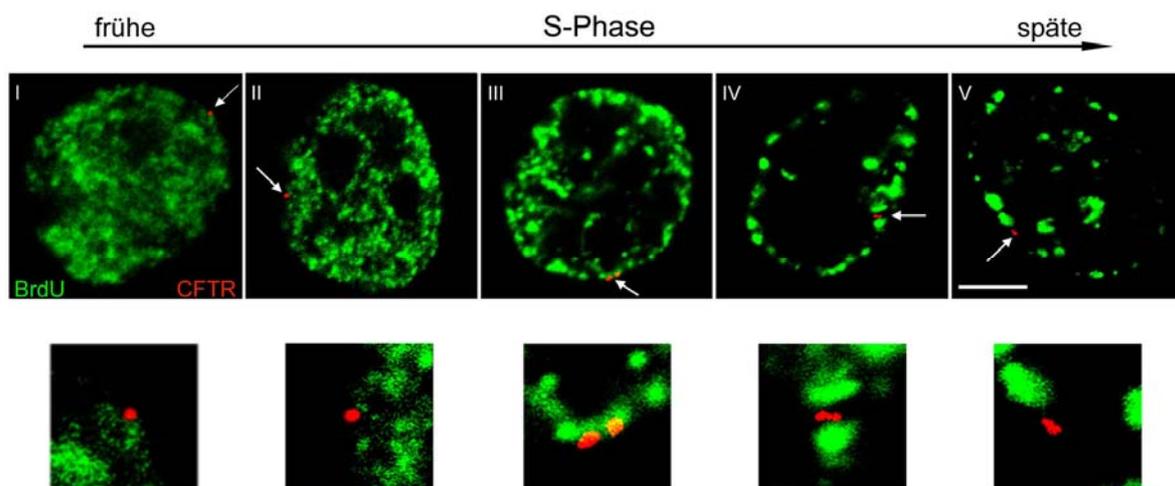


Abbildung 28: **Replikations-Pulsmarkierung und FISH.** Die Abbildung zeigt lichtoptische Schnitte von SH-EP N14 Zellkernen. Nicht synchronisierte Kulturen von SH-EP N14 Zellen wurden mit BrdU pulsmarkiert und mit Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde CFTR durch FISH detektiert (rote Signale). Die inkorporierten BrdU-Nukleotide wurden immunologisch nachgewiesen (grün). Die resultierenden, typischen Replikationsmuster geben die temporäre Progression der Zellen durch die S-Phase von früh (Typ I), über mittel (Typ III) bis spät (Typ V) an. Die Vergrößerungen (4x) zeigen die FISH-Signale. Das Auftreten von FISH-Dubletten (hier ab Typ III) weist auf die Replikation des Genlokus hin. Maßstab: 5 µm.

3.2.2. Bestimmung der Replikationszeitpunkte von GASZ, CFTR und CORTBP2

Die Replikationszeitpunkte von GASZ, CFTR und CORTBP2 in SH-EP N14, HEK-293 und Calu-3 Zellen wurden, wie in Abbildung 28 dargestellt, anhand der Anteile von Singletten- beziehungsweise Dubletten-Signalen zu den jeweiligen Zeitpunkten in der S-Phase (definiert durch die Replikationsmuster) ermittelt. Die Ergebnisse (Abb. 29) zeigten, dass die transkriptionell inaktiven Gene GASZ, CFTR und CORTBP2 in SH-EP N14 Zellen, sowie GASZ und CFTR in HEK-293 Zellen relativ spät replizierten. Erst in einem mittleren bis späten S-Phase Stadium (Typ III-IV) konnte ein substantieller Anteil an Dubletten nachgewiesen werden (Abb. 29). Der Vergleich mit den bisherigen Daten zeigte, dass der späte Replikationszeitpunkt dieser Gene mit einem hohen Anteil an Kolo-kalisation mit dem perinukleären Heterochromatin korrelierte (Abb. 17). In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser Chromatin-Bereich bevorzugt in einem mittleren bis späten S-Phase Stadium repliziert (Sadoni *et al.*, 1999). In HEK-293 Zellen replizierte der transkriptionell aktive CORTBP2-Lokus im Gegensatz zu den benachbarten Genloci deutlich früher (Abb. 29). Bereits zu einem sehr frühen S-Phase Stadium konnte ein hoher Anteil an replizierten CORTBP2-Loci detektiert werden (ca. 40 % in Typ I).

In Calu-3 Zellen wies der transkriptionell aktive CFTR-Lokus ebenfalls ein sehr frühes Replikationsverhalten auf (Abb. 29). Hier waren bereits ca. 60 % der CFTR-Loci in dem frühesten S-Phase Stadium repliziert (Typ I). Sowohl CORTBP2 in HEK-293 Zellen, als auch CFTR in Calu-3 Zellen kolokalisierten zu einem hohen Anteil mit dem hyperazetylierten Euchromatin (Abb. 17). Der in Calu-3 Zellen exprimierte CORTBP2 Locus replizierte zwar relativ früh (Abb. 29: Typ II), im Vergleich zu CFTR aber etwas später (keine Dubletten in dem frühesten S-Phase Stadium). Interessanterweise korrelierte der Anteil an Signalen im perinukleären Heterochromatin (Abb. 17: ca. 40%) genau mit dem Anteil an nicht replizierten Loci in der Typ II S-Phase (Abb. 29: ca. 40%). GASZ wird in Calu-3 Zellen nicht exprimiert, replizierte im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien aber relativ früh (Abb. 29: ca. 40% Dubletten in Typ II gegenüber ca. 10% in SH-EP N14 und HEK-293 Zellen). Auch hier korrelierte der Anteil an nicht replizierten Signalen (Abb. 29: ca. 60%) mit dem Anteil an Signalen, die mit dem perinukleären Heterochromatin kolokalisierten (Abb. 17: ca. 60%).

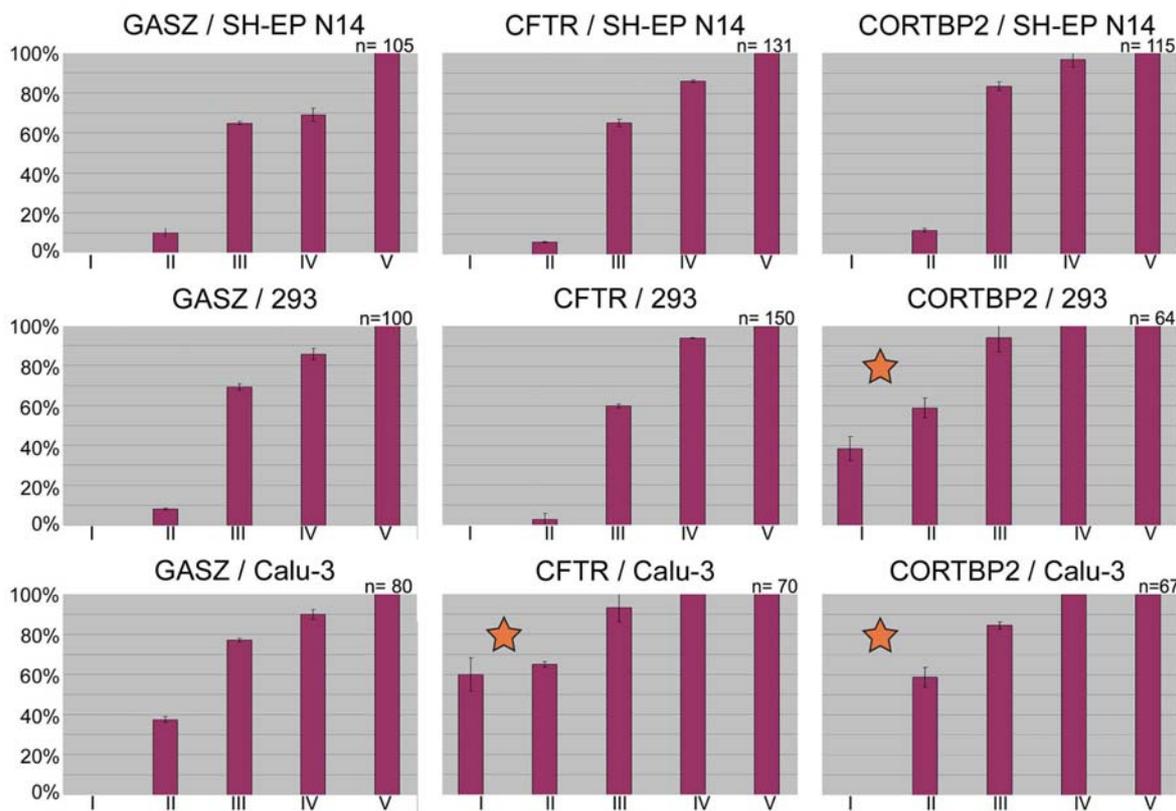


Abbildung 29: **Replikationszeitpunkte von GASZ, CFTR und CORTBP2.** SH-EP N14, HEK-293 und Calu-3 Zellen wurden replikationsmarkiert und mit Formaldehyd fixiert. GASZ, CFTR und CORTBP2 wurden durch FISH nachgewiesen und die Zellkerne am CLSM aufgenommen. Die Zellkerne wurden dreidimensional ausgewertet, um eine korrekte Einordnung der Replikationsmuster und Identifizierung von Dubletten-Signalen zu ermöglichen. Die Replikationszeitpunkte wurden durch Korrelation der Replikationsmuster (früh-spät/ Typen I-V) mit dem Auftreten von Dubletten-Signalen ermittelt (siehe Abb. 28). Die Balken geben den Anteil an Dubletten (Mittelwerte +/- SD) zu den jeweiligen S-Phase Stadien (I-V) an. „n“ entspricht der Anzahl an ausgewerteten FISH-Signalen (Dubletten wurden als ein Signal gezählt). Ein orangefarbener Stern zeigt die Expression des jeweiligen Gens an.

Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass transkriptionell inaktive Gene bevorzugt spät replizierten (mit Ausnahme von GASZ in Calu-3 Zellen). Aktive Gene (CFTR und CORTBP2 in Calu-3 und CORTBP2 in HEK-293 Zellen) replizierten dagegen früher während der S-Phase. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen den Replikationszeitpunkten der Gene und deren Assoziation mit dem spät replizierenden, perinukleären Heterochromatin beziehungsweise dem früh replizierenden Euchromatin beobachtet werden. Das abweichende Verhalten von GASZ in Calu-3 Zellen könnte sich somit eventuell durch den relativ geringen Assoziationsgrad mit dem perinukleären Heterochromatin und der Lage im Zellkerninneren erklären lassen. Die Daten konnten jedoch nicht eindeutig zeigen, ob das Transkriptionsverhalten oder die Kernlokalisierung und die entsprechende Assoziation mit unterschiedlichen Chromatin-Fractionen das Replikationsverhalten bestimmten.

3.2.3. Kohäsionstest

Kürzlich wurde gezeigt, dass das späte Auftreten von FISH-Dubletten während der S-Phase nicht unbedingt einen späten Replikationszeitpunkt anzeigt, sondern ebenso auf einer verlängerten Kohäsion von Schwester-Chromatiden eines bereits früh replizierten Lokus beruhen kann (Azuara *et al.*, 2003). Dies wurde besonders in Paraformaldehyd-fixierten Zellen beobachtet. Eine hypotone Behandlung und Methanol/Eisessig-Fixierung der Zellen führte dagegen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Es wurde vermutet, dass diese Fixierungsmethode möglicherweise die enge Assoziation der Schwester-Chromatiden löst. Doch konnte auch in dieser Arbeit eine verlängerte Schwester-Chromatid Kohäsion nicht immer beobachtet werden. So konnte der Replikationszeitpunkt des Amylase 2.1 Lokus durch eine Singletten/Dubletten-Analyse korrekt bestimmt werden (Azuara *et al.*, 2003).

Um zu bestimmen, ob die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Singletten/Dubletten-Analyse nicht die Replikationszeitpunkte der Genloci, sondern vielmehr eine verlängerte Schwester-Chromatid Kohäsion anzeigte, wurde der Anteil an Singletten/Dubletten-Signalen vergleichend in Formaldehyd-fixierten und Methanol/Eisessig-fixierten Zellen bestimmt (Tabelle 4). Dies wurde nur in Zellen durchgeführt, die sich in einem frühen Zeitpunkt während der S-Phase befanden (Typ I-II Replikationsmuster), da sich nur in diesen Stadien eine eventuell frühere Replikation der Genloci bemerkbar machen würde.

Tabelle 4: **Kohäsionstest - Bestimmung des Anteils an Singletten-Signalen nach verschiedenen Fixierungsmethoden**

SH-EP N14	GASZ	CFTR	CORTBP2
FA	95 +/- 1,1 %	97 +/- 2,0 %	94 +/- 1,3 %
M/E	94,5 +/- 1,9 %	95 +/- 2,5 %	95 +/- 1,6 %
HEK-293	GASZ	CFTR	CORTBP2
FA	96 +/- 1,1 %	98,5 +/- 2,2 %	n.d.
M/E	97 +/- 1,5 %	96,5 +/- 0,8 %	n.d.
Calu-3	GASZ	CFTR	CORTBP2
FA	81,5 +/- 1,0 %	n.d.	70,5 +/- 1,5 %
M/E	85 +/- 2,1 %	n.d.	75,5 +/- 0,9 %

Die Werte geben den Anteil an Singletten (Mittelwerte +/- SD in %) in frühen S-Phase Stadien (Typen I+II) an. Nach der Methanol/Eisessig-Fixierung wurde nur das Replikationsverhalten von den Genen bestimmt, die bei der Formaldehyd-Fixierung ein spätes Auftreten von Dubletten zeigten. SH-EP N14, HEK-293 und Calu-3 Zellen wurden entweder mit Formaldehyd fixiert (obere Reihe, FA) oder mit Methanol/Eisessig-fixiert (untere Reihe, M/E). Es wurden für jede Kombination (Gen und Zelllinie) jeweils 3 unabhängige Experimente durchgeführt und ca. 100 FISH-Signale ausgewertet. („n.d.“: nicht durchgeführt).

Die Tatsache, dass beide Methoden sehr ähnliche Resultate aufwiesen (keine signifikanten Unterschiede; ungepaarter t-Test: p stets $> 0,5$) zeigte, dass Schwester-Chromatid Kohäsion

hier keine Rolle spielte und die Replikationszeitpunkte von GASZ, CFTR und CORTBP2 in dieser Arbeit korrekt bestimmt wurden. Auch frühere Arbeiten, die unterschiedliche Methoden zur Bestimmung von Replikationszeitpunkten beinhalteten, haben gezeigt, dass durch die Singletten/Dubletten-Analyse der Replikationszeitpunkt von CFTR korrekt bestimmt werden kann (Selig *et al.*, 1992). Möglicherweise ist die verlängerte Schwester-Chromatid Kohäsion an verschiedenen Genloci nicht gleichermaßen ausgeprägt.

3.2.4. Bestimmung des Replikationszeitpunktes von CFTR nach TSA-Behandlung

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Aktivität, der Kernlokalisierung und dem Replikationsverhalten von Genen der CFTR-Region besteht. Es konnte jedoch nicht eindeutig gezeigt werden, ob die Kernpositionierung und die entsprechende Assoziation mit bestimmten Chromatin-Fraktionen oder vielmehr die transkriptionelle Aktivität den Replikationszeitpunkt von Genen der CFTR-Region beeinflusst. Um den Einfluss der transkriptionellen Aktivität von dem der Kernlokalisierung auf das Replikationsverhalten zu unterscheiden, wurde der Replikationszeitpunkt von CFTR auch nach Behandlung der Zellen mit TSA bestimmt. Bisher wurde gezeigt, dass durch Inkubation mit geringen Konzentrationen an TSA der inaktive CFTR-Lokus in SH-EP N14 und HEK-293 Zellen in das Zellkerninnere relokalierte (Abb. 25). Der Genlocus assoziierte hier nach TSA Behandlung vermehrt im hyperazetylierten und früh replizierenden Euchromatin (Abb. 26 und 27), zeigte aber keine transkriptionelle Aktivität (Zink *et al.*, 2004; Englmann *et al.*, 2005).

Wie in Abbildung 30 dargestellt ist, replizierte CFTR in TSA-behandelten SH-EP N14 und HEK-293 Zellen deutlich früher als in unbehandelten Zellen. TSA-behandelte Zellen zeigten bereits Dubletten in dem frühesten S-Phase Stadium (Typ I). In Typ II S-Phase Stadien war bereits ein relativ großer Teil der CFTR-Loci repliziert (ca. 40 % in SH-EP N14 und ca. 60 % in HEK-293 Zellen). Im Gegensatz dazu replizierte der größte Teil der CFTR-Loci in den entsprechenden unbehandelten Zellen erst zu einem späteren S-Phase Stadium (Typ III). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Lokalisation im Zellkerninneren und die Assoziation mit früh replizierendem und hyperazetyliertem Euchromatin mit einem frühen Replikationszeitpunkt von CFTR verbunden ist. Der frühere Replikationszeitpunkt war dagegen nicht von einer veränderten transkriptionellen Aktivität abhängig, da auch nach TSA-Behandlung unter diesen Bedingungen keine Expression von CFTR in SH-EP N14 und HEK-293 Zellen beobachtet wurde (siehe Anhang und Zink *et al.*, 2004; Englmann *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse bestätigten die Annahme, dass weniger die transkriptionelle Aktivität,

sondern vielmehr die Assoziation mit definierten Chromatin-Fractionen den Replikationszeitpunkt des CFTR-Lokus beeinflusst.

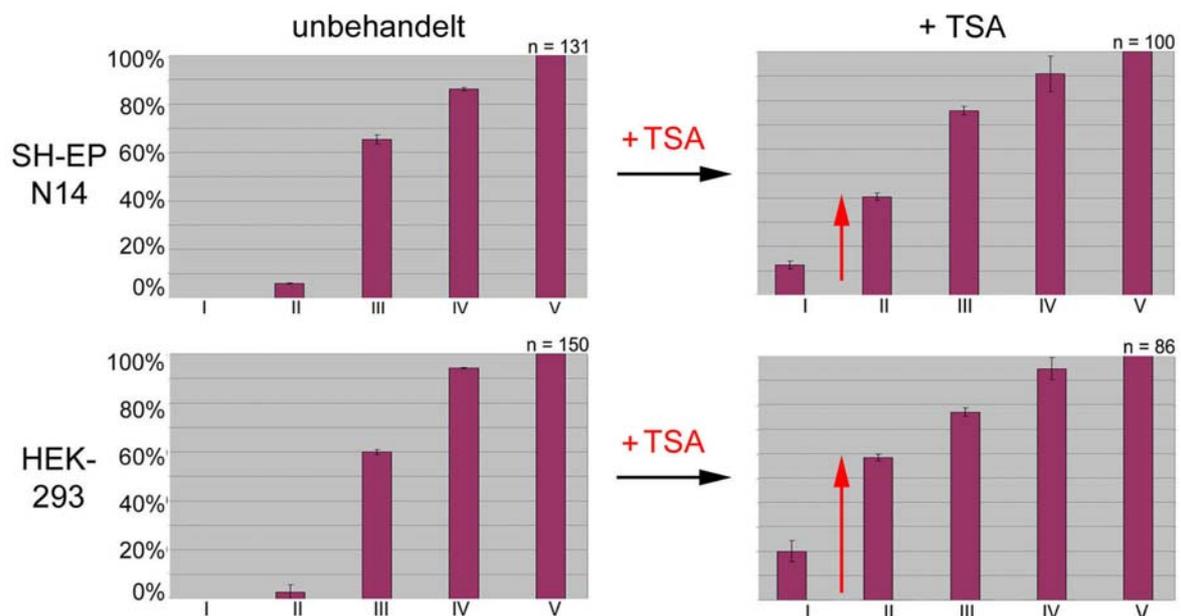


Abbildung 30: **Bestimmung des Replikationszeitpunktes von CFTR in unbehandelten und TSA-behandelten Zellen.** SH-EP N14 und HEK-293 Zellen wurden replikationsmarkiert und mit Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde CFTR durch 3D-FISH detektiert und die Replikationszeitpunkte wurden bestimmt (siehe Abb. 29). Die linken Diagramme zeigen das Replikationsverhalten von CFTR in unbehandelten Zellen, die rechten Diagramme nach Inkubation mit TSA. Die Balken geben den Anteil an Dubletten zu den jeweiligen S-Phase Stadien an (Mittelwerte +/- SD). Die roten Pfeile weisen auf die Veränderung gegenüber den unbehandelten Zellen hin. „n“ entspricht der Anzahl an ausgewerteten FISH-Signalen (Dubletten wurden als ein Signal gezählt).

3.3. Der Einfluss der Zellkernlamina auf die Kernlokalisierung von CFTR

Die Charakterisierung einzelner Bestandteile der Zellkernlamina in den vergangenen Jahren hat gezeigt, dass sowohl Lamine, als auch Lamina-assoziierte Proteine, wie Emerin und Lap2 β , eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellkern-Architektur, der Organisation des peripheren Chromatins und vermutlich auch bei der Regulation der Genexpression spielen (Aebi *et al.*, 1986; Bione *et al.*, 1994; Foisner and Gerace, 1993; Hutchison and Worman, 2004; Liu *et al.*, 2003; Mancini *et al.*, 1994; Nili *et al.*, 2001). Um zu ermitteln, ob entsprechende Proteine der Zellkernlamina an der Regulation der Kernpositionierung des CFTR-Lokus beteiligt sind, wurde in dieser Arbeit die Expression einiger wichtiger Komponenten der Lamina durch RNA-Interferenz (RNAi) posttranskriptionell reduziert („post transcriptional gene silencing“; im Folgenden als „Knockdown“ bezeichnet). Anschließend wurde die Kernlokalisierung des CFTR-Lokus durch verschiedene Methoden bestimmt.

3.3.1. Knockdown von Lamin A/C, Emerin und Lap2 β durch RNA-Interferenz

RNAi ist ein in Eukaryonten hoch konservierter zellulärer Vorgang, der bei Vorhandensein von geeigneten doppelsträngigen kurzen RNAs (siRNAs), den posttranskriptionellen Abbau von homologen mRNAs zur Folge hat (Elbashir *et al.*, 2001a; Elbashir *et al.*, 2001b; Fire *et al.*, 1998; Tuschl, 2001). Sowohl die Sequenz und Basenzusammensetzung der verwendeten siRNAs, als auch die Transfektionseffizienz der verwendeten Zelllinie sind dabei von großer Bedeutung (Elbashir *et al.*, 2001a). In dieser Arbeit wurden siRNAs homolog zu Lamin A/C, Lap2 β und Emerin verwendet, deren Anwendung bereits gut etabliert war (Elbashir *et al.*, 2001a; Harborth *et al.*, 2001). Für die Transfektion wurden SH-EP N14 und HeLa S6 Zellen ausgewählt, da diese beiden Zelllinien eine sehr periphere Kernlokalisierung von CFTR zeigten und vermutet wurde, dass die möglichen Auswirkungen einer veränderten Lamina-Zusammensetzung auf die Kernlokalisierung von CFTR dort besonders gut beobachtet werden könnte. HeLa S6 Zellen wurden außerdem verwendet, da für diese Zellen bereits eine gute RNAi-Effizienz gezeigt worden ist (Elbashir *et al.*, 2001a; Elbashir *et al.*, 2002; Harborth *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2002).

Die Transfektionseffizienz dieser beiden Zelllinien wurde durch liposomale Transfektion mit einem Konstrukt getestet, das ein Histon H2B-GFP Fusionsprotein kodiert (Kanda *et al.*, 1998). Die Aufnahme von siRNAs wurde durch Transfektion mit FITC-markierten siRNAs am Epifluoreszenzmikroskop überprüft (Abb. 31). Die markierten siRNAs wiesen keinerlei Homologie zu einem bekannten menschlichen Gen auf (überprüft und bestätigt durch den Hersteller Qiagen) und dienten lediglich zur Kontrolle der Transfektionseffizienz. Da sich häufig siRNA-Transfektionskomplexe auf den Zellen anhefteten (helle, grün fluoreszierende Signale in Abb. 31 C, D), war die Kontrolle der Aufnahme von Nukleinsäuren in die Zellen allein durch Verwendung der markierten siRNAs nicht zuverlässig. Die Expression des Fusionsproteins H2B-GFP zeigte dagegen eindeutig die Aufnahme von Nukleinsäuren in die Zellen an. Es zeigte sich, dass sowohl die Transfektion mit dem H2B-GFP Expressionsvektor, als auch die Aufnahme von markierten siRNAs in HeLa S6 Zellen sehr effizient erfolgte (Abb. 31). Mehr als 90 % der HeLa S6 Zellen zeigten eine Expression des H2B-GFP Fusionsproteins, beziehungsweise wiesen eine intrazelluläre Fluoreszenz der FITC-markierten siRNAs auf. Sowohl die Aufnahme des Vektors, als auch der siRNAs durch liposomale Transfektion erfolgte in diesen Zellen somit sehr effizient. SH-EP N14 Zellen wiesen dagegen eine wesentlich geringere Transfektionseffizienz auf (Abb. 31). Weniger als 40 % der Zellen exprimierten das Fusionsprotein. Auch die Aufnahme der

markierten siRNAs erfolgte mit einer ähnlich geringen Effizienz. Für die nachfolgenden Experimente (Bestimmung der Kernlokalisierung des CFTR-Lokus in siRNA behandelten Zellen) war es allerdings notwendig, eine sehr effiziente und in der Zellpopulation möglichst gleichmäßige RNAi-Antwort zu erreichen. Da eine effiziente Transfektion von SH-EP N14 Zellen nicht erzielt werden konnte, wurden die folgenden Experimente daher nur mit HeLa S6 Zellen durchgeführt.

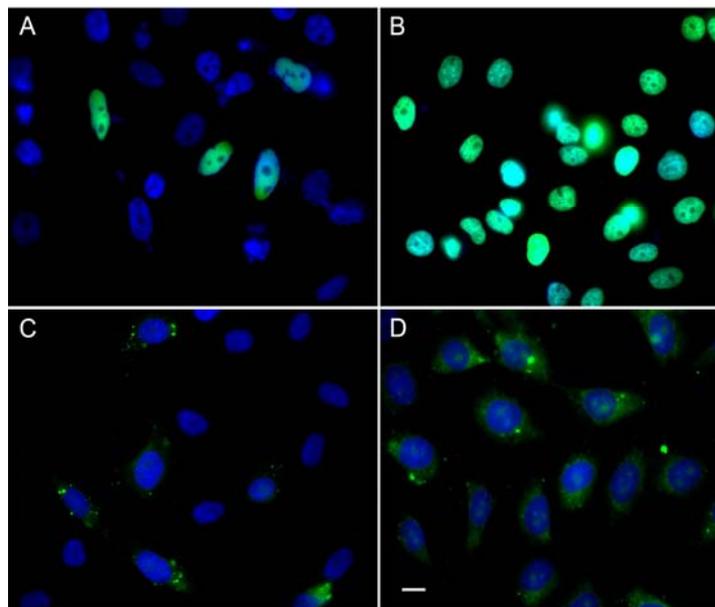


Abbildung 31: **Bestimmung der Transfektionseffizienz von SH-EP N14 und HeLa S6 Zellen.**

SH-EP N14 (A, C) und HeLa S6 Zellen (B, D) wurden mit einem Histon H2B-GFP Expressionsvektor (A, B: grüne Fluoreszenz) beziehungsweise einer FITC-markierten siRNA (C, D: grüne Fluoreszenz) transfiziert und am Epifluoreszenz-Mikroskop visualisiert. Die siRNA wies keine Homologie zu einem bekannten menschlichen Gen auf und diente zur Kontrolle und Optimierung der Transfektion mit siRNAs. HeLa S6 Zellen nahmen den Vektor beziehungsweise die siRNAs mit einer hohen Effizienz (> 90 %) auf. SH-EP N14 Zellen zeigten dagegen eine nur geringe Transfektionseffizienz (in beiden Fällen < 40 %). DNA-Färbung: DAPI (blau); Maßstab: 10 μ m.

Im Anschluss an die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde der Knockdown von Lamin A/C, Lap2 β und Emerin durch spezifische siRNAs in HeLa S6 Zellen getestet und optimiert. Es zeigte sich, dass durch die Transfektion mit je 100 nM siRNA und die anschließende Inkubation über 72 h eine deutlich reduzierte Expression dieser Lamina-Proteine erreicht werden konnte (Abb. 32 und 33).

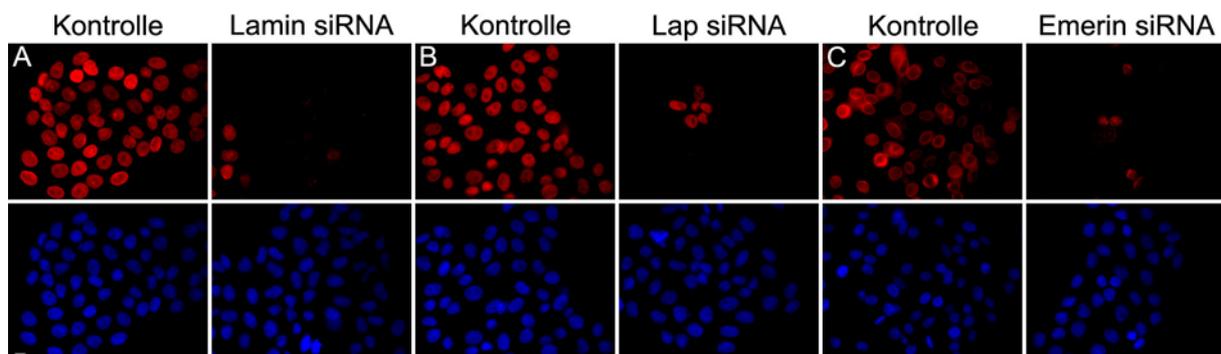


Abbildung 32: **Knockdown von Lamin A/C, Lap 2 β und Emerin in HeLa S6 Zellen.** HeLa S6 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % in 6-well Kulturschalen inkubiert und mit jeweils 5 μ g siRNA homolog zu Lamin A/C (A), Lap 2 β (B) und Emerin (C) transfiziert (Quiagen siRNA System). Nach 3 Tagen Inkubation wurde der Effekt der RNAi durch Immunfluoreszenz ermittelt (A, B, C: rechte Bilder). Simultan wurden auch unbehandelte Zellen immungefärbt (A, B, C: linke Bilder). Die obere Reihe zeigt die Immunfärbungen (rot) von Lamin A/C (A), Lap 2 β (B) und Emerin (C). Die untere Reihe zeigt die Gegenfärbung der DNA durch DAPI. Maßstab: 10 μ m.

Dieser Effekt war in der Zellpopulation relativ gleichmäßig ausgeprägt (Abb. 32). Allerdings waren gelegentlich auch kleine Zellgruppen mit nahezu unveränderter Signalintensität vorhanden (z.B.: Abb. 32 A: Lamin A/C-siRNA / linker, unterer Bildrand). Bei diesen Zellen handelte es sich wahrscheinlich um Tochterzellen, deren Vorläuferzelle(n) nicht transfiziert wurden. Dies verdeutlicht die Bedeutung einer hohen Transfektionseffizienz für eine effiziente RNAi. Die Bestimmung der exprimierten Proteinmengen mittels Western-Blot und die Quantifizierung der Bandenintensität ergab - im Vergleich zu den unbehandelten Zellen - eine Reduktion von Lamin A/C um ca. 75 %, von Lap2 β um ca. 70 % und von Emerin um ca. 70 % (jeweils gemittelt gegen β -Aktin; Abb. 33). Die erzielten Effizienzen der RNAi waren bei wiederholten Experimenten konstant und damit für weitere Analysen geeignet.

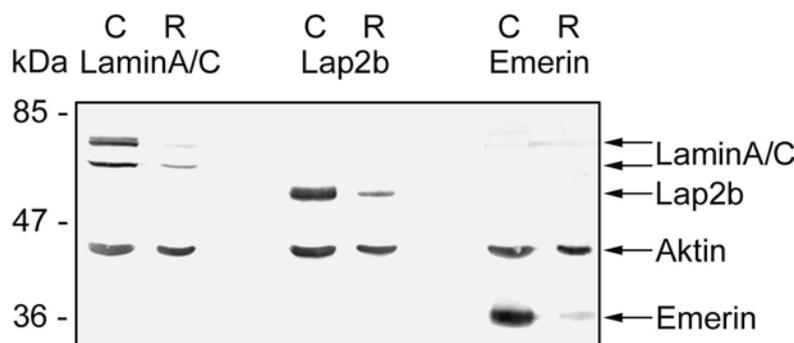


Abbildung 33: **Western-Blot von HeLa S6 Zellen nach Transfektion mit siRNAs.** HeLa S6 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % in 6-well Kulturschalen inkubiert, mit 5 μ g Lamin A/C-, LAP 2 β - oder Emerin- siRNA transfiziert und nach 3 Tagen trypsinisiert. Der Ganzzellextrakt wurde unter DNaseI Behandlung gewonnen (gekennzeichnet mit R). Außerdem wurde der Ganzzellextrakt unbehandelter

Zellen aufgetragen (C). Mittels Western-Blot wurden Lamin A/C (Doppelbande bei ca. 70 kDa; der Antikörper erkennt Lamin A und Lamin C), Lap2 β (53 kDa), Emerin (34 kDa) und β -Aktin (43 kDa) nachgewiesen. Die Pfeile kennzeichnen die Lage der entsprechenden Banden. Die Detektion von β -Aktin diente als Mengenkontrolle. Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte durch Bestimmung der mittleren Grauwerte mit der Software Adobe Photoshop (7.0). Links sind die Molekulargewichte in kDa angegeben (Fermentas).

3.3.2. Der Einfluss des Knockdowns von Lamina-Bestandteilen auf die Lokalisation von CFTR

Um die Bedeutung von Lamina-Bestandteilen für Positionierung des CFTR-Lokus zu untersuchen, wurde die Kernlokalisation von CFTR in unbehandelten und in mit Lamin A/C-, Lap2 β - und Emerin-siRNA behandelten Zellen durch 2D- und 3D-Erosionsanalysen verglichen. Außerdem wurde in diesen Zellen der Abstand zwischen der Kernperipherie und dem CFTR-Lokus dreidimensional vermessen. Um unspezifische Effekte der siRNA-Transfektion und der zellulären RNAi-Antwort auf die Kernlokalisation von CFTR auszuschließen, wurde die Position von CFTR in HeLa S6 Zellen auch nach Transfektion mit FITC-markierten siRNAs überprüft, die keine Homologie zu bekannten Genen aufwiesen. Zusätzlich wurde der Effekt einer kombinierten Transfektion mit Lamin A/C- und Lap2 β -siRNAs ermittelt (nur 2D-Erosionsanalyse). In HeLa und Drosophila Zellen wurde bereits

gezeigt, dass die simultane Transfektion mit 2 oder mehr siRNAs eine ähnliche RNAi-Effizienz aufweist, wie bei einer getrennten Anwendung der einzelnen siRNAs (Elbashir *et al.*, 2002; Goshima and Vale, 2003; Schubert *et al.*, 2005). Bei allen folgenden Experimenten wurden die Messungen an zufällig ausgewählten Zellkernen durchgeführt. Da für die Mikroskopie nur drei Farbkanäle zur Verfügung standen und simultan der CFTR-Lokus, die CT 7 und die Gesamt-DNA detektiert wurden, konnte der Knockdown von Lamin A/C, Lap2 β beziehungsweise Emerin in den entsprechenden Zellkernen nicht zusätzlich detektiert werden. Die hohe Effizienz der Transfektion und der RNAi in HeLa S6 Zellen (Abb. 32 und 33) erlaubte jedoch dieses Vorgehen.

3.3.2.1. 2D- und 3D-Erosionsanalyse

Die Ergebnisse der 2D-Erosionsanalyse zeigten, dass sich die Kernlokalisierung von CFTR in unbehandelten HeLa S6 Zellen und in mit unspezifischen siRNAs (FITC-markierte siRNAs) behandelten Zellen nicht signifikant unterschied (Abb. 34 A; ungepaarter t-Test: $p = 0,85$). So befanden sich 47,2 % der CFTR-Signale in unbehandelten Zellen in der ersten Schale. Nach Transfektion mit unspezifischen siRNAs befanden sich 46,9 % der CFTR-Signale in der ersten Schale. Dagegen führte sowohl die Transfektion mit Lamin A/C-siRNAs, als auch mit Lap2 β -siRNAs zu einer signifikant weiter im Kerninneren liegenden Position des CFTR-Lokus (Abb. 34 A: 31 % beziehungsweise 26 % der CFTR-Signale befanden sich in der ersten Schale; ungepaarter t-Test: jeweils $p < 0,002$). Die simultane Anwendung von Lamin A/C und Lap2 β siRNAs führte ebenfalls zu einer signifikant weiter im Kerninneren liegenden Position des CFTR-Lokus (Abb. 34 A: 25 % der CFTR-Signale in der ersten Schale; ungepaarter t-Test: $p < 0,001$). Die Transfektion mit Emerin siRNAs hatte hier eine weniger ausgeprägte, jedoch noch signifikante Relokalisation des CFTR-Genlokus in das Zellkerninnere zur Folge (Abb. 34 A: ca. 40 % der CFTR-Signale waren in der ersten Schale; ungepaarter t-Test: $p = 0,023$).

Auch in der 3D-Erosionsanalyse konnte eine Relokalisation von CFTR in das Zellkerninnere durch Transfektion mit Lamin A/C-, Lap2 β - und Emerin-siRNAs beobachtet werden (Abb. 34 B). Der CFTR-Lokus lokalisierte in unbehandelten Zellen in der 3D-Erosionsanalyse zu 80 % in der äußersten Schale (Abb. 34 B). Die Transfektion der Zellen mit Lamin A/C beziehungsweise Lap2 β siRNAs führte zu einer signifikant (ungepaarter t-Test: p jeweils $< 0,001$) weiter innen liegenden Kernlokalisierung des CFTR-Lokus (Abb. 34 B: 42% beziehungsweise 47 % der CFTR-Signale waren in der ersten Schale).

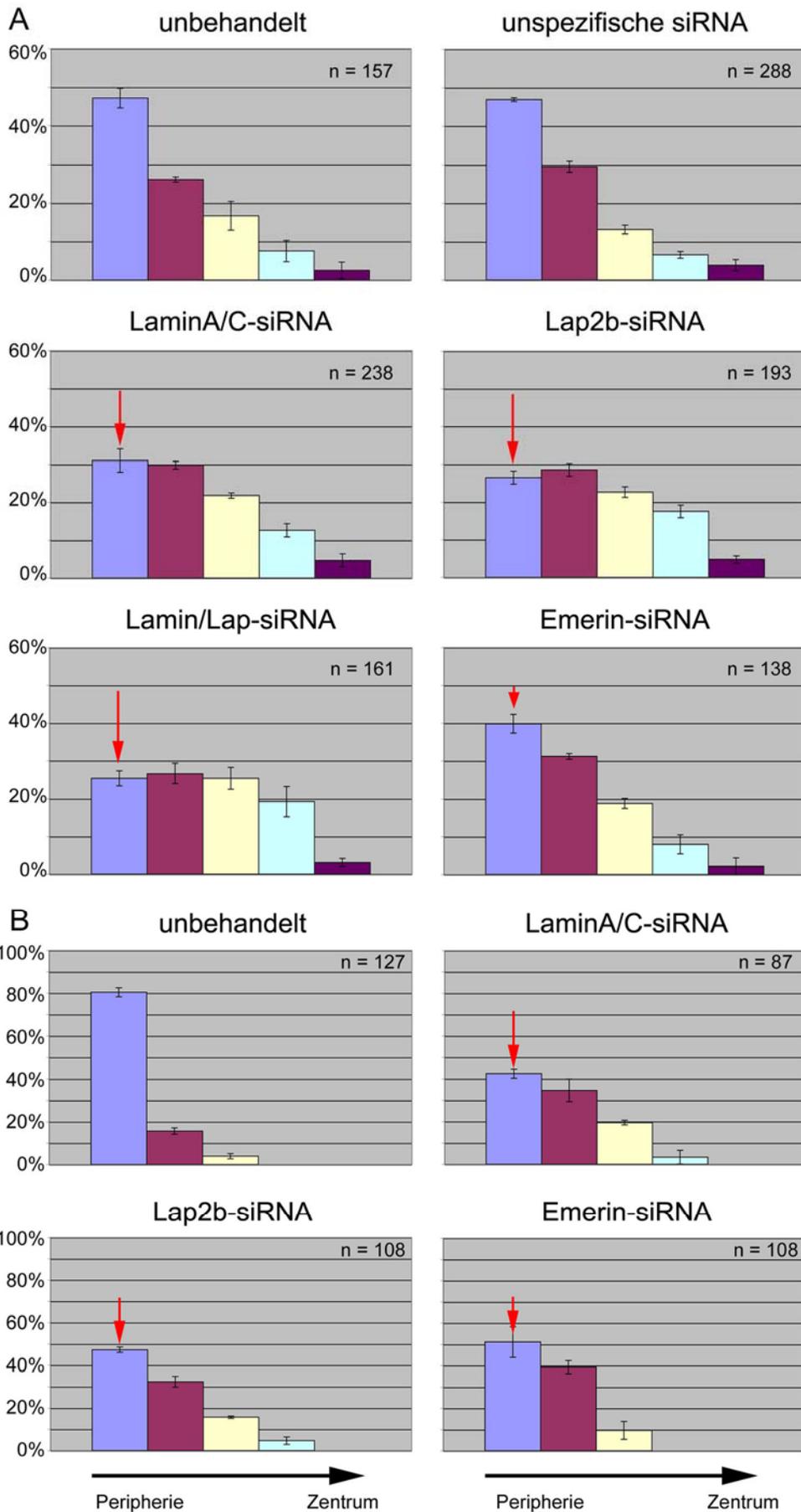


Abbildung 34 (vorhergehende Seite): **Erosionsanalyse zur Positionsbestimmung von CFTR in unbehandelten und siRNA behandelten HeLa Zellen.** HeLa S6 Zellen wurden entweder unbehandelt oder nach Transfektion mit siRNAs mit Methanol/Eisessig (A) beziehungsweise Formaldehyd (B) fixiert und CFTR wurde durch FISH detektiert. Anschließend wurden die Präparate am Epifluoreszenzmikroskop (A) beziehungsweise am CLSM (B) aufgenommen und einer Erosionsanalyse unterzogen. In A sind die Ergebnisse der 2D-Erosionsanalyse, in B die Ergebnisse der 3D-Erosionsanalyse dargestellt. Die Balken geben den Anteil (Mittelwerte +/- SD) an CFTR-Signalen in den entsprechenden Schalen von der Peripherie bis zum Zentrum der Zellkerne an. Die verwendeten siRNAs sind angegeben. Die roten Pfeile verdeutlichen den Effekt des Knockdowns auf die Lokalisation von CFTR. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA (FITC-markierte siRNA). „n“ gibt die Anzahl an ausgewerteten FISH-Signalen an.

Allerdings war hier der Effekt einer Transfektion mit Lamin A/C-siRNAs stärker als der einer Transfektion mit Lap2 β -siRNAs. Die Anwendung von Emerin-siRNAs zeigte, wie auch in der 2D-Erosionsanalyse, einen etwas weniger ausgeprägten, aber immer noch signifikanten Effekt auf die Lokalisation von CFTR (Abb. 34 B: 51 % in der ersten Schale; ungepaarter t-Test: $p = 0,002$). Interessanterweise konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass in den siRNA-behandelten Zellen der Anteil an Allelen, die sich in der 3D-Erosionsanalyse in unbehandelten Zellen in derselben Schale befanden, deutlich zurückging. So befanden sich in unbehandelten HeLa S6 Zellen 63% der CFTR-Signale in derselben Schale, während dieser Anteil in siRNA behandelten Zellen stark zurückging (Lamin A/C-siRNA: 19 %, Lap 2 β -siRNA: 11 % und Emerin-siRNA: 27 % der CFTR-Signale in derselben Schale).

Auch hier war der Effekt bei Emerin-siRNA behandelten Zellen etwas geringer. Insgesamt zeigten die Ergebnisse der Erosionsanalysen, dass der Knockdown von Lamin A/C, Lap2 β und Emerin mit einer weniger peripheren Kernlokalisierung des CFTR-Lokus verbunden war. Dieser Effekt war bei der Transfektion mit Emerin-siRNAs etwas geringer ausgeprägt. Die hier beobachteten Effekte schienen spezifisch aus der reduzierten Expression dieser Lamina-Proteine zu resultieren, da die Verwendung von siRNAs, die nicht homolog zu einem bekannten Gen waren, zu keiner signifikanten Änderung der Kernlokalisierung von CFTR führte.

3.3.2.2. Abstandsmessungen zwischen der Kernperipherie und dem CFTR-Lokus

Zusätzlich zu den Erosionsanalysen wurde der Effekt des Knockdowns von Lamin A/C, Lap2 β beziehungsweise Emerin auf die Lokalisation des CFTR-Lokus durch eine dreidimensionale Messung des Abstandes zwischen der Kernperipherie und dem CFTR-Lokus ermittelt (Tabelle 5). Die Messungen zeigten, dass die durchschnittlichen Abstände zwischen der Kernperipherie und dem CFTR-Lokus in siRNA transfizierten Zellen in allen Fällen gegenüber den unbehandelten Zellen um mehr als den Faktor zwei vergrößert waren

(Tabelle 5). Die größten Abstände konnten dabei in Lamin A/C-siRNA transfizierten Zellen beobachtet werden. In Emerin-siRNA transfizierten Zellen war die Zunahme der Abstände am geringsten. Die maximalen Abstände betragen in unbehandelten Zellen ca. 800 nm, in transfizierten Zellen ca. 1,5 μm . Diese Ergebnisse zeigten, dass die Lokalisation des CFTR-Lokus durch den Knockdown von Lamina-Proteinen messbar beeinflusst werden kann. Dies befindet sich im Einklang mit den durch die Erosionsanalysen ermittelten Daten (Abb. 34).

Tabelle 5: **Abstandsmessungen zwischen der Kernperipherie und dem CFTR-Lokus**

Zelllinie	unbehandelt	Lamin A/C-siRNA	LAP 2 β -siRNA	Emerin-siRNA
Abstand \emptyset	280 nm	710 nm	650 nm	610 nm
Abstand max.	800 nm	1500 nm	1500 nm	1500 nm

HeLa S6 Zellen wurden mit Lamin A/C-, Lap2 β - und Emerin-siRNAs transfiziert und mit Formaldehyd fixiert. Der CFTR-Lokus wurde durch 3D-FISH detektiert. Die Zellkerne wurden am CLSM unter identischen Einstellungen aufgenommen und der kürzeste Abstand in 3D wurde zwischen der Kernperipherie (definiert durch die DNA-Färbung mit Topro-3) und dem Intensitätszentrum des CFTR-Signals mit der Software Image J gemessen. Dabei wurde stets derselbe Schwellenwert für die Bestimmung der Kernperipherie durch die Topro-3 Färbung gewählt. Angegeben sind die Mittelwerte (\emptyset) und Maximalwerte (max.) der gemessenen Abstände (in nm) zwischen dem äußersten Zellkernrand und dem Intensitätszentrum der CFTR-Signale (SD stets < 5%). Es wurden jeweils ca. 60-70 FISH-Signale ausgewertet.

3.4. Untersuchungen von HGPS-Zellen

Die Transfektion von HeLa S6 Zellen mit Lamin A/C-siRNAs führte zu einer Verlagerung des CFTR-Lokus in das Zellkerninnere (Abb. 34; Tabelle 5). Eine weitere Möglichkeit, die Bedeutung von Lamin A/C für die Lokalisation des CFTR-Genlokus zu bestimmen, bot sich durch die Untersuchung von Zellen mit einer Mutation im Lamin A/C Gen (LMNA). Dazu wurden Fibroblasten von gesunden Probanden und von Patienten mit dem Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom (HGPS; Eriksson *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2004) untersucht. Letztgenannte Zellen wurden Kindern entnommen, bei denen auf phänotypischer, zytologischer und molekularer Ebene das HGPS diagnostiziert worden war (bezogen von den Coriell Cell Repositories, New Jersey, USA). Der ursächliche Zusammenhang von Mutationen in LMNA mit den bei HGPS-Patienten beobachteten degenerativen Erscheinungen ist unbekannt. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass die mit den Mutationen verbundenen Veränderungen in der Zellkernlamina zu einer Misslokalisierung von Genen führen könnten. Dies könnte wiederum eine gestörte Genregulation zur Folge haben (Zastrow *et al.*, 2004; Gruenbaum *et al.*, 2005). Diese Hypothese sollte mit CFTR als Modellgen überprüft werden, da die Zusammenhänge zwischen peripherer und interner Kernlokalisierung und der transkriptionellen Aktivität von CFTR bereits detailliert untersucht worden sind (diese Arbeit; siehe auch Zink *et al.*, 2004; Englmann *et al.*, 2005).

3.4.1. Untersuchungen zur Morphologie von HGPS-Zellen

Aus früheren Studien war bereits bekannt, dass primäre Fibroblasten von Patienten, die an HGPS erkrankt waren (hier bezeichnet als HGPS-Zellen), eine deformierte Zellkernlamina und lokale Anhäufungen von Lamin A an der Zellkernlamina besitzen (Eriksson *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass späte Passagen (>25) von HGPS-Zellen einen Zellzyklus-Arrest in der frühen S-Phase aufweisen und eine Kultivierung dieser Zellen jenseits dieser Passagen-Zahl kaum möglich ist (Goldman *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte nun ermittelt werden, ob diese morphologischen und zytologischen Eigenschaften bei den hier verwendeten HGPS-Zellen auch beobachtet werden können. Außerdem sollte die Morphologie sowohl der HGPS-Zellen, als auch von primären Fibroblasten eines gesunden Probanden charakterisiert werden, um mögliche Effekte der Mutation in LMNA in HGPS-Zellen auf die Kernlokalisierung des CFTR-Lokus interpretieren zu können. In dieser Arbeit wurden primäre Fibroblasten des gesunden Vaters eines an HGPS erkrankten Kindes (Bezeichnung: AG08469, Abkürzung: C1) und primäre Fibroblasten zweier erkrankter Kinder (Zellen einer 14-jährigen Patientin: AG01972, Abkürzung: P1 und Zellen eines 14-jährigen Patienten: AG11498, Abkürzung: P2) verwendet. Diese Zellen wurden aus Hautbiopsien gewonnen und von den „Coriell Cell Repositories“ (New Jersey, USA) erworben. Die Zellen befanden sich, bis auf die HGPS-Zellen P1, in einer relativ frühen Passage (C1: Passage +5, P1: +14, P2: +8). Die Anzahl der Passagen wurde nicht angeglichen, da dies die vorübergehende Kryopreservation der älteren Passagen erfordert hätte und ein Einfluss dieser Maßnahme auf die Morphologie nicht ausgeschlossen werden konnte.

Die Untersuchungen zur Morphologie wurden sowohl mit frühen Passagen, als auch nach einigen Wochen mit späteren Passagen der Zellen C1, P1 und P2 durchgeführt. Außerdem wurde untersucht, ob sich die Morphologie von Zellen, die in der G0-Phase arretiert wurden (G0-Zellen), von der Morphologie zyklisierender Zellen unterschied. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die morphologischen Veränderungen in HGPS-Zellen durch eine Akkumulation von mutiertem Lamin A verursacht werden (Eriksson *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2004). Der mögliche Zusammenhang dieser Akkumulation mit dem Zellzyklus sollte durch den Vergleich zyklisierender Zellen mit G0-Zellen noch eingehender untersucht werden. Um Zellen in der G0-Phase zu arretieren, wurden diese bis zur vollständigen Konfluenz, unter häufigem Wechsel des Kulturmediums (alle 3 Tage) kultiviert und anschließend unter seltenem Wechsel des Mediums (alle 10 Tage) für 2-3 Wochen inkubiert. Die Abwesenheit zyklisierender Zellen wurde durch Phasenkontrastmikroskopie

und BrdU-Markierung überprüft. Um die Zellen von der G₀-Phase in die G₁-Phase zu überführen, wurden diese durch Trypsinieren abgelöst, um den Faktor 1:3 verdünnt und mit frischem Medium inkubiert. Bei Wiedereintritt in die G₁-Phase zeigten die HGPS-Zellen einer frühen Passage auch nach bis zu 4 Wochen Arretierung in der G₀-Phase ein rasches Wachstum. Die Kultivierung von HGPS-Zellen bis zu Passagen von über 25-26 war jedoch auf Grund des kaum mehr vorhandenen Wachstums nicht möglich. Dies wurde auch bereits in einer früheren Studie beobachtet (Goldman *et al.*, 2004). Um die Morphologie der verwendeten Zellen zu untersuchen, wurden sowohl frühe als auch späte Passagen zyklisierender Zellen, und frühe Passagen von G₀-Zellen mit Formaldehyd fixiert. Die Lamina wurde durch anti-Emerin Antikörper und die DNA durch Topro-3 gefärbt (Abb. 35 B). Emerin ist in HGPS-Zellen gegenüber anderen Lamina-Proteinen, wie Lamin B und Lap2 β , nicht delokalisiert und eignet sich daher gut als Lamina-Marker (Paola Scaffidi, Universität Lissabon, persönliche Mitteilung). Anschließend wurden die Präparate unter dem Epifluoreszenzmikroskop und dem CLSM untersucht. Um die Morphologie der Zellen besser beschreiben zu können, wurden unterschiedliche Phänotypen klassifiziert (Abb. 35):

Die erste Klasse (Klasse I) umfasste morphologisch unauffällige Zellen mit elliptischen Zellkernen und einer gleichmäßigen, glatten Lamina mit nur sehr wenigen, schmalen Invaginationen. Die nächste Klasse (Klasse II) zeigte eine etwas unregelmäßigere Morphologie mit im Grunde noch elliptischen Zellkernen, aber ausgeprägteren und breiteren Invaginationen. Die Lamina-Färbung war in dieser Klasse stets homogen und gleichmäßig. Die dritte Klasse (Klasse III) umfasste morphologisch sehr auffällige Zellen mit stark deformierten Zellkernen, zum Teil auch unter Abspaltung von Mikronuklei. Die ausgeprägten Ausbuchtungen und Zerteilungen der Lamina wiesen oft sehr inhomogene Emerin-Färbungen auf, die auf lokale Akkumulationen hindeuteten. Zum Teil konnte auch eine regelrechte „Zerteilung“ der Zellkerne beobachtet werden (Abb. 35 und 37). Zellen dieser Klasse konnten nicht mehr mit BrdU markiert werden und zyklisierten demnach nicht mehr. Es zeigte sich, dass die HGPS-Zellen -gegenüber den Fibroblasten des gesunden Probanden- einen deutlich erhöhten Anteil an Klasse III Zellkernen aufwiesen (Abb. 35). Außerdem war dieser Anteil in den zyklisierenden HGPS-Zellen im Vergleich zu den G₀-Zellen desselben Zelltyps und des gleichen „Alters“ (Erklärung siehe Legende Abb. 35 B) erhöht. Noch spätere Passagen der zyklisierenden Zellen wiesen eine weitere Zunahme an Klasse III Zellkernen auf (Abb. 35).

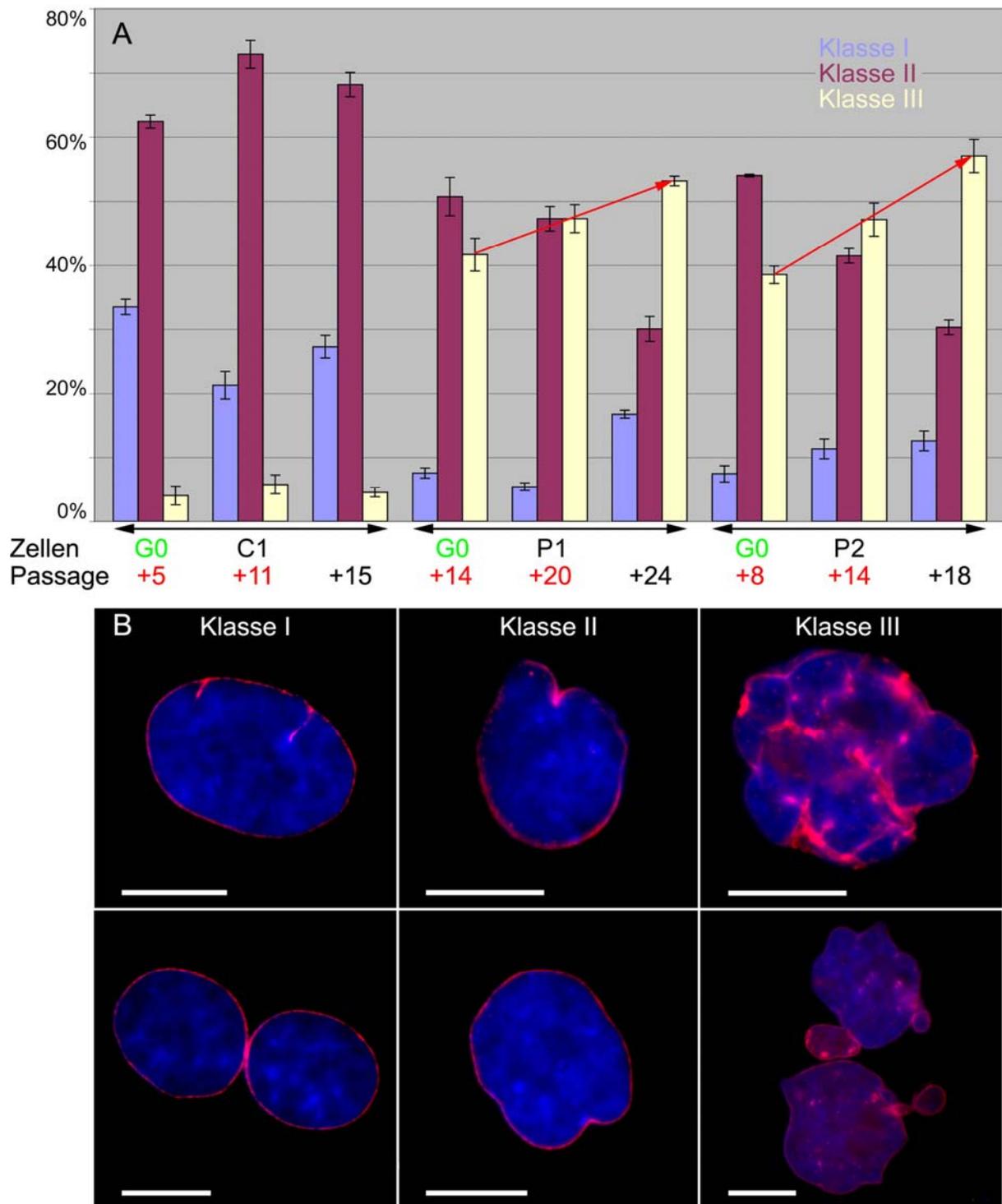


Abbildung 35: **Progressive morphologische Veränderungen der HGPS-Zellen.** Zu Beginn des Experiments wurden Kulturen von Fibroblasten eines gesunden Probanden (C1) und von HGPS-Patienten (P1 und P2) aufgeteilt. Die eine Hälfte der Zellen wurde für 3 Wochen in G0 arretiert (grünes G0) und die andere Hälfte wurde für 3 Wochen (6 Passagen) exponentiell kultiviert (rote Passagen). Diese Kulturen besaßen *de facto* dasselbe Alter, unterschieden sich aber in der Anzahl ihrer Passagen und somit in der Zahl der durchlaufenen Zellzyklen. Die sich teilende Kultur wurde anschließend wieder aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit Formaldehyd fixiert (zeitgleich mit der G0 Kultur); die andere Hälfte wurde weitere 2 Wochen (4 Passagen) exponentiell kultiviert und ebenfalls fixiert. Die Präparate wurden mit einem anti-Emerin Antikörper (Laminafärbung, rot in B) und die DNA mit TOPRO-3 (blau in B) gefärbt. Die Zellkerne wurden auf Grund ihrer Morphologie in drei Klassen (B: obere Reihe: P1, untere Reihe: P2) eingeteilt. Das Diagramm (A) zeigt die Anteile der beobachteten morphologischen Klassen in den Kulturen zu den angegebenen Passagen. Der rote Pfeil verdeutlicht die Zunahme an stark deformierten Klasse III Zellkernen in den HGPS-Kulturen. Es wurden jeweils ca. 200 Zellen ausgewertet. Maßstab: 10 μ m.

Aus diesen Beobachtungen konnten nun folgende Rückschlüsse gezogen werden: Zum einen zeigten nur die HGPS-Zellen einen substantiellen Anteil an Klasse III Zellkernen. Somit akkumulierten sich die morphologischen Defekte lediglich in HGPS-Zellen, was vermutlich auf die Anreicherung von unreifem pre-Lamin A zurückzuführen ist (Goldman *et al.*, 2004). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass diese Zunahme an morphologisch auffälligen Zellkernen vermehrt in zyklisierenden Kulturen auftrat (Abb. 35). Möglicherweise spielen dabei auch Zellzyklus-Defekte eine Rolle. Diese Zusammenhänge wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Goldman *et al.*, 2004).

3.4.2. Die Lokalisation von CFTR in HGPS-Zellen

Um der Frage nachzugehen, ob die bei HGPS-Zellen späterer Passagen beobachteten Veränderungen einen Einfluss auf die Kernlokalisierung des CFTR-Lokus ausüben, wurde die Position von CFTR in Fibroblasten eines gesunden Probanden (C1) und in HGPS-Zellen (P1 und P2) untersucht. Dabei wurde sowohl der Abstand des CFTR-Lokus zur Zellkernlamina, als auch die Lokalisation im hochazetylierten Euchromatin ermittelt.

3.4.2.1. 3D-Erosionsanalyse zur Positionierung von CFTR in Fibroblasten

Mittels 3D-Erosionsanalyse wurde die Kernlokalisierung des CFTR-Lokus in primären menschlichen Fibroblasten untersucht. Dies konnte allerdings nur mit den Fibroblasten des gesunden Probanden (C1) durchgeführt werden, da die sehr unregelmäßige Morphologie der HGPS-Zellen eine Erosionsanalyse nicht erlaubte. Die 3D-Erosionsanalyse der Fibroblasten des gesunden Probanden diente lediglich dazu, mehr über die Kernlokalisierung des CFTR-Lokus in Fibroblasten mit dieser bereits sehr gut etablierten Methode zu erfahren, um die Ergebnisse aus den späteren Analysen der HGPS-Zellen besser interpretieren zu können.

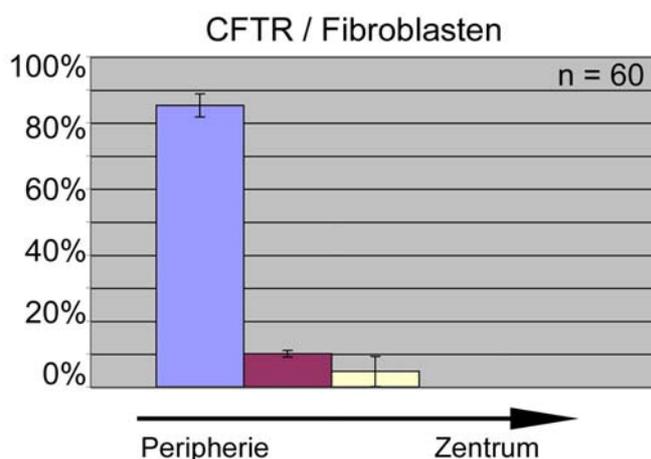


Abbildung 36: **3D-Erosionsanalyse.**

Primäre Fibroblasten (C1) wurden mit Formaldehyd fixiert und der CFTR-Lokus wurde durch FISH detektiert. Die Zellkerne wurden am CLSM aufgenommen, mit dem Programm Amira dreidimensional rekonstruiert und in 5 konzentrische radiale Schalen eingeteilt (siehe Abb. 13). Die Position der FISH-Signale wurde anschließend in Bezug auf diese Schalen ausgewertet. Die Balken in dem Diagramm zeigen den Anteil (Mittelwerte \pm SD) an FISH-Signalen in den fünf Schalen (von links nach rechts: Peripherie bis Zentrum). „n“ entspricht der Anzahl an ausgewerteten FISH-Signalen.

Die Ergebnisse der 3D-Erosionsanalyse ließen auf eine sehr periphere Kernlokalisierung des CFTR-Lokus in diesen Zellen schließen (Abb. 36). Die Verteilung war nahezu identisch zu der in den SH-EP N14 Zellen beobachteten Verteilung des CFTR-Lokus (siehe Abb. 14). Dies lässt den Schluss zu, dass in diesen primären Fibroblasten der CFTR-Lokus ebenfalls einen hohen Grad an Assoziation mit dem perinukleären Heterochromatin aufweist.

3.4.2.2. Abstandsmessungen zwischen der Zellkernlamina und dem CFTR-Lokus

Späte Passagen der Fibroblasten des gesunden Probanden (C1: Passage +19) und der HGPS-Zellen (P1: Passage +24, P2: Passage + 20) wurden auf Deckgläsern bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % exponentiell kultiviert. Die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert und der CFTR-Lokus wurde durch 3D-FISH detektiert. Die Kernlamina wurde durch Immunfärbung mittels eines anti-Emerin Antikörpers visualisiert. Der kürzeste Abstand in 3 D zwischen der Zellkernlamina (definiert durch die α -Emerin Färbung) und den Intensitätszentren der CFTR-Signale wurde mit der Software Image J gemessen (Tabelle 6). Es wurden stets Klasse III Zellkerne ausgewertet (Klassifikation siehe Abb. 35 B).

Tabelle 6: Abstandsmessungen zwischen der Zellkernlamina und dem CFTR-Lokus

Zellen	C1	P1	P2
Abstand \emptyset	230 nm	540 nm	470 nm
Abstand max.	510 nm	1220 nm	1000 nm

Angegeben sind die Mittelwerte (\emptyset) und Maximalwerte (max.) der gemessenen Abstände (in nm) zwischen dem innersten Rand der Lamina (ermittelt durch α -Emerin-Färbung) und dem Intensitätszentrum der CFTR-Signale. Die Messungen wurden in älteren Passagen von Fibroblasten eines gesunden Probanden (C1) und HGPS-Fibroblasten (P1, P2) durchgeführt. Die Zellen wurden unter Erhalt der 3D-Struktur fixiert, am CLSM aufgenommen und dreidimensional ausgewertet. Es wurden jeweils ca. 50-60 FISH-Signalen ausgewertet (SD stets < 5 %).

Die Messungen zeigten (Tabelle 6), dass der CFTR-Lokus in allen Fällen eng mit der Kernperipherie assoziiert war. Jedoch war der Abstand zwischen der Zellkernlamina und dem CFTR-Lokus in HGPS-Zellen gegenüber den Abständen in den primären Fibroblasten des gesunden Probanden um mehr als den Faktor zwei vergrößert. Zum Teil wurde der CFTR-Lokus in HGPS-Zellen auch an Invaginationen der Lamina in das Zellkerninnere vorgefunden (Abb. 37: rote Pfeile linkes Bild und unterer Pfeil des rechten Bildes). In diesem Fall wurde der Abstand zu der Einbuchtung gemessen.

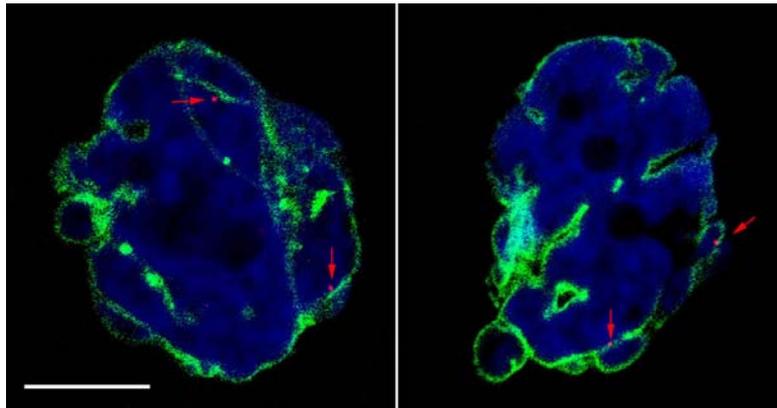


Abbildung 37: **Immuno-FISH von HGPS Zellen.** HGPS-Zellen (links: P1, rechts: P2) wurden auf Deckgläsern kultiviert und mit Formaldehyd fixiert. CFTR wurde durch FISH (rote Signale) und die Lamina durch anti-Emerin Immunfärbung (grün) detektiert. Die DNA wurde durch TOPRO-3 gefärbt (blau) und die Zellkerne wurden am CLSM aufgenommen. Die roten Pfeile deuten auf die CFTR-Signale. Maßstab: 10 µm

3.4.2.3. Die Lokalisation von CFTR in dem hyperazetylierten Euchromatin

Auf Grund der 3D-Erosionsanalyse von Fibroblasten eines gesunden Probanden (C1, Abb. 36), war zu erwarten, dass der CFTR-Lokus auch in diesen Zellen –wie bei SH-EP N14 und HEK-293 Zellen- eng mit dem perinukleären Heterochromatin assoziiert ist. Die Ergebnisse der Abstandsmessungen (Tabelle 6) führten zu der Frage, ob der CFTR-Lokus durch den größeren Abstand zu der Lamina in HGPS-Zellen in ein funktionell anderes Chromatin-Umfeld gelangt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Anteil an Kolokalisation des CFTR-Lokus mit dem hyperazetylierten Euchromatin in Fibroblasten eines gesunden Probanden (C1) und in HGPS-Zellen (P1 und P2) ermittelt (Tabelle 7). Die Bestimmung der Kolokalisation des CFTR-Lokus mit dem Euchromatin wurde an etwas jüngeren Passagen vorgenommen (C1: +11, P1: +20, P2: 14), da eine eindeutige Unterscheidung zwischen Chromatin, welches an H4AcK8 angereichert beziehungsweise nicht angereichert war, bei den stark deformierten Zellkernen der sehr alten HGPS-Kulturen zunehmend erschwert war.

Tabelle 7: **Kolokalisation des CFTR-Lokus mit dem hyperazetylierten Euchromatin**

Zellen	C1	P1	P2
Anteil Kolokalisation	21 %	49 %	46 %

Angegeben ist jeweils der durchschnittliche Anteil an Kolokalisation des CFTR-Lokus mit dem hyperazetyliertem Euchromatin in Fibroblasten eines gesunden Probanden (C1) und in HGPS-Zellen (P1, P2). Die Zellen wurden auf Deckgläsern bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert und mit Formaldehyd fixiert. CFTR wurde durch FISH und das hyperazetylierte Euchromatin durch einen anti-H4AcK8 Antikörper detektiert. Die Zellen wurden am CLSM aufgenommen und dreidimensional ausgewertet. Überlagerten sich die Intensitätsmaxima der FISH-Signale mit der H4AcK8 Färbung, wurde dies als Kolokalisation gewertet. Es wurden jeweils 50-60 FISH-Signale ausgewertet (SD stets < 5 %).

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass in HGPS-Zellen (P1 und P2) der Anteil an Kolo-kalisation mit dem hyperazetylierten Euchromatin im Vergleich zu den Fibroblasten eines gesunden Probanden (C1) mehr als zweimal so hoch war (Tabelle 7). Folglich korrelierte der in HGPS-Zellen vergrößerte Abstand zwischen dem CFTR-Lokus und der Zellkernlamina (Tabelle 6), hier mit einer zunehmenden Lokalisation im hyperazetylierten Euchromatin (Tabelle 7).

Diese Beobachtungen zeigten demnach, dass die mit der Mutation in LMNA verbundenen Veränderungen in der Zellkernlamina tatsächlich zu einer veränderten Assoziation des CFTR-Lokus mit definierten Chromatin-Frak-tionen beigetragen haben. Ob dies einen Einfluss auf die Genregulation von CFTR ausübt, müsste durch weitere Experimente untersucht werden. Generell wäre es wünschenswert, noch weitere Untersuchungen der HGPS-Zellen, z.B. in Bezug auf die Transkriptions- und Replikationsregulation von CFTR durchzuführen, die jedoch in dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr vorgenommen werden konnten.

4. Diskussion

4.1. Kernlokalisierung, Genaktivität und Replikationsverhalten

4.1.1. Die flexible Organisation der CFTR-Region

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit hatte zum Ziel, die komplexen Zusammenhänge zwischen der Kernlokalisierung, der transkriptionellen Aktivität und dem Replikationsverhalten von Zelltyp-spezifisch regulierten Genen in menschlichen Zellen besser zu verstehen. Dazu wurde zunächst der Zusammenhang zwischen der Kernlokalisierung und der transkriptionellen Aktivität von drei Genen der humanen CFTR-Region auf Chromosom 7q31 untersucht. Um die radiale Kernlokalisierung dieser Gene zu bestimmen, wurde die seit längerem bewährte Erosionsanalyse durchgeführt (Boyle *et al.*, 2001; Chambeyron and Bickmore, 2004; Chubb *et al.*, 2002; Croft *et al.*, 1999; Gilchrist *et al.*, 2004). Um ein möglichst breites Spektrum an Zelllinien untersuchen zu können, wurde zunächst die relativ rasch durchführbare 2D-Erosionsanalyse angewendet (Abb. 11 und 12). Die Ergebnisse haben gezeigt, dass transkriptionell aktive Genloci der CFTR-Region bevorzugt weiter im Kerninneren lokalisierten als nicht exprimierte Genloci (Abb. 12). Besonders ausgeprägt war die interne Kernlokalisierung des exprimierten CFTR-Lokus in Calu-3 Zellen und in primären Zellen des Nasenepitheliums (Abb. 12). In manchen Fällen war diese Korrelation weniger deutlich. So war der Anteil an Signalen des exprimierten CORTBP2-Lokus in HEK-293 Zellen in der äußersten Schale bei der Erosionsanalyse gegenüber den benachbarten, inaktiven Genloci nur geringfügig reduziert (Abb. 12). In Calu-3 Zellen lokalisierte die gesamte CFTR-Region weiter im Kerninneren, der exprimierte CORTBP2-Lokus befand sich jedoch zu einem höheren Anteil in der äußersten Schale als der inaktive GASZ-Lokus (Abb. 12).

Um mehr über die dreidimensionale Positionierung von GASZ, CFTR und CORTBP2 zu erfahren und um die Zuverlässigkeit der 2D-Erosionsanalyse zu kontrollieren, wurde die Kernlokalisierung außerdem durch eine 3D-Erosionsanalyse bestimmt. Die Ergebnisse der 3D-Erosionsanalyse haben gezeigt, dass nicht exprimierte Genloci, wie etwa alle drei Gene in SH-EP N14 Zellen, hier zu einem sehr hohen Anteil (< 90 %) in der äußersten Schale lokalisierten (Abb. 14). Die 3D-Erosionsanalyse des exprimierten CORTBP2-Lokus in HEK-293 Zellen zeigte außerdem, dass dieser Genloкус im Vergleich zu den benachbarten, inaktiven Genloci weiter im Kerninneren lokalisierte (Abb. 14). Diese differenzierte Positionierung der CFTR-Region in HEK-293 Zellen ging aus der 2D-Erosionsanalyse weniger deutlich hervor (Abb. 12). Die verhältnismäßig periphere Kernlokalisierung des

exprimierten CORTBP2-Lokus in Calu-3 Zellen konnte auch in der 3D-Erosionsanalyse beobachtet werden. Insgesamt bestätigte die 3D-Erosionsanalyse somit die Ergebnisse der 2D-Erosionsanalyse, zeigte die Positionierung der Genloci jedoch eindeutiger an. Die unterschiedlichen Anteile von Signalen in den radialen Schalen im Vergleich beider Analyseverfahren beruhen wahrscheinlich auf der Erfassung aller Signale im dreidimensionalen Raum durch die 3D-Erosionsanalyse (Abb. 13; siehe auch Kosak *et al.*, 2002). Beide Methoden zeigten einen engen Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Aktivität und der radialen Positionierung von Genen der CFTR-Region, die auch bei der Untersuchung anderer Genloci beobachtet werden konnte (Chambeyron and Bickmore, 2004; Kosak *et al.*, 2002; Tambar and Belmont, 2001). Aus den Ergebnissen der Erosionsanalysen konnte jedoch keine Aussage über die zelluläre Umgebung der Genloci getroffen werden.

Um in Erfahrung zu bringen, ob die Gene der CFTR-Region mit unterschiedlichen Chromatin-Fractionen assoziiert waren, wurde eine Kolokalisationsanalyse vorgenommen (Abb. 15 bis 17). Die Ergebnisse haben gezeigt, dass transkriptionell inaktive Genloci der CFTR-Region eng mit dem perinukleären Heterochromatin assoziiert waren. Aktive Genloci lokalisierten dagegen bevorzugt in dem hyperazetylierten Euchromatin im Kerninneren (Abb. 16 und 17). Im Gegensatz zu der Erosionsanalyse, bei der artifizielle Schalen in den Zellkern projiziert werden, wird durch die Kolokalisationsanalyse die Assoziation mit einem biologischen Kompartiment bestimmt (Abb. 38).

Trotz der natürlich vorgegebenen Schwankungen in der Breite des hier detektierten perinukleären Heterochromatins (Abb. 38 A) erschien die Assoziation von Genloci mit beziehungsweise die Dissoziation von diesem zellulären Kompartiment sehr spezifisch entsprechend der individuellen transkriptionellen Aktivität zu erfolgen (Abb. 16 und 17). Auch in Fällen, in denen der Zusammenhang zwischen der radialen Positionierung und der Genexpression nicht so klar erschien (etwa bei CORTBP2 in HEK-293 Zellen), zeigte die Kolokalisationsanalyse eine sehr differenzierte Positionierung, die offenbar auf der Ebene der einzelnen Genloci reguliert wird (Abb. 38 C). Ein Vergleich der hier durchgeführten Methoden zeigt, dass durch die Erosionsanalyse zwar wertvolle Hinweise über die räumlich flexible Organisation der CFTR-Region erlangt werden konnten; insgesamt schienen die Daten der Kolokalisationsanalyse jedoch aussagekräftiger und von größerer biologischer Relevanz zu sein.

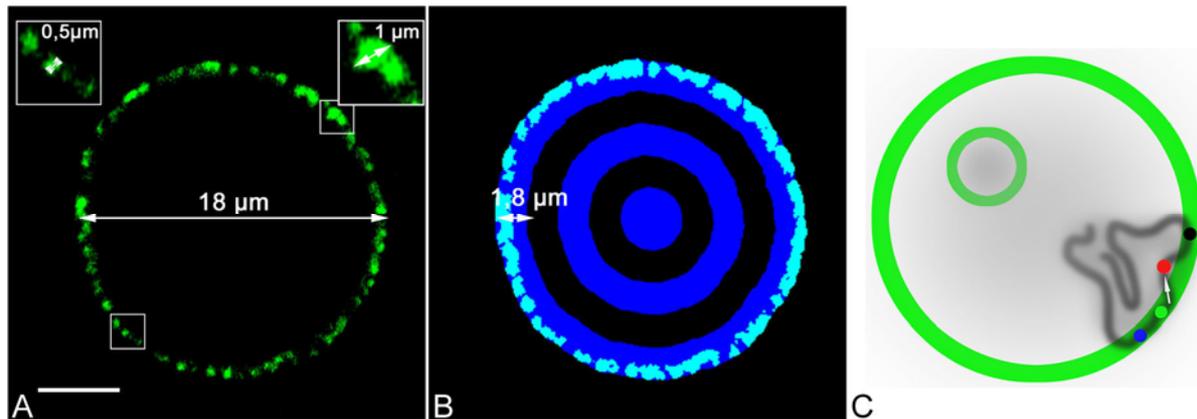


Abbildung 38: **Detektion des perinukleären Heterochromatins und 3D-Erosionsanalyse.** (A und B) Abgebildet ist ein HEK-293 Zellkern nach RPM und Formaldehyd-Fixierung. Perinukleäres Heterochromatin wurde durch einen Antikörper gegen BrdU nachgewiesen (grün in A und B). DNA wurde durch Topro-3 gefärbt und der Zellkern in 5 konzentrische, radiale Schalen in 3D eingeteilt (blau in B). Der Zellkerndurchmesser dieser Zelle beträgt ca. 18 µm. Dementsprechend besitzen die Schalen einen Durchmesser von ca. 1,8 µm. Das perinukleäre Heterochromatin weist eine Breite von ca. 500 nm bis zu ca. 1 µm auf (Messungen mit der Software Image J). Die Vergrößerungen (3x) zeigen jeweils eine schmale und breite Stelle des Heterochromatins. Maßstab: 5 µm. (C) Die schematische Darstellung eines HEK-293 Zellkerns in C beschreibt die in dieser Zelllinie beobachtete Relokalisation des exprimierten CORTBP2-Lokus (rot) aus dem perinukleären Heterochromatin (grün) in das angrenzende Euchromatin. Die benachbarten, inaktiven Genloci GASZ (blau), CFTR (hellgrün) und eine 200 kbp telomerisch gelegene intergenische Region (schwarz, detektiert durch den PAC RP5) verblieben in dem perinukleären Heterochromatin (gezeigt für GASZ, CFTR) an der Kernperipherie (gezeigt für GASZ, CFTR und die intergenische Region). Das CT 7 ist durch eine graue Linie angedeutet. Der kleine Kreis im Zellkern symbolisiert den Nukleolus mit dem perinukleolären Heterochromatin (grün)

Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass die Assoziation mit definierten Chromatin-Fractionen häufig mit der transkriptionellen Aktivität korreliert. So assoziieren sowohl der humane β -Globin Locus, als auch Lymphozyten-spezifische Gene im transkriptionell inaktiven Zustand spezifisch mit perizentrischem Heterochromatin (Brown *et al.*, 1997, 1999, 2001; Schübeler *et al.*, 2000). Auch in den hier untersuchten Zelllinien war der β -Globin-Locus eng mit dem perizentrischen Heterochromatin assoziiert (Abb. 19 und 20). Im Gegensatz dazu assoziierten die Gene der CFTR-Region in ihrem inaktiven Zustand spezifisch mit dem perinukleären Heterochromatin (Abb. 16 und 17), aber nicht mit perizentrischem oder perinukleolärem Heterochromatin (Zink *et al.*, 2004). Dies lässt den Schluss zu, dass unterschiedliche Fractionen von Heterochromatin nicht äquivalent sind und unterschiedliche Rollen in der Regulation der Genaktivität verschiedener Genloci spielen.

Diese Ansicht wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass sich in Säugerzellen die Chromatinstruktur von perizentrischem Heterochromatin von anderen Fractionen des Heterochromatins unterscheidet (Maison *et al.*, 2002; Mahy *et al.*, 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass der transkriptionelle Repressor Ikaros spezifisch in perizentrischem Heterochromatin angereichert ist und dort für die transkriptionelle Repression von Lymphoid-spezifischen Genen in ihrem inaktiven Zustand benötigt wird (Brown *et al.*, 1997; Cobb *et al.*,

2000; Molnar and Georgopoulos, 1994). Inaktive Allele von Immunoglobulin-Genen finden sich dagegen bevorzugt an der Kernperipherie und assoziieren nicht mit perizentrischem Heterochromatin (Kosak *et al.*, 2002). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse unterstreichen die funktionell differenzierte Bedeutung unterschiedlicher heterochromatischer Bereiche. Der Befund, dass die eng benachbarten Gene der CFTR-Region abhängig von ihrem individuellen Transkriptionsverhalten in sehr unterschiedlichem Maße mit dem perinukleären Heterochromatin assoziiert sind, unterstreicht zum einen die funktionelle Bedeutung der Assoziation mit verschiedenen Chromatin-Fraktionen für die Genregulation. Zum anderen erfordert dieses Verhalten eine hohe räumliche Flexibilität, die auf der Ebene einzelner Gene reguliert wird (Abb. 38 C). Die Ergebnisse aus der Orientierungsanalyse (Abb. 22) und den Abstandsmessungen (Abb. 23) haben gezeigt, dass die Gene der CFTR-Region trotz der Nähe zueinander in demselben Zellkern unterschiedlich positioniert sein können. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die intergenischen Abschnitte die differenzierte Positionierung der unterschiedlich exprimierten Genloci ermöglichen (Abb. 23).

Die Beobachtung, dass die Organisation einer subchromosomalen Region auf der Ebene einzelner Gene reguliert wird und höchst flexibel zu sein scheint, schien zunächst im Gegensatz zu früheren Daten unserer und anderer Arbeitsgruppen zu stehen. Dort wurde gezeigt, dass ganze Chromosomen beziehungsweise größere subchromosomale Regionen eine spezifische Kernlokalisation aufweisen (Ferreira *et al.*, 1997; Croft *et al.*, 1999; Sadoni *et al.*, 1999; Volpi *et al.*, 2000; Boyle *et al.*, 2001; Mahy *et al.*, 2002a, b; Williams *et al.*, 2002). Die Position und Struktur einer subchromosomalen Region beziehungsweise eines CTs, reflektiert jedoch eventuell nur die Summe der Kernlokalisationen der individuellen Gene und DNA-Sequenzen. Unter diesem Gesichtspunkt sind die hier ermittelten Ergebnisse kompatibel mit der Beobachtung, dass chromosomale Regionen mit einer hohen Gendichte und einer hohen transkriptionellen Aktivität weiter im Kerninneren positionieren, als Regionen mit geringerer Gendichte und Expressionsrate. (Ferreira *et al.*, 1997; Sadoni *et al.*, 1999; Boyle *et al.*, 2001).

Wichtige Erkenntnisse über den kausalen Zusammenhang zwischen der Kernpositionierung, der Assoziation mit bestimmten Chromatin-Fraktionen und der Genaktivität konnten durch die Experimente mit TSA erlangt werden. So führte die TSA-Behandlung von SH-EP N14 und HEK-293 Zellen zu einer Relokalisation des CFTR-Lokus aus dem perinukleären Heterochromatin in das hyperazetylierte und früh replizierende Euchromatin im Zellkerninneren (Abb. 25-27). Die Relokalisation des CFTR-Lokus führte jedoch nicht zu der Expression des Genlokus (siehe Anhang und Zink *et al.*, 2004; Englmann *et al.*, 2005). Es ist denkbar, dass die Positionierung in dem euchromatischen Kompartiment

eine wichtige Voraussetzung für die transkriptionelle Aktivität ist, die Expression jedoch von der Bereitstellung weiterer zellulärer Faktoren (z.B. Transkriptionsfaktoren) abhängig ist. Diese Vorstellung wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass der relativ intern lokalisierende GASZ-Lokus in unbehandelten Calu-3 Zellen keine transkriptionelle Aktivität aufwies (Anhang und Zink *et al.*, 2004). Da GASZ ein Keimzell-spezifisch exprimiertes Gen ist, sind vermutlich Keimzell-spezifische Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung dieses Gens notwendig. Daher kann sich GASZ eventuell eine „relaxierte“ Positionierung in somatischen Zellen „erlauben“, in denen entsprechende Transkriptionsfaktoren nicht vorkommen. Möglicherweise verhindert auch der DNA-Methylierungszustand der CFTR-Region eine „artifizielle“ transkriptionelle Aktivierung allein durch TSA. Auch in einer anderen Arbeit wurde beobachtet, dass die transkriptionelle Aktivierung eines transgenen Konstruktes nicht durch TSA ausgelöst werden kann (Ayyanathan *et al.*, 2003). Nur die zusätzliche Hemmung der DNA-Methylierung führte zu einer Aktivierung des Konstruktes. Es wäre wünschenswert, in künftigen Studien mehr über den detaillierten Methylierungs- und Azetylierungs-Zustand der CFTR-Region zu erfahren. Dies könnte durch eine CHIP-Analyse ermittelt werden, die in der vorliegenden Arbeit jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt wurde.

4.1.2. Das Replikationsverhalten von GASZ, CFTR und CORTBP2

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das Replikationsverhalten von GASZ, CFTR und CORTBP2 in verschiedenen Zelllinien ermittelt. Dabei wurde insbesondere auf die Zusammenhänge zwischen der Kernlokalisierung, der transkriptionellen Aktivität und dem Replikationsverhalten der untersuchten Gene eingegangen.

Um den Replikationszeitpunkt von GASZ, CFTR und CORTBP2 zu bestimmen, wurde das Auftreten von FISH-Dubletten mit einem definierten Replikationsmuster korreliert (Abb. 28). Die Bestimmung von Replikationszeitpunkten durch eine Singletten / Dubletten-Analyse ist eine seit längerem bewährte Methode (Selig *et al.*, 1992, Bickmore *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 1999, 2001). In einer neueren Studie wurde jedoch gezeigt, dass das späte Auftreten von Dubletten-Signalen während der S-Phase nicht notwendigerweise einen späten Replikationszeitpunkt anzeigt, sondern aus einer verlängerten Schwester-Chromatid Kohäsion bereits replizierter Loci resultieren kann (Azuara *et al.*, 2003). Dies wurde nicht bei allen untersuchten Loci beobachtet und trat nur bei einer Struktur-erhaltenden Fixierung mit Paraformaldehyd auf (Azuara *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Anwendung von sowohl denaturierenden, als auch Struktur-erhaltenden Fixierungsmethoden weitgehend ausgeschlossen, dass die ermittelten Replikationszeitpunkte durch eine verlängerte Schwester-Chromatid Kohäsion verfälscht wurden (Tabelle 4). In einer früheren Studie konnte außerdem durch den Vergleich verschiedener Methoden gezeigt werden, dass die Singletten / Dubletten-Analyse den Replikationszeitpunkt von CFTR korrekt anzeigt (Selig *et al.*, 1992).

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Bestimmung des Replikationsverhaltens von GASZ, CFTR und CORTBP2 haben gezeigt, dass diese Gene in exprimierenden Zelllinien deutlich früher replizieren als in nicht exprimierenden Zelllinien (Abb. 29). So replizierte der aktive CFTR-Lokus in Calu-3 Zellen bereits zu dem frühesten hier definierten Zeitpunkt in der S-Phase (Typ I Muster). In nicht exprimierenden Zelllinien (SH-EP N14 und HEK-293 Zellen) replizierte CFTR dagegen zu einem signifikant späteren Zeitpunkt. Diese Beobachtungen waren im Einklang mit den Ergebnissen einer früheren Studie über das Replikationsverhalten der CFTR-Region (Selig *et al.*, 1992). Selig *et al.* zeigten in ihrer Arbeit, dass eine Region von ca. 400 bis 700 kbp um den CFTR-Genlocus zu einem frühen Zeitpunkt in der S-Phase repliziert, wenn CFTR transkribiert wird. In einer nicht exprimierenden Zelllinie replizierte diese Region zu einem deutlich späteren Zeitpunkt. Die Ungenauigkeiten bezüglich der Bestimmung der exakten Größe der Replikations-Zeitzone in der Arbeit von Selig *et al.* erklären sich vermutlich durch das Fehlen von FISH-Sonden für die 3' Region von CFTR, in der sich CORTBP2 befindet. Auch das 5' Ende der Replikations-Zeitzone, in der sich das damals noch unbekannte Gen GASZ befindet (Yan *et al.*, 2002), konnte in der Arbeit von Selig *et al.* (1992) noch nicht exakt eingeordnet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die entsprechende Replikations-Zeitzone auf das CFTR-Gen beschränkt ist und die benachbarten Genloci ein eigenständiges Replikationsverhalten aufweisen (Abb. 29). So replizierte der transkriptionell aktive CFTR-Lokus in Calu-3 Zellen deutlich früher als der benachbarte inaktive GASZ-Lokus. In HEK-293 Zellen replizierte dagegen der dort inaktive CFTR-Lokus später als der 3'- gelegene, aktive CORTBP2-Lokus (Abb. 29). Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den Längen der Genloci und der verwendeten FISH-Sonden (Abb. 8) lässt den Schluss zu, dass eine Region von ca. 300 kbp, die den CFTR-Lokus beinhaltet, das Replikationsverhalten entsprechend der transkriptionellen Aktivität ändert. Diese Region ist geringfügig kleiner, als die minimale Größe der von Selig *et al.* (1992) vorgeschlagenen Region von 400 kbp. Diese Differenz resultiert daraus, dass diese frühere Studie den Bereich 100 kbp strangaufwärts von CFTR, der GASZ beinhaltet, in diese Region mit einbezieht. Die in der vorliegenden Arbeit

ermittelten Ergebnisse legen dagegen nahe, dass GASZ ein eigenständiges Replikationsverhalten aufweist. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass GASZ, CFTR und CORTBP2 ein differenziertes Replikationsverhalten aufweisen, das offenbar auf der Ebene der einzelnen Gene reguliert wird und mit der transkriptionellen Aktivität korreliert. Weiterhin gaben die Ergebnisse einen Hinweis auf die kausale Wechselwirkung zwischen Kernpositionierung, Transkription und Replikation. Ein Vergleich des verhältnismäßig frühen Replikationszeitpunktes des inaktiven GASZ-Lokus und dem vergleichsweise verzögerten Replikationszeitpunkt des aktiven CORTBP2-Lokus in Calu-3 Zellen mit den Anteilen an Kolokalisation mit dem perinukleären Heterochromatin beziehungsweise dem internen Euchromatin (Abb. 17 und 29), lässt den Schluss zu, dass weniger die transkriptionelle Aktivität *per se*, sondern vielmehr die Assoziation dieser Genloci mit definierten Chromatin-Fractionen einen maßgeblichen Einfluss auf das Replikationsverhalten ausübt.

Diese Vorstellung wird auch durch die Ergebnisse unterstützt, die aus der Behandlung mit TSA resultierten. Dort wurde gezeigt, dass der transkriptionell inaktive CFTR-Lokus sein Replikationsverhalten ändert, abhängig davon, ob der Genlocus mit hypoazetyliertem und spät replizierendem peripheren Heterochromatin oder mit hyperazetyliertem und früh replizierendem internen Euchromatin assoziiert ist (Abb. 25, 26, 27 und 30; CFTR bleibt auch nach TSA-Behandlung inaktiv). Da die TSA-Behandlung vermutlich zu einer Histon-Hyperazetylierung am CFTR-Lokus führte (Gilchrist *et al.*, 2004), stimmen diese Daten mit früheren Ergebnissen zum β -Globin Locus überein (Cimbora *et al.*, 2000; Schübeler *et al.*, 2000). Dort wurde gezeigt, dass eine generelle Histon-Hyperazetylierung des β -Globin-Lokus mit einer Dissoziation des Genlocus vom perizentrischen Heterochromatin und einem früheren Replikationszeitpunkt korreliert. Diese Vorgänge waren jedoch unabhängig von der transkriptionellen Aktivität des β -Globin-Lokus (Cimbora *et al.*, 2000; Schübeler *et al.*, 2000).

Insgesamt legen diese Daten die Vermutung nahe, dass die transkriptionelle Aktivität und das Replikationsverhalten nur indirekt miteinander zusammenhängen, möglicherweise über Histonmodifikationen und eine veränderte Kernlokalisierung. Die Untersuchungen des β -Globin-Lokus zeigten zwar, dass eine generelle Histon-Hyperazetylierung mit der Dissoziation von perizentrischem Heterochromatin korreliert, der kausale Zusammenhang war jedoch nicht klar (Schübeler *et al.*, 2000). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Relokalisation des CFTR-Lokus nach der TSA-Behandlung (Abb. 25-27) erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Dissoziation von heterochromatischen Kompartimenten durch Histon-Hyperazetylierung induziert wird.

4.1.3. Integration der Daten in ein Modell

Auf der Basis früherer Arbeiten und der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse wurde ein Modell entwickelt, das den Ablauf der einzelnen Schritte bei der Genaktivierung und die kausalen Zusammenhänge zwischen Histonmodifikationen, der Kernlokalisation, der transkriptionellen Aktivität und dem Replikationsverhalten von Zelltyp-spezifisch regulierten Genen darstellt (Abb. 39; Englmann *et al.*, 2005). Die nach TSA-Behandlung erzielten Ergebnisse (Abb. 25-27) unterstützen die Vorstellung, dass eine generelle Histon-Hyperazetylierung zu einer Relokalisation und Dissoziation eines Genlokus von heterochromatischen Bereichen führt (Abb. 39: blauer Pfeil oben). Wie die Ergebnisse dieser Arbeit (Abb. 29 und 30) und früherer Arbeiten (Cimbora *et al.*, 2000; Schübeler *et al.*, 2000) gezeigt haben, sind diese Vorgänge mit einem veränderten (früheren) Replikationszeitpunkt verbunden (Abb. 39: langer, roter Pfeil). Dies ist jedoch unabhängig von einer transkriptionellen Aktivierung, die normalerweise nach Etablierung der transkriptionellen Kompetenz erfolgt (Abb. 39: blauer und schwarzer Pfeil Mitte).

Wie frühere Daten unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, hat die Expression des CFTR-Lokus einen Einfluss auf dessen Kernlokalisation, auch wenn nach transkriptioneller Inhibition keine enge Assoziation mit der Kernperipherie beobachtet werden konnte (Zink *et al.*, 2004). Demzufolge könnte die transkriptionelle Aktivierung eines Lokus zu einer „Verfeinerung“ der Position im euchromatischen Kompartiment beitragen (Abb. 39: blauer Pfeil unten). Außerdem wurde gezeigt, dass die aktive Transkription eines Lokus mit weiteren Histonmodifikationen assoziiert ist (Schneider *et al.*, 2004; Schübeler *et al.*, 2000; Schübeler *et al.*, 2004) (Abb. 39: blauer Pfeil unten). Die Unterschiede in dem Replikationsverhalten von CFTR in Calu-3 Zellen (Abb. 29: CFTR transkriptionell aktiv) und in TSA behandelten HEK-293 und SH-EP N14 Zellen (Abb. 30: CFTR inaktiv; in allen Fällen assoziiert CFTR mit dem Euchromatin im Kerninneren) legen die Vermutung nahe, dass mit der transkriptionellen Aktivität verbundene Modifikationen möglicherweise auch das Replikationsverhalten beeinflussen (Abb. 39: kurzer roter Pfeil unten).

Das Modell (Abb. 39) wird auch durch folgende Beobachtungen unterstützt: Sowohl für CFTR in Calu-3 Zellen, als auch für CORTBP2 in HEK-293 Zellen wurde ein sehr früher Replikationszeitpunkt beobachtet (Abb. 29). In beiden Fällen war ein hoher Anteil an Loci bereits zu dem frühesten S-Phase Stadium (Typ I) repliziert und etwa 90 % der Genloci waren mit früh-replizierendem Euchromatin assoziiert (Abb. 17). Dennoch unterschieden sich die Expressionsniveaus der Gene deutlich (Zink *et al.*, 2004). Während CFTR in Calu-3 Zellen

hoch exprimiert wird, ist die transkriptionelle Aktivität von CORTBP2 in HEK-293 Zellen deutlich geringer (siehe Anhang und Zink *et al.*, 2004). Insgesamt legen diese Daten die Vermutung nahe, dass der frühe Replikationszeitpunkt in beiden Fällen vor allem durch den hohen Anteil an Kolo­kalisierung mit dem früh-replizierenden Euchromatin determiniert wird. Die Daten und das dargestellte Modell verdeutlichen, dass alle Prozesse, die mit einer Veränderung der Histonmodifikationen, der Chromatinstruktur und der Kernlokalisation verbunden sind, das Replikationsverhalten beeinflussen (Abb. 39: rote Pfeile).

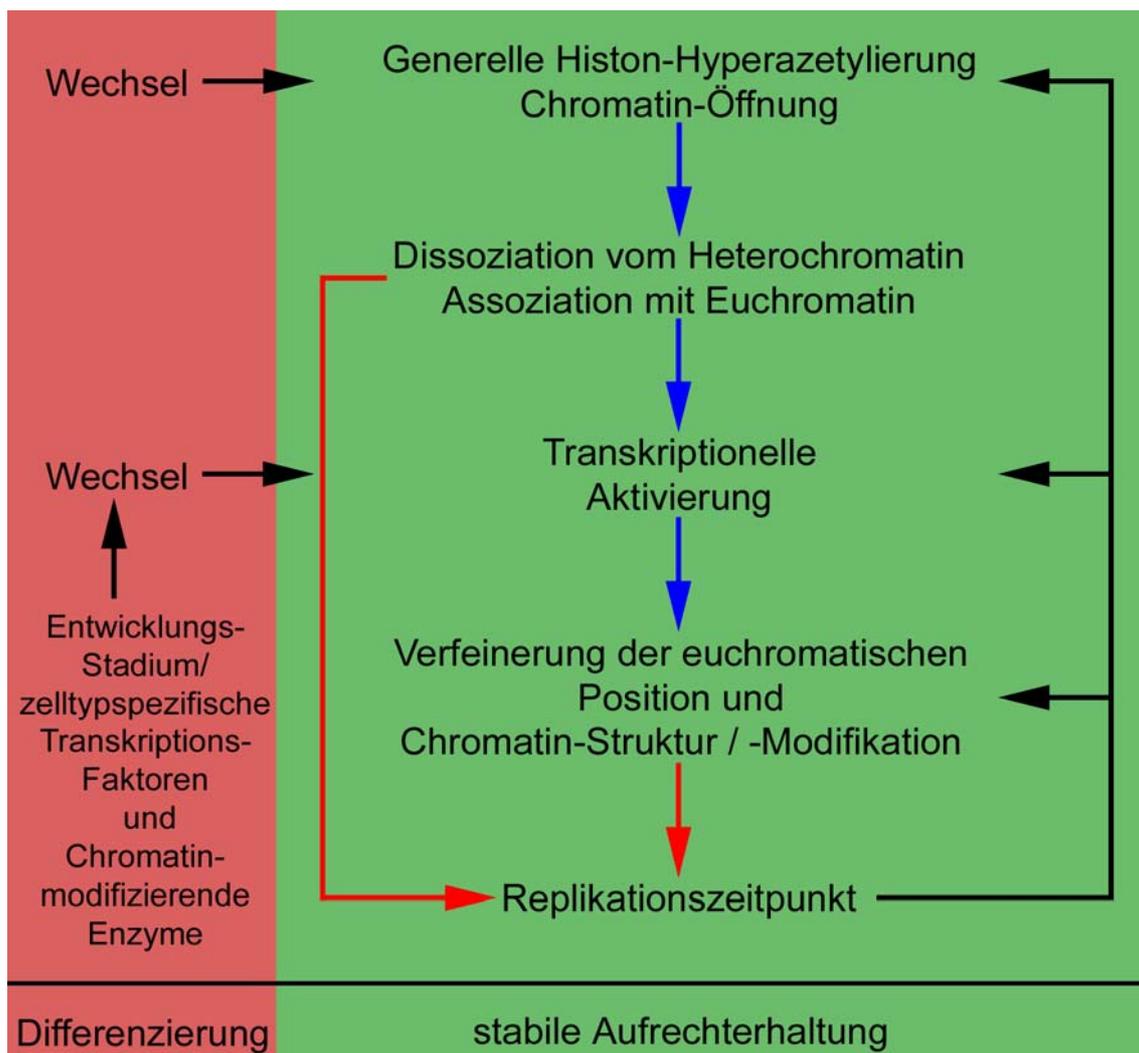


Abbildung 39: **Chromatinmodifikationen, Kernlokalisierung, Genaktivität und Replikationsverhalten.**

Das Modell stellt die Abfolge an Ereignissen dar, die mit der Expression eines Genlokus in Zusammenhang stehen (blaue Pfeile) und das Replikationsverhalten beeinflussen (rote Pfeile). Es wird postuliert, dass die transkriptionelle Aktivität und das Replikationsverhalten nur indirekt miteinander zusammenhängen und der Replikationszeitpunkt eines Lokus vorwiegend durch die Kernlokalisierung bestimmt wird (rote Pfeile). Der Zeitpunkt der Replikation reguliert möglicherweise wiederum die Zugänglichkeit des Lokus für Transkriptionsfaktoren und Chromatin-modifizierende Enzyme (schwarze Pfeile rechts). Auf diese Weise könnte eine „Feedback-Schleife“ etabliert werden, die den Aktivitätszustand des Genlokus stabilisiert (grüner Sektor). Im Zuge der zellulären Entwicklung beziehungsweise Signaltransduktion kann das gesamte System zwischen aktiv und früh replizierend beziehungsweise inaktiv und spät replizierend umgeschaltet werden (roter Sektor).

Die transkriptionelle Aktivität und das Replikationsverhalten interagieren dagegen nur indirekt miteinander. Bisher kann keine eindeutige Aussage gemacht werden, wodurch diese Prozesse das Replikationsverhalten beeinflussen. Neuere Daten geben einen Hinweis auf die Bedeutung der Kernlokalisation für das Replikationsverhalten subchromosomaler Regionen (Sadoni *et al.*, 2004). Dort wurde gezeigt, dass in Säugerzellen benachbarte subchromosomale Regionen (benachbart bezüglich der Lage im Zellkern, nicht der Lage auf dem Chromosom) sequentiell während der S-Phase aktiviert werden und replizieren. Somit sollte die Position subchromosomaler Regionen im Zellkern einen entscheidenden Einfluss auf den Zeitpunkt der Replikation ausüben.

Die in dem Modell dargestellten Zusammenhänge sollen keine strikte Hierarchie implizieren. So könnte das Replikationsverhalten eines Lokus dessen Verfügbarkeit für Transkriptionsfaktoren und Chromatin-Remodelling Enzyme beeinflussen (Gilbert, 2002; Zhang *et al.*, 2002b) und über die Etablierung einer „Feedback-Schleife“ zu einer stabilen und kontinuierlichen Weitergabe der Genaktivität beitragen (Abb. 39: schwarze Pfeile rechts). Dies könnte während und nach der zellulären Differenzierung für die Aufrechterhaltung eines etablierten Musters der Genexpression von Bedeutung sein (Abb. 39: grüner Sektor). Weiterhin geben experimentelle Befunde einen Hinweis darauf, dass die Komponenten des dargestellten Systems für verschiedene Genloci nicht von gleicher Bedeutung sind. So korrelieren zum Beispiel die Kernlokalisation und Assoziation mit perizentrischem Heterochromatin mit der Repression des β -Globin Lokus (welcher inaktiv zu einem späteren Zeitpunkt repliziert). Im Gegensatz dazu scheint der α -Globin Lokus seine Position im Zellkern nicht im Zusammenhang mit der transkriptionellen Aktivität zu ändern und stets früh zu replizieren (Brown *et al.*, 2001; Cimborra *et al.*, 2000; Schübeler *et al.*, 2000; Smith and Higgs, 1999).

Bei Genen, die im Zuge der zellulären Differenzierung ihr Replikationsverhalten ändern und sich entsprechend des in Abbildung 39 dargestellten Modells verhalten, könnte die Genaktivität durch Änderungen in den Expressionsniveaus von Transkriptionsfaktoren verändert werden (Abb. 39: roter Sektor). Dies hätte wiederum Veränderungen der Histonmodifikationen und der Chromatinstruktur zur Folge, welche durch die Transkriptionsfaktor-vermittelte Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden Enzymen und Chromatin-remodelling Faktoren verursacht werden (Grant *et al.*, 1998; Lehrmann *et al.*, 2002; Utley *et al.*, 1998).

4.2. Die Interaktion zwischen der Zellkernlamina und dem CFTR-Lokus

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Zellkernlamina für die Kernlokalisierung des CFTR-Lokus analysiert. Es hatte sich in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt, dass der inaktive CFTR-Lokus eng mit der Kernperipherie assoziiert ist und die Assoziation mit dem perinukleären Heterochromatin vermutlich eine funktionelle Bedeutung für die Regulation der transkriptionellen Aktivität der CFTR-Region besitzt. Es stellte sich die Frage, ob die Zellkernlamina an der Kernlokalisierung des CFTR-Lokus funktionell beteiligt ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zwei Strategien verfolgt: Zum einen wurde die Expression von wichtigen Komponenten der Zellkernlamina, von denen bekannt war, dass sie mit peripherem Chromatin interagieren, durch RNA-Interferenz (RNAi) reduziert. Zum zweiten wurden primäre Fibroblasten von Patienten mit dem Hutchinson-Gilford Progeria-Syndrom (HGPS) untersucht (Eriksson *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2004).

4.2.1. Die gezielte Manipulation von Komponenten der Zellkernlamina

Aus früheren Studien war bereits bekannt, dass Lamine und Lamina-assoziierte LEM-Domänen Proteine an der Bindung und Stabilisierung peripheren Chromatins beteiligt sind (Furukawa, 1999; Goldman *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003; Nikolova *et al.*, 2004; Segura-Totten and Wilson, 2004; Sullivan *et al.*, 1999; Taniura *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob durch eine gezielte „Hinunterregulierung“ von Komponenten der Zellkernlamina die Kernlokalisierung eines einzelnen Genlokus messbar beeinflusst werden kann. Dazu wurden HeLa S6 Zellen mit Lamin A/C-, Lap2 β - und Emerin-siRNAs transfiziert (Abb. 31). Nach dem erfolgreichen Knockdown dieser Proteine (Abb. 32) wurde die Kernlokalisierung von CFTR durch Erosionsanalysen und Abstandsmessungen ermittelt.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass nach Transfektion mit Lamin A/C-, Lap2 β - und Emerin-siRNAs der CFTR-Lokus signifikant weiter im Kerninneren lokalisierte (Abb. 34, Tabelle 5). Nach der Transfektion mit Lamin A/C- und Lap2 β -siRNAs konnte diesbezüglich ein ähnlicher Effekt beobachtet werden. Die Transfektion mit Emerin-siRNAs führte jedoch zu einer etwas weniger ausgeprägten Delokalisation des CFTR-Lokus in das Zellkerninnere (Abb. 34 A). In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass eine Mutation in Emerin (X-linked EMDM) die Positionierung von Chromosomen in menschlichen Zellen nicht beeinflusst (Boyle *et al.*, 2001). Möglicherweise hat Emerin eine größere Bedeutung für die mechanische Stabilität des Zellkerns und weniger für die Positionierung peripheren Chromatins. Das wird

auch dadurch nahe gelegt, dass Emerin sowohl nukleäres Aktin als auch Nesprin-1 α bindet und somit besonders für die Stabilität des Zellkerns und die Interaktion mit dem Zytoskelett von Bedeutung sein könnte (Bengtsson and Wilson, 2004; Mislow *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). Ein weiterer, indirekter Hinweis für die Beteiligung der Zellkernlamina an der Positionierung der CFTR-Region an der Kernperipherie ist die Beobachtung, dass die zwischen den Genloci gemessenen Abstände in Calu-3 Zellen am größten waren (Abb. 23). In dieser Zelllinie lokalisierte die gesamte CFTR-Region am weitesten im Kerninneren (Abb. 12 und 14). Auch in einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass chromosomale Regionen im Nukleoplasma eine größere räumliche Flexibilität aufweisen, als Regionen, die eng mit der Kernperipherie assoziiert sind (Chubb *et al.*, 2002). Die verminderte Beweglichkeit bestimmter Chromatin-Bereiche wurde schon früher auf die Interaktion von Chromatin mit nukleären Kompartimenten, wie der Matrix oder der Lamina, zurückgeführt (Abney *et al.*, 1997).

Auch wenn die sehr komplexen Interaktionen zwischen Laminen, LEM-Domänen-Proteinen und Chromatin bei weitem noch nicht voll verstanden sind (Gruenbaum *et al.*, 2005), geben die Ergebnisse dieser Arbeit dennoch einen Hinweis darauf, dass selbst die Störung einzelner Komponenten dieses Systems einen großen Einfluss auf die Positionierung eines peripher lokalisierenden Genlokus ausüben kann. Ob der CFTR-Lokus dabei repräsentativ für andere Genloci ist, müsste durch eine vergleichende Analyse ermittelt werden. Ebenso müsste durch weitere Experimente untersucht werden, ob die beobachtete Delokalisation des CFTR-Lokus einen Einfluss auf die Genexpression von CFTR hat. Die Versuche mit TSA haben gezeigt, dass eine Relokalisation nicht unbedingt mit einer transkriptionellen Induktion verbunden ist (Abb. 26 und 27; Englmann *et al.*, 2005). Da Lamine und Lamina-assoziierte Proteine jedoch auch mit transkriptionellen Repressoren interagieren (Holaska *et al.*, 2003; Mancini *et al.*, 1994; Markiewicz *et al.*, 2002; Nili *et al.*, 2001; Ozaki *et al.*, 1994), könnten diese Interaktionen an der Kernlamina möglicherweise eine Rolle bei der stabilen Repression von CFTR spielen.

4.2.2. Rückschlüsse aus der Untersuchung von HGPS-Zellen

Die Untersuchungen zur Morphologie und dem Wachstumsverhalten der HGPS-Zellen haben gezeigt, dass die Eigenschaften der verwendeten Zellen den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von HGPS-Zellen entsprachen (Abb. 35; Eriksson *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2004). Weiterhin wurde festgestellt, dass sich die morphologisch sehr auffälligen (Klasse III) Zellkerne zunehmend in älteren Passagen zyklisierender HGPS-Zellen anreicherten (Abb. 35).

Kürzlich wurde gezeigt, dass für die Ausprägung des Phänotyps von HGPS-Zellen vermutlich die Akkumulation von mutiertem, „unreifem“ Lamin A $\Delta 50$ verantwortlich ist (Goldman *et al.*, 2004). Möglicherweise beeinträchtigt Lamin A $\Delta 50$ die Reorganisation und Polymerisation des Lamin-Netzwerks nach der mitotischen Teilung und führt daher besonders in zyklisierenden Zellen zu den beobachteten morphologischen Veränderungen.

Die Bestimmung der Kernlokalisierung des CFTR-Lokus in HGPS-Zellen konnte auf Grund der sehr unregelmäßigen Morphologie (Abb. 35 B und 37) nicht durch eine Erosionsanalyse vorgenommen werden. Daher wurde die Position des Genlokus durch eine Messung des Abstandes zwischen der Zellkernlamina (hier detektiert durch eine Emerin-Färbung) und dem CFTR-Lokus ermittelt (Tabelle 6). Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Abstände zu der Kernperipherie in HGPS-Zellen, gegenüber den in den Fibroblasten eines gesunden Probanden gemessenen Abständen, um mehr als das zweifache vergrößert waren (Tabelle 6). Interessanterweise ähnelten die Effekte die bei HGPS-Zellen beobachtet wurden, der Delokalisation des CFTR-Lokus nach der Transfektion mit Lamin A/C-siRNAs (Tabelle 5). Dennoch ist der Verlust von Lamin A/C (durch RNAi) nur bedingt mit der Anhäufung des mutierten Lamin A $\Delta 50$ (in HGPS-Zellen) vergleichbar. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Phänotyp von HGPS-Zellen nicht durch eine Überexpression von „normalem“ Lamin A, sondern nur durch eine Maskierung der mutierten Spleißing-Stelle von LMNA $\Delta 50$ durch Transfektion mit Oligonukleotiden rückgängig gemacht werden kann (Scaffidi *et al.*, 2005).

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der CFTR-Lokus in HGPS-Zellen vermehrt in dem hyperazetylierten Euchromatin im Zellkerninneren lokalisierte (Tabelle 7). Es ist vorstellbar, dass diese veränderte Kernlokalisierung, zusammen mit dem bei HGPS-Zellen beobachteten Verlust der heterochromatischen Marker HP1 α und H3MeK9 an der Kernperipherie (Jenuwein and Allis, 2001; Scaffidi and Misteli, 2005; Ye *et al.*, 1997) durchaus zu einer gestörten Genregulation der betroffenen Genloci beitragen könnte.

In vielen Arbeiten wurde bereits spekuliert, dass neben einer strukturellen, mechanischen Komponente, auch eine Veränderung des Genrepressionsmusters an der Ausprägung der Hutchinson-Gilford Progerie beteiligt ist (Gruenbaum *et al.*, 2005; Muchir and Worman, 2004; Zastrow *et al.*, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse bezüglich der Kernlokalisierung von CFTR, die mit einer Änderung des Transkriptionsverhaltens einhergehen könnten, unterstützen diese Vermutung. Es wäre in diesem Zusammenhang sehr interessant zu erfahren, ob sich die Expression von CFTR in den untersuchten HGPS-Zellen von der Expression in normalen Fibroblasten unterscheidet.

Insgesamt konnten aus den Untersuchungen von HGPS-Zellen wertvolle Informationen über den Aspekt der gestörten Gen-Positionierung in diesen Zellen gesammelt werden. Dennoch sollten diese Daten durch weitere Experimente ergänzt werden, die im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt wurden.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die komplexen Zusammenhänge zwischen der Kernlokalisierung, der transkriptionellen Aktivität und dem Replikationsverhalten von Zelltypspezifisch regulierten Genen in menschlichen Zellen besser zu verstehen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Kernlokalisierung der drei benachbarten, jedoch funktionell unabhängigen Gene GASZ, CFTR und CORTBP2 der humanen CFTR-Region auf Chromosom 7q31 ermittelt und mit dem Expressionsverhalten verglichen. Durch eine 2D-Erosionsanalyse wurde die radiale Positionierung dieser Gene in einer Reihe von Zelllinien und primären Zelltypen untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass transkriptionell aktive Gene der CFTR-Region bevorzugt im Zellkerninneren lokalisiert, nicht exprimierte Gene waren dagegen eng mit der Kernperipherie assoziiert. Die benachbarten Genloci wiesen dabei eine voneinander weitgehend unabhängige Lokalisation auf. Unter Verwendung hoch auflösender konfokaler Mikroskopie und dreidimensionaler Bildrekonstruktion konnte diese Korrelation durch eine 3D-Erosionsanalyse im Wesentlichen bestätigt werden.

Um zu ermitteln, ob die unterschiedlich positionierten Genloci mit verschiedenen Chromatinfraktionen assoziiert sind, wurde eine Kollokalisationsanalyse vorgenommen. Die Daten haben gezeigt, dass inaktive Genloci der CFTR-Region zu einem hohen Anteil mit dem perinukleären Heterochromatin assoziiert sind, aktive Genloci lokalisierten dagegen bevorzugt in dem hyperazetylierten Euchromatin im Kerninneren. Mehrfarben-FISH Experimente haben gezeigt, dass die eng benachbarten Genloci entsprechend ihrer transkriptionellen Aktivität simultan mit unterschiedlichen Bereichen im Zellkern assoziiert sein können und vermutlich die intergenischen Bereiche zwischen den Genen als flexible Linker dienen. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen im Gegensatz zu früheren Studien (Sadoni *et al.*, 1999; Volpi *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2002; Mahy *et al.*, 2002) die Vermutung nahe, dass die Positionierung subchromosomaler Regionen auf der Ebene einzelner Gene reguliert wird. Durch die Behandlung der Zellen mit TSA wurde außerdem gezeigt, dass eine erhöhte Histonazetylierung zu der Dissoziation eines inaktiven Genlokus von heterochromatischen Bereichen führt, die transkriptionelle Aktivität davon jedoch nicht beeinflusst wird.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, welcher funktionelle Zusammenhang zwischen dem Replikationsverhalten von GASZ, CFTR und CORTBP2 und der transkriptionellen Aktivität und Kernlokalisierung dieser Gene besteht. Die Bestimmung der Replikationszeitpunkte wurde durch die Untersuchung des Auftretens von FISH-Dubletten während definierter S-Phase Stadien vorgenommen. Da bei dieser Analyse die Möglichkeit

besteht, den Anteil an Dubletten durch eine verlängerte Schwester-Chromatid Kohäsion zu unterschätzen (Azuara *et al.*, 2003), wurden die ermittelten Zeitpunkte darüber hinaus durch verschiedene Fixierungsmethoden überprüft. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass transkriptionell aktive Genloci, die in dem hyperazetylierten Euchromatin lokalisierten, zu einem früheren Zeitpunkt replizierten als nicht exprimierte Genloci, die eng mit dem perinukleären Heterochromatin assoziiert waren. Durch eine TSA-Behandlung der Zellen wurde nachgewiesen, dass vor allem die Assoziation mit definierten Chromatin-Fraktionen einen Einfluss auf das Replikationsverhalten ausübt, die transkriptionelle Aktivität und das Replikationsverhalten jedoch nur indirekt miteinander in Zusammenhang stehen. Auf der Basis dieser Daten und früherer Studien wurde ein Modell erstellt, das die epigenetischen Mechanismen zueinander in Beziehung setzt, die an der Aktivierung Zelltyp-spezifisch regulierter Gene beteiligt sind.

Der letzte Teil dieser Arbeit war der Frage gewidmet, ob Komponenten der Zellkernlamina an der perinukleären Positionierung des reprimierten CFTR-Lokus beteiligt sind. Dazu wurden HeLa S6 Zellen mit Lamin A/C-, Lap2 β - oder Emerin-siRNAs transfiziert. Nach erfolgreichem Knockdown wurde die Kernlokalisierung des CFTR-Lokus durch Erosionsanalysen und Abstandsmessungen zu der Kernperipherie ermittelt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass nach dem Knockdown von Lamin A/C, Lap2 β oder Emerin der CFTR-Lokus signifikant weiter im Kerninneren lokalisierte. Dabei schienen Lamin A/C und Lap2 β einen stärkeren Einfluss auf die Lokalisation von CFTR auszuüben als Emerin. Auch wenn in früheren Arbeiten bereits gezeigt wurde, dass die Kernlamina für die Positionierung peripheren Chromatins von Bedeutung ist (Sullivan *et al.*, 1999; Goldman *et al.*, 2004; Zastrow *et al.*, 2004), konnte hier zum ersten Mal ein direkter Einfluss auf die Lokalisation eines einzelnen Genlokus demonstriert werden. In einem ergänzenden Ansatz wurde die Kernlokalisierung von CFTR in Fibroblasten von HGPS-Patienten untersucht, die auf Grund der Akkumulation von mutiertem Lamin A/C Deformationen der Zellkernlamina und Zellzyklus-Defekte aufwiesen (Eriksson *et al.*, 2003; Goldman *et al.*, 2004). Durch Abstandsmessungen zu der Kernperipherie und durch Koloalisationsanalysen wurde gezeigt, dass der CFTR-Lokus in HGPS-Zellen einen größeren Abstand zur Kernperipherie aufwies und häufiger im hyperazetylierten Euchromatin lokalisierte als in Fibroblasten eines gesunden Probanden. Insgesamt unterstützen diese Daten die Vermutung, dass die Misslokalisierung von reprimierten Genen in ein verändertes Chromatin-Umfeld an dem Krankheitsbild dieser und anderer Laminopathien beteiligt sein könnte.

6. Literaturverzeichnis

- Abney, J.R., B. Cutler, M.L. Fillbach, D. Axelrod, and B.A. Scalettar. 1997. Chromatin dynamics in interphase nuclei and its implications for nuclear structure. *J Cell Biol.* 137:1459-68.
- Aebi, U., J. Cohn, L. Buhle, and L. Gerace. 1986. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature.* 323:560-4.
- Alberts, B., Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell.*
- Allison, D.C., and A.L. Nestor. 1999. Evidence for a relatively random array of human chromosomes on the mitotic ring. *J Cell Biol.* 145:1-14.
- Alt, F. 2002. Die Zellkernlokalisierung von endogenen und transgenen "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator" Gensequenzen. *In Department Biology II. LMU Munich, Munich.* 1-87.
- Amaral, M.D., L.A. Clarke, A.S. Ramalho, S. Beck, F. Broackes-Carter, R. Rowntree, N. Mouchel, S.H. Williams, A. Harris, M. Tzetis, B. Steiner, J. Sanz, S. Gallati, M. Nissim-Rafinifa, B. Kerem, T. Hefferon, G.R. Cutting, E. Goina, and F. Pagani. 2004. Quantitative methods for the analysis of CFTR transcripts/splicing variants. *J Cyst Fibros.* 3 Suppl 2:17-23.
- Anderson, K.V., and C. Nusslein-Volhard. 1984. Information for the dorsal--ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA. *Nature.* 311:223-7.
- Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J. Smith, R. Staden, and I.G. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290:457-65.
- Andrulis, E.D., A.M. Neiman, D.C. Zappulla, and R. Sternglanz. 1998. Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature.* 394:592-5.
- Arney, K.L., and A.G. Fisher. 2004. Epigenetic aspects of differentiation. *J Cell Sci.* 117:4355-63.
- Avery, O.T., C.M. MacLeod, and M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. exp. Med.* 79:137-158.
- Avner, P., and E. Heard. 2001. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet.* 2:59-67.
- Ayyanathan, K., M.S. Lechner, P. Bell, G.G. Maul, D.C. Schultz, Y. Yamada, K. Tanaka, K. Torigoe, and F.J. Rauscher, 3rd. 2003. Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev.* 17:1855-69.
- Azuaa, V., K.E. Brown, R.R. Williams, N. Webb, N. Dillon, R. Festenstein, V. Buckle, M. Merkenschlager, and A.G. Fisher. 2003. Heritable gene silencing in lymphocytes delays chromatid resolution without affecting the timing of DNA replication. *Nat Cell Biol.* 5:668-74.
- Badame, A.J. 1989. Progeria. *Arch Dermatol.* 125:540-4.
- Bannister, A.J., P. Zegerman, J.F. Partridge, E.A. Miska, J.O. Thomas, R.C. Allshire, and T. Kouzarides. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature.* 410:120-4.
- Barnes, W.M. 1994. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:2216-20.
- Belmont, A.S., M.B. Braunfeld, J.W. Sedat, and D.A. Agard. 1989. Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro. *Chromosoma.* 98:129-43.

- Belmont, A.S., and A.F. Straight. 1998. In vivo visualization of chromosomes using lac operator-repressor binding. *Trends Cell Biol.* 8:121-4.
- Belyaev, N.D., A.M. Keohane, and B.M. Turner. 1996. Histone H4 acetylation and replication timing in Chinese hamster chromosomes. *Exp Cell Res.* 225:277-85.
- Bengtsson, L., and K.L. Wilson. 2004. Multiple and surprising new functions for emerin, a nuclear membrane protein. *Curr Opin Cell Biol.* 16:73-9.
- Berezney, R., D.D. Dubey, and J.A. Huberman. 2000. Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma.* 108:471-84.
- Berezney, R., H. Ma, C. Meng, J. Samarabandu, and P.-C. Cheng. 1995. Connecting Genomic Architecture and DNA Replication in Three Dimensions. *Zool. Stud.* 34:29-32.
- Biamonti, G., M. Giacca, G. Perini, G. Contreas, L. Zentilin, F. Weighardt, M. Guerra, G. Della Valle, S. Saccone, S. Riva, and *et al.* 1992. The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol.* 12:3499-506.
- Bickmore, W.A., and A.D. Carothers. 1995. Factors affecting the timing and imprinting of replication on a mammalian chromosome. *J Cell Sci.* 108 (Pt 8):2801-9.
- Bickmore, W.A., and A.T. Sumner. 1989. Mammalian chromosome banding--an expression of genome organization. *Trends Genet.* 5:144-8.
- Bione, S., E. Maestrini, S. Rivella, M. Mancini, S. Regis, G. Romeo, and D. Toniolo. 1994. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 8:323-7.
- Bolzer, A., G. Kreth, I. Solovei, D. Koehler, K. Saracoglu, C. Fauth, S. Muller, R. Eils, C. Cremer, M.R. Speicher, and T. Cremer. 2005. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol.* 3:e157.
- Boumil, R.M., and J.T. Lee. 2001. Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet.* 10:2225-32.
- Boveri, T. 1909. Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch. Zellforschung.* 3:181.
- Boyle, S., S. Gilchrist, J.M. Bridger, N.L. Mahy, J.A. Ellis, and W.A. Bickmore. 2001. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet.* 10:211-9.
- Brenner, S. 1961. RNA, ribosomes, and protein synthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 26:101-10.
- Briggs, S.D., M. Bryk, B.D. Strahl, W.L. Cheung, J.K. Davie, S.Y. Dent, F. Winston, and C.D. Allis. 2001. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 15:3286-95.
- Brookfield, J.F. 1994. The human Alu SINE sequences--is there a role for selection in their evolution? *Bioessays.* 16:793-5.
- Brown, K.E., S. Amoils, J.M. Horn, V.J. Buckle, D.R. Higgs, M. Merckenschlager, and A.G. Fisher. 2001. Expression of alpha- and beta-globin genes occurs within different nuclear domains in haemopoietic cells. *Nat Cell Biol.* 3:602-6.
- Brown, K.E., J. Baxter, D. Graf, M. Merckenschlager, and A.G. Fisher. 1999. Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell.* 3:207-17.
- Brown, K.E., S.S. Guest, S.T. Smale, K. Hahm, M. Merckenschlager, and A.G. Fisher. 1997. Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell.* 91:845-54.
- Burke, B., and C.L. Stewart. 2002. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:575-85.

- Camargo, M., and J. Cervenka. 1982. Patterns of DNA replication of human chromosomes. II. Replication map and replication model. *Am J Hum Genet.* 34:757-80.
- Chambeyron, S., and W.A. Bickmore. 2004. Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes Dev.* 18:1119-30.
- Chambeyron, S., N.R. Da Silva, K.A. Lawson, and W.A. Bickmore. 2005. Nuclear reorganisation of the Hoxb complex during mouse embryonic development. *Development.* 132:2215-2223.
- Chandley, A.C., R.M. Speed, and A.R. Leitch. 1996. Different distributions of homologous chromosomes in adult human Sertoli cells and in lymphocytes signify nuclear differentiation. *J Cell Sci.* 109:773-6.
- Cheng, S., C. Fockler, W.M. Barnes, and R. Higuchi. 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:5695-9.
- Cheung, J., E. Petek, K. Nakabayashi, L.C. Tsui, J.B. Vincent, and S.W. Scherer. 2001. Identification of the human cortactin-binding protein-2 gene from the autism candidate region at 7q31. *Genomics.* 78:7-11.
- Cheung, P., K.G. Tanner, W.L. Cheung, P. Sassone-Corsi, J.M. Denu, and C.D. Allis. 2000a. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell.* 5:905-15.
- Cheung, W.L., S.D. Briggs, and C.D. Allis. 2000b. Acetylation and chromosomal functions. *Curr Opin Cell Biol.* 12:326-33.
- Cheutin, T., A.J. McNairn, T. Jenuwein, D.M. Gilbert, P.B. Singh, and T. Misteli. 2003. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science.* 299:721-5.
- Chubb, J.R., S. Boyle, P. Perry, and W.A. Bickmore. 2002. Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Curr. Biol.* 12:439-45.
- Cimbora, D.M., D. Schübeler, A. Reik, J. Hamilton, C. Francastel, E.M. Epner, and M. Groudine. 2000. Long-distance control of origin choice and replication timing in the human beta-globin locus are independent of the locus control region. *Mol Cell Biol.* 20:5581-91.
- Cobb, B.S., S. Morales-Alcelay, G. Kleiger, K.E. Brown, A.G. Fisher, and S.T. Smale. 2000. Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. *Genes Dev.* 14:2146-60.
- Cockell, M., and S.M. Gasser. 1999. Nuclear compartments and gene regulation. *Current Opinion in Genetics & Development.* 9:199-205.
- Cohen, M., K.K. Lee, K.L. Wilson, and Y. Gruenbaum. 2001. Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends Biochem Sci.* 26:41-7.
- Correns, C. 1900. G. Mendel's Regel über das Verhalten der Nachkommenschaft der Rassenbastarde. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft.* 18:158-168.
- Craig, J.M., and W.A. Bickmore. 1993. Chromosome bands--flavours to savour. *Bioessays.* 15:349-54.
- Craig, J.M., and W.A. Bickmore. 1994. The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nat Genet.* 7:376-82.
- Cremer, M., J. von Hase, T. Volm, A. Brero, G. Kreth, J. Walter, C. Fischer, I. Solovei, C. Cremer, and T. Cremer. 2001. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res.* 9:541-67.
- Cremer, T., and C. Cremer. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* 2:292-301.

- Cremer, T., C. Cremer, H. Baumann, E.K. Luedtke, K. Sperling, V. Teuber, and C. Zorn. 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., A. Kurz, R. Zirbel, S. Dietzel, B. Rinke, E. Schrock, M.R. Speicher, U. Mathieu, A. Jauch, P. Emmerich, and *et al.* 1993. Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 58:777-92.
- Cremer, T., P. Lichter, J. Borden, D.C. Ward, and L. Manuelidis. 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.
- Cremer, T., S. Dietzel, R. Eils, P. Lichter, and C. Cremer. 1995. Chromosome territories, nuclear matrix filaments and interchromatin channels: a topological view on nuclear architecture and function. *Royal Botanic Gardens, Kew.*:63-81 pp.
- Croft, J.A., J.M. Bridger, S. Boyle, P. Perry, P. Teague, and W.A. Bickmore. 1999. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* 145:1119-1131.
- Csank, A.K., and S. Henikoff. 1996. Genetic modification of heterochromatic association and nuclear organization in *Drosophila*. *Nature.* 381:529-31.
- Csoka, A.B., S.B. English, C.P. Simkevich, D.G. Ginzinger, A.J. Butte, G.P. Schatten, F.G. Rothman, and J.M. Sedivy. 2004. Genome-scale expression profiling of Hutchinson-Gilford progeria syndrome reveals widespread transcriptional misregulation leading to mesodermal/mesenchymal defects and accelerated atherosclerosis. *Aging Cell.* 3:235-43.
- Dechat, T., S. Vlcek, and R. Foisner. 2000. Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol.* 129:335-45.
- Dillon, N., and R. Festenstein. 2002. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet.* 18:252-8.
- Dimitrova, D.S., and D.M. Gilbert. 1999. The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase. *Mol Cell.* 4:983-93.
- Dutrillaux, B., J. Couturier, C.-L. Richer, and E. Viegas-Pequinot. 1976. Sequence of DNA replication in 277 R- and Q-bands of human chromosomes using a BrdU treatment. *Chromosoma.* 58:51-61.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411:494-8.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, K. Weber, and T. Tuschl. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods.* 26:199-213.
- Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001b. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15:188-200.
- Engelhardt, J.F., S.S. Smith, E. Allen, J.R. Yankaskas, D.C. Dawson, and J.M. Wilson. 1994. Coupled secretion of chloride and mucus in skin of *Xenopus laevis*: possible role for CFTR. *Am J Physiol.* 267:C491-500.
- Englmann, A., L.A. Clarke, S. Christan, M.D. Amaral, D. Schindelbauer, and D. Zink. 2005. The replication timing of CFTR and adjacent genes. *Chromosome Res.* 13:183-94.
- Eriksson, M., W.T. Brown, L.B. Gordon, M.W. Glynn, J. Singer, L. Scott, M.R. Erdos, C.M. Robbins, T.Y. Moses, P. Berglund, A. Dutra, E. Pak, S. Durkin, A.B. Csoka, M. Boehnke, T.W. Glover, and F.S. Collins. 2003. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature.* 423:293-8.

- Ermakova, O.V., L.H. Nguyen, R.D. Little, C. Chevillard, R. Riblet, N. Ashouian, B.K. Birshstein, and C.L. Schildkraut. 1999. Evidence that a single replication fork proceeds from early to late replicating domains in the IgH locus in a non-B cell line. *Mol Cell.* 3:321-30.
- Felsenfeld, G., and M. Groudine. 2003. Controlling the double helix. *Nature.* 421:448-53.
- Ferreira, J., G. Paolella, C. Ramos, and A.I. Lamond. 1997. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J Cell Biol.* 139:1597-1610.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391:806-11.
- Fischle, W., Y. Wang, and C.D. Allis. 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol.* 15:172-83.
- Fisher, D.Z., N. Chaudhary, and G. Blobel. 1986. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:6450-4.
- Fogh, J., J.M. Fogh, and T. Orfeo. 1977a. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 59:221-6.
- Fogh, J., W.C. Wright, and J.D. Loveless. 1977b. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst.* 58:209-14.
- Foisner, R., and L. Gerace. 1993. Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell.* 73:1267-79.
- Furukawa, K. 1999. LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J Cell Sci.* 112 (Pt 15):2485-92.
- Furukawa, K., and Y. Hotta. 1993. cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *Embo J.* 12:97-106.
- Furukawa, K., H. Inagaki, and Y. Hotta. 1994. Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Exp Cell Res.* 212:426-30.
- Furumai, R., Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, M. Yoshida, and S. Horinouchi. 2001. Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:87-92.
- Gilbert, D.M. 1986. Temporal order of replication of *Xenopus laevis* 5S ribosomal RNA genes in somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:2924-8.
- Gilbert, D.M. 2001. Nuclear position leaves its mark on replication timing. *J Cell Biol.* 152:F11-5.
- Gilbert, D.M. 2002. Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Curr Opin Cell Biol.* 14:377-83.
- Gilbert, N., S. Boyle, H. Fiegler, K. Woodfine, N.P. Carter, and W.A. Bickmore. 2004. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell.* 118:555-66.
- Gilchrist, S., N. Gilbert, P. Perry, and W.A. Bickmore. 2004. Nuclear organization of centromeric domains is not perturbed by inhibition of histone deacetylases. *Chromosome Res.* 12:505-16.
- Goldman, A.E., R.D. Moir, M. Montag-Lowy, M. Stewart, and R.D. Goldman. 1992. Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *J Cell Biol.* 119:725-35.
- Goldman, M.A., G.P. Holmquist, M.C. Gray, L.A. Caston, and A. Nag. 1984. Replication timing of genes and middle repetitive sequences. *Science.* 224:686-92.

- Goldman, R.D., Y. Gruenbaum, R.D. Moir, D.K. Shumaker, and T.P. Spann. 2002. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* 16:533-47.
- Goldman, R.D., D.K. Shumaker, M.R. Erdos, M. Eriksson, A.E. Goldman, L.B. Gordon, Y. Gruenbaum, S. Khuon, M. Mendez, R. Varga, and F.S. Collins. 2004. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8963-8.
- Goren, A., and H. Cedar. 2003. Replicating by the clock. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:25-32.
- Goshima, G., and R.D. Vale. 2003. The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the Drosophila S2 cell line. *J Cell Biol.* 162:1003-16.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36:59-74.
- Grant, P.A., S.L. Berger, and J.L. Workman. 1999a. Identification and analysis of native nucleosomal histone acetyltransferase complexes. *Methods Mol Biol.* 119:311-7.
- Grant, P.A., A. Eberharter, S. John, R.G. Cook, B.M. Turner, and J.L. Workman. 1999b. Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem.* 274:5895-900.
- Grant, P.A., D.E. Sterner, L.J. Duggan, J.L. Workman, and S.L. Berger. 1998. The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin-modifying complexes. *Trends Cell Biol.* 8:193-7.
- Gratzner, H.G. 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 218:474-5.
- Gray, K.M., J.W. White, C. Costanzi, D. Gillespie, W.T. Schroeder, B. Calabretta, and G.F. Saunders. 1985. Recent amplification of an alpha satellite DNA in humans. *Nucleic Acids Res.* 13:521-35.
- Gruenbaum, Y., A. Margalit, R.D. Goldman, D.K. Shumaker, and K.L. Wilson. 2005. The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:21-31.
- Haaf, T., and M. Schmid. 1991. Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. *Exp Cell Res.* 192:325-32.
- Hall, L.L., M. Byron, K. Sakai, L. Carrel, H.F. Willard, and J.B. Lawrence. 2002a. An ectopic human XIST gene can induce chromosome inactivation in postdifferentiation human HT-1080 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:8677-82.
- Hall, L.L., C.M. Clemson, M. Byron, K. Wydner, and J.B. Lawrence. 2002b. Unbalanced X;autosome translocations provide evidence for sequence specificity in the association of XIST RNA with chromatin. *Hum Mol Genet.* 11:3157-65.
- Harborth, J., S.M. Elbashir, K. Bechert, T. Tuschl, and K. Weber. 2001. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci.* 114:4557-65.
- Hatton, K.S., V. Dhar, E.H. Brown, M.A. Iqbal, S. Stuart, V.T. Didamo, and C.L. Schildkraut. 1988. Replication program of active and inactive multigene families in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 8:2149-58.
- Heitz, E. 1928. Das Heterochromatin der Moose. *I. Jahrb. Wiss. Botanik.* 69:762-818.
- Heun, P., T. Laroche, M.K. Raghuraman, and S.M. Gasser. 2001. The positioning and dynamics of origins of replication in the budding yeast nucleus. *J Cell Biol.* 152:385-400.
- Hofemeister, H., K. Weber, and R. Stick. 2000. Association of prenylated proteins with the plasma membrane and the inner nuclear membrane is mediated by the same membrane-targeting motifs. *Mol Biol Cell.* 11:3233-46.
- Holaska, J.M., K.K. Lee, A.K. Kowalski, and K.L. Wilson. 2003. Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *J Biol Chem.* 278:6969-75.

- Holtz, D., R.A. Tanaka, J. Hartwig, and F. McKeon. 1989. The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell*. 59:969-77.
- Horn, P.J., and C.L. Peterson. 2002. Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science*. 297:1824-7.
- Hozak, P., A.M. Sasseville, Y. Raymond, and P.R. Cook. 1995. Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *J Cell Sci*. 108 (Pt 2):635-44.
- Hutchison, C.J., and H.J. Worman. 2004. A-type lamins: guardians of the soma? *Nat Cell Biol*. 6:1062-7.
- Im, H., J.A. Grass, H.M. Christensen, A. Perkins, and E.H. Bresnick. 2002. Histone deacetylase-dependent establishment and maintenance of broad low-level histone acetylation within a tissue-specific chromatin domain. *Biochemistry*. 41:15152-60.
- Jackson, D.A. 2003. The principles of nuclear structure. *Chromosome Res*. 11:387-401.
- Jackson, D.A., and A. Pombo. 1998. Replicon Clusters Are Stable Units of Chromosome Structure: Evidence That Nuclear Organization Contributes to the Efficient Activation and Propagation of S Phase in Human Cells. *J. Cell Biol*. 140:1285-1295.
- Jenuwein, T., and C.D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science*. 293:1074-80.
- Kanda, T., K.F. Sullivan, and G.M. Wahl. 1998. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol*. 8:377-85.
- Katan-Khaykovich, Y., and K. Struhl. 2002. Dynamics of global histone acetylation and deacetylation in vivo: rapid restoration of normal histone acetylation status upon removal of activators and repressors. *Genes Dev*. 16:743-52.
- Kitten, G.T., and E.A. Nigg. 1991. The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2. *J Cell Biol*. 113:13-23.
- Kondra, P.M., and M. Ray. 1978. Analysis of DNA replication patterns of human fibroblast chromosomes: the replication map. *Hum Genet*. 43:139-49.
- Kosak, S.T., and M. Groudine. 2004. Form follows function: The genomic organization of cellular differentiation. *Genes Dev*. 18:1371-84.
- Kosak, S.T., J.A. Skok, K.L. Medina, R. Riblet, M.M. Le Beau, A.G. Fisher, and H. Singh. 2002. Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science*. 296:158-62.
- Krouwels, I.M., K. Wiesmeijer, T.E. Abraham, C. Molenaar, N.P. Verwoerd, H.J. Tanke, and R.W. Dirks. 2005. A glue for heterochromatin maintenance: stable SUV39H1 binding to heterochromatin is reinforced by the SET domain. *J Cell Biol*. 170:537-49.
- Kurz, A., S. Lampel, J.E. Nickolenko, J. Bradl, A. Benner, R.M. Zirbel, T. Cremer, and P. Lichter. 1996. Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol*. 135:1195-205.
- Lachner, M., D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler, and T. Jenuwein. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. 410:116-20.
- Lachner, M., R.J. O'Sullivan, and T. Jenuwein. 2003. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci*. 116:2117-24.
- Lander, E.S., L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R.

- Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chissoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, *et al.* 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409:860-921.
- Lang, S. 2003. Untersuchung zur Lokalisierung von drei benachbarten Genen der humanen „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“-Region im Zellkern. In Department Biology II. LMU Munich, Munich. 1-89.
- Lee, K.K., T. Haraguchi, R.S. Lee, T. Koujin, Y. Hiraoka, and K.L. Wilson. 2001. Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *J Cell Sci*. 114:4567-73.
- Lee, K.K., and K.L. Wilson. 2004. All in the family: evidence for four new LEM-domain proteins Lem2 (NET-25), Lem3, Lem4 and Lem5 in the human genome. *Symp Soc Exp Biol*:329-39.
- Lehrmann, H., L.L. Pritchard, and A. Harel-Bellan. 2002. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res*. 86:41-65.
- Lengauer, C., E.D. Green, and T. Cremer. 1992a. Fluorescence in situ hybridization of YAC clones after Alu-PCR amplification. *Genomics*. 13:826-8.
- Lengauer, C., H.C. Riethman, M.R. Speicher, M. Taniwaki, D. Konecki, E.D. Green, R. Becher, M.V. Olson, and T. Cremer. 1992b. Metaphase and interphase cytogenetics with Alu-PCR-amplified yeast artificial chromosome clones containing the BCR gene and the protooncogenes c-raf-1, c-fms, and c-erbB-2. *Cancer Res*. 52:2590-6.
- Leonhardt, H., and M.C. Cardoso. 2000. DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer. *J Cell Biochem Suppl*. Suppl 35:78-83.
- Leonhardt, H., H.P. Rahn, P. Weinzierl, A. Sporbert, T. Cremer, D. Zink, and M.C. Cardoso. 2000a. Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol*. 149:271-80.
- Leonhardt, H., A. Sporbert, and M.C. Cardoso. 2000b. Targeting regulatory factors to intranuclear replication sites. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*. 10:127-33.
- Lewin, B. 2003. Genes VIII.
- Li, F., J. Chen, M. Izumi, M.C. Butler, S.M. Keezer, and D.M. Gilbert. 2001. The replication timing program of the Chinese hamster beta-globin locus is established coincident with its repositioning near peripheral heterochromatin in early G1 phase. *J Cell Biol*. 154:283-92.
- Li, M., J.D. McCann, C.M. Liedtke, A.C. Nairn, P. Greengard, and M.J. Welsh. 1988. Cyclic AMP-dependent protein kinase opens chloride channels in normal but not cystic fibrosis airway epithelium. *Nature*. 331:358-60.
- Lichter, P., T. Cremer, J. Borden, L. Manuelidis, and D.C. Ward. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet*. 80:224-234.
- Liu, J., T.R. Ben-Shahar, D. Riemer, M. Treinin, P. Spann, K. Weber, A. Fire, and Y. Gruenbaum. 2000. Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Mol Biol Cell*. 11:3937-47.
- Liu, J., K.K. Lee, M. Segura-Totten, E. Neufeld, K.L. Wilson, and Y. Gruenbaum. 2003. MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:4598-603.
- Lozzio, B.B., and C.B. Lozzio. 1979. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk Res*. 3:363-70.

- Lozzio, B.B., E.A. Machado, S.V. Lair, and C.B. Lozzio. 1979. Reproducible metastatic growth of K-562 human myelogenous leukemia cells in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 63:295-9.
- Luther, K. 2003. Untersuchung zur Positionierung des „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR)-Gens im Zellkern. In Department Biology II. LMU Munich, Munich. 1-102.
- Ma, H., J. Samarabandu, R.S. Devdhar, R. Acharya, P.-C. Cheng, C. Meng, and R. Berezney. 1998. Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 143:1415-1425.
- Machiels, B.M., A.H. Zorenc, J.M. Endert, H.J. Kuijpers, G.J. van Eys, F.C. Ramaekers, and J.L. Broers. 1996. An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem.* 271:9249-53.
- Mahy, N.L., P.E. Perry, and W.A. Bickmore. 2002a. Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. *J Cell Biol.* 159:753-63.
- Mahy, N.L., P.E. Perry, S. Gilchrist, R.A. Baldock, and W.A. Bickmore. 2002b. Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. *J Cell Biol.* 157:579-89.
- Maison, C., D. Bailly, A.H. Peters, J.P. Quivy, D. Roche, A. Taddei, M. Lachner, T. Jenuwein, and G. Almouzni. 2002. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet.* 30:329-34.
- Mancini, M.A., B. Shan, J.A. Nickerson, S. Penman, and W.H. Lee. 1994. The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:418-22.
- Manders, E.M., H. Kimura, and P.R. Cook. 1999. Direct imaging of DNA in living cells reveals the dynamics of chromosome formation. *J Cell Biol.* 144:813-21.
- Manuelidis, L. 1985. Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Hum Genet.* 71:288-93.
- Markiewicz, E., T. Dechat, R. Foisner, R.A. Quinlan, and C.J. Hutchison. 2002. Lamin A/C binding protein LAP2alpha is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell.* 13:4401-13.
- Martinez, J., A. Patkaniowska, H. Urlaub, R. Luhrmann, and T. Tuschl. 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* 110:563-74.
- McKeon, F.D. 1987. Nuclear lamin proteins and the structure of the nuclear envelope: where is the function? *Bioessays.* 7:169-73.
- Meselson, M., and F.W. Stahl. 1958. The replication of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 23:9-12.
- Mislow, J.M., J.M. Holaska, M.S. Kim, K.K. Lee, M. Segura-Totten, K.L. Wilson, and E.M. McNally. 2002. Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett.* 525:135-40.
- Misteli, T. 2001. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science.* 291:843-7.
- Misteli, T. 2004. Spatial positioning; a new dimension in genome function. *Cell.* 119:153-6.
- Misteli, T. 2005. Concepts in nuclear architecture. *Bioessays.* 27:477-487.
- Moir, R.D., T.P. Spann, H. Herrmann, and R.D. Goldman. 2000a. Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. *J Cell Biol.* 149:1179-92.
- Moir, R.D., T.P. Spann, R.I. Lopez-Soler, M. Yoon, A.E. Goldman, S. Khuon, and R.D. Goldman. 2000b. Review: the dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle--relationship between structure and function. *J Struct Biol.* 129:324-34.

- Molnar, A., and K. Georgopoulos. 1994. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol.* 14:8292-303.
- Mostoslavsky, R., N. Singh, T. Tenzen, M. Goldmit, C. Gabay, S. Elizur, P. Qi, B.E. Reubinoff, A. Chess, H. Cedar, and Y. Bergman. 2001. Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system. *Nature.* 414:221-5.
- Muchir, A., and H.J. Worman. 2004. The nuclear envelope and human disease. *Physiology (Bethesda).* 19:309-14.
- Nagele, R., T. Freeman, L. McMorro, and H.Y. Lee. 1995. Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order. *Science.* 270:1831-5.
- Nagele, R.G., T. Freeman, J. Fazekas, K.M. Lee, Z. Thomson, and H.Y. Lee. 1998. Chromosome spatial order in human cells: evidence for early origin and faithful propagation. *Chromosoma.* 107:330-8.
- Nakamura, H., T. Morita, and C. Sato. 1986. Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus. *Exp Cell Res.* 165:291-7.
- Nakayama, J., J.C. Rice, B.D. Strahl, C.D. Allis, and S.I. Grewal. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science.* 292:110-3.
- Nakayasu, H., and R. Berezney. 1989. Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J Cell Biol.* 108:1-11.
- Nielsen, S.J., R. Schneider, U.M. Bauer, A.J. Bannister, A. Morrison, D. O'Carroll, R. Firestein, M. Cleary, T. Jenuwein, R.E. Herrera, and T. Kouzarides. 2001. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature.* 412:561-5.
- Nikolova, V., C. Leimena, A.C. McMahon, J.C. Tan, S. Chandar, D. Jogia, S.H. Kesteven, J. Michalicek, R. Otway, F. Verheyen, S. Rainer, C.L. Stewart, D. Martin, M.P. Feneley, and D. Fatkin. 2004. Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J Clin Invest.* 113:357-69.
- Nili, E., G.S. Cojocar, Y. Kalma, D. Ginsberg, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, R. Berger, S. Shaklai, N. Amariglio, F. Brok-Simoni, A.J. Simon, and G. Rechavi. 2001. Nuclear membrane protein LAP2beta mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less). *J Cell Sci.* 114:3297-307.
- Nye, A.C., R.R. Rajendran, D.L. Stenoien, M.A. Mancini, B.S. Katzenellenbogen, and A.S. Belmont. 2002. Alteration of large-scale chromatin structure by estrogen receptor. *Mol Cell Biol.* 22:3437-49.
- O'Keefe, R.T., S.C. Henderson, and D.L. Spector. 1992. Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J Cell Biol.* 116:1095-110.
- Ostlund, C., and H.J. Worman. 2003. Nuclear envelope proteins and neuromuscular diseases. *Muscle Nerve.* 27:393-406.
- Ozaki, T., M. Saijo, K. Murakami, H. Enomoto, Y. Taya, and S. Sakiyama. 1994. Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. *Oncogene.* 9:2649-53.
- Palladino, F., T. Laroche, E. Gilson, A. Axelrod, L. Pillus, and S.M. Gasser. 1993. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell.* 75:543-55.
- Pendas, A.M., Z. Zhou, J. Cadinanos, J.M. Freije, J. Wang, K. Hultenby, A. Astudillo, A. Wernerson, F. Rodriguez, K. Tryggvason, and C. Lopez-Otin. 2002. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet.* 31:94-9.
- Peters, A.H., D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schofer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M.

- Sibilia, and T. Jenuwein. 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*. 107:323-37.
- Phair, R.D., and T. Misteli. 2000. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*. 404:604-9.
- Pollard, K.M., E.K. Chan, B.J. Grant, K.F. Sullivan, E.M. Tan, and C.A. Glass. 1990. In vitro posttranslational modification of lamin B cloned from a human T-cell line. *Mol Cell Biol*. 10:2164-75.
- Rabl, C. 1885. Ueber Zelltheilung. *Morphol. Jahrbuch*. 10.
- Ragoczy, T., A. Telling, T. Sawado, M. Groudine, and S.T. Kosak. 2003. A genetic analysis of chromosome territory looping: diverse roles for distal regulatory elements. *Chromosome Res*. 11:513-25.
- Rasheed, S., W.A. Nelson-Rees, E.M. Toth, P. Arnstein, and M.B. Gardner. 1974. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*. 33:1027-33.
- Razin, S.V., and Gromova, II. 1995. The channels model of nuclear matrix structure. *Bioessays*. 17:443-50.
- Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B.D. Strahl, Z.W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C.P. Ponting, C.D. Allis, and T. Jenuwein. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. 406:593-9.
- Rober, R.A., K. Weber, and M. Osborn. 1989. Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development*. 105:365-78.
- Ross, R.A., B.A. Spengler, and J.L. Biedler. 1983. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 71:741-7.
- Roth, S.Y., J.M. Denu, and C.D. Allis. 2001. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*. 70:81-120.
- Rountree, M.R., K.E. Bachman, and S.B. Baylin. 2000. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*. 25:269-77.
- Saccone, S., S. Caccio, J. Kusuda, L. Andreozzi, and G. Bernardi. 1996. Identification of the gene-richest bands in human chromosomes. *Gene*. 174:85-94.
- Saccone, S., A. De Sario, J. Wiegant, A.K. Raap, G. Della Valle, and G. Bernardi. 1993. Correlations between isochores and chromosomal bands in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:11929-33.
- Sadoni, N., K.F. Sullivan, P. Weinzierl, E.H. Stelzer, and D. Zink. 2001. Large-scale chromatin fibers of living cells display a discontinuous functional organization. *Chromosoma*. 110:39-51.
- Sadoni, N., M.C. Cardoso, E.H. Stelzer, H. Leonhardt, and D. Zink. 2004. Stable chromosomal units determine the spatial and temporal organization of DNA replication. *J Cell Sci*. 117:5353-65.
- Sadoni, N., S. Langer, C. Fauth, G. Bernardi, T. Cremer, B.M. Turner, and D. Zink. 1999. Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol*. 146:1211-26.
- Sadoni, N., and D. Zink. 2004. Nascent RNA synthesis in the context of chromatin architecture. *Chromosome Res*. 12:439-51.
- Sanger, F., G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, A.R. Coulson, C.A. Fiddes, C.A. Hutchison, P.M. Slocombe, and M. Smith. 1977. Nucliotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 265:687-95.
- Sanger, F., A.R. Coulson, T. Friedmann, G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, J.C. Fiddes, C.A. Hutchison, 3rd, P.M. Slocombe, and M. Smith. 1978. The nucleotide sequence of bacteriophage phiX174. *J Mol Biol*. 125:225-46.

- Sanger, F., A.R. Coulson, G.F. Hong, D.F. Hill, and G.B. Petersen. 1982. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol.* 162:729-73.
- Santos-Rosa, H., R. Schneider, A.J. Bannister, J. Sherriff, B.E. Bernstein, N.C. Emre, S.L. Schreiber, J. Mellor, and T. Kouzarides. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature.* 419:407-11.
- Scaffidi, P., and T. Misteli. 2005. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med.* 11:440-5.
- Schardin, M., T. Cremer, H.D. Hager, and M. Lang. 1985. Specific staining of human chromosome position in chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Hum. Genet.* 71:281-287.
- Scherer, W.F., and A.F. Hoogasian. 1954. Preservation at subzero temperatures of mouse fibroblasts (strain L) and human epithelial cells (strain HeLa). *Proc Soc Exp Biol Med.* 87:480-7.
- Schermelleh, L., I. Solovei, D. Zink, and T. Cremer. 2001. Two-color fluorescence labeling of early and mid-to-late replicating chromatin in living cells. *Chromosome Res.* 9:77-80.
- Schiltz, R.L., C.A. Mizzen, A. Vassilev, R.G. Cook, C.D. Allis, and Y. Nakatani. 1999. Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem.* 274:1189-92.
- Schneider, R., A.J. Bannister, F.A. Myers, A.W. Thorne, C. Crane-Robinson, and T. Kouzarides. 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol.* 6:73-7.
- Schübeler, D., C. Francastel, D.M. Cimborá, A. Reik, D.I. Martin, and M. Groudine. 2000. Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes Dev.* 14:940-50.
- Schübeler, D., M. Groudine, and M.A. Bender. 2001. The murine beta-globin locus control region regulates the rate of transcription but not the hyperacetylation of histones at the active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11432-7.
- Schübeler, D., D.M. MacAlpine, D. Scalzo, C. Wirbelauer, C. Kooperberg, F. van Leeuwen, D.E. Gottschling, L.P. O'Neill, B.M. Turner, J. Delrow, S.P. Bell, and M. Groudine. 2004. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* 18:1263-71.
- Schübeler, D., D. Scalzo, C. Kooperberg, B. van Steensel, J. Delrow, and M. Groudine. 2002. Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. *Nat Genet.* 32:438-42.
- Schubert, S., H.P. Grunert, H. Zeichhardt, D. Werk, V.A. Erdmann, and J. Kurreck. 2005. Maintaining inhibition: siRNA double expression vectors against coxsackieviral RNAs. *J Mol Biol.* 346:457-65.
- Segura-Totten, M., and K.L. Wilson. 2004. BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol.* 14:261-6.
- Selig, S., K. Okumura, D.C. Ward, and H. Cedar. 1992. Delineation of DNA replication time zones by fluorescence in situ hybridization. *Embo J.* 11:1217-25.
- Simon, I., T. Tenzen, R. Mostoslavsky, E. Fibach, L. Lande, E. Milot, J. Gribnau, F. Grosveld, P. Fraser, and H. Cedar. 2001. Developmental regulation of DNA replication timing at the human beta globin locus. *Embo J.* 20:6150-7.
- Simon, I., T. Tenzen, B.E. Reubinoff, D. Hillman, J.R. McCarrey, and H. Cedar. 1999. Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature.* 401:929-32.
- Skok, J.A., K.E. Brown, V. Azuara, M.L. Caparros, J. Baxter, K. Takacs, N. Dillon, D. Gray, R.P. Perry, M. Merkenschlager, and A.G. Fisher. 2001. Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat Immunol.* 2:848-54.

- Smith, E.D., B.A. Kudlow, R.L. Frock, and B.K. Kennedy. 2005. A-type nuclear lamins, progerias and other degenerative disorders. *Mech Ageing Dev.* 126:447-60.
- Smith, Z.E., and D.R. Higgs. 1999. The pattern of replication at a human telomeric region (16p13.3): its relationship to chromosome structure and gene expression. *Hum Mol Genet.* 8:1373-86.
- Spann, T.P., A.E. Goldman, C. Wang, S. Huang, and R.D. Goldman. 2002. Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol.* 156:603-8.
- Spann, T.P., R.D. Moir, A.E. Goldman, R. Stick, and R.D. Goldman. 1997. Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol.* 136:1201-12.
- Sparvoli, E., M. Levi, and E. Rossi. 1994. Replicon clusters may form structurally stable complexes of chromatin and chromosomes. *J Cell Sci.* 107 (Pt 11):3097-103.
- Sporbert, A., A. Gahl, R. Ankerhold, H. Leonhardt, and M.C. Cardoso. 2002. DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters. *Mol Cell.* 10:1355-65.
- Stallcup, M.R. 2001. Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene.* 20:3014-20.
- Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403:41-5.
- Strahl, B.D., R. Ohba, R.G. Cook, and C.D. Allis. 1999. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:14967-72.
- Struhl, K. 1998. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* 12:599-606.
- Stuurman, N., S. Heins, and U. Aebi. 1998. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol.* 122:42-66.
- Stuurman, N., B. Sasse, and P.A. Fisher. 1996. Intermediate filament protein polymerization: molecular analysis of Drosophila nuclear lamin head-to-tail binding. *J Struct Biol.* 117:1-15.
- Sullivan, T., D. Escalante-Alcalde, H. Bhatt, M. Anver, N. Bhat, K. Nagashima, C.L. Stewart, and B. Burke. 1999. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 147:913-20.
- Sun, H.B., J. Shen, and H. Yokota. 2000. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys. J.* 79:184-190.
- Tanabe, H., F.A. Habermann, I. Solovei, M. Cremer, and T. Cremer. 2002. Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat Res.* 504:37-45.
- Taniura, H., C. Glass, and L. Gerace. 1995. A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J Cell Biol.* 131:33-44.
- Telenius, H., N.P. Carter, C.E. Bebb, M. Nordenskjold, B.A. Ponder, and A. Tunnacliffe. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics.* 13:718-25.
- Tschermak, E. 1900. Über künstliche Kreuzung bei Pisum sativum. *Zeitschrift für das landwirtschaftliche Versuchswesen in Österreich.* 3:465-555.
- Tumbar, T., and A.S. Belmont. 2001. Interphase movements of a DNA chromosome region modulated by VP16 transcriptional activator. *Nat Cell Biol.* 3:134-9.
- Tumbar, T., G. Sudlow, and A.S. Belmont. 1999. Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J. Cell Biol.* 145:1341-1354.
- Tuschl, T. 2001. RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem.* 2:239-45.

- Utle, R.T., K. Ikeda, P.A. Grant, J. Cote, D.J. Steger, A. Eberharter, S. John, and J.L. Workman. 1998. Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature*. 394:498-502.
- Venter, J.C., M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt, J.D. Gocayne, P. Amanatides, R.M. Ballew, D.H. Huson, J.R. Wortman, Q. Zhang, C.D. Kodira, X.H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P.D. Thomas, J. Zhang, G.L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A.G. Clark, J. Nadeau, V.A. McKusick, N. Zinder, A.J. Levine, R.J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A.E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T.J. Heiman, M.E. Higgins, R.R. Ji, Z. Ke, K.A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G.V. Merkulov, N. Milshina, H.M. Moore, A.K. Naik, V.A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D.B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, *et al.* 2001. The sequence of the human genome. *Science*. 291:1304-51.
- Vermaak, D., K. Ahmad, and S. Henikoff. 2003. Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Curr Opin Cell Biol*. 15:266-74.
- Verschure, P.J., I. van der Kraan, E.M. Manders, D. Hoogstraten, A.B. Houtsmuller, and R. van Driel. 2003. Condensed chromatin domains in the mammalian nucleus are accessible to large macromolecules. *EMBO Rep*. 4:861-6.
- Verschure, P.J., I. van Der Kraan, E.M. Manders, and R. van Driel. 1999. Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J Cell Biol*. 147:13-24.
- Visser, A.E., F. Jaunin, S. Fakan, and J.A. Aten. 2000. High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J Cell Sci*. 113 (Pt 14):2585-93.
- Volpi, E.V., E. Chevret, T. Jones, R. Vatcheva, J. Williamson, S. Beck, R.D. Campbell, M. Goldsworthy, S.H. Powis, J. Ragoussis, J. Trowsdale, and D. Sheer. 2000. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci*. 113 (Pt 9):1565-76.
- Vries, H.d. 1900. Sur la loi de disjonction des hybrides. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences (Paris)*. 130:845-847.
- Wang, H., R. Cao, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, C. Borchers, P. Tempst, and Y. Zhang. 2001a. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell*. 8:1207-17.
- Wang, H., Z.Q. Huang, L. Xia, Q. Feng, H. Erdjument-Bromage, B.D. Strahl, S.D. Briggs, C.D. Allis, J. Wong, P. Tempst, and Y. Zhang. 2001b. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*. 293:853-7.
- Watson, J.D., and F.H. Crick. 1953. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 18:123-31.
- Weber, K., U. Plessmann, and P. Traub. 1989. Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett*. 257:411-4.
- Wenzel, A., C. Cziepluch, U. Hamann, J. Schurmann, and M. Schwab. 1991. The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells. *Embo J*. 10:3703-12.

- Williams, R.R., S. Broad, D. Sheer, and J. Ragoussis. 2002. Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei. *Exp Cell Res.* 272:163-75.
- Wilson, K.L., M.S. Zastrow, and K.K. Lee. 2001. Lamins and disease: insights into nuclear infrastructure. *Cell.* 104:647-50.
- Wolffe, A.P. 1994. Inheritance of chromatin states. *Dev Genet.* 15:463-70.
- Wyman, C., and M. Botchan. 1995. DNA replication. A familiar ring to DNA polymerase processivity. *Curr Biol.* 5:334-7.
- Yan, W., A. Rajkovic, M.M. Viveiros, K.H. Burns, J.J. Eppig, and M.M. Matzuk. 2002. Identification of Gasz, an evolutionarily conserved gene expressed exclusively in germ cells and encoding a protein with four ankyrin repeats, a sterile-alpha motif, and a basic leucine zipper. *Mol Endocrinol.* 16:1168-84.
- Ye, Q., I. Callebaut, A. Pezhman, J.C. Courvalin, and H.J. Worman. 1997. Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J Biol Chem.* 272:14983-9.
- Ye, Q., Y.F. Hu, H. Zhong, A.C. Nye, A.S. Belmont, and R. Li. 2001. BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. *J Cell Biol.* 155:911-21.
- Yoshida, M., Y. Hoshikawa, K. Koseki, K. Mori, and T. Beppu. 1990a. Structural specificity for biological activity of trichostatin A, a specific inhibitor of mammalian cell cycle with potent differentiation-inducing activity in Friend leukemia cells. *J Antibiot (Tokyo).* 43:1101-6.
- Yoshida, M., M. Kijima, M. Akita, and T. Beppu. 1990b. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem.* 265:17174-9.
- Yoshida, M., A. Matsuyama, Y. Komatsu, and N. Nishino. 2003. From discovery to the coming generation of histone deacetylase inhibitors. *Curr Med Chem.* 10:2351-8.
- Zastrow, M.S., S. Vlcek, and K.L. Wilson. 2004. Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J Cell Sci.* 117:979-87.
- Zhang, C.L., T.A. McKinsey, and E.N. Olson. 2002a. Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Mol Cell Biol.* 22:7302-12.
- Zhang, J., F. Xu, T. Hashimshony, I. Keshet, and H. Cedar. 2002b. Establishment of transcriptional competence in early and late S phase. *Nature.* 420:198-202.
- Zhang, Q., C.D. Ragnauth, J.N. Skepper, N.F. Worth, D.T. Warren, R.G. Roberts, P.L. Weissberg, J.A. Ellis, and C.M. Shanahan. 2005. Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *J Cell Sci.* 118:673-87.
- Zhou, J., O.V. Ermakova, R. Riblet, B.K. Birshtein, and C.L. Schildkraut. 2002. Replication and subnuclear location dynamics of the immunoglobulin heavy-chain locus in B-lineage cells. *Mol Cell Biol.* 22:4876-89.
- Zielenski, J., R. Rozmahel, D. Bozon, B. Kerem, Z. Grzelczak, J.R. Riordan, J. Rommens, and L.C. Tsui. 1991. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics.* 10:214-28.
- Zink, D., M.D. Amaral, A. Englmann, S. Lang, L.A. Clarke, C. Rudolph, F. Alt, K. Luther, C. Braz, N. Sadoni, J. Rosenecker, and D. Schindelbauer. 2004. Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *J Cell Biol.* 166:815-25.
- Zink, D., H. Bornfleth, A. Visser, C. Cremer, and T. Cremer. 1999. Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories. *Exp Cell Res.* 247:176-88.

- Zink, D., T. Cremer, R. Saffrich, R. Fischer, M.F. Trendelenburg, W. Ansorge, and E.H. Stelzer. 1998. Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum Genet.* 102:241-51.
- Zink, D., N. Sadoni, and E. Stelzer. 2003. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods.* 29:42-50.
- Zirbel, R.M., U.R. Mathieu, A. Kurz, T. Cremer, and P. Lichter. 1993. Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res.* 1:93-106.

7. Anhang

7.1. Expressionsdaten von GASZ, CFTR und CORTBP2

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Margarida D. Amaral (Universität Lissabon, Portugal) wurde die Expression von GASZ, CFTR und CORTBP2 in verschiedenen Zelllinien ermittelt. Die Expression wurde in unbehandelten und in TSA- beziehungsweise DRB-behandelten Zellen wie unter (Amaral *et al.*, 2004; Zink *et al.*, 2004; Englmann *et al.*, 2005) beschrieben ermittelt. Die folgende Übersicht gibt das Expressionsniveau der untersuchten Gene in Relation zu der Expression von β -Aktin an:

Bestimmung der Genexpression in Relation zu β -Aktin

Zelltyp	CORTBP2	CFTR	GASZ
T-Lymphozyten	0,33 +/- 0,58%	N.N.	N.N.
HEK-293	6,9 +/- 4,8% (n=4)	N.N. (n=4)	N.N.
SH-EP N14	N.N. (n=4)	N.N. (n=4)	N.N.
Calu-3	0,27 +/- 0,29%	57,6 +/- 23,4% (n=5)	N.N.
HT 1080	0,53 +/- 0,45%	N.N.	N.N.
Testis	2,2 +/- 1,7%	2,1 +/- 0,4% (n=4)	N.
Nasen Epithelium	0,67 +/- 0,12%	1,3 +/- 0,3%	N.N.
Calu-3 Kontrolle	-	77,5 +/- 13,0%	-
Calu-3 + DRB	-	34,7 +/- 19,2%	-
HEK-293 + TSA	-	N.N.	-
SH-EP N14 + TSA	-	N.N.	-

Die Werte geben die mittlere, prozentuale Genexpression in Relation zur Expression von β -Aktin an (+/- SD). Wenn nicht anders angegeben (n=) wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. „Calu-3 Kontrolle“ bezeichnet eine zweite Nachweisserie für Calu-3 Zellen. N.N. bezeichnet eine nicht nachweisbare Genexpression; N. entspricht Werten an der Nachweisgrenze.

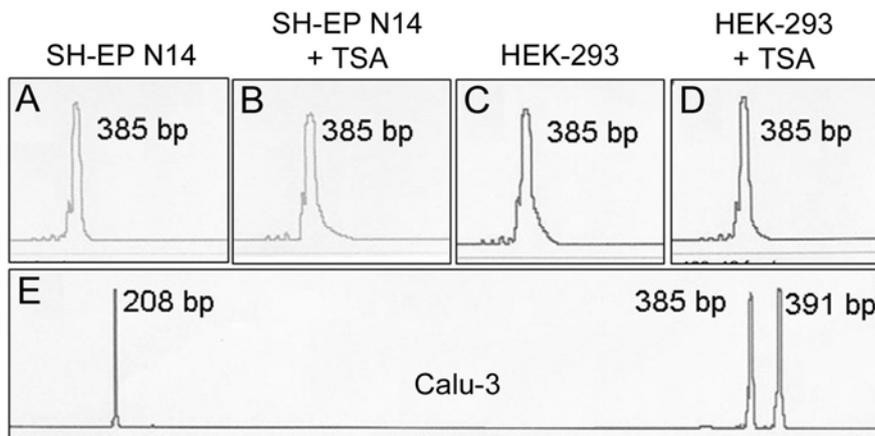


Abbildung 28: **Quantitative Bestimmung des Expressions-Niveaus von CFTR.**

In unbehandelten (A, C, E) und mit TSA behandelten Zellen (B und D) wurde durch quantitative RT-PCR und Kapillar-Elektrophorese das Expressionsniveau von CFTR bestimmt. Die Abbildung zeigt die resultierenden Intensitäts-Verteilungen. In SH-EP N14 und HEK-293 Zellen (A-D) konnten nur β -Aktin Transkripte nachgewiesen werden (385 bp). In Calu-3 Zellen (E) wurde zusätzlich zu β -Aktin noch die Expression von CFTR (208 und 391 bp) detektiert.

7.2. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional	FITC-dUTP	Fluorescein-12-2'-desoxy-Uridin-5'-Triphosphat
2D-FISH	zweidimensionale Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
3D	dreidimensional	FT	Farbteiler
3D-FISH	dreidimensionale Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	g	Gramm
Abb.	Abbildung	GASZ	germ cell-specific expression and the presence of four Ankyrin repeats, a Sterile- α Motif and a basic Leucine Zipper
<i>ad</i>	„zum Endvolumen auffüllen“	GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
AK	Antikörper	h	Stunde
BAC	Bacterial Artificial Chromosome	H2B	Histon H2B
bp	Basenpaare	H ₂ O	Wasser
BP	Bandpassfilter	H3AcK9	Histon H3 azetyliert an Lysin 9
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridintriphosphat	H3MeK4	Histon H3 methyliert an Lysin 4
BSA	Bovine Serum Albumin	H3MeK9	Histon H3 methyliert an Lysin 9
CCD	Charge-coupled device	H4AcK8	Histon H4 azetyliert an Lysin 8
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator	HGPS	Hutchinson Gilford Progeria Syndrom
Chr.	Chromosom(en)	HMG	High Mobility Group
CLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop	IC	Interchromatin-Kompartiment
conc	konzentriert	ICD	Interchromosomen-Domäne
CORTBP2	Cortactin-binding Protein-2	IPTG	Isopropylthiogalaktopyranosid
CT	Chromosomenterritorium	kbp	Kilobasenpaare
CT/IC	Chromosomen-Territorien/Interchromatin-Kompartiment	kDa	kilo Dalton
Cy3-dUTP	5-Amino-propargyl-2'-Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat mit Cy3-Fluorochrom	Lap2 β	Lamina assoziiertes Polypeptid-2
Cy5-dUTP	5-Amino-propargyl-2'-Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat mit Cy5-Fluorochrom	LCR	Lokus Kontroll Region
DAPI	4-6-Diamidino-2-phenylindole	LP	Longpassfilter
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	LR-PCR	Long-Range Polymerase Chain Reaction
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	M	Molar (Konzentrationseinheit)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	mA	milli-Ampere
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser	Mbp	Megabasenpaare
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium	mg	Milligramm
DMSO	Dimethylsulfoxid	min	Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ml	Milliliter
DNase	Desoxyribonuklease	mM	Millimolar
DOP	degenerative oligonucleotide primer (-PCR)	monokl.	monoklonal
DRB	5,6-dichloro-1-ribofuranosylbenzimidazol	ms	Millisekunde
DTT	Dithiothreitol	μ l	Mikroliter
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	μ m	Mikrometer
dUTP	Desoxyuridintriphosphat	μ M	Mikromolar
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	MW	Molekulargewicht
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	N	Normal (Konzentrationseinheit)
EtOH	Ethanol	NA	numerische Apertur
EM	Elektronenmikroskopie	NBT/BCIP	Nitroblau-tetrazolium / (5-bromo-4-chloro-3-indolyl) Phosphat
FCS	Foetal Calf Serum	NEB	New England Biolabs
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	ng	Nanogramm
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	nm	Nanometer
		NPC	Nuclear Pore Complex
		P/S	Penicillin/Streptomycin Lösung
		p.a.	<i>pro analysis</i>
		PAC	Phage P1 Artificial Chromosome
		PBS	Phosphate Buffered Saline

PBSTT	Phosphate Buffered Saline mit Triton X-100 und Tween 20	s	Sekunde
PCH	perizentrisches Heterochromatin	SD	Standard-Abweichung
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	SDS	Sodiumdodecylsulfat
PCR	Polymerase Chain Reaction	SF	subchromosomaler Fokus
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese	siRNA	small interfering RNA
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	SRL	Scratch Replication Labelling
polykl.	polyklonal	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
rDNA	ribosomale DNA	TEMED	Tetramethyldiamin
RF	Replikationsfokus	TBS	Tris Buffered Saline
RNA	Ribonukleinsäure	Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
RNAi	RNA interference	TRITC	Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat
RNase	Ribonuklease	Triton X-100	Octylphenol-decaethylenglycolether
ROI	Region of Interest	Trolox	(±)6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute	TSA	Trichostatin A
RPM	Replikations-Pulsmarkierung	Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitanmonolaureat
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkultur-Medium)	V	Volt
RT	Raumtemperatur		
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction		

Lebenslauf

Name: Andreas Englmann

Geburtsdatum: 30. 12. 1973

Geburtsort: München

Schulausbildung:

09/80 – 07/84	Grundschule Bergkirchen
09/84 – 05/90	Ignaz-Taschner-Gymnasium Dachau
06/90 – 06/93	Ludwig-Thoma-Gymnasium Prien am Chiemsee

Hochschulausbildung:

11/94 – 07/00	Diplom-Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
10/99 – 07/00	Diplomarbeit am Institut für Genetik bei PD Dr. Christian Koch, im Labor von Prof. Dr. Regine Kahmann.
12/00 – 11/01	Promotion am Institut für Biochemie der Fakultät für Tiermedizin, LMU München bei Prof. Dr. Hans-Joachim Gabius (abgebrochen)
seit 12/01	Promotion am Department Biologie II der Fakultät für Biologie, LMU München bei PD Dr. Daniele Zink Forschungstätigkeit zur vorliegenden Arbeit

Kurse und Mitgliedschaften:

05/02	EMBO-Kurs „Practical Course on Live Specimen Light Microscopy“ am EMBL in Heidelberg
05/04 – 07/04	International Property Management Kurs “Patentierung in den Life Sciences im internationalen Vergleich” am EPA München
seit 2003	Mitglied in der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie

Publikationen

Originalarbeiten:

Englmann, A., L.A. Clarke, S. Christan, M.D. Amaral, D. Schindelhauer, and D. Zink. 2005. The replication timing of CFTR and adjacent genes. *Chromosome Res.* 13:183-94

Zink, D., M.D. Amaral, A. Englmann, S. Lang, L.A. Clarke, C. Rudolph, F. Alt, K. Luther, C. Braz, N. Sadoni, J. Rosenecker, and D. Schindelhauer. 2004. Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *J Cell Biol.* 166:815-25.

Tagungsbeiträge:

Englmann, A., and D. Zink. 2004. Analysis of the relationships between nuclear positioning, transcriptional regulation and replicational regulation of genes in the human CFTR-region. *European Journal of Cell Biology.* 83 (Supplement 55). (erster Teil)

Englmann, A., and D. Zink. 2005. Analysis of the relationships between nuclear positioning, transcriptional regulation and replicational regulation of genes in the human CFTR-region. *European Journal of Cell Biology.* 84 (Supplement 55). (zweiter Teil)

Englmann, A. 2005. Functional regulation and spatial organization of the human CFTR region. *FASEB Summer Research Conference, Saxtons River, Vermont, USA.*
Präsentation.

Außerdem verschiedene Poster auf Tagungen in Deutschland und im europäischen Ausland.