

Aus dem Biozentrum (Anthropologie und Humangenetik) der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. Thomas Cremer

Die räumliche Anordnung subchromosomaler Bereiche mit  
unterschiedlicher Gendichte im Interphasezellkern

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Dorothee Biener  
aus  
Hannover

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Chr. Klein  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Becker  
Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. U. Strobl  
Prof. Dr. M. Schleicher

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2007

Meinen Schwestern  
Kai, Ike, Susu, Ingi und Angi  
in Liebe und Dankbarkeit zugeeignet

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	6
2	Einleitung	8
3	Material und Methoden	18
3.1	Verbrauchsmaterial .....	18
3.2	Technische Ausrüstung und sonstige Hilfsmittel.....	25
3.3	Mikroskope und Software .....	27
3.4	Zellmaterial.....	29
3.5	Sonden und BAC-Klone.....	30
3.6	Zellkultur .....	31
3.6.1	Isolierung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut.....	31
3.6.2	Ansetzen einer Blutzellkultur.....	32
3.6.3	BrdU-Markierung der Zellkultur .....	33
3.7	Herstellung von Interphasepräparaten .....	33
3.8	BAC-Sonden: von der Datenbank bis zur Hybridisierungsprobe .....	36
3.8.1	Zuordnung der BACs zu genarmen/genreichen Bereichen der Chromosomen .....	36
3.8.2	Primäre DOP-PCR zur Amplifikation der einzelnen BACs .....	41
3.8.3	Herstellung der BAC-Pools .....	42
3.8.4	Sekundäre-DOP-PCR ohne Markierung (optional) .....	43
3.8.5	Markierungs-PCR (label-PCR) der BAC-Pools mit der DOP-PCR-Methode.....	44
3.8.6	Nick-Translation zum Markierung der BAC-Pools (optional) .....	46
3.8.7	Gelelektropherese .....	47
3.8.8	DNase Verdau der Markierungs-PCR-Produkte (optional).....	48
3.8.9	Ansetzen des Hybridisierungsmixes mit den genarmen/genreichen BAC-Pools von Chromosom 1 und 12 .....	49
3.8.10	Ansetzen des Hybridisierungsmixes: genarme/genreiche BAC-Pools von Chromosom 1 und 12 MIT PAINT .....	51
3.8.11	Ansetzen des Hybridisierungsmixes: R-/G-Banden-assoziierte BAC-Pools von Chromosom 12.....	52
3.8.12	Ansetzen des Hybridisierungsmixes: R-/G-Banden-assoziierte BAC-Pools von Chromosom 12 MIT PAINT.....	53
3.9	Von der genomischen DNA bis zur Alu-Hybridisierungssonde.....	54
3.10	2D-FISH mit BAC-Hybridisierungsmixen.....	58
3.10.1	Simultane Denaturierung und Hybridisierung .....	58
3.10.2	Waschungen und Detektion.....	59
3.11	3D-FISH mit BAC-Hybridisierungsmixen.....	60
3.11.1	Ansetzen der Hybridisierung.....	60
3.11.2	Waschungen und Detektion:.....	62
3.11.3	Schema der standardmäßig verwendeten Antikörper und Fluorochrome.....	63
3.12	Mikroskopie .....	67

3.12.1	Epifluoreszenzmikroskopie für 2D-FISH-Versuche .....	67
3.12.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	67
3.13	Bearbeitung und Auswertung der mit FISH und der Konfokalen-Laser-Scanning- Mikroskopie gewonnenen Daten .....	67
3.13.1	Vorgehen in Image J.....	68
3.13.2	Quantitative Evaluation der Radialverteilung von Fluoreszenzsignalen mittels des „3D-relative radial distance“ (3D-RRD) -Programms.....	69
3.13.3	Quantitative Evaluation der Radialverteilung von Fluoreszenzsignalen mittels des ADS – „absolut distances to surfaces“ -Programms .....	76
3.13.4	Statistik .....	78
4	Ergebnisse	80
4.1	Vorbemerkungen zur Versuchplanung und -durchführung.....	80
4.2	Verteilung der Alu-Sequenzen im humanen Karyogramm .....	80
4.3	2D-FISH Experimente.....	82
4.3.1	2D-FISH Experimente mit genarmen und genreichen BAC-Pools von Chromosom1 .....	82
4.3.2	2D-FISH Experimente mit BAC-Pools von Chromosom 12.....	84
4.3.3	2D-FISH Experimente auf SW480-Tumorzellen .....	87
4.4	3D-FISH Experimente.....	87
4.4.1	Verteilung der CT von Chromosom 12 im Kern .....	87
4.4.2	Humane Lymphozyten und die radiale Verteilung genarmer/genreicher BAC-Pools .....	89
4.4.3	Humane Fibroblasten und die radiale Verteilung genarmer/genreicher BAC-Pools.....	100
4.4.4	SW480-Tumorzellen und die radiale Verteilung genarmer/genreicher BAC-Pools .....	110
4.4.5	Humane Lymphozyten und die radiale Verteilung R- und G-Banden-assoziiertes BAC-Pools.....	116
4.4.6	Humane Fibroblasten und die radiale Verteilung R- und G-Banden-assoziiertes BAC-Pools.....	127
5	Diskussion	138
5.1	Gendichte-korrelierte radiale Verteilung subchromosomaler DNA-Bereiche im Interphasekern .....	138
5.2	Beweggründe für die Verwendung von Chromosom 12 als Versuchsgrundlage .....	139
5.3	Diskussion der Ergebnisse der durchgeführten Versuche.....	140
5.4	Diskussion der möglichen Einschränkungen in der Aussagekraft der Versuche.....	145
5.4.1	Begrenzung der möglichen globalen Aussagekraft der Versuchsergebnisse .....	145
5.4.2	Genreichtum und Transkriptionsaktivität, Lokalisation und radiale Verteilung .....	147
5.4.3	Mögliche „Probleme“ mit FISH.....	148
5.4.4	Lust und Frust mit Paint-Proben.....	150
5.4.5	Mögliche strukturelle Artefakte bei Zellen in Kultur .....	150
5.4.6	Vorteile und Nachteile manuell gesetzter Schwellenwerte.....	151
5.5	Erkenntnisse der vorgestellten Arbeit und Möglichkeiten für die weitere Forschung.....	152

# 1 Zusammenfassung

Die Zellkernarchitektur beschreibt die räumliche Anordnung der linearen Gensequenz im dreidimensionalen Zellkern. Die Beobachtung einer geordneten räumlichen Strukturierung und radialen Verteilung der Gene und Chromosomen legt nahe, daß die Zellkernarchitektur Basis und Ausdruck von höheren Organisations- und Regulationsmechanismen ist. Chromosomen liegen im Interphasezellkern in definierten umschriebenen Regionen, sogenannten Chromosomenterritorien vor. Aus früheren Untersuchungen weiß man um die Gendichte-korrelierte radiale Anordnung dieser Chromosomenterritorien. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Frage, inwieweit die Gendichte eines *subchromosomalen* DNA-Bereiches (also eines Teilabschnittes eines Chromosoms) die Position dieses DNA-Abschnittes in Bezug auf das Chromosomenterritorium und den Interphasezellkern beeinflußt.

Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an 2D- und 3D-fixierten Zellkernen (2D/3D-FISH) und Epifluoreszenz- bzw. konfokaler Mikroskopie wurden spezifische subchromosomale Bereiche unterschiedlichen Gengehalts der Chromosomen 1 und 12 differentiell dargestellt. Beide Chromosomen zeichnen sich durch eine distinkte Gliederung in sehr genarme und sehr genreiche Areale aus. Als DNA-Sonden wurden fluoreszenzmarkierte Pools aus exakt kartierten BAC-Klonen von Chromosom 1 und 12 eingesetzt, die entweder einer R- oder G-Bande oder alternativ einem chromosomalen Abschnitt hoher oder niedriger Gendichte zugeordnet waren. Um mögliche andere, von der Gendichte unabhängige Einflüsse auf die radiale Verteilung subchromosomaler Bereiche wie z.B. die Kerngestalt zu identifizieren, wurden die Versuche an drei unterschiedlichen menschlichen Zellarten, Lymphozyten, Fibroblasten und Colonicarcinomzellen der Zelllinie SW480, sowohl während der S-Phase als auch nach Verlassen des Zellzyklus in der G<sub>0</sub>-Phase durchgeführt. Die quantitative Evaluation der Anordnung und der radialen Verteilung der DNA-Segmente in Bezug auf das Chromosomenterritorium bzw. auf den Kern erfolgte an 3D-Rekonstruktionen von lichtoptischen Serienschnitten mittels zweier unabhängiger computergestützter Auswertungsprogramme.

Es konnte gezeigt werden, daß in den annähernd runden Lymphozyten radiale Verteilungsunterschiede in Korrelation zur Gendichte gegeben sind: Genarme Bereiche des Chromosoms 12 ordnen sich unabhängig vom Zellzykluszeitpunkt in Bezug auf den geometrischen Mittelpunkt des Interphasekerns peripherer an als genreiche. Dieser Befund

stützt die Hypothese, daß genreiche Regionen von Chromosomen eher zum Zellkernmittelpunkt hin präsentiert, genarme dagegen in die Peripherie verlagert werden. In der S-Phase konnte eine ebensolche radiale Verteilung auch in Bezug auf das Chromosomenterritorium gefunden werden. Hier wird die genarme DNA schwerpunktmäßig an den Rand des Territoriums verschoben.

Anders verhält es sich bei den adhärent wachsenden, flachen humanen Fibroblasten. Hier konnte kein signifikanter Unterschied in der dreidimensionalen, räumlichen Anordnung genarmer und genreicher DNA-Abschnitte gefunden werden, und zwar weder in Bezug auf den Kern noch auf das Territorium.

SW480-Tumorzellen sind rundliche bis ellipsoide Zellen. Ähnlich den Lymphozyten zeigen sie klare radiale Anordnungsunterschiede von Bereichen des Chromosoms 12, sortiert nach der Gendichte. Allerdings sind diese Unterschiede weniger stark ausgeprägt als bei den Lymphozyten. So konnte nur in Bezug auf das Chromosomenterritorium ein signifikanter radialer Verteilungsunterschied gefunden werden. In Bezug auf den Kern sieht man eine deutliche, aber statistisch nicht signifikante Tendenz, genarmes Chromatin in die Peripherie zu verlagern.

Insgesamt belegen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit, daß das Prinzip der Korrelation von Gendichte und radialer Verteilung grundsätzlich auch für subchromosomale Bereiche gilt. Es läßt sich jedoch feststellen, daß bei der radialen Verteilung von Chromosomenabschnitten weitere, noch nicht bekannte Faktoren eine Rolle spielen und sie nicht ausschließlich durch die Gendichte bestimmt wird.

## 2 Einleitung

Die Zellkernarchitektur beschäftigt sich mit der Frage, wie die lineare DNA räumlich im Zellkern angeordnet und verteilt ist. Jeder diploide Zellkern des Menschen enthält ca. 1,8 m DNA-Sequenz (Lewin, 1998). Diese Sequenz wird in hochgeordneter Form kondensiert und im Zellkern verpackt. So ist in der Interphase das genetische Material als Chromatin zu erkennen, einem Komplex aus DNA und Proteinen. Chromatin ist seinerseits die Grundsubstanz der Chromosomen. In der Zellkernarchitektur werden also Regeln der Verteilung und Ordnungsprinzipien von Strukturen wie Chromatin und Chromosomen im Zellkern jenseits der einfachen DNA-Sequenz beschrieben.

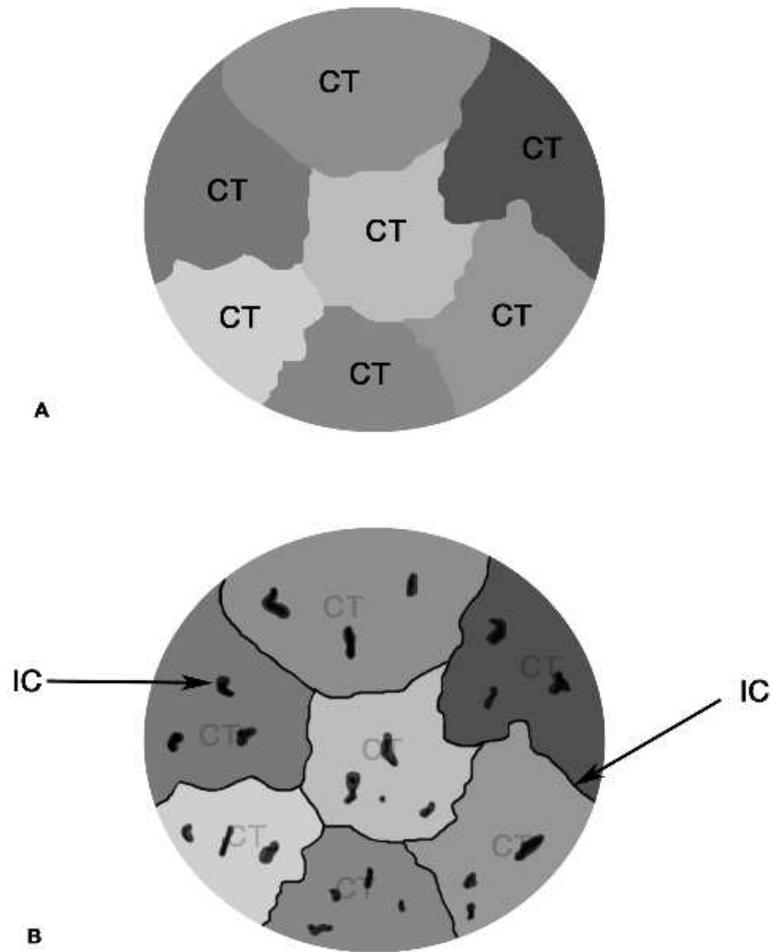
Im folgenden soll ein Überblick über die im Moment gültigen Vorstellungen zur Zellkernarchitektur gegeben werden.

### **Das Chromosomenterritorien/Interchromatin-Compartment-Modell**

Jedes Chromosom beinhaltet eine diskrete, definierte Menge an DNA und Genen. In der Mitosephase können die Chromosomen als solche im Lichtmikroskop betrachtet werden. In der Interphase nehmen sie einen räumlich abgegrenzten Bereich im Zellkern ein, der als Chromosomenterritorium (CT) bezeichnet wird (Cremer and Cremer, 2001; Parada and Misteli, 2002) (siehe auch Abbildung 2.1.A).

Es ist unbekannt, wie die Chromosomen und die CT genau im Zellkern verankert sind (Parada et al., 2004). Folgende drei Modelle werden vorgeschlagen: Zum einen ist vorstellbar, daß die CT durch spezifische architektonische Elemente an Ort und Stelle gehalten werden bzw. ihre Form durch diese Elemente bestimmt wird. Als Kandidat für ein derartiges Element gilt die nukleäre Matrix mit ihren Laminen (Mattout-Drubezki and Gruenbaum, 2003; Zink et al., 2004). Aber auch der Verankerung von Chromosomen mittels ihrer Telomere an der Kernhülle wird eine Bedeutung in diesem Zusammenhang zugeschrieben (Parada et al., 2004). Interessanterweise beobachten andere Arbeitsgruppen, daß die Telomere eher nach innen weisen. Weitere Experimente zur Klärung dieser Frage sind folglich nötig (Nogami et al., 2000).

Ein zweites Modell geht davon aus, daß die Steuerung der Zellkernarchitektur über transkriptionelle Aktivität und Inaktivität läuft. Aktive Genbereiche weisen andere funktionelle und strukturelle Eigenschaften auf als inaktive. Die Unterschiede zwischen beiden könnten für die räumliche Gestaltung des Zellkerns verantwortlich sein. Konkret geht man davon aus, daß kondensierte Heterochromatinblöcke verschiedener Chromosomen zueinanderfinden und damit räumliche Strukturen vorgeben, in deren Aussparungen sich das Euchromatin



**Abbildung 2.1. Darstellung des CT/IC-Modells**

**A:** Der Zellkern enthält eine definierte Menge DNA, portioniert in Form von Chromosomen. Diese nehmen im Interphasekern jeweils einen definierten Bereich ein, der als Chromosomenterritorium (CT) bezeichnet wird

**B:** Der Interchromatinraum (siehe Pfeile) erstreckt sich zwischen und in den CT. Er ist DNA-leer und enthält makromolekuläre Komplexe z.B. für Transkription und Replikation

befindet. Man stellt sich also eine „aktivitätsgesteuerte Selbstorganisation des Zellkerns“ vor (Cook, 2002; Misteli, 2005; Parada et al., 2004).

Das dritte Modell postuliert als entscheidenden Faktor die nicht-codierenden Bereiche auf der DNA. Nicht die nukleäre Matrix soll für die Formgebung im Kern zuständig sein. Vielmehr sollen entweder Proteine Sequenzen in der nicht codierenden DNA erkennen und über Bindung an sie dreidimensionale Strukturen errichten. Auch könnte die DNA selbst Kernhüllen-Anheftungspunkte enthalten (Pederson, 2000). Diese könnten sodann direkt an spezielle Rezeptoren in der Kernhülle ankoppeln, und, ähnlich den Masten eines Zeltes, die räumliche Struktur bedingen. Für alle drei Modelle gibt es diverse Evidenz, und eine abschließende Beurteilung steht noch aus.

Zusätzlich zu den CT wurde auch das Interchromatin-Compartment (IC) beschrieben (Cremer and Cremer, 2001). Das IC kann man sich als DNA-leeren Raum im Zellkern vorstellen, der sich zwischen den CT erstreckt und bis tief in die einzelnen CT reicht (siehe Abbildung 1.1.B). In ihm befinden sich makromolekulare Komplexe, die für Transkription, Replikation, Splicing und Reparatur zuständig sind (Cremer et al., 2004; Spector, 1993). Es gibt Schätzungen, wonach das Chromatin selbst nur etwa 50% des nukleären Volumens einnimmt (Lopez, 1996). Der direkte Grenzbereich zwischen CT und IC wird als Perichromatinraum bezeichnet. In ihm werden Gene abgelesen, und die naszente RNA kann direkt in den IC abgegeben werden (Verschure et al., 1999). Es ist wichtig anzumerken, daß man sich den IC als sehr dynamische Struktur vorstellen muß. In Bereichen großer transkriptioneller Aktivität beispielsweise kann er sich aufdehnen und ausweiten, um Platz für die diversen benötigten Transkriptionsfaktoren und Ähnliches zu schaffen. Ebenso kann er in anderen Bereichen ganz schmal und unscheinbar werden (Cremer et al., 2004).

### **CT-Beziehungen zueinander und die radiale Verteilung von CT**

Geht man von der Zelle als einem Ort großer Ordnung aus, könnte man auf den Gedanken kommen, daß im Kern immer dieselben CT nebeneinanderliegen müßten. Doch interessanterweise ist das keinesfalls so. Zwar kann eine radiale Verteilung von CT in vielen Zelltypen beobachtet werden, es kann aber keine Aussage darüber getroffen werden, wo in einem bestimmten Zellkern sich ein bestimmtes CT befinden wird. Die Anordnung der CT beruht also nicht auf einem rein zufälliger Prozeß, sondern gehorcht bestimmten Wahrscheinlichkeiten (Parada et al., 2003). Mit anderen Worten: manche CT liegen gerne, aber nicht immer beieinander (Bolzer et al., 2005; Misteli, 2005; Parada et al., 2002).

Allerdings ist die einmal gewählte Position eines CTs in der Interphase relativ stabil (Walter et al., 2003). Wenn überhaupt scheint es nur kleinere Bewegungen zu geben (Parada et al.,

2004). Erst in den Tochterzellen nach einer Zellteilung findet man ein neues Muster in der Anordnung der CT.

Grundsätzlich kann man sich jedes CT als eine Entität vorstellen, die ziemlich exakt nur „ihr“ Chromatin enthält und nicht großräumig mit anderen CT überlappt. Nur in kleinen Bereichen scheint es gemäß elektronenmikroskopischer und Lebendzell-Untersuchungen Interaktionen zu geben (Cremer et al., 2004; Visser et al., 2000). Im Gegensatz dazu wurde in letzter Zeit das Schlagwort „Intermingling“ geprägt. Unter Intermingling versteht man das Ineinanderverwobensein von Chromatinfasern verschiedener CT. So vertreten Mahy und Kollegen die Hypothese, daß die CT keinesfalls so fest begrenzt seien wie behauptet. Satt dessen läge das Chromatin sehr decondensiert vor, und damit seien große Überlappungen zwischen den CT nicht nur möglich, sondern auch zu erwarten (Mahy et al., 2002a). Bolzer und Kollegen berichteten jedoch von Versuchen, bei denen keinerlei Intermingling festgestellt werden konnte (Bolzer et al., 2005). Wie es nun tatsächlich zwischen den CT aussieht und ob „intermingled“ wird, bleibt demnach in letzter Konsequenz noch zu klären.

Ein weiteres, sehr wichtiges Thema in der Zellkernarchitektur ist die Frage der radialen Verteilung und Ordnung von Chromosomen. Es gibt kein starres Prinzip, nach dem die Chromosomen nebeneinander angeordnet sind. Außer Frage steht jedoch, daß es eine radiale Verteilung gibt. Es ist dabei sehr wichtig klarzustellen, daß die Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen gravierend sein können (Bolzer et al., 2005).

In zirkulierenden humanen Fibroblasten (HFb), flache Zellen mit einem ebenfalls flachen Kern (Verhältnis der Länge zur Höhe 0,5), konnten Croft und Kollegen 1999 eine radiale Verteilung der Chromosomen nachweisen, die mit der Gendichte auf den einzelnen Chromosomen korreliert (Croft et al., 1999). Genreiche Chromosomen wie das untersuchte Chromosom 19 liegen zentraler, während das genärmere Chromosom 18 in die Peripherie verschoben ist. 2001 wurde dieser Befund auch für viele andere Chromosomen bestätigt (Boyle et al., 2001).

Ganz im Gegensatz dazu beschrieben 2000 Sun und Kollegen zwar auch eine radiale Verteilung der CT in HFb, machten aber dafür die Chromosomengröße verantwortlich. Kleine Chromosomen lägen weiter innen, große weiter außen. Dieser Befund wurde auch von Cremer 2001 bestätigt (Cremer et al., 2001b; Sun et al., 2000).

Zusätzlich wurde ein zellzyklusabhängiger Unterschied im radialen Verhalten von Chromosom 18 gefunden. Die Versuche wurden in der G<sub>0</sub>- und in der S-Phase durchgeführt. Die G<sub>0</sub>-Phase ist ein postmitotischer Zustand, der außerhalb des eigentlichen Zellzyklus steht und einem ruhenden Dasein der Zelle entspricht. Die Zelle ist jedoch nicht inaktiv, sie ist nur momentan oder dauerhaft nicht dazu befähigt, eine Zellteilung durchzuführen. In der S-Phase findet die DNA-Replikation in Vorbereitung der Zellteilung stattfindet. Hier sind die

Zellen hochgradig aktiviert in Bezug auf die nukleären Replikationsmechanismen und andere zellteilungsassoziierte Prozesse. Bridger und Kollegen fanden heraus, daß in der S-Phase das CT von Chromosom 18 peripherer liegt als in der G<sub>0</sub>-Phase (Bridger et al., 2000). In einer sehr neuen Arbeit bestätigten Bolzer und Kollegen noch einmal die größenabhängige radiale Verteilung der CT in HFb sowohl in G<sub>0</sub> als auch in der S-Phase (Bolzer et al., 2005). Ganz anders sieht es bei den humanen Lymphozyten (HLY) aus. Sie sind runde Zellen mit einem kugelförmigen Zellkern (Verhältnis Länge/Breite = 1). Hier scheint die Gendichte der entscheidende Parameter für die radiale Ordnung zu sein (Boyle et al., 2001; Cremer et al., 2001b). Dazu paßt der Befund, daß genarme DNA, die spät repliziert, grundsätzlich eher in der nukleären Peripherie zu finden ist, genreiche DNA hingegen nach innen gerichtet zu sein scheint (Sadoni et al., 1999). Die radiale Staffelung von CT ist schon sehr früh in der Differenzierung und Entwicklung von Zellen vorhanden, so zum Beispiel bereits in hämatopoetischen Vorläuferzellen (Cremer et al., 2003). Zusätzlich ist sie evolutionär konserviert, wie anhand von Versuchen mit Chromosomen 18 und 19 in lymphoblastoiden Zellen gezeigt werden konnte (Tanabe et al., 2002).

Ein wichtiger Unterschied zwischen HLY und HFb als Prototypen für annähernd runde bzw. sehr flache Zellen besteht in dem möglichen Kontakt von CT und Kernhülle. In Zellkernen von HFb können CT Kontakt mit der Kernmembran haben, obwohl sie im Inneren des Kerns liegen. Das liegt an der flachen Struktur der Zellen und des Zellkerns (Bolzer et al., 2005). Bei HLY ist dies nicht möglich (Cremer et al., 2001b).

Alle vorgestellten Ansätze gleichen sich in einer Grundaussage: Es gibt eine radiale Verteilung von CT. Diese variiert von Zelltyp zu Zelltyp und je nach Zellzykluszeitpunkt. Es gibt keine einfachen Regeln, die die Lage von CT mit Gendichte oder Größe korrelieren (Parada et al., 2004). Für die Untersuchung von Substrukturen des CT ist es daher sehr wichtig, die beschriebenen Unbekannten wie Zelltyp und Zellkernform sowie den Zellzykluszeitpunkt zu berücksichtigen.

### **Gene, Aktivität und CT**

Es liegt nahe, der beschriebenen radialen Verteilung von CT eine funktionelle Bedeutung beizumessen. Ein Einfluß auf die Genexpression ist vorstellbar. Unklar ist dagegen, ob die Struktur die Genaktivität bestimmt oder umgekehrt die Genaktivität Auswirkungen auf die Struktur zeigt. Um dieser Frage etwas genauer nachzugehen, soll im folgenden zunächst die Rolle der Genaktivität in der Lokalisation und Formgebung von CT dargelegt werden.

Früher dachte man, daß aktive Gene sich stets auf der Oberfläche von CT befinden müßten (Kurz et al., 1996; Zirbel et al., 1993). An einem Ort also, der für die Transkriptionsmaschinerie sehr gut zugänglich ist. Folglich müßten die Gene zur

Transkription erst an die Oberfläche des CT gebracht werden, sofern sie sich nicht bereits dort befinden. Und tatsächlich konnte gezeigt werden, daß Gene und Genkomplexe bei ihrer Aktivierung größere Bewegungen durchführen (Francastel et al., 2001).

Parallel dazu fand man jedoch heraus, daß sowohl aktive als auch inaktive Gene peripher, also auf der Oberfläche, aber auch zentral im CT liegen können (Verschure et al., 1999). Man kann aktive Gene sogar in stark kondensiertem, kompaktem Chromatin nachweisen (Gilbert et al., 2004). Es gibt also kein eindeutiges und einheitliches Vorkommen von aktiven Genen nur in einem möglichen Bereich.

Das bedeutet zugleich, daß Transkription nicht nur in der Peripherie des CT stattfinden kann (Mahy et al., 2002b), sondern daß Gene sogar tief im Inneren eines CT abgelesen werden müssen (Pederson, 2004). Wenn man sich noch einmal das CT/IC-Modell in Erinnerung ruft, sieht man, daß dies kein Problem darstellen muß. RNAs werden im Perichromatinraum in das IC transkribiert. Und das IC reicht weit in das CT hinein. Zudem ist bekannt, daß RNA und Proteine sich in hohem Maße frei und schnell im Kern bewegen können (Misteli, 2001). Für den Mechanismus der Transkription also scheint eine strikte Positionierung von Genen nicht nötig zu sein (Parada et al., 2003). Das impliziert zugleich, daß für die Veränderung von Genaktivität nicht immer große Umbauten von Nöten sind, bei denen die Gene erst an die CT-Oberfläche verschoben werden. Statt dessen könnten kleine lokale Veränderungen schon zu einem großen Effekt führen (Mahy et al., 2002b).

Umgekehrt zeigen Veränderungen der räumlichen Ordnung einen Einfluß auf die Expression von genetischen Programmen. So berichten Kim und Kollegen von massiven Reorganisationen und Umstrukturierungen von Centromeren, Chromosomen und Genloci während der Differenzierung von Zellen (Kim et al., 2004). Eine andere Hypothese nennt die Zusammensetzung eines Chromatinsegmentes schon an sich den Auslöser für seine Position im Kern (Cremer et al., 2003).

Interessant ist auch, daß im gesamten Kern Transkription stattfindet und nicht nur in Bereichen mit nachweislich aktiven Genen (Mattick, 2003; Verschure et al., 1999). In Versuchen mit Chromosom 21 und 22 konnte gezeigt werden, daß nicht nur Gene, sondern auch sehr viele ncRNAs transkribiert werden (Kapranov et al., 2002). Das Kürzel „nc“ steht für non-protein-coding RNA. Folglich werden diese RNAs nicht in Protein übersetzt, sondern verbleiben im Kern. Ihnen wird nicht nur eine regulatorische Funktion in der Transkriptionssteuerung, sondern auch - und das ist in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung - ein Einfluß auf die chromosomale Architektur zugeschrieben (Mattick, 2003).

Zusammenfassend kann aus all diesen Befunden abgeleitet werden, daß Transkription und räumliche Ordnung sicherlich miteinander verknüpft sind.

## **Gencluster, Ridges und Loops**

Aus den zuvor dargestellten Befunden kann man ableiten, daß die globale Genaktivität einen Einfluß auf die Struktur im Kern nimmt. Interessant ist nun die Frage nach der Auswirkung einzelner Gene und Gen-Bereiche auf die Chromatin- und CT-Struktur.

In den letzten Jahren wurden zunehmend spezifische Cluster- Ansammlungen von Genen gefunden. So zeigten Lercher und Kollegen, daß Haushalts-Gene in Gruppen zusammengefaßt sind, zelltypspezifische Gene jedoch nicht (Lercher et al., 2002). Im Gegensatz dazu beschrieben Yamashita und Kollegen organspezifische Cluster für z.B. leberspezifische Gene (Yamashita et al., 2004). Cluster sind zunächst nichts anderes als eine Aneinanderreihung von Genen auf der linearen DNA. Die strukturelle Ebene ist erst betroffen, wenn die Gene eines Clusters gemeinsam abgelesen und verwaltet werden.

2001 wurden von Caron und Kollegen die Ridges definiert (Caron et al., 2001). Unter Ridge versteht man einen mehrere Megabasenpaare langen Chromatinbereich, der extrem genreich ist und eine hohe Expressionsrate zeigt. Zusätzlich ist ein Ridge sehr GC-reich, und die enthaltenen Gene besitzen sehr kurze Introns. Wenn man sich mit der Frage beschäftigt, wie die Genaktivität in einem solchen Rigde gesteuert wird, ergeben sich zwei mögliche Ansätze: Zum einen könnte jedes Gen autonom reguliert werden. Dafür spricht, daß die einzelnen Gene sehr unterschiedliche Expressionsraten zeigen können. Zum anderen gibt es aber auch die Möglichkeit, daß Expression über globale Faktoren gesteuert wird. Diese könnten die Chromatin-Konformation oder dessen Lage im Kern beeinflussen (Versteeg et al., 2003).

Während der Begriff „Rigde“ ebenso wie „Gencluster“ ein molekulares Phänomen beschreibt, handelt es sich bei Loops um strukturell definierte Ausstülpungen des Chromatins aus der CT-Oberfläche heraus. Im Jahr 2000 beschrieben Volpi und Kollegen, daß der MHC-Komplex auf Chromosom 6 eine große, mehrere Megabasen lange Chromatinschleufe bilden kann, die vom CT weg gerichtet ist. Die Häufigkeit dieser Loopbildung hängt dabei vom Zelltyp und der Anzahl aktiver Gene in diesem Bereich ab (Mahy et al., 2002a; Volpi et al., 2000). Hemmt man die Transkription, so nimmt die Lokalisation von Loops außerhalb des CT deutlich ab, verschwindet aber nicht vollständig (Mahy et al., 2002b). Zwei Jahre später wurde dieses Phänomen auch für den Epidermal Differentiation Complex (EDC) auf Chromosom 1 bestätigt (Williams et al., 2002). Seitdem sind viele Loops beschrieben worden, besonders in sehr genreichen Bezirken mit einer hohen Transkriptionsrate. Dies ergibt die Möglichkeit, daß sich hinter einem strukturellen Loop also ein funktioneller Ridge (van Driel and Franz, 2004) verbergen könnte.

Zwei kausale Erklärungen lassen sich zu den DNA-Ausstülpungen vorschlagen: Zum einen werden können diese genreichen Bezirke so nach außen präsentiert, wo die Transkriptionsmaschinerie sie gut erreichen kann. An der Basis solcher Loops könnten sich

beispielsweise benötigte Proteine versammeln und dort in hoher Konzentration vorliegen (Chambeyron and Bickmore, 2004). Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Loops ausgestülpt werden, da die Struktur transkriptionell sehr aktiven Chromatinfasern selbst dies vorgibt. Vielleicht bestimmen also DNA-Bereiche mit hoher Genaktivität den nukleären Aufbau viel mehr als einzelne Gene dies tun (Mahy et al., 2002a).

Wichtig ist anzumerken, daß für die Versuche zu den Loops ausschließlich die FISH-Methode verwandt wurde. Durch die verschiedenen Behandlungsschritte der FISH-Technik, wie die Hitzedenaturierung, Permeabilisierung etc., ist jedoch nicht auszuschließen, daß die Loops zumindest zum Teil durch die Versuchsdurchführung selbst induziert wurden (van Driel and Fransz, 2004).

### **Aberrante Zellkernarchitektur und Krebs**

In der Tumorgenese und –proliferation ist nicht nur die molekulare Biologie der Zelle modifiziert. Auch die Kernmorphologie und die innernukleäre Architektur der Zellen können gestört sein. Manche der beschriebenen Veränderungen der Zellkernarchitektur werden als Diagnosekriterien für Neoplasien in der Pathologie verwendet. Dazu gehört das Philadelphia-Chromosom bei der Chronisch myeloischen Leukämie, die nukleären und cytoplasmatischen Veränderungen, nachgewiesen in der Papanicolaou-Färbung beim Cervixcarcinom, die Hyperchromasie (erhöhter DNA-Gehalt) und die Verdickung der Kernmembran in Zellen des malignen Harnleiterkarzinoms (Bühling, 1995; Riede, 2001). Diese strukturellen Veränderungen sind jedoch nicht nur als Nebenprodukte der neoplastischen Entwicklung zu sehen. Im Gegenteil: Veränderungen in der Verteilung und Struktur der Kompartimente des Kerns scheinen eine Rolle in der Tumorentstehung selbst zu spielen (Guasconi et al., 2005). Ein weiteres, schon seit längerem bekanntes Phänomen bei Neoplasien ist die Assoziation bestimmter Tumore mit Translokationen. Beispielsweise kommt beim Myxoiden Liposarcom die Translokation  $t(12;16)(q13.3;p11.2)$  vor (Kuroda et al., 2004). Das zuvor genannte Philadelphia-Chromosom ist eine Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$  (Nowell et al., 1998; Rowley, 1973). Wichtig für die Translokationsentstehung dabei ist die Lage der betroffenen Chromosomen und ihre Nähe zueinander (Kozubek et al., 1999; Kuroda et al., 2004; Parada et al., 2002; Roix et al., 2003), die in hohem Maße durch den Zellkernaufbau bedingt wird. Die Zellkernarchitektur ist ihrerseits Veränderungen im Zellzyklus und in der Differenzierung unterworfen. So fanden Kuroda und Kollegen, daß erst in der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten die Chromosomen 12 und 16 sich annähern, während sie zuvor nicht miteinander assoziiert sind (Kuroda et al., 2004).

In Tumoren beobachtet man Lageveränderungen von Chromosomenterritorien, die unabhängig von Karyotypveränderungen auftreten. Gleichzeitig ist die radiale Verteilung von

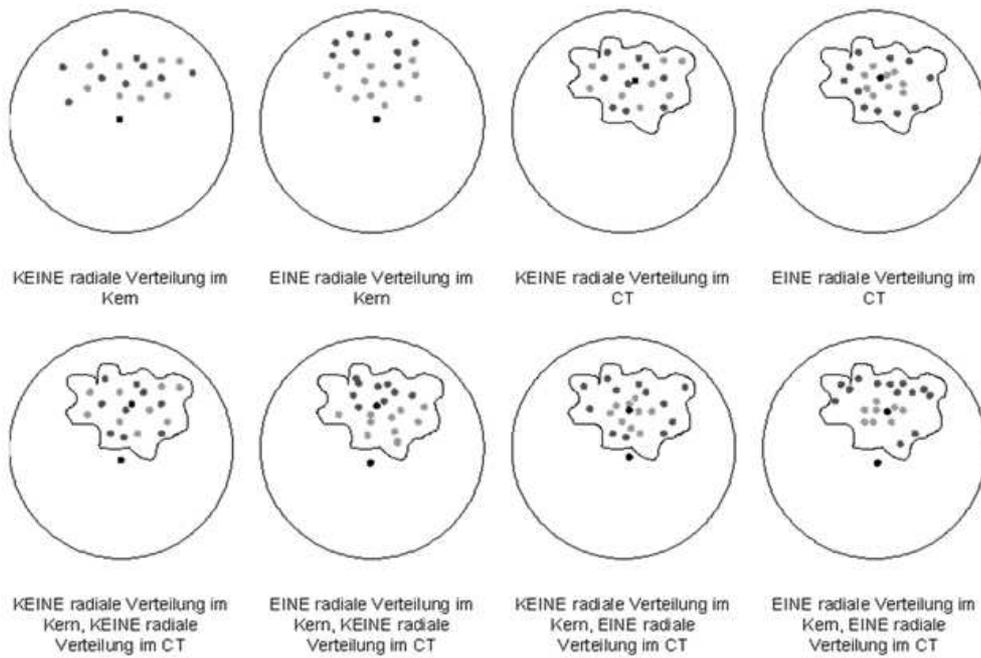
CT weniger ausgeprägt als in normalen Zellen. Was zu diesen strukturellen Veränderungen führt, ist noch nicht bekannt. (Cremer et al., 2003). Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der Einfluß der Zellkernarchitektur auf die Organisation und Regulation auch oder vielleicht gerade bei Neoplasien und in der Tumorentstehung eine Rolle spielt.

### **Orchester-Analogie**

Abschließend können das CT/IC Modell und viele der hier präsentierten Vorstellungen zur Zellkernarchitektur mit einem Orchester verglichen werden. In einem Orchester gibt es verschiedene Musikergruppen, die Streicher, die Blechbläser oder andere, die vergleichbar den Genen eines Chromosoms beieinander sitzen und sozusagen ein CT bilden. Dabei ist es durchaus möglich, daß ein Solist seine eigene Umgebung gleich einem Loop verläßt und aufsteht oder sogar vortritt. Auch ist die Anordnung der verschiedenen Musikergruppen nicht immer starr vorgegeben, sondern wird nach dem Geschmack der Zeit und den Bedürfnissen im Konzertsaal immer wieder variiert, genauso wie die Zelle je nach Zellzyklusphase oder ihrer Differenzierung unterschiedliche strukturelle Gegebenheiten im Kern zeigt. Auch verfügt ein Orchester über eine Art IC, ein Zwischenraumsystem, in dem sich die Notenständer und Noten, die Dämpfer, Stimmhilfen und Ähnliches befinden, die für das Musizieren von essentieller Bedeutung sind. Alles in allem ist ein Orchester, auch wenn es manchmal chaotisch auf den Betrachter wirken mag, ein hochgeordneter Zustand. Auch die Zelle und speziell ihr Kern sind einem hohen Maß an Ordnung unterworfen ist. Wie diese Ordnung genau funktioniert und was sie letzten Endes bedingt, bleibt noch zu erforschen.

### **Die Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, wie die genreichen und genarmen Bereiche eines Chromosoms in Bezug auf das Chromosomenterritorium und den Kern angeordnet sind. (Eine Übersicht über die möglichen Anordnungen bietet Abbildung 2.2.) Gibt es eine radiale Verteilung, wie sie bei verschiedenen genarmen und genreichen Chromosomen im Ganzen beobachtet wurde? Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Frage des zusätzlichen Einflusses von Zelltyp und Zellzykluszeitpunkt gerichtet werden. Um Antworten hierauf zu finden, wurden FISH-Experimenten an dreidimensional fixierten Interphasezellkernen mit BAC-Klonen durchgeführt.



**Abbildung 5.1. Übersicht über die Möglichkeiten einer radialen Anordnung von BACs in Bezug auf das CT, in Bezug auf den Kern und in Bezug auf beides**

Farblegende: Schwarzer Punkt: Schwerpunkt des Kerns oder des CTs, rote und grüne Punkte: BACs

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verbrauchsmaterial

#### Chemikalien, Enzyme, Reagenzien

Chemikalien	Firma
Agarose SeaKem ME	FMC Rockland, Maine, USA
Ampuwa – Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg
BSA	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
Colcemid (10 µg/ml)	Seromed Biochrom, Berlin
Dextransulfat	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Diethyl-Ether	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's MEM Medium	Seromed Biochrom, Berlin
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut p. a.	Merck, Darmstadt
Ethidium-Bromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FCS	Seromed Biochrom, Berlin
Ficoll-Paque Ô Plus	Amersham-Pharmacia Biotech, Sweden
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formamid	Merck, Darmstadt
Formamid, deionisiert	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gel-loading-Puffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glyzerin	Merck, Darmstadt
HANKS Balanced Salt Solution	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Heparin Natrium 25000 I.E./5ml	Braun, Melsungen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-Citrat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Seromed Biochrom, Berlin
Phytohämagglutinin (2,4 mg Protein/Flasche)	Seromed Biochrom, Berlin
Polylysin-Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RPMI 1640 Medium	Calbiochem, Darmstadt
Salzsäure 1 N	Merck, Darmstadt
Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim, Krefeld
Tris-HCl (pH = 8,0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA-Lösung 10x	Seromed Biochrom, Berlin
Tween 20	Calbiochem, Darmstadt

<b>Enzyme</b>	<b>Firma</b>
DNA - Polymerase I	Roche, Mannheim
DNase I	Roche, Mannheim
Pepsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Taq – Polymerase	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Trypsin/EDTA	Seromed Biochrom, Berlin

<b>Nukleotide/Primer/DNA</b>	<b>Firma</b>
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM)	Roche, Mannheim
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (25 mM)	Pharmacia Biotech
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim

<b>Nukleotide/Primer/DNA</b>	<b>Firma</b>
DNP-16-dUTP	NEN Life Science Produkts, Inc., Boston, USA
Digoxigenin-16-dUTP	Roche, Mannheim
TAMRA-dUTP	laboreigene Kopplung von TAMRA X (Molecular Probes) an dUTP
6MW-Primer	MWG-Biotech, Ebersberg
human Cot-1 DNA	Roche, Mannheim
Salmon Sperm DNA	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Lamda/Hind III Marker	Roche, Mannheim
BrdU	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

<b>Antikörper und Fluorochrome</b>	<b>Firma</b>
Antifade Medium Vectashield	Vector, Burlingame CA, USA
Avidin-Alexa-488	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Avidin-Cy5	Jackson ImmunoResearch, PA, USA
Goat $\alpha$ Avidin-Bio	Vector, Burlingame CA, USA
Goat $\alpha$ Avidin-FITC	Vector, Burlingame CA, USA
Goat $\alpha$ Mouse-Alexa488	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Goat $\alpha$ Mouse-Alexa350	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Goat $\alpha$ Mouse-Cy3	Jackson ImmunoResearch, PA, USA
Goat $\alpha$ Mouse-Cy5	Dianova, Hamburg
Goat $\alpha$ Rabbit-Cy3	Amersham Pharmacia Biotech
Goat $\alpha$ Rabbit-FITC	BioSource
Mouse $\alpha$ BrdU	Roche, IN, USA
Mouse $\alpha$ Dig-Cy3	Jackson ImmunoResearch, PA, USA
Mouse $\alpha$ Dig-Cy5	Jackson ImmunoResearch, PA, USA
Mouse $\alpha$ Ki67	DAKO, Dänemark
Rabbit $\alpha$ DNP	Sigma, Missouri, USA
Rabbit $\alpha$ Ki67	DAKO, Dänemark

Antikörper und Fluorochrome	Firma
Sheep $\alpha$ Mouse-Cy3	Dianova, Hamburg
DAPI	Sigma
YOYO-1	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
SYTO 16	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
TO-PRO-3	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

Reagenzien für PCR / Nicktranslation	Firma
Cetus-Puffer II	Roche, Mannheim
Detergenz W1	Gibco BRL, Karlsruhe
Mb-Mercaptoethanol	
MgCl <sub>2</sub>	Roche, Mannheim
Puffer D 5x	Invitrogen, Groningen, Niederlande

### Medien, Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Bestandteile	Anmerkungen
Agarose Gel	1% Agarose in TAE Puffer	5 g in 500 ml TAE Puffer, in der Mikrowelle aufkochen, bis die Lösung klar ist; heiß gießen
Blockierungslösung (in SSC/T)	4% BSA in 4xSSC/T	<u>50 ml Ansatz:</u> 10 ml 20% BSA 40 ml 4xSSC/T
Blockierungslösung (in PBS/T)	5% BSA in 1xPBS/T	<u>50 ml Ansatz:</u> 12,5 ml 20% BSA 37,5 ml 1xPBS/T
BSA-Lösung (20%)	BSA 4xSSC/T bzw. 1xPBS/T	<u>100 ml Ansatz:</u> 20 g BSA 100 ml 4xSSC/T bzw. 1xPBS/T

Puffer/Lösungen	Bestandteile	Anmerkungen
Denaturierungslösung	70% Formamid in 2xSSC	<u>100 ml Ansatz:</u> 10 ml 20xSSC 70 ml Formamid 20 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH = 7,0 mit 1 M HCl einstellen, bei -20°C lagern, 7x verwendbar
Formamid-Lösung (50%) in 2xSSC	Formamid 4xSSC	<u>1 l Ansatz:</u> 500 ml Formamid 500 ml 4xSSC
Glycerin-Lösung (20%)	Glycerin 1xPBS	<u>200 ml Ansatz:</u> 160 ml 1xPBS 40 ml Glycerin
HCl-Lösung (0,1 N)	1 N HCl H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	<u>200 ml Ansatz:</u> 20 ml 1N HCl 180 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Hybridisierungs-Mastermix	20% Dextransulfat in 2xSSC	8 g Dextransulfat in 40 ml 2xSSC lösen, vortexen, durch 0,45 µm Filter filtrieren
Markierungs-ACG-Mix (je 2 mM)	je 100 mM dATP, dCTP, dGTP	<u>500 µl-Ansatz:</u> je 10 µl ATP, CTP, GTP 470 µl PCR-H <sub>2</sub> O
NaCl-Lösung (5 M)	5 M NaCl	146 g NaCl ad 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
NT-dNTP-Mix	je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	<u>1 ml Ansatz:</u> je 250 µl dATP, dCTP, dGTP 50 µl TTP 200 µl PCR-H <sub>2</sub> O
NT-Puffer	1 M Tris-HCl (pH = 7,5) 1 M MgCl <sub>2</sub> BSA	<u>100 ml Ansatz:</u> 50 ml 1M Tris-HCl 50 mg BSA 45 ml H <sub>2</sub> O
Paraformaldehyd-Lösung (4%) in 1xPBS	Paraformaldehyd 1xPBS	8 g des PFA-Pulvers in 200 ml 1xPBS lösen, Gefäß dabei auf 60°C (in der Hood) unter ständigem Rühren erwärmen, bis Lösung klar wird. Anschließend abkühlen

Puffer/Lösungen	Bestandteile	Anmerkungen
Paraformaldehyd-Lösung (4%) in 0,3xPBS	Paraformaldehyd 0,3x PBS	8 g des PFA-Pulvers in 200 ml 0,3xPBS lösen, Gefäß dabei auf 60°C (in der Hood) unter ständigem Rühren erwärmen, bis Lösung klar wird. Anschließend abkühlen
1xPBS-Puffer (pH = 7,4)	140 mM NaCl 2,7 mM KCL 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<u>20xPBS:</u> 320 g NaCl 8 g KCl 57,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 9,6 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 2 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> mit HCl auf pH = 7,4 einstellen
0,3xPBS-Puffer (pH = 7,4)	140 mM NaCl 2,7 mM KCL 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Siehe oben 0,3xPBS-Aliquots autoklavieren
PBT-Puffer (0,01% Tween)	1xPBS Tween 20	<u>1 l Ansatz:</u> 1000 ml 1xPBS 100 µl Tween
SSC-Puffer (pH = 7,0)	150 mM NaCl 15 mM Na-Citrat	<u>20xSSC:</u> 350,6 g NaCl 176,4 g NaCitrat ad 2 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> mit NaOH pH 7,0 einstellen
SSC/T-Puffer (0,2% Tween)	4xSSC Tween 20	<u>1 l Ansatz:</u> 1000 ml 4xSSC 2 ml Tween 20
TAE-Puffer (pH = 8,0)	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA	<u>50xTAE:</u> 242 g Tris 18,6 g EDTA 57,1 ml Eisessig ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
TritonX-Lösung (0,05%)	1xPBS TritonX100	<u>1 l Ansatz:</u> 1000 ml 1xPBS 500 µl TritonX100
TritonX-Lösung (0,5%)	1xPBS TritonX100	<u>200 ml Ansatz:</u> 199 ml 1xPBS 1 ml TritonX100

Medien	Bestandteile	Anmerkungen
RPMI 1640 Komplettmedium	RPMI 1640 Medium FCS Penicillin/Streptomycin	500 ml RPMI 100 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin

Färbe-Lösungen	Bestandteile	Anmerkungen
DAPI-Färbelösung (Endkonzentration: 0,05 $\mu$ M)	DAPI (5 $\mu$ g/ml) 4xSSC/T	DAPI Ausgangslösung 1:100 in 4xSSC/T verdünnen, pro Objektträger 150 $\mu$ l verwenden Inkubationszeit: 3 min
SYTO 16-Färbelösung (Endkonzentration: 10 $\mu$ M)	SYTO 16 1xPBS	SYTO Ausgangslösung 1:100 in 1xPBS verdünnen, pro Objektträger 150 $\mu$ l verwenden Inkubationszeit: 15 min
TO-PRO-Färbelösung (Endkonzentration: 1 $\mu$ M)	TO-PRO 1xPBS	TOPRO Ausgangslösung 1:1000 in 1xPBS verdünnen, pro Objektträger 150 $\mu$ l verwenden Inkubationszeit: 5 min
YOYO 1-Färbelösung (Endkonzentration: 5 nM)	2,5 $\mu$ M YOYO Arbeitslösung 1xPBS	YOYO Ausgangslösung 1:500 in 1xPBS verdünnen, pro Objektträger 150 $\mu$ l verwenden Inkubationszeit: 40 min

### 3.2 Technische Ausrüstung und sonstige Hilfsmittel

#### Technische Ausrüstung

Geräte	Typ	Hersteller
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Typ B 5060	Heraeus, Hanau
Dampfsterilisator	Varioklav	H+P Labortechnik GmbH
Thermocycler	Techne Progene	Thermo-DUX, Wertheim
Sterile Werkbank	Airflow	Biohit
Zentrifugen	Biofuge pico Rotanta/S Vacuumconcentrator	Heraeus, Hanau Hettich, Tuttlingen Bachhofer, Reutlingen

sonstige Geräte	
Abzugshaube	Gefrierschrank -20°C
Bunsenbrenner für die Sterilbank	Hot Block
Eismaschine	kleine Tischzentrifuge
Kühlschrank +4°C	Stickstofftank
ph-Meter	Wasserbäder (37°C-72°C)
Präzisionswaage	UV-Lampe für die Sterilbank
Rotator	Vortexer
Schüttler	

## Hilfsmittel

Hilfsmittel	Spezifizierung	Hersteller
Deckgläser	12 x 12 mm, 15 x 15 mm, 18 x 18 mm	Superior
Deckgläser	76 x 26 mm	Schubert & Weiss, München
Einmal-Injektionskanülen, Dünnwand	100 Sterican® 0,90 x 40 mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmal-Pipetten	1 ml und 3,5 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße	1,5 ml und 0,5ml	Schubert & Weiss, München
Falcon Gewebekultur-flaschen	50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falconröhrchen	15 ml und 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Fixogum Montagekleber		Marabuwerke, Tamm
Glasflaschen	100 ml, 250 ml, 500 ml und 1000 ml	Schott
Küvetten	für 10 Objektträger	Schubert & Weiss, München
Leucosep Röhrchen mit Trennscheibe	Für 20-30 ml Blut	
Objektträger	76 x 26 mm	R. Langenbrink
Pipettenspitzen	Weiß	Molecular Bio ProduCT
Pipettenspitzen	gelb und blau	Greiner Labortechnik
Pipettierhilfe	Accu-jet® BRAND	Schubert & Weiss, München
Quadri PERM® plus	für 4 Deckgläser 76 x 26 mm	Heraeus, Hanau
Sterilfilter	20 µm, 40 µm Porengröße	Satorius, Göttingen

sonstige Hilfsmittel	
Diamantstift	Nagellack
Filterpapier	Klebeband Scotch®
Laborhandschuhe	Parafilm™
Laborwischtücher	Pipettensätze
Metallbox mit Deckel	Präparatemappen
spitze Uhrmacherpinzette	Objektträgerbox
Trockenmittel	

### 3.3 Mikroskope und Software

#### Mikroskope

Mikroskope/Zubehör	Typ	Hersteller
Durchlicht-/ Phasenkontrastmikroskop  Objektive	Axiovert 25 C  CP Achromat x5 / 0,12 CP Achromat x10 / 0,25 Ph1 LD Achrostigmat x20 / 0,3 Ph1 Achrostigmat x40 / 0,55 Ph2	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop  Objektive  Fluoreszenzfilter	Axiophot 2  Plan-NEOFLUAR 16x / 0,5 Plan-NEOFLUAR 40x oil / 1,3 Plan-NEOFLUAR 63x oil / 1,4 Plan-NEOFLUAR 100x oil / 1,3  DAPI (BP 365, FT 395, LP 450-490 nm) FITC (BP 450-490, FT 510, LP 515-565 nm) Cy3 (BP 546, FT 580, LP 590 nm) Cy5 (BP 575-625, FT 645, BP 660-710 nm) Triple-Filter (TBP 400/495/570,	Zeiss, Jena

Mikroskope/Zubehör	Typ	Hersteller
	FT 410/505/585, TBP460/530/610)	
CCD-Kamera		Coolview CCD Camera System
Konfokales Laser-Scanning- Mikroskop	Zeiss LSM-410	Zeiss, Jena
Objektiv	Plan-APOCHROMAT 63x oil / 1,4	

### Verwendete Software

Verwendete Software	Hersteller	Verwendung
Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems, Inc.	Bildbearbeitung
ADS	Dr. Johann von Hase (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Cremer, Kirchhoff-Institut für Physik, Universität Heidelberg in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Cremer, Institut für Anthropologie und Humangenetik, Universität München)	Auswertung
Amira	TGS	3D Rekonstruktion
Cytovision	Applied Imaging International Ltd.	Software zur Betreuung des Fluoreszenzmikroskops
Image J 1.30u	NIH, USA	Bildbearbeitung
LSM Version 3.98	Carl Zeiss Microscope Systems	Software zur Betreuung des Konfokalen Mikroskops
3D-RRD	Dr. Johann von Hase (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Cremer, Kirchhoff-Institut für Physik, Universität Heidelberg in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Cremer, Institut für Anthropologie und Humangenetik, Universität München)	Auswertung
SigmaStat	Systat	Statistische Auswertung

### 3.4 Zellmaterial

- Humane Lymphozyten wurden aus frisch entnommenen, heparinisiertem Vollblut gesunder Spender gewonnen. Bei ihnen handelt es sich um runde Zellen mit einem kugelförmigen Zellkern (Verhältnis Länge/Breite = 1), die sich primär in G0 befinden (Wachtler et al., 1982). Sie entstammen hämatopoetischen Vorläuferzellen und gehören zum Immunsystem. Durch Stimulation mit Phytohämagglutinin ist es möglich, sie in den Zellzyklus eintreten zu lassen und dadurch in die S-Phase zu bringen.
  - Metaphasepräparate für die 2D-FISH-Versuche wurden von Frau Jahn-Henninger hergestellt
  - Objektträger, die mit HLY beschickt sind, wurden nach dem Protokoll (3.6. und 3.7.) hergestellt
- Bei den humanen Fibroblasten handelt es sich um primäre Zellkulturen aus weiblichen Zellen, freundlicherweise von Thomas Meitinger, LMU, zur Verfügung gestellt. HFb sind vom Mesoderm abgeleitete sehr flache Zellen Bindegewebszellen. Zellzyklustechnisch befinden sie sich, wenn sie unter Standardbedingungen in Kultur gehalten werden, statistisch zur Hälfte in G0 und zur Hälfte in der Zellteilung (unveröffentlichte, laborinterne Daten)
  - Objektträger, die mit HFb in der Interphase beschickt sind, wurden freundlicherweise von Frau Katrin Küpper zur Verfügung gestellt
- Die SW480-Zellen stammen aus einer etablierten Zelllinie eines Colonicarcinoms. Die Zelllinie ist unter ATCC no CCL228 gelistet. Ähnlich den HLY verfügen sie über einen eher runden Zellkern (Verhältnis Länge/Breite = 1,2). Sie sind hyperdiploid mit einer Chromosomenzahl zwischen 50 und 55. Sie zeigen diverse chromosomale Umbauten und numerische Abberationen, von denen vier - zwei Translokationen, eine Inversion und ein Isochromosom - das Chromosom 12 betreffen. Die Umbauten liegen größtenteils stabil vor (Kleivi et al., 2004; Muller et al., 2004).
  - Objektträger, die mit SW480 -Zellen in der Interphase beschickt sind, wurden freundlicherweise von Frau Jahn-Henninger vorbereitet

### 3.5 Sonden und BAC-Klone

- Die BAC-Klone von Chromosom 1 und 12 wurden mit freundlicher Genehmigung von Dr. Thomas Ried vom National Institute of Health, Maryland, USA, zur Verfügung gestellt
- In der vorliegenden Arbeit wurde die Numerierung der BAC-Klone von Chromosom 12 von Katrin Küpper übernommen
- Die „chromosome paints“ für die humanen Chromosomen 1 und 12 wurden von Dr. Marion Cremer und Dr. Irina Solovei zur Verfügung gestellt. Paint-Proben dienen der Darstellung eines einzelnen Chromosoms bzw. bei Untersuchungen des Interphasezellkerns der CT. Sie entsprechen einer amplifizierten und markierten Ansammlung von kurzen Fragmenten dieses Chromosoms. Diese Fragmente sollten nach Möglichkeit das gesamte Chromosom repräsentieren

## 3.6 Zellkultur

### 3.6.1 Isolierung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut

#### Benötigtes Material:

- 4% Paraformaldehyd in 0,3xPBS
- 0,3xPBS
- Blutentnahmebesteck
- Heparin
- Ficoll-Paque
- Hanks-Lösung
- Filterröhrchen mit Trennscheibe
- Falconröhrchen 15 ml, 50 ml
- Falcon 3 ml Plastikpipetten
- Zentrifuge
- Sterilbank

#### Vorgehensweise:

**CAVE:** Sollen die isolierten Lymphozyten in Kultur genommen werden, erfolgen alle Arbeitsschritte in der Sterilbank! Werden sie anschließend sofort weiter verarbeitet und fixiert, ist dies nicht nötig

1. Ficoll aus dem Kühlschrank nehmen und auf RT erwärmen lassen
2. Blut abnehmen und mit einem Tropfen Heparin versetzen
3. 15 ml Ficoll in ein großes Filterröhrchen mit Trennscheibe geben
4. Filterröhrchen 30 sek bei 2400 rpm zentrifugieren, so daß sich das Ficoll unterhalb der Trennscheibe sammelt
5. das Blut zugeben
6. 15 min bei 2000 rpm zentrifugieren
7. Mononukleäre Zellen mit einer Plastikpipette abnehmen und in ein neues Falconröhrchen überführen
8. 10 ml HANKS-Lösung zugeben
9. 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren

10. Überstand bis auf einen geringen Rest abnehmen, Zellen mit einer Plastikpipette resuspendieren
11. Waschschrift mit HANKS-Lösung wiederholen
12. Zellen in 3-4 ml 50% FCS/RMPI-Medium aufnehmen und Pellet resuspendieren

### 3.6.2 Ansetzen einer Blutzellkultur

#### Benötigtes Material:

- RPMI 1640 Medium
- Fetales Kälberserum (FCS)
- Streptomycin/Penicillin
- Phytohämagglutinin
- Pipetten, 10 ml
- Falcon-Gewebekulturflasche, 50 ml (25 cm<sup>3</sup>)
- Falconröhrchen, 15 ml
- Zentrifuge
- Sterilbank
- Bunsenbrenner
- Wasserbad 37°C
- Brutschrank mit 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 80%iger Luftfeuchtigkeit

#### Vorgehensweise:

**CAVE:** Alle Arbeitsschritte erfolgen in der Sterilbank!

1. Medium vorbereiten: dazu 500 ml Medium mit 100 ml FCS (20%) und 5 ml Streptomycin/Penicillin gut mischen und auf 37°C im Wasserbad erwärmen
2. Gewebekulturflasche mit 20 ml Medium und 200 µl Phytohämagglutinin beschicken
3. Isolierte, vorbereitete Zellen (s.o.) zugeben
4. 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank wachsen lassen

### 3.6.3 BrdU-Markierung der Zellkultur

#### Benötigtes Material:

- Zellen in Kultur nach 72 h Bebrütung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>
- BrdU-Stocklösung (Konzentration 100 mM)

#### Vorgehensweise:

1. BrdU sollte in der Anwendung eine Konzentration von 10 µM besitzen; es wird demnach 1 µl BrdU-Stocklösung zu 1 ml Medium in der Zellkulturflasche gegeben. Dies entspricht einer 1:1000 Verdünnung
2. Das BrdU wird direkt in die Kulturflasche gegeben
3. Anschließend werden die Zellen für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert
4. Jetzt können die Zellen nach dem Standardprotokoll aufgetropft und fixiert werden

## 3.7 Herstellung von Interphasepräparaten

### Interphasepräparate aus den Blutlymphozyten

#### Benötigtes Material:

- 4% Paraformaldehyd in 0,3xPBS
- 0,3xPBS, 1xPBS
- Polylysin (Endkonzentration 1,25 mg/ml); zu verdünnen in Aqua bidest
- 0,5% Triton in 1xPBS
- 20% Glycerol in 1xPBS
- Flüssigstickstoff
- 0,1 N HCl-Lösung
- 2xSSC
- Aufbewahrungslösung: 50% FA in 2xSSC (pH = 7,0)
- Bunsenbrenner
- QuadriPERM Objektträgerschalen
- Dünne, geätzte Objektträger in Alkohol

### **Vorgehensweise:**

1. geätzte Objektträger aus dem Alkohol nehmen und trocknen (dazu kurz abflammen) und beschriften
2. 200 µl Polylysin-Lösung auf den Boden jedes Feldes der QuadriPERM-Schale geben
3. den Objektträger mit der beschrifteten Seite nach unten auf den Tropfen Polylysin legen, Deckel der QuadriPERM-Schale schließen
4. 1 h inkubieren bei RT
5. Aqua bidest. auf die Objektträger geben, diese hochschwemmen lassen, herausnehmen und vollständig trocknen lassen
6. 200-300 µl Zellsuspension auf das Hybridisierungsfeld des getrockneten Objektträgers geben
7. bei 37°C für 30-60 min inkubieren

### **Hypotone Behandlung und Fixierung der Zellen**

1. Objektträger für 1 min - nicht länger- in 0,3xPBS stellen
2. 10 min in 4% PFA in 0,3xPBS fixieren
3. 3 x 5 min in 1xPBS waschen

An dieser Stelle kann das Vorgehen unterbrochen werden. Die Objektträger können in 1x PBS im Kühlschrank aufbewahrt werden

### **Permeabilisierung der Zellen**

1. 20 min bei RT in 0,5% Triton in 1xPBS
2. 30 min bei RT in 20% Glycerol in 1xPBS
3. Flüssigstickstoffbehandlung: dazu die Objektträger in die Glycerol-Lösung tauchen, im Flüssigstickstoff einfrieren, auftauen lassen und erneut in die Glycerol-Lösung tauchen. Diesen Vorgang sechs Mal wiederholen.

**CAVE:** die Objektträger dürfen beim Auftauen nicht austrocknen!

4. 2 x 2 min in 1xPBS waschen
5. 7 min - exakt - in 0,1 N HCl-Lösung inkubieren
6. 2 x 3 min in 2xSSC waschen

Aufbewahrung der fertigen Objektträger in 50% FA-Lösung (siehe Material) für ca. 12 Monate möglich

## Pepsinierung der Objektträger

### Benötigtes Material:

- 1% Paraformaldehyd in 1xPBS
- Pepsin- Stocklösung (10%ig)
- Pepsin-Lösung: 49,5 ml Aqua dest., 500 µl 1 N HCl auf 37°C; kurz vor der Verwendung 10 µl der Pepsin-Stocklösung zugeben
- MgCl<sub>2</sub>-Lösung in 1xPBS (190 ml 1xPBS und 10 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung)
- 1xPBS
- 2xSSC
- QuadriPERM Objektträgerschalen

### Vorgehensweise:

**CAVE:** die Objektträger dürfen zu keinem Zeitpunkt austrocknen!

1. Objektträger 2 min in 2xSSC waschen
2. 3 min in 1xPBS waschen
3. Pepsin zur Pepsinlösung zugeben (siehe oben)
4. Objektträger in die QuadriPerm-Schalen legen und sofort mit Pepsin-Lösung bedecken
5. Objektträger ca. 2-4 min in der Pepsinlösung inkubieren  
(es empfiehlt sich, die Zellen während der Pepsinierung unter dem Mikroskop zu beobachten. Die Pepsinierung sollte spätestens beendet werden, wenn die Zellen beginnen, sich vom Untergrund zu lösen)
6. 2 x 5 min in MgCl<sub>2</sub>/1xPBS-Lösung waschen
7. Postfixieren für 10 min in 1% PFA in 1xPBS
8. 2 x 3 min in 1xPBS waschen
9. 2 x 5 min in 2xSSC waschen

Objektträger abermals zur Aufbewahrung oder vor der Verwendung in 50% FA in 2xSSC stellen

### **3.8 BAC-Sonden: von der Datenbank bis zur Hybridisierungsprobe**

BACs (bacterial artificial chromosomes) sind Plasmide, genauer gesagt Derivate des F-Faktors von E.coli. Sie können an ihrer „multiple cloning site“ DNA-Fragmente von bis zu 300 kb aufnehmen. In Zellkultur werden sie in E.coli- Zellen vermehrt (Strachan, 1996).

Die von uns verwendeten BAC-Klone von Chromosom 1 und 12 wurden mit freundlicher Genehmigung von Dr. Thomas Ried vom National Institute of Health, Maryland, zur Verfügung gestellt.

Alle BACs sind eindeutig einzelnen Bandenabschnitten des menschlichen Chromosoms 1 respektive 12 zugeordnet.

#### **3.8.1 Zuordnung der BACs zu genarmen/genreichen Bereichen der Chromosomen**

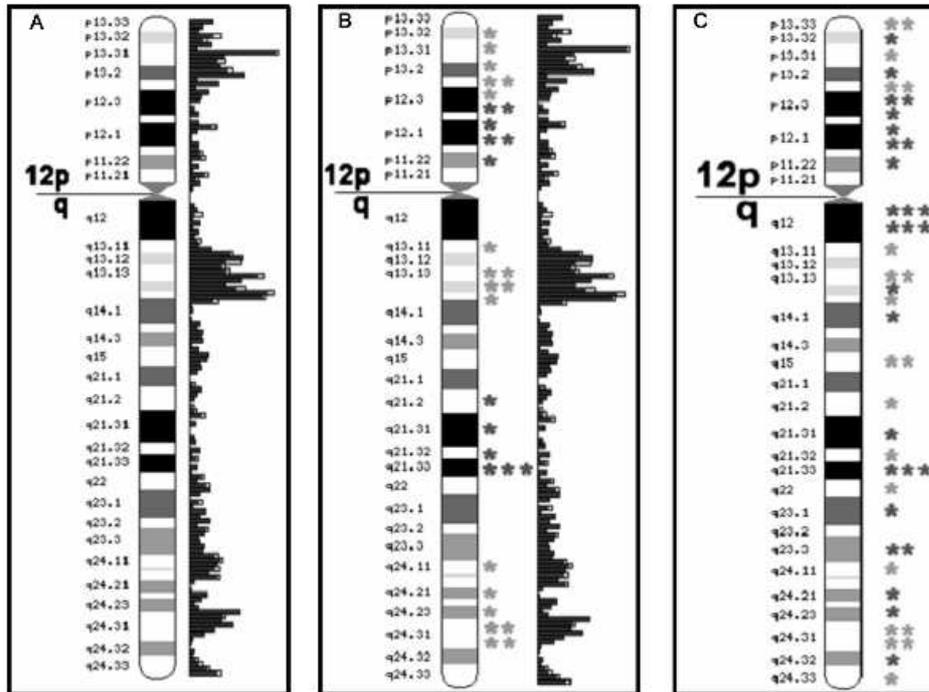
Die Gendichte variiert nicht nur zwischen den Chromosomen, sondern auch innerhalb eines Chromosoms beträchtlich. Einen Überblick über die lokalen Unterschiede in der Gendichte auf Chromosom 12 findet sich in der Abbildung 3.1.

Für die Bearbeitung der vorliegenden Fragestellung war es von grundlegender Bedeutung, Bereiche auf Chromosom 1 bzw. 12 zu wählen, die sich in ihrer Gendichte maximal voneinander unterscheiden.

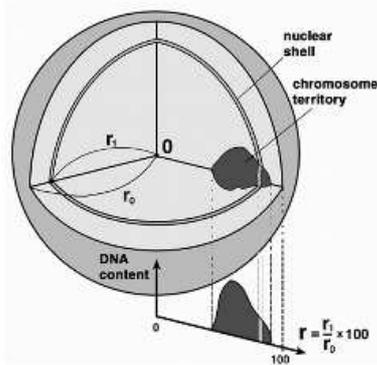
Die Auswahl und Zuordnung der BACs zu Pools wurde auf zwei Arten durchgeführt. Zum einen wurde die klassische R-/G-Bänderung zur Abschätzung der Gendichte genutzt. Zum anderen wurden Vergleiche zwischen einzelnen Chromosomenabschnitten und ihrer Genmenge laut Datenbank angestellt. Aus den so als genreich oder genarm eingestuften Chromosomenbereichen wurden BAC-Pools zusammengestellt. Sie enthalten also entweder sehr genreiche oder sehr genarme DNA.

#### **Datenbankrecherche zur Bestimmung des Gen-Gehaltes**

Eine Möglichkeit, BACs zu den Pools zuzuordnen, ist es, sich an ihrem in Datenbanken erfaßten Gen-Gehalt zu orientieren. Das bedeutet, daß BACs mit DNA-Inserts mit geringer Gendichte zusammengefaßt werden, ebenso wie mit hoher Gendichte.



**Abbildung 3.1. Ideogramme von Chromosom 12**  
**A:** Ideogramm von Chromosom 12 mit Angabe der Lokalisation der bekannten Gene (braune Balken) und der Lokalisation der erwarteten Gene (weiße Balken)  
**B:** Ideogramm von Chromosom 12 mit zusätzlicher Angabe der Lokalisation der genarmen (rot) und genreichen (grün) BAC-Pools  
**C:** Ideogramm von Chromosom 12 mit Angabe der Lokalisation der BAC-Pools von R- (grün) und G- (rot) Banden-assoziierten BACs  
 Abbildung nach Katrin Küpper, Ideogramme aus der Ensemble-Datenbank



**Abbildung 3.2. Schema der 3D-Evaluation von CT-Arrangements in kugeligen Zellen**  
 0 ist das geometrische Zentrum des Kerns. Der Kern wird in 25 Schalen unterteilt, und die Voxel in jeder Schale werden gezählt.  
 Die Position jedes Voxels wird dabei in einem relativen Radius angegeben  
 Abbildung nach M.Cremer, Chromosome Research 9, 2001

**Verwendete Datenbanken:**

- The Cancer Genome Anatomy Project (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/>)
- Ensembl- Datenbank (<http://dev.ensembl.org/perl/cytoview>)

**Vorgehensweise:**

Man lässt sich in der Datenbank einen Ausschnitt des zu untersuchenden Chromosoms anzeigen mit der in ihm enthaltenen/erwarteten Genzahl. Dadurch ist eine Vorsortierung in genreichere und genärmere Bereiche möglich. Dann verkleinert man den angezeigten Bereich zunehmend, bis man einzelne BACs genarm oder genreich zuordnen kann.

**Chromosom 1:**

Chromosomenbereich/Gendichte	Gendichte pro Mb	Verwendete BACs	BAC-Pool Nummer
1p31.3 - p31.1 (21Mb); ca. 85 Gene	4,1	28, 29, 30, 31, 32	1 (genarm)
1q31.1 – q31.3 (11Mb); ca. 30 Gene	2,7	61, 62, 63, 64	2 (genarm)
1p36.21 – p35.2 (17Mb); ca. 270 Gene	15,9	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	3 (genreich)
1p 13.3 – p13.1 (8Mb); ca. 140 Gene	17,5	39, 40, 41, 42, 43, 44	4 (genreich)
1q 21.2 – q23.3 (12Mb); ca. 360 Gene	30	48, 49, 50, 51, 52, 53	5 (genreich)

**Chromosom 12:**

Chromosomenbereich/Gendichte	Gendichte pro Mb	Verwendete BACs	BAC-Pool Nummer
12p12.3 – p11.22 (15Mb); ca. 100 Gene	6,7	9, 10, 11, 12, 13, 14	1 (genarm)
12q21.1 – q21.33 (21Mb); ca. 110 Gene	5,2	30, 31, 32, 33, 34, 35	2 (genarm)
12p13.31 – p12.3 (10,5Mb); ca. 400 Gene	38,1	3, 4, 5, 6, 7, 8	3 (genreich)
12q 13.11 – q13.3 (11Mb); ca. 345 Gene	31,4	21, 22, 23, 24, 25, 26	4 (genreich)
12q 24.11 – q24.32 (18Mb); ca. 250 Gene	13,9	40, 41, 42, 43, 44, 45, 46	5 (genreich)

## R-/G-Bänderung

Alternativ zu der Zuordnung der BACs mit Hilfe der Datenbanken kann man sich, wie oben erwähnt, auch an der R-/G-Bänderung orientieren. Charakteristischerweise enthalten R-Banden sehr viele Gene. Schätzungen gehen davon aus, daß sie bis zu 80% aller Gene beinhalten. Sie replizieren früh und stellen sich in der Giemsa-Färbung hell dar. G-Banden hingegen sind sehr Adenin- und Thyminreich, enthalten vor allem gewebespezifische Gene, und stellen sich in der Färbung dunkel dar. Für Chromosom 12 wurden BAC-Pools aus der Zuordnung zu R- oder G-Bande zusammengestellt.

Folgende Tabelle dient der Übersicht der Zuordnung der BACs zu genarm/genreich bzw zu R/G-Banden-assoziierten-BAC-Pools zusammengefaßt (Unterschiedliche Zuordnungen sind fett unterlegt):

Chromosomen-Bereich	Verwendete BACs	R-/G-Bande	BAC-Pool R-/G und Nummer-	BAC-Pool genarm/genreich (Nummer)
12p13.33 d	12/1	R	R1	-
12p13.33 c-d	12/2	R	R1	-
12p13.32 a-b	12/3	G	<b>G1</b>	<b>genreich (3)</b>
12p13.31c	12/4	R	R1	genreich (3)
12p13.2 b	12/5	G	<b>G1</b>	<b>genreich (3)</b>
12p13.1 b	12/6	R	R1	genreich (3)
12p13.1 a	12/7	R	R1	genreich (3)
12p12.3 d	12/8	G	<b>G1</b>	<b>genreich (3)</b>
12p12.3 c	12/9	G	G1	genarm (1)
12p12.3 b	12/10	G	G1	genarm (1)
12p12.1 d-c	12/11	G	G1	genarm (1)
12p12.1 c	12/12	G	G1	genarm (1)
12p12.1 b	12/13	G	G1	genarm (1)
12p11.22 a-b	12/14	G	G1	genarm (1)
12q12 c	12/15	G	G1	-
12q12 d	12/16	G	G1	-
12q12 e-f	12/17	G	G1	-
12q12 f	12/18	G	G1	-
12q12 g	12/19	G	G2	-
12q12 g-h	12/20	G	G2	-
12q13.11 b	12/21	R	R1	genreich (4)
12q13.13 c-d	12/22	R	R1	genreich (4)

12q13.13 e	12/23	R	R1	genreich (4)
12q13.2 b-c	12/24	G	<b>G2</b>	<b>genreich (4)</b>
12q13.2-13.3	12/25	R/G	-	genreich (4)
12q13.3 a-b	12/26	R	R1	genreich (4)
12q14.1 b	12/27	G	G2	-
12q15 b-c	12/28	R	R1	-
12q15 c	12/29	R	R2	-
12q21.2	12/30	R	<b>R2</b>	<b>genarm (2)</b>
12q21.31 b-c	12/31	G	G2	genarm (2)
12q21.32	12/32	R	<b>R2</b>	<b>genarm (2)</b>
12q21.33 b	12/33	G	G2	genarm (2)
12q21.33 c	12/34	G	G2	genarm (2)
12q21.33 c-d	12/35	G	G2	genarm (2)
12q22 a-b	12/36	R	R2	-
12q23.1 b-c	12/37	G	G2	-
12q23.3 b-c	12/38	G	G2	-
12q23.3 c	12/39	G	G2	-
12q24.11 b	12/40	R	R2	genreich (5)
12q24.21 b	12/41	G	<b>G2</b>	<b>genreich (5)</b>
12q24.23 a-b	12/42	G	<b>G2</b>	<b>genreich (5)</b>
12q24.31 b	12/43	R	R2	genreich (5)
12q24.31 b-c	12/44	R	R2	genreich (5)
12q24.31 d	12/45	R	R2	genreich (5)
12q24.31 e-f	12/46	R	R2	genreich (5)
12q24.32 b	12/47	G	G2	-
12q24.33 c	12/48	R	R2	-

### 3.8.2 Primäre DOP-PCR zur Amplifikation der einzelnen BACs

#### Benötigtes Material:

- Puffer D (5x), Invitrogen: Tris/HCl (300 mM)
- $MgCl_2$  (17,5 mM)
- $KCl(NH_4)_2SO_3$  (15 mM)
- pH = 8,5
- 6MW-Primer, Biotech GmbH
- Detergenz W1, Gibco BRL
- dNTPs, Roche
- Taq-Polymerase, Pharmacia Biotech
- Ampuwa- $H_2O$
- sterile 0,5 ml Eppendorf-Tubes
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Thermocycler

#### Vorgehensweise:

1. Ansetzen des Mastermixes:

Menge	Reagenz	Endkonzentration
200 $\mu$ l	Puffer D (5x)	1x
120 $\mu$ l	6 MW-Primer (17 $\mu$ M)	1,7-2 $\mu$ M
100 $\mu$ l	Detergenz W1 (1%)	0,1%
80 $\mu$ l	dNTP-Mix (je 2,5 mM)	200 $\mu$ M
450 $\mu$ l	$H_2O$	-
$\Sigma = 950 \mu$ l		

2. Ansetzen des Reaktionsansatzes: 48,5  $\mu$ l Mastermix + 1  $\mu$ l BAC-DNA (Konzentration ca. 50-100 ng DNA/ $\mu$ l)+ 1  $\mu$ l Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l); jeder BAC wird einzeln amplifiziert

### 3. PCR im Thermocycler mit folgenden Bedingungen:

Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Start-Denaturierung	96°C	3 min 00''
8	Denaturierung	94°C	1 min 00''
	Primeranlagerung	30°C	1 min 30''
	Extension	72°C	2 min 00''
35	Denaturierung	94°C	1 min 00''
	Primeranlagerung	56°C	1 min 00''
	Extension	72°C	2 min 00''
1	Schluß-Extension	72°C	5 min 00''
	Gesamtdauer		4h 15 min

#### 3.8.3 Herstellung der BAC-Pools

Von jedem primär amplifiziertem BAC eines Pools wird dieselbe Menge (z.B. 2 µl; das ergibt bei 6 BACs im Pool eine Menge von 12 µl) in ein gemeinsames Reaktionsgefäß gegeben und gemischt. Diese Mischungen sind die BAC-pre-Pools und stellen das Ausgangsmaterial für alle weiteren Schritte dar.

### 3.8.4 Sekundäre-DOP-PCR ohne Markierung (optional)

Diese PCR kann an die primäre DOP-PCR angeschlossen werden, wenn der BAC-pre-Pool für das weitere Vorgehen zu wenig DNA enthält. Alternativ wird sie vor eine Markierung mittels Nick-Translation gestellt, da bei selbiger die DNA im Vergleich zur Markierungs-DOP-PCR nur markiert und nicht amplifiziert wird.

#### Benötigtes Material:

- Puffer D (5x), Invitrogen: Tris/HCl (300 mM)  
MgCl<sub>2</sub> (17,5 mM)  
KCl(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (75 mM)  
pH = 8,5
- 6MW-Primer, Biotech GmbH
- Detergenz W1, Gibco BRL
- dNTPs, Roche
- Taq-Polymerase, Pharmacia Biotech
- Ampuwa-H<sub>2</sub>O
- 0,5 ml Eppendorf-Tubes
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Thermocycler

#### Vorgehensweise:

1. Ansetzen des Mastermixes:

Menge	Reagenz	Endkonzentration
200 µl	Puffer D (5x)	1x
120 µl	6 MW-Primer (17 µM)	1,7-2 µM
100 µl	Detergenz W1 (1%)	0,1%
80 µl	dNTP-Mix (je 2,5mM)	200 µM
450 µl	H <sub>2</sub> O	-
Σ = 950 µl		

2. Ansetzen des Reaktionsansatzes: 46,5 µl Mastermix + 3 µl BAC-Pool-DNA + 0.5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl); die BACs werden im Pool amplifiziert!
3. PCR im Thermocycler mit folgenden Bedingungen:

Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Start-Denaturierung	96°C	3 min 0''
35	Denaturierung	94°C	1 min 00''
	Primeranlagerung	56°C	1 min 0''
	Extension	72°C	2 min 00''
1	Schluß-Extension	72°C	5 min 0''
	Gesamtdauer		3 h 00 min

### 3.8.5 Markierungs-PCR (label-PCR) der BAC-Pools mit der DOP-PCR-Methode

#### Benötigtes Material:

- Cetus-II-Puffer, Roche:
  - Tris-HCl (100 mM)
  - KCl (500 mM)
  - pH = 8,3
  - MgCl<sub>2</sub>, Roche
- 6MW-Primer, Biotech
- dNTPs, Roche
- Biotin-16-UTP / Dig-11-UTP / DNP-16-UTP, Roche
- Ampuwa-H<sub>2</sub>O
- Taq-Polymerase, Pharmacia Biotech
- 0,5 ml Eppendorf-Tubes
- Thermocycler

**Vorgehensweise:**

## 1. Ansetzen des Mastermixes:

Menge	Reagenz	Endkonzentration
100 µl	Cetus-II-Puffer	50 mM KCl, 10 mM Tris
80 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 mM
100 µl	6 MW-Primer (17 µM)	1,7 µM
50 µl	ACG-Mix (je 2 mM)	100 µM
80 µl	dTTP (1 mM)	80 µM
20 µl	x-dUTP (1 mM)	20 µM
530 µl	H <sub>2</sub> O	-
Σ = 960 µl		

2. Ansetzen des Reaktionsansatzes: 47 µl Mastermix + 2,5 µl BAC-pre-Pool-DNA + 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl); die BACs werden im Pool markiert!

3. PCR im Thermocycler mit folgenden Bedingungen:

Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Start-Denaturierung	96°C	3 min 00"
35	Denaturierung	94°C	1 min 00"
	Primeranlagerung	56°C	1 min 00"
	Extension	72°C	0 min 30"
1	Schluß-Extension	72°C	5 min 00"
	Gesamtdauer		1 h 15 min

### 3.8.6 Nick-Translation zum Markierung der BAC-Pools (optional)

#### Benötigtes Material:

- 10xNT-Puffer:        5 M Tris-HCl  
                              500 mM MgCl<sub>2</sub>  
                              0,5% BSA
- dNTPs
- Biotin-16-UTP / Dig-11-UTP / DNP-16-UTP
- 0,1 M β-Mercapto-ethanol
- Polymerase I
- DNase I
- EDTA
- 1,5 ml Eppendorf-Tubes
- Styroporbox oder Wasserbad

#### Vorgehensweise:

1. Ansetzen eines Mastermixes für die Nicktranslation (DNase noch nicht zugeben)

Menge	Reagenz	Endkonzentration
x µl	DNA	800-1000ng
5 µl	10xNT-Puffer	0,5 M Tris-HCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,05% BSA
5 µl	dNTP-Mix (0,5 mM ACG +0,1 mM T)	50 µM ACG, 10 µM T
1 µl	Biotin-16-UTP (1 mM)	20 µM
5 µl	0,1 M β-Mercapto-ethanol	10 mM
x µl	H <sub>2</sub> O	-
1 µl	Polymerase I	
1 µl	DNase I (1:750 Verdünnung)	
Σ = 50 µl		

2. Reaktionsgefäß für die Nick-Translations vorbereiten; dazu Styroporbox halbvoll mit Wasser füllen und durch die Zugabe von Eis auf 15°C kühlen oder Wasserbad auf 15°C einstellen
3. DNase 1:750 verdünnen, auf Eis aufbewahren
4. DNase zum Mastermix zugeben, gut mischen und abzentrifugieren
5. Nick-Translationsansatz ca.90 min im Wasserbad bei 15°C verdauen lassen
6. Anschließend Reaktion (vorläufig) stoppen, indem die Proben auf Eis gestellt werden
7. Zur Fragmentlängenkontrolle 2 µl Probe auf einem 1% Agarose-Gel auftragen und eine Gelelektrophorese durchführen (siehe Punkt 3.8.7.)
8. Sind die Fragmente noch zu lang, muß nachverdaut werden. Dazu wird abermals 1µl 1:750 verdünnte DNase zugeben
9. Ist das Ziel, eine Ideallänge der Fragmente von ca. 600bp erreicht, kann die Reaktion endgültig durch Zugabe von 1 µl EDTA gestoppt werden

### 3.8.7 Gelelektrophorese

#### Benötigtes Material:

- Agarose
- TAE-Puffer
- 6xAuftragspuffer, enthält: 0,25% Xylencyanol (Bande läuft bei 4 kb)  
0,25% Bromphenolblau (Bande läuft bei 300 bp)  
Glycerin
- Längenmarker, hier Lamda/HindIII-DNA
- Ethidium-Stammlösung (5 mg/ml)
- Gelkammer und Gelkamm
- Transilluminator

#### Vorgehensweise:

1. Für ein 1%iges Agarosegel werden 5 g Agarose in 500 ml TAE-Puffer zum Kochen gebracht (Vorsicht: Gefahr der Siedepunktverzögerung!)
2. Anschließend das Agarosegel auf etwa 60°C abkühlen lassen
3. Flüssiges Gel in die mit Gelkämmen versehene Gelkammer gießen und aushärten lassen
4. Das Agarosegel wird in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer bedeckt

5. 3 µl des PCR-Produktes mit 1 µl Auftragspuffer mischen und in die Taschen des Gels einfüllen
6. Zur Bestimmung der Fragmentlänge 5 µl Längenmarker in eine Spur auftragen
7. Die elektrische Auftrennung erfolgt bei 130 Volt für ca. 30 min
8. Das Gel wird in einer Ethidium-Bromid-TAE-Lösung (1 Tropfen (~50 µl) Ethidium-Bromid-Stocklösung pro 50 ml TAE-Lösung) unter Lichtausschluß 15-20 min gefärbt
9. Das Gel wird für 15 min in H<sub>2</sub>O gewaschen
10. Das Gel kann nun im Transilluminator belichtet werden. Zusätzlich kann das Gel fotografiert werden

### 3.8.8 DNase Verdau der Markierungs-PCR-Produkte (optional)

Um auf die gewünschte Fragmentlänge zwischen 300 und 800 bp zu kommen, wurden die Markierungs-PCR-Produkte einem ein DNase-Kurzverdau unterzogen.

#### **Benötigtes Material:**

- Markierungs-PCR-Produkt der BAC-Pools
- 10xNT-Puffer: 5 M Tris-HCl  
500 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5% BSA
- Ampuwa-H<sub>2</sub>O
- DNase I
- EDTA (0,5 M)
- Tischzentrifuge

**Vorgehensweise:**

1. DNase 1:250 in Wasser verdünnen und auf Eis stellen
2. Ansetzen eines Reaktionsansatzes:

Menge	Reagenz
47 µl	Markierungs-PCR-Produkt
10 µl	10xNT-Puffer
40 µl	H <sub>2</sub> O
2 µl	DNase I 1:250 verdünnt

3. DNase zu dem Reaktionsansatz zugeben; für ca. 8 min bei Raumtemperatur inkubieren
4. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 1 µl EDTA (0,5 M)
5. Gelelektrophorese der Verdau-Produkte zur Längen- und Konzentrationsbestimmung

**3.8.9 Ansetzen des Hybridisierungsmixes mit den genarmen/genreichen BAC-Pools von Chromosom 1 und 12****Benötigtes Material:**

- Markierungs-PCR-Produkt der BAC-Pools
- Cot1-DNA
- Blue Stain
- Eisgekühlter 100% reiner Ethanol
- Formamid
- Mastermix = 20% Dextransulfat in 2xSSC
- Tischzentrifuge
- Heizbarer Schüttler
- Gefrierschrank
- Vacuumkonzentrator

Bei der Berechnung der einzusetzenden Mengen an Reagenzien geht man von folgenden Voraussetzungen aus:

- Von jedem BAC werden 40-80 ng DNA/ $\mu$ l Hybridisierungsmix eingesetzt  
(Anmerkung: Für Chromosom 12 wurde standardmäßig 70 ng DNA/ $\mu$ l eingesetzt, für Chromosom 1 40 ng DNA/ $\mu$ l)
- Es wird ein mindestens 20facher Cot 1-DNA Überschuß verwendet.

Rechenbeispiel für Chromosom 1:

Pool 1 von Chromosom 1 enthält 5 BACs. Es sollen 5  $\mu$ l Hybridisierungsmix hergestellt werden. Der DNA-Gehalt der markierten Probe (Markierungs-PCR-Produkt) beträgt 100ng DNA/ $\mu$ l.

Es werden gebraucht: 40 ng DNA pro  $\mu$ l Hybmix (5) pro BAC (5) entspricht für Pool 1 mit 5 BACs:

$40 \times 5 \times 5 \times 5 = 1000\text{ngDNA}$  (entspricht 10  $\mu$ l Markierungs-PCR-Produkt)

Oder anders formuliert:

Bei einem BAC-Pool mit 5 BACs und einer Ausbeute von 100 ng DNA/ $\mu$ l nach der Markierungs-PCR enthält 1  $\mu$ l PCR-Produkt 20 ng DNA pro BAC. Bei einer gewünschten DNA-Konzentration von 40 ng DNA/BAC/ $\mu$ l Hybmix müssen 2  $\mu$ l PCR-Produkt pro BAC oder 10  $\mu$ l PCR-Produkt insgesamt eingesetzt werden.

Werden 1000 ng, also 1  $\mu$ g DNA eingesetzt, beläuft sich die zu verwendende Cot-1-DNA-Menge auf 20  $\mu$ g.

### **Vorgehensweise:**

1. Ansetzen des Hybridisierungsmixes:

Berechnete Menge DNA  
+ Berechnete Menge Cot1-DNA  
+ 2 $\mu$ l Blue Stain zur Farbmarkierung  
-----

Summe in  $\mu$ l der eingesetzten Reagenzien

Das 2,5fache des Betrages dieser Summe wird in Form von 100%igem eisgekühltem Ethanol zugegeben

2. Ansatz gut durchmischen

3. über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fällen

4. Abzentrifugieren des Ansatzes bei 13000 rpm für 20 min

5. Abnehmen des Überstandes
6. Trocknen des Pellets im Vacuumkonzentrator für 5 min
7. Zugabe von Formamid; (die Hälfte des Endvolumens des Hybmixes)
8. Auf dem Schüttler das Pellet bei ca. 42°C über Nacht im Formamid lösen
9. Zugabe der anderen Hälfte des Endvolumens des Hybmixes in Form von Mastermix
10. gut vermischen

### **3.8.10 Ansetzen des Hybridisierungsmixes: genarme/genreiche BAC-Pools von Chromosom 1 und 12 MIT PAINT**

(Für eine Definition des Begriffs Paint siehe Material und Methoden Punkt 3.5.)

#### **Benötigtes Material:**

- Markierungs-PCR-Produkt der BAC-Pools
- Markierungs-PCR-Produkt vom Paint von Chromosom 1 bzw. 12
- Cot1-DNA
- Blue Stain
- Eisgekühlter 100% reiner Ethanol
- Formamid
- Mastermix = 20% Dextransulfat in 2xSSC
- Tischzentrifuge
- Heizbarer Schüttler
- Gefrierschrank
- Vacuumkonzentrator

#### **Vorgehensweise:**

Genau wie unter Punkt 3.8.9. beschrieben, werden die einzusetzenden Mengen BAC-Pool-DNA berechnet. In den Ansatz wird zusätzlich 150 ng markierte Paint-DNA pro  $\mu\text{l}$  Hybridisierungsmix (Endvolumen) gegeben. Das bedeutet beispielsweise, daß für 10  $\mu\text{l}$  Hybridisierungsmix 1500 ng markierte Paint-DNA eingesetzt werden muß. Ebenso muß die eingesetzte Cot1-DNA-Menge und in Folge auch die verwendete Ethanolmenge gesteigert werden. Das weitere Vorgehen entspricht aber exakt dem unter Punkt 3.8.9. beschriebenen.

### 3.8.11 Ansetzen des Hybridisierungsmixes: R-/G-Banden-assoziierte BAC-Pools von Chromosom 12

#### Benötigtes Material:

- Markierungs-PCR-Produkt der R1, R2, G1, G2-BAC-Pools
- Cot1-DNA
- Blue Stain
- Eisgekühlter 100% reiner Ethanol
- Formamid
- Mastermix = 20% Dextransulfat in 2xSSC
- Tischzentrifuge
- Heizbarer Schüttler
- Gefrierschrank
- Vacuumkonzentrator

Bei den Versuchen mit den R-/G-Banden zugeordneten BACs zeigte sich, daß ein festes Mischungsverhältnis von R-/und G-BACs bessere Ergebnisse lieferte, als ein äquivalenter Mengeneinsatz aller vier BAC-Pools oder ein Ansatz, bei dem wie zuvor beschrieben die eingesetzte DNA-Menge berechnet wurde. Im folgenden wird der Ansatz vorgestellt, der die besten Ergebnisse erbrachte und daher für alle Untersuchungen und FISH-Experimente verwendet wurde. Dabei ist zu beachten, daß die Bestimmung der zu verwendenden DNA-Menge mittels Gelelektrophorese mit einem Vergleichsmarker gemacht wurde.

Einzusetzende Mengen für 5 µl Hybridisierungsmix:

Menge	Reagenz
1585 ng	Dnase verdautes Produkt von R1-BAC-Pool-Markierungs-PCR
1585 ng	Dnase verdautes Produkt von R2-BAC-Pool-Markierungs-PCR
3170 ng	Dnase verdautes Produkt von G1-BAC-Pool-Markierungs-PCR
3170 ng	Dnase verdautes Produkt von G2-BAC-Pool-Markierungs-PCR
48 µg	Cot1-DNA
2 µl	Blue Stain
Σµl x 2,5	100%, reiner Ethanol

**Vorgehensweise:**

Die technische Durchführung entspricht exakt der unter Punkt 3.8.9. beschriebenen.

**3.8.12 Ansetzen des Hybridisierungsmixes: R-/G-Banden-assoziierte BAC-Pools von Chromosom 12 MIT PAINT****Benötigtes Material:**

- Markierungs-PCR-Produkt der R1, R2, G1, G2-BAC-Pools
- Markierte Paint-DNA von Chromosom 12
- Cot1-DNA
- Blue Stain
- Eisgekühlter 100% reiner Ethanol
- Formamid
- Mastermix = 20% Dextransulfat in 2xSSC
- Tischzentrifuge
- Heizbarer Schüttler
- Gefrierschrank
- Vacuumkonzentrator

Einzusetzende Mengen für 5 µl Hybridisierungsmix:

Menge	Reagenz
1585 ng	Dnase verdautes Produkt von R1-Markierungs-PCR
1585 ng	Dnase verdautes Produkt von R2-Markierungs-PCR
3170 ng	Dnase verdautes Produkt von G1-Markierungs-PCR
3170 ng	Dnase verdautes Produkt von G2-Markierungs-PCR
800 ng	Markierter Paint von Chromosom 12
56 µg	Cot1-DNA
2 µl	Blue Stain
Σµl x 2,5	100%, reiner Ethanol

### Vorgehensweise:

Die technische Durchführung entspricht exakt der unter Punkt 3.8.9. beschriebenen.

## 3.9 Von der genomischen DNA bis zur Alu-Hybridisierungssonde

### Alu-PCR Nr.1 (Sekundäre PCR ohne Markierung)

#### Benötigtes Material:

- Primer mit der folgenden Sequenz:  
Alu1: 5' GGATT ACAGG YRTGA GCCA 3'  
Alu2: 5' RCCAY TGCAC TCCAG CCTG 3' (Y = C/T; R = A/G) (Liu et al., 1993)
- 10xPuffer von Pharmacia
- dNTPs, Roche
- Ampuwa-H<sub>2</sub>O
- Taq-Polymerase, Pharmacia Biotech
- 0,5 ml Eppendorf-Tubes
- Thermocycler

### Vorgehensweise:

1. Ansetzen des Mastermixes:

Menge	Reagenz
5 µl	10xPuffer
2,5 µl	Alu1-Primer (ca. 20 µM)
2,5 µl	Alu2-Primer (ca. 20 µM)
2 µl	dNTP-Mix (5 mM)
35 µl	H <sub>2</sub> O
Σ = 47 µl	

2. Ansetzen des Reaktionsansatzes: 47 µl Mastermix + 2 µl DNA + 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

### 3. PCR im Thermocycler mit folgenden Bedingungen:

Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Start-Denaturierung	96°C	3 min 00''
35	Denaturierung	94°C	1 min 00''
	Primeranlagerung	56°C	1 min 00''
	Extension	72°C	2 min 00''
1	Schluß-Extension	72°C	5 min 00''

### Alu-PCR Nr.2 Markierungs-PCR (label-PCR)

#### Benötigtes Material:

- Primer mit der folgenden Sequenz:  
Alu1: 5' GGATT ACAGG YRTGA GCCA 3'  
Alu2: 5' RCCAY TGCAC TCCAG CCTG 3' (Y=C/T; R=A/G) (Liu et al., 1993)
- Cetus-II-Puffer, Roche: Tris-HCl (100 mM)  
KCl (500 mM)  
pH = 8,3
- MgCl<sub>2</sub>, Roche
- TAMRA-dUTP
- dNTPs, Roche
- Ampuwa-H<sub>2</sub>O
- Taq-Polymerase, Pharmacia Biotech
- 0,5 ml Eppendorf-Tubes
- Thermocycler

**Vorgehensweise:**

## 1. Ansetzen des Mastermixes:

Menge	Reagenz
5 µl	Cetus-II-Puffer
4 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
3 µl	Alu1-Primer (ca. 20 µM)
3 µl	Alu2-Primer (ca. 20 µM)
2,5 µl	ACG-Mix (2 mM)
4 µl	dTTP (1 mM)
3 µl	TAMRA-dUTP (1 mM)
23 µl	H <sub>2</sub> O
Σ = 47,5 µl	

2. Ansetzen des Reaktionsansatzes: 47,5 µl Mastermix + 2 µl DNA + 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl);

3. PCR im Thermocycler mit folgenden Bedingungen:

Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Start-Denaturierung	96°C	3min 00''
20	Denaturierung	94°C	1min 00''
	Primeranlagerung	56°C	1min 00''
	Extension	72°C	0min 30''
1	Schluß-Extension	72°C	5min 00''

## DNase-Verdau der Alu-Markierungs-PCR-Produkte

### Benötigtes Material:

- Alu-Markierungs-PCR-Produkt
- 10xNT-Puffer: 5 M Tris-HCl  
500 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5% BSA
- Ampuwa-H<sub>2</sub>O
- DNase I
- EDTA
- Tischzentrifuge

### Vorgehensweise:

1. DNase 1:250 in Wasser verdünnen und auf Eis stellen
2. Ansetzen eines Reaktionsansatzes:

Menge	Reagenz
48 µl	Alu-Markierungs-PCR-Produkt
10 µl	10xNT-Puffer
38 µl	H <sub>2</sub> O
4 µl	DNase I 1:250 verdünnt

3. DNase zu dem Reaktionsansatz zugeben; 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
4. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 1 µl EDTA

## Ansetzen des Alu-Hybridisierungsmixes

### Benötigtes Material:

- DNase verdautes Alu-Markierungs-PCR-Produkt
- Formamid
- Mastermix = 20% Dextransulfat in 2xSSC
- Heizbarer Schüttler
- Vacuumkonzentrator

**Vorgehensweise:**

1. 50 µl des DNase verdauten Alu-PCR-Produktes für 40 min im Vacuumconcentrator trocknen
2. 5 µl Formamid zugeben
3. bei ca. 40°C auf dem beheizbaren Schüttler lösen
4. 5 µl Mastermix zugeben und gründlich mischen

**3.10 2D-FISH mit BAC-Hybridisierungsmixen****3.10.1 Simultane Denaturierung und Hybridisierung****Benötigtes Material:**

- Hybridisierungsmix
- Metaphasepräparate
- Deckgläser 15 x 15mm
- Montagekleber Fixogum
- Thermocycler auf 85°C
- Wasserbad bei 37°C
- Eis
- Hotblock auf 76°C
- Metallbox
- Diamantstift

**Vorgehensweise:**

1. Auf dem Objektträger Regionen mit besonders schönen Metaphasen mittels Diamantstift markieren
2. den Hybridisierungsmix im Thermocycler für 5 min auf 85°C erwärmen
3. danach den Hybridisierungsmix kurz abzentrifugieren und auf Eis stellen
4. 2,5 µl Hybridisierungsmix auf die markierten Areale des Objektträgers geben und mit einem Deckgläschen abdecken
5. mit Fixogum das Deckgläschen gut umrahmen und auf diese Weise luftdicht abschließen. Fixogum gut trocknen lassen
6. die Objektträger für 2 - 2min 30" auf den Hotblock bei 76°C legen
7. anschließend die Objektträger sofort in eine Metallbox legen

8. bei 37°C im Wasserbad mindestens über Nacht hybridisieren lassen

### 3.10.2 Waschungen und Detektion

**CAVE:** ES IST VON GRÖßTER WICHTIGKEIT, DARAUF ZU ACHTEN, DAß DER OBJEKTTRÄGER ZU KEINEM ZEITPUNKT DES VERFAHRENS AUSTROCKNET!

#### **Benötigtes Material:**

- Waschlösungen: 2xSSC (auf 37°C vorgewärmt)  
0,1xSSC (auf 60°C vorgewärmt)  
4xSSC/Tween (0,2% Tween20 in 4xSSC, auf 37°C vorgewärmt)
- Blockierungslösung (4% BSA in 4xSSC/Tween)
- Antikörperverdünnungslösung (2% BSA in 4xSSC/Tween)
- DAPI-Färbelösung
- Parafilm
- Feuchte Kammer
- Antifade-Medium (Vectashield)
- Deckgläser 60 x 22 mm
- farbloser Nagellack
- Glasküvetten
- Wasserbad 37°C/60°C
- Schüttler
- spitze Pinzette
- Fixogum

#### **Vorgehensweise:**

1. Fixogum mit spitzer Pipette abziehen und Deckgläser abnehmen
2. 2 x 3 min bei 37°C in 2xSSC waschen, dabei auf dem Schüttler bewegen
3. 3 x 5 min bei 60°C in 0,1xSSC waschen, dabei auf dem Schüttler bewegen
4. kurz in 4xSSC bei 37°C equilibrieren
5. 15 min Blocken in 4% BSA in 4xSSC/Tween bei 37°C
6. aus der Antikörper-Stocklösung die passende Verdünnung in 2%BSA Lösung (in 4xSSC/Tween) erstellen

7. die Verdünnung für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugieren, um evtl. gebildete Konglomerate zu fällen
8. 150 µl der Verdünnung auf den Objektträger auftragen
9. mit Parafilm den Objektträger gut abdecken
10. den Objektträger bei 37°C in einer feuchten, dunklen Kammer 30-45 min inkubieren
11. Anschließend 3 x 5 min in 4xSSC/Tween im Dunkeln waschen (37°C, Schüttler)
12. DAPI-Lösung ansetzen: DAPI-Stock-Lösung in 4xSSC/Tween auf 0,05 µg/ml verdünnen
13. Präparate 2 min in vorgewärmter DAPI-Lösung (in 4xSSC/T) färben
14. Objektträger mit H<sub>2</sub>O dest. gründlich abspülen und im Dunkeln gut lufttrocknen lassen
15. Mit Vectashield (Antifade) 1-2 große Tropfen pro Objektträger unter einem Deckglas einbetten
16. das Deckglas mit farblosen Nagellack versiegeln

### 3.11 3D-FISH mit BAC-Hybridisierungsmixen

#### 3.11.1 Ansetzen der Hybridisierung

**CAVE:** DIE 3D-FISH-HYBRIDISIERUNG WIRD IM ALLGEMEINEN AUF DÜNNEN OBJEKTTRÄGERN DURCHGEFÜHRT. DIESE SIND EXTREM BRUCHGEFÄHRDET UND MÜSSEN DEMENTSPRECHEND VORSICHTIG BEHANDELT WERDEN!

#### **Benötigtes Material:**

- Hybridisierungsmix
- Fixierte Zellpräparate auf Coverslips in 50% Formamid in 2xSSC
- 70%iges Formamid in 2xSSC (auf 72°C vorgewärmt)
- Glasküvetten
- Wasserbad 37°C/72°C
- Thermocycler auf 85°C
- Eis
- Deckglas 18 x 18 mm
- Montagekleber Fixogum
- Metallbox
- spitze Pinzette und Kleenextücher

**Vorgehensweise:**

1. 70% Formamid in 2xSSC (pH 7,0) aus dem Eisfach nehmen und auf RT erwärmen
2. Sodann auf 70°C im Wasserbad erhitzen - das dauert etwa 30min
3. (VORSICHT: Die Küvette nicht zu kalt in das erwärmte Wasserbad stellen, da sie sonst zerspringen kann)
4. Hybridisierungs-Mix für 5 min auf 85°C erhitzen
5. kurz auf Eis stellen, dann kurz abzentrifugieren
6. 20 min bei 37°C ins Wasserbad stellen (preannealing)
7. nach Ablauf dieser Zeit bis zum Auftragen auf Eis lagern
8. Objektträger für 2min in das 70°C-warme Formamid stellen
9. Objektträger zurück in die 50% Formamid-Küvette bis zum Auftragen stellen
10. 3µl Hybridisierungsmix auf das Deckgläschen geben
11. Objektträger aus dem 50%igen Formamid nehmen und auf ein Kleenextuch legen
12. sodann das Deckgläschen mit dem Hybridisierungsmix umgedreht auf den Objektträger legen
13. mit weiteren Kleenextüchern das überschüssige Formamid abtupfen (Es ist dabei von äußerster Wichtigkeit, schnell und präzise zu arbeiten und das Hybridisierungsfeld NIEMALS austrocknen zu lassen!)
14. das Hybridisierungsfeld mit Fixogum versiegeln
15. bei 37°C mindest über 2 Nächte hybridisieren lassen

### 3.11.2 Waschungen und Detektion:

**CAVE:** ES IST VON GRÖßTER WICHTIGKEIT, DEN OBJEKTTRÄGER ZU KEINEM ZEITPUNKT DES VERFAHRENS AUSTROCKNEN ZU LASSEN!

Zusätzlich beachte man, daß der Objektträger sehr dünn ist und leicht zerbricht.

#### **Benötigtes Material:**

- Waschlösungen: 2xSSC (auf 37°C vorgewärmt)  
0,1xSSC (auf 60°C vorgewärmt)  
4xSSC/Tween (0,2% Tween20 in 4xSSC, auf 37°C vorgewärmt)
- 1xPBS/Tween (0,2% Tween 20 in 1xPBS, auf 37°C vorgewärmt)
- Blockierungslösung (4% BSA in 4xSSC/Tween)
- Antikörperverdünnungslösung in 2% BSA in 4xSSC/Tween
- Antikörperverdünnungslösung in 2% BSA in 1xPBS/Tween
- TO-PRO-, YOYO-, SYTO- und DAPI-Färbelösungen
- Parafilm
- Feuchte Kammer
- Antifade-Medium (Vectashield)
- Deckgläser 60 x 22 mm
- farbloser Nagellack
- Glasküvetten
- Wasserbad 37°C/60°C
- Schüttler
- spitze Pinzette
- Fixogum

#### **Vorgehensweise:**

Die Vorgehensweise entspricht der bei 2D-FISH.

Es ist nur wichtig darauf zu achten, daß manche der Antikörper in PBS statt SSC verdünnt werden müssen. Wird ein solcher Antikörper verwendet, so sollten die Objektträger zuvor aus dem SSC genommen und in PBS equilibriert werden.

Verdünnt werden die folgenden Farben für die Gegenfärbung in der Lösung, in der der letzte Antikörper verdünnt wurde (SSC oder PBS)

Endkonzentration	Counterstain	Inkubationsdauer
0.05 µM/ml	DAPI	3 min
1 µM/ml	TO-PRO	5 min
10 µM/ml	SYTO	15 min
5 nm/µl	YOYO	40 min

### 3.11.3 Schema der standardmäßig verwendeten Antikörper und Fluorochrome

#### Versuche mit genarmen und genreichen BACs von Chromosom 12

Genarme BACs markiert mit Digoxigenin

Genreiche BACs markiert mit Biotin

Verwendete Antikörper und Fluorochrome:

Schicht	Lösung für AK	Antikörper	Verdünnung	Inkubationsdauer
1	2% BSA in 4xSSC	Mouse $\alpha$ Digoxigenin-Cy3	1:100	35 min
1	2% BSA in 4xSSC	Avidin-Cy5	1:200	35 min
2	2% BSA in 4xSSC	Sheep $\alpha$ Mous-Cy3	1:500	35 min
2	2% BSA in 4xSSC	Goat $\alpha$ Avidin-Bio	1:200	35 min
3	2% BSA in 4xSSC	Avidin-Cy5	1:200	35 min

Gegenfärbung mit YoYo (siehe Punkt 3.11.2.)

## Versuche mit genarmen und genreichen BACs und Paint von Chromosom 12

Genarme BACs markiert mit Digoxigenin

Genreiche BACs markiert mit Biotin

Paint markiert mit DNP

Verwendete Antikörper und Flouochrome:

Schicht	Lösung für AK	Antikörper	Verdünnung	Inkubationsdauer
1	2% BSA in 4xSSC	Mouse $\alpha$ Digoxigenin-Cy3	1:100	35 min
1	2% BSA in 4xSSC	Avidin-Cy5	1:200	35 min
1	2% BSA in 4xSSC	Rabbit $\alpha$ DNP	1:200	35 min
2	2% BSA in 4xSSC	Sheep $\alpha$ Mouse-Cy3	1:500	35 min
2	2% BSA in 4xSSC	Goat $\alpha$ Avidin-Bio	1:200	35 min
2	2% BSA in 4xSSC	Goat $\alpha$ Rabbit-FITC	1:100	35 min
3	2% BSA in 4xSSC	Avidin-Cy5	1:200	35 min

## Versuche mit R- und G-Banden-assoziierten BACs von Chromosom 12

R-Banden-assoziierte BACs markiert mit Digoxigenin

G-Banden-assoziierte BACs markiert mit DNP

Verwendete Antikörper und Flouochrome:

Schicht	Lösung für AK	Antikörper	Verdünnung	Inkubationsdauer
1	2% BSA in 4xSSC	Mouse $\alpha$ Digoxigenin-Cy3	1:100	35 min
1	2% BSA in 4xSSC	Rabbit $\alpha$ DNP	1:200	35 min
2	2% BSA in 4xSSC	Sheep $\alpha$ Mouse-Cy3	1:500	35 min
2	2% BSA in 4xSSC	Goat $\alpha$ Rabbit-FITC	1:100	35 min

Gegenfärbung mit TO-PRO (siehe Punkt 3.11.2.)

## Versuche mit R- und G-Banden-assoziierten BACs und Paint von Chromosom 12

R-Banden-assoziierte BACs markiert mit Digoxigenin

G-Banden-assoziierte BACs markiert mit DNP

Paint markiert mit Biotin

Verwendete Antikörper und Flouochrome:

Schicht	Lösung für AK	Antikörper	Verdünnung	Inkubationsdauer
1	2% BSA in 4xSSC	Mouse $\alpha$ Digoxigenin-Cy3	1:100	35 min
1	2% BSA in 4xSSC	Avidin-Cy5	1:200	35 min
1	2% BSA in 4xSSC	Rabbit $\alpha$ DNP	1:200	35 min
2	2% BSA in 4xSSC	Sheep $\alpha$ Mouse-Cy3	1:500	35 min
2	2% BSA in 4xSSC	Goat $\alpha$ Avidin-Bio	1:200	35 min
2	2% BSA in 4xSSC	Goat $\alpha$ Rabbit-FITC	1:100	35 min
3	2% BSA in 4xSSC	Avidin-Cy5	1:200	35 min

## Versuche mit Ki67-Nachweis

Der Ki67-Nachweis schließt sich an die vorausgegangenen Antikörper-Nachweise an. Er wird allerdings in PBS durchgeführt, so daß nach den vorherigen Schritten in 4xSSC die Objektträger zunächst in PBS umgepuffert werden müssen.

Verwendete Antikörper und Flouochrome:

Schicht	Lösung	Antikörper	Verdünnung	Inkubationsdauer
1	2% BSA in PBST	Mouse $\alpha$ Ki67	1:50	35 min
2	2% BSA in PBST	Goat $\alpha$ Mouse-AMCA oder Goat $\alpha$ Mouse-ALEXA350	1:100	35 min

## Versuche mit BrdU-Nachweis

Der BrdU-Nachweis schließt sich ebenso wie der Ki67-Nachweis an die vorausgegangenen Antikörper-Nachweise an. Er kann parallel mit dem Ki67-Nachweis durchgeführt werden. Er wird in PBS durchgeführt, so daß nach den vorherigen Schritten in 4xSSC die Objektträger zunächst in PBS umgepuffert werden müssen.

Verwendete Antikörper und Flouochrome:

Schicht	Lösung	Antikörper	Verdünnung	Inkubationsdauer
1	2% BSA in PBST	Mouse $\alpha$ BrdU	1:100	35 min
2	2% BSA in PBST	Goat $\alpha$ Mouse-AMCA oder Goat $\alpha$ Mouse-ALEXA350	1:100	35 min

## Versuche mit DAPI-Gegenfärbung

Wird der AMCA-Kanal nicht für den Ki67- oder BrdU-Nachweis benötigt, ist es möglich, die Zellen auf den Objektträgern mit DAPI zu färben. Damit erleichtert man sich das Auffinden der Zellen unter dem Epifluoreszenzfilter des konfokalen Mikroskopes.

## **3.12 Mikroskopie**

### **3.12.1 Epifluoreszenzmikroskopie für 2D-FISH-Versuche**

Mit dem zur Verfügung stehenden Epifluoreszenzmikroskop Axiophot 2 können die Metaphase der 2D-Versuche durch folgende Fluoreszenzfilter betrachtet werden: DAPI, FITC, Cy3, Triple Filter, Cy5. Für genauere Angaben bezüglich der anregenden Wellenlänge siehe auch Material, Mikroskope. Die durch das Mikroskop betrachteten Metaphasen können mit einer CCD-Kamera und mit Hilfe der Software „Cytovision“ abfotografiert werden. Eine Bearbeitung der erhaltenen digitalen Bilder ist in „Image J“ möglich.

### **3.12.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie**

Mit dem Zeiss LSM-410-Mikroskop können die Zellen dreidimensional aufgenommen werden. Das Mikroskop verfügt über drei Filtersysteme, die die Mikroskopie mit dem Laser in den Wellenlängen von Cy3, Cy5 und FITC unterstützen. Zusätzlich gibt es einen Epifluoreszenzfilter, der anstelle des Lasers angeschaltet werden kann und der es ermöglicht, Zellen im DAPI/FITC-Kanal vor der Laser-Mikroskopie anzusehen.

Im allgemeinen werden Zellen mit einer Schichtdicke von 0,2 µm aufgenommen. In einzelnen Fällen wird bei sehr großen Zellen auch eine Schichtdicke von 0,25 µm gewählt. Die Vergrößerung/Zoom sollte zwischen 8 für sehr große Zellen und 16 für kleine Zellen liegen. Er wird zu jeder aufgenommenen Zelle ebenso wie die verwendete Schichtdicke notiert.

## **3.13 Bearbeitung und Auswertung der mit FISH und der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie gewonnenen Daten**

### **Prinzip:**

Die mit der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie gewonnenen Daten müssen für die Auswertung und Messung bearbeitet werden. Dazu gehört die Shift-Korrektur, die Helligkeits- und Kontrastkorrektur, die Hintergrundreduktion sowie u. U. die Filterung der Daten. Im folgenden dann werden die Schwellenwerte für die Objekte angepaßt, ihre Lage und Helligkeit vermessen und ausgewertet.

### **Benötigte Programme:**

- Image J
- 3D RRD
- ADS

### **Ausgangsmaterial:**

Für jede Zelle sind drei voneinander unabhängige Datensätze gewonnen worden. Sie entsprechen den drei Kanälen Cy3, Cy5 und FITC. In einem Kanal wurde die Gegenfärbung des Zellkerns bzw. die Signale des Paints erfaßt. Diese Daten werden in Zukunft der Einfachheit halber als Gegenfärbung bezeichnet. Die Ausmaße der Gegenfärbung bzw. des Paints dienen als Basis der Berechnungen. Das heißt, daß die Lage der in den beiden übrigen Kanälen erfaßten BAC-Signale in Beziehung zu dieser Basis gesetzt und berechnet wird.

#### **3.13.1 Vorgehen in Image J**

(Die Befehlsketten zu den einzelnen Schritten der Auswertung werden in Klammern angegeben)

Zunächst werden die Daten einer sog. Shift-Korrektur unterzogen. Unter Shift versteht man die chromatische Aberration des Mikroskops. Der jeweilige Shift wird mittels Scanning von Beads mit verschiedenen Schnittdicken bestimmt. Details zum genauen Vorgehen finden sich in der Diplomarbeit von Claudia Weierich (Weierich, 2002).

Der Shift wurde empirisch festgestellt und in der vorliegenden Arbeit korrigiert, indem von den aufgenommenen Bilderfolgen (stacks) folgende Bilder verworfen werden:

FITC-Kanal	das letzte und das vorletzte Bild
Cy3-Kanal	das erste und das letzte Bild
Cy5-Kanal	die ersten beiden Bilder

Anschließend werden die einzelnen Stacks in Image J geöffnet. Unter einem Stack versteht man den „Stapel“ der einzelnen vom Mikroskop aufgenommenen Bilder. Diese werden wie in einem Kartenstapel so aneinander gereiht, daß sie nacheinander durchgesehen werden können.

(File → Import → Image Sequence (Convert to 8-bit Grayscale))

Zunächst kann das Hintergrundrauschen der Daten verringert werden. Dazu wird ein neuer Minimalwert ausgewählt, der die untere Grenze der gezeigten Grauwerte angibt.

(Image → Adjust → Brightness/ Contrast → set (minimum displayed value) → ok → apply)

Die Signale in den Stack-Bildern können zusätzlich in ihrer Helligkeit und in ihrem Kontrast bearbeitet werden.

(Image → Adjust → Brightness/ Contrast → apply)

Hierbei ist zu beachten, daß nach Veränderungen stets „apply“ ausgeführt wird, da diese sonst nicht abgespeichert werden. In einem letzten Schritt können die Bilder bei Bedarf noch gefiltert werden. Der Gaussian Blur Filter verrechnet die Helligkeitswerte zweier benachbarter Pixel. Dadurch werden einzelne sehr helle Werte in sehr dunkler Umgebung dunkler und umgekehrt. Es reduziert sich somit das Hintergrundrauschen sowie unnatürliche Spitzenwerte. Dadurch muß später der Schwellenwert weniger hoch angesetzt werden.

(Process → Filters → Gaussian Blur)

Die fertig bearbeiteten Stacks werden gespeichert.

Es gibt nun die Möglichkeit, die Bilder, die sich nur schwarz-weiß darstellen, als farbiges RGB-Bild zusammenzufügen.

(Plugins → Color → RGB-Merge → Stacks den gewünschten Farben zuordnen → ok)

### **3.13.2 Quantitative Evaluation der Radialverteilung von Fluoreszenzsignalen mittels des „3D-relative radial distance“ (3D-RRD) -Programms**

#### **Verwendete Begriffe:**

Mittelwert: das arithmetische Mittel aller erfaßten Werte

Median: 50% aller erfaßten Werte sind größer, 50% kleiner als der Median-Wert

Voxel: kleinste Einheit im dreidimensionalen Bild (entspricht dem zweidimensionalen Pixel)

Objekt: Zusammenfassung aller Voxel, die sich zu einem dreidimensionalen Gebilde formieren und z.B. einem BAC-Pool Signal entsprechen

segmentiertes Objekt: ein Objekt, dessen räumliche Ausdehnung in mehrere Schalen verteilt wurde

Element = Objekt

### **Prinzip der 3D-Relativen Radialen Verteilungsmessung:**

Die relative radiale Verteilung der BACs in Bezug auf das Chromosomenterritorium oder den gesamten Zellkern kann mit dem 3D-RRD-Programm von Dr. Johann von Hase (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Cremer, Kirchhoff-Institut für Physik, Universität Heidelberg in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Cremer, Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universität München) bestimmt werden. Mit diesem Programm werden relative dreidimensionale Entfernungen von segmentierten Objekten zum Zellkern-/bzw. Territoriumszenrum bestimmt. Dadurch kann man z.B. eine Aussage darüber treffen, ob Voxel A peripherer in Bezug auf das Zentrum liegt als Voxel B.

Siehe auch Abbildung 3.2. auf Seite 34.

### **Vorgehen: Setzen des Schwellenwertes**

Um die Objekte von Interesse vom Hintergrundrauschen abzuheben, muß man einen Schwellenwert definieren. Alle Voxel, die diesen unterschreiten, werden gleich null gesetzt. Dazu ist es hilfreich, das Hintergrundrauschen zuvor in ImageJ heruntergesetzt und korrigiert zu haben (siehe oben).

Das Programm „3dthresh.sh“ geht zur Schwellenwertbestimmung folgendermaßen vor: (siehe auch Abbildung 3.3.)

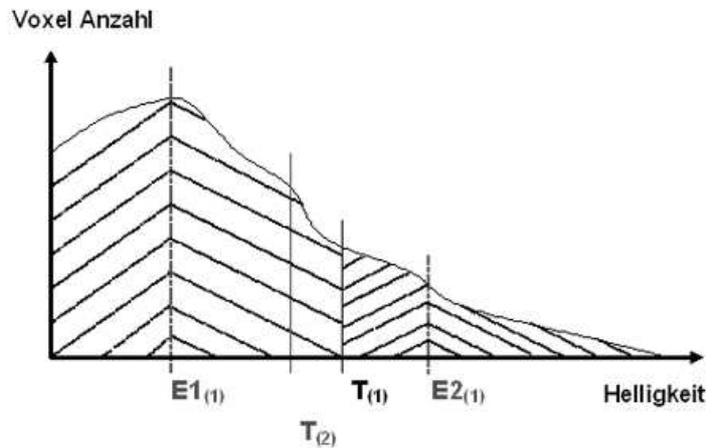
Zunächst wird ein vorläufiger Schwellenwert T1 errechnet, der der mittleren Voxel-Intensität aller Voxel des Datensatzes entspricht. Dann berechnet das Programm die Mittelwerte aller Voxelintensitäten, die oberhalb bzw. unterhalb von T1 liegen und ermittelt so die Werte E1(1) und E2(1). Dabei beschreibt E1(1) die mittlere Intensität des Hintergrundes, wogegen E2(1) für die mittlere Intensität des zu berechnenden Signals steht.

In einem weiteren Schritt bildet der Computer den Mittelwert von E1(1) und E2(1) und erhält so einen neuen, wiederum vorläufigen Schwellenwert T2. Es werden nun neue E1(2) und E2(2)-Werte bestimmt, die sich jetzt auf T2 beziehen. Dieses Vorgehen wird solange wiederholt, bis sich der Schwellenwert Tx nicht mehr ändert, d.h., er konvergiert.

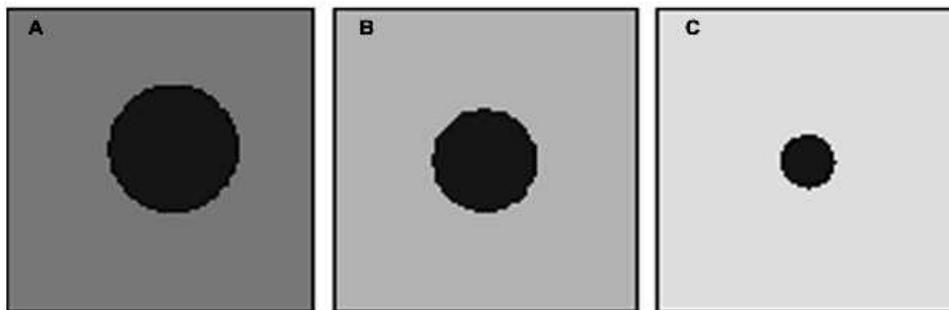
Als Bediener hat man hierbei die Möglichkeit einzugreifen und den Schwellenwert T zu verändern, indem man die Gewichtung von E1 zu E2 bei der Berechnung von T verschiebt.

$$T = (1-V) \times E1 + V \times E2$$

Setzt man  $V=0,5$  bedeutet dies, daß E1 und E2 bei der Berechnung von T gleich stark gewichtet werden. D. h., der Intensitäts-Mittelwert und der Mittelwert des zu erfassenden Signals werden gleich gewichtet. Erhöht man V, so resultiert daraus durch eine höhere Gewichtung von E2. Der Intensitäts-Mittelwert des zu erfassenden Objekts geht also stärker in die Berechnung ein als der Mittelwert des Hintergrundes. Es ergibt sich ein höherer



**Abbildung 3.3. Darstellung des Vorgehens beim Setzen eines Schwellenwertes**  
 Erklärung siehe Text  
 Abbildung nach Johann von Hase, Doktorarbeit an der Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg, 2002



**Abbildung 3.4. Darstellung des Verlustes von Objektinformation beim Setzen eines Schwellenwertes zur Reduktion des Hintergrundrauschens**

Farbverteilung A-C: Hintergrundrauschen: Graustufen; Objekt: blau

**A:** Ausgangsbefund: Objekt in seiner Originalgröße, umgeben von einem Hintergrundrauschen

**B:** Reduktion des Hintergrundrauschens durch Setzen eines Schwellenwertes. Das Hintergrundrauschen nimmt ab, gleichzeitig geht Objektinformation verloren, das Objekt wird kleiner

**C:** Das Hintergrundrauschen wurde wie für die Auswertung nötig auf null reduziert. Gleichzeitig ist, wie deutlich zu sehen, Objektinformation verloren gegangen

Schwellenwert. Praktisch folgt daraus, daß die Objekte kleiner werden. Erniedrigt man umkehrt  $V$ , so wird der berechnete Schwellenwert niedriger, das Objekt größer.

Um den optimalen  $V$ -Wert zu bestimmen, vergleicht man für jeden einzelnen Kanal den mit verschiedenen Schwellenwerten behandelten Datensatz mit dem Rohdatensatz.

Beispiel:

Hat man ein sehr klares Signal bei wenig Hintergrundrauschen, so kann man  $V$  z.B. gleich 0,1 setzen. Das Objekt erscheint in seiner vollen Größe.

Ist das Signal allerdings von starkem Hintergrundrauschen überschattet, so muß man den Wert für  $V$  hoch setzen. Daraus resultiert ein hoher Schwellenwert. Der Hintergrund ist damit gleich null, gleichzeitig ist aber auch Objektinformation verloren gegangen und das Objekt ist kleiner (siehe Abbildung 3.4. auf Seite 68).

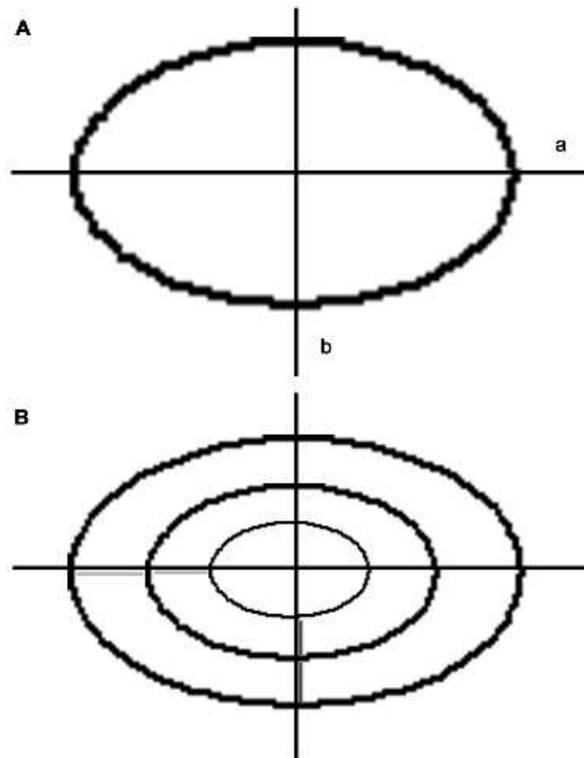
Gleichzeitig mit der Schwellenwertkorrektur werden die Grenzen der Objekte geebnet, indem die Datensätze durch einem Gaussian Filter laufen. Dazu wird die Gegenfärbung des Zellkerns oder der Territoriumspaint durch einen drei-stufigen-Filter geschickt (Maske: [1 4 6 4 1], [1 0 4 0 6 0 4 0 1] und [1 0 0 0 4 0 0 0 6 0 0 0 4 0 0 0 1]). Die BAC-Signale werden nur einfach gefiltert (Maske: [1 4 6 4 1]).

Um die Zellkerngrenze/Territoriumsgrenze eindeutig zu definieren, wird zusätzlich der Intensität-Schwerpunkt des Kerns/Territoriums aus dem schon schwellenwertkorrigierten Datensatz der Gegenfärbung errechnet. Jeder Voxel innerhalb und außerhalb des Zellkerns/Territoriums wird durch eine gerade Linie mit diesem Schwerpunkt verbunden. Durchläuft eine der gezogenen Linien einen Voxelbereich, der zuvor bei der Schwellenwertkorrektur gleich null gesetzt wurde und somit als außerhalb des Zellkerns/Territoriums klassifiziert wurde, so wird der untersuchte Voxel am Ende der Linie gleich null gesetzt. Damit möchte man erreichen, daß helle Punkte im Hintergrund, deren Helligkeitswerte den Schwellenwert überschreiten und damit nicht entfernt wurden, nicht in die Berechnungen mit einbezogen werden.

Auf diese Weise werden auch die Objektgrenzen, hier die der BAC-Signale, klar definiert.

### **Vorgehen bei der Segmentierung**

Bei der Segmentierung wird das Volumen des Zellkerns in 25, das des Territorium in 15 Schalen unterteilt. Die Schalen sind konzentrisch und geben die Größenverhältnisse (relativ!) gleich dem Objekt, auf das sie zurückgehen, wieder. Zum leichteren visuellen Verständnis konsultiere man bitte auch die Abbildung 3.5. auf Seite 70.



**Abbildung 3.5. Darstellung der Schalenbildung bei 3D-RRD**

**A:** Das Objekt wird durch das Verhältnis seiner Quer- (a) zu seiner Längsachse (b) definiert  
**B:** Das Achsenverhältnis wird bei der Segmentierung beibehalten. In jeder Schale bleibt das Verhältnis von Längs- zu Querachse erhalten. Die Schalen sind jedoch nicht äquidistant. Das bedeutet, daß jeweils die beiden roten Striche gleich lang sind und die beiden gelben Striche. Im Vergleich sind aber rote und gelbe Striche nicht gleich lang.

Man stelle sich ein Ellipsoid vor, das durch das Verhältnis der kleinen (y und z) zu der großen Halbachsen (x) charakterisiert ist. Der Durchmesser des Ellipsoids in Richtung x-Achse größer ist als in Richtung y-Achse. Unterteilt man nun dieses Ellipsoid in Schalen, so ist der Durchmesser der Schale an der großen Halbachse größer als an den kleinen Halbachsen. Das Verhältnis von Längs- zu Querachse im Objekt wird also in den Schalen übernommen. Die Dicke jeder Schale ist dabei gleich, vergleicht man sie mit der Dicke an genau dem gleichen Punkt an einer anderen Schale. Die Schalen sind jedoch nicht äquidistant. Das bedeutet, daß die Schalen von sich entsprechenden Punkten auf der Schalenoberfläche die gleiche Ausdehnung zur nächsten Schale besitzen, daß dieser Wert aber je nach betrachtetem Punkt auf der Schale variiert (dies ist der grundsätzliche Unterschied zum ADS-Programm).

Folglich nehmen die Schalen auch nicht an jeder Stelle das gleiche Volumen ein. Weiter außen liegende Schalen beinhalten ein größeres Volumen als innen liegende. Dies entspricht wieder dem Verhältnis der Längs- zu Querachsen.

Nachdem die Zellen segmentiert, d.h., in Schalen unterteilt wurden, wird jedes Voxel seiner Schale, also der Schale, in der es zu liegen kommt, zugeordnet.

### **Vorgehen: Berechnung der relativen radialen Entfernungen**

Da das Programm 3D-RRD grundsätzlich nur mit relativen Radien arbeitet, müssen alle absoluten Entfernungen von Voxeln zum Zellkern-/Territoriumszenrum in relative Entfernungen umgerechnet werden. Dazu wird die absolute Distanz eines Voxels durch die Distanz geteilt, die zwischen diesem Voxel und dem maximal entfernten auf einer Linie durch das Zentrum liegenden Voxel x besteht.

Es ergeben sich Werte zwischen null (das Voxel liegt im Zentrum) und 1 (das Voxel liegt im absolut äußersten Rand des Zellkerns/Territorium).

Als Zentrum des Zellkerns/Territoriums wird dabei der geometrische Mittelpunkt der segmentierten Gegenfärbung definiert.

Der relative DNA-Gehalt wird durch die Division von Menge und Intensität der Voxel durch die Gesamtmenge und Gesamtintensität der Voxel des gesamten Objekts dargestellt. Er wird gegen die relative Entfernung aufgetragen. Dabei wird die Menge und Intensität der Voxel pro Schale erfaßt und angegeben. Das heißt konkret, daß der Anteil eines zu messenden Objekts in der jeweiligen Schale auf der Ordinate, die Schalen gemäß ihrer Entfernung auf der Abszisse abgetragen werden. Zur Berechnung der mittleren relativen Radien wird ein ergänzendes Skript zur 3D-RRD-Software verwendet.

Die relative radiale Verteilung einer Probenreihe mit vielen Zellen wird analog dazu erzeugt, indem der Mittelwert des relativen DNA-Gehaltes aller Zellen pro Schale gegen die Schalenentfernung aufgetragen wird.

### **Idee und Vorgehen bei den Outer Shells**

Es ist ein beobachtetes Phänomen, daß die BACs eines Territoriums nicht immer innerhalb des vom Paint als CT markierten Bereichs liegen. Das liegt zum einem daran, daß der Paint nicht perfekt alles Chromatin eines Chromosoms abdeckt und markiert. Zum anderen ist die verwendete Methode der Mikroskopie in ihrer Auflösung limitiert. Ein BAC, der also außerhalb des Territoriums liegt, kann unter Umständen durchaus über eine Chromatinbrücke mit dem Territorium verbunden sein, nur läßt sich diese Brücke mit unseren Methoden nicht mehr darstellen. Ebenso erscheinen BACs an der Zellkernoberfläche manchmal außerhalb des Zellkerns, obwohl sie selbstverständlich innerhalb zu liegen kommen. Wie zuvor beschrieben, wird aber die Territoriums- und Zellkerngrenze als strikte Grenze für alle Signale verwendet; alles, was sich außerhalb befindet, wird gleich null gesetzt. Um nun nicht alle diese scheinbar außerhalb liegenden Signale zu verlieren, verwendet man folgende Strategie: Nachdem der Schwellenwert für die Objekte und die Gegenfärbung bestimmt wurden, wird die Zelle virtuell „aufgepumpt“. Dies geschieht in der Form, daß die Schalen bei der Segmentierung vergrößert werden. Gibt man z.B. den Vergrößerungsfaktor 1.1 ein, so wird jede Schale um ein Zehntel ihres Volumens vergrößert. Der Zellkern wird somit insgesamt virtuell um ein Zehntel seines Volumens vergrößert. Nun sollten alle Signale innerhalb der Grenzen liegen.

Bei der Bearbeitung von Chromosomenterritorien verwendet man den Faktor 3 für die Vergrößerung.

Dadurch nehmen Kurven, die die mit „outer shells“ ausgewerteten Versuche darstellen, auf der Abszisse Werte über 100 an. Hatte man zuvor mit Faktor 3 vergrößert, ergibt sich als Maximalwert auf der Abszisse 300. Hatte man 1.1 verwendet, beträgt der Maximalwert 110. Dem Einwand, daß hiermit Ergebnisse verfälscht werden, kann man folgendes entgegensetzen: Bei der Auswertung werden keine absoluten, sondern nur relative Abstände gemessen und verwendet. Daher stellt eine gleichmäßige Vergrößerung des untersuchten Objekts keinerlei Einschränkung für die Aussagekraft der Resultate dar.

### **3.13.3 Quantitative Evaluation der Radialverteilung von Fluoreszenzsignalen mittels des ADS – „absolut distances to surfaces“ -Programms**

#### **Prinzip des ADS-Auswertungsprogramms**

Das 3D-RRD Programm ist in seiner Anwendung limitiert. Eine Auswertung ist nur möglich, wenn jedes Voxel eines Signals durch eine gerade Linie mit dem geometrischen Mittelpunkt der Gegenfärbung (definiert das Objekt) zu verbinden ist, und diese Linie komplett innerhalb des zu untersuchenden Objektes liegt. Dies bedeutet, daß man in der Praxis nur kugelförmige bzw. leicht ellipsoide Objekte berechnen lassen kann. Sichelförmige Objekte, oder solche mit Einstülpungen, entziehen sich der Analyse.

Um diese Lücke zu schließen wurde das ADS-Programm von Dr. Johann von Hase entwickelt.

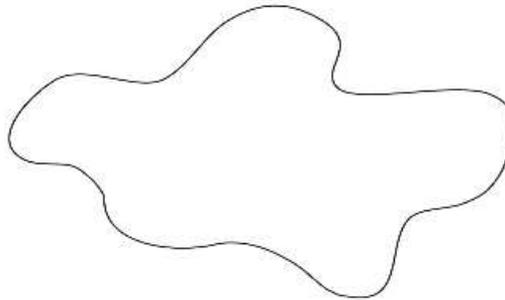
#### **Arbeitsweise des ADS-Programms**

Wie zuvor erklärt, werden bei der 3D-RRD Auswertung Schalen verwendet, die konzentrisch sind und die die Größenverhältnisse (relativ!) naturgetreu wiedergeben. Das bedeutet aber auch, daß verschiedene Schalen nicht das gleiche Volumen einnehmen.

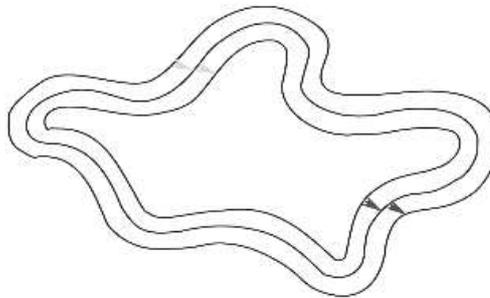
Bei der ADS-Auswertung hingegen werden die Schalen so angelegt, daß die absolute Distanz zur nächsten Schale an jedem Punkt auf einer Schale gleich bleibt (siehe auch Abbildung 3.6. auf Seite 74). Es handelt sich also um äquidistante Schalen. Dies wiederum bedeutet, daß die Schalen nicht forminvariant sein können, sondern sich in ihrer Formgebung dem Ursprungsobjekt angleichen. Außerdem bedeutet es, daß nicht von vornherein festgelegt werden kann, wie viele Schalen verwendet werden (wie bei 3D-RRD). Stattdessen bildet ADS so viele Schalen, wie bei der vorgegebenen Distanz zwischen zwei Schalen in den Kern passen.

Nachdem man genauso wie bei dem 3D-RRD-Programm einen Schwellenwert bestimmt hat, werden im ADS-Programm die Schalen folgendermaßen angelegt: Das ADS-Programm erkennt eine Oberfläche, auf der eine schwellenwertrelevante Helligkeitsänderung stattfindet. Nun bestimmt es die Entfernung eines bestimmten Punktes zu dieser Oberfläche. Es legt um den Punkt sukzessive immer größere Kugeln, bis in einer der Kugeln eine Helligkeitsänderung enthalten ist. Das ist dann der Fall, wenn die Oberfläche eines anderen Objektes erreicht wurde. Der erreichte Oberflächenpunkt hat vom Kugelmittelpunkt, der ja der Punkt war, von dem ausgegangen wurde, die Entfernung des zuletzt gewählten Kugelradius.

**A**



**B**



**Abbildung 3.6. Darstellung der Schalenbildung bei ADS-Auswertung**

**A:** Das Objekt kann jede beliebige Form einnehmen

**B:** Die Schalen werden so angelegt, daß die absolute Distanz zur nächsten Schale von jedem Punkt einer Schale aus gleich, also äquidistant ist. Das bedeutet, daß die beiden roten und die beiden gelben Linien gleich lang sind

Das Programm „Radiensort“ speichert nun nicht die Kugelradien, sondern die Vektoren, die den Abstand und die Richtung zwischen Punkt und Oberfläche definieren. Diese Vektoren werden ihrer Länge nach sortiert und klassifiziert. Diese Klassifizierung liefert eine Aussage zur Häufigkeitsverteilung aller gemessenen Abstände zur Oberfläche.

Durch ihren Vergleich ist es möglich, eine Aussage darüber zu treffen, welcher BAC-Pool z.B. weiter innen und welcher weiter außen liegt in Bezug auf die Territorien/Zellkernoberfläche. Somit ergänzt das ADS-Programm die Auswertungsmöglichkeiten. Besonders flache Zellen können besser, Zellen mit Einstülpungen können überhaupt erst ausgewertet werden.

### **3.13.4 Statistik**

Nach der quantitativen Auswertung der Zellkerne mit dem 3D-RRD und dem ADS-Programm müssen die gewonnenen Daten geordnet, verglichen und statistisch beurteilt werden.

#### **Angewandte Test auf die Ergebnisse der 3D-RRD-Auswertung**

1. Das Programm „Statistik größer kleiner“ berechnet für jeden einzelnen Zellkern eines Versuches den mittleren relativen Radius der Signale in einem Kanal. Er gibt an, bei wieviel Prozent des normalisierten Gesamtradius sich das gemittelte Signal befindet.

Für eine vergleichende Aussage subtrahiert das Programm die Werte des mittleren relativen Radius des zweiten Kanals von denen des ersten Kanals. Durch Ermittlung des Vorzeichens der Ergebniswerte wird eine Aussage über die Lage der Signale in den beiden Kanälen zueinander getroffen.

Sind beispielsweise in Kanal 1 die Signale der genreichen BAC-Pools vermessen worden ( $K1 = 2$ ) und in Kanal 2 die der genarmen ( $K1 = 4$ ) und ist das Ergebnis der Subtraktion  $K2 - K1$  ein positives, so kann folgende Aussage getroffen werden: Die Signale in Kanal 1 liegen zentraler, die relativen mittleren Radien sind also kleiner als die der Signale in Kanal 2. Oder in dem angegebenen Beispiel: In dieser Zelle liegen die genarmen BACs peripherer als die genreichen.

Es ist von großer Wichtigkeit zu bemerken, daß das Programm diese Werte nur in Bezug auf ihre Größe binär miteinander vergleicht. Der Abstand zwischen den Signalen der Kanäle kann minimal und nicht signifikant sein, nichtsdestotrotz gibt das Programm an, welches Signal peripherer liegt als das andere.

2. Aus den vielen mittleren relativen Radien pro Kanal, die mit „Statistik größer kleiner“ erhoben wurden, kann ein Gesamt-Mittelwert gebildet werden. Er trifft eine Aussage darüber, wo im Mittel von allen untersuchten Zellen das Signal eines Kanals in Prozent des normalisierten Gesamtradius liegt.

Auch die Differenz zwischen den Werten zweier Kanäle kann berechnet werden. Der so erhaltene Wert gibt an, um wieviel Prozent des normalisierten Gesamtradius die beiden Mittelwerte der relativen Radien auseinanderliegen und welche Signale peripherer liegen als die anderen. Ist der Betrag der Differenz sehr klein, liegen beide Signale im Mittel dicht beieinander und ein signifikanter Unterschied ist unwahrscheinlich.

3. Das Programm mit dem irreführenden Namen „Median-Quartile-Test“ berechnet ebenfalls die einzelnen mittleren relativen Radien jeder Zelle in jedem Kanal. Diese werden mit Rangzahlen von null bis  $x$  ( $x$ = Anzahl der ausgewerteten Zellen  $-1$ ) versehen und sortiert.

4. Für die statistische Auswertung wurden der t-Test oder Mann-Whitney-U-Test verwendet. Praktisch wurden diese Tests mit dem Computerprogramm SigmaStat durchgeführt. Dabei wurden die Werte der mittleren relativen Radien aus dem Median-Quartile-Test miteinander verglichen und auf signifikante Unterschiede untersucht.

### **Tests für die Auswertung der ADS-Ergebnisse**

1. Hier wurde ebenfalls ein Programm „Statistik kleiner größer“ verwendet. Hier gibt dieses allerdings die absoluten Abstände zwischen dem Signal in einem Kanal und der Oberfläche, also dem Rand des CT in nm an. Da per definitionem die inneren Schalen negativ sind, sind die Werte für im CT befindliche Signale ebenfalls negativ. Ihre Differenz in nm macht anhand des Vorzeichens eine Aussage darüber, welches Signal peripherer als das andere liegt.

2. Aus den einzelnen absoluten Abständen können ebenfalls wie bei der 3D-RRD-Auswertung Mittelwerte gebildet werden, die eine Aussage darüber erlauben, wie sich die Signale in allen Zellkernen eines Versuchs insgesamt verhalten.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Vorbemerkungen zur Versuchplanung und -durchführung**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob es über die Gendichte gesteuerte radiale Anordnungen von subchromosomalen Bereichen im Interphasekern gibt. Zur experimentellen Überprüfung dieser Frage wurden zunächst Vorversuche durchgeführt. Sie dienen zum einen der Überprüfung der Gendichteverteilung auf den Chromosomen, zum anderen der Vorbereitung dreidimensionaler Versuche in fixierten Interphasezellkernen.

Aus der vorangegangenen Publikation von Nogami et al (Nogami et al., 2000) zur der radialen Verteilung spät replizierender DNA-Abschnitte von Chromosom 12 waren Unsicherheiten bezüglich dreier Versuchsparameter geblieben: Fixierungsmethode, Art der Sonde (Cosmide), Bezugspunkte bei der Auswertung. Daher wurden die Hauptversuche dieser Doktorarbeit mit einer anderen Fixierungsmethode (Paraformaldehyd statt Methanoleisessig), mit BACs statt Cosmiden und mit zwei unterschiedlichen Bezugspunkten, einmal dem geometrischen Mittelpunkt des Zellkerns und einmal dem CT von Chromosom 12 durchgeführt.

Zusätzlich wurden noch folgende Parameter variiert, die einen Einfluß auf die Versuchsergebnisse nehmen könnten: Zelltyp, Zellzykluszeitpunkt, Sonden-Pool und die Computerprogramme zur Auswertung.

Das auf der nächsten Seite folgende Schema soll noch einmal den Aufbau und die Abfolge der durchgeführten Versuche verdeutlichen.

### **4.2 Verteilung der Alu-Sequenzen im humanen Karyogramm**

Alu-Sequenzen gehören zu den repetitiven DNA-Elemente, genauer gesagt zu der Klasse der SINEs (short interspersed nuclear elements). Sie kommen vermehrt in R-Banden und GC-reicher DNA vor und liegen bevorzugt in den Introns von Genen. Der Nachweis von Alu-Sequenzen und ihrer Blockbildung eignet sich daher gut zur experimentellen Überprüfung der Ausgangshypothese, daß es auf Chromosom 1 und 12 Bereiche mit einer sehr unterschiedlicher Gendichte gibt.

## Übersichtsschema zur Darstellung der Versuchsplanung und -durchführung in der vorliegenden Doktorarbeit

### Vorversuche

1) Visualisierung von Bereichen hoher/niedriger Gendichte mittels Nachweis von Alu-Sequenzen im humanen Karyogramm

2) Auswahl und Gruppierung geeigneter BAC-Klone in Pools

3) Testung der BAC-Pools auf Metaphasen mittels 2D-FISH

4) Darstellung der strukturellen Chromosomenaberrationen bei SW480 - Colonicarcinomzellen mittels 2D-FISH

5) Untersuchung der radialen Verteilung ganzer CT in Zellkernen mittels 3D-FISH und 3D-RRD-Auswertung

### Hauptversuche

#### Versuche mit genarm/genreich-assoziierten BAC-Pools

folgende Variablen wurden in den möglichen Kombinationen getestet:

1) Zelltyp  
- HLY  
- HFb  
- SW480 - Colonicarcinomzellen

2) Zellzykluszeitpunkt  
- G0-Phase  
- S-Phase

3) Bezugspunkt der Auswertung  
- Kern  
- CT

4) Auswertungsprogramm  
- 3D-RRD-Software  
- ADS-Programm

#### Versuche mit R/G-Banden-assoziierten BAC-Pools

folgende Variablen wurden in den möglichen Kombinationen getestet:

1) Zelltyp  
- HLY  
- HFb

2) Zellzykluszeitpunkt  
- G0-Phase  
- S-Phase

3) Bezugspunkt der Auswertung  
- Kern  
- CT

4) Auswertungsprogramm  
- 3D-RRD-Software  
- ADS-Programm

78

Wie unter Methoden Punkt 3.9. beschrieben, wurden 2D-FISH-Experimente mit Alu-Sonden durchgeführt und ein Karyogramm erstellt.

Auf der Abbildung 4.1. ist zu sehen, daß starke Blockbildungen von Alu-reicher DNA auf Chromosomen 1 und 12 zu beobachtet sind. Dies läßt sich besonders distal an den Chromosomenarmen erkennen. Umgekehrt zeigen beide Chromosomen um das Centromer herum ein fast vollständiges Fehlen von Alu-Sequenzen. Vergleicht man dieses Karyogramm mit Bänderungs-Ideogrammen von Chromosom 1 und 12, entspricht es in etwa einer sehr groben R/G-Bänderung. Beide Chromosomen weisen große Unterschiede in der lokalen Gendichte und eine Blockbildung von genreichen bzw. genarmen DNA-Abschnitten auf.

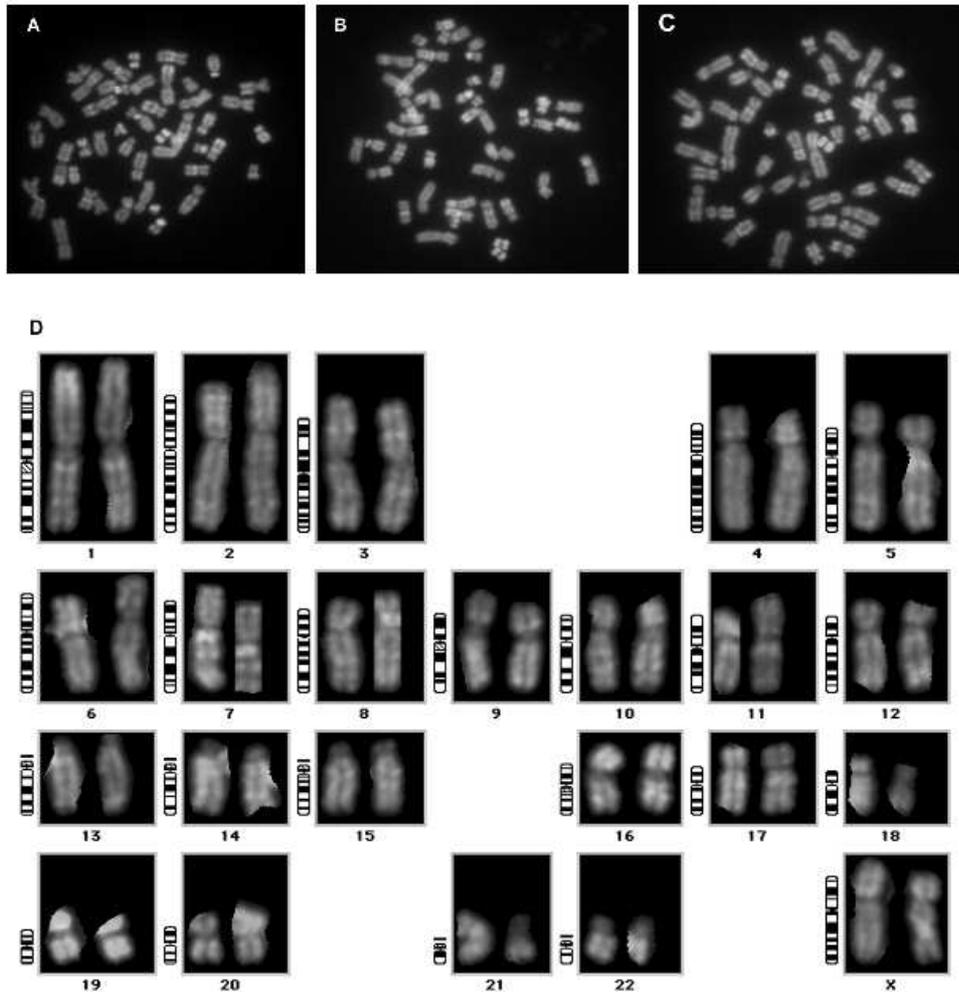
### **4.3 2D-FISH Experimente**

Ziel der Arbeit ist die Untersuchung räumlicher Anordnungen und radialer Verteilungen von DNA-Bereichen im Interphasekern. Um Versuche im dreidimensionalen Kern möglich zu machen, müssen zunächst die Sonden (BAC-Pools) etabliert und auf Metaphasen (2D) getestet werden.

#### **4.3.1 2D-FISH Experimente mit genarmen und genreichen BAC-Pools von Chromosom1**

Wie in Methoden unter Punkt 3.8.1. beschrieben, wurden die einzelnen BAC-Klone hinsichtlich ihres Gengehaltes in Pools sortiert. Mit diesen Pools wurden 2D-FISH-Experimente auf humanen Metaphasen durchgeführt.

Durch Variieren verschiedener DNA-Markierungs-Verfahren, verschiedener Ausgangs-DNA-Konzentrationen im Hybridisierungsmix und verschiedener Nachweisprotokolle konnten die Bedingungen optimiert werden, unter denen eine effiziente Amplifikation, Markierung und Hybridisierung der fünf BAC-Pools möglich ist (siehe auch Methoden Punkte 3.8. und 3.10.) Wie auf der beigefügten Abbildung 4.2. zu erkennen ist, lassen sich die BAC-Signale eindeutig und spezifisch dem Chromosom 1 zuordnen. Auch läßt sich die Lokalisation der BACs auf dem Chromosom überprüfen. Das Chromatin vom langen bzw. kurzen Arm von Chromosom 1 kann mittels Paint spezifisch angefärbt werden. Die Signalstärke der BACs und des Paints ist deutlich höher als das Hintergrundrauschen des Versuchs. Damit ist ein spezifischer Nachweis einzelner BAC-Pools möglich. Dies spricht dafür, daß auch in



**Abbildung 4.1. 2D-FISH-Versuch und Karyogramm mit Alu-Hybridisierungssonden**

Farbverteilung A-D: grün: Alu-reiche DNA, rot: Alu-arme DNA, gelb: überlappende Bereiche zwischen Alu-arm und Alu-reich

**A-C:** Bilder von 2D-FISH-Experimenten mit Hybridisierungsmixen, die Alu-Sonden enthielten. Sehr klar kann man die bänderungsähnliche Verteilung von Alu-reichen und Alu-armen DNA-Abschnitten unterscheiden. In Centromernähe finden sich keine Alu-Sequenzen.

**D:** Karyogramm aus einer mit Alu-Sonden hybridisierten humanen Metaphase. Man bemerke die großen lokalen Unterschiede im Alu-Gehalt der DNA. Beispielsweise ist Chromosom 19 extrem Alu-reich und stellt sich fast komplett grün dar. Im Gegensatz dazu ist Chromosom 18 sehr arm an Alu-Sequenzen und erscheint rötlich. Die uns interessierenden Chromosomen 1 und 12 zeigen sehr hohe lokale Unterschiede in der Alu-Dichte. So sind beispielsweise an den distalen Armen beider Chromosomen große Blöcke Alu-reicher DNA zu erkennen, die direkt an Alu-arme DNA-Areale angrenzen.

Interphasekernen bei 3D-Versuchen die BAC nur auf ihre DNA hybridisieren und so spezifische Signale geben werden.

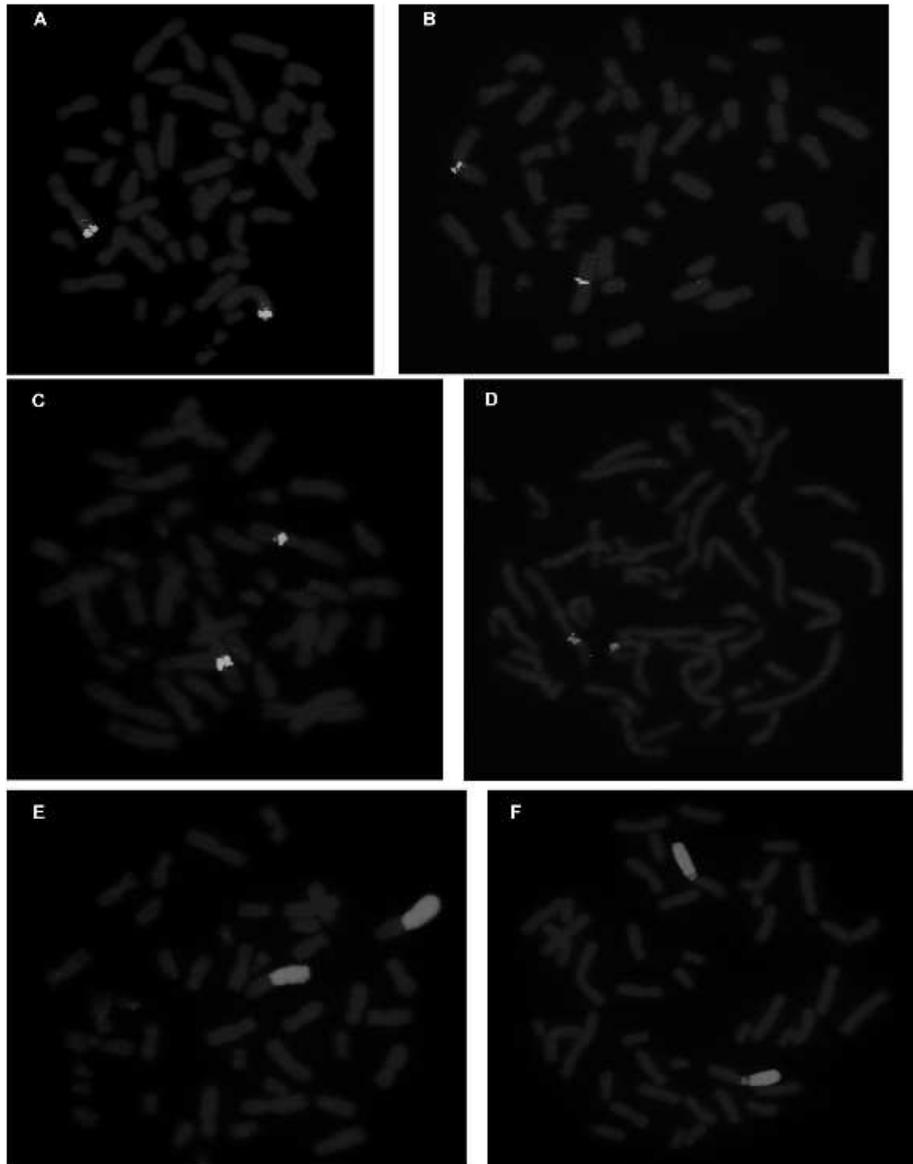
#### 4.3.2 2D-FISH Experimente mit BAC-Pools von Chromosom 12

Ebenso wie zuvor für das Chromosom 1 beschrieben, wurden auch 2D-Experimente mit den BAC-Pools von Chromosom 12 durchgeführt. Die korrekte Lokalisation der BAC-Pools auf dem Metaphasechromosom wurde überprüft. Zusätzlich zu den nach Genreichtum sortierten Genpools wurden hier BAC-Pools geordnet nach ihrer Bandenzugehörigkeit zu R- und G-Banden verwendet.

Die erhaltenen Ergebnisse (siehe Abbildung 4.3.) entsprechen insgesamt denjenigen von Chromosom 1. Auch hier ist eine gute Hybridisierbarkeit der Pools mit hoher Sensitivität und Spezifität durch Wahl geeigneter Versuchsparameter zu erreichen. Das Hybridisierungssignal ist stark genug, um einen Nachweis der BAC-Pools vor dem Hintergrund eines Paints zu ermöglichen. Dieser Befund ist von großer Wichtigkeit für die Verwendung von BACs zur Lokalisation im Territorium im Interphasekern.

Insgesamt lassen sich als Ergebnis der beschriebenen 2D-FISH Versuche mit Chromosom 1 und 12 folgende Aussagen zusammenfassen:

1. Die BAC-Pools geben ein eindeutiges, bandenspezifisches Signal auf Metaphasen
2. Die Signalstärke der BACs ist dabei ausreichend für eine eindeutige Aussage bezüglich ihrer Lokalisation
3. Die Signalstärke der BACs ermöglicht ihre Darstellung vor dem Hintergrund eines Paints
4. Durch geeignete Einstellung der Versuchsparameter kann das visuelle Hintergrundrauschen des Versuches weitgehend reduziert werden
5. Die Genpools können sowohl mit Digoxigenin, DNP als auch mit Biotin markiert und nachgewiesen werden. Willkürlich wurde festgesetzt, daß die genarmen BAC-Pools in allen weiteren Versuchen mit Digoxigenin markiert werden, die genreichen mit Biotin. Die R-BACs werden ebenfalls mit Digoxigenin markiert, die G-BACs mit DNP
6. Der Verwendung der BAC-Pools auch für die deutlich sensitiveren und damit störanfälligeren 3D-FISH-Versuche steht nach Beurteilung der 2D-Hybridisierbarkeit nichts im Wege



**Abbildung 4.2. Auswahl der Ergebnisse der 2D-FISH-Versuche mit Chromosom 1 auf humanen Metaphasen**

Farbverteilung A-F: Biotin-Signale: grün, Cy3-Signale: rot, Gegenfärbung: blau

**A:** BAC-Pool 3 markiert mit Biotin und nachgewiesen im FITC-Kanal lokalisiert distal am kurzen Arm von Chromosom 1

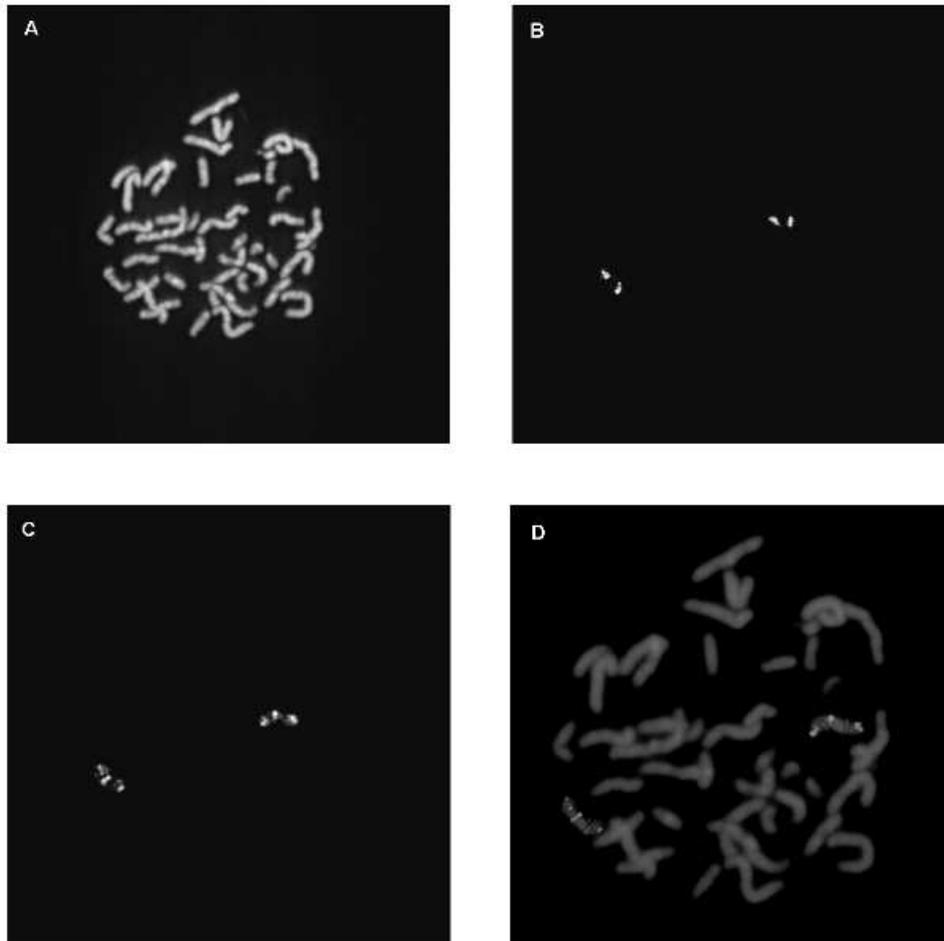
**B:** BAC-Pool 4 markiert mit Biotin und nachgewiesen im FITC-Kanal kann centromernah erkannt werden

**C:** FITC-Signale, die dem BAC-Pool 5 markiert mit Biotin entsprechen, liegen auf 1q

**D:** BAC-Pool 1 markiert mit Digoxigenin und nachgewiesen im Cy3-Kanal des Epifluoreszenzmikroskops. Die Lokalisation des BAC-Pools auf 1p ist klar erkennbar

**E:** Paints von 1p markiert mit DNP und nachgewiesen im Cy3-Kanal

**F:** Paints von 1q markiert mit Diaoxidenin und nachgewiesen im Cy3-Kanal



**Abbildung 4.3. 2D-FISH-Versuch mit genarmen und genreichen BAC-Pools von Chromosom 12 auf humanen Metaphasen**

**A:** DAPI-Gegenfärbung der DNA

**B:** Cy3-Signale, die den genarmen BACs markiert mit Digoxigenin entsprechen

**C:** FITC-Signale, die den genreichen BACs markiert mit Biotin entsprechen

**D:** RGB-Bild derselben Metaphase

Die fünf verwendeten BAC-Pools sind zweifelfrei einzeln zu erkennen. Sie lokalisieren exakt und sind als bandenförmige Striche auf den beiden Chromosomen 12 zu erkennen

### **4.3.3 2D-FISH Experimente auf SW480-Tumorzellen**

SW480-Tumorzellen sind Zellen einer Colocarzinom-Zelllinie. Sie verfügen über mehrere stabile numerische und strukturelle Aberrationen im Kern, von denen vier unter anderem das Chromosom 12 betreffen (Muller et al., 2004). Es handelt sich um zwei Translokationen, eine Inversion und das Auftreten eines Isochromosoms aus den kurzen Armen von Chromosom 12. Ähnlich wie die humanen Lymphozyten (HLY) sind sie rundliche Zellen mit einem ebenfalls eher runden Zellkern.

Um einen visuellen Eindruck von ihrem Erscheinungsbild zu bekommen und um die strukturellen Aberrationen darzustellen, wurde ein 2D-FISH-Experiment mit SW480-Tumorzellen und einem Paint von Chromosom 12 durchgeführt.

Wie auf der Abbildung 4.4. zu sehen ist, lassen sich sowohl die Translokationen, als auch das Isochromosom darstellen. Die Inversion ist bei dieser Versuchsanordnung, wie erwartet, nicht darstellbar. Folglich ist damit zu rechnen, daß in Interphasekernen mehr als zwei Regionen als CT 12 zur Darstellung kommen würden.

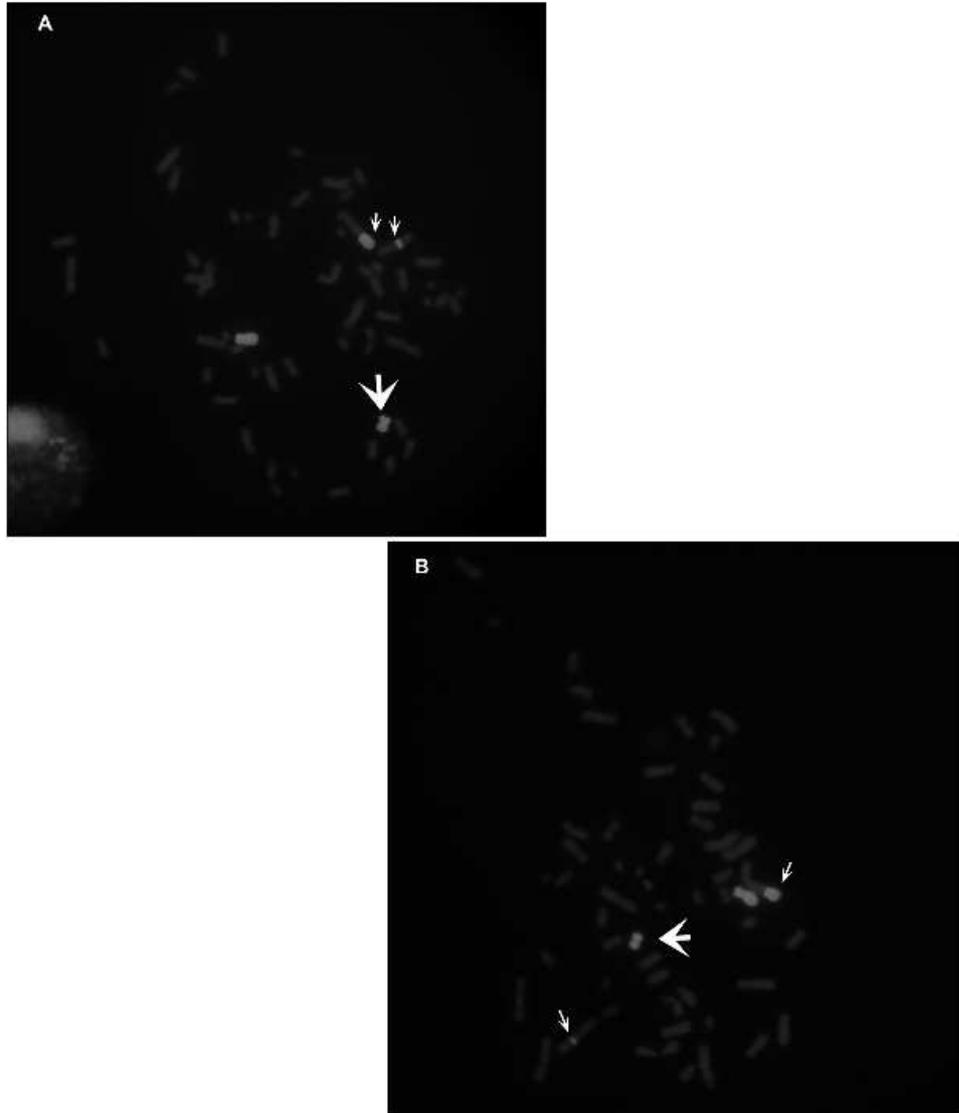
## **4.4 3D-FISH Experimente**

Durch die in den vorgeschalteten 2D-FISH-Versuchen gewonnene Erfahrung konnte von einer Verwendbarkeit der BAC-Pools für die 3D-Interphasekernuntersuchung ausgegangen werden. Interessanterweise zeigte sich, daß sich die BAC-Pools von Chromosom 12 besser auf die DNA von Interphasekerne hybridisieren ließen als diejenigen von Chromosom 1. Daher wurden alle im folgenden vorgestellten Experimente zur räumlichen Anordnung und Verteilung von genarmen und genreichen DNA-Bereichen ausschließlich mit BAC-Pools von Chromosom 12 durchgeführt.

### **4.4.1 Verteilung der CT von Chromosom 12 im Kern**

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß die CT von Chromosom 12 in HLY tendenziell eher randständig im Kern liegen (Weierich et al., 2003).

Um auch eine Aussage für HFb und SW480-Tumorzellen machen zu können, wurden beide Zellarten auf Objektträgern fixiert und pepsiniert. Anschließend wurden sie mit einem Hybridisierungsmix inkubiert, der einen Paint von Chromosom 12 markiert mit Digoxigenin



**Abbildung 4.4. 2D-FISH-Versuche mit einem Paint von Chromosom 12 auf Metaphasen von SW480-Zellen**

Farbverteilung A,B: Signale von Chromosom 12: rot, Gegenfärbung: blau

**A+B:** Wie auf den Abbildungen klar zu erkennen ist, liegt das Chromosom 12 in SW480-Coloncarzinomzellen strukturell verändert vor. Es können sowohl die beschriebenen Translokationen (kleine Pfeile), als auch die Isochromosom aus zwei kurzen Armen von Chromosom 12 (große Pfeile) erkannt werden. Bei den nicht mit Pfeilen markierten, roten Chromosomen handelt es sich um die strukturell nicht nachweisbar veränderten Chromosomen 12.

enthielt. Nachgewiesen wurden die Digoxigeninsignale des Paints mit Antikörpern, die ihrerseits an das Fluorochrom Cy3 gekoppelt waren. Anschließend wurde die DNA des Zellkerns mit TO-PRO (Cy5) gegengefärbt. Die Signale beider Fluorochrome Cy3 und Cy5 wurden in ihren Kanälen mit dem LSM aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels 3D-RRD-Software (Feinheit 26).

Wie auf den Abbildungen 4.5. für die SW480-Zellen zu sehen ist, liegen die CT von Chromosom 12 im Kern verteilt. Eine leichte Akzentuierung in Richtung Peripherie kann angenommen werden. In Abbildung 4.6. zeigen die HFb eine tendenzielle Verschiebung der CT 12 in Richtung Peripherie des Zellkerns.

#### **4.4.2 Humane Lymphozyten und die radiale Verteilung genarmer/genreicher BAC-Pools**

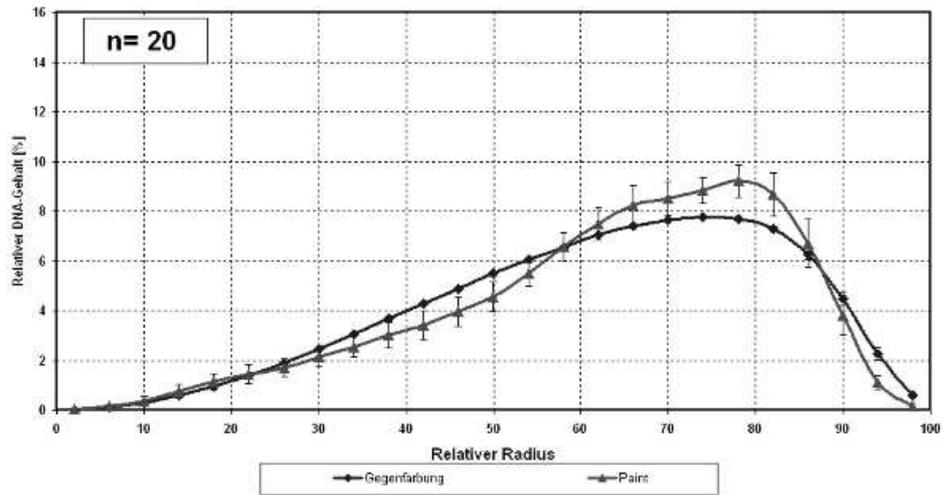
##### **Die subchromosomale Struktur genarmer/genreicher DNA in Bezug auf den Kern in der G0-Phase**

Humane Lymphozyten (HLY) sind Zellen des Immunsystems. Sie entstehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen und liegen im peripheren Blut postmitotisch in G0 vor (Wachtler et al., 1982). Für die Versuche wurden sie aus frischem Blut mittels Ficoll-Paque-Gradienten extrahiert und mit 4%-igem Paraformaldehyd 3D-fixiert. Als Hybridisierungsmix wurden die genarmen/genreichen BAC-Pools markiert mit Digoxigenin bzw. Biotin verwendet. Die Zellen wurden mit dem Hybridisierungsmix mindestens 40h inkubiert. Die Markierungen (Label) wurden mittels Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen. Dabei wurde Cy3 für Digoxigenin und FITC für Biotin verwendet. Die Zellen wurden zusätzlich mit TO-PRO (Cy5) gegengefärbt. Die Signale der BAC-Pools und die Gegenfärbung wurden mit dem LSM in den drei Kanälen für Cy3, Cy5 und FITC aufgenommen und mit der 3D-RRD-Software (Feinheit 26) ausgewertet.

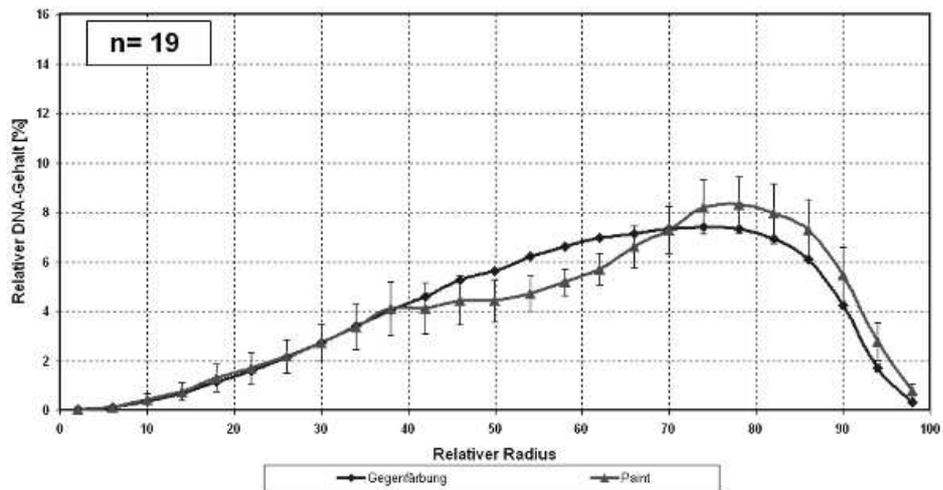
Wie in der Abbildung 4.7. zu sehen ist, zeigen sich eindeutig radiale Verteilungsunterschiede zwischen den verschiedenen subchromosomalen Regionen von Chromosom 12: genarme DNA-Bereiche liegen peripherer als genreiche.

Die statistische Auswertung bestätigte diesen Befund. In allen 18 (100%) der ausgewerteten Zellen (n = 18) lagen die genarmen BACs peripherer als die genreichen („Statistik größer kleiner“). Die Differenz der mittleren radialen Mediane betrug 19,28% des Gesamtradius. Dieser Wert kann als vergleichsweise hoch angesehen werden, entspricht er fast einem Fünftel des Gesamtradius. Der Median-Quartile Test und die Beurteilung seiner Werte mit

**4.5. Verteilung der CT12 im Bezug auf den Kern bei SW480-Zellen**



**4.6. Verteilung der CT12-Paints im Bezug auf den Kern bei HFb**



**Abbildung 4.5. und 4.6. Kurven der radialen Verteilung der CT12 in Bezug auf den Kern in SW480-Tumorzellen und in HFb**

Farbverteilung: CT12: rot, Gegenfärbung des Kerns: blau  
 Kurven der 3D-RRD-Auswertung eines Versuches zur Lokalisation der CT12 im Kern  
 In Kurve 4.5. sieht man die Verteilung der CT12 im Kern von SW480-Zellen.  
 Die CTs verteilen sich im ganzen Kern mit einer leichten Tendenz  
 in Richtung Peripherie  
 Wie auf der Kurve 4.6. zu sehen ist, liegen die CT12 bei den HFb tendenziell eher  
 peripher im Kern

einem t-Test ergaben, daß das Ergebnis „genarme BAC-Pools liegen peripherer als genreiche“ als hochsignifikant zu werten ist ( $p < 0,001$ ).

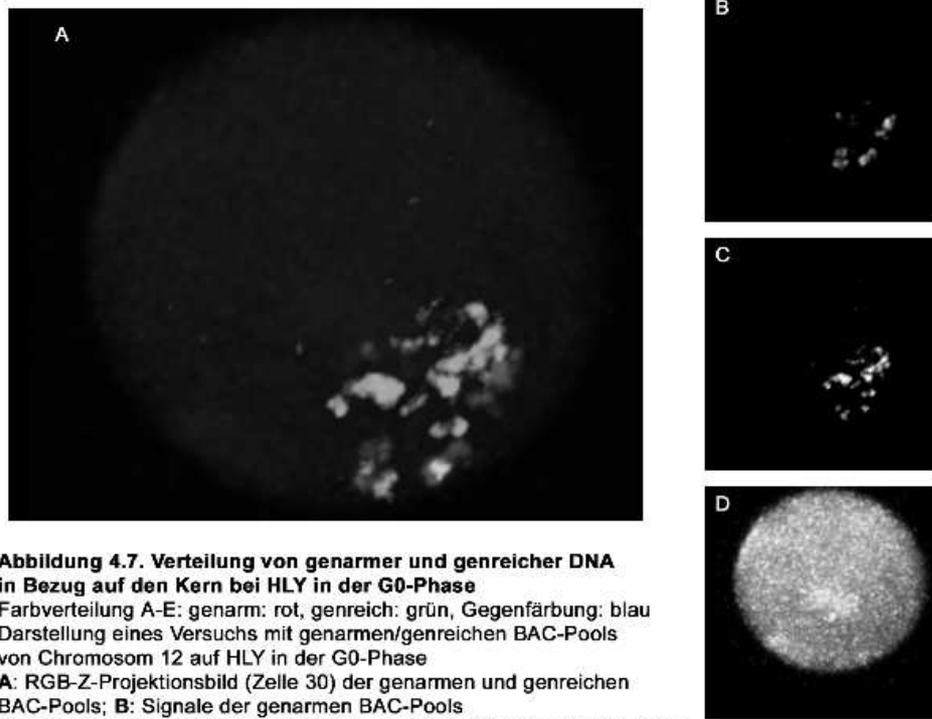
### **Die subchromosomale Struktur genarmer/genreicher DNA in Bezug auf den Kern in der S-Phase**

Um festzustellen, ob die Aktivierung von HLY und die damit verbundene erhöhte Genaktivität zu einer Verschiebung der subchromosomalen Bereiche im Interphasekern führt, wurden die zuvor beschriebenen Versuche in der S-Phase wiederholt.

Dazu wurden frische HLY aus dem peripheren Blut mittels Ficoll-Paque-Gradienten isoliert, mit Phytohämagglutinin stimuliert und für 72h in Kultur genommen. 30min vor der Fixierung wurde Bromdesoxyuridin (BrdU) zu der Zellkultur zugegeben. Zellen, die gerade ihre DNA replizieren, bauen das Thymin-Analogon BrdU in ihre DNA ein und sind dadurch markiert. Nach Fixierung mit 4%igem Paraformaldehyd und der Pepsinierung wurden die Zellkerne mit den BAC-Pools genarm/genreich (Digoxigenin, Biotin) hybridisiert. Die Inkubationsdauer mit dem Hybridisierungsmix betrug mindestens 40h. Digoxigenin wurde mit Antikörpern nachgewiesen, die an Cy3 gekoppelt waren, Biotin mit Cy5-gekoppelten Antikörpern. Anschließend wurde die DNA des Zellkerns mit YoYo, das im FITC-Kanal aufgenommen werden kann, gegengefärbt. Um zu sehen, welche Zellen sich in der S-Phase befinden, wurden die Zellen mit Anti-BrdU-Antikörpern markiert. Diese Antikörper sind ihrerseits an das Fluorochrom AMCA gekoppelt, das unter dem Epifluoreszenzmikroskop im DAPI-Kanal sichtbar gemacht werden kann. Die in der S-Phase befindlichen HLY wurden in den drei Kanälen für Cy3, Cy5 und FITC mit dem LSM aufgenommen. Mit dem 3D-RRD-Programm (outer shells, Feinheit 26, Vergrößerung 1,1) wurden die erhaltenen Bilddaten anschließend ausgewertet.

Das Ergebnis entspricht dem der Zellen in G0 (Abbildung 4.8.). In allen 25 (100%) der untersuchten Zellen ( $n = 25$ ) lagen die genarmen BACs peripherer als die genreichen („Statistik größer kleiner“). Die Differenz der mittleren radialen Mediane betrug 17,16% des Gesamtradius. Dieser Wert ist nur geringfügig kleiner als bei dem Versuch mit den HLY in der G0-Phase. Ein U-Test auf das Ergebnis des Median-Quartile-Testes belegte, daß es sich um ein hochsignifikantes Ergebnis handelt ( $p < 0,001$ ).

Ein Unterschied zwischen der G0 und der S-Phase in der radialen Verteilung subchromosomaler Bereiche von Chromosom 12 ist bei HLY nicht festzustellen.



**Abbildung 4.7. Verteilung von genarmer und genreicher DNA in Bezug auf den Kern bei HLY in der G0-Phase**

Farbverteilung A-E: genarm: rot, genreich: grün, Gegenfärbung: blau  
 Darstellung eines Versuchs mit genarmen/genreichen BAC-Pools von Chromosom 12 auf HLY in der G0-Phase

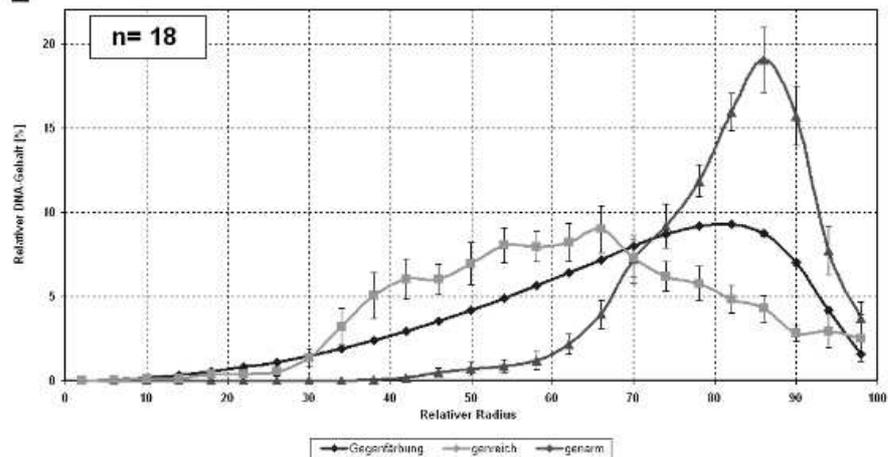
**A:** RGB-Z-Projektionsbild (Zelle 30) der genarmen und genreichen BAC-Pools; **B:** Signale der genarmen BAC-Pools

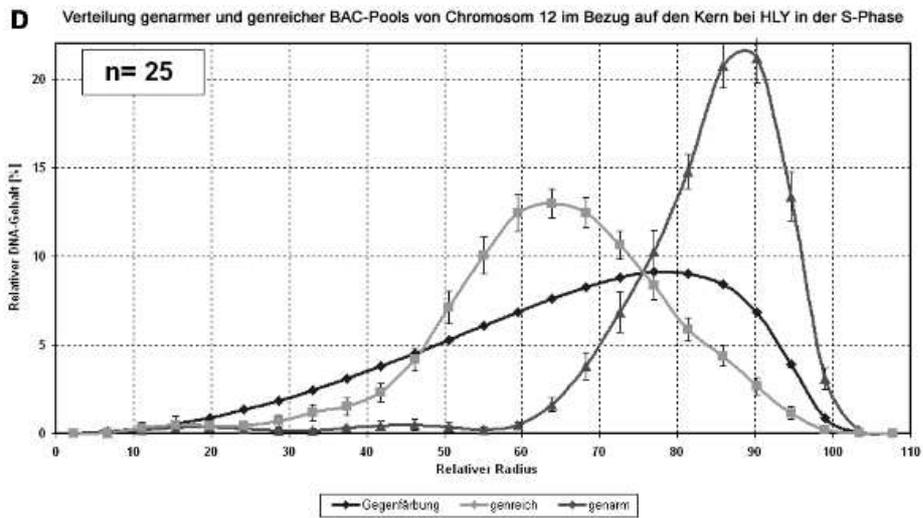
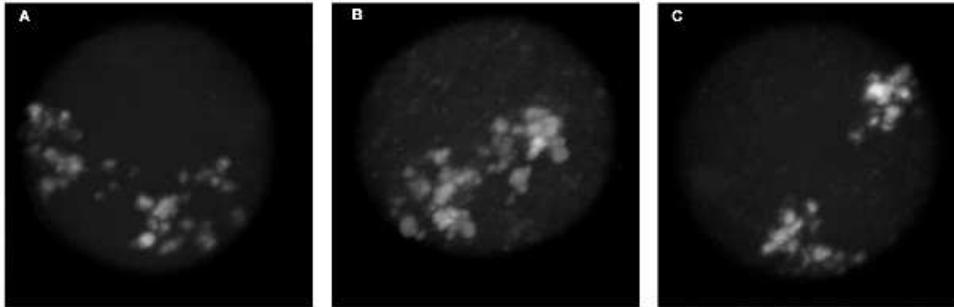
**C:** Signale der genreichen BAC-Pools **D:** Gegenfärbung des Zellkerns

Wie eindeutig und sehr klar zu sehen ist, gibt es in dieser vorgestellten Zelle eine radiale Verteilung der genarmen und genreichen BACs. Die genarmen BACs liegen insgesamt peripherer als die genreichen

**E:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für die genarmen und genreichen BACs zeigen einen unterschiedlichen Verlauf. Die genarmen DNA-Bereiche (rot) liegen peripherer als die genreichen (grün). Der Unterschied zwischen beiden Graphen ist höchstsignifikant.

**E** Verteilung genarmer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf den Kern bei HLY in der G0-Phase





**Abbildung 4.8. Verteilung von genarmer und genreicher DNA in Bezug auf den Kern bei HLY in der S-Phase**

Farbverteilung A-D: genarm: rot, genreich: grün, Gegenfärbung: blau

Darstellung eines Versuchs mit genarmen/genreichen BAC-Pools von Chromosom 12 auf HLY in der S-Phase

A-C: Z-Projektionsbilder (Zellen 13(A), 6(B), 24(C)) der genarmen und genreichen BAC-Pools in HLY

Wie eindeutig und sehr klar zu sehen ist, gibt es eine radiale Verteilung der genarmen und genreichen BACs und damit der von ihnen markierten DNA. Die genarmen BACs liegen peripherer als die genreichen.

D: Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für genarme und genreiche BACs zeigen einen unterschiedlichen Verlauf. Die genarmen DNA-Bereiche (rot) liegen peripherer als die genreichen (grün). Der Unterschied zwischen beiden Graphen ist höchstsignifikant.

## **Die subchromosomale Struktur genarmer/genreicher DNA in Bezug auf das CT in der G0-Phase**

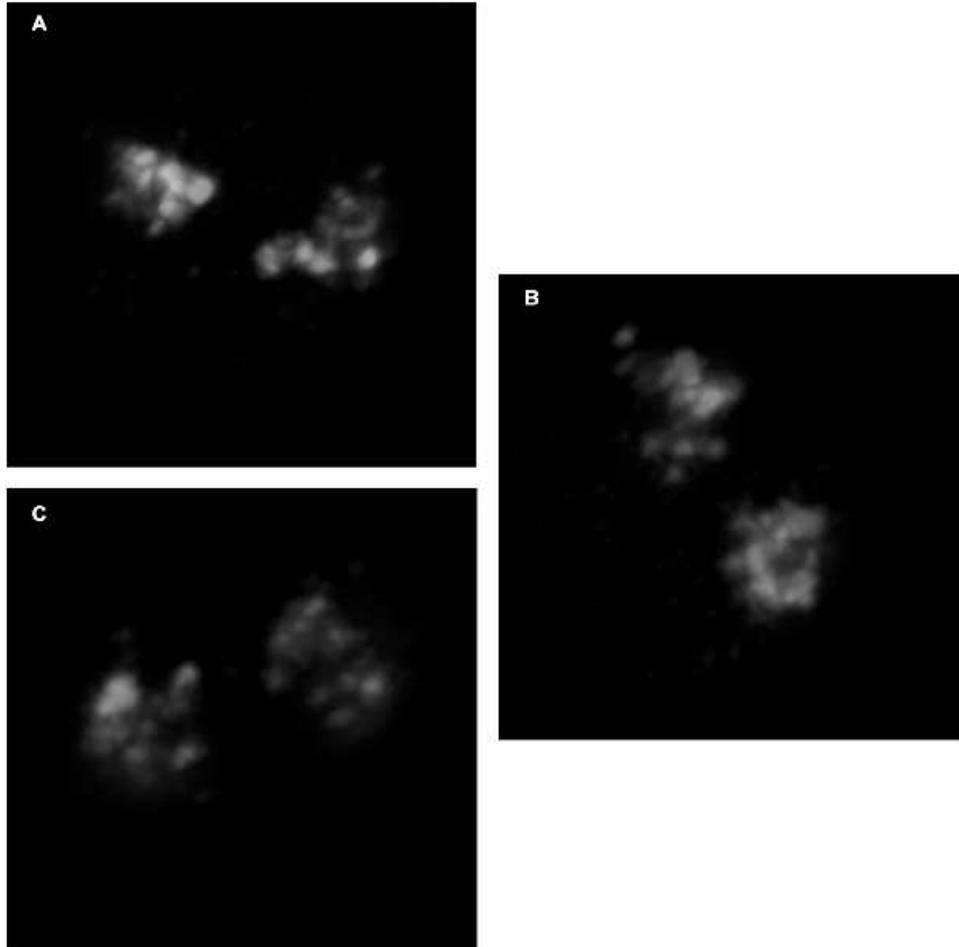
Für diesen Versuch wurden frische HLY aus dem peripheren Blut in der G0-Phase isoliert, mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert und pepsiniert. Anschließend wurden sie mit einem Hybridisierungsmix inkubiert, der zusätzlich zu den genarmen/genreichen BAC-Pools (Digoxigenin-, Biotin-markiert) einen Paint von Chromosom 12 (DNP-markiert) enthielt. Die Inkubationsdauer betrug mindestens 40h. Die Markierungen (Label) wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen; als Fluorochrome wurden Cy3 für Digoxigenin, FITC für DNP und Cy5 für Biotin verwendet. Alle Signale der drei Fluorochrome wurden mit dem LSM aufgenommen.

Die Auswertung umfaßte neben dem 3D-RRD-Programm (outer shells, Feinheit 16, Vergrößerung 3) auch das ADS-Programm ( $d_{\min} -2100$ ,  $d_{\max} + 2101$ ,  $F = 15$ ). Jedes CT, das sich mittels Paint darstellen ließ, wurde einzeln ausgewertet. Nebeneinanderliegende CT, die nicht eindeutig voneinander zu trennen waren, wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Wie in der Abbildung 4.9. zu sehen ist, können keine statistisch signifikanten radialen Verteilungsunterschiede der DNA-Abschnitte, die mit den BACs nachgewiesen wurden, erfaßt werden.

In der Auswertung der mit 3D-RRD gewonnenen Daten zeigte sich bei der „Statistik größer kleiner“, daß in 16/24 (66%) der ausgewerteten Zellen ( $n = 24$ ) die genarmen BACs peripherer lagen als die genreichen. Die Differenz der mittleren radialen Mediane betrug allerdings nur 2,61% des Gesamtradius und war somit sehr klein. Das bedeutet, daß die Aussage darüber, welcher BAC-Pool peripherer liegt, unter Umständen nur einen Frage marginaler Abstände ist. Daher ist es nicht verwunderlich, daß ein t-Test auf das Ergebnis des Median-Quartile-Tests keine radiale Verteilung der BAC-Pools in Bezug auf das CT finden konnte ( $p = 0,227$ ). Ein zusätzlich durchgeführter U-Test bestätigte dieses Ergebnis ( $p = 0,152$ ).

Auch mit der ADS-Auswertung konnte kein radialer Verteilungsunterschied zwischen genarmer und genreicher DNA eruiert werden. Hier ergab sich, daß in 13/24 (54%) der Zellen ( $n = 24$ ) genarme BACs peripherer lagen als genreiche („Statistik größer kleiner“). Interessanterweise fand sich beim Vergleich der mittleren absoluten Abstände, daß hier die genarmen BACs zentraler lagen als die genreichen. Die erfaßten Werte lauteten  $-652,46$  nm für genarm und  $-625,46$  nm für genreich. Damit beträgt die Differenz  $-27$  nm. Dieses Ergebnis kann mit dem der 3D-RRD-Auswertung nicht ohne weiteres in Einklang gebracht werden.



**Abbildung 4.9. Verteilung von genarmer und genreicher DNA in Bezug auf das CT12 bei HLY in der G0-Phase**

Farbverteilung A-F: genarm: rot, genreich: grün, Paint: blau

Darstellung eines Versuchs mit genarmen/genreichen BAC-Pools von Chromosom 12 auf HLY in der G0-Phase

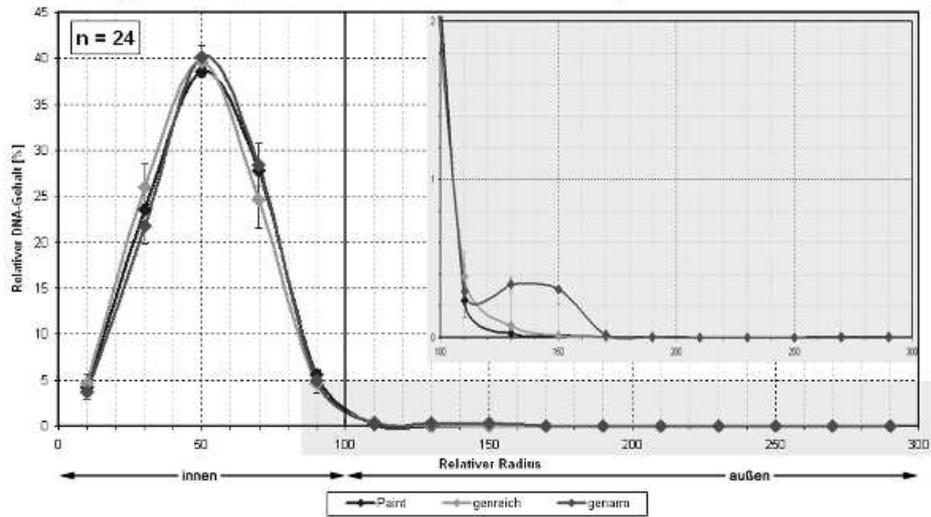
**A-C:** Z-Projektionsbilder der genarmen und genreichen BAC-Pools in drei HLY

Man beachte die unterschiedliche Form und Anordnung der BACs in jedem einzelnen CT12. Scheinbar läßt sich eine radiale Verteilung erkennen. Diese konnte jedoch statistisch nicht gesichert werden (vergleiche Kurven D-F). Man sollte sich daher bewußt sein, daß der visuelle Eindruck bei der Beurteilung der radialen Verteilung von BACs und damit von DNA täuschen kann!

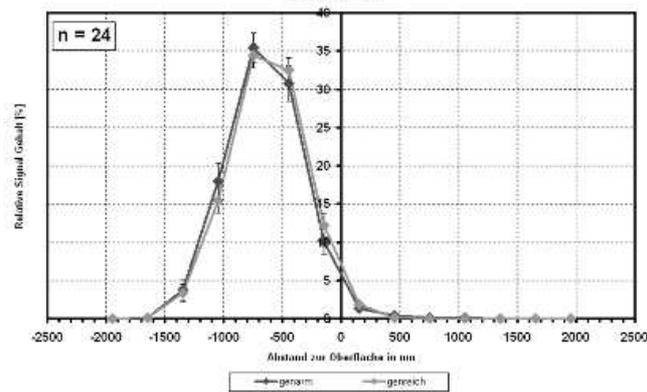
**Kurven D-F: siehe nächste Seite**

**D:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für genarme und genreiche BACs laufen annähernd parallel. Geringfügig liegt der Graph der genarmen BACs (rot) peripherer als der der genreichen. Der Unterschied zwischen beiden Graphen ist jedoch nicht signifikant.  
**E+F:** Kurven der ADS-Auswertung. Anders als bei der 3D-RRD-Auswertung erscheinen hier die genreichen BAC-Pools ein wenig peripherer zu liegen als die genarmen

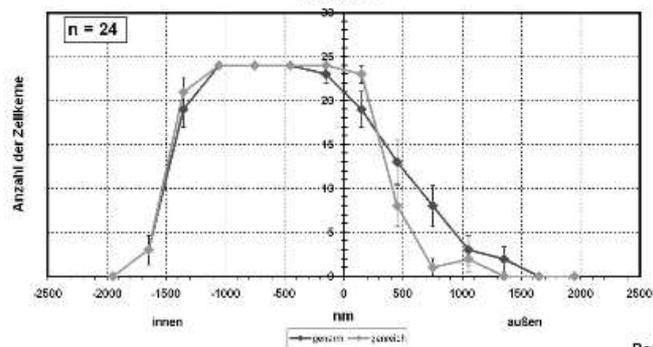
**D** Verteilung genärmer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HLY in der G0-Phase



**E** Verteilung genärmer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HLY in der G0-Phase



**F** Verteilung genärmer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HLY in der G0-Phase



Beschreibung siehe vorangegangene Seite

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es keinen statistisch signifikanten radialen Verteilungsunterschied zwischen den genarmen und den genreichen BAC-Pools bei HLY in Bezug auf das CT12 in der G0-Phase gibt.

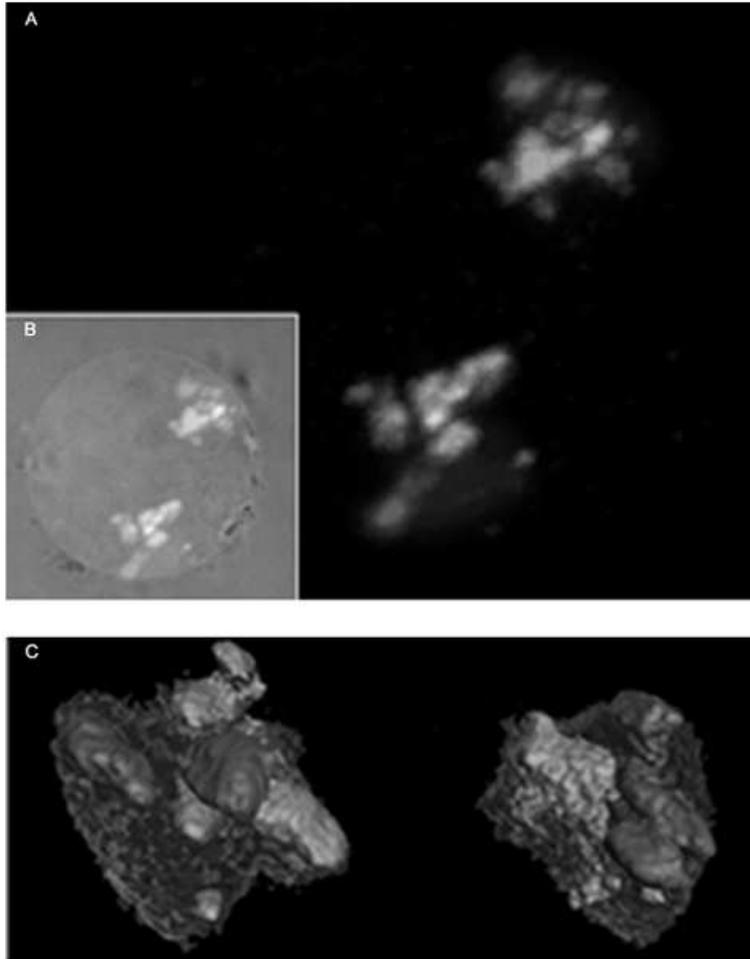
### **Die subchromosomale Struktur genarmer/genreicher DNA in Bezug auf das CT in der S-Phase**

Die Untersuchung der HLY wurde in der S-Phase wiederholt. Abermals wurde ein Hybridisierungsmix mit genarmen/genreichen (Digoxigenin, Biotin) BAC-Pools und einem Paint (DNP) von CT12 verwendet. Zuvor waren die aus dem peripheren Blut isolierten HLY mit Phytohämagglutinin stimuliert und für 72h in Kultur gehalten worden. 30min vor Fixierung war BrdU zur Kultur zugegeben worden. Nach Fixierung mit 4%igem Paraformaldehyd und der Pepsinierung der Zellen wurde der Hybridisierungsmix für mindestens 40h zugegeben. Die Markierungen (Label) wurden mit den folgenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen: Cy3 für Digoxigenin, Cy5 für Biotin und FITC für DNP. Nach Aufnahme mit dem LSM wurden die Daten mit dem 3D-RRD-Programm (outer shells, Feinheit 16, Vergrößerung 3) und der ADS-Software (dmin -2000, dmax + 2001, F= 17) untersucht.

Wie in Abbildung 4.10. zu sehen ist, unterscheidet sich das Ergebnis von dem vorangegangenen. Ein radialer Verteilungsunterschied zwischen den genarmen und genreichen BAC-Pools und damit der genarmen und genreichen DNA-Abschnitte, die sie markieren, ist zu erkennen.

Die statistische Auswertung ergab bei den mit dem 3D-RRD-Programm gewonnenen Daten folgendes Bild: es gab einen signifikanten Unterschied zwischen der Lage genarmer und genreicher BACs. Die genarmen DNA-Abschnitte lagen peripherer als die genreichen; ein t-test auf die Median-Quartile-Ergebnisse ( $p = 0,033$ ) und ein U-test auf die Median-Quartile-Test ( $p = 0,019$ ) bestätigten diesen Befund. Mit dem Auswertungsprogramm „Statistik größer kleiner“ konnte gezeigt werden, daß in 15/25 (60%) der ausgewerteten Zellen ( $n = 25$ ) genarm peripherer lag als genreich. Die Differenz der mittleren radialen Mediane beträgt 5,4% des Gesamtradius und ist damit doppelt so groß wie bei dem Versuch in der G0-Phase (2,61%) und signifikant.

Bei der Auswertung mit dem ADS-Programm zeigte sich ebenfalls, daß die genarmen BACs in 12/21 (57%) der ausgewerteten Zellkerne ( $n = 21$ ) peripherer lagen als die genreichen. Die mittleren absoluten Abstände von der CT-Oberfläche betragen -685,06 nm für die genarmen BAC-Pools und -694,36 nm für die genreichen. Damit lagen die genreichen DNA-Bereiche stärker im Negativen, also tiefer im Inneren des CT, was zu den mit der 3D-RRD-Software erhobenen Ergebnissen paßt.



**Abbildung 4.10. Verteilung von genarmer und genreicher DNA in Bezug auf das CT12 bei HLY in der S-Phase**

Farbverteilung A-F: genarm: rot, genreich: grün, Paint: blau

Darstellung eines Versuchs mit genarmen/genreichen BAC-Pools von Chromosom 12 auf HLY in der S-Phase

**A:** Z-Projektionsbild der genarmen und genreichen BAC-Pools;

In der gezeigten Zelle läßt sich die radiale Verteilung der BACs erkennen

**B:** Transmissionsbild derselben CTs in ihrer Zelle

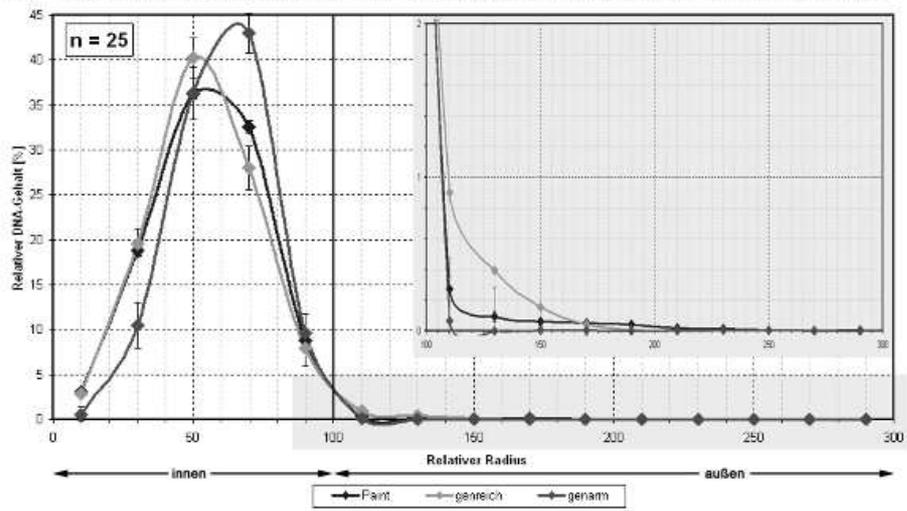
**C:** Amira 3D-Rekonstruktion der gezeigten Paints (Rekonstruktion von Katrin Küpper)

**Kurven D-F: siehe nächste Seite**

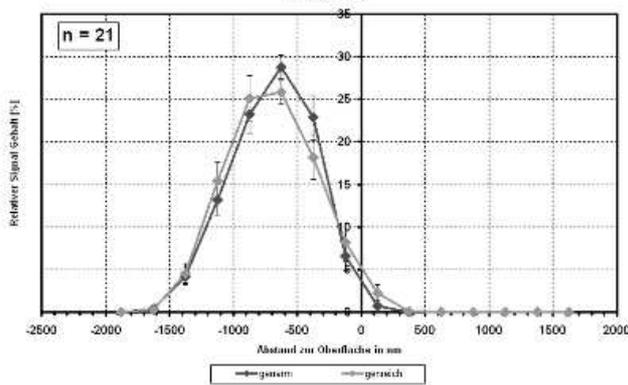
**D:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für genarme und genreiche BACs zeigen einen unterschiedlichen Verlauf. Die genarmen DNA-Bereiche (rot) liegen peripherer als die genreichen (grün). Der Unterschied zwischen beiden Graphen ist signifikant.

**E+F:** Kurven der ADS-Auswertung. Es ist kein Unterschied zu den Ergebnissen der 3D-RRD-Auswertung zu finden. Auch hier liegen die genarmen BACs peripherer als die genreichen BACs

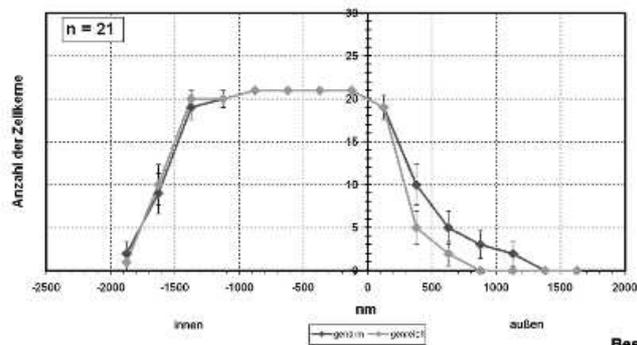
**D** Verteilung genamer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HLY in der S-Phase



**E** Verteilung genamer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HLY in der S-Phase



**F** Verteilung genamer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HLY in der S-Phase



Beschreibung siehe vorangegangene Seite

Insgesamt kann man die vorgestellten Versuche zu den HLY mit den genarmen/genreichen BAC-Pools wie folgt zusammenfassen:

1. In den HLY gibt es **einen** hochsignifikanten radialen Verteilungsunterschied zwischen den genarmen und genreichen BAC-Pools in Bezug auf den Kern. Genarme BAC-Pools liegen peripherer als genreiche.
2. Es kann **keine** signifikante radiale Verteilung der BAC-Pools in Bezug auf das CT12 in der G0-Phase gefunden werden.
3. In der S-Phase kann **ein** signifikanter radialer Verteilungsunterschied zwischen den genarmen und genreichen BAC-Pools in Bezug auf das CT12 gefunden werden. Genarme BAC-Pools liegen peripherer als genreiche.
4. Bei den HLY findet sich **ein** zellzyklusabhängiger Unterschied in der radialen Verteilung subchromosomaler Bereiche zwischen Zellen in der G0- und S-Phase.

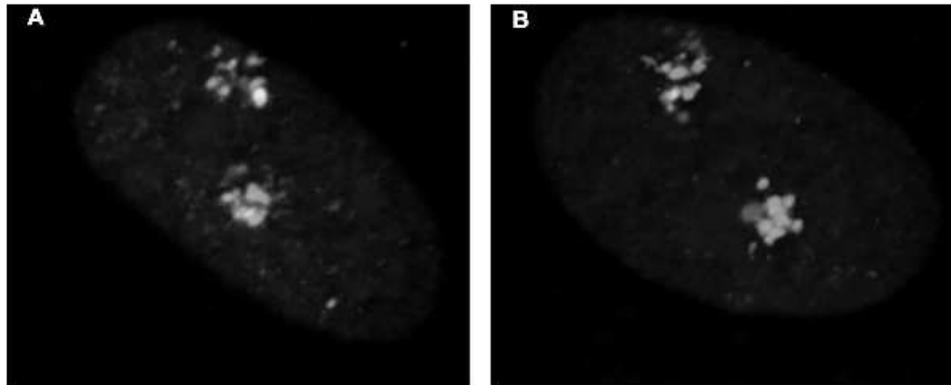
#### **4.4.3 Humane Fibroblasten und die radiale Verteilung genarmer/genreicher BAC-Pools**

##### **Die subchromosomale Struktur genarmer/genreicher DNA in Bezug auf den Kern in der G0-Phase**

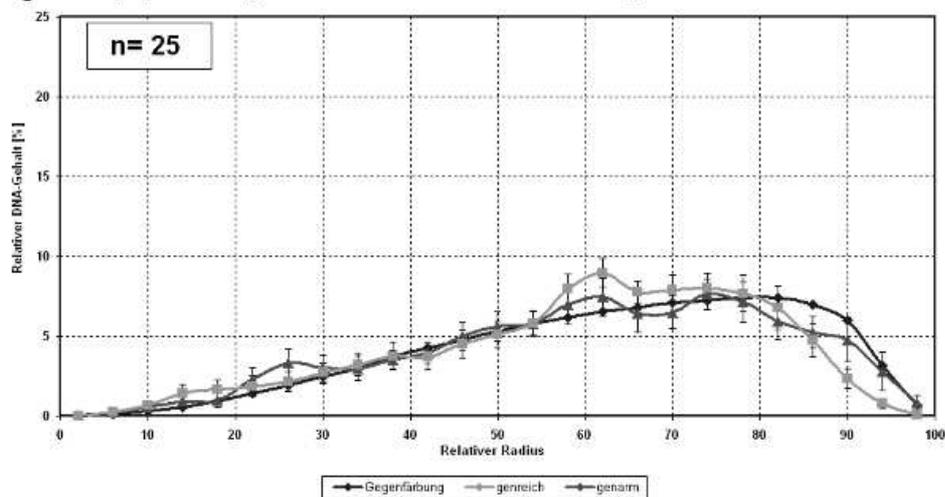
Humane Fibroblasten (HFb) gehören zu der Familie der Bindegewebszellen. Sie sind in der Lage, eine kollagene extrazelluläre Matrix auszuscheiden und sind extrem anpassungsfähig (Alberts, 1995). Es handelt sich um sehr flache Zellen mit einem sehr flachen Zellkern. Werden sie in Kultur gehalten, liegen sie ca. zur Hälfte in G0, zur anderen Hälfte in der S-Phase vor (laborinterne, unveröffentlichte Daten). Die für die Versuche verwendeten HFb sind weibliche Zellen aus primärer Zellkultur.

Analog zu den mit HLY durchgeführten Versuchen wurden auch die HFb auf die radialen Verteilungsunterschiede genarmer und genreicher subchromosomaler Bereiche von Chromosom 12 untersucht.

Dazu wurden die fixierten und pepsinierten HFb für mindestens 40h mit einem Hybridisierungsmix inkubiert. Dieser enthielt genarme BAC-Pools markiert mit Digoxigenin und genreiche BAC-Pools markiert mit Biotin. Zum Nachweis der BAC-Signale wurden die Markierungen (Label) mit Fluorochrom-markierten Antikörpern nachgewiesen, Cy3 für



**C** Verteilung genarmer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf den Kern bei HFb in der G0-Phase



**Abbildung 4.11. Verteilung von genarmer und genreicher DNA in Bezug auf den Kern bei HFb in der G0-Phase**

Farbverteilung A-C: genarm: rot, genreich: grün, Gegenfärbung: blau

Darstellung eines Versuchs mit genarmen/genreichen BAC-Pools von Chromosom 12 auf HFb in der G0-Phase

**A+B:** Z-Projektionsbilder (Zellen 1(A), 11(B)) der genarmen und genreichen BAC-Pools vor der Gegenfärbung der Zelle; die BACs geben klare und eindeutig Signale. Eine radiale Verteilung der genreichen und genarmen DNA-Bereiche, die durch die BACs markiert werden, ist nicht zu sehen

**C:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für genarme und genreiche BACs zeigen keinen unterschiedlichen Verlauf. Die genarmen DNA-Bereiche (rot) scheinen in gleichem Maße peripher und zentral zu liegen wie die genreichen. In der statistischen Auswertung konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden

Digoxigenin, Cy5 für Biotin. Zusätzlich wurde der Zellkern mit YoYo, das im FITC-Kanal aufgenommen werden kann, gegengefärbt. Um diejenigen HFb zu identifizieren, die in G0 vorliegen, wurden die Zellen mit AMCA-gekoppelten Antikörpern gegen Ki67 inkubiert. Ki67 ist ein Protein im Zellkern, das bei allen proliferierenden Zellen vorkommt. Es liegt in Form feiner Sprenkel (G1-Phase) oder auch in größeren Ansammlungen (alle anderen Phasen) vor. Einzig in der G0-Phase ist es nicht vorhanden. Betrachtet man HFb unter dem Epifluoreszenzmikroskop, kann man das AMCA-Signal Ki67-positiver Zellen im DAPI-Kanal erkennen. Möchte man G0-HFb mit dem LSM aufnehmen, so wählt man Ki67-negative Zellen. Mit dem LSM wurden alle BAC-Signale der HFb in G0 in den Kanälen Cy3, Cy5, FITC aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der 3D-RRD-Software (Feinheit 26).

Wie in der Abbildung 4.11. zu sehen ist, kann kein Unterschied in der radialen Verteilung der genarmen und genreichen DNA-Bereiche festgestellt werden.

Die statistische Untersuchung der mit der 3D-RRD-Software erhobenen Werte ergab im Detail, daß in 17/25 (68%) der ausgewerteten Zellkerne ( $n = 25$ ) die genarmen DNA-Bereiche peripherer liegen als die genreichen („Statistik größer kleiner“). Die Differenz der mittleren radialen Mediane betrug aber nur 1,06% des Gesamtradius. Mit dem t-Test auf das Ergebnis des Median-Quartile-Test konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden ( $p = 0,75$ ).

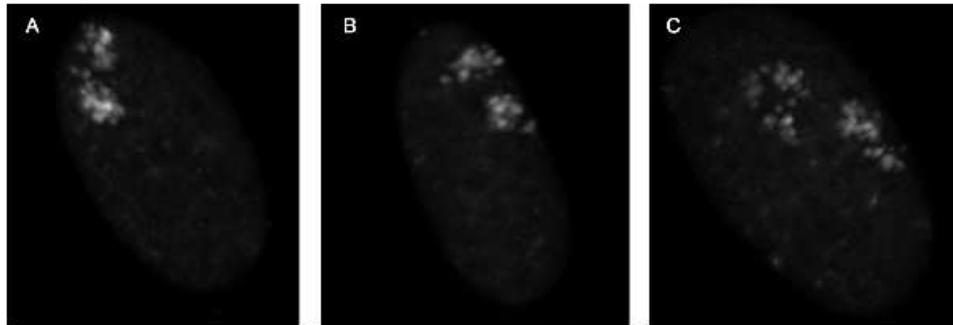
Es lassen sich folglich bei den HFb in der G0-Phase keine radialen Verteilungsunterschiede zwischen den genarmen und genreichen BAC-Pools in Bezug auf den Kern finden.

### **Die subchromosomale Struktur genarmer/genreicher DNA in Bezug auf den Kern in der S-Phase**

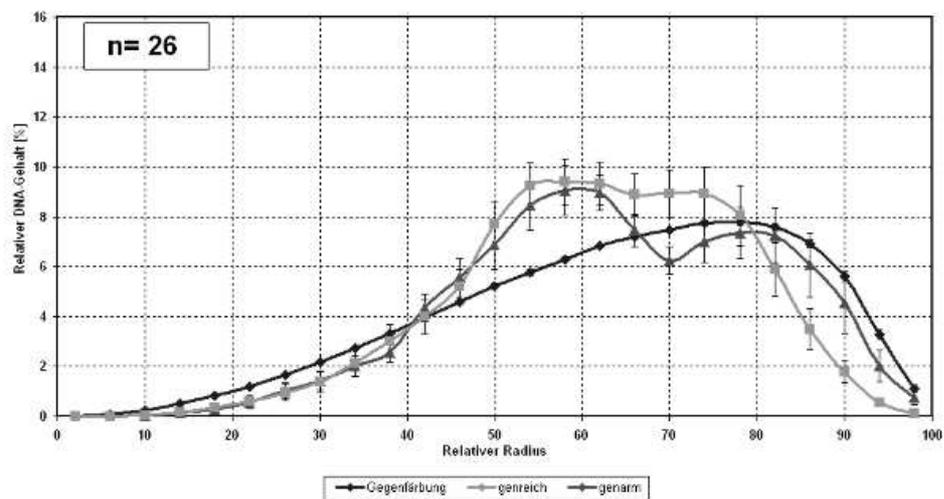
Um Vergleiche zwischen den beiden Zellzykluszeitpunkten G0 und S-Phase und ihre Auswirkungen auf die radiale Verteilung machen zu können, wurden die oben beschriebenen Versuche an HFb in der S-Phase wiederholt. Dazu wurden BrdU-markierte, fixierte und pepsinierte HFb mit einem Hybridisierungsmix inkubiert, der genarme und genreiche BAC-Pools enthielt. Die genarmen BACs waren wie zuvor mit Digoxigenin markiert, die genreichen mit Biotin. Die Inkubationszeit betrug mindestens 40h.

Die Signale der BAC-Pools wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen: Cy3 für Digoxigenin, Cy5 für Biotin. Anschließend wurden die Zellen mit YoYo -anregbar im FITC-Kanal- gegengefärbt. Der Nachweis des Vorliegens von Zellen in der S-Phase wurde mittels AMCA-gekoppelten Antikörpern gegen BrdU geführt. Nur BrdU positive Zellen wurden für die Mikroskopie verwendet.

Alle Signale in den drei Kanälen Cy3, Cy5, FITC wurden mit dem LSM aufgenommen und mittels 3D-RRD ausgewertet (Feinheit 26).



**D** Verteilung genarmer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf den Kern bei HFb in der S-Phase



**Abbildung 4.12. Verteilung von genarmer und genreicher DNA in Bezug auf den Kern bei HFb in der S-Phase**

Farbverteilung A-D: genarm: rot, genreich: grün, Gegenfärbung: blau

Darstellung eines Versuchs mit genarmen/genreichen BAC-Pools von Chromosom 12 auf HFb in der S-Phase

**A-C:** Z-Projektionsbilder (Zellen 8(A),9(B),15(C)) der genarmen und genreichen BAC-Pools vor dem Hintergrund der Gegenfärbung;

die BACs geben klare und eindeutig zuordbare Signale. Gelbe Signale entstehen durch die Überlagerung verschiedener BAC-Signale. Es ist nicht mit Sicherheit zu sagen, ob die BACs dabei nur in großer Nähe zueinander liegen oder tatsächlich überlappen.

Eine radiale Verteilung der genreichen und genarmen DNA-Bereiche, die durch die BACs markiert werden, ist nicht zu sehen

**D:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für genarme und genreiche BACs zeigen keinen unterschiedlichen Verlauf. Auch in der statistischen Auswertung konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden

Wie man der Abbildung 4.12. entnehmen kann, findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen der radialen Verteilung der genarmen und der genreichen DNA-Bereiche. In 15/26 (58%) der ausgewerteten Zellkerne ( $n = 26$ ) lagen die genarmen BAC-Pools peripherer als die genreichen („Statistik größer kleiner“). Die Differenz der mittleren relativen Radien betrug 1,91% des Gesamtradius und ist somit sehr klein. Ein auf das Ergebnis des Median-Quartile-Tests durchgeführter t-Test konnte keinen Unterschied in der Verteilung beider BAC-Pools finden ( $p = 0,427$ ).

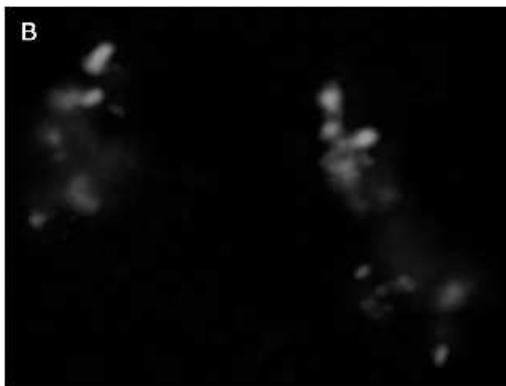
Als Ergebnis bleibt festzuhalten, daß es keine radialen Verteilungsunterschiede zwischen den genarmen und den genreichen BAC-Pools in den Interphasekernen der HFb in der S-Phase gibt.

### **Die subchromosomale Struktur genarmer/genreicher DNA in Bezug auf das CT in der G0-Phase**

Für diesen Versuch wurden fixierte und pepsinierte HFb verwendet, die mit einem Hybridisierungsmix mit genarmen und genreichen BAC-Pools und einem Paint von Chromosom 12 inkubiert wurden. Die verwendeten Markierungen (Label) waren Digoxigenin für genarm, Biotin für genreich und DNP für den Paint. Die Inkubationszeit betrug mindestens 40h. Der Nachweis der BAC-Pools erfolgte mittels Fluorochrom-markierter Antikörper. Dabei wurden Cy3 für Digoxigenin, Cy5 für Biotin und FITC für DNP eingesetzt. Um die Zellen zu identifizieren, die sich in G0 befinden, wurde ein Nachweis von Ki67 im Zellkern mittels AMCA-gekoppelten Antikörpern geführt. Der Ki67- Nachweis ist damit im DAPI-Kanal des Epifluoreszenzmikroskops, in dem auch AMCA leuchtet, möglich. Es wurden nur Ki67-negative Zellen in den drei Kanälen Cy3, Cy5 und FITC mit dem LSM aufgenommen. Anschließend wurden die Daten mit der 3D-RRD-Software (outer Shells, Feinheit 16, Vergrößerung 3) und dem ADS-Programm ( $d_{min} -2000$ ,  $d_{max} + 2001$ ,  $F = 17$ ) ausgewertet.

Wie auf der Abbildung 4.13. zu sehen ist, können keine radialen Verteilungsunterschiede zwischen der genreichen und der genarmen DNA in Bezug auf den Kern festgestellt werden. Die 3D-RRD-Auswertung zeigte, daß in 11/26 (42%) der ausgewerteten Zellkerne ( $n = 26$ ) genarm peripherer lag als genreich („Statistik größer kleiner“). Da die Differenz der mittleren relativen Radien aber nur  $-0.75\%$  des Gesamtradium betrug, kann die Aussage der „Statistik größer kleiner“-Auswertung als nur sehr eingeschränkt aussagekräftig gewertet werden. Die statistische Prüfung mittels t-Test auf das Ergebnis des Median-Quartile-Testes ergab keinen Unterschied in der Verteilung genarmer und genreicher BAC-Pools ( $p = 0,728$ ).

In der ADS-Auswertung wurde gefunden, daß in 14/26 (54%) der ausgewerteten Zellkerne ( $n = 26$ ) genarm peripherer lag als genreich. Die Graphen der ASD-Ergebnisse verlaufen sehr



**Abbildung 4.13. Verteilung genarmer und genreicher DNA-Bereiche in Bezug auf das CT12 bei HFB in der G0-Phase**

Farbverteilung in den Bildern A-E: genreich: grün, genarm: rot, Paint von CT12: blau

**A+B:** Z-Projektionsbilder (Zellen 10(A), 12(B)) der CTs 12 mit den BACs vor dem Hintergrund der Paints von CT12; jedes der vier gezeigten CT12 besitzt eine unterschiedliche Gestalt, und auch die Form der mit BACs markierten DNA-Bereiche variiert

**Kurven C-E befinden sich auf der nächsten Seite**

**C:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung.

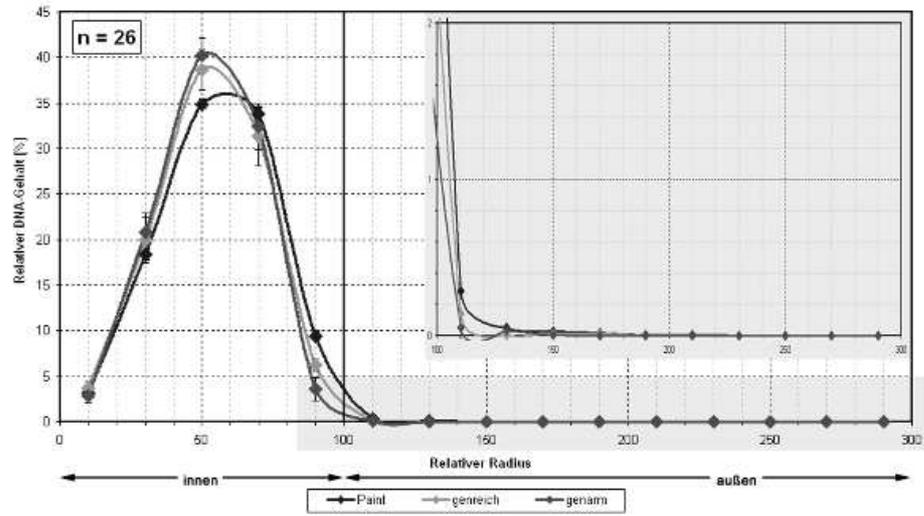
Die beiden Graphen für die genarme und die genreiche DNA verlaufen gleich. Auch im Ausschnitt der ausserhalb des CTs liegenden BACs läßt sich keine große Abweichung erkennen.

**D+E:** Kurven der ADS-Auswertung

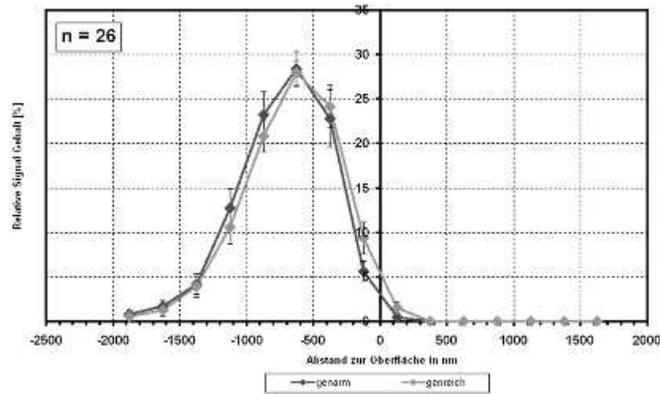
**D:** Wie bei der für flache Zellen genauere Auswertungsoption mit ADS zu erwarten zeigt die Kurve ein häufigeres Auftreten von BACs außerhalb des CTs.

**E:** Die ADS-Auswertung entspricht im Übrigen genau der 3D-RRD-Auswertung: es läßt sich kein Unterschied in der radialen Verteilung genarmer und genreicher BAC-Pools in Bezug auf das CT bei HFB in der G0-Phase eruieren

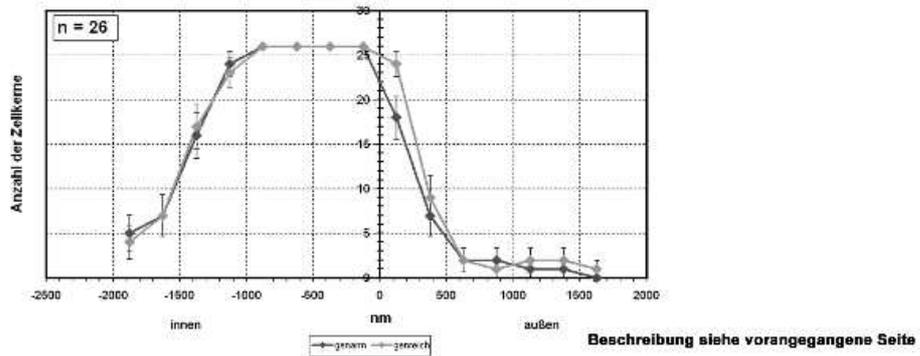
**C** Verteilung genärmer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HFb in der G0-Phase



**D** Verteilung genärmer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf den Kern bei HFb in der G0-Phase



**E** Verteilung genärmer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf den Kern bei HFb in der G0-Phase



dicht beieinander. Die absoluten Abstände von der CT-Oberfläche betragen  $-712,09$  nm für genarm,  $-655,25$  nm für genreich. Die Differenz beträgt somit  $-56,84$  nm.

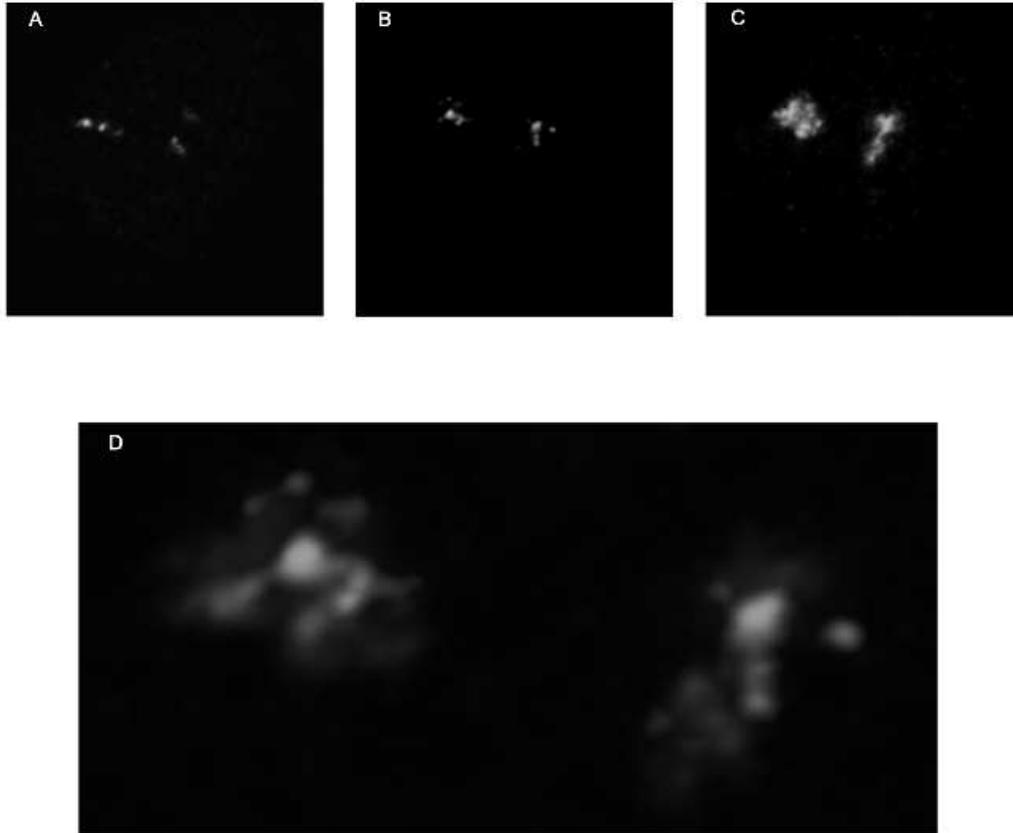
Dies bedeutet, daß genreich ganz geringfügig peripherer liegt als genarm. Diese Tendenz scheint aber sehr schwach ausgeprägt zu sein, so daß sie in der für flache Zellen etwas weniger sensitiven Auswertung mit 3D-RRD nicht zu sehen ist. Zusammenfassend kann man sagen, daß keine radialen Verteilungsunterschiede zwischen der genarmen und der genreichen DNA in Bezug auf das CT12 bei HFb in der G0-Phase zu finden sind.

### **Die subchromosomale Struktur genarmer/genreicher DNA in Bezug auf das CT in der S-Phase**

Für den Nachweis einer möglichen radialen Verteilung von genreichen und genarmen subchromosomalen Bereichen im CT12 bei HFb in der S-Phase wurden Objektträger mit fixierten und pepsinierten HFb verwendet. Die teilungsaktiven HFb waren vor der Fixierung in Paraformaldehyd mit BrdU markiert worden. In den Hybridisierungsmix wurden genarme (Digoxigenin markiert) und genreiche (Biotin markiert) BAC-Pools sowie ein Paint von Chromosom 12 (DNP markiert) gegeben. Die Inkubationszeit betrug mindestens 40h. Um die Signale der BAC-Pools und des Paints sichtbar zu machen, wurden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet. Die Zuordnung von Markierungen (Label) zu Fluorochromen war wie folgt: Digoxigenin und Cy3, Biotin und Cy5 sowie DNP und FITC. Die BrdU-positiven Zellen wurden mit AMCA-markierten Antikörpern nachgewiesen. Das Aufleuchten von AMCA-Signalen im DAPI-Kanal des Epifluoreszenzmikroskops war ein Nachweis für das Vorliegen von S-Phase positiven HFb. Die drei Farben Cy3, Cy5 und FITC wurden in den zugehörigen Kanälen mit dem LSM aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem 3D-RRD-Programm (outer shells, Feinheit 16, Vergrößerung 3) und der ADS-Software (dmin  $-2000$ , dmax  $+2001$ ,  $F=17$ ).

Ebenso wie zuvor für die G0-Phase beobachtet worden war, ist keine radiale Verteilung der genarmen/genreichen BAC-Pools in Bezug auf das CT 12 zu finden. In der Abbildung 4.14. kann man den nahezu kongruenten Verlauf der Kurven der Verteilung von genarmen und genreichen DNA-Bereichen sehen.

Dies paßt zu den Befunden der 3D-RRD-Auswertung. Hier lagen bei der Auswertung „Statistik größer kleiner“ genau in 14/28 (50%) der ausgewerteten Zellkerne ( $n = 28$ ) genarme BACs peripherer als genreiche. Die Differenz der mittleren relativen Radien betrug 1,62% des Gesamtradius und ist somit sehr klein. Ein t-Test auf das Ergebnis des Median-Quartile-Testes bescheinigte das Fehlen eines Unterschiedes in der Verteilung genarmer und genreicher DNA-Bereiche ( $p = 0,503$ ).



**Abbildung 4.14. Verteilung genarmer und genreicher DNA-Bereiche in Bezug auf das CT12 bei HFb in der S-Phase**

Farbverteilung in den Bildern A-G: genarm: rot, genreich: grün, Paint: blau

**Kurven E-G: siehe nächste Seite**

Darstellung eines 3D-Versuches mit genarmen und genreichen BAC-Pools von Chromosom 12 auf HFb in der S-Phase

**A:** Z-Projektionsbild der genarmen BACs markiert mit Digoxigenin und nachgewiesen mit Cy3

**B:** Z-Projektionsbild der genreich BACs markiert mit Biotin und nachgewiesen mit Cy5

**C:** Z-Projektionsbild des Paints markiert mit DNP und nachgewiesen mit FITC

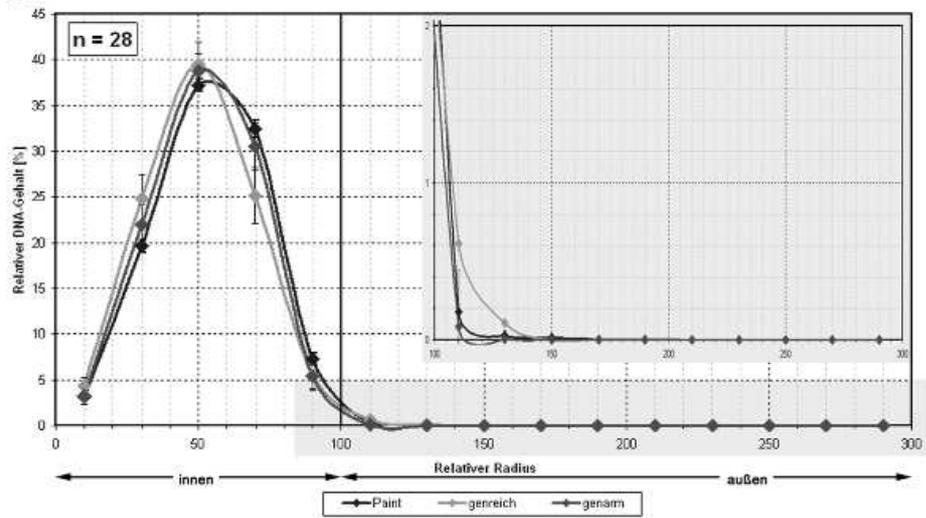
**D:** Z-Projektionsbild in RGB fusioniert aus den Bildern A-C

Die einzelnen BACs können klar und deutlich erkannt werden. Eine radiale Verteilung ist nicht zu sehen

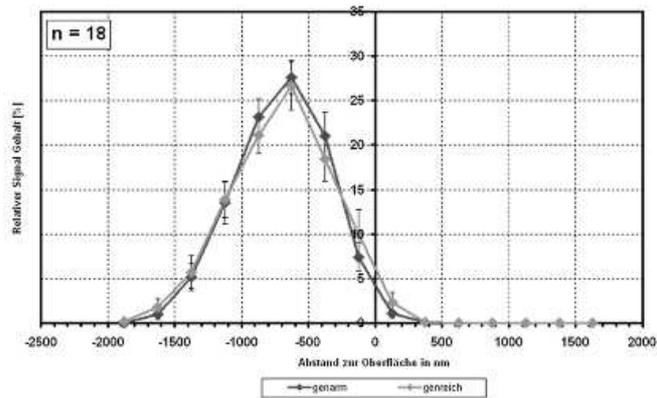
**E:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für genarm und genreich zeigen den gleichen Verlauf. Auch im Ausschnitt der außerhalb des CTs liegenden BACs ist kein anderes Ergebnis zu sehen

**F+G:** Kurven der ADS- Auswertung. Es ist kein Unterschied zwischen den genarmen und den genreichen BACs bezüglich ihrer radialen Verteilung zu erkennen. Die genarmen und genreichen DNA-Bereiche, die mit BACs markiert wurden, zeigen keine radialen Anordnungsunterschiede in HFb in der S-Phase

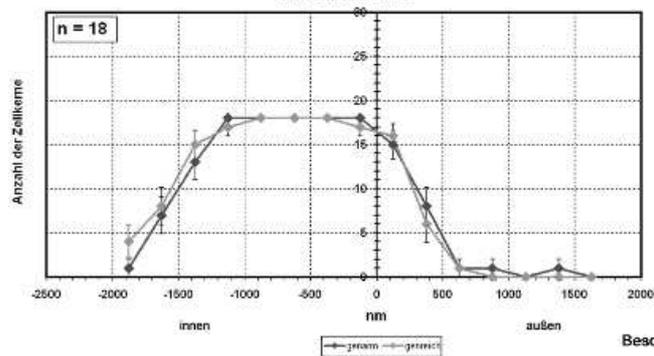
**E** Verteilung genärmer und genreicher BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HFb in der S-Phase



**F** Verteilung von genärmen und genreichen BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HFb in der S-Phase



**G** Verteilung von genärmen und genreichen BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HFb in der S-Phase



Beschreibung siehe vorangegangene Seite

Das Ergebnis der ADS-Auswertung entspricht dem der 3D-RRD-Auswertung. In 14/28 Zellkernen, also in genau 50% der untersuchten Zellen, fand sich genarm peripherer als genreich. Die absoluten Abstände von der CT-Oberfläche betragen  $-697,7$  nm für genarmen BAC-Pools und  $-692,3$  nm für die genreichen BAC-Pools. Die Differenz beträgt somit  $-5,4$  nm.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit keinem der beiden Auswertungsprogramme ein Unterschied in der Verteilung der genarmen und genreichen DNA-Abschnitte bezogen auf das CT12 bei HFb in der S-Phase gefunden werden konnte.

Insgesamt kann man die 4 vorgestellten Versuche mit den HFb und den genarmen/genreichen BAC-Pools wie folgt zusammenfassen:

1. Es gibt **keine** signifikanten radialen Verteilungsunterschiede zwischen den genarmen und genreichen DNA-Bereichen in Bezug auf den Kern bei HFb.
2. Es gibt **keine** signifikante radiale Verteilung der DNA-Bereiche unterschiedlicher Gendichte in Bezug auf das CT.
3. Es gibt **keine** signifikanten zellzyklusabhängigen Unterschiede in diesen Befunden. Es ist weder in G0 noch in der S-Phase ein signifikanter radialer Verteilungsunterschied zu beobachten.

#### **4.4.4 SW480-Tumorzellen und die radiale Verteilung genarmer/genreicher BAC-Pools**

##### **Die subchromosomale Struktur genarmer/genreicher DNA in Bezug auf den Kern in der S-Phase**

SW480-Tumorzellen sind Zellen einer Coloncarcinom-Zelllinie. Ähnlich wie HLY sind sie runde Zellen mit einem ebenfalls eher runden Zellkern.

Um zu untersuchen, ob es radiale Verteilungsunterschiede zwischen genarmen und genreichen DNA-Bereichen im Interphasekern gibt, wurden Versuche mit genarmen/genreichen BAC-Pools durchgeführt und einmal in Beziehung zum geometrischen Mittelpunkt des Kerns, einmal zum CT12 gesetzt. Da nach den Erfahrungen in den vorangegangenen Experimenten mit HLY und HFb am ehesten ein Unterschied in der radialen Verteilung der DNA-Bereiche in der S-Phase zu erwarten war, wurden die SW480-Tumorzellen in dieser Zellzyklusphase untersucht.

Für den Versuch waren die mit Paraformaldehyd fixierten und pepsinierten SW480-Tumorzellen kurz vor der Fixierung mit BrdU markiert worden. Sie wurden mit einem Hybridisierungsmix inkubiert, der genarme und gereiche BAC-Pools enthielt. Die genarmen BACs waren mit Digoxigenin markiert, die genreichen mit Biotin. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 40h wurden die Signale der BACs mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen. Verwendet wurden die Fluorochrome Cy3 für Digoxigenin und Cy5 für Biotin. Zusätzlich wurden die Zellen mit YoYo, nachweisbar im FITC-Kanal, gegengefärbt. Um Zellen in der S-Phase zu identifizieren, wurden AMCA-markierte Antikörper gegen BrdU auf das Hybridisierungsfeld gegeben. AMCA-positive S-Phase-positive Zellen leuchten im DAPI-Kanal des Epifluoreszenzmikroskops, in dem auch AMCA angeregt wird, auf. Sie wurden in allen drei Kanälen im LSM aufgenommen und anschließend mit dem 3D-RRD-Programm (Feinheit 26) ausgewertet.

Wie in der Abbildung 4.15. zu sehen ist, gibt es eine klare Tendenz der radialen Verteilung in der Form, daß genarm peripherer liegt als genreich.

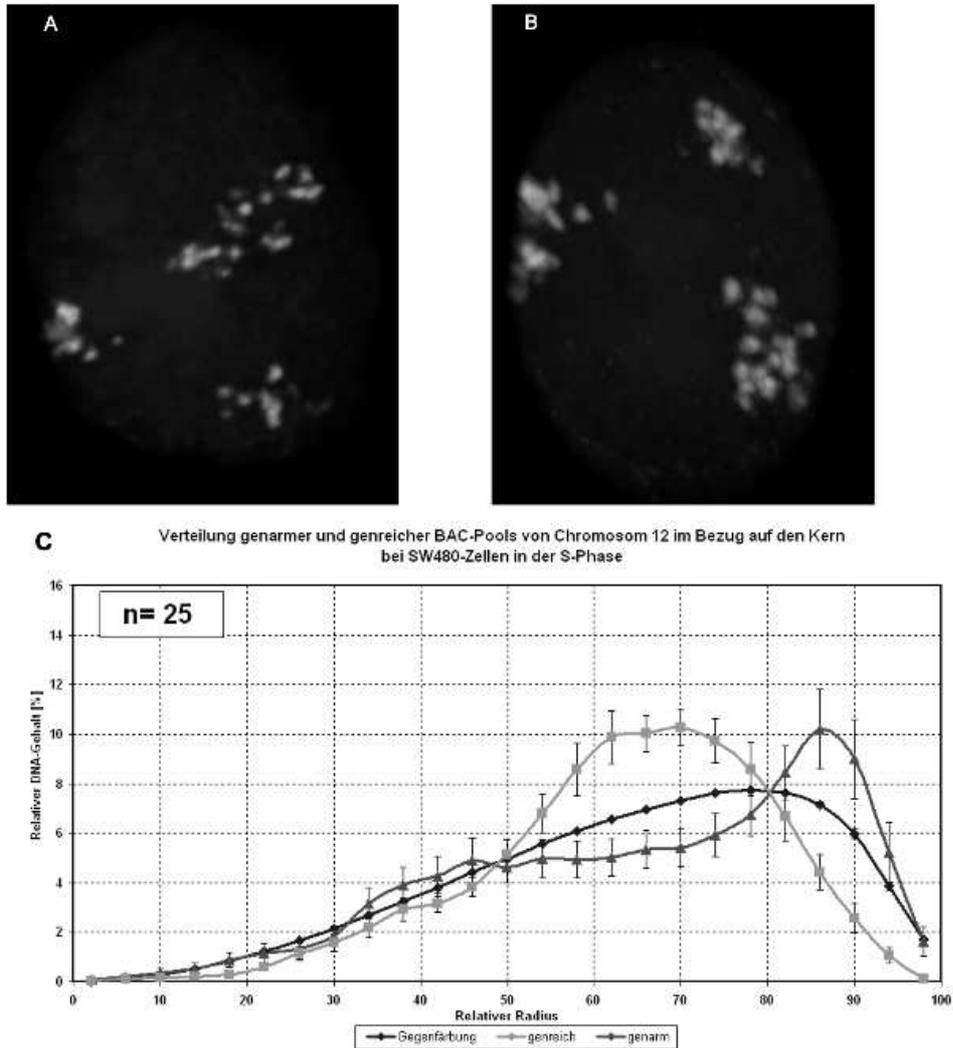
Laut „Statistik größer kleiner“ sind in 17/24 (68%) der ausgewerteten Zellkerne ( $n = 24$ ) genarme DNA-Bereiche an periphereren Orten zu finden als genreiche. Die Differenz der mittleren relativen Radien beträgt interessanterweise jedoch nur 2,57% des Gesamtradius. Somit konnte mittels U-Test auf die Ergebnisse des Median-Quartile-Tests kein Unterschied zwischen den genarmen und genreichen BAC-Pools bezüglich ihrer Verteilung gefunden werden ( $p = 0,340$ ).

Es bleibt jedoch sicherlich unbenommen, anhand des Kurven-Verlaufs eine Tendenz zu postulieren, bei der genarm peripherer liegt als genreich.

### **Die subchromosomale Struktur genarmer/genreicher DNA in Bezug auf das CT in der S-Phase**

Die für diesen Versuch verwendeten SW480-Tumorzellen wurden vor ihrer Fixierung mit 4%igem Paraformaldehyd mit BrdU markiert. Nach der Fixierung und Pepsinierung wurden die Zellen mit einem Hybridisierungsmix für mindestens 40h inkubiert. Dieser enthielt neben den genarmen (Digoxigenin markiert) und genreichen (Biotin markiert) BAC-Pools einen Paint (DNP markiert) für das CT12. Die Markierungen (Label) wurden mittels Fluorochrom-gekoppelter-Antikörper nachgewiesen. Als Fluorochrome wurden Cy3 für Digoxigenin, Cy5 für Biotin sowie FITC für DNP verwendet.

Der Nachweis von BrdU-Signalen - im DAPI-Kanal des Epifluoreszenzmikroskops mittels AMCA-gekoppelter Antikörpern gegen BrdU - diente als Beleg, daß sich die untersuchte Zelle in der S-Phase befindet.



**Abbildung 4.15. Verteilung von genarmer und genreicher DNA in Bezug auf den Kern bei SW480-Coloncarcinom-Zellen in der S-Phase**

Farbverteilung A-C: genarm: rot, genreich: grün, Gegenfärbung: blau

Darstellung eines Versuchs mit genarmen/genreichen BAC-Pools von Chromosom 12 auf SW480-Zellen in der S-Phase

**A+B:** Z-Projektionsbilder (Zellen 8(A),10(B)) der genarmen und genreichen BAC-Pools vor dem Hintergrund der Gegenfärbung des Zellkerns

Aufgrund der strukturellen Umbauten in der Coloncarcinomzelllinie SW480 sind mehr als zwei CT 12 zu erkennen. Die BACs geben klare und eindeutig Signale, die eine tendenzielle radiale Verteilung erkennen lassen

**C:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für genarme und genreiche BACs zeigen einen unterschiedlichen Verlauf. Die genarmen DNA-Bereiche (rot) scheinen peripherer zu liegen als die genreichen (grün). In der statistischen Auswertung konnte kein signifikanter Unterschied eruiert werden. Die Verhältnisse der Graphen zueinander zeigen demnach nur eine Tendenz zur unterschiedlichen radialen Verteilung.

Mit dem LSM wurden die Signale der BAC-Pools und des Paints in allen drei Kanälen für Cy3, Cy5 und FITC in S-Phase-Zellen aufgenommen. Wie aufgrund der vorliegenden Translokationen zu erwarten war, gab es in jedem Kern nicht nur zwei CT, die sich mit dem Paint darstellen ließen, sondern mehrere. Die von den Paints erhaltenen Signale wurden mit der 3D-RRD-Software (outer shells, Feinheit 16, Vergrößerung 3) und dem ADS-Programm (dmin -2000, dmax + 2001, F= 17) einzeln ausgewertet.

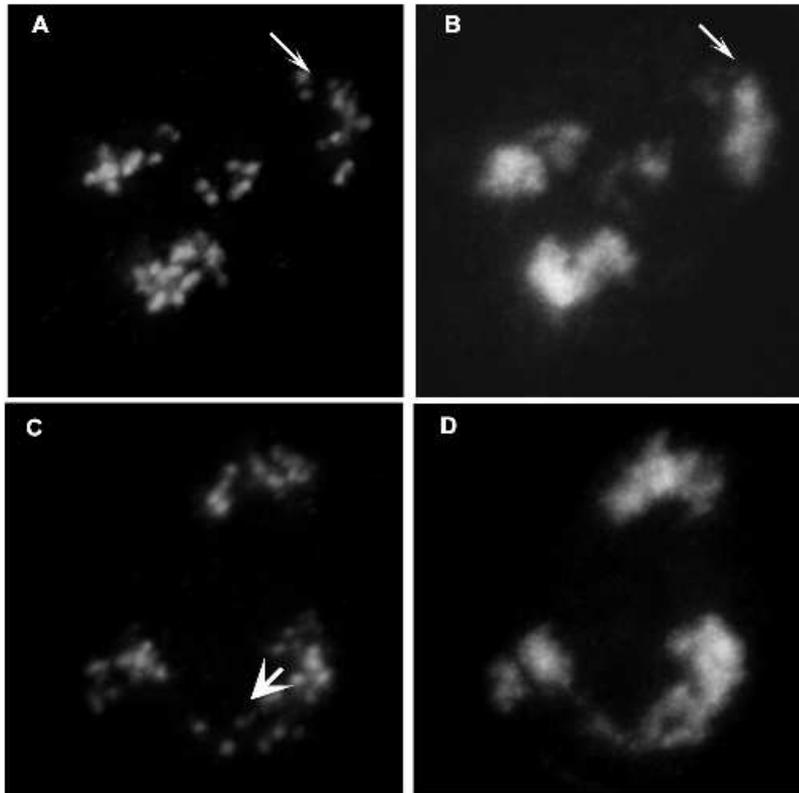
Wie auf der Abbildung 4.16. zu sehen ist, verlaufen die Graphen der genarmen und genreichen BAC aus der 3D-RRD-Auswertung versetzt. Die statistische Auswertung der Werte ergab, daß in 17/24 (71%) der ausgewerteten Zellen (n = 24) genarm peripherer lag als genreich. Die Differenz der mittleren relativen Radien betrug 7,11% des Gesamtradius. Ein t-Test auf das Ergebnis des Median-Quartile-Testes bescheinigte den signifikanten Unterschied in der radialen Verteilung genarmer und genreicher DNA-Bereiche (p = 0,015). Hiermit konform gingen auch die Ergebnisse der ADS-Auswertung:

Laut „Statistik größer kleiner“ lagen in 16/24 (66%) der ausgewerteten Zellen (n = 24) die genarmen BACs peripherer als die genreichen. Die genarmen BACs hatten einen absoluten Abstand von der CT-Oberfläche von -843,48nm, die genreichen von -899,73nm. Der größere negative Wert der genreichen BACs zeigt, daß sie weiter innen in Richtung CT-Zentrum liegen müssen. Die Differenz der Werte betrug 56,25nm.

Man kann zusammenfassen, daß es bei den SW480-Tumorzellen einen signifikanten Unterschied in der radiale Verteilung der BAC-Pools unterschiedlicher Gendichte in Bezug auf das CT gibt. Genarme BACs liegen peripherer als genreiche. Dies wurde von beiden Auswertungsprogrammen belegt.

Insgesamt kann man die vorgestellten Versuche mit den SW480-Tumorzellen und den genarmen/genreichen BAC-Pools wie folgt zusammenfassen:

1. Es gibt **keine** signifikanten radialen Verteilungsunterschiede zwischen genarmen und genreichen DNA-Bereichen im Interphasekern der SW480-Tumorzelle.
2. Es gibt **einen** signifikanten radialen Verteilungsunterschied der DNA-Bereiche unterschiedlicher Gendichte in Bezug auf das CT. Genarme BAC-Pools liegen peripherer als genreiche.



**Abbildung 4.16. Verteilung von genarmer und genreicher DNA in Bezug auf das CT12 bei SW480-Coloncarcinom-Zellen in der S-Phase**

Farbverteilung A-G: genarm: rot, genreich: grün, Paint: blau

Darstellung eines Versuchs mit genarmen/genreichen BAC-Pools von Chromosom 12 in den Zellkernen der SW480-Tumorzellen in der S-Phase

**Aufgrund der strukturellen Aberrationen der Zellen sind in jedem ausgewerteten Zellkern mehr als zwei CT12 zu finden**

**A:** Z-Projektionsbild (Zelle 2/7) der genarmen und genreichen BAC-Pools;

man beachte, daß bei dem kleinen zusätzlichen CT (Isochromosom?) in der Mitte nur genreiche BACs zu sehen sind **B:** Aufgehellte Z-Projektion des Paints (Zelle 2/7)

Man vergleiche die mit den weißen Pfeilspitzen markierten Bereiche. Nach Setzen eines

Schwellenwertes für die Auswertung, scheinen die mit Pfeilen markierten BACs in Bild A außerhalb des Territoriums zu liegen. Vergleicht man aber ihre Lage mit einem Bild des Paints ohne Schwellenwertkorrektur (Bild B), so sieht man, daß sie eigentlich noch innerhalb des CTs liegen

**C:** Z-Projektionsbild (Zelle 1/7) der genarmen und genreichen BAC-Pools;

In dem mit dem breiten Pfeil markierten Bereich ist ein DNA-Loop/Stalk zu sehen, auf dem BACs nachgewiesen werden können

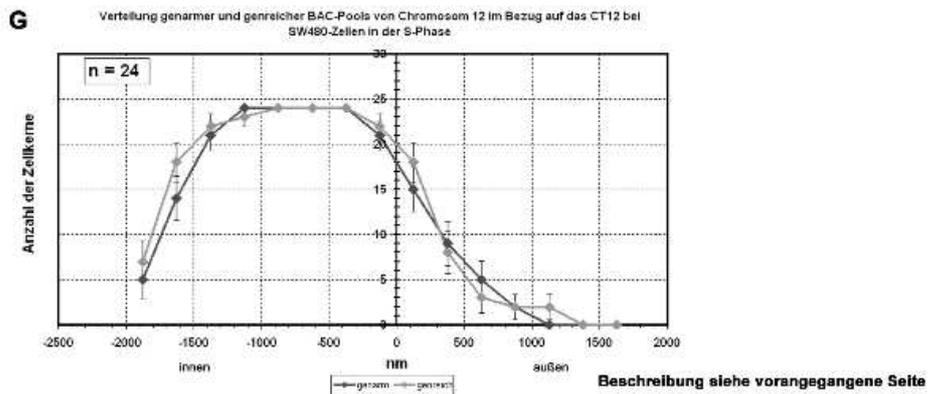
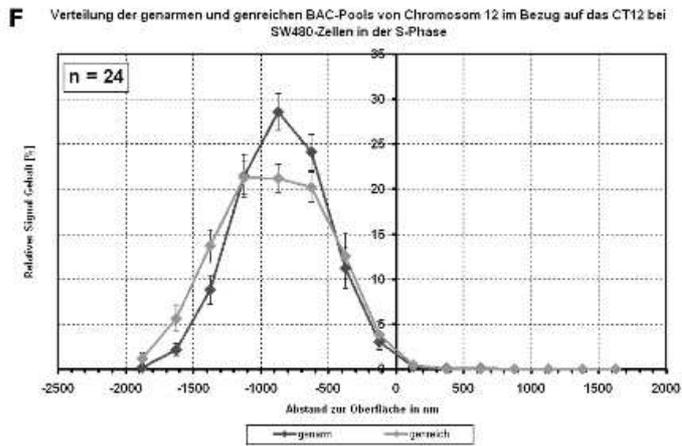
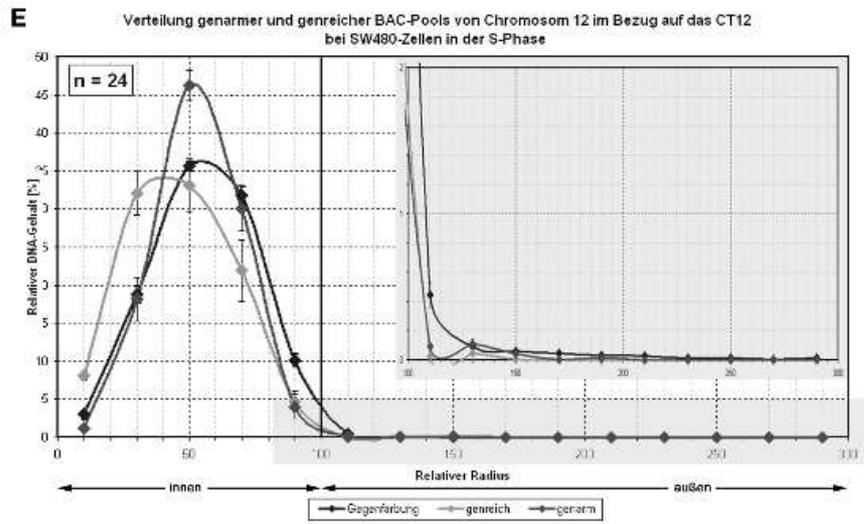
**D:** Z-Projektion des Paints (Zelle 1/7)

Auch in der Darstellung des Paints läßt sich eine Loop erkennen

**Kurven E-G: siehe nächste Seite**

**E:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für genarme und genreiche BACs zeigen einen unterschiedlichen Verlauf. Die genarmen DNA-Bereiche (rot) liegen peripherer als die genreichen (grün). Der Unterschied zwischen beiden Graphen ist signifikant.

**F+G:** Kurven der ADS-Auswertung. Es ist kein Unterschied zu den Ergebnissen von 3D-RRD zu finden. Auch hier liegen die genarmen BACs peripherer als die genreichen BACs



In der folgenden Tabelle werden die Distanzen der mittleren relativen Radien der genarmen und genreichen BAC-Pools aus den bisher vorgestellten Versuchen mit HLY, HFb und SW480-Tumorzellen noch einmal zur Übersicht zusammengefaßt:

Zelltyp und Versuchsanordnung	a) Distanz [genarm] – [genreich] in % des Gesamtradius	b) Anteil der Zellen pro Versuch mit [genarm] > [genreich]
HLY, genarm/genreich, Gegenfärbung; G0	19,28	18/18 (100%)
HLY, genarm/genreich, Gegenfärbung; S	17,16	25/25 (100%)
HLY, genarm/genreich/Paint; G0	2,61	16/24 (66%)
HLY, genarm/genreich/Paint; S	5,4	15/25 (60%)
HFb, genarm/genreich, Gegenfärbung; G0	1,06	17/25 (68%)
HFb, genarm/genreich, Gegenfärbung; S	1,91	15/26 (58%)
HFb, genarm/genreich/Paint; G0	-0,75	11/26 (42%)
HFb, genarm/genreich/Paint; S	1,62	14/28 (50%)
SW480, genarm/genreich, Gegenfärbung; S	2,57	17/25 (68%)
SW480, genarm/genreich/Paint; S	7,11	17/24 (71%)

**Tabelle 4.1.** Übersicht über

a) die Distanzen der mittleren relativen Radien (dies entspricht der Differenz der mittleren relativen Radien) – erhoben in der 3D-RRD-Auswertung, unter der Vorstellung, daß genarme BACs peripherer liegen als genreiche BACs

b) den Anteil der Zellen, bei denen genarm peripherer lag als genreich sowie dessen Prozentwert - erhoben in „Statistik größer kleiner“

#### 4.4.5 Humane Lymphozyten und die radiale Verteilung R- und G-Banden-assoziiierter BAC-Pools

##### Die subchromosomale Struktur R-/G-Banden-assoziiierter-DNA in Bezug auf den Kern in der G0-Phase

Wie im Kapitel „Methoden“ unter Punkt 3.8.1. beschrieben, wurden die R/G-BACs gemäß ihrer Bandenzugehörigkeit in Pools gruppiert. R-Banden-assoziierte DNA gilt als frühreplizierend, genreich und GC-reich (Strachan, 1996). Die enthaltenen Gene sind oftmals Housekeeping Gene und werden konstitutionell exprimiert. Das bedeutet, daß in einem gewissen Maße R-Banden-assoziierte-BACs genreichen und G-Banden-assoziierte den genarmen BACs entsprechen. Da aber diese beiden Sets von BAC-Pools nicht

übereinstimmen, sollte durch Versuche herausgearbeitet werden, wie die Unterschiede sich auf den Nachweis radialer Verteilungsunterschiede auswirken.

Die aus dem peripheren Blut isolierten HLY wurden in der G<sub>0</sub>-Phase mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert und pepsiniert. Es wurde ein Hybridisierungsmix, der R- und G-Banden-assoziierte BAC-Pools enthielt, verwendet. R-Banden-assoziierte BAC-Pools waren mit Dioxigenin markiert, G-Banden-assoziierte mit DNP. Der Nachweis der Markierungen (Label) erfolgte mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper. Dioxigenin wurde mit Cy3 nachgewiesen, DNP mit FITC. Anschließend wurden die Zellen mit TO-PRO, nachweisbar im Cy5-Kanal, gegengefärbt. Die Signale in den Zellen wurden mit dem LSM in den drei Kanälen für Cy3, Cy5 und FITC aufgenommen, und die Versuche mit der 3D-RRD-Software (Feinheit 26) ausgewertet.

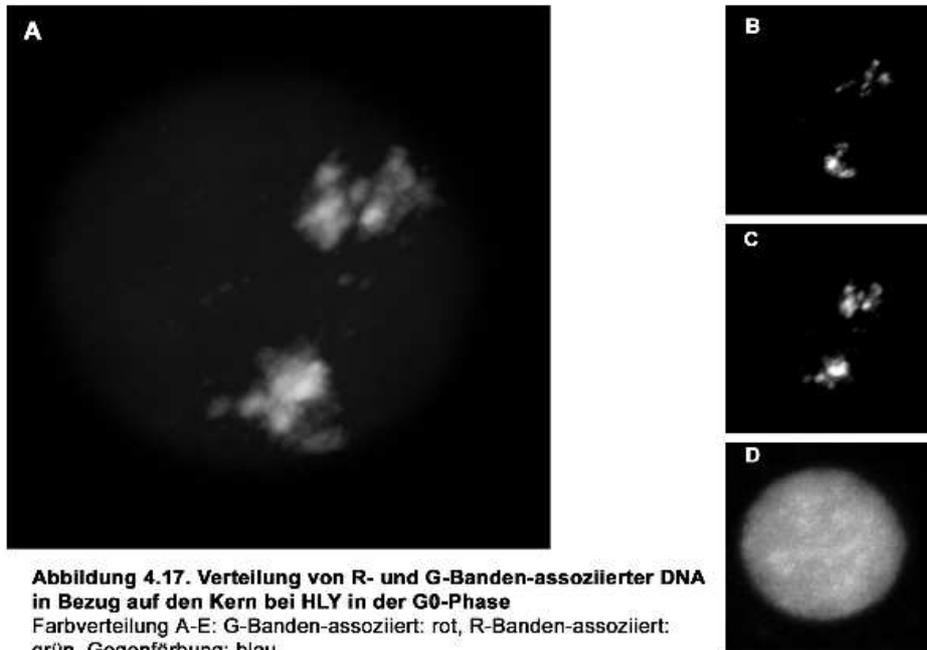
Wie in der Abbildung 4.17. zu sehen ist, liegen die Signale der G-Banden-assoziierten BACs insgesamt peripherer als die der R-BACs (Kurve der 3D-RRD-Auswertung). Dies bedeutet, daß, wie schon zuvor bei den genarm/genreichen BACs beobachtet, die eher genärmeren (G-Banden-) DNA-Bereiche weiter außen im Interphasekern liegen als die genreicheren (R-Banden-DNA).

Die Auswertung „Statistik größer kleiner“ ergab, daß in 20/20 (100%) der ausgewerteten Zellen (n = 20) die G-BACs peripherer lagen als die R-BACs. Die Differenz der mittleren relativen Radien beträgt 13,34% des Gesamtradius und ist damit verhältnismäßig groß. Ein t-Test durchgeführt auf die Ergebnisse des Median-Quartile-Tests ergab einen, wie von den Ergebnissen zu erwartenden, hochsignifikanten Unterschied zwischen der Verteilung der R- und G-Banden-assoziierten DNA ( $p < 0,001$ ).

### **Die subchromosomale Struktur R-/G-Banden-assoziiierter-DNA in Bezug auf den Kern in der S-Phase**

Auch in der S-Phase befindlichen HLY sollten auf die radiale Verteilung ihrer R/G-Banden assoziierten BAC-Pools untersucht werden. Die HLY wurden nach der Isolierung aus dem peripheren Blut mit Phytohämagglutinin stimuliert und 72h unter Standardbedingungen kultiviert. 30min vor der Fixierung mit 4%igem Paraformaldehyd wurden die Zellen mit BrdU markiert und anschließend pepsiniert. Die Inkubation mit einem Hybridisierungsmix, der Digoxigenin-markierte R-BACs und DNP-markierte G-BACs enthielt, dauerte mindestens 40h. Die Markierungen (Label) wurden mit Cy3 für Digoxigenin und FITC für DNP nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Zellen mit TO-PRO, nachweisbar im Cy5-Kanal, gegengefärbt.

Aufgrund der schlechten Hybridisierbarkeit der Zellen in dieser Versuchsanordnung mußte dieser Versuch mehrfach wiederholt werden. Trotzdem konnten nur 12 der 18 mit dem LSM



**Abbildung 4.17. Verteilung von R- und G-Banden-assoziiierter DNA in Bezug auf den Kern bei HLY in der G0-Phase**

Farbverteilung A-E: G-Banden-assoziiert: rot, R-Banden-assoziiert: grün, Gegenfärbung: blau

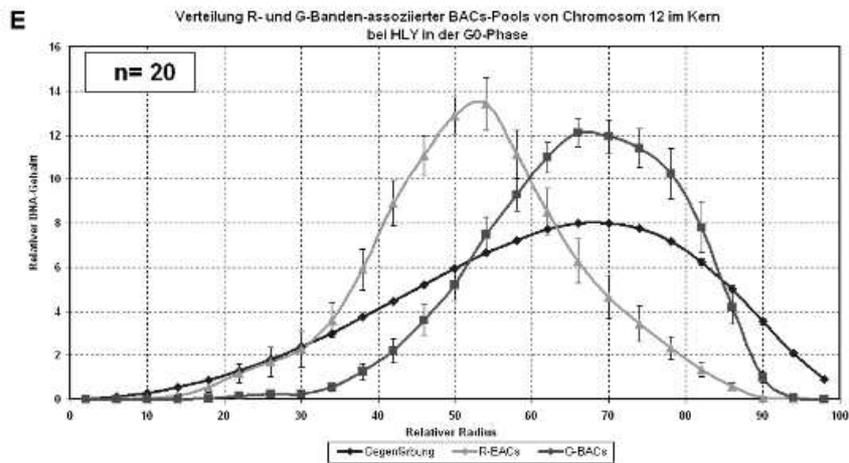
A-D: Darstellung eines Versuchs mit G- und R-Banden assoziierten BAC-Pools von Chromosom 12 auf HLY in der G0-Phase

A: Z-Projektionsbild (Zelle 4) der R- und G-Banden-assoziierten BAC-Pools vor dem Hintergrund der Gegenfärbung B: Signale der G-Banden-assoziierten BAC-Pools

C: Signale der R-Banden-assoziierten BAC-Pools D: Gegenfärbung des Zellkerns

Wie eindeutig und sehr klar zu sehen ist, gibt es eine radiale Verteilung der BACs und damit der DNA. Die G-Banden-assoziierten BACs liegen peripherer als die R-Banden-assoziierten

E: Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für R- und G-Banden-assoziierte BACs zeigen einen unterschiedlichen Verlauf. Die G-Banden-assoziierten DNA-Bereiche (rot) liegen peripherer als die R-Banden-assoziierten (grün). Der Unterschied zwischen beiden Graphen ist höchstsignifikant.



aufgenommenen Zellkerne in der 3D-RRD-Auswertung verwendet werden. Um eine optimale Auswertung auch der Randbereiche der Zellkerne zu garantieren, wurden die Signale mit der Zusatzoption „outer shells“ des 3D-RRD-Programms ausgewertet (outer shells, Feinheit 26, Vergrößerung 1,1).

Wie Abbildung 4.18. belegt, kann ein klarer und eindeutiger Unterschied zwischen der Verteilung von R- und G-Banden-assoziierten-BACs festgestellt werden.

Die Auswertung „Statistik größer kleiner“ gab an, daß in 11/12 (92%) der ausgewerteten Zellkerne ( $n = 12$ ) die G-BACs peripherer lagen als die R-BACs. Die Differenz der mittleren relativen Radien betrug 8,3% des Gesamtradius. Ein U-Test auf das Ergebnis des Median-Quartile Test bestätigte, daß die Verteilung von R- und G-Banden-assoziierten BACs signifikant unterschiedlich ist ( $p = 0,035$ ).

Das bedeutet, daß bei den untersuchten HLY sowohl in der G<sub>0</sub>- als auch in der S-Phase ein signifikanter Unterschied in der radialen Verteilung der R- und G-Banden-assoziierten DNA vorliegt.

### **Die subchromosomale Struktur R/G-Banden-assoziiierter DNA in Bezug auf das CT in der G<sub>0</sub>-Phase**

Aus den vorherigen Untersuchungen an HLY mit den genarmen und genreichen BAC-Pools wußte man um die Unterschiede in der Verteilung in Bezug auf das CT.

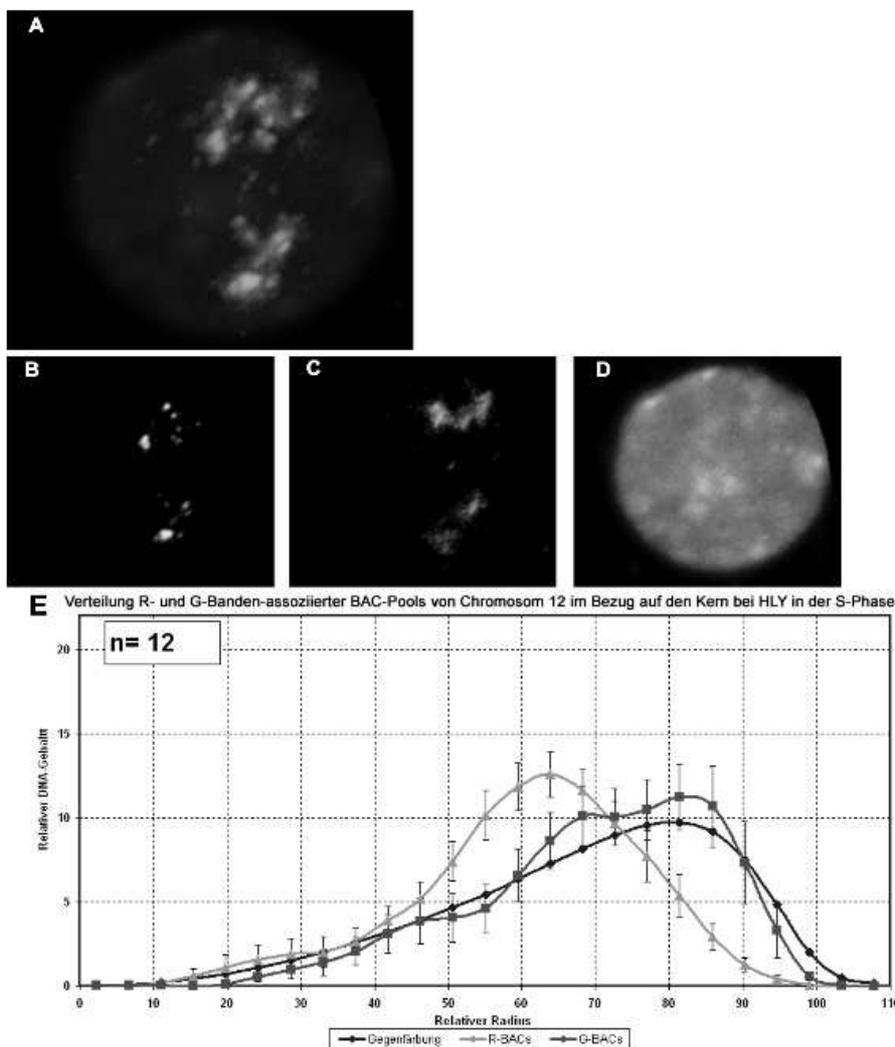
Es war nun von Interesse zu sehen, wie sich die R- und G-Banden-assoziierte DNA im Vergleich dazu verhalten würde.

Frische HLY wurden aus dem peripheren Blut isoliert, mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert und pepsiniert. Anschließend wurden sie mit einem Hybridisierungsmix inkubiert, der R-BACs markiert mit Digoxigenin, G-BAC markiert mit DNP und einen Paint markiert mit Biotin enthielt. Die Inkubationsdauer betrug mindestens 40h. Anschließend konnten die Markierungen (Label) mit Fluorochrom-markierten Antikörpern nachgewiesen werden. Dabei wurden die Fluorochrome Cy3 für Digoxigenin, FITC für DNP und Cy5 für den Nachweis von Biotin verwendet.

Die Signale der Fluorochrome wurden in allen drei Kanälen mit dem LSM aufgenommen und anschließend mit dem 3D-RRD-Programm (outer shells, Feinheit 16, Vergrößerung 3) und der ADS-Software ( $d_{min} -2000$ ,  $d_{max} + 2001$ ,  $F = 17$ ) ausgewertet.

Wie auf Abbildung 4.19. zu sehen ist, verlaufen die Graphen der R- und G-Banden-assoziierten BACs über weite Strecken parallel.

Die Auswertung „Statistik größer kleiner“ mit den Werten der 3D-RRD-Auswertung ergab, daß in 14/25 (56%) der ausgewerteten Zellkerne ( $n = 25$ ) die G-BACs peripherer lagen als die R-BACs. Die Differenz der mittleren relativen Radien betrug 0,03% des Gesamtradius



**Abbildung 4.18. Verteilung von R- und G-Banden-assoziierter DNA in Bezug auf den Kern bei HLY in der S-Phase**

Farbverteilung A-E: G-Banden-assoziert: rot, R-Banden-assoziert: grün, Gegenfärbung: blau

**A-D:** Darstellung eines Versuchs mit G- und R-Banden assoziierten BAC-Pools von Chromosom 12 auf HLY in der G<sub>0</sub>-Phase

**A:** Z-Projektionsbild (Zelle 10) der R- und G-Banden-assozierten BAC-Pools vor der Gegenfärbung; Wie eindeutig zu sehen ist, gibt es eine radiale Verteilung der BACs und damit der DNA.

Die G-Banden-assozierten BACs liegen insgesamt peripherer als die R-Banden-assozierten. Zusätzlich kann man erkennen, daß die G-Bacs stärker zur Cluster-Bildung neigen als die R-BACs

**B:** Signale der G-Banden-assozierten BAC-Pools

**C:** Signale der R-Banden-assozierten BAC-Pools

**D:** Gegenfärbung des Zellkerns

**E:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für die R- und G-Banden-assozierten BACs zeigen einen unterschiedlichen Verlauf. Die G-Banden-assozierten DNA-Bereiche (rot) liegen peripherer als die R-Banden-assozierten (grün). Der Unterschied zwischen beiden Graphen ist signifikant.

und ist somit verschwindend klein. Der t-Test auf das Ergebnis des Median-Quartile-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung R- und G-Banden-assoziiierter BACs ( $p = 0,991$ ).

In der ADS-Auswertung ergab der „Statistik größer kleiner“-Test, daß in 11/25 (44%) der ausgewerteten Zellkerne ( $n = 25$ ) die G-Bacs peripherer lagen als die R-BACs. Die absoluten Abstände betragen  $-768,57$  nm von der CT-Oberfläche für die G-BACs und  $-721,83$  nm für die R-BACs. Die Differenz dieser Werte beträgt  $-46,74$  nm.

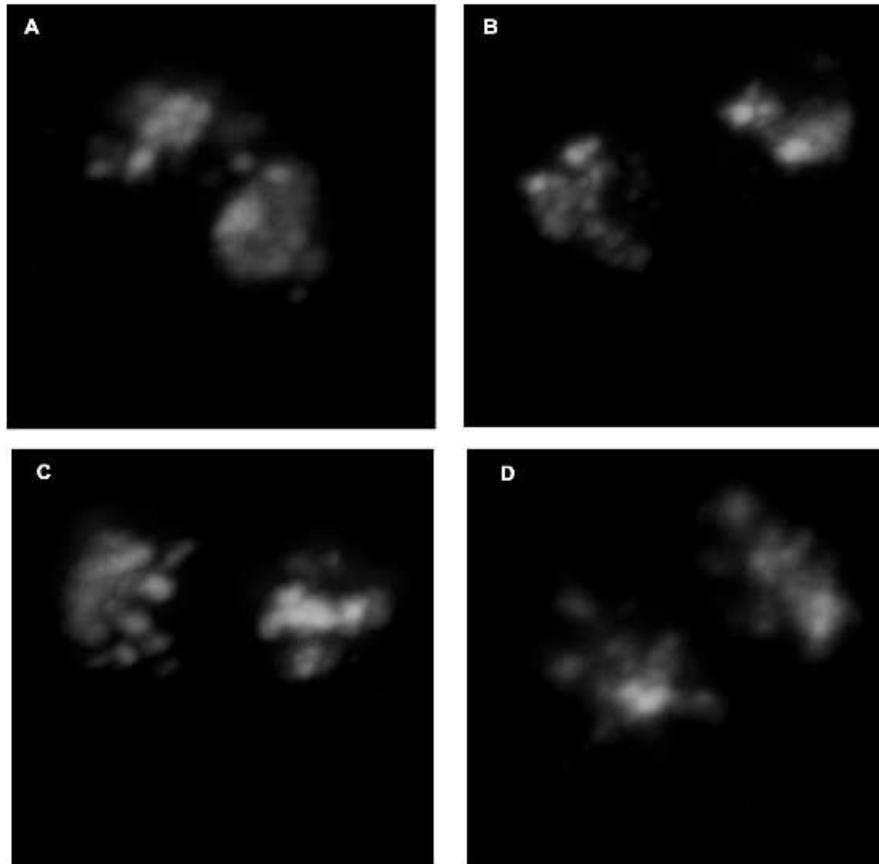
Eine Erklärung für dieses von dem Befund der 3D-RRD-Auswertung abweichende Ergebnis, könnte sein, daß ADS einen vorhandenen, aber von 3D-RRD nicht aufgenommenen Unterschied in der Verteilung erfaßt hat. Die Auswertungen widersprechen sich nicht, ASD postuliert nur einen größeren Unterschied.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ergibt dennoch, daß es keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung von R- und G-Banden-assoziiierter DNA in Bezug auf das CT12 bei HLY in der G<sub>0</sub>-Phase gibt.

### **Die subchromosomale Struktur R/G-Banden-assoziiierter DNA in Bezug auf das CT in der S-Phase**

R-Banden-assoziierte DNA wird früh in der S-Phase repliziert. Es ist in diesem Zusammenhang interessant zu untersuchen, ob eine eventuell bereits abgelaufene Replikation eines Teils des genetischen Materials den Befund zur radialen Verteilung subchromosomaler Bereiche verändern würde.

Deswegen wurden die Versuche mit R- und G-Banden-assoziierten BACs auf HLY in der S-Phase wiederholt. Dazu wurden die frischen HLY aus dem peripheren Blut mit Phytohämagglutinin stimuliert und für 72h in Kultur genommen. 30min vor der Fixierung wurde Bromdesoxyuridin (BrdU) zu der Zellkultur zugegeben. Zellen, die gerade ihre DNA replizierten, wurden mit BrdU markiert. Nach Fixierung mit 4%igem Paraformaldehyd und einer Pepsinierung wurden die Zellkerne mit den R-BAC-Pools markiert mit Digoxigenin, den G-BAC-Pools markiert mit DNP und einem Paint von Chromosom 12 markiert mit Biotin hybridisiert. Die Inkubationsdauer mit dem Hybridisierungsmix betrug mindestens 40h. Digoxigenin wurde mit Antikörpern nachgewiesen, die an Cy3 gekoppelt waren, DNP mit FITC- und Biotin mit Cy5-gekoppelten Antikörpern. Um zu sehen, welche Zellen sich in der S-Phase befinden, wurden die Zellen mit Anti-BrdU-Antikörpern markiert. Dieser Antikörper ist seinerseits an das Fluorochrom ANCA gekoppelt, das unter dem Epifluoreszenzmikroskop im DAPI-Kanal sichtbar gemacht werden kann. Die so als in der S-Phase befindlich identifizierten HLY wurden in den drei Kanälen für Cy3, Cy5 und FITC mit dem LSM aufgenommen. Mit dem 3D-RRD-Programm (outer shells, Feinheit 16, Vergrößerung 3) und



**Abbildung 4.19. Verteilung von R- und G-Banden-assoziiierter DNA in Bezug auf das CT12 bei HLY in der G0-Phase**

Farbverteilung A-G: G-Banden-assoziiert: rot, R-Banden-assoziiert: grün, Paint: blau  
 Darstellung eines Versuchs mit R- und G-Banden-assoziierten BAC-Pools von Chromosom 12 auf HLY in der G0-Phase

**A-D:** Z-Projektionsbilder (Zellen 4(A),5(B),7(C),12(D)) der R- und G-Banden-assoziierte BAC-Pools vor dem Hintergrund der Paints von CT12; die BAC-Signale können deutlich erkannt, es kann aber keine radiale Verteilung gesehen werden

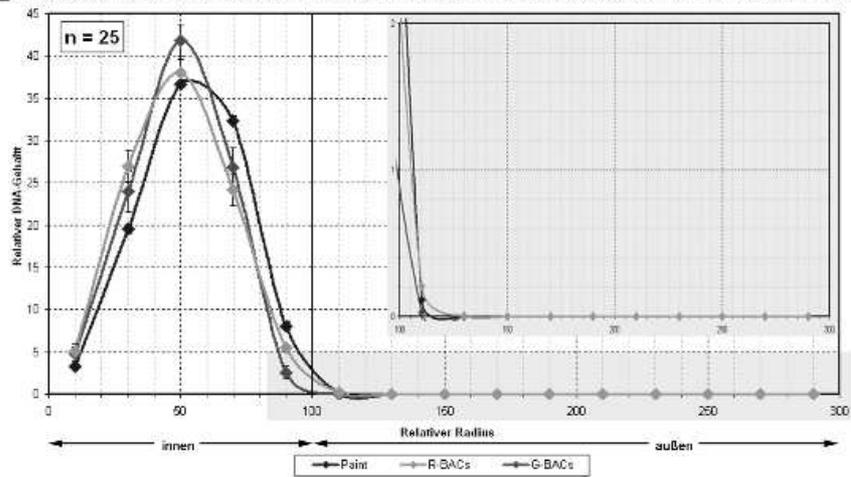
**Kurven E-G: siehe nächste Seite**

**E:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für G-bzw. R-Banden-assoziierte BACs zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Der Unterschied zwischen ihnen ist nicht signifikant.

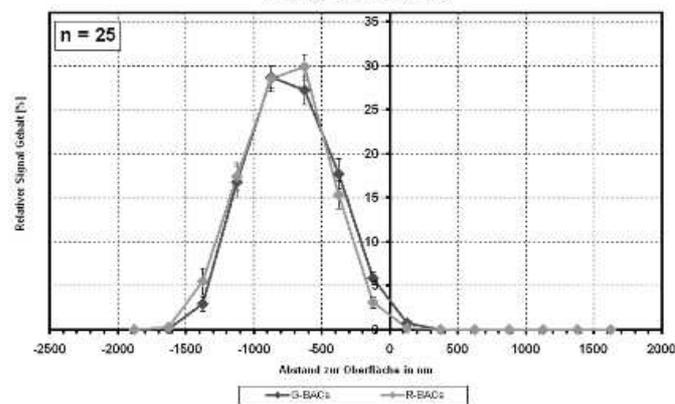
**F+G:** Kurven der ADS-Auswertung. Anders als bei den Ergebnissen der 3D-RRD-Auswertung ist hier die Tendenz einer radiale Verteilung zu finden.

Die R-Banden-assoziierten BACs (grün) liegen peripherer als die G-Banden-assoziierten BACs (rot)

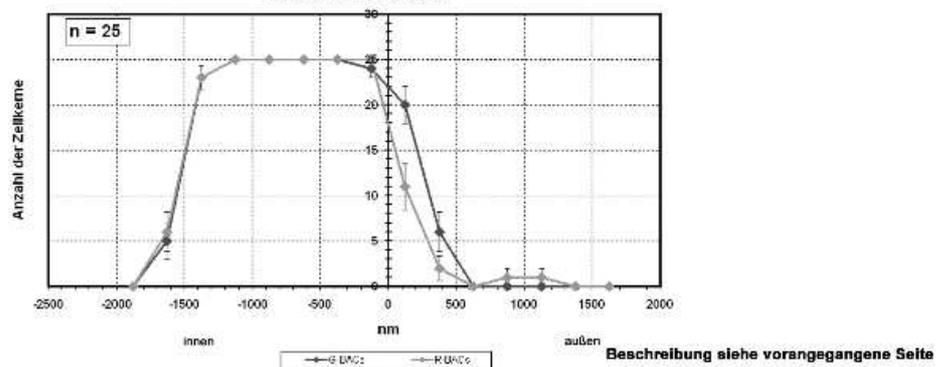
**E** Verteilung R- und G-Banden-assoziierter BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HLY in der G0-Phase



**F** Verteilung von R- und G-Banden-assozierten BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HLY in der G0-Phase



**G** Verteilung von R- und G-Banden-assozierten BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HLY in der G0-Phase



der ADS-Software ( $d_{\min} -2100$ ,  $d_{\max} + 2101$ ,  $F= 15$ ) wurden die erhaltenen Bilddaten ausgewertet.

Das Ergebnis entspricht, wie man in Abbildung 4.20. sehen kann, weitgehend dem in der G<sub>0</sub>-Phase erhobenen Befund.

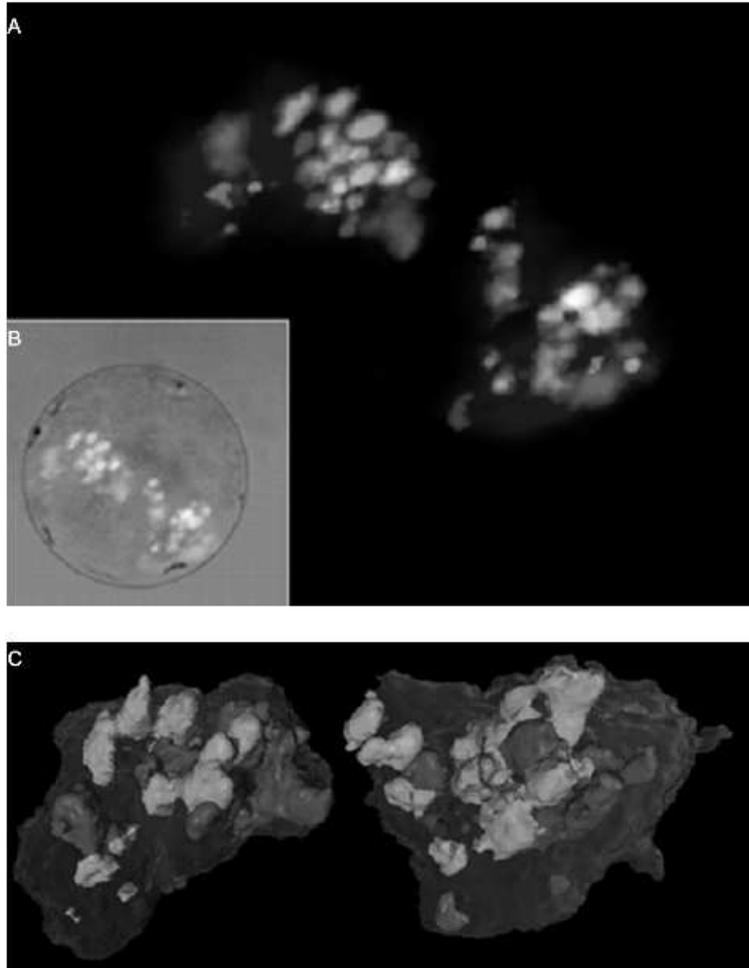
Die statistische Auswertung der Ergebnisse des 3D-RRD-Programms zeigen, daß in 8/18 (44%) der ausgewerteten Zellkerne ( $n = 18$ ) die G-Banden-assoziierten BAC-Pools peripherer lagen als die R-Banden-assoziierten („Statistik größer kleiner“). Die Differenz der mittleren relativen Radien betrug -0,87% des Gesamtradius. Die Negativität des Wertes bedeutet, daß die R-BACs peripherer liegen als die G-BACs. Da der Betrag der Differenz so klein ist, war kein signifikanter Unterschied der Kurvenverläufe zu erwarten. Tatsächlich ergab ein t-Test angewandt auf die Ergebnisse des Median-Quartile-Tests keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei verglichenen BAC-Pools ( $p = 0,71$ ).

Die ADS-Auswertung ergab, wie schon bei den Zellen in G<sub>0</sub>, daß die R-Banden-assoziierten BACs etwas peripherer lagen als die G-BACs. Die absoluten Abstände vom CT-Oberfläche betragen -667,26 nm für die G-BACs und -623,55 nm für die R-BACs. Die Differenz beträgt damit -43,71 nm. In 7/18 (39%) der ausgewerteten Zellkerne ( $n = 18$ ) lagen die G-BACs peripherer als die R-BACs oder anders herum betrachtet: in 11/18 Zellen lagen die R-BACs weiter außen als die G-BACs.

Die Auswertungen können folgendermaßen zusammengefaßt werden: in den untersuchten HLY in der S-Phase liegen tendenziell die R-Banden-assoziierten BACs peripherer als die G-Banden-assoziierten. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Insgesamt kann man die 4 vorgestellten Versuche mit den HLY und den R- und G-Banden-assoziierten BACs wie folgt zusammenfassen:

1. Es gibt **einen** signifikanten radialen Verteilungsunterschied zwischen den R- und den G-Banden zugeordneter DNA-Bereiche in Bezug auf den Kern bei HLY.
2. Es gibt **keinen** signifikanten radialen Verteilungsunterschied der DNA-Bereiche unterschiedlicher Bandenzugehörigkeit in Bezug auf das CT.
3. Es gibt **keine** signifikanten zellzyklusabhängigen Unterschiede in diesen Befunden. Es ist weder in G<sub>0</sub> noch in der S-Phase eine signifikante unterschiedliche radiale Verteilung im Vergleich zu der jeweils anderen Phase zu beobachten.



**Abbildung 4.20. Verteilung von R- und G-Banden-assoziiierter DNA in Bezug auf das CT12 bei HLY in der S-Phase**

Farbverteilung A-F: G-Banden-assoziiert: rot, R-Banden-assoziiert: grün, Paint: blau  
 Darstellung eines Versuchs mit R- und G-Banden-assoziierten BAC-Pools von Chromosom 12 auf HLY in der S-Phase

**A:** Z-Projektionsbild der R- und G-Banden-assoziierte BAC-Pools vor dem Paint von CT12;

**B:** Transmissionsbild derselben CTs in ihrer Zelle

**C:** Amira 3D-Rekonstruktion der gezeigten Paints (Rekonstruktion von Katrin Küpper)

In der vorgestellten Zelle kann keine radiale Verteilung der BAC-Pools erkannt werden.

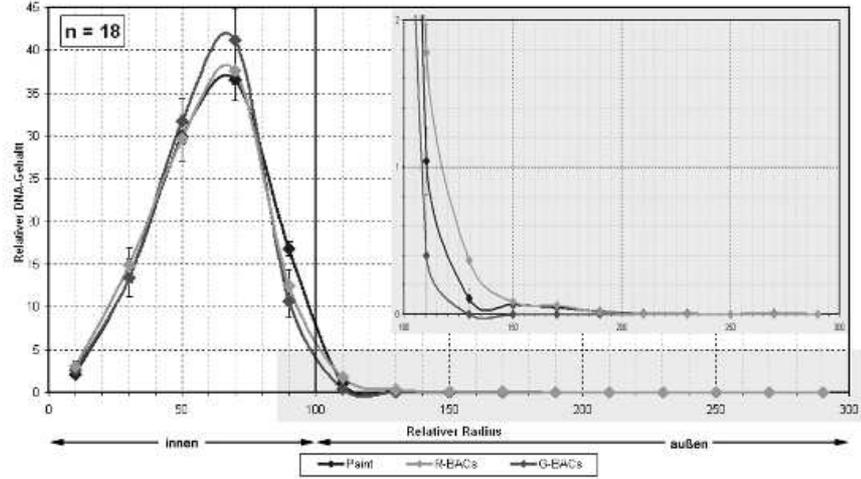
Die einzelnen BACs stellen sich jedoch klar und deutlich voneinander abgrenzbar dar

**Kurven D-F: siehe nächste Seite**

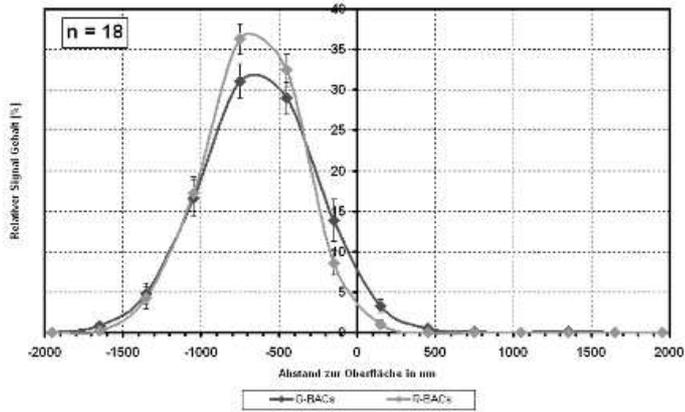
**D:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für G-bzw. R-Banden-assoziierte BACs zeigen nahezu kongruenten Verlauf. Nur geringfügig liegen die R-Banden-assoziierten BACs peripherer als die G-Banden-assoziierten. Der Unterschied zwischen beiden Graphen ist aber nicht signifikant.

**E+F:** Kurven der ADS-Auswertung. Es ist kein Unterschied zu den Ergebnissen von RRD zu finden. Auch hier liegen die R-Banden-assoziierten BAC tendenziell weiter außen als die G-Banden-assoziierten BACs

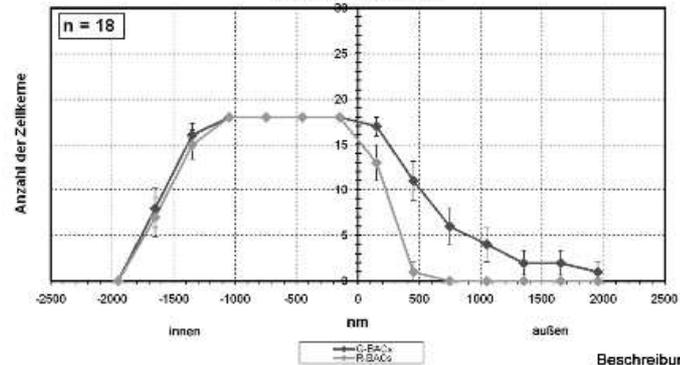
**D** Verteilung R- und G-Banden assoziierter BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HLY in der S-Phase



**E** Verteilung von R- und G-Banden-assozierten BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HLY in der S-Phase



**F** Verteilung von R- und G-Banden-assozierten BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HLY in der S-Phase



Beschreibung siehe vorangegangene Seite

#### 4.4.6

## **Humane Fibroblasten und die radiale Verteilung R- und G-Banden-assoziiierter BAC-Pools**

### **Die subchromosomale Struktur R-/G-Banden-assoziiierter-DNA in Bezug auf den Kern in der G<sub>0</sub>-Phase**

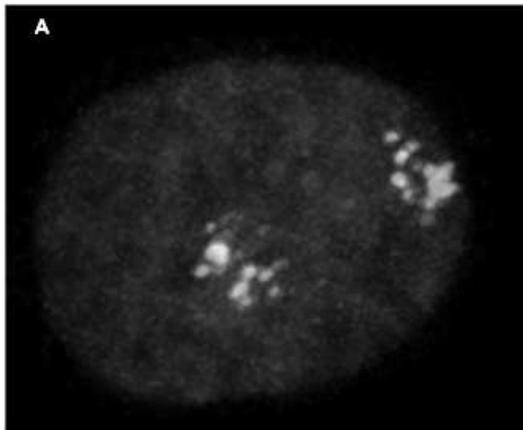
In Analogie zu den mit den HLY durchgeführten Versuchen wurden die HFb auf die etwaigen radialen Verteilungsunterschiede R- und G-Banden-assoziiierter DNA von Chromosom 12 untersucht.

Dazu wurden die mit 4%igem Paraformaldehyd fixierten und pepsinierten HFb für mindestens 40h mit einem Hybridisierungsmix inkubiert. Dieser enthielt R-Bac-Pools markiert mit Digoxigenin und G-BAC-Pools markiert mit DNP. Zur Darstellung der BAC-Signale wurden die Markierungen (Label) mit folgenden Fluorochrom-markierten Antikörpern nachgewiesen: Cy3 für Digoxigenin, FITC für DNP. Zusätzlich wurde der Zellkern mit TO-PRO, anregbar im Cy5-Kanal, gegengefärbt. Um diejenigen HFb zu identifizieren, die in G<sub>0</sub> vorliegen, wurden die Zellen mit AMCA-gekoppelten Antikörpern gegen Ki67 inkubiert. Unter dem Epifluoreszenzmikroskop leuchtet das AMCA-Signal Ki67-positiver Zellen im DAPI-Kanal auf. Mit dem LSM wurden nur Ki67-negative Zellen und hier alle BAC-Signale in den Kanälen Cy3, Cy5, FITC aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der 3D-RRD-Software (Feinheit 26) und wurde von Frau Katrin Küpper durchgeführt.

Wie in der Abbildung 4.21. zu sehen ist, kann kein Unterschied in der radialen Verteilung der R- und G-Banden-assoziierten DNA-Bereiche festgestellt werden.

Die statistische Untersuchung der mit 3D-RRD erhobenen Werte ergab im Detail, daß in 5/16 (31%) der ausgewerteten Zellkerne die G-BACs peripherer liegen als die R-BACs („Statistik größer kleiner“). Die Differenz der mittleren radialen Mediane betrug -3,1% des Gesamtradius. Diese beiden Ergebnisse sprechen dafür, daß in den ausgewerteten Zellkernen R-BACs peripherer liegen als die G-BACs. Da die Unterschiede aber sehr klein sind, konnte mit dem U-Test auf das Ergebnis des Median-Quartile-Test kein signifikanter Unterschied gefunden werden ( $p = 0,44$ ).

Folglich lassen sich in den untersuchten HFb in der G<sub>0</sub>-Phase keine Unterschiede in der radialen Verteilung der R- und G-Banden-assoziierten BAC-Pools in Bezug auf den Kern finden.

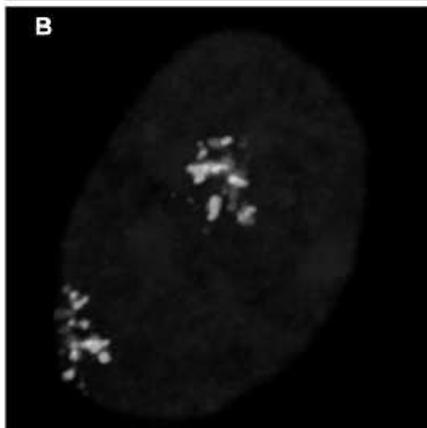


**Abbildung 4.21.**  
Verteilung von R- und G-Banden-assoziierter DNA in Bezug auf den Kern bei HFb in der G0-Phase

Farbverteilung A-C: G-Banden-assoziert: rot, R-Banden-assoziert: grün, Gegenfärbung: blau

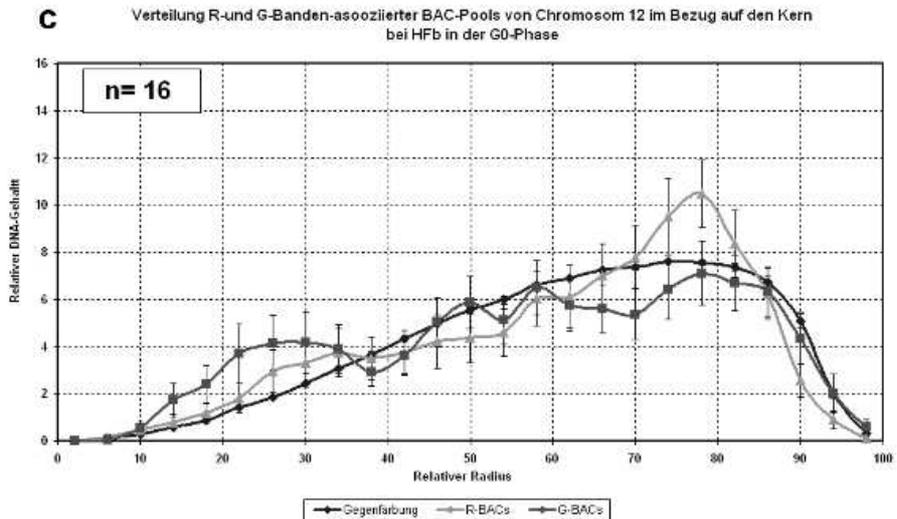
**A-B:** Darstellung eines Versuchs mit G- und R-Banden-assozierten BAC-Pools von Chromosom 12 auf HFb in der G0-Phase

**A:** RGB-Z-Projektionsbild (Zelle 6)  
**B:** RGB-Z-Projektionsbild (Zelle 11) der R- und G-Banden-assozierten BAC-Pools vor dem Hintergrund der Gegenfärbung;



Radiale Verteilungsunterschiede der BACs und damit der DNA in Bezug auf den Kern ist nicht zu sehen.

**C:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für R- und G-Banden-assozierte BACs zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Lage der G-Banden-assozierten DNA-Bereiche (rot) und den R-Banden-assozierten (grün) DNA-Arealen ist nicht eruierbar



### **Die subchromosomale Struktur R-/G-Banden-assoziiierter DNA in Bezug auf den Kern in der S-Phase**

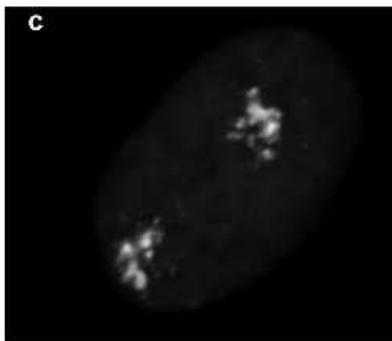
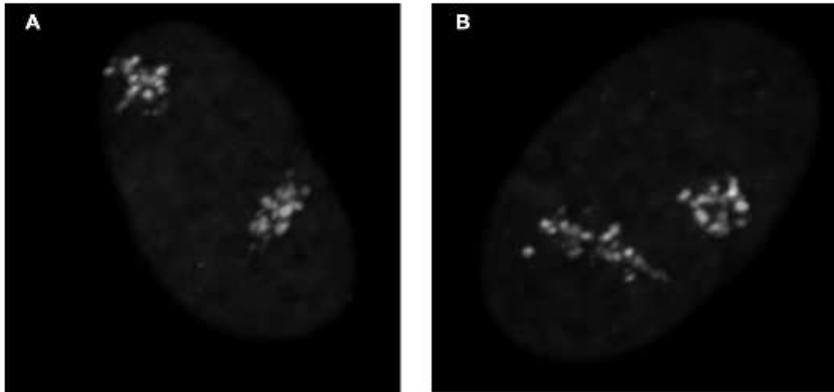
Um Vergleiche zwischen den beiden Zellzykluszeitpunkten G<sub>0</sub> und S-Phase und ihre Auswirkungen auf die radiale Verteilung machen zu können, wurden die oben beschriebenen Versuche an HFb in der S-Phase wiederholt. Dazu wurden BrdU-markierte, fixierte und pepsinierte HFb mit einem Hybridisierungsmix inkubiert, der R- und G-Banden-assoziierte BAC-Pools enthielt. Die R-BACs waren mit Digoxigenin markiert, die G-BACs mit DNP. Die Inkubationszeit betrug mindestens 40h.

Die Signale der BAC-Pools wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen: dabei wurden Cy3 für Digoxigenin und FITC für DNP verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit TO-PRO, nachweisbar im Cy5-Kanal, gegengefärbt. Der Nachweis des Vorliegens von S-Phase Zellen wurde mittels AMCA-gekoppelten Antikörpern gegen BrdU geführt. Nur BrdU positive Zellen wurden für die Mikroskopie ausgewählt. Alle Signale der BAC-Pools wurden in den drei Kanälen Cy3, Cy5, FITC mit dem LSM aufgenommen. Die Auswertung mit der 3D-RRD-Software (Feinheit 26) wurde freundlicherweise von Frau Katrin Küpper durchgeführt.

Wie man der Abbildung 4.22. entnehmen kann, findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Verteilung der R- und G-Banden-assoziierten DNA-Bereiche. In 11/25 (44%) der ausgewerteten Zellkerne (n = 25) lagen die genarmen BAC-Pools peripherer als die genreichen („Statistik größer kleiner“). Die Differenz der mittleren relativen Radien betrug 1,9% des Gesamtradius. Ein auf das Ergebnis des Median-Quartile-Tests durchgeführter t-Test konnte keinen Unterschied in der Verteilung beider BAC-Pools bestätigen ( $p = 0,797$ ). Als Ergebnis bleibt festzuhalten, daß es keine radialen Verteilungsunterschiede zwischen der R-Banden- und G-Banden-assoziierten DNA in den Interphasekernen der HFb in der S-Phase gibt.

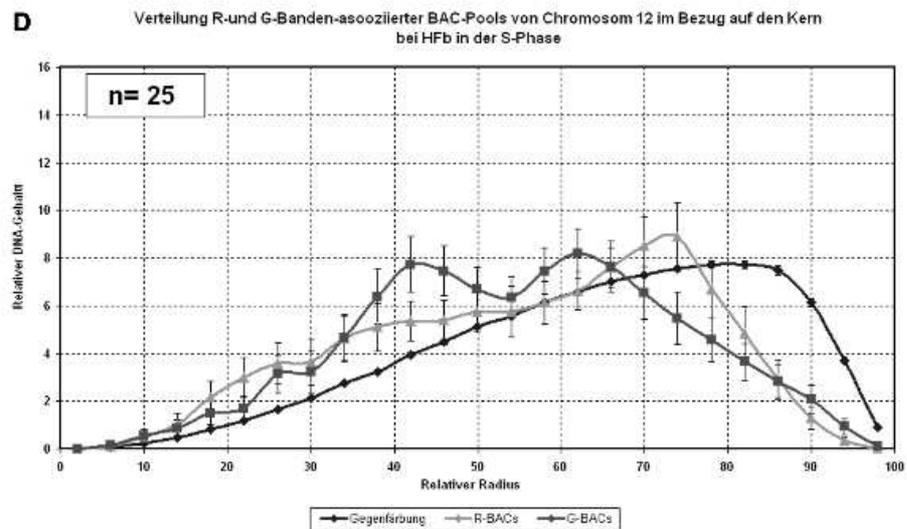
### **Die subchromosomale Struktur R/G-Banden-assoziiierter DNA in Bezug auf das CT in der G<sub>0</sub>-Phase**

Für diesen Versuch wurden mit Paraformaldehyd fixierte und pepsinierte HFb verwendet. Sie wurden mit einem Hybridisierungsmix mit R- und G-Banden-assoziierten-BAC-Pools und einem Paint von Chromosom 12 für mindestens 40h inkubiert. Die verwendeten Markierungen (Label) waren Digoxigenin für die R-BACs, DNP für die G-BACs und Biotin für den Paint. Der Nachweis der BAC-Pool Signale erfolgte mittels Fluorochrom-markierter Antikörper. Dabei wurden Cy3 für Digoxigenin, Cy5 für Biotin und FITC für DNP eingesetzt. Um die Zellen zu identifizieren, die sich in G<sub>0</sub> befinden, wurde ein Nachweis von Ki67 im



**Abbildung 4.22.**  
**Verteilung von R- und G-Banden-assoziiierter DNA in Bezug auf den Kern bei HFb in der S-Phase**  
 Farbverteilung A-D: G-Banden-assoziiert: rot, R-Banden-assoziiert: grün, Gegenfärbung: blau  
 A-C: Darstellung eines Versuchs mit G- und R-Banden-assoziierten BAC-Pools von Chromosom 12 auf HFb in der S-Phase  
 A: Z-Projektionsbild (Zelle 17)  
 B: Z-Projektionsbild (Zelle 13)  
 C: Z-Projektionsbild (Zelle 28)  
 der R- und G-Banden-assoziierten BAC-Pools im Kern;  
 Eine radiale Verteilung der BACs und damit der DNA im Bezug auf den Kern ist nicht zu sehen.

**D:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung.  
 Die beiden Graphen für R- und G-Banden-assoziierte BACs zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Lage der G-Banden-assoziierten DNA-Bereiche (rot) und den R-Banden-assoziierten (grün) ist nicht zu sehen



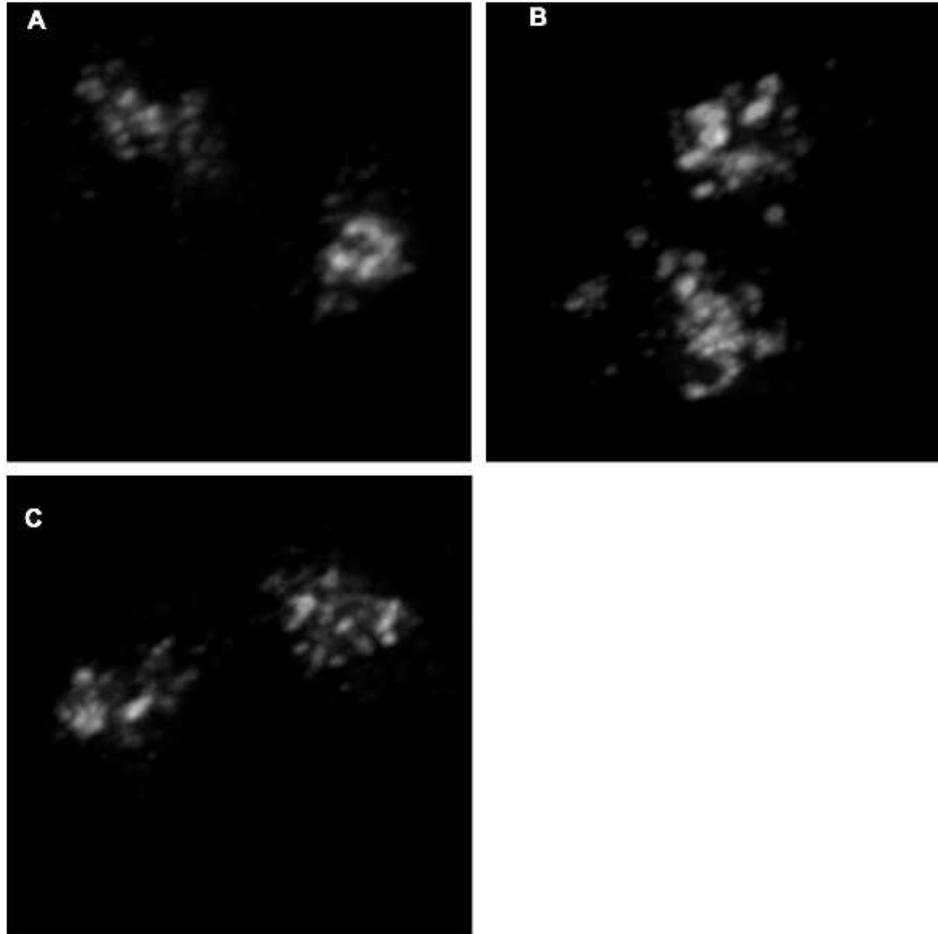
Zellkern mittels AMCA-gekoppelten Antikörpern geführt. Der Ki67-Nachweis ist damit im DAPI-Kanal des Epifluoreszenzmikroskops, in dem auch AMCA leuchtet, möglich. Es wurden nur Ki67-negative Zellen in den drei Kanälen Cy3, Cy5 und FITC mit dem LSM aufgenommen. Anschließend wurden die Daten mit der 3D-RRD-Software (outer Shells, Feinheit 16, Vergrößerung 3) und dem ADS-Programm von Frau Katrin Küpper ausgewertet. Wie in der Abbildung 4.23. zu sehen ist, verlaufen die Graphen der R- und G-BAC-Verteilung sehr ähnlich. Dies gilt in besonderem Maße für die Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Hier lagen bei der Auswertung „Statistik größer kleiner“ in 11/21 (52%) der ausgewerteten Zellkerne (n = 21) die G-BACs peripherer als die R-BACs. Die Differenz der mittleren relativen Radien betrug 2,79% des Gesamtradius. Ein U-Test auf das Ergebnis des Median-Quartile-Testes bescheinigte das Fehlen eines Unterschiedes in der Verteilung genarmer und genreicher DNA-Bereiche ( $p = 0,6$ ).

Das Ergebnis der ADS-Auswertung entspricht dem der 3D-RRD-Auswertung. In 14/19 (74%) der ausgewerteten Zellkerne (n = 19) fanden sich die G-BACs peripherer als die R-BACs. Die absoluten Abstände von der CT-Oberfläche betragen  $-289,23$  nm für die G-BAC-Pools und  $-395,21$  nm für die R-BAC-Pools. Die Differenz beträgt 105,98 nm.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit keinem der beiden Auswertungsprogramme ein Unterschied in der Verteilung der genarmen und genreichen DNA-Abschnitte gefunden werden konnte. Es gibt also keine radiale Verteilung von DNA unterschiedlicher Gendichte bezogen auf das CT12 bei HFb in der S-Phase.

### **Die subchromosomale Struktur R/G-Banden-assoziiertes DNA in Bezug auf das CT in der S-Phase**

Für den Nachweis einer möglichen radialen Verteilung von R- und G-Banden-assoziierten subchromosomalen Bereichen im CT12 bei HFb in der S-Phase wurden Objektträger mit fixierten und pepsinierten HFb verwendet. Die teilungsaktiven HFb waren vor der Fixierung in Paraformaldehyd mit BrdU markiert worden. In den Hybridisierungsmix wurden R-BAC-Pools (Digoxigenin markiert), G-BAC-Pools (DNP markiert) sowie ein Paint von Chromosom 12 (Biotin markiert) eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug mindestens 40h. Um die Signale der BAC-Pools und des Paints sichtbar zu machen, wurden Fluorochrom-markierte Antikörper verwendet. Die Zuordnung von Markierungen (Label) zu Fluorochrom war wie folgt: Digoxigenin und Cy3, Biotin und Cy5 und DNP und FITC. Die BrdU-positiven Zellen wurden mit AMCA-markierten Antikörpern nachgewiesen. Das Aufleuchten von AMCA-Signalen im DAPI-Kanal des Epifluoreszenzmikroskops, in dem auch AMCA leuchtet, war ein Nachweis für das Vorliegen von HFb in der S-Phase. Die Signale der drei Fluorochrome Cy3, Cy5 und FITC wurden in ihren zugehörigen Kanälen mit dem LSM aufgenommen. Die Auswertung mit



**Abbildung 4.23. Verteilung von R- und G-Banden-assoziiierter DNA in Bezug auf das CT12 bei HFB in der G0-Phase**

Farbverteilung A-F: G-Banden-assoziiert: rot, R-Banden-assoziiert: grün, Paint: blau  
 Darstellung eines Versuchs mit R- und G-Banden-assoziierten BAC-Pools von Chromosom 12 auf HLY in der G0-Phase

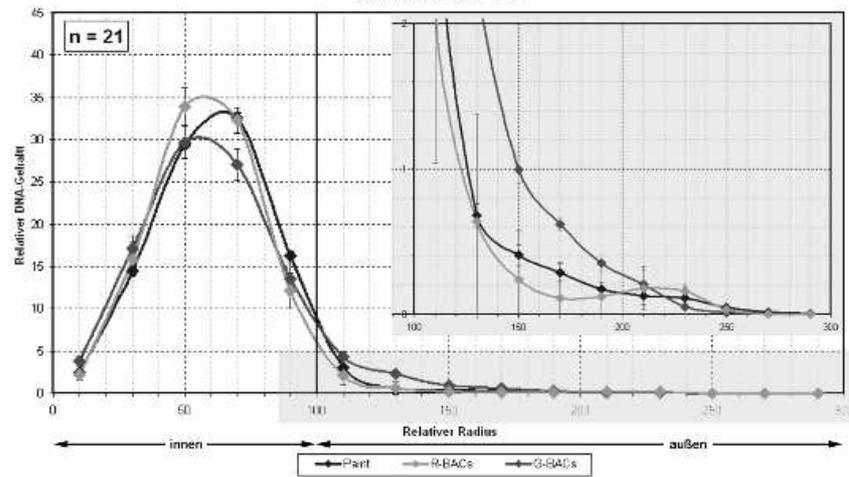
**A-C:** Z-Projektionsbilder (Zellen 7(A), 2(B), 10(C)) der R- und G-Banden-assoziierte BAC-Pools; die BAC-Signale können deutlich erkannt, aber es kann keine radiale Verteilung gesehen werden. Manche BACs scheinen außerhalb des CTs zu liegen. Dieser Eindruck entsteht durch den hohen Schwellenwert, der aufgrund eines ausgeprägten Hintergrundrauschens bei diesem Versuch gesetzt werden mußte. Durch die Verwendung der Auswertungsoption "outer shells" konnten diese außenliegenden BACs dennoch mit in die Auswertung einbezogen werden und ihre Information ging nicht verloren.

**Kurven D-F: siehe nächste Seite**

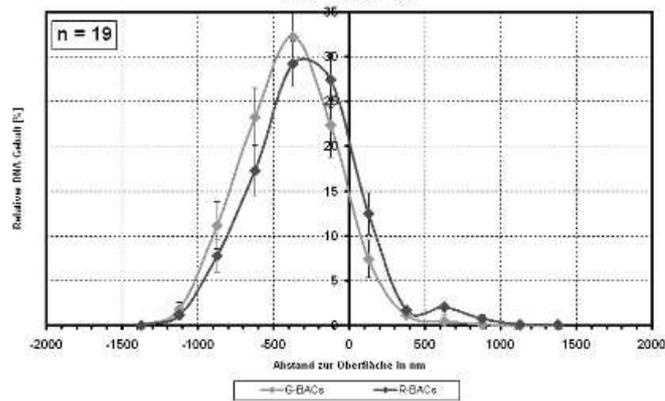
**D:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für G-bzw. R-Banden-assoziierte BACs zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Eine leichten Tendenz zur periphereren Lage der G-BACs im Vergleich zu den R-BACs läßt sich erkennen. Der Unterschied zwischen ihnen ist jedoch nicht signifikant.

**E+F:** Kurven der ADS-Auswertung. Auch hier findet sich Auswertung ist hier die Tendenz einer radiale Verteilung. Die G-Banden-assoziierten BACs (grün) liegen peripherer als die R-Banden-assoziierten BACs (rot)

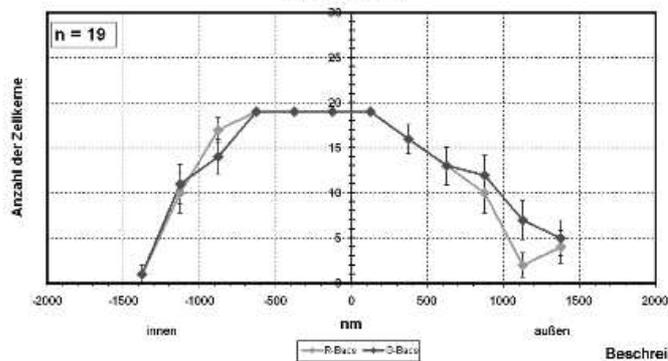
**D** Verteilung R- und G-Banden-assoziierter BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HFb in der G0-Phase



**E** Verteilung R- und G-Banden-assoziierter BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HFb in der G0-Phase



**F** Verteilung R- und G-Banden-assoziierter BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HFb in der G0-Phase



Beschreibung siehe vorangegangene Seite

dem 3D-RRD-Programm (outer shells, Feinheit 16, Vergrößerung 3) und der ADS-Software wurde von Frau Katrin Küpper durchgeführt.

In der Abbildung 4.24. kann man den leicht verschobenen, aber ähnlichen Verlauf der Kurven der Verteilung von R- und G-BACs sehen.

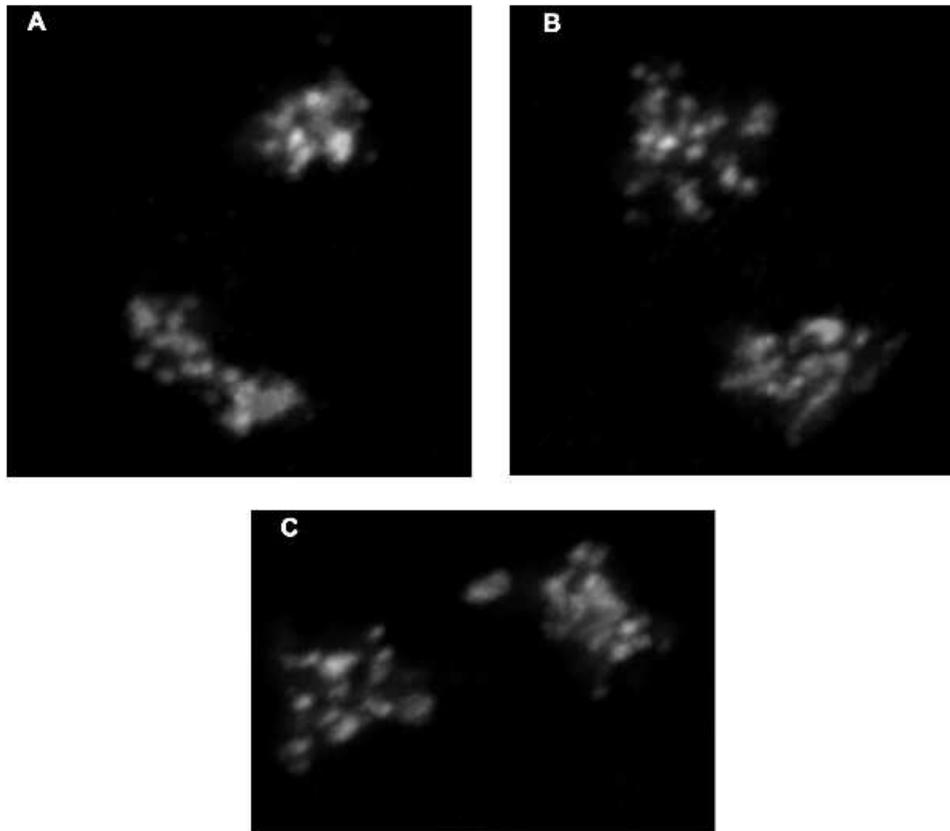
Die statistische Auswertung der 3D-RRD-Ergebnisse zeigte, daß in 16/30 (53%) der ausgewerteten Zellkerne (n = 30) die G-BACs peripherer lagen als die R-BACs. Die Differenz der mittleren relativen Radien betrug 1,68% des Gesamtradius. Ein t-Test angewandt auf das Ergebnis des Median-Quartile-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden BAC-Pools ( $p = 0,34$ ).

Das Ergebnis der ADS-Auswertung widersprach dem 3D-RRD-Ergebnis insofern, als hier R-Banden-assoziierte BAC-Pools tendenziell häufiger peripher gesehen wurden als die G-Banden-BAC-Pools. Laut „Statistik größer kleiner“ lagen nur in 10/30 (33%) der ausgewerteten Zellkerne die G-BACs peripherer als die R-BACs. Die absoluten Abstände von der CT-Oberfläche betrugen  $-686,65$  nm für die G-BACs und  $-647,11$  nm für die R-BACs. Die G-BACs liegen somit zentraler als die R-BACs. Die Differenz beider Werte beträgt  $-39,39$  nm.

Zur Erklärung der Widersprüchlichkeit der beiden Auswertungen muß auf die Diskussion verwiesen werden. Hier sei nur soviel angemerkt, daß es sich bei den beobachteten Unterschieden in der radialen Verteilung nicht um statistisch signifikante Ergebnisse handelt. Daher muß davon ausgegangen werden, daß die R- und G-Banden-assoziierte DNA in HFb in der S-Phase keine Unterschiede in der radialen Verteilung zeigt.

Insgesamt kann man die 4 vorgestellten Versuche mit den HFb und den R- und G-Banden-assoziierten BACs wie folgt zusammenfassen:

1. Es gibt **keine** signifikanten radialen Verteilungsunterschiede zwischen der R- und der G-Banden zugeordneter DNA-Bereiche in Bezug auf den Kern bei HFb.
2. Es gibt **keine** signifikanten Unterschiede in der radialen Verteilung R- und G-Banden zugeordneter DNA-Bereiche in Bezug auf das CT.
3. Es gibt **keine** signifikanten zellzyklusabhängigen Unterschiede in diesen Befunden. Es ist weder in G0 noch in der S-Phase eine signifikante unterschiedliche radiale Verteilung im Vergleich zu der anderen Phase zu beobachten.



**Abbildung 4.24. Verteilung von R- und G-Banden-assoziiierter DNA in Bezug auf das CT12 bei HFB in der S-Phase**

Farbverteilung A-F: G-Banden-assoziiert: rot, R-Banden-assoziiert: grün, Paint: blau  
 Darstellung eines Versuchs mit R- und G-Banden-assoziierten BAC-Pools von Chromosom 12 auf HLY in der S-Phase

**A-C:** Z-Projektionsbild der R- und G-Banden-assoziierte BAC-Pools (Zellen 3(A), 21(B), 23(C)) vor dem Hintergrund der Paints von CT12

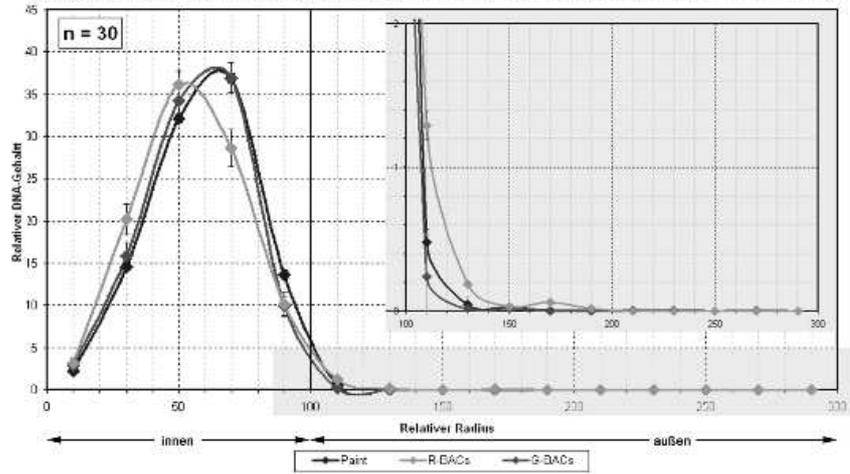
Die einzelnen BACs sind gut zu erkennen und von einander absetzbar. Eine radiale Verteilung ist nicht eindeutig zu erkennen, aber es entsteht, den Bildern nach zu urteilen, der Eindruck, daß die R-BACs etwas häufiger zentral liegen als die G-BACs. Es sei an dieser Stelle aber darauf hingewiesen, daß der visuelle Eindruck täuschen kann!

**Kurven D-F:** siehe nächste Seite

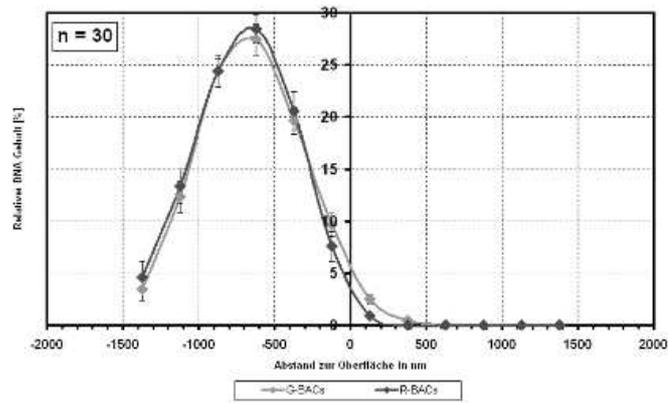
**D:** Kurve der 3D-RRD-Auswertung. Die beiden Graphen für G-bzw. R-Banden-assoziierte BACs zeigen einen nahezu gleichen Verlauf. Nur sehr geringfügig liegen die G-Banden-assoziierten BACs peripherer als die R-Banden-assoziierten. Der Unterschied zwischen beiden Graphen ist aber nicht signifikant.

**E+F:** Kurven der ADS-Auswertung. Es ist ein Unterschied zu den Ergebnissen von RRD zu finden. Hier liegen die R-Banden-assoziierten BAC tendenziell weiter außen als die G-Banden-assoziierten BACs

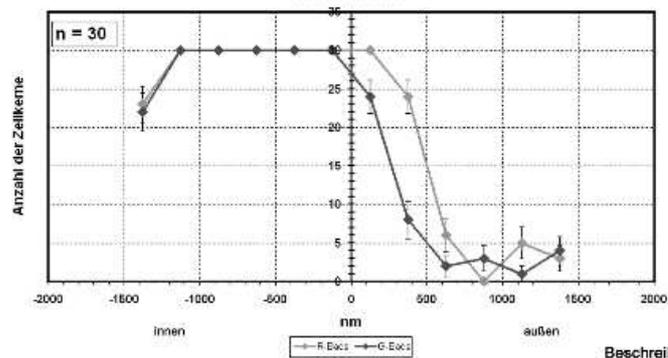
**D** Verteilung R- und G-Banden-assoziiierter BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HFb in der S-Phase



**E** Verteilung R- und G-Banden-assoziiierter BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HFb in der S-Phase



**F** Verteilung R- und G-Banden-assoziiierter BAC-Pools von Chromosom 12 im Bezug auf das CT12 bei HFb in der S-Phase



Beschreibung siehe vorangegangene Seite

Die folgende Tabelle dient der Zusammenfassung der mittleren relativen Radien und dem schnellen Überblick über die mit R- und G-Banden-assoziierten BAC-Pools durchgeführten Versuche:

Zelltyp und Versuchsanordnung	a) Distanz [G-BACs] – [R-BACs] in % des Gesamtradius	b) Anteil der Zellen pro Versuch mit [G-BACs] > [R-BACs]
HLY, R/G, Gegenfärbung; G0	13,34	20/20 (100%)
HLY, R/G, Gegenfärbung; S	8,3	11/12 (92%)
HLY, R/G/Paint; G0	-0,03	14/25 (56%)
HLY, R/G/Paint; S	-0,87	8/18 (44%)
HFb, R/G, Gegenfärbung; G0	-3,1	5/16 (31%)
HFb, R/G, Gegenfärbung; S	-0,9	11/25 (44%)
HFb, R/G/Paint; G0	2,79	11/21 (52%)
HFb, R/G/Paint; S	1,68	16/30 (53%)

**Tabelle 4.2.** Übersicht über

a) die Distanzen der mittleren relativen Radien (dies entspricht der Differenz der mittleren relativen Radien) – erhoben in der 3D-RRD-Auswertung, unter der Vorstellung, daß G-Banden-assoziierte DNA peripherer liegt als R-Banden-assoziierte

b) den Anteil der Zellen, bei denen G-Banden-assoziierte BACs peripherer lagen als R-Banden-assoziierte BACs, sowie dessen Prozentwert -erhoben in „Statistik größer kleiner“

## 5 Diskussion

### 5.1 Gendichte-korrelierte radiale Verteilung subchromosomaler DNA-Bereiche im Interphasekern

Der Interphasezellkern ist ein Ort hoher Ordnung. Anders als lange Zeit angenommen befindet sich die DNA in seinem Inneren nicht in einer völlig unübersichtlichen, chaotischen Konformation. Im Gegenteil, es gibt CT und einen IC (Cremer and Cremer, 2001), die einzelnen Chromosomen scheinen nur in geringem Maße zu überlappen und ineinander verstrickt zu sein (Cremer et al., 2004; Visser et al., 2000). Zwar gibt es genreiche Areale, die ausloopen (Mahy et al., 2002a; Volpi et al., 2000) und Genbezirke, die bei Aktivierung größere Bewegungen zurücklegen (Francastel et al., 2001), aber insgesamt scheint jedes CT als Entität begrenzt vorzuliegen.

Unter dem Aspekt der Ordnung betrachtet ist es daher auch nicht verwunderlich, daß die einzelnen CT einer radialen Verteilung gehorchen (Boyle et al., 2001; Cremer et al., 2001b; Croft et al., 1999; Sun et al., 2000). Umstritten ist jedoch, welche Gesetzmäßigkeiten diese Verteilung bestimmen (Parada et al., 2004). Postuliert wird als ausschlaggebendes Momentum zum einen die Gendichte, zum anderen die Größe einzelner Chromosomen. Allerdings weisen die unterschiedlichen, teilweise sogar widersprüchlichen Versuchsergebnisse darauf hin, daß die radiale Verteilung in verschiedenen Zelltypen und –formen unterschiedlich reguliert werden könnte. Es ist auch nicht auszuschließen, daß das übergeordnete Konzept noch nicht erfaßt wurde.

Weniger noch als auf der Ebene der CT ist die radiale Verteilung subchromosomaler Strukturen geklärt. Man weiß nur unter anderem, daß Alu-reiche- und damit genreiche DNA die Tendenz zeigt, sich in Richtung des Zellkerninneren zu orientieren. Ebenso ist bekannt, daß in humanen Zellen Telomere von Chromosomen nach innen zum Kernmittelpunkt weisen, Centromere hingegen in die Peripherie und zu den Nucleoli deuten und dort auch häufig Kontakt mit der Kernmembran haben (Ferguson and Ward, 1992).

Im Jahr 2000 publizierten Nogami und Kollegen eine Arbeit, in der sie ausführten, daß sich das Interphasechromosom 12 aufgrund der Replikations-Bänderung grob in fünf Abschnitte unterteilen läßt. Anhand von Cosmid-Untersuchungen auf myeloiden Leukämiezellen und normalen humanen Lymphozyten (HLY) zeigten sie, daß die spät replizierenden Abschnitte eher in die nukleäre Peripherie weisen (Nogami et al., 2000). Damit hatten sie eine Verbindung zwischen Replikationsverhalten und radialer Position geschaffen.

Leider mußten die Autoren die Aussagekraft ihrer Befunde in drei Punkten einschränken: Zum einen konnten sie nicht ausschließen, durch ihre Fixierungsmethode (Methanoleisessig) Artefakte verursacht zu haben. Als zweites beklagten sie die geringe Insert-Größe von Cosmiden (maximal 44 kb). Damit verbunden ist die Frage, ob das Verhalten eines einzelnen Cosmids tatsächlich eine Aussagekraft für die umgebende Region hat. Als dritten Punkt führten die Autoren an, sie hätten nie Untersuchungen zu der radialen Verteilung in Bezug auf das CT gemacht.

Aufgrund der noch übersichtlichen Wissenslage und der offenen Fragestellungen alter Publikationen erschien es reizvoll, sich mit der radialen Verteilung subchromosomaler Strukturen zu befassen. Dabei sollte der Einfluß der Gendichte auf die Lokalisation unterschiedlicher DNA-Abschnitte eines Chromosoms im Interphasekern besondere Beachtung finden.

Durch Versuche an Chromosom 12 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß nicht nur wie bisher bekannt komplette CT aufgrund ihres Gengehaltes eine radial definierte Position im Kern einnehmen können, sondern daß auch einzelne Chromosomenabschnitte sich gemäß ihrer Gendichte radial ausrichten. Genarme DNA-Bereiche liegen peripherer als genreiche. Dies gilt allerdings nicht in gleichem Maße für alle Zellarten. In runden oder rundlichen Zellen zeigt sich ein ausgeprägt radiales Verhalten, wohingegen dieses in flachen Zellen nicht beobachtet werden konnte. Auch fanden sich Unterschiede zwischen verschiedenen Zellzykluszeitpunkten.

Die einzelnen Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen und ihre spezifischen Unterschiede bei verschiedenen Versuchsbedingungen sollen im folgenden diskutiert werden.

## **5.2 Beweggründe für die Verwendung von Chromosom 12 als Versuchsgrundlage**

Chromosom 12 ist ein submetazentrisches Chromosom mit einer Länge von 132 Mb. Im Moment werden ca. 1100 Gene auf diesem Chromosom vermutet. Chromosom 12 zeichnet sich durch sehr große lokale Unterschiede in der Gendichte aus. So enthält in den genärmsten Bereichen 1 Mb DNA nur 5 Gene, in den genreichsten hingegen 38 Gene, also mindestens das siebenfache (Daten aus der Ensembl-Datenbank). Zusätzlich grenzen diese DNA-Abschnitte sehr unterschiedlicher Gendichte zum Teil direkt aneinander und sind nicht durch lange Übergänge verbunden. Dadurch eignet sich das Chromosom 12 in besonderem Maße für eine Analyse der CT-Substruktur in Bezug auf den Einfluß der Gendichte.

## 5.3 Diskussion der Ergebnisse der durchgeführten Versuche

### Zelltypen

Die verschiedenen untersuchten Zelltypen zeigen große Unterschiede in der räumlichen Struktur der subchromosomalen Bereiche:

So findet man bei den runden HLY eine eindeutige, hochsignifikante radiale Verteilung der BAC-Pools in Bezug auf den Kern, wobei genreiche DNA-Regionen zentraler liegen als genarme. Diese Verteilung ist in beiden Zellzyklusphasen konserviert. In der S-Phase zeigt sich zudem ein ebensolcher signifikanter radialer Verteilungsunterschied im CT.

In Übereinstimmung damit liegt bei den Versuchen mit den R- und G-Banden-assoziierten BAC-Pools die R-Banden-assoziierte DNA zentraler in Bezug auf den Kern als die G-Banden-assoziierte. Dieser Befund ist sehr gut vereinbar mit Publikationen, die zeigen, daß transkriptionell aktives Chromatin im Inneren des Zellkerns zu finden ist (Skalnikova et al., 2000). Auch R-Banden sind nach innen gerichtet (Sadoni et al., 1999).

Bei den rundlichen SW480-Tumorzellen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der radialen Verteilung in Bezug auf den Kern gefunden werden. Es ist allerdings eine Tendenz zur Verlagerung genarmer DNA in die Peripherie sichtbar.

Bei der Auswertung in Bezug auf das CT zeigte sich, daß hier aus dem Trend ein signifikanter Unterschied wurde: Genarme DNA liegt peripherer als genreiche.

Es läßt sich somit zusammenfassen, daß auch rundliche Zellen eine radiale Verteilung ihrer DNA-Segmente nach Gendichte zeigen. Die radiale Ausrichtung scheint aber nicht so ausgeprägt zu sein wie bei den ganz runden HLY. Wichtig ist jedoch folgende Einschränkung: Man weiß, daß in Tumorzellen die radiale Verteilung ganzer CT weniger stark ausgeprägt ist als in normalen Zellen (Cremer et al., 2003). Es ist daher schwer, hier zu entscheiden, ob die schwächer ausgeprägte radiale Verteilung subchromosomaler DNA-Bereiche bei den SW480-Zellen auf ihre leicht elipsoide Zellkernform oder auf ihre maligne Transformation zurückzuführen ist.

In den flachen humanen Fibroblasten (HFb) ließ sich weder bei der Auswertung in Bezug auf den Kern noch auf das CT bei keinem der beiden verwendeten BAC-Pools ein signifikanter Unterschied in der radialen Verteilung subchromosomalen Strukturen von Chromosom 12 nachweisen.

Diese Ergebnisse legt eine Korrelation zwischen Zellkernform und der radialen Verteilung von DNA-Bereichen unterschiedlicher Gendichte nahe. In den runden HLY sind die radialen

Verteilungsunterschiede am ausgeprägtesten. Je flacher die Zelle wird, desto mehr nehmen diese Unterschiede ab. Allerdings muß einschränkend festgestellt werden, daß eine Aussage über die Kausalität dieser Korrelation nicht mit Sicherheit getroffen werden kann. Theoretisch ist denkbar, daß nicht die Zellkernform, sondern beispielsweise der Aktivitätsstatus der Zelle oder das Leben im dreidimensionalen Zellverband ausschlaggebend für radiale Verteilungsunterschiede ist.

### **Zellzykluszeitpunkte**

Insgesamt verhielten sich die untersuchten Zellkerne und CT in der G<sub>0</sub>- und S-Phase jeweils sehr ähnlich. In den untersuchten Zelltypen wurden mit der 3D-RRD-Auswertung folgende Befunde erhoben:

Bei den HLY wurde in einer Versuchsreihe ein *zellzyklusabhängiger* signifikanter Unterschied in der radialen Verteilung genarmer und genreicher DNA gefunden. So lagen in der S-Phase die genarmen DNA-Bereiche signifikant häufiger in der Peripherie in Bezug auf das CT als die genreichen. Bei dem gleichen Versuch in der G<sub>0</sub>-Phase konnte kein signifikanter Unterschied in der radialen Anordnung eruiert werden. Allerdings war auch hier eine Tendenz zur Verlagerung genarmer Strukturen in der Peripherie sichtbar (die Differenz der mittleren relativen Radien betrug in der G<sub>0</sub>-Phase 2,6% des Gesamtradius, in der S-Phase hingegen 5,4% des Gesamtradius, also mehr als das Doppelte).

Bei den Versuchen mit den R- und G-Banden-assoziierten BAC-Pools ergab sich bezüglich des Zellzykluszeitpunktes ein ähnliches, aber deutlich weniger ausgeprägtes Bild. Hier war in der G<sub>0</sub>-Phase kein Unterschied zwischen R- und G-Banden-assoziiierter DNA in Bezug auf das CT erkennbar. In der S-Phase zeigte sich eine leichte Verschiebung der genreichen DNA nach außen (Differenzen der mittleren relativen Radien: in der G<sub>0</sub>-Phase -0,03%, in der S-Phase -0,87% des Gesamtradius); ein Befund, der auch von den Ergebnissen der ADS-Auswertung gestützt wurde.

Bei den HFb konnte in den Versuchen mit den genarmen/genreichen BAC-Pools weder in Bezug auf den Kern noch auf das CT, weder in G<sub>0</sub>-, noch in der S-Phase ein signifikanter Unterschied zwischen den DNA-Verteilungen eruiert werden.

Aber auch hier sind schwache Tendenzen sichtbar. So sieht man bei den Ergebnissen der Versuche in der G<sub>0</sub>-Phase, daß genarme BAC-Pools tendenziell sowohl in Bezug auf den Kern, als auch in Bezug auf das CT peripherer liegen als genreiche. Ein Trend, der sich in der S-Phase noch verstärkt. Hier ist die Differenz der mittleren relativen Radien größer als

die in der G0-Phase. Das bedeutet, daß in der S-Phase die radialen Verteilungsunterschiede akzentuierter sind als in der G0-Phase.

Interessanterweise ist dieser Befund bei den R- und G-Banden-assoziierten DNA insofern umgekehrt, als hier die Differenzen der mittleren relativen Radien von G0- zur S-Phase abnehmen. In der S-Phase sind die Verteilungsunterschiede zwischen R- und G-Banden-assoziierten DNA also weniger akzentuiert als in der G0-Phase.

Die folgende Tabelle soll die Unterschiede zusammenfassen und verdeutlichen:

Versuchsanordnung	Auswertung in Bezug auf:	Zellzyklus-phase	Betrag der Differenz der mittleren relativen Radien in (%)	Tendenz des Betrags der Differenzen von der G0- zur S-Phase
HFb, genarm/genreich	Kern	G0	1,1	<b>ansteigend</b>
HFb, genarm/genreich	Kern	S	1,9	
HFb, genarm/genreich/Paint	CT	G0	0,8	<b>ansteigend</b>
HFb, genarm/genreich/Paint	CT	S	1,62	
HFb, R-/G-BAC-Pools	Kern	G0	3,1	<b>abfallend</b>
HFb, R-/G-BAC-Pools	Kern	S	0,9	
HFb, R-/G-BAC-Pools/Paint	CT	G0	2,79	<b>abfallend</b>
HFb, R-/G-BAC-Pools/Paint	CT	S	1,68	

**Tabelle 5.1.:** Übersicht über die Differenzen der mittleren relativen Radien in den Versuchen mit HFb erhoben mit der 3D-RRD-Software

Die vorgestellten Versuche zeigen, daß es Unterschiede in der Verteilungen der DNA-Bereiche zwischen beiden Zellzykluszeitpunkten gibt. Diese sind aber gering ausgeprägt und erreichen außer in einem Fall nie ein Signifikanzniveau. Es ist daher anzunehmen, daß das Zellzyklusgeschehen im Vergleich zur Kernform nur einen untergeordneten Einfluß auf die Steuerung des radialen Verteilungsmusters ausübt.

### Unterschiedliche BAC-Pools

Theoretisch ist es möglich, daß die genarmen/genreichen BAC-Pools andere Ergebnisse erbringen könnten als R/G-Banden-assoziierten. Das beruht auf zwei Punkten: Zum einen führt die Verteilung der BACs zu zwei insgesamt ähnlichen, aber dennoch unterschiedlichen Sets von BAC-Pools (siehe auch Material und Methoden 3.8.1.). So enthalten die genarmen/genreichen BAC-Pools deutlich weniger BACs (31) als die R/G-BAC-Pools (47). Das liegt daran, daß in den genarmen/genreichen BAC-Pools nur die entweder *sehr* genreichen oder *sehr* genarmen BACs verwendet werden, nicht aber die mit einem mittleren Gengehalt. Die R/G-BAC-Pools enthalten mehr DNA mittleren Gengehaltes, die zu einer

„Verwässerung“ der radialen Verteilungsunterschiede führen könnte. Zum anderen wurden 8 der 48 BACs unterschiedlich zugeteilt. So wird beispielsweise derselbe BAC einmal aufgrund seiner Bänderung in den G-Banden-assoziierten BAC-Pool sortiert, einmal aufgrund seines Gengehaltes laut Datenbank in die genreiche Fraktion gegeben.

Es überrascht daher zunächst, daß von einer Ausnahme (HLY in der S-Phase ausgewertet in Bezug auf das CT) abgesehen, die R- und G-BAC-Pools die gleichen signifikanten Unterschiede ergeben wie die genarmen und genreichen BAC-Pools.

Sieht man sich aber die Differenzen der mittleren relativen Radien in den unterschiedlichen Versuchen an, erkennt man, daß überall dort, wo signifikante Unterschiede in der radialen Verteilung gegeben sind, diese bei den genarmen und genreichen DNA-Bereichen deutlich ausgeprägter sind als bei der R-/G-Banden-assoziierten DNA. Die Differenz der mittleren Radien beschreibt dabei, wie weit die beiden Kurvengipfel der Verteilungskurven voneinander entfernt sind. Je größer der Betrag der Differenz ist, desto ausgeprägter sind also die gemessenen radialen Verteilungsunterschiede.

Versuchsanordnung	Differenz der mittleren rel.Radien (%)	Versuchsanordnung	Differenz der mittleren rel.Radien (%)
HLY, genarm/genreich, G0-Phase	19,3	HLY,R-/G-Banden-assoziiert, G0-Phase	13,3
HLY, genarm/genreich, S-Phase	17,2	HLY,R-/G-Banden-assoziiert, S-Phase	8,3

**Tabelle 5.2.** Darstellung der Unterschiede in der mittleren relativen Radien von genarm und genreich und R- und G-Banden-assoziierten BAC-Pools. Die mittleren relativen Radien wurden mit der 3D-RRD-Software ermittelt

Dies unterstreicht die Vermutung, daß die Verwendung der DNA mittleren Gengehaltes in den R-/G-Banden-assoziierten BAC-Pools zu einer Weichzeichnung der Unterschiede in der radialen Verteilung und damit in den Ergebnissen führt.

### Die Auswertung mit der 3D-RRD- und der ADS-Software

Die beiden in Material und Methoden beschriebenen Auswertungsprogramme 3D-RRD und ADS wurden verwendet, um möglichst präzise Aussagen zu den Ergebnissen der durchgeführten Experimente machen zu können. Die beiden Programme sollten sich ergänzen, um durch unterschiedliche Auswertung derselben Grundsituation einen genaueren Aufschluß über das tatsächlichen Aussehen des Zellkerns zu ermöglichen.

Zwei mögliche Ergebnisse der Softwareauswertung im Vergleich miteinander wurden angenommen: Zum einen, daß beide Programme dieselben Ergebnisse berechnen würden.

Zum anderen, daß insofern Unterschiede zwischen den Ergebnissen von ADS und 3D-RRD auftreten würden, diese folgendermaßen aussehen könnten: das ADS-Programm könnte eine in 3D-RRD sichtbare Tendenz in ein signifikanten Befund umwandeln. Beide Fälle kamen tatsächlich vor (vgl. Resultate: Auswertung der HLY, genarm/genreich/Paint in der S-Phase in Bezug auf das CT und HLY R-/G-Banden-assoziert in der G0-Phase).

Interessanterweise trat zusätzlich der Fall ein, daß sich 3D-RRD- und ADS-Ergebnisse in ihrer Aussage widersprachen. Unter allen durchgeführten Auswertungen kam dies zweimal vor. Zum einen bei HLY genarm/genreich/Paint, G0-Phase, ausgewertet in Bezug auf das CT und zum anderen bei HFb R-/G-BAC-Pools/Paint, S-Phase ebenfalls ausgewertet in Bezug auf das CT.

Bei beiden Versuchen ist die Differenz der mittleren relativen Radien klein bis sehr klein (2,6% des Gesamtradius und 1,7% respektive). Da es sich laut Statistik um Ergebnisse ohne signifikanten Unterschied in der radialen Verteilung handelt, ist folgende Erklärung denkbar: Die tatsächlich bestehenden Unterschiede in der radialen Verteilung der BACs in den einzelnen Zellkernen sind in Bezug auf das CT sehr klein. So klein, daß durch das unterschiedlichen Zuteilungsverfahren beider Auswertungsprogramme zu den Schalen das Signal zufälligerweise unterschiedlich klassifiziert wird. Aufgrund des geringen Gesamtbetrages der Differenz führt diese unterschiedliche Zuteilung jedoch dazu, daß das Gesamtergebnis einmal in die eine und einmal in die andere Richtung weist.

Bei den Auswertungen mit einem signifikanten Ergebnis kam es in keinem Fall zu Unterschieden zwischen den Resultaten von 3D-RRD und ADS. Es ist daher sinnvoll zu hinterfragen, ob ein Widerspruch der beiden Auswertungsprogramme bezüglich nicht-signifikanter Ergebnisse als Problem gewertet werden muß. Vielleicht handelt es sich auch um Situationen, bei denen aufgrund der geringen Größe des zu bewertenden Gutes keine fundierte Aussage möglich ist.

## **5.4 Diskussion der möglichen Einschränkungen in der Aussagekraft der Versuche**

### **5.4.1 Begrenzung der möglichen globalen Aussagekraft der Versuchsergebnisse**

Es stellt sich die Frage, ob man eine grundsätzliche Aussage über die subchromosomale Struktur des Interphasekerns wagen darf oder ob es anzunehmen ist, daß die Ergebnisse nur für Chromosom 12 und nur in den untersuchten Zelltypen gelten.

Selbstverständlich kann keine bindende Antwort gegeben werden. Es soll aber versucht werden, verschiedene Argumente anzuführen und die Diskussionsgrundlage darzulegen.

#### **Argumente für eine globale Verwertbarkeit der gewonnenen Daten**

Die vorgestellten Versuche wurden an Zellen durchgeführt, die möglichst artefaktarm mit Paraformaldehyd fixiert worden waren. Die Hybridisierungsbedingungen wurden so konstant gehalten wie technisch möglich. Alle Zellen wurden einzeln in der Auswertung bearbeitet und manuell mit einem Schwellenwert versehen. Die Auswertung mittels zweier Programme - 3D-RRD und ADS - ermöglicht eine sichere Aussage zu den Ergebnissen. Zudem ergänzen sich beide Programme bezüglich der möglichen strukturellen Gegebenheiten in den untersuchten Zellen sehr gut. Während beispielsweise ADS bei sehr flachen Zellen dem 3D-RRD-Programm aufgrund seiner Funktionsweise überlegen ist, ist die 3D-RRD-Software der etablierte Standard bei der Auswertung runder Zellen.

Insgesamt wurden im Schnitt für jede Versuchsanordnung 23 Zellen ausgewertet. Aus laborinternen, nicht publizierten Daten ist bekannt, daß ab 15 ausgewerteten Zellen eine statistische Sicherheit besteht.

Chromosomenterritorien haben eine beachtliche Größe und oft eine weite Ausdehnung. Grundsätzlich kann es daher bei der Auswertung passieren, daß geringfügige Unterschiede in der radialen Verteilung zweier BAC-Pools übersehen werden. Besonders groß ist diese Gefahr, wenn zwei Territorien in Randgebieten aneinanderstoßen oder sogar überlappen. Dann können BAC-Signale zum falschen CT gerechnet werden, was zu Verschiebungen in der abgebildeten radialen Verteilung führt. Um dieses Problem zu umgehen, wurden nur Daten von Zellen verwendet, in denen die beiden Chromosomenterritorien weit voneinander entfernt lagen.

Die vorgestellten Experimente wurden mit BACs durchgeführt. Es ist möglich, daß sie aufgrund ihrer Größe oder ihrer bloßen Anwesenheit die Konformation der DNA, auf die sie

hybridisieren, verändern. Damit würde bei den Experimenten etwas untersucht, das nicht dem Normalzustand der Zellen entspricht. Ist also eine Aussage zum Verhalten subchromosomaler Bereiche unter Verwendung von BACs folglich überhaupt zulässig?

Da es bei den vorgestellten Experimenten nicht um absolute Abstände geht, sondern die radiale Verteilung zweier Marker in Bezug zueinander untersucht wurde, und es sich somit um relative Verhältnisse handelt, ist eine Aussage durchaus zulässig. Zwar könnte es sein, daß etwas gemessen wurde, das in der Natur nicht genau diesen Wert annimmt. Da aber alle Versuche mit derselben Abweichung behaftet wären, handelte es sich um einen systematischen Fehler ohne Einschränkung der Validität.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß bei den durchgeführten Versuchen größte Sorgfalt darauf verwandt wurde, reproduzierbare Versuchsanordnungen und Ergebnisse zu schaffen. Dadurch sollte eine möglichst hohe Reliabilität und Validität geschaffen werden, um eine Basis für eine grundsätzliche Aussage, die über die Befunde bei Chromosom 12 hinausgeht, zu schaffen.

### **Argumente gegen eine globale Verwertbarkeit der gewonnenen Daten**

Über die bisher durchgeführten Experimente zur Lage einzelner ganzer Chromosomen wurden sehr unterschiedliche, ja teilweise sogar widersprüchliche Ergebnisse publiziert (Boyle et al., 2001; Cremer et al., 2001b; Croft et al., 1999; Sun et al., 2000). Auch in den hier vorgestellten Versuchen mit Chromosom 12 konnte keine eindeutige Linie im radialen Verhalten subchromosomaler Strukturen gefunden werden. Zwar kann man eindeutig in runden Zellen (HLY) eine radiale Verteilung subchromosomaler Bereiche in der Form erkennen, daß genarme DNA-Bereiche peripherer liegen als genreiche. Auch in rundlichen Zellen (SW480) ist immer noch eine radiale Anordnung subchromosomaler Bereiche zu sehen, das Signifikanzniveau jedoch nimmt ab. HFb, sehr flache Zellen, zeigen nur Tendenzen einer radialen Verteilung, die aber in keinem Fall ein Signifikanzniveau erreichen. Zusätzlich traten auch vereinzelt Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellzykluszeitpunkten auf.

Die Ergebnisse der verschiedenen Zelltypen und Zellzykluszeitpunkte fallen folglich insgesamt so unterschiedlich aus, daß sie nicht zu einem Konzept mit nur einem einzelnen bestimmenden Parameter zusammengefaßt werden können. Auch waren die beobachteten Unterschiede und Differenzen zwischen den radialen Positionen der BAC-Pools oft nur sehr klein. Bei diesen geringen Abständen muß gefragt werden, ob größere Datenmengen ausgewertet werden müßten oder ob hier möglicherweise keine eindeutige Aussage möglich ist.

Zu all diesen Einschränkungen einer globalen Aussage zum Verhalten des Zellkerns kommt hinzu, daß FISH-Experimente und besonders ihre Auswertung immer zutiefst individuelle Versuche sind. Jeder Versuchsleiter wird unterschiedliche Zellen für die Mikroskopie auswählen, unterschiedliche Schwellenwerte setzen und sich mit variablen Bedingungen bei der Luftfeuchtigkeit, Raumtemperatur und Ähnlichem auseinandersetzen müssen. Dazu kommt, daß die Zelle ein lebendes Untersuchungsgut ist und sich nicht standardisiert verhält (Levsky and Singer, 2003). Eine gewisse Sicherheit bezüglich der getroffenen Aussage ist natürlich aufgrund der Auswertung vieler Zellen gegeben. Aber bei der qualitativen Einschätzung von Versuchsergebnissen mit sehr kleinen Differenzen muß große Zurückhaltung geübt werden.

All diese Argumente sprechen gegen eine Verallgemeinerung der vorgestellten Ergebnisse auf andere Chromosomen oder andere Versuchsbedingungen.

Außer Frage steht jedoch, daß einzelne Ergebnisse dieser Versuchsreihe hochsignifikant sind. Sie bestätigen, daß das Prinzip der Gendichte-abhängigen radialen Verteilung subchromosomaler Strukturen gilt und daß dies bei Chromosom 12 in HLY definitiv und reproduzierbar zu beobachten ist. Anders formuliert: Obwohl keine Aussage zur radialen Verteilung aller subchromosomaler Strukturen im Interphasekern gewagt werden darf, ist eine Aussage zu dem untersuchten Bereich sehr wohl möglich.

#### **5.4.2 Genreichtum und Transkriptionsaktivität, Lokalisation und radiale Verteilung**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Unterschiede in der Gendichte zu Unterschieden in der Kernlokalisierung führen. Verbunden mit diesem Gedanken ist die Vorstellung, daß Genreichtum mit hoher transkriptioneller Aktivität gekoppelt ist, insbesondere dann, wenn es sich um R-Banden-assoziierte Gene handelt.

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, wird eine Häufung von hochaktiven Genen auf Loops außerhalb des kompakten Chromatin beobachtet (Gilbert et al., 2004; Mahy et al., 2002b; Verschure et al., 1999; Volpi et al., 2000; Williams et al., 2002). Dies spricht dafür, daß Aktivität mit Lokalisation verknüpft ist. Unklar ist, warum die Versuche dann nicht in allen Zelltypen ein klares aktivitätsgesteuertes Verteilungsmuster zeigen.

Drei Ursachen hierzu sind vorstellbar: a) zum einen ist es möglich, daß die subchromosomalen Strukturen durchaus ein definiertes Verteilungsmuster aufweisen, das aber, da es nicht zu radial signifikanten Unterschieden führt, unerfaßt bleibt. Es wurde untersucht, welcher von zwei gegebenen BAC-Pools peripherer liegt. Auch wenn hierbei

keine Differenz der mittleren relativen Radien eruiert werden konnte, kann dennoch das Vorliegen eines anderen Musters nicht ausgeschlossen werden.

b) Eine zweite Option zieht die Zellkernform in Betracht. Vielleicht ist es in HFb schlicht nicht möglich, eine radiale Verteilung subchromosomaler Strukturen zu einem energetisch sinnvollen Preis aufrechtzuerhalten.

c) Die dritte mögliche Ursache ist die komplexeste: Grundsätzlich ist an der Vorstellung „hohe Gendichte ist gleich hohe Genaktivität ist gleich hohe Transkriptionsrate“ prinzipiell nichts falsch, wie Vergleiche von Sequenzen mit Datenbank-Informationen zeigen.

In letzter Zeit mehren sich jedoch die Anhaltspunkte, daß nicht nur die Genaktivität die Transkriptionsmenge im Kern steuert, sondern daß auch die Produktion von nc-RNA einen großen Teil der gesamten Transkriptionsaktivität ausmacht (Cawley et al., 2004; Collins et al., 2003; Kampa et al., 2004; Kapranov et al., 2002). In einer neuen Arbeit von Kampa und Kollegen wird davon ausgegangen, daß viel mehr als nur die bekannten Gene transkribiert werden, und somit die momentane Vorstellung von der Menge transkribierten Sequenzen um ein Vielfaches nach oben korrigiert werden muß (Kampa et al., 2004). Zudem wird diesen kleinen, regulatorischen RNAs ein Einfluß auf die Transkription und die Regulierung der nukleären Architektur zugeschrieben (Mattick and Makunin, 2005). Das bedeutet, daß z.B. genarme Regionen, die im alten Modell als transkriptionell inaktive Bereiche gesehen wurden, durchaus eine hohe Transkriptionsrate an kleinen RNAs haben könnten. Vielleicht ist es also nicht richtig, wenn man genreiche oder R-Banden-assoziierte BAC-Pools als einzige Marker für DNA mit hoch aktiver Gentranskription hält.

In Bezug auf die hier vorgestellten Ergebnisse könnte das erklären, warum eine radiale Verteilung unterschiedlich genreicher Areale, selbst wenn sie im Prinzip tatsächlich vorliegt, nicht erkannt werden kann. Sie kann sozusagen von der Aktivität anderer, nichtcodierender, aber transkribierter Bereiche überdeckt werden. Alternativ könnte die Aktivität dieser nichtcodierenden Bereiche die Formgebung subchromosomaler Areale genauso beeinflussen wie die Genaktivität. Kämen die nichtcodierenden, aber transkribierten Areale zudem vermehrt in genarmer DNA vor, könnte dies zu der Nivellierung der Transkriptionsaktivität im gesamten CT führen. Damit wäre keine radiale Verteilung aufgrund von Gendichteunterschieden mehr sichtbar.

#### **5.4.3 Mögliche „Probleme“ mit FISH**

Bei jedem Versuchsergebnis, das mit der FISH-Methodik gewonnen wurde, sind zwei mögliche Einschränkungen bei der Beurteilung zu bedenken. Erstens: Ist FISH überhaupt

imstande, fundierte Daten zu strukturellen Gegebenheiten zu liefern? Durch die vergleichsweise grobe Behandlung der Zellen mit HCL, Hitze etc. könnten im Zellkern massive Artefakte erzeugt werden, die eine Aussage unmöglich machen. Zweitens: Möglicherweise reicht die Auflösung der FISH-Methode nicht aus oder erzwingt Einschränkungen in der Aussagekraft der erhobenen Daten.

1996 veröffentlichten Kurz und Kollegen eine Studie, in der sie zeigen konnten, daß die dreidimensionale Struktur der Centromere im Zellkern trotz Denaturierung und Permeabilisierung erhalten bleibt (Kurz et al., 1996). In einer neueren Arbeit, publiziert von Solovei und Kollegen, wurden Lebenszellversuche mit FISH- und elektronenmikroskopischen Experimenten verglichen. Es zeigte sich, daß FISH zu einer Reduktion der Kondensation der DNA führt. Im elektronenmikroskopischen Bild geht sie sogar so weit, daß die DNA nach der FISH-Behandlung als eine Art Netz vorzuliegen scheint. Dies ist ein Zustand, der sich stark vom Normalbefund unterscheidet. Auch scheint die FISH-Prozedur zu einem Ausfließen von DNA in den Cytoplasmatischen Raum und zu einer Veränderung der Kernmorphologie zu führen. Dennoch ließ sich beweisen, daß die räumliche und dreidimensionale Struktur und vor allem auch die Proportionen im Zellkern insgesamt sehr gut erhalten bleiben. Auf alle Fälle in einem ausreichenden Ausmaß für Untersuchungen mit dem Lichtmikroskop und seiner beschränkten Auflösung (Solovei et al., 2002).

Womit das zweite Problem genannt wäre: die Auflösung des Lichtmikroskops. Ein Epifluoreszenzmikroskop kann ungefähr eine maximale Auflösung von 800 nm axial erreichen. Das konfokale Laser Scanning Mikroskop erreicht nur geringfügig bessere Werte, hat aber den Vorteil, daß Streustrahlung besser ausgeblendet und das Signal somit klarer dargestellt werden kann. Auch unter optimalen Bedingungen ist es folglich nicht möglich, Strukturen zu beurteilen, die einen Durchmesser von 500 nm oder darunter haben. Daher ist es ausgeschlossen, mit der FISH-Methodik eine exakte Genlokalisierung durchführen zu können (Cremer et al., 2004). Da dies aber in der vorliegenden Arbeit nicht versucht wurde, sondern deutlich größere Signale ausgewertet wurden, kann davon ausgegangen werden, daß für die Versuche eine Aussagesicherheit besteht.

In der letzten Zeit sind große Anstrengungen unternommen worden, die Auflösungsbeschränkung des Lichtmikroskops zu verringern und verbesserte visuelle Möglichkeiten bereitzustellen. Mit diesen vielversprechenden neuen Mikroskopiertechniken wie SMI (Spatially Modulated Illumination) wird es, so die Hoffnung, möglich sein, die bisher erhobenen Daten zu kontrollieren und wo nötig zu korrigieren.

#### **5.4.4 Lust und Frust mit Paint-Proben**

Paint-Proben sollen es dem Untersucher ermöglichen, das CT eines Chromosoms darzustellen. Es gibt zwei Möglichkeiten, diese Paintproben herzustellen. Zum einen können Chromosomen mittels Flowsorting gewonnen und dann mit einer DOP-PCR amplifiziert werden (Wienberg et al., 1994). Bislang gibt es keine genauen Angaben, wie gut die so amplifizierte DNA das Chromosoms tatsächlich repräsentiert. Sehr pessimistische Angaben gehen von nur 20-40% aus. Eine andere Methode gewinnt Chromosomenmaterial durch Laser-Mikrodissektion und amplifiziert es anschließend mit einer Linker-Adaptor-PCR zu. Die Autoren dieser Methode geben an, auch Translokationen kleiner 3 Mb detektieren zu können und somit eine sehr gute Repräsentation des Chromosoms in der Paintprobe zu erreichen (Thalhammer et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden Paintproben verwendet, die nach der alten Methode des Flowsortings und der DOP-PCR hergestellt wurden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß Teile der CT nicht vollständig dargestellt wurden. Daraus ergeben sich zwei Probleme. Zum einen ist eine Aussage über die absoluten Lagebeziehungen von BACs zum CT nur unter Vorbehalt möglich. Um dieses Problem zu umgehen, wurden relative Aussagen über die Lageverhältnisse der BAC-Pools getroffen (3D-RRD). Absolute Distanzangaben sind unter Umständen nur eingeschränkt valide. Zum anderen kann nicht ausgeschlossen werden, daß BAC-Klone, die außerhalb des CT zu liegen scheinen, in Wirklichkeit noch innerhalb des CT liegen (vgl. Abbildung 4.23.). Das bedeutet, daß man mit Aussagen über Loops, ausgestülpte DNA oder Erklärungen zum Vorliegen von BACs außerhalb des CT sehr vorsichtig sein muß. Die neueren Paints werden hier eine größere Aussagesicherheit ermöglichen.

#### **5.4.5 Mögliche strukturelle Artefakte bei Zellen in Kultur**

Aus der Arbeit mit Tumorzellen weiß man, daß sie in Kultur einen anderen Phänotyp zeigen können als in vivo (Lelievre et al., 1998; Zink et al., 2004). Theoretisch ist es möglich, daß dies auch für alle anderen Zellen in Kultur gilt. Daher sollte man sich stets bewußt sein, daß Daten, die an kultivierten Zellen gewonnen wurden, unter Umständen stark von Daten aus in vivo Zellen abweichen können. Somit könnte die beobachtete radiale Verteilung von subchromosomalen Bereichen in kultivierten Zellen ein Artefakt sein oder zumindest in dieser Form nicht in den normalen Zellen des Organismus vorkommen. Eine Möglichkeit, dieses grundsätzliche Problem zu umgehen, ist, sofern möglich, frische Zellen zu

verwenden. Eine Alternative stellen 3D-Kulturmedien dar. Allerdings ist die Kultivierung von Zellen im annähernd naturgetreuen Zellverband eine große Herausforderung, die bisher noch nicht zur vollen Zufriedenheit gelöst werden konnte.

#### **5.4.6 Vorteile und Nachteile manuell gesetzter Schwellenwerte**

Wie im Material- und Methodenteil unter Punkt 3.13.2. beschrieben wurde, ist ein Schritt bei der Auswertung das Festlegen eines Schwellenwertes. Dieser definiert die Grenze, oberhalb derer eine Helligkeit als Signal gewertet wird, unterhalb derer aber als Hintergrundrauschen verworfen wird. Ein Schwellenwert wirft grundsätzlich das Problem auf, daß immer Signal anteilig verloren gehen kann oder Hintergrundrauschen als Signal gewertet wird.

So kann es passieren, daß BAC-Signale, die tatsächlich innerhalb des CT lokalisiert sind, außerhalb des CT zu liegen scheinen. Aufgrund des Schwellenwertes, der gesetzt werden mußte, ist die schwache Paintfärbung, die zuvor vorhanden war, aber verloren gegangen (Vergleiche auch Abbildung 3.4. und 4.16.).

Der Grund überhaupt einen solchen Schwellenwert setzen zu müssen, bei dem ein Signalverlust in Kauf genommen werden muß, lautet wie folgt. Die beiden Auswertungsprogramme 3D-RRD und ADS verwenden Helligkeitsänderungen als Indizien für Oberflächengrenzen. Damit beispielsweise der Zellkernrand/CT-Rand als solcher erkannt werden kann, *muß* die Umgebung den Helligkeitswert null besitzen. Da aber bei jedem Versuch ein gewisses Hintergrundrauschen auftritt, hat die Umgebung in den Rohdaten nie den Wert null. Er muß daher künstlich festgelegt werden. Dazu wird der Wert des Hintergrundrauschens ermittelt und der Schwellenwert wird oberhalb dieses Wertes festgesetzt.

Die verwendeten Schwellenwerte bei der Auswertung der vorgestellten Versuche wurden manuell durch den Anwender festgelegt. Dies birgt manche Vorteile. Jede Zelle und jedes Signal wird einzeln genau angesehen und beurteilt. Damit wird jeder Schwellenwert optimal an die Gegebenheiten in der Zelle angepaßt.

Ein Nachteil ergibt sich aus dem großen personellen Aufwand und der damit verbundenen geringen Anzahl ausgewertbarer Zellen. Auch ist jeder Anwender unterschiedlich streng in der Beurteilung der Grenzwerte (interpersonelle Variabilität). Daher ist es wichtig, daß ein Satz von Daten komplett von derselben Person bearbeitet wird, wie es auch bei den vorgestellten Experimenten gemacht wurde.

Die in Entwicklung befindlichen Computerprogramme werden es ermöglichen, das manuelle Festlegen eines Schwellenwertes durch automatische Programmabläufe zu ersetzen und

damit auch die zuvor genannte interpersonelle Variabilität zu umgehen. Ob die größere Anzahl an bearbeitbaren Zellen und der absolut gleichmäßige Umgang mit jedem Signal einen Vorteil in der Auswertungsgenauigkeit bringen wird und somit der manuellen Arbeit überlegen ist, bleibt abzuwarten.

## **5.5 Erkenntnisse der vorgestellten Arbeit und Möglichkeiten für die weitere Forschung**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß subchromosomale Bereiche von Chromosom 12 im Interphasekern einer runden oder rundlichen Zelle eine radiale Position gemäß ihres Gengehaltes einnehmen. Andere Zellen wie die HFb zeigen keine solche radiale Ordnung.

Eine Möglichkeit, das vorhandene Wissen an dieser Stelle weiter auszubauen und zu vertiefen, ist, ähnliche Versuche mit anderen Zelltypen durchzuführen. Sie sollten flacher sein als HLY, aber nicht so flach wie HFb. Alternativ könnte man versuchen, mittels struktureller Software eine räumliche Verteilung am Modell zu simulieren. So könnte gezeigt werden, ob eine radiale Verteilung subchromosomaler Bereiche in flachen Zellen überhaupt möglich und energetisch sinnvoll ist. Zusätzlich sollten die neuen, mittels Mikrodissektion und Linker-Adaptor-PCR hergestellten Paints ausgetestet werden. Es bleibt allerdings abzuwarten, ob diese neuen Paints tatsächlich durch eine genauere CT-Colorierung andere Daten bezüglich der radialen Verteilung subchromosomaler Strukturen erbringen werden.

Ein ganz anderer Ansatz für das weitere Vorgehen ist die Korrelation der gewonnenen FISH-Daten mit Ergebnissen von Expressionsprofilen. Hier könnte der Vergleich von Gentranskription und der Produktion von nc-RNA viel Klarheit in das Verständnis der globalen Transkriptionsaktivität in der Zelle und ihre Auswirkung auf die Struktur bringen. Vielleicht könnte man so erklären, warum bestimmte Bereiche der DNA sich strukturell und gemäß ihrer radialen Position wie genreiche DNA-Abschnitte verhalten, obwohl sie nur wenige aktive Gene enthalten. Es wäre zudem interessant zu sehen, ob durch neu zusammengestellte BAC-Pools, die die tatsächlichen Transkriptionsverhältnisse widerspiegeln, ganz andere Daten und Aussagen zur Struktur getroffen werden können, als die hier vorgestellten.

Living cell studies könnten zusätzlich in der Erforschung subchromosomaler DNA-Bereiche eine bedeutende Rolle spielen. Mit ihnen wäre es möglich, Veränderungen der strukturellen Ordnung im Verlauf eines Zellebens zu verfolgen. Es wäre unter anderem ausgesprochen

aufschlußreich, die radiale Verteilung subchromosomaler Bereiche bei Zellen zu untersuchen, die während ihrer Differenzierung ihre Form stark verändern.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, andere Vorstellungen der Kernorganisation subchromosomaler Strukturen als das Modell der radialen Verteilung zu entwickeln und auszutesten.

Das Ziel aller dieser möglichen Ansätze ist es, ein besseres Verständnis des strukturellen Aufbaus subchromosomalen Regionen und damit der Zellkernarchitektur zu gewinnen.

- Alberts. 1995. Molekularbiologie der Zelle. VCH.
- 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.
- 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 emerimutant cells. *Hum Mol Genet.* 10:211-9.
- Bridger, J.M., S. Boyle, I.R. Kill, and W.A. Bickmore. 2000. Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Curr. Biol.* 10:149-52.
- Bühling. 1995. Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie. Urban und Schwarzenberg, München.
- Caron, H., B. van Schaik, M. van der Mee, F. Baas, G. Riggins, P. van Sluis, M.C. Hermus, R. van Asperen, K. Boon, P.A. Voute, S. Heisterkamp, A. van Kampen, and R. Versteeg. 2001. The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science.* 291:1289-92.
- Cawley, S., S. Bekiranov, H.H. Ng, P. Kapranov, E.A. Sekinger, D. Kampa, A. Piccolboni, V. Sementchenko, J. Cheng, A.J. Williams, R. Wheeler, B. Wong, J. Drenkow, M. Yamanaka, S. Patel, S. Brubaker, H. Tammana, G. Helt, K. Struhl, and T.R. Gingeras. 2004. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell.* 116:499-509.
- Chambeyron, S., and W.A. Bickmore. 2004. Does looping and clustering in the nucleus regulate gene expression? *Curr Opin Cell Biol.* 16:256-62.
- Collins, J.E., M.E. Goward, C.G. Cole, L.J. Smink, E.J. Huckle, S. Knowles, J.M. Bye, D.M. Beare, and I. Dunham. 2003. Reevaluating human gene annotation: a second-generation analysis of chromosome 22. *Genome Res.* 13:27-36.
- Cook, P.R. 2002. Predicting three-dimensional genome structure from transcriptional activity. *Nat Genet.* 32:347-52.
- Cremer, M., K. Kupper, B. Wagler, L. Wizelman, J. von Hase, Y. Weiland, L. Kreja, J. Diebold, M.R. Speicher, and T. Cremer. 2003. Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol.* 162:809-20.
- Cremer, M., J. v. Hase, T. Volm, A. Brero, G. Kreth, J. Walter, C. Fischer, I. Solovei, C. Cremer, and T. Cremer. 2001b. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res.* 9:541-567.
- Cremer, T., and C. Cremer. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet.* 2:292-301.
- Cremer, T., K. Kupper, S. Dietzel, and S. Fakan. 2004. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol Cell.* 96:555-67.
- 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.* 145:1119-31.
- Ferguson, M., and D.C. Ward. 1992. Cell cycle dependent chromosomal movement in premitotic human T- lymphocyte nuclei. *Chromosoma.* 101:557-65.
- Francastel, C., W. Magis, and M. Groudine. 2001. Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:12120-5.
- 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.
- Guasconi, V., M. Soudi, and S. Ait-Si-Ali. 2005. Nuclear Positioning, Gene Activity and Cancer. *Cancer Biol Ther.* 4.

- Kampa, D., J. Cheng, P. Kapranov, M. Yamanaka, S. Brubaker, S. Cawley, J. Drenkow, A. Piccolboni, S. Bekiranov, G. Helt, H. Tammana, and T.R. Gingeras. 2004. Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res.* 14:331-42.
- Kapranov, P., S.E. Cawley, J. Drenkow, S. Bekiranov, R.L. Strausberg, S.P. Fodor, and T.R. Gingeras. 2002. Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. *Science.* 296:916-9.
- Kim, S.H., P.G. McQueen, M.K. Lichtman, E.M. Shevach, L.A. Parada, and T. Misteli. 2004. Spatial genome organization during T-cell differentiation. *Cytogenet Genome Res.* 105:292-301.
- Kleivi, K., M.R. Teixeira, M. Eknaes, C.B. Diep, K.S. Jakobsen, R. Hamelin, and R.A. Lothe. 2004. Genome signatures of colon carcinoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 155:119-31.
- Kozubek, S., E. Lukasova, A. Mareckova, M. Skalnikova, M. Kozubek, E. Bartova, V. Kroha, E. Krahulcova, and J. Slotova. 1999. The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9,22) translocations and in the pathogenesis of t(9,22) leukemias. *Chromosoma.* 108:426-35.
- Kuroda, M., H. Tanabe, K. Yoshida, K. Oikawa, A. Saito, T. Kiyuna, H. Mizusawa, and K. Mukai. 2004. Alteration of chromosome positioning during adipocyte differentiation. *J Cell Sci.* 117:5897-903.
- 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.
- Lelievre, S.A., V.M. Weaver, J.A. Nickerson, C.A. Larabell, A. Bhaumik, O.W. Petersen, and M.J. Bissell. 1998. Tissue phenotype depends on reciprocal interactions between the extracellular matrix and the structural organization of the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:14711-6.
- Lercher, M.J., A.O. Urrutia, and L.D. Hurst. 2002. Clustering of housekeeping genes provides a unified model of gene order in the human genome. *Nat Genet.* 31:180-3.
- Levsky, J.M., and R.H. Singer. 2003. Gene expression and the myth of the average cell. *Trends Cell Biol.* 13:4-6.
- Lewin, B. 1998. *Molekularbiologie der Gene.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Liu, P., J. Siciliano, D. Seong, J. Craig, Y. Zhao, P.J. de Jong, and M.J. Siciliano. 1993. Dual Alu polymerase chain reaction primers and conditions for isolation of human chromosome painting probes from hybrid cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 65:93-9.
- Lopez, G., Marquez J., Ubaldo E., Corkidi G., Echeverria O., Vasquez Nin G.H. 1996. Three-dimensional analysis of the arrangement of compact chromatin in the nucleus of G0 rat lymphocytes. *Histochem.Cell Biol.* 105:153-161.
- 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.
- Mattick, J.S. 2003. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays.* 25:930-9.
- Mattick, J.S., and I.V. Makunin. 2005. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet.* 14 Suppl 1:R121-32.
- Mattout-Drubezki, A., and Y. Gruenbaum. 2003. Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery. *Cell Mol Life Sci.* 60:2053-63.
- Misteli, T. 2001. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science.* 291:843-7.
- Misteli, T. 2005. Concepts in nuclear architecture. *Bioessays.* 27:477-487.

- Muller, S., V. Eder, and J. Wienberg. 2004. A nonredundant multicolor bar code as a screening tool for rearrangements in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer*. 39:59-70.
- Nogami, M., O. Nogami, K. Kagotani, M. Okumura, H. Taguchi, T. Ikemura, and K. Okumura. 2000. Intranuclear arrangement of human chromosome 12 correlates to large-scale replication domains. *Chromosoma*. 108:514-22.
- Nowell, P.C., J.D. Rowley, and A.G. Knudson, Jr. 1998. Cancer genetics, cytogenetics--defining the enemy within. *Nat Med*. 4:1107-11.
- Parada, L., and T. Misteli. 2002. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol*. 12:425-32.
- Parada, L.A., P.G. McQueen, P.J. Munson, and T. Misteli. 2002. Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells. *Curr Biol*. 12:1692-7.
- Parada, L.A., J.J. Roix, and T. Misteli. 2003. An uncertainty principle in chromosome positioning. *Trends Cell Biol*. 13:393-6.
- Parada, L.A., S. Sotiriou, and T. Misteli. 2004. Spatial genome organization. *Exp Cell Res*. 296:64-70.
- Pederson, T. 2000. Half a century of "the nuclear matrix". *Mol. Biol. Cell*. 11:799-805.
- Pederson, T. 2004. The spatial organization of the genome in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev*. 14:203-9.
- Riede. 2001. Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
- Roix, J.J., P.G. McQueen, P.J. Munson, L.A. Parada, and T. Misteli. 2003. Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet*. 34:287-91.
- Rowley, J.D. 1973. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 243:290-3.
- 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.
- Skalnikova, M., S. Kozubek, E. Lukasova, E. Bartova, P. Jirsova, A. Cafourkova, I. Koutna, and M. Kozubek. 2000. Spatial arrangement of genes, centromeres and chromosomes in human blood cell nuclei and its changes during the cell cycle, differentiation and after irradiation. *Chromosome Res*. 8:487-99.
- Solovei, I., A. Cavallo, L. Schermelleh, F. Jaunin, C. Scasselati, D. Cmarko, C. Cremer, S. Fakan, and T. Cremer. 2002. Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH). *Exp Cell Res*. 276:10-23.
- Spector, D.L. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol*. 9:265-315.
- Strachan, R. 1996. Molekulare Humangenetik. Spektrum Akademischer Verlag.
- Sun, H.B., J. Shen, and H. Yokota. 2000. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys. J*. 79:184-90.
- Tanabe, H., S. Muller, M. Neusser, J. von Hase, E. Calcagno, M. Cremer, I. Solovei, C. Cremer, and T. Cremer. 2002. Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:4424-9.
- Thalhammer, S., S. Langer, M.R. Speicher, W.M. Heckl, and J.B. Geigl. 2004. Generation of chromosome painting probes from single chromosomes by laser microdissection and linker-adaptor PCR. *Chromosome Res*. 12:337-43.
- van Driel, R., and P. Fransz. 2004. Nuclear architecture and genome functioning in plants and animals: what can we learn from both? *Exp Cell Res*. 296:86-90.
- 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.
- Versteeg, R., B.D. van Schaik, M.F. van Batenburg, M. Roos, R. Monajemi, H. Caron, H.J. Bussemaker, and A.H. van Kampen. 2003. The human transcriptome map reveals

- extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes. *Genome Res.* 13:1998-2004.
- Visser, A.E., F. Jaunin, S. Fakan, and J.A. Aten. 2000. High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J. Cell Sci.* 113:2585-93.
- 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.* 113:1565-76.
- Wachtler, F., H.G. Schwarzacher, and A. Ellinger. 1982. The influence of the cell cycle on structure and number of nucleoli in cultured human lymphocytes. *Cell Tissue Res.* 225:155-63.
- Walter, J., L. Schermelleh, M. Cremer, S. Tashiro, and T. Cremer. 2003. Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages. *J Cell Biol.* 160:685-97.
- Weierich, C. 2002. Diplomarbeit. *In* Institut für Anthropologie und Humangenetik. LMU, München.
- Weierich, C., A. Brero, S. Stein, J. von Hase, C. Cremer, T. Cremer, and I. Solovei. 2003. Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. *Chromosome Res.* 11:485-502.
- Wienberg, J., A. Jauch, H.J. Ludecke, G. Senger, B. Horsthemke, U. Claussen, T. Cremer, N. Arnold, and C. Lengauer. 1994. The origin of human chromosome 2 analyzed by comparative chromosome mapping with a DNA microlibrary. *Chromosome Res.* 2:405-10.
- 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.
- Yamashita, T., M. Honda, H. Takatori, R. Nishino, N. Hoshino, and S. Kaneko. 2004. Genome-wide transcriptome mapping analysis identifies organ-specific gene expression patterns along human chromosomes. *Genomics.* 84:867-75.
- Zink, D., A.H. Fischer, and J.A. Nickerson. 2004. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer.* 4:677-87.
- 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.

Danksagung:

Herrn Prof. Thomas Cremer möchte ich an allererster Stelle auf das herzlichste nicht nur für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit danken, sondern auch für seine großartige Vorbildfunktion als Wissenschaftler und engagierter Forscher.

Frau Dr. Marion Cremer danke ich ebenfalls ganz herzlich für die Übernahme der Rolle meiner Doktormutter. Sie begleitete mich nicht nur vom ersten Moment an durch schöne und weniger schöne Versuchszeiten, sondern war auch stets eine immer zugewandte Ansprechpartnerin für Probleme aller Art.

Herrn PD Dr. Klein danke ich für die Vertretung meiner Doktorarbeit vor der Medizinischen Fakultät. Und meinen ganz besonders herzlichen Dank möchte ich auch für die guten Gespräche und hilfreichen Anregungen aussprechen.

Frau Katrin Küpper danke ich für ihre große Hilfe in praktischen Dingen und ihre unermüdlichen Erklärungen und zu Versuchsanordnungen, Computerprogrammen und statistischen Fragestellungen.

Frau Dr. Irina Solovei danke ich für ihre so hilfsbereite Art, für viele Anregungen aller Art zu meinen Versuchen.

Dear Irina, may I thank you for being there throughout the good and the tough times. For always answering my hundreds of questions, for your advise and your help and of course for your reading suggestions.

Besonderen und herzlichen Dank für schöne Gespräche, aufmunternde Mittagessen und fröhliche Nachmittage richte ich an Tina Friederich, Katrin Teller, Roman Zinner, Sandro Brero und Babett Wangler.

Frau Jahn-Henninger danke ich für die Bereitstellung von Metaphasepräperaten, Unmengen von Lösungen und Ratschlägen, die über den Laboralltag weit hinaus gingen.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die vielen, vielen kleinen und großen Hilfen während meiner Zeit im Labor und danach bedanken. Dafür, daß es Spaß gemacht hat, in der Arbeitsgruppe zu arbeiten und das vergnügliche „Außendrumherum“. Danke an Heiner Albiez, Claudia Weierich, Dani Köhler, Simone Otten, Roy Hessing, Carolin Blesse, Stefan Müller, Michaela Neusser, Verena Schwarz, Robert Mayer, Steffen Dietzel und Claudia Heppberger.

Meinen Freunden Nike, Max, Verena, Flo, Philip, Christoph, Marc, Mathias, und Carsten danke ich für die Unterstützung und dafür, daß sie meine Freunde sind. Was könnte mir besseres passieren? Steffen, Älmi und T. Ilse: Danke!

## Erklärung:

Ich erkläre, dass ich die an der Ludwig-Maximilians-Universität eingereichte Dissertation mit dem Titel

### Die räumliche Anordnung subchromosomaler Bereiche mit unterschiedlicher Gendichte im Interphasezellkern

am Biozentrum (Anthropologie und Humangenetik) der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Thomas Cremer und Herrn Priv. Doz. Dr. Christoph Klein

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Teile dieser Dissertation wurden an folgendes Publikationsorgan zur Veröffentlichung eingereicht:

Kupper K, Kolbl A, Biener D, Dittrich S, von Hase J, Thormeyer T, Fiegler H, Carter NP, Speicher MR, Cremer T, Cremer M.

Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression.

Chromosoma. 2007 Feb 27;

München, 19.04.2007

## Lebenslauf Dorothee Biener

### **PERSÖNLICHE DATEN:**

Geburtstag: 28. April 1977  
Geburtsort: Hannover  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **AUSBILDUNG:**

Nov 2006	APPRPBATION ALS ÄRZTIN
Okt 2006	DRITTES STAATSEXAMEN in Medizin
Aug 2005	ZWEITES STAATSEXAMEN in Medizin
März 2003	ERSTES STAATSEXAMEN in Medizin
März 2002	PHYSIKUM
März 2001	Aufnahme des Studiums der Medizin an der LMU, München
Feb 2001	DIPLOM DER BIOLOGIE
Nov 1996 – Feb 2001	Studium der Biologie an der LMU, München Hauptfach: Humangenetik Nebenfächer: Genetik, Immunologie und Psychologie
Juni 1996	ABITUR am Maximiliansgymnasium, München