

Department Biologie II
Anthropologie und Humangenetik
Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zur Zellkernarchitektur:

**Der Einfluss verschiedener Chromatineigenschaften auf
die räumliche Anordnung subchromosomaler Segmente
bezüglich der Zellkerne sowie der
Chromosomenterritorien anhand der humanen
Chromosomen 11, 12, 18 und 19.**

Katrin Küpper

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
eingereicht am 15.03.2007

**Untersuchungen zur Zellkernarchitektur:
Der Einfluss verschiedener Chromatineigenschaften auf die räumliche Anordnung
subchromosomaler Segmente bezüglich der Zellkernen sowie der
Chromosomenterritorien anhand der humanen Chromosomen 11, 12, 18 und 19.**

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

vorgelegt von
Dipl. Biol. Katrin Küpper

Gutachter:
Prof. Dr. Thomas Cremer
Dr. Angelika Böttger (PD)

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2007

1. EINLEITUNG	6
1.1 Anordnung von DNA im Zellkern	6
1.1.1 Definitionen: Chromatin und Chromosomen.....	6
1.1.2 Chromosomen in der Metaphase.....	8
1.1.2.1 Aufbau von Metaphasechromosomen.....	8
1.1.2.2 Färbung von Metaphasechromosomen.....	10
1.1.2.3 Eigenschaften von R- und G-Banden.....	12
1.1.3 Chromosomen in der Interphase: Chromosomenterritorien.....	13
1.1.3.1 Geschichte.....	13
1.1.3.2 Räumliche Anordnung der CTs im Zellkern.....	14
1.1.3.3 Organisation subchromosomaler Segmente in den CTs.....	16
1.1.3.4 Positionierung von aktiven Genen in CTs: Vom ICD Modell zum CT-IC Modell.....	18
1.2 Regulation der Transkription	21
1.2.1 Die Ebene der Gene.....	22
1.2.2 Epigenetische Faktoren der Regulation.....	22
1.2.2.1 Histonvarianten.....	23
1.2.2.2 Histonmodifikationen.....	23
1.2.2.3 Methylierung der DNA.....	25
1.2.2.4 Lokalisation im Zellkern.....	25
1.3 Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)	27
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	28
2. MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Zellmaterial und verwendete DNA-Sonden	30
2.1.1 Zellmaterial.....	30
2.1.2 DNA-Sonden.....	30
2.2 Zellkultur	30
2.2.1 Ansetzen einer Zellkultur.....	30
2.2.2 Isolierung und Kultivierung von Lymphozyten aus Vollblut.....	31
2.2.3 Umsetzen (Subkultivierung) einer Zellkultur.....	33
2.2.4 Kultivierung von E.coli mit BAC-Klonen.....	35
2.2.5 Herstellung von Glycerolstocks der hochgezogenen E.coli Kulturen.....	36
2.3 Minipräparation der BAC-Klone	37
2.4 DOP-PCR	39
2.4.1 Primäre DOP-PCR der isolierten BAC-DNA.....	39
2.4.2 Sekundäre DOP-PCR der BAC-DNA.....	40
2.4.3 Label DOP-PCR der BAC-DNA.....	41
2.4.4 Sekundäre DOP-PCR der paint-Sonden.....	42
2.4.5 Label DOP-PCR der paint-Sonden.....	43
2.5 Restriktionsanalyse der isolierten BAC-DNA	45
2.5.1 Restriktionsverdau.....	45
2.5.2 Auftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese.....	46
2.6 Semiquantitative RT-PCR	47
2.6.1 RNA-Isolation.....	47
2.6.2 Photometrische Messung der RNA-Konzentration.....	49
2.6.3 Kontrolle der RNA mittels Gelelektrophorese.....	50
2.6.4 Erststrang cDNA-Synthese.....	51
2.6.5 Genspezifische PCR.....	52

2.7 Herstellung von Metaphasepräparaten.....	53
2.7.1 Fixierung von Lymphozyten	53
2.7.2 Auftropfen von Präparaten	54
2.7.3 Pepsinierung.....	55
2.8 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).....	55
2.8.1 2D-FISH-Experimente	55
2.8.2. 3D-FISH-Experimente	59
2.9 Mikroskopie.....	65
2.9.1 Phasenkontrastmikroskopie.....	65
2.9.2 Epifluoreszenzmikroskopie	66
2.9.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	67
2.10 Bildbearbeitung.....	68
2.10.1 Prozessierung	68
2.10.2 Dekonvolution.....	68
2.11 Quantitative Auswertungsmethoden	69
2.11.1 Auswertungen mit der 3D-RRD Software: Analyse der relativen, radialen Verteilung von Signalen in einer Referenzstruktur	69
2.11.2 Erweiterung des 3D-RRD Programms: Auswertung von CTs	73
2.11.3 Auswertungen mit der ADS Software: Bestimmung von absoluten Abständen zur Oberfläche einer Referenzstruktur	74
2.11.4 Auswertungen mit der eADS Software	77
2.11.5 Distanzmessungen mit ImageJ (Version 1.35i): Messung der Abstände zwischen mehreren Signalen	79
2.11.5.1 Distanzmessungen mit „SyncMeasure3D“	79
2.11.5.2 Distanzmessungen mit „Correlation function 3D“	80
2.11.6 Statistische Auswertung	80
3. ERGEBNISSE	82
3.1 Zusammenstellung der BAC-pools	82
3.1.1 Eigenschaften der menschlichen Chromosomen 11, 12, 18 und 19	82
3.1.2 Spezifische BACs für R- und G-Banden	88
3.1.3 Spezifische BACs für genreiche und genarme Segmente	88
3.1.4 Spezifische BACs für hoch und niedrig exprimierte Sequenzen.....	91
3.2 Auswahl spezifischer BACs für die Untersuchung von Genen mit inversen Eigenschaften.....	93
3.3 Durchführung der Experimente	94
3.3.1 Isolation, Amplifizierung und Testhybridisierung der BACs.....	94
3.3.2 Testen der ausgewählten BACs mittels Restriktionsverdau und RT-PCR	95
3.3.3 Durchführung der 3D-FISH Experimente	97
3.4 Anordnung der BAC-Pools innerhalb des Zellkerns	100
3.4.1 Entwicklung eines geeigneten Auswertungsprogrammes	100
3.4.2 Anordnung der BAC-Pools innerhalb des Zellkerns	101
3.4.3 Untersuchung der räumlichen Anordnung im Zellkern von Genen mit inversen Eigenschaften	108
3.5 Anordnung der BAC-Pools innerhalb der Chromosomenterritorien	110
3.5.1 Entwicklung eines geeigneten Auswertungsprogrammes	110
3.5.2 Anordnung der BAC-Pools in Bezug zur Oberfläche der Chromosomenterritorien	111
3.5.3 Polare Anordnung der BAC-Pools innerhalb der Chromosomenterritorien	114
3.5.3.1 Abstandsmessungen zwischen Intensitätsschwerpunkten	115
3.5.3.2 Voxelbasierte Abstandsmessungen	121
3.5.4 Analyse der CT-Struktur: Maximum Brightness Center (MBCs)	125
3.5.5 Das Phänomen des „Looping out“	131
3.5.6 Vermischung von Chromosomenterritorien	134

4. DISKUSSION	139
4.1 Einfluss lokaler Chromatineigenschaften auf die Zellkernarchitektur	139
4.2 BAC-Klone als Handwerkszeug für die Untersuchung der räumlichen Anordnung bestimmter Chromatinabschnitte im Zellkern	140
4.3 Die lokale Gendichte als wichtigster Faktor für die radiale Anordnung des Chromatins im Zellkern	141
4.4 Anordnung subchromosomaler Segmente innerhalb der Chromosomenterritorien	147
4.5 Funktionelle Bedeutung der beschriebenen Ordnung im Zellkern	159
5. ZUSAMMENFASSUNG	162
6. LITERATURVERZEICHNIS	164
DANKSAGUNG	180
CURRICULUM VITAE	181
PUBLIKATIONEN	182
EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG	183
ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE	183

1. Einleitung

1.1 Anordnung von DNA im Zellkern

1.1.1 Definitionen: Chromatin und Chromosomen

Die DNA liegt in eukaryontischen Zellen nicht als freies Molekül vor, sondern bildet mit verschiedenen Proteinen einen Komplex, das so genannte Chromatin. Der Name lässt sich von dem griechischen Wort „χρώμα“ (Chroma = Farbe) bzw. „χρωματισμένος“ (chromatismenos = gefärbt) ableiten, und geht auf Walther Flemming (1843-1905) zurück, der als Erster entdeckte, dass sich das Material im Zellkern durch basische Farbstoffe anfärben lässt (Flemming, 1882).

In Eukaryonten ist die DNA mit Hilfe der Histone verpackt. Diese kleinen, basischen Proteine (100-135 aa, Mw = 10-14000 Da) enthalten viele positiv geladene Aminosäuren (wie z.B. Lysin und Arginin) und ermöglichen so durch ihre positive Ladung eine gute Interaktion mit der negativ geladenen DNA (Alberts et al., 1990; Lewin, 1998; Luger et al., 1997). Der DNA-Faden ist mit 146 bp in genau 1,67 Windungen um die Oberfläche eines Oktamers aus diesen Histonen gewickelt und bildet so ein Nukleosom. Dieses Oktamer besteht aus je einem Dimer der Histone H2A, H2B, H3 und H4 („core particle“). Die Länge der DNA zwischen zwei Nukleosomen, die so genannte „linker-DNA“ ist variabel und nimmt in höheren Lebewesen eine Länge zwischen 10 und 90bp ein (Luger et al., 1997; Richmond and Davey, 2003). Das Histon H1 stabilisiert die Nukleosomenstruktur, es kann an die linker-DNA binden (Simpson, 1978). Die Histone des „core particle“ sind während der Evolution hoch konserviert geblieben, was auf ihre wichtige funktionelle Bedeutung hinweist. So unterscheiden sich zum Beispiel die Histone H4 aus dem Rind und der Erbse in nur zwei Aminosäuren (DeLange, 1969a; DeLange, 1969b). Die Histone übernehmen fundamentale Aufgaben im Zellkern. Sie wirken nicht nur als Verpackungs- und Komprimierungsfaktor der DNA, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription (siehe Abschnitt 1.2).

Die Aneinanderreihung der Nukleosomen entlang des DNA-Fadens bildet die so genannte Perlschnurstruktur („beads-on-a-string“). Sie ist die Grundform des Chromatins. Diese Anordnung konnte erstmals in den 70er Jahren anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen dokumentiert werden (Kornberg, 1974; Olins and Olins, 1974). Die Perlschnurstruktur kann mit Hilfe des Histons H1 durch Schleifenbildung die nächst höhere Ordnungsstufe des Chromatins, die so genannte Solenoidstruktur oder 30nm Fiber, formen (Thomas, 1999). Die Existenz dieser Anordnung konnte ebenfalls mit Hilfe des Elektronenmikroskops belegt werden (Finch and Klug, 1976). Das Chromatin kann auch noch stärker kondensiert im Zellkern vorliegen, doch über die Art dieser höheren Chromatinordnung ist bislang nur wenig bekannt (Felsenfeld and Groudine, 2003).

Prinzipiell kann, je nach Grad der Kondensierung, zwischen zwei Arten des Chromatins unterschieden werden: dem Euchromatin und dem Heterochromatin. Diese Begriffe wurden

bereits 1928 von Emil Heitz eingeführt. Er führte lichtmikroskopische Untersuchungen an Zellkernen durch, deren DNA durch basische Farbstoffe angefärbt war, und unterschied zwischen intensiv gefärbten Segmenten, die er Heterochromatin nannte und weniger intensiv gefärbten Abschnitten, die er als Euchromatin definierte. Schon damals postulierte er, dass das Heterochromatin sich „genetisch passiv“ verhält und auch nur wenige bis gar keine Gene beinhaltet, während das Euchromatin genetisch aktive bzw. potentiell genetisch aktive Kernregionen mit vielen Genen umfasst (Heitz, 1928). Etwas später wurde die Unterscheidung zwischen fakultativen und konstitutiven Heterochromatin eingeführt (Brown, 1966). Das konstitutive Heterochromatin besteht aus hoch repetitiven Sequenzen. Es bleibt permanent, also während der gesamten Lebensspanne eines Organismus, stark kondensiert. Konstitutives Heterochromatin wird vornehmlich an den Centromeren, sowie in kleineren Mengen an den Telomeren der Chromosomen gefunden (Craig, 2005). Das fakultative Heterochromatin dagegen ist gewebsspezifisch. Es enthält DNA-Sequenzen, die in dem entsprechenden Gewebe grundsätzlich nicht benötigt werden und daher still gelegt wurden. Die Bildung von fakultativen Heterochromatin ist von der Entwicklung und Differenzierung eines Organismus abhängig (Craig, 2005). Brown et al postulierte, dass jede DNA Sequenz potentiell zu fakultativen Heterochromatin verpackt werden kann (Brown, 1966). Ein typisches Beispiel für fakultatives Heterochromatin ist das inaktive X-Chromosom in weiblichen Säugerzellen. Welches der beiden X-Chromosomen inaktiviert wird ist zufällig, die Entscheidung fällt allerdings bereits in einem frühen Stadium der Embryogenese (Reviews zu diesem Thema: Brockdorff, 2002; Plath et al., 2002). Die von Emil Heitz aufgrund von lichtmikroskopischen Beobachtungen getroffene Einteilung in Eu- und Heterochromatin ist bis heute anerkannt. Dennoch zeigt die steigende Kenntnis über regulatorische Mechanismen im Zellkern, wie z.B. histonmodifizierende Elemente (siehe Abschnitt 1.2.2.2), dass diese Einteilung differenzierter betrachtet werden muss und zunehmend schwieriger und komplexer wird.

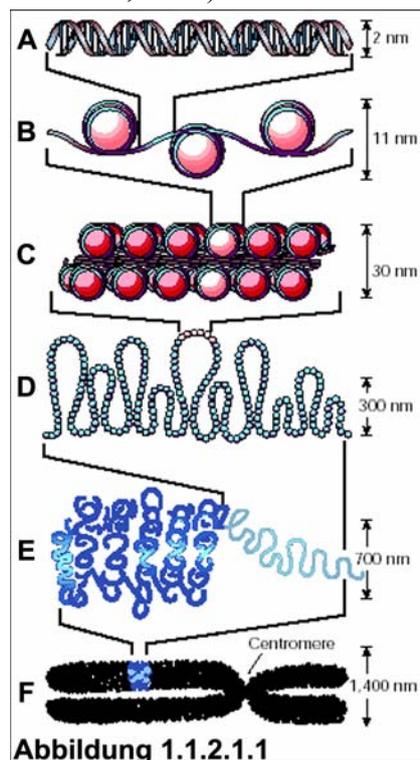
In sich teilenden (mitotischen) Zellen löst sich der Zellkern auf und das Chromatin kann, dicht gepackt, in Form von individuellen Chromosomen beobachtet werden. In diesem Zustand sind die Chromosomen (abgeleitet vom griechischen „χρόμα“ = Farbe und „σώμα“ = Körper) mit Hilfe des Lichtmikroskops ohne besondere Anfärbung erkennbar. Diese Strukturen dienen dem sicheren Transport der genetischen Information der Mutterzelle in die beiden, während der Zellteilung (Mitose) neu entstehenden Tochterzellen. Die Zahl und die Größe der Chromosomen kann sich beträchtlich zwischen verschiedenen Spezies unterscheiden. So hat zum Beispiel der Pferdespulwurm (*Ascaris megalocephala univalens*) nur 2 Chromosomen, die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) 8 Chromosomen, der Tintenfisch (*Sepia*) 12 Chromosomen und das Neunauge (*Petromyzontiformes*) sogar 174 Chromosomen. Die Anzahl der Chromosomen sagt dabei nichts über den Entwicklungsgrad des Organismus aus. So unterscheiden sich zum Beispiel verschiedene Unterarten der Süßkirsche (*Prunus*) beträchtlich in ihrer Chromosomenanzahl, je nach Unterart haben sie 16, 24, 32, 54 oder 144 Chromosomen (Flindt, 1985). Ein weiteres Beispiel sind zwei eng verwandte Muntjac Arten: während der chinesische Muntjac 46 Chromosomen in einer diploiden Zelle aufweist, hat der indische Muntjac nur 6 (♀) bzw. 7 (♂) Chromosomen (Scheuermann et al., 2005). In einer normalen, menschlichen Metaphase sind 46 Chromosomen zu finden.

Nach der Zellteilung dekondensieren die mitotischen Chromosomen in den neu gebildeten Kernen der Tochterzellen wieder zu den so genannten Chromosomenterritorien (CT). Diese CTs lassen sich durch Anfärben der gesamten DNA im Zellkern nicht mehr als getrennte Einheiten identifizieren. Mit Hilfe der FISH Technik (Fluoreszenz in situ Hybridisierung, siehe Abschnitt 2.8) ist es jedoch möglich zu demonstrieren, dass jedes Chromosom auch im Interphasezellkern ein distinktes Territorium einnimmt (Cremer et al., 1993; Lichter et al., 1988; Schardin et al., 1985, siehe auch Abschnitt 1.1.3.1).

1.1.2 Chromosomen in der Metaphase

1.1.2.1 Aufbau von Metaphasechromosomen

Das diploide menschliche Genom hat eine Länge von etwa 6,4 Milliarden Basenpaaren (6400 Mbp) und ist in 23 homologe Chromosomenpaare aufgeteilt (siehe www.ensembl.org/homo_sapiens). Messungen am Molekularmodell der DNA haben ergeben, dass 10bp eines reinen DNA Fadens (ohne Nukleosomen) eine Länge von 3,4nm einnehmen (Wakelin et al., 1984). Daraus lässt sich hochrechnen, dass in jedem diploiden Kern einer menschlichen Körperzelle insgesamt etwa 2m DNA verpackt sind. Für ein menschliches Chromosom würde sich damit durchschnittlich ein DNA-Faden von etwa 4,7cm Länge ergeben. Tatsächlich weisen die Chromosomen während der Zellteilung aber nur eine Länge von einigen wenigen µm auf. Das zeigt, dass die Metaphasechromosomen etwa um den Faktor 10.000 verkürzt und damit stark kondensiert sind. Es ist jedoch noch weitgehend unklar, wie diese Verpackung organisiert ist. Die Abbildung 1.1.2.1 (genommen aus Felsenfeld and Groudine, 2003) gibt einen Überblick über das von den meisten Autoren favorisierte „Loop-Modell“ zur Chromosomenkondensierung (Gasser and Laemmli, 1986; Laemmli et al., 1978; Paulson and Laemmli, 1977).



Die DNA Doppelhelix (A) ist in 1,6 Windungen um je ein Oktamer aus Histonproteinen gewickelt und bildet so die Nukleosomen (siehe Abschnitt 1.1.1). Aufgrund des Durchmessers des DNA-Protein-Komplexes spricht man hier von der 10nm Fiber (B). In dieser, durch Aufnahmen am Elektronenmikroskop belegten Perlschnurstruktur (Olins and Olins, 1974) ist die DNA bereits um den Faktor 10 komprimiert. Die 10nm Fiber wird mit Hilfe des Histons H1 weiter zur 30nm Fiber (C) aufgedreht. Die Existenz dieser Struktur wurde ebenfalls mit Hilfe des Elektronenmikroskops bestätigt (Finch and Klug, 1976), die genaue Struktur ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt. Die beiden am meisten favorisierten Modelle sind zum einen das Solenoid Modell (Felsenfeld and McGhee, 1986), nach dem je 6 bis 8 Nukleosomen in einer engen, helikalen Windung aufgewickelt sind, und das „Two-start-helical“ Modell (Dorigo et al., 2004), nach dem die Nukleosomen

eine Zig-Zag Struktur bilden, die dann wiederum zu einer Helix aufgewickelt wird. Es wird angenommen, dass die 30nm Fiber die DNA um den Faktor 30-40 komprimiert. Im Loop-Modell wird weiter davon ausgegangen, dass die 30nm Fiber wiederum in großen Schlaufen („loops“) angeordnet ist, die über SARs (scaffold attachment regions, ein Bindemotiv auf der DNA) an einem Proteingerüst befestigt sind (**D**). Erste Hinweise auf die Existenz dieses chromosomalen scaffolds erbrachten elektronen-mikroskopische Aufnahmen von Chromosomen, deren Histone mittels einer Behandlung mit Heparin und Dextransulfat herausgelöst wurden. Die Bilder zeigen eine Korona von relaxierten DNA Schlaufen, die um ein Proteingerüst angeordnet sind (Paulson and Laemmli, 1977; siehe Abbildung 1.1.2.1.2 A). Aus welchen Bestandteilen sich dieses Gerüst zusammensetzt ist noch nicht geklärt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass im Inneren der Metaphasechromosomen Topoisomerase II α sowie Condensin lokalisieren (Earnshaw and Heck, 1985; Gasser et al., 1986; Maeshima et al., 2005; Maeshima and Laemmli, 2003; siehe Abbildung 1.1.2.1.2 B, C und D), beides Faktoren, die nachweislich für die Kondensierung von Chromosomen essentiell sind (Adachi et al., 1991; Hirano et al., 1997). Für die weitere Kondensierung ist das scaffold wiederum schlaufenförmig aufgerollt (**E**). Diese dadurch entstehende Struktur entspricht schon einem Chromatid eines Metaphase-chromosoms (**F**). Die Strukturen, die in D, E und F gezeigt werden sind bisher rein spekulativ.

Eine weitere Vorstellung zur Verpackung der Metaphasechromosomen ist das Chromonema Modell (Belmont and Bruce, 1994; Belmont et al., 1999). Hier wird vorgeschlagen, dass die 30nm Fiber anhand von weiteren, helikalen Windungen zu höheren Strukturen aufgewickelt wird, den so genannten „Chromonema Fibern“.

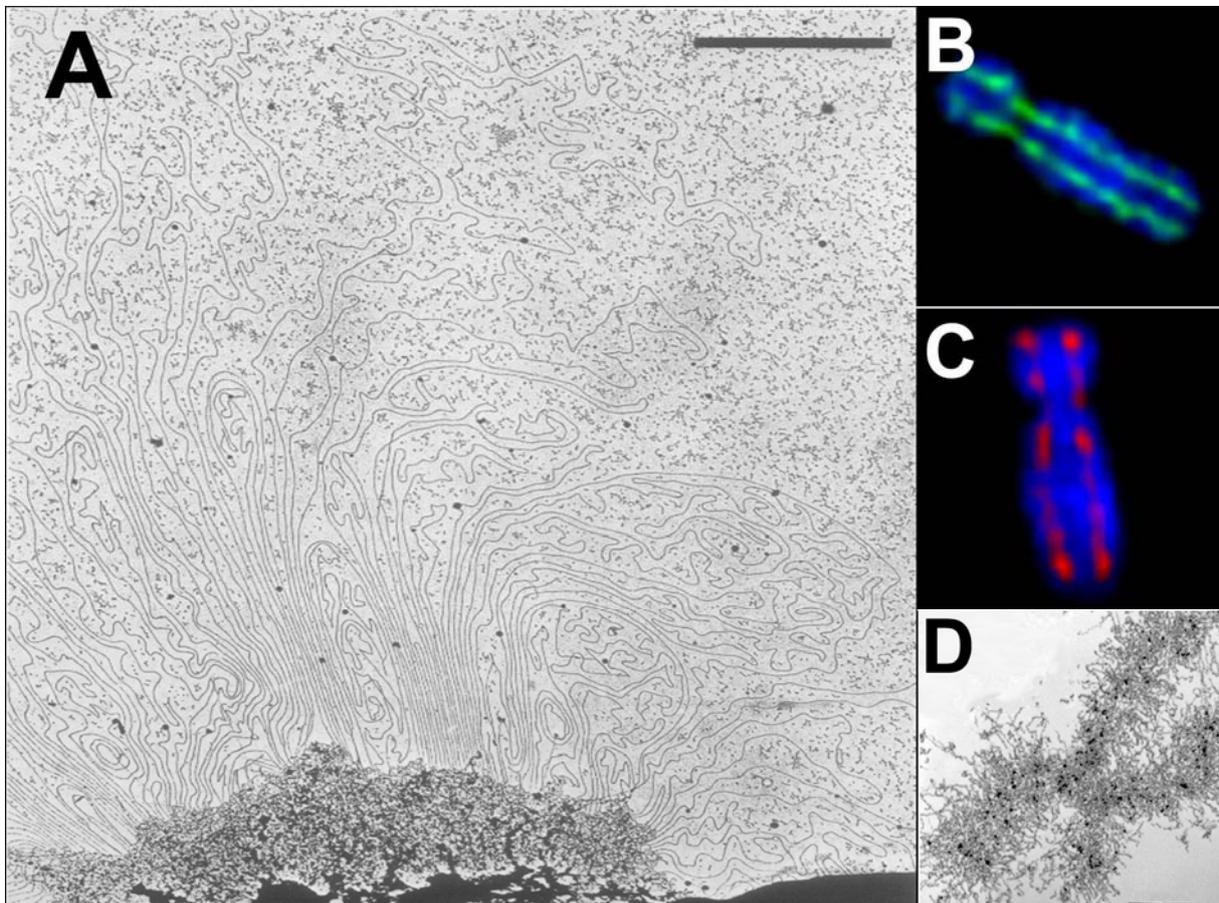


Abb. 1.1.2.1.2: Das Loop-Modell zur Chromosomenkondensation

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Histone-depletierten Chromosoms. Die DNA ist in großen Schlaufen an das Proteingerüst angeheftet (aus Paulson and Laemmli, 1977). Der Größenstandart entspricht 2 μ m. (B) Immunfluoreszenzfärbung von Topoisomerase II α (grün) auf einem humanen Metaphasechromosom (blau). (C) Immunfluoreszenzfärbung von hBar (rot), einem Bestandteil von Condensin, auf einem humanen Metaphasechromosom (blau). (D) Immunoelektronenmikroskopische Aufnahme eines Metaphasechromosoms. Angefärbt ist das zentral liegende hBar Protein (schwarze Punkte), ein Bestandteil von Condensin. Der Bar entspricht etwa 1 μ m (B,C,D aus Maeshima et al., 2005).

1.1.2.2 Färbung von Metaphasechromosomen

Die menschlichen Chromosomen unterscheiden sich untereinander in ihrer Größe und der Lage des Centromers. Doch diese Unterschiede reichen nicht aus, um alle Chromosomen eindeutig identifizieren und ein Karyogramm erstellen zu können. Mit Hilfe der Bandentechnik ist dagegen eine sehr gute Differenzierung möglich. Es gibt verschiedene Färbemethoden um Bandenmuster zu erzeugen. Die zwei gängigsten Techniken sind wohl die der G- bzw. der R-Bänderung.

Für die G-Bänderung werden die Chromosomen vor der Färbung kurz mit Trypsin anverdaut. Der verwendete Farbstoff Giemsa interagiert sowohl mit der DNA wie auch mit assoziierten Proteinen. Die entstehenden, dunklen Banden bezeichnet man als G-positive Banden, die hellen Bereiche sind G-negative Banden. Die Abbildung 1.1.2.2 (B) zeigt ein Karyogramm einer menschlichen Metaphase, das mittels der G-Bänderung angefertigt wurde.

Bei der R-Bänderung sind dagegen alle Banden dunkel gefärbt, die G-negativ sind, daher stammt die Bezeichnung „R“ für reverse Banden. Hier werden die Chromosomen vor der Giemsa-Färbung durch Erhitzen in einer Salzlösung teilweise denaturiert. Die Temperatur wird dabei so gewählt, dass nur die besonders AT-reiche DNA denaturiert (A=T haben nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen und benötigen so weniger Energie zur Denaturierung als C \equiv G) und damit dem Farbstoff unzugänglich gemacht wird.

Die Auflösung dieser so entstehenden Bandenmuster hängt vom Grad der Kondensierung der mitotischen Chromosomen ab. Der Kondensierungsgrad ist normalerweise relativ hoch, da für die Herstellung von Chromosomenpräparaten oft Mitosegifte wie Colcemid oder Nocodazol verwendet werden, die einen Metaphase-Arrest bewirken. So wird die Ausbeute an mitotischen Zellen für die Präparation zwar erhöht, allerdings liegen die in der Metaphase arretierten Chromosomen auch in einer hohen Kondensierung vor. Die normale Auflösung liegt zwischen 300 bis 800 Banden (Craig and Bickmore, 1993). Das ISCN (International System for Chromosome Nomenclature) hat standardisierte Bandenmuster und entsprechende Nomenklaturen für menschliche Metaphasenchromosomen für die Auflösungsstufen von etwa 400, 550 und 850 Banden festgelegt (Harnden, 1985). Prophase-Chromosomen zeigen allerdings eine weitaus höhere und damit bessere Auflösung. Bei Präparationen mit synchronisierten Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung in der Prophase befanden, konnten bis zu 2000 Banden nachgewiesen werden (Yunis, 1981).

Der molekulare Mechanismus der Bandenfärbung ist bislang noch nicht verstanden. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Farbintensität der R- und G-Banden ist das Modell nach Saitoh und Laemmli (siehe Abbildung 1.1.2.2 A). Es basiert auf dem Loop-

Modell der Chromosomenkondensierung (siehe Abschnitt 1.1.2.1). Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass die DNA (in Form der 30nm Fiber) mittels bestimmter Bindemotive, den SARs (scaffold attachment regions) an ein Proteingerüst, dem scaffold, angeheftet wird. Das Scaffold ist ein Komplex aus verschiedenen Proteinen, seine genaue Zusammensetzung ist bislang noch nicht bekannt. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass sowohl Codensin wie auch Topoisomerase II am Aufbau des Scaffolds beteiligt sind (Maeshima and Laemmli, 2003; siehe auch Abschnitt 1.1.2.1). Die SARs sind sehr AT reiche Abschnitte auf der DNA (Kipp et al., 2000; Laemmli et al., 1992). Die DNA-Sequenzen der R-Banden enthalten weniger SARs als die Sequenzen der G-Banden, was dazu führt, dass die entstehenden „R-loops“ größer und lockerer gepackt an dem Proteinrückgrat angeordnet sind als die „G-loops“. Zusätzlich sind die DNA Abschnitte, die mit G-Banden assoziiert sind, im Metaphasechromosom durch weitere helikale Windungen des scaffolds noch dichter kondensiert. Giemsa ist ein Farbstoff der eine hohe Affinität zu AT reichen Sequenzen hat. Die inhomogene Färbung der Metaphasechromosomen kommt nach diesem Modell also durch den unterschiedlichen SAR Gehalt und damit auch den unterschiedlichen Grad der Kondensierung einzelner chromosomaler Domänen zustande (Saitoh and Laemmli, 1994).

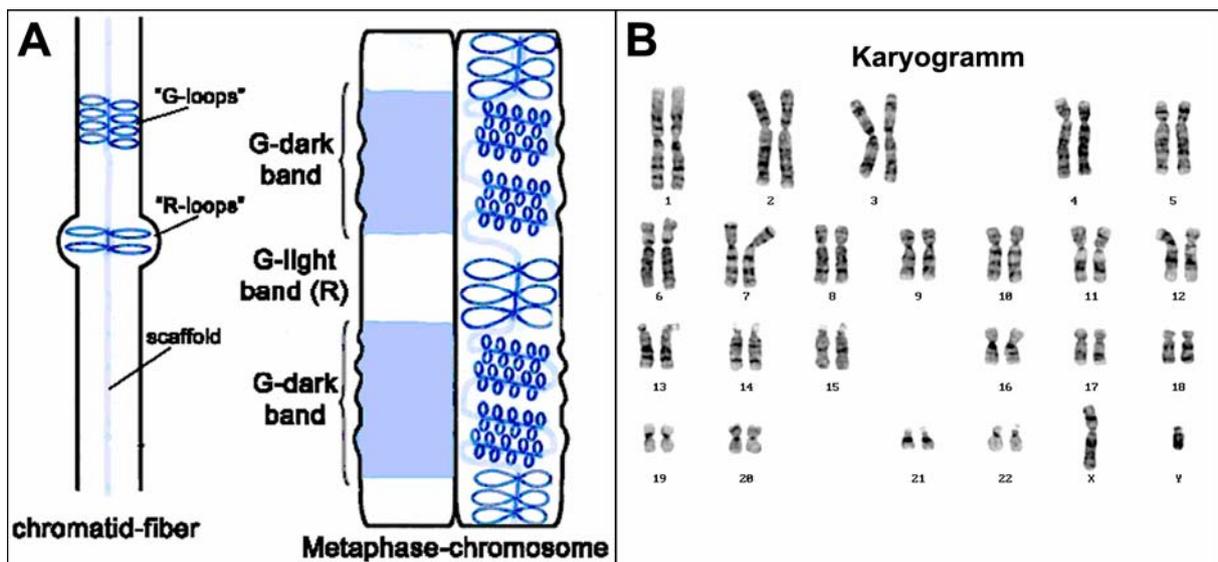


Abb. 1.1.2.2: R- und G-Bandenmuster auf Metaphasechromosomen

(A) Modell nach Saitoh und Laemmli (1994). Die DNA Sequenzen der G-Banden haben mehr SARs als die der R-Banden. Diese SARs sind AT reiche Bindemotive, die ein Anheften der DNA an ein Proteingerüst bewirken. Die dadurch entstehenden „R-loops“ sind größer und weniger stark gepackt als die „G-loops“. Zusätzlich sind die G-Banden Domänen im Metaphasechromosom stärker kondensiert als die R-Banden Domänen. Giemsa ist ein DNA-Farbstoff, der bevorzugt AT reiche Sequenzen anfärbt. Die höhere Farbtintensität der G-Banden lässt sich durch den höheren Gehalt an SARs und damit auch durch den höheren Kondensierungsgrad der DNA Abschnitte erklären.

(B) Karyogramm einer männlichen menschlichen Metaphase (XY). Die Chromosomen sind nach ihrer Größe und Lage des Centromers sortiert. Die G-Bänderung macht die eindeutige Identifizierung der einzelnen Chromosomen möglich.

1.1.2.3 Eigenschaften von R- und G-Banden

Die R-Banden und G-Banden unterscheiden sich wesentlich in ihren Eigenschaften. Das fängt bereits bei der Basenzusammensetzung der DNA an. G-Banden sind im Durchschnitt AT-reicher, während die R-Banden dagegen mehr GC-reiche Sequenzen aufweisen (Craig and Bickmore, 1993). Das konnte auch durch Hybridisierungsexperimente mit menschlichen Isochoren nachgewiesen werden (Saccone and Bernardi, 2001). Isochore sind Segmente mit gleichem GC-Gehalt. Das menschliche Genom lässt sich mittels eines Dichtegradienten bei der Ultrazentrifugation in fünf Isochore aufsplitten: es gibt zwei GC-arme Isochore (L1 und L2) und drei GC-reiche Isochore (H1, H2 und H3). Es konnte gezeigt werden, dass die GC-reichsten Fraktionen H3 und H2 bei einer Hybridisierung mit den R-Banden kolokalisieren, während das GC-ärmste Isochor L1 ausschließlich mit den am intensivsten gefärbten G-Banden hybridisierten.

Die R-Banden enthalten auch viele CpG-Inseln, die oft im Zusammenhang mit den so genannten Haushaltsgenen auftreten (Larsen et al., 1992). Diese essentiellen Gene werden in allen Arten von Geweben benötigt und sind damit normalerweise überall transkriptionell aktiv. G-Banden beinhalten dagegen mehr gewebsspezifische Gene, die in dem meisten Zelltypen inaktiv sind. Durch diese recht deutliche Trennung von aktiven Genen auf den R-Banden und den meist inaktiven Abschnitten auf G-Banden lässt sich auch der insgesamt höhere Histonacetylierungsgrad der R-Banden erklären, da die Acetylierung der Histone eine der Voraussetzungen für die Aktivierung von DNA-Sequenzen ist (Craig and Bickmore, 1993; siehe auch Abschnitt 1.2.2.2).

Insgesamt lässt sich auch beobachten, dass die R-Banden wesentlich genreicher sind als die G-Banden. Etwa 80% aller Gene werden bislang den R-Banden zugeordnet, während auf die G-Banden nur etwa 20% aller Gene entfallen (Craig and Bickmore, 1993; Larsen et al., 1992). Damit geht natürlich auch eine höhere Gendichte der R-Banden im Verhältnis zu den G-Banden einher.

Es konnte gezeigt werden, dass das R-Banden-Material insgesamt früher in der S-Phase repliziert als G-Bandenmaterial (Craig and Bickmore, 1994; Drouin et al., 1991; Ferreira et al., 1997; Zink et al., 1999). Eine Doppelmarkierung der DNA während der frühen und mittleren S-Phase mit zwei verschiedenen, halogenierten Nukleotiden (CldU und JdU) führt bei der späteren Detektion von mitotischen Zellen zu einem Bandenmuster, das dem der R- und G- Bänderung nahezu entspricht (Schermelleh et al., 2001; Zink et al., 1999). Ein Zusammenhang zwischen der Replikationszeit und der Zuordnung zu einer R- bzw. G-Bande ist allerdings nicht zwingend, es gibt in verschiedenen Zelltypen immer wieder Ausnahmen. So hängt die Replikationszeit einer DNA-Sequenz offensichtlich unter anderem auch von der Aktivität der enthaltenen Genloci ab: aktive Bereiche werden normalerweise früher repliziert als inaktive Bereiche (Dimitrova and Gilbert, 1999; Selig et al., 1992; White et al., 2004; Williams et al., 2006; Woodfine et al., 2004). So kann sich beispielsweise das Replikationsverhalten einer G-Bande, die ein gewebsspezifisches Gen enthält, in dem entsprechenden Gewebe, indem dieses Gen angeschaltet ist, zeitlich drastisch ändern. Doch nicht nur das Timing des Starts der Replikation, auch die Replikationsgeschwindigkeit der Bandentypen kann unterschiedlich sein. Es konnte gezeigt werden, dass das Tempo, mit der

neue DNA synthetisiert wird, in der mittleren S-Phase deutlich sinkt, wenn die Replikationsgabel von einer R-Bandenregion auf eine G-Bandenregion wandert (Takebayashi et al., 2005).

Die Banden unterscheiden sich auch durch die in ihnen enthaltenen interspersed elements. SINE's wie die Alu-Sequenz sind relativ GC-reich, und finden sich auch dementsprechend hauptsächlich in R-Banden, während die GC-ärmeren LINE's, wie L1, in den G-Banden angereichert sind (Korenberg and Rykowski, 1988). Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Hybridisierung mit Alu-FISH-Sonden auf menschlichen Metaphasen auf den Chromosomen ein Bandenmuster erzeugt werden konnte, dass dem der G-Bänderung nahezu perfekt entspricht (Bolzer et al., 2005).

Unterschiedliches Verhalten konnte schließlich auch noch für die Kondensation der beiden Bandentypen in der Mitose beobachtet werden. Die G-Banden kondensieren früher und insgesamt wohl auch stärker als die R-Banden. Diese stärkere Kondensierung der G-Banden bleibt in manchen Bereichen wohl auch über die Mitose hinaus erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte G-Bereiche erst in der mittleren S-Phase dekondensieren um eine Replikation zu ermöglichen (Camargo and Cervenka, 1982; Craig and Bickmore, 1993). Das bestätigt auch wieder die Beobachtung, dass in G-Banden-Material viele inaktive Sequenzen zu finden sind.

Die folgende Tabelle soll noch mal einen Überblick über die wichtigsten charakteristischen Eigenschaften von R- und G-Banden bieten:

Tabelle 1.1.2.3: Überblick über Eigenschaften von R- und G-Banden

G-Banden	R-Banden
relativ A=T reich	relativ G=C reich
geringe Gendichte	hohe Gendichte
etwa 20% aller Gene	etwa 80% aller Gene
vor allem gewebsspezifische Gene	viele housekeeping Gene
kondensieren früh	kondensieren spät
replizieren spät	replizieren früh
geringere Histonacetylierung	höhere Histonacetylierung
reich an LINEs	reich an SINEs

1.1.3 Chromosomen in der Interphase: Chromosomenterritorien

1.1.3.1 Geschichte

Wie im Abschnitt 1.1.2 beschrieben, zeigen Metaphasechromosomen in Bezug auf ihre äußere Form und ihr Bandenmuster eine in allen Zelltypen hoch konservierte und strikte Organisation. Diese im Lichtmikroskop gut beobachtbaren Strukturen lösen sich jedoch nach der Zellteilung im neu entstehenden Zellkern im Zuge ihrer Dekondensierung auf und sind

selbst im Elektronenmikroskop nicht mehr als individuelle Einheiten erkennbar. Obwohl bereits Ende des 19. bzw. Anfang des 20. Jahrhunderts von Carl Rabl und Theodor Boveri postuliert wurde, dass die Chromosomen auch während der Interphase als strukturelle Einheiten erhalten bleiben und distinkte Territorien einnehmen (Cremer, 1985), wurde lange Zeit angenommen, dass die 46 humanen Chromosomen, mit Ausnahme des auf ihnen enthaltenen Heterochromatins, zu Beginn der Interphase vollständig dekondensieren und sich die verschiedenen relaxierten DNA-Moleküle wie Spaghetti auf einem Teller im Zellkern vermischen (Review zu dieser Ansicht: Wischnitzer, 1973). Erste konkrete Hinweise für die Existenz von Chromosomenterritorien (CTs) konnten Anfang der 80er Jahre durch die Analyse chromosomaler Schäden nach der gezielten UV-Bestrahlung kleiner Abschnitte der Zellkerne erbracht werden (Cremer et al., 1982a; Cremer et al., 1982b). Würde im Zellkern eine Vermischung der verschiedenen chromosomalen DNA-Moleküle stattfinden, wäre eine weite Verbreitung der Strahlungsschäden auf viele Chromosomen zu erwarten gewesen. Die der Zelle zugefügten Schäden waren jedoch im Wesentlichen auf wenige Metaphasechromosomen beschränkt. Mitte der 80er Jahre konnte schließlich mit Hilfe der FISH Technik (Fluoreszenz In Situ Hybridisierung, siehe Abschnitt 2.8) erstmals eindeutig gezeigt werden, dass jedes Chromosom auch im Interphasezellkern ein distinktes, abgrenzbares Volumen einnimmt (Lichter et al., 1988; Manuelidis, 1985; Pinkel et al., 1986; Rappold et al., 1984; Schardin et al., 1985). Damit war eine wichtige Voraussetzung für die weitere, intensive Untersuchung der Zellkernarchitektur geschaffen (Übersichtsartikel zur Historie der Entdeckung der CTs: Cremer and Cremer, 2006).

1.1.3.2 Räumliche Anordnung der CTs im Zellkern

Die CTs zeigen eine von der Gendichte abhängige radiale Anordnung im Zellkern. Das konnte zuerst für die humanen Chromosomen 18 und 19 gezeigt werden. Diese Chromosomen unterscheiden sich nur unwesentlich in ihrer Größe, dafür deutlich in ihrem Gengehalt: Das 76,2 Mb große Chromosom 18 ist mit durchschnittlich 5,4 Genen pro Mb eines der genärmsten im menschlichen Genom, während das 64 Mb umfassende Chromosom 19 mit einer Gendichte von 27,5 Mb das genreichste menschliche Chromosom ist (www.ensembl.org). Es konnte mit Untersuchungen an humanen Lymphozyten gezeigt werden, dass sich das genarme Chromosom 18 bevorzugt in der Kernperipherie aufhält, während das genreiche Chromosom 19 überwiegend im Inneren des Zellkerns gefunden wurde (Cremer et al., 2001b; Croft et al., 1999; siehe auch Abbildung 1.1.3.2 A). Diese Anordnung konnte ebenfalls für eine Reihe weiterer menschlicher Zelltypen sowie für verschiedene Krebszelllinien gezeigt werden (Cremer et al., 2003). Diese von der Gendichte abhängige, radiale Anordnung der CTs im Zellkern konnte nicht nur im Prinzip für alle übrigen humanen Chromosomen bestätigt werden (Boyle et al., 2001; Cremer et al., 2001b), sondern auch für subchromosomale Segmente gezeigt werden. So wurde beschrieben, dass translozierte Domänen derivativer Chromosomen nahezu die gleiche radiale Position im Zellkern einnehmen wie die entsprechenden nicht rearrangierten, normalen Chromosomen (Cremer et al., 2003; Croft et al., 1999). Eine ebenfalls gleiche radiale Anordnung konnte sogar für homologe Chromosomensegmente verschiedener Spezies der Primaten beobachtet

werden, die deutliche Rearrangements in ihren Karyotypen zeigen (Neusser et al., 2007; Tanabe et al., 2002b). Diese evolutionäre Konservierung einer von der Gendichte abhängigen, radialen Anordnung der CTs im Nukleus über etwa 30 Millionen Jahre ist ein Hinweis auf ihre wahrscheinlich hohe, funktionelle Bedeutung für den Zellkern.

In den sehr flachen, ellipsoid geformten Zellkernen der humanen Fibroblasten ließ sich eine so strikte, von der Gendichte abhängige Anordnung bislang nicht nachweisen. Tatsächlich zeigten mehrere Studien, dass hier die Chromosomengröße offensichtlich eine wichtigere Rolle für die Anordnung des Chromatins in den Nuklei spielt (Bolzer et al., 2005; Cremer et al., 2001b; Croft et al., 1999). Nur für zyklierende Zellen konnte eine internere Position des humanen Chromosoms 19 im Vergleich zum Chromosom 18 gefunden werden, in ruhenden Zellen (G₀-Phase) war ein solcher Unterschied nicht zu beobachten (Bridger et al., 2000). Mit einem Nachweis der Alu-Sequenzen, die bevorzugt in genreichen Sequenzen zu finden sind, konnte allerdings gezeigt werden, dass sich diese Sequenzen im Inneren der flachen Zellkerne anhäufen, während um den Zellkernrand eine Alu-Sequenz-freie Schale aus genarmen Chromatinmaterial existiert (Bolzer et al., 2005). Dies lässt zumindest auf eine Koexistenz einer von der Gendichte abhängigen Ordnung in diesem Zelltyp schließen. Die Abbildung 1.1.3.2 B zeigt eine 3D Rekonstruktion eines humanen Fibroblasten, dessen Alu-Sequenzen mittels spezifischer FISH-Sonden nachgewiesen wurden.

Dass die CTs im Zellkern eine nicht zufällige, radiale Anordnung zeigen, ist allgemein anerkannt. Die Frage nach spezifischen Nachbarschaften zwischen CTs wird dagegen noch kontrovers diskutiert. In einer aktuellen Studie (Bolzer et al., 2005) konnten keine speziellen Nachbarschaften zwischen bestimmten CTs in humanen Fibroblasten gefunden werden. Hierzu wurden alle 23 homologen Chromosomenpaare simultan mittels Multicolor-FISH angefärbt und die Winkel zwischen den Intensitätszentren zweier CTs und dem Zellkernmittelpunkt gemessen. Kleine Winkel deuten auf eine enge Nachbarschaft der entsprechenden CTs hin, während große Winkel zeigen, dass die vermessenen CTs keinen räumlichen Kontakt miteinander haben. Gemessen wurden die Winkel zwischen allen homologen und 30 heterologen Chromosomenpaaren. In beiden Fällen wurden für alle Paare Winkel von 1°-3° (Minimum) bis 172°-180°(Maximum) gemessen, der Mittelwert lag ebenfalls für alle Paare zwischen 80° und 100°. Dieser große Intervall und die Mittelwerte um 90° zeigen deutlich, dass keine festen Regeln für die Nachbarschaft von CTs besteht, diese scheint zufällig zu sein. Eine Studie, die in humanen Lymphozyten nach Bestrahlung die Translokationshäufigkeit zwischen Chromosomen analysierte, kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die direkten Nachbarschaften der CTs zufällig ist (Cornforth et al., 2002).

Auf der anderen Seite zeigen die Zellen einiger bestimmter Krebsarten (z.B. bestimmte Leukämien, Lymphome und/oder spezielle Sarkome) spezifische Translokationen zwischen ganz bestimmten Chromosomen (Elliott and Jasin, 2002; Mitelman, 2000; Rowley, 1998). So ist zum Beispiel für das Burkitt-Lymphom eine Translokation zwischen Chromosom 8 und 14 typisch, bei der das myc Gen (8q24) in das Gen für die schwere Kette des Immunglobulins (IGH, 14q21) versetzt wird, was zu einer Überexpression von myc in B-Zellen führt (Boxer and Dang, 2001). Da das Zustandekommen von Translokationen den engen physischen Kontakt zweier Chromosomen voraussetzt, liegt eine enge, nukleäre Nachbarschaft der an solchen, speziellen Translokationen beteiligten Loci nahe, zumindest innerhalb der

betroffenen Zelltypen. Für das bereits erwähnte Burkitt-Lymphom konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das *myc*- und das *IGH*-Gen bereits in normalen Lymphozytenkernen einen signifikant kleineren Abstand zueinander aufweisen, als das *myc*-Gen und verschiedene andere Kontrollgene (Roix et al., 2003). In weiteren Studien konnte dokumentiert werden, dass, abhängig vom untersuchten Zelltyp, bestimmte heterologe Chromosomenpaare häufiger in enger, räumlicher Nachbarschaft zueinander angeordnet sind, als eine reine Zufallsverteilung im Kern zulassen würde. Damit wurde gezeigt, dass die nukleäre Nachbarschaft der Chromosomen zumindest teilweise gewebsspezifisch ist (Parada et al., 2004a). So wurde z. B. je ein Homolog der Chromosomen 12, 14 und 15 in murinen Milzzellen oft in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander gefunden (Parada et al., 2002; siehe auch Abbildung 1.1.3.2 C). Diese Triplet-Anordnung konnten dagegen z.B. im Lungengewebe der Maus nicht nachgewiesen werden (Parada et al., 2004a).

Die Nachbarschaften zwischen den Chromosomenterritorien – ob nun zufällig oder gewebsspezifisch – werden im Zellkern in der frühen G1 Phase etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass das Chromatin während des Ablaufs der gesamten Interphase relativ immobil ist. So bleiben diese Nachbarschaften während eines Zellzyklus erhalten und können sich erst während der nächsten Mitose neu formieren. (Abney et al., 1997; Chubb et al., 2002; Parada and Misteli, 2002; Walter et al., 2003; Zink et al., 1998).

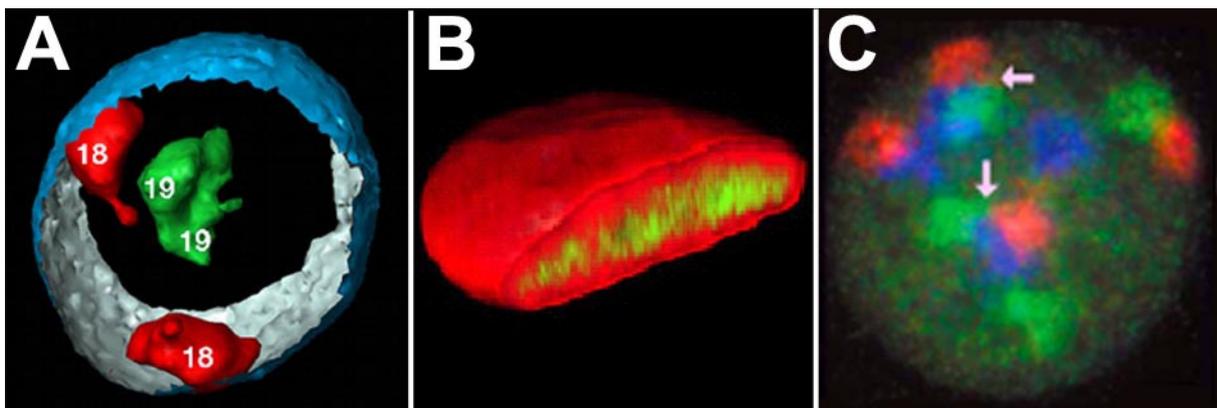


Abb. 1.1.3.2: Räumliche Anordnung der CTs im Zellkern

(A) 3D Rekonstruktion der Kernhülle eines humanen Lymphozyten (blau), zweier CTs #18 (rot) und zweier CTs #19 (grün). Die genreichen Chromosomen 19 sind direkt nebeneinander im Inneren des Zellkerns zu finden, während das genarme Chromosom 18 an der Zellkernperipherie lokalisiert ist. Genommen aus Cremer et al (2001b). (B) 3D Rekonstruktion eines aufgeschnittenen, humanen Fibrozyten vor. Es lässt sich deutlich ein Rahmen aus genarmer DNA an der Zellkernperipherie erkennen. Genommen aus Bolzer et al (2005). (C) Spezifische Nachbarschaften zwischen CTs. Aufnahme (eine konfokale Ebene) einer tetraploiden murinen Milzzelle mit FISH Sonden für CT #12 (rot), CT #14 (blau) und CT#15 (grün). Es sind zwei Triplet-Cluster erkennbar (siehe Pfeile). Diese Anordnung wurde signifikant häufiger in den Zellen beobachtet als eine zufällige Verteilung es erwarten lassen würde. Genommen aus Parada et al (2002).

1.1.3.3 Organisation subchromosomaler Segmente in den CTs

Chromosomenterritorien haben eine sehr variable Morphologie, sie können im Zellkern die unterschiedlichsten Formen aufweisen. Dennoch scheint ihr Aufbau hoch strukturiert zu sein. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass nicht nur die p- bzw. q Arme der

Metaphasechromosomen distinkte, kaum vermischte Bereiche im Territorium einnehmen (Dietzel et al., 1998; siehe auch Abbildung 1.1.3.3), sondern auch Substrukturen, wie einzelne Banden oder Replikationseinheiten, können als eigene Domänen nachgewiesen werden (Lemke et al., 2002; Shopland et al., 2003; Visser and Aten, 1999; Zink et al., 1999).

In ruhenden, humanen Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass die Centromere der Chromosomen bevorzugt an der Oberfläche ihrer Territorien liegen. Die einzige Ausnahme zu dieser Regel bildet das Centromer des inaktiven X-Chromosoms, das hier internalisiert im Territorium gefunden wurde (Clemson et al., 2006; Weierich et al., 2003). Die Abbildung 1.1.3.3 zeigt ein Beispiel für eine solche Anordnung. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Centromere der humanen Lymphozyten sehr häufig an der Peripherie der Zellkerne zu finden sind, und sich dort in kleinen Gruppen gerne zu Clustern zusammenlagern. Im Gegensatz dazu wurden die Telomere als Cluster bevorzugt weiter im Inneren des Zellkerns gefunden (Weierich et al., 2003). Diese lokalisieren zwar auch oft an der Oberfläche ihrer Territorien, sie wurden aber vorwiegend auf der den Centromeren gegenüberliegenden Seite der CTs gefunden (Amrichova et al., 2003).

Das Chromatin der Chromosomenterritorien zeigt bezüglich des Zellkerns eine polare Organisation. Dies konnte zuerst anhand einer Studie beschrieben werden, die sich mit der Verteilung von früh und spät replizierendem Material im Zellkern beschäftigte (Zink et al., 1999). Dazu wurden Zellen in der frühen sowie in der mittleren S-Phase durch Zugabe der Thymidinanaloga CldU bzw. IdU ins Medium doppelt markiert. Die Zellen wurden danach erst nach einigen weiteren Zellteilungen fixiert, so dass in den Nachkommen der ursprünglich markierten Zellen durch die so genannte „random segregation“ der gelabelten DNA nur noch vereinzelte, durch halogenierte Nukleotide markierte Chromosomenterritorien enthalten waren. Durch die zusätzliche Hybridisierung mit entsprechenden chromosomalen paint-Sonden wurden simultan die CTs #13 bzw. #15 identifiziert. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass sich spät replizierendes Material zur Peripherie des Zellkerns hin orientiert, während das früh replizierende Material auf der Seite der CTs zu finden war, die ins Innere der Zellkerne hineinragte. Ein ähnliches Ergebnis wurde für die Verteilung von hoch und niedrig exprimierten Genen beschrieben, hier waren die Gene mit einer hohen transkriptionellen Aktivität weiter innen im Zellkern zu finden als Gene desselben Chromosoms, die eine niedrige transkriptionelle Aktivität zeigten (Lukasova et al., 2002). Diese spezifische, polare Verteilung bezüglich der Expression der Gene konnte allerdings nur für CTs gezeigt werden, die RIDGEs, also Cluster von Genen die in verschiedenen Geweben eine extrem hohe Expression zeigen (für mehr Information über RIDGEs siehe Caron et al., 2001), enthielten. In CTs, deren Gene insgesamt ein eher niedriges Expressionsniveau aufweisen, konnte eine solche Anordnung nicht nachgewiesen werden, hier waren die Gene gleichmäßig über das ganze Territorium verteilt (Lukasova et al., 2002). Auch Saccone et al (2002) konnte diese polare Anordnung von subchromosomalen Segmenten in CTs bestätigen. Bei einer simultanen Hybridisierung der GC-reichsten und GC-ärmsten Segmente der humanen Chromosomen 6, 9 und 12 konnte deutlich gezeigt werden, dass die GC-reichen Abschnitte weiter ins innere des Zellkerns hineinragen als die GC-armen Domänen desselben CTs (für einen Übersichtsartikel siehe Foster and Bridger, 2005; siehe auch Abb 1.1.3.3).

Der Abschnitt 3.5.3 beschäftigt sich ausführlich mit der in dieser Arbeit ebenfalls beobachteten Polarität der Chromosomenterritorien.

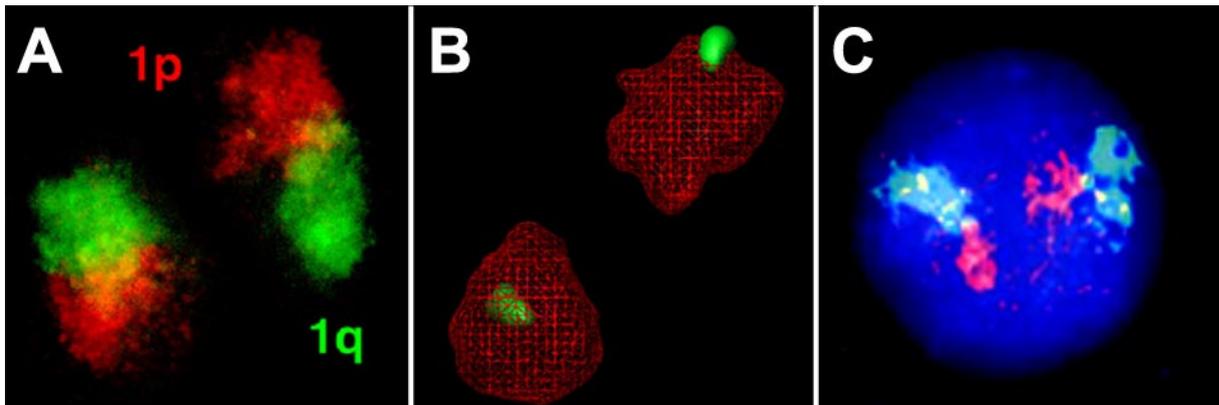


Abb. 1.1.3.3: Organisation subchromosomaler Segmente im CT

(A) Die Chromosomenarme nehmen eigene, distinkte Bereiche im CT ein. Gezeigt ist ein 3D FISH Experiment an humanen Lymphozyten mit Sonden für 1p (rot) und 1q (grün). Genommen aus Dietzel et al (1998). (B) 3D Rekonstruktion der beiden X-Chromosomenterritorien (rot) und ihren Centromeren (grün) einer weiblichen, humanen Fibroblastenzelle. Im aktiven X-Chromosom (oben) ist das Centromer an der Peripherie des CTs lokalisiert, während es beim inaktiven X-Chromosom (unten) intern im CT liegt. Genommen aus Weierich et al (2003). (C) Polare Organisation der CTs. 2D FISH Experiment an humanen Lymphozyten mit Sonden für das gesamte CT #9 (grün) und der extrem GC-reichen Region 9p24 (rot), die deutlich weiter ins Innere des Zellkerns hineinragt als das übrige CT #9. Genommen aus Saccone et al (2002).

1.1.3.4 Positionierung von aktiven Genen in CTs: Vom ICD Modell zum CT-IC Modell

Ein ebenfalls immer noch sehr kontroverses Thema ist die Positionierung der Gene in Chromosomenterritorien. In einer frühen Arbeit zu diesem Thema wurden aktive Gene an der Oberfläche von CTs gefunden, während nicht codierende Sequenzen im Inneren des CTs nachgewiesen wurden (Chevret et al., 2000; Kurz et al., 1996). Dies passte gut zum damals aktuellen „Interchromosome Domain Modell“ (ICD Modell), das davon ausging, dass CTs eine definierte, relativ glatte Oberfläche besitzen und durch eine Interchromosom Domäne klar voneinander abgegrenzt sind. Diese Interchromosom Domäne besteht aus einem weit verzweigten Netz aus kleinen Gängen und Kanälen, das sich, ausgehend von den Kernporen zwischen den CTs durch den ganzen Zellkern erstreckt. Die aktiven Gene der Chromosomen sind nach dem ICD Modell an der Oberfläche der CTs lokalisiert, wo sie Zugang zu den, sich in der Interchromosom Domäne aufhaltenden Proteinen haben. Dazu gehören Faktoren der Transkriptionsmaschinerie, Faktoren für die DNA-Reparatur, für das Splicing der RNA oder auch für die Replikation. Das Innere der CTs ist nach dem ICD Modell für diese Faktoren unzugänglich (Cremer et al., 1993; Zirbel et al., 1993). Dazu passend konnten Dietzel et al (1999) zeigen, dass die Lage bestimmter Gene im CT von ihrer Aktivität abhängt. So wurde das X-chromosomale ANT2 Gen (Xq24-25, unterliegt der X-Inaktivierung) im CT des aktiven X Chromosoms an der Oberfläche gefunden, während es beim inaktiven X-Chromosom weiter im Inneren des Territoriums gefunden wurde.

Erste Hinweise für die Existenz der Interchromosom Domäne kamen von Versuchen mit in Säugerzellen überexprimierten Vimentinproteinen, denen durch das Anfügen eines NLS

(nuclear localization signal) der Zugang in die Zellkerne ermöglicht wurde. Es konnte beobachtet werden, dass das Vimentin fibrilliäre Strukturen ausbildete, die den Zellkern netzartig durchzogen (Herrmann et al., 1993). Es wurde postuliert, dass die Vimentinfibern dem Verlauf der Interchromosom Domäne folgen, und diese damit zumindest teilweise darstellen (Bridger et al., 1998; Reichenzeller et al., 2000). Es konnte auch gezeigt werden, dass verschiedene Proteine, die laut ICD Modell in der Interchromosom Domäne zu finden sind, mit den Vimentinfibern kolokalisieren, was ebenfalls dafür spricht, dass sich das Vimentin in den Kanälen der Interchromosom Domäne erstreckt (Richter et al., 2005).

Weitere Forschungsergebnisse machten allerdings deutlich, dass das ICD-Modell eine zu vereinfachte Sicht auf die Organisation des Zellkerns bot. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass RNA-Transkripte überall im CT hergestellt werden und nicht nur an ihrer Oberfläche zu finden sind (Verschure et al., 1999), und elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten deutlich, dass einzelne Kanäle der Interchromosom Domäne auch durch einzelne CTs hindurch laufen (Dehghani et al., 2005; Visser et al., 2000). Desweiteren konnte mit verschiedenen Beispielen gezeigt werden, dass auch transkriptionell hoch aktive Gene im Inneren der CTs lokalisiert sein können (Bartova et al., 2002; Dundr and Misteli, 2001; Mahy et al., 2002b). Diese Beobachtungen führten unter anderem zur Entwicklung des CT-IC Modells (Übersichtsartikel: Cremer et al., 2004a; Cremer and Cremer, 2001a), demnach die einzelnen CTs von einem Netz aus Kanälen des Interchromatin Compartments (IC) durchzogen werden und so eine schwammartige Struktur aufweisen. In einer aktuellen Studie konnten die Kanäle und Verzweigungen des Interchromatin Compartments deutlich im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden. Durch eine Behandlung der Zellen mit einem hyper-osmolaren Medium wurde eine starke Kondensierung des Chromatins herbeigeführt („hyper-condensed chromatin“). Dadurch wurde das Netzwerk der Kanäle des IC soweit vergrößert, dass Aufnahmen am Lichtmikroskop ausreichten, um Teile des komplexen Systems sichtbar zu machen. Der Vorgang der Hyper-Kondensierung ist reversibel und wiederholbar. Die entstehenden Muster des jeweils pro Zyklus hyper-kondensierten Chromatins weisen große Ähnlichkeit miteinander auf, was für eine hohe und fixierte Ordnung des ICs im Zellkern spricht (Albiez et al., 2006).

Am Übergang zwischen dem IC und den subchromosomalen Domänen befindet sich die so genannte Perichromatin Region (PR). Sie wurde in elektronmikroskopischen Studien als enger, aus dekondensierten Chromatinschlaufen bestehender Grenzbereich an der Oberfläche chromosomaler Strukturen definiert. Hier finden nach dem CT-IC Modell alle relevanten nukleären Vorgänge wie Transkription, Splicing, Reparatur oder auch Replikation statt (Fakan, 2004a; Fakan, 2004b). Nach dem CT-IC Modell können aktive Gene also nicht nur an der Oberfläche sondern auch im Inneren der CTs liegen, solange sie Zugang zum IC bzw. zur PR haben.

Die CTs an sich bestehen laut CT-IC Modell aus Chromatin Untereinheiten, die einige hundert kb bis zu ein paar Mbs umfassen können, die so genannten 1Mb Domänen. Sie entsprechen damit den Replikationsfoci (Berezney et al., 2000; Jackson and Pombo, 1998), die bei „Pulse-label Experimenten“ mit Thymidinanaloga während der S-Phase entdeckt wurden (Ma et al., 1998; Nakamura et al., 1986). Es konnte gezeigt werden, dass diese Replikationsfoci, sobald sie einmal während ihrer Replikation in der S-Phase markiert

wurden, als stabile Einheiten während des gesamten Zellzyklus strukturell erhalten bleiben und sogar noch nach einigen Zellteilungen in den Tochterzellen nachgewiesen werden können (Berezney et al., 2000; Koberna et al., 2005). Der Aufbau der 1Mb Domänen ist bisher rein spekulativ, doch wird im CT-IC Modell davon ausgegangen, dass diese Chromatineinheiten wiederum aus einer Ansammlung kleinerer DNA-Schlaufen bestehen. Diese Schlaufen beinhalten etwa zwischen 50 und 200kb DNA und werden daher die 100kb Domänen genannt. Sie lagern sich rosettenartig zur 1Mb Domäne zusammen. Die individuellen 100kb und 1Mb Domänen im Zellkern können unterschiedlich konfiguriert sein, je nach dem transkriptionellen Status ihrer enthaltenen Gene oder auch ihrer Gendichte. Diese Eigenschaften könnten einen Einfluss auf den Grad der Kondensierung haben, sowie auf weitere epigenetische Modifikationen des Chromatins, wie DNA-Methylierungen oder spezielle Histonmodifikationen. Im Abschnitt 1.2 wird genauer auf die epigenetische Regulierung der Transkription eingegangen.

Mit einer kürzlichen Veröffentlichung von Branco et al (Branco and Pombo, 2006) brannte die Diskussion über die Exklusivität der CTs erneut auf. Wurde bislang davon ausgegangen, dass CTs eigene, distinkte Bereiche im Zellkern einnehmen (Cremer and Cremer, 2001a), was gestützt wurde von elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Visser et al., 2000), so zeigten Branco et al mit FISH Experimenten auf ultradünnen Gefrierschnitten (80-150nm) dass große Anteile eines CTs mit Chromatinfasern der benachbarten CTs vermischt sind. Ihre Auswertungen ergaben, dass insgesamt bis zu 30 Prozent des Volumens eines CTs mit den angrenzenden Territorien geteilt werden kann. Sie postulierten aufgrund ihrer Daten ein neues Modell zur Zellkernarchitektur, das ICN Modell (**I**nter**C**hromosomal **N**etwork), was unter Anderem die Existenz eines Interchromatin Compartments ausschließt. Doch dieses Modell lässt sich kaum mit den bereits genannten, vielen verschiedenen experimentellen Daten vereinbaren, die zur Entwicklung des CT-IC Modells geführt haben. Dem zur Folge kommt es nur in sehr limitierten Rahmen zur Vermischung zwischen benachbarten Chromosomenterritorien. Es konnte bislang mehrfach dokumentiert werden, dass bestimmte extrem genreiche und transkriptionell hoch aktive Segmente weit aus ihren Territorien herausragen können (c-myc: Bartova and Kozubek, 2006; Hoxgene: Chambeyron et al., 2005; Region 11p15.5: Mahy et al., 2002a; MHC: Volpi et al., 2000; EDC: Williams et al., 2002). Dieses „looping out“ genannte Phänomen wird im Abschnitt 4.4 ausführlich diskutiert. Laut CT-IC Modell erstrecken sich diese Ausstülpungen in das IC hinein, und können so, einem Kanal des IC folgend, auch in das Volumen eines angrenzenden CTs hineinragen (siehe Abbildung 1.1.3.4). Das CTs auch im direkten Kontakten miteinander stehen können und das Chromatin so im Interphasezellkern ein durchgängiges Netzwerk bildet, konnte in einer aktuellen Studie gezeigt werden (Albiez et al., 2006). Doch wie diese Verbindungsstellen organisiert sind, ob sie zufällig auftreten oder an spezielle DNA Sequenzen gekoppelt sind, und in welchen Grad hier Vermischungen zwischen den Chromatinfibern der sich berührenden Territorien auftreten bleibt noch zu klären.

Die Abbildung 1.1.3.4 zeigt Einzelheiten des CT-IC Modells anhand einer schematischen Zeichnung.

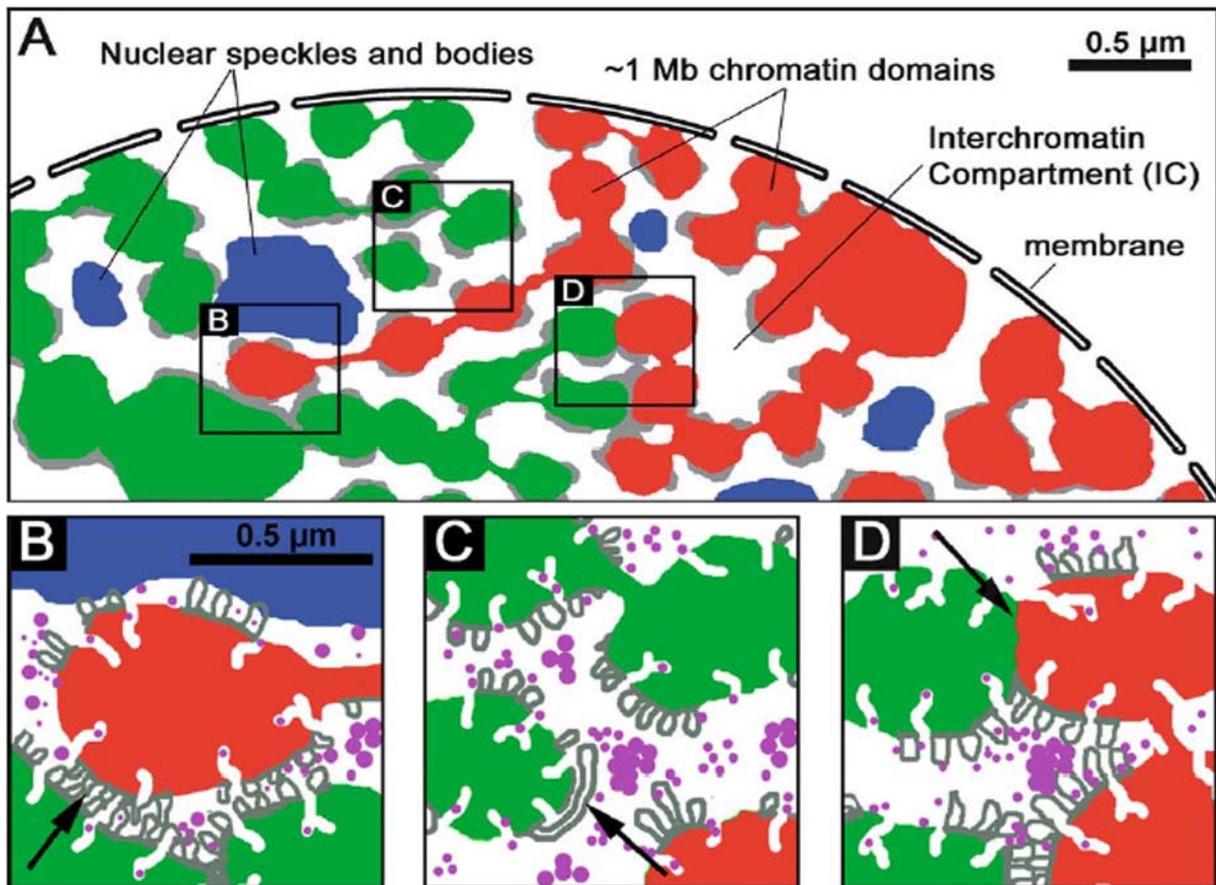


Abb. 1.1.3.4: Das CT-IC Modell (genommen aus Albiez et al., 2006)

(A) Schematische Darstellung eines Ausschnitts aus einem Interphasezellkern. Gezeigt sind die Chromatin Domänen (1 Mb Domänen und höher kondensierte Strukturen) zweier benachbarter CTs (in grün und rot dargestellt), die vom Interchromatin Compartment (IC, weiß) umgeben sind. Im IC eingebettet sind Cluster von Kernproteinen, die so genannten „nuclear bodies“ (blau), die teilweise im direkten Kontakt mit den Chromatin Domänen stehen können (siehe B). Die Perichromatin Region (PR) an der Peripherie der Chromatin Domänen ist in grau dargestellt. (B) Ende einer Ausstülpung („loop“) aus dem roten Territorium, welche, den Kanälen des IC folgend, auch in ein benachbartes CT (grün) hineinragen kann. Lokal dekondensierte Chromatinschleifen mit für die Transkription bereiten Genen bilden die PR (grau). Diese kann in den engen Kanal des ICs in direkten Kontakt mit „nuclear bodies“ (blau) oder auch mit der PR eines benachbarten CTs stehen (siehe Pfeil), um sich die Faktoren der Transkriptions- und Splicingmaschinerie (lila) zu teilen. (C) Ausschnitt aus einem Bereich mit breiten Kanälen des ICs, indem die dekondensierten Chromatinschleifen der PR (grau) frei diffundieren können (siehe Pfeil). So können sich Gene desselben oder auch verschiedener Chromosomen im IC für eine gemeinsam regulierte Transkription zusammenlagern (Phänomen des "Chromosome Kissing", siehe Kioussis, 2005). (D) Direkter Kontakt (siehe Pfeil) zwischen zwei 1 Mb Domänen der benachbarten CTs (grün und rot). In welchem Maß sich hier das Chromatin der beiden CTs vermischt ist noch nicht bekannt.

1.2 Regulation der Transkription

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms zeigte, dass in etwa 200 verschiedenen humanen Zelltypen die Expression von jeweils etwa 35000 Genen reguliert werden muss (Lander et al., 2001; McPherson et al., 2001; Venter et al., 2001). Dass dies ein hohes Maß an Organisation und Ordnung erfordert, liegt auf der Hand. Doch wir sind momentan noch weit

davon entfernt, die Mechanismen und das komplexe Zusammenspiel unterschiedlichster Faktoren, die alle zur transkriptionellen Regulierung der Gene beitragen, zu verstehen. Der folgende Abschnitt soll einen kurzen Überblick auf bislang bekannte Mechanismen der Expressionskontrolle in Säugerzellen geben.

1.2.1 Die Ebene der Gene

Die bislang am Besten verstandene Regulierung der Expression ist die auf der Sequenzebene der DNA. Es gibt eine Reihe von cis-wirkenden Sequenzelementen in der Umgebung eines Gens, die ausschlaggebend für eine funktionelle Transkription sind. Dazu gehört zum Beispiel eine Promotorregion, die dem transkribierenden Proteinkomplex aus RNA-Polymerase, Transkriptionsfaktoren und weiteren Cofaktoren das Andocken an die DNA ermöglicht. Upstream oder downstream vom Gen liegende Enhancer oder Silencer können durch lokale Schlaufenbildung der DNA in direkten Kontakt zum Gen treten und mit ihren gebundenen Cofaktoren fördernd oder hemmend auf die Transkription einwirken (Lewin, 1998).

Viele Gene sind auch in Genclustern angeordnet. Diese Cluster können aus Genen mit eng zusammenhängenden Funktionen bestehen, wie z.B. das Cluster der Histongene oder der Hoxgene. Es gibt aber immer mehr Hinweise darauf, dass sich viele Cluster auch aus Genen zusammensetzen, die zwar funktionell in keinem so direkt erkennbaren Zusammenhang zueinander stehen wie beispielsweise die Hoxgene, dafür aber zur gleichen Zeit exprimiert werden. Das kann zum Beispiel ein bestimmter Differenzierungszustand eines Zelltyps, eine Phase während der Entwicklung des Organismus oder auch nur ein bestimmtes Zeitfenster während der Interphase sein (van Driel et al., 2003). Die Gencluster werden durch spezifische Elemente gemeinsam reguliert – zusätzlich zur Ebene der einzelnen Gene. Diese so genannten LCRs (locus control region) können die Gene ihres Clusters in einen für die Transkription zugänglichen Zustand versetzen. Dafür rekrutieren sie Histonmodifizierende Enzyme, die kondensiertes Chromatin in offene Chromatinfasern umwandeln können (siehe Abschnitt 1.2.2.2). Das bedeutet aber noch nicht, dass die enthaltenen Gene alle auch sofort exprimiert werden, diese Entscheidung hängt immer noch von der Regulierung des individuellen Gens ab (Festenstein and Kioussis, 2000). Weitere regulatorische Elemente, die Isolatoren, liegen zwischen den einzelnen Genclustern und begrenzen die Reichweite der LCRs (Labrador and Corces, 2002; West et al., 2002).

So sehr sich dieses ausgeklügelte System aus cis-wirkenden Sequenzelementen und trans-wirkenden Transkriptions- und Cofaktoren auch für die Feinregulierung der Transkription eignet, es kann nicht die komplette Kontrolle über 35.000 Gene im Zellkern erklären. Eine weitere, höhere Ebene der Regulation ist nötig um die gesamte Expression einer Zelle beherrschen zu können: die Ebene der Epigenetik.

1.2.2 Epigenetische Faktoren der Regulation

Unter der epigenetischen Regulierung der Expression versteht man sämtliche Mechanismen zur Steuerung der Transkription, die nicht direkt im Zusammenhang mit regulatorischen Elementen der DNA-Sequenz stehen (wie Promotoren, Enhancer, Silencer) und auch keine

Veränderung in der Basenabfolge der DNA bewirken. Der Name leitet sich von der griechischen Vorsilbe „έπι-“ ab, die „zusätzlich, darüber hinaus“ bedeutet. Wie bereits im Abschnitt 1.1 beschrieben, liegt die DNA in eukaryontischen Zellen nicht als freie Doppelhelix vor, sondern wird mit Hilfe einiger struktureller Proteine, den Histonen, zu Chromatin verpackt. Dieser Nukleoproteinkomplex bietet eine Vielzahl an Ansatzpunkten für eine epigenetische Regulierung. So ist zum Beispiel ein kondensiertes Chromatinsegment bereits epigenetisch kontrolliert, da kompakte Chromatinfibern eine Anlagerung von Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase erschweren (Beato and Eisefeld, 1997; Kornberg and Lorch, 1992). Eine Umgestaltung des Chromatins in eine offene Struktur begünstigt dagegen die Transkription (Adams and Workman, 1993).

Im Folgenden sollen einige wichtige epigenetische Faktoren vorgestellt werden (für einen Übersichtsartikel zu diesem Thema siehe Espada and Esteller, 2007).

1.2.2.1 Histonvarianten

Ein wichtiger Mechanismus zur Umorganisation der Chromatinstruktur ist das Austauschen eines der Histone des „core particles“ (siehe Abschnitt 1.1) durch Varianten des Proteins. Bislang konnten eine ganze Reihe an Histonvarianten entdeckt werden, nur beim Histon H4 scheint es so etwas nicht zu geben (Gilbert et al., 2005).

Eine in Säugetierzellen häufig auftretende Variation des Histons H3 ist z.B. das Protein CENP-A, das an den Kinetochoren aller aktiven Centromere zu finden ist (Warburton et al., 1997). Nukleosomen, die CENP-A anstelle von H3 enthalten, zeigen eine stabilere Konformation, was wichtig sein könnte, um ein funktionelles Kinetochor zu bilden (Black et al., 2004). Das Protein H2A.Z ist eine essentielle Histonvariante von H2A, die vorzugsweise im pericentromerischen Heterochromatin gefunden wird. Nukleosomen mit H2A.Z zeigen ebenfalls eine veränderte Konformation, Chromatinsegmente mit dieser H2A Variante zeigen eine stärkere intramolekulare Faltung was zu der Bildung von hoch kompakten Chromatinstrukturen führt (Fan et al., 2002). Die H2A Variante MacroH2A wird nur im Territorium des inaktiven X-Chromosoms gefunden. Seine Rolle ist noch nicht geklärt, es wird aber angenommen dass es zur kompakteren Struktur des Xi und Stilllegung der Gene beiträgt (Costanzi and Pehrson, 1998; Gilbert and Ramsahoye, 2005). Die H3 Variante H3.3 wird ausschließlich in transkriptionell aktiven Chromatin gefunden und scheint eine offene Chromatinkonfiguration zu favorisieren (McKittrick et al., 2004).

Diese Beispiele machen deutlich, dass sich die Chromatinstruktur alleine schon durch den Austausch von Histonen deutlich ändern kann.

1.2.2.2 Histonmodifikationen

Jedes Histonprotein besteht aus einem N-terminus, einem C-Terminus und einer mittleren, globulären Domäne. Während die globuläre Domäne im Inneren des Nukleosoms liegt, ragen die C- und N-terminalen Schwänze aus der Chromatinfaser heraus. So sind sie für posttranslationale Modifikationen leicht zugänglich, wie u. A. Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung (alle am N-Terminus) und Ubiquitinierung (am C-Terminus). Diese

Modifikationen haben Einfluss auf die Chromatinstruktur, indem sie die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen den Nukleosomen und der DNA ändern und/oder Bindungsstellen für regulatorische Nicht-Histon-Proteine schaffen (Craig, 2005; Fischle et al., 2003; Gilbert et al., 2005; Peters et al., 2003).

Die reversible Acetylierung von Lysinresten in den N-terminalen Schwänzen aller Histone wird von einer Reihe von Acetyltransferasen katalysiert (HATs = Histone Acetyl Transferase). Ein hohes Level an acetylierten Histonen korreliert mit transkriptioneller Aktivität, während ein abnehmendes Niveau an Acetylierung zur Stilllegung von Genen führt. Das inaktivierte X-Chromosom weist beispielsweise ungewöhnlich wenig Acetylierungen auf (Jeppesen and Turner, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass acetyliertes Chromatin zugänglich für Nukleasen ist, und unter hohen Salzbedingungen nicht kondensiert, im Gegensatz zum nicht acetylierten Kontrollchromatin. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Acetylierungen die lokale Chromatinstruktur öffnen und so das Binden von Transkriptionsfaktoren ermöglichen (Gilbert et al., 2005).

Eine Reihe von Methyltransferasen (HMTs), darunter SUV39, die SET1/SET2 und die EZH Familie, katalysieren eine weitere wichtige Regulationsmöglichkeit, die Methylierungen (für einen Übersichtsartikel siehe Volkel and Angrand, 2007). Die erst kürzlich entdeckten Demethylasen sorgen für eine dynamische Regulierung dieser epigenetischen Modifikation (Iwase et al., 2007; Shi and Whetstine, 2007). Eine weitere Möglichkeit schnell und effizient die Methylierungen der Nukleosomen zu entfernen ist der Austausch von Histonen (Gilbert et al., 2005). Bislang sind Methylierungen an sechs verschiedenen Lysinresten (K) des Histons H3 (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79) und an einem Lysinrest des Histons H4 (H4K20) beschrieben worden. Diese Lysinreste können alle einfach, doppelt oder dreifach methyliert sein und in jedem Zustand unterschiedliche Wirkungen auf das lokale Chromatin haben, was das große Wirkungsspektrum dieser Modifikationen deutlich macht (Rice and Allis, 2001). Einige dieser Modifikationen konnten als typische Marker für Euchromatin bzw. fakultatives oder konstitutives Heterochromatin identifiziert werden. So sind zum Beispiel trimethyliertes H3K9 bzw. H4K20 Kennzeichen für konstitutives Heterochromatin (Kourmouli et al., 2004; Lachner et al., 2003; Peters et al., 2003; Rice et al., 2003), während trimethyliertes H3K27 als Markierung für fakultatives Heterochromatin gilt (Cao et al., 2002; Chadwick and Willard, 2004; Gilbert et al., 2003). Es wird beispielsweise in hohen Mengen im inaktiven X-Chromosomenterritorium gefunden (Gilbert et al., 2003; Plath et al., 2003; Zinner et al., 2005). Im Euchromatin ist die Sache etwas komplexer. Hier weist mehrfach methyliertes H3K4 auf transkriptionell aktive Bereiche hin (Lachner et al., 2003). So konnte in Hühner Erythrozyten gezeigt werden, dass triH3K4 mit transkriptionell aktiven Genen kolokalisiert, während diH3K4 in Bereichen gefunden wurden, die zwar generell für die Transkription zugänglich sind aber noch nicht aktiviert wurden (Schneider et al., 2004). Nur einfach methyliertes H3K9 weist auf Gene im Euchromatin hin, die stillgelegt wurden (Rice et al., 2003). Über die Funktion von methylierten H3K36 und H3K79 ist bislang nur wenig bekannt. In Hefe konnte gezeigt werden, dass methyliertes H3K36 offensichtlich an der transkriptionellen Elongation beteiligt ist (Schaff et al., 2003). Methyliertes H3K79, ein Lysinrest der sich in der globulären Domäne des Histons H3 befindet, konnte an aktiven Loci der V(D)J Rekombination nachgewiesen werden (Ng et al., 2003).

Histone können durch Serin-/Threonin Kinasen auch phosphoryliert werden. Die Funktion dieser posttranslationalen Modifikation ist bislang noch weniger gut verstanden als die der Acetylierung oder Methylierung. Sie scheint jedoch an vielen wichtigen zellulären Prozessen, wie Transkription, DNA Reparatur, Apoptose und mitotische Chromosomenkondensation beteiligt zu sein. Vielleicht dient die Phosphorylierung in allen diesen Prozessen dem gleichen Zweck: eine Änderung der elektrischen Ladung der Histone durch die Übertragung negativ geladener Phosphatgruppen bewirkt eine Öffnung der Chromatinfiber. Nachfolgende Faktoren können so binden, die dann weitere lokale Kondensationen oder Dekondensationen verursachen (Cheung et al., 2000; Gilbert et al., 2005; Wei et al., 1999).

Die Entdeckung der posttranslationalen Modifikation der Histone und ihrer epigenetischen Funktion führte zur Postulierung der „Histone Code Hypothesis“ (Fischle et al., 2003; Strahl and Allis, 2000). Diese Hypothese besagt, dass Gruppen bestimmter Histonmodifikationen („modification cassettes“) zusammenwirken und so bestimmten Proteinen, die einen remodulierenden Effekt auf Chromatin haben, den Zugang zur DNA ermöglichen. Die einzelnen Modifikationen auf demselben oder einem benachbarten Histon sind dabei voneinander abhängig und beeinflussen sich gegenseitig. Die Bildung distinkter euchromatischer oder heterochromatischer Domänen im Zellkern hängt damit zum größten Teil von der lokalen Konzentration und Kombination der verschiedenen modifizierten Nukleosomen ab.

1.2.2.3 Methylierung der DNA

Ein weiterer, grundlegender epigenetischer Faktor zur Kontrolle der Expression ist die Methylierung der DNA Sequenz (für einen Übersichtsartikel siehe Fuks, 2005). Sie führt zur Stilllegung von Chromatinsegmenten, indem Nukleosomen modifizierende Proteine rekrutiert werden. Katalysiert wird die Methylierung von DNA Methyltransferasen (DNMTs), die die Cytosine der dinukleotiden Sequenz CpG erkennen und modifizieren (Bird, 2002; Jones and Takai, 2001). Die Genexpression wird davon auf zwei Arten beeinträchtigt: Zum einen können spezifische DNA bindende Transkriptions- und/oder Cofaktoren aufgrund des methylierten Cytosins nicht mehr an ihre Zielsequenz binden (Watt, 1988). Desweiteren aktivieren bestimmte, methyl-CpG bindende Proteine wiederum spezielle Enzyme, die für epigenetische Modifikationen der Chromatinstruktur verantwortlich sind, wie HDACs und HMTs (Hendrich and Bird, 1998; Nan et al., 1998; Sarraf and Stancheva, 2004; siehe auch Abschnitt 1.2.2.2 Histonmodifikationen).

Wie wichtig die DNA-Methylierung für die funktionelle Kontrolle der Genexpression einer Zelle ist, zeigt die Tatsache, dass Schäden in dieser Regulierung in vielen Fällen zur Entwicklung von Krebs führen kann (Esteller, 2005; Robertson, 2005).

1.2.2.4 Lokalisation im Zellkern

Ein weiterer, wichtiger epigenetischer Faktor zur Expressionsregulierung ist die Lokalisation eines Chromatinabschnitts im Zellkern. Hier ist die Anordnung des Chromatins hoch geordnet. Schon auf dem Level der linearen Sequenzabfolge der DNA lässt sich ein

Ordnungsprinzip erkennen. So zeigt z.B. die Zusammenlagerung verschiedener Gene zu Clustern, dass bereits die Anordnung der Gene alles andere als zufällig ist (Caron et al., 2001; van Driel et al., 2003; Versteeg et al., 2003). Es konnte auch die Existenz chromosomaler Domänen nachgewiesen werden, in denen sich bestimmte, nur in spezifischen Geweben hoch exprimierte Gene zusammenlagern. So wurden beispielsweise sechs chromosomale Domänen identifiziert, deren Gene in der Leber eine 6fach höhere Expression zeigten, als in anderen Geweben (Yamashita et al., 2004). Dies lässt darauf schließen, dass das lineare Genom nicht nur aus einer zufälligen Aneinanderreihung von Genen besteht, sondern einer strukturierten Ordnung folgt.

Die DNA wird in eukaryontischen Zellen mittels Histonen zu Chromatin verpackt, dessen Kondensierungsgrad und Faltungsverhalten von spezifischen, epigenetischen Modifikationen abhängt (siehe vorherige Abschnitte). Durch diese hoch gefalteten Strukturen können Genloci zusammengebracht und unter eine gemeinsame transkriptionelle Regulation gestellt werden, die auf dem linearen Genom weit voneinander entfernt liegen. So konnte beispielsweise in einer aktuellen Studie mittels der neu entwickelten 4C Methode (chromosome conformation capture on chip) gezeigt werden, dass das in fetalen Leberzellen aktive β -Globin Gen mit einer Reihe von cis liegender Loci interagiert, die sogar bis zu einigen 10Mbs weit entfernt auf demselben Chromosom liegen können. Aber auch Interaktionen in trans mit Sequenzen anderer Chromosomen konnten nachgewiesen werden (Simonis et al., 2006).

Wie bereits im Abschnitt 1.1 ausführlich behandelt wurde, ist schließlich auch die räumliche Anordnung des Chromatins im Zellkern nicht zufällig. Es konnte eine Korrelation zwischen der radialen Anordnung der einzelnen CTs mit der Gendichte (Cremer et al., 2001b; Croft et al., 1999) sowie der Größe der Territorien nachgewiesen werden (Bolzer et al., 2005; Cremer et al., 2001b). Auch gewebsspezifische Nachbarschaften zwischen bestimmten CTs wurden beobachtet (Parada and Misteli, 2002; Parada et al., 2004a). Man nimmt inzwischen an, dass diese spezielle, räumliche Anordnung des Chromatins im Zellkern u. A. für die Regulation der Expression eine wichtige Rolle spielt. Der Zellkern unterliegt einer hohen funktionellen Kompartimentierung (Francastel et al., 2000; Lanctot et al., 2007). Es konnten viele verschiedene Domänen innerhalb des Zellkerns identifiziert werden (wie zum Beispiel der Nukleolus, PML bodies, speckles, Cajal bodies, PcG bodies, heterochromatische Bereiche, usw.) und jede hat eine bestimmte Funktion und makromolekulare Zusammensetzung (für einen Übersichtsartikel zu diesem Thema siehe Spector, 2001). Einige dieser Bereiche wirken repressiv auf die Transkription, während andere Domänen die Expression fördern können. So konnte z.B. gezeigt werden, dass während der Lymphozytenentwicklung in der Maus die Verschiebung von Genloci an pericentromerisches Heterochromatin mit der epigenetischen Stilllegung dieser Gene einhergeht (Brown et al., 1997). Transkriptionell aktive Bereiche wurden dagegen oft in unmittelbarer Nähe von Speckles (= eine nukleäre Domäne, die eine Ansammlung von Splicing Faktoren enthält) gefunden (Shopland et al., 2003). So kann die Lage eines Gens im Zellkern ausschlaggebend für seine transkriptionelle Aktivität sein.

Auf diese Weise bildet die Zellkernarchitektur, bestehend aus der nicht zufälligen Anordnung der Gene auf Ebene der linearen DNA-Sequenz, deren, durch epigenetische Modifikationen an DNA und Histonen kontrollierte Kondensierung und Faltung zu CTs, sowie die nicht zufällige Anordnung der CTs im Zellkern, ein kompliziertes Netzwerk zur funktionellen

Regulierung vieler wichtiger nukleärer Prozesse, wie die Transkription, die Replikation oder DNA Reparatur (für Übersichtsartikel zur funktionellen Zellkernarchitektur siehe Foster and Bridger, 2005; Misteli, 2005; Taddei et al., 2004).

1.3 Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)

Bacterial Artificial Chromosomes, kurz BACs genannt, sind E.coli Plasmide, Derivate des F-Faktors. Sie tragen neben einem Selektionsgen für die Transformation des Plasmids in die Bakterienzelle (oft werden hierfür Antibiotikaresistenzen verwendet) auch eine „multiple cloning site“. Diese sehr flexible Insertionsstelle enthält Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme, und ist normalerweise in einem Reportergen integriert. So wird eine Kontrolle über eine erfolgreiche Integration genomischer DNA in das Plasmid gewährleistet. Die Insertgröße von BACs beträgt maximal 300kb. „Copy number control“ Sequenzen sorgen dafür, dass die BACs jeweils nur in 1-2facher Kopienzahl pro Bakterienzelle vorliegen, was eine hohe Stabilität gewährleistet (Lewin, 1998).

Die in dieser Arbeit verwendeten BAC-Klone stammen zum größten Teil aus der Bibliothek RPCI-11. Diese Bibliothek wurde am **Roswell Park Cancer Institute (RPCI)** aus der DNA eines anonymen, männlichen Spenders erstellt. Dafür wurde die genomische DNA in zwei getrennten Ansätzen einmal mit dem Enzym EcoRI und einmal mit dem Enzym MboI verdaut und die so gewonnenen Fragmente in pBACe3.6 bzw. in pTARBACI Vektoren integriert. Die Ligationsprodukte wurden in E.coli DH10B Zellen transformiert. So entstand eine 30-fach redundante Bibliothek, die aus insgesamt 543797 Klonen besteht. Die durchschnittliche Insertgröße beträgt 178kb. Die Klone wurden über Endsequenzierungen, Chromosome walking und/oder Hybridisierungen mit speziellen Markern bestimmten Abschnitten des menschlichen Genoms zugeordnet (Osoegawa et al., 2001). Dabei repräsentieren die Klone der RPCI-Bibliothek das menschliche Genom nahezu lückenlos (Cheung et al., 2001).

Klone haben eine standardisierte Nomenklatur, um sie eindeutig zuordnen zu können. Diese Namen setzen sich aus dem Bibliotheksnamen, aus der Nummer der Mikrotiterplatte, auf der sie zu finden sind, und der entsprechenden Reihen- und Säulenummer auf dieser Mikrotiterplatte zusammen. So wäre der Klon RP11-88C10 beispielsweise in der RPCI Bibliothek, auf der Mikrotiterplatte 88, in Reihe C und Säule 10 zu finden (Osoegawa et al., 2001).

Ein großer Vorteil der BAC-Klone ist, dass ihre Eigenschaften genau definiert werden können, da durch Datenbankrecherche detaillierte Informationen wie die lokale Gendichte, Anzahl und Art der enthaltenen Gene, der GC-Gehalt oder auch die Zuordnung zu einer R- oder G-Bande ermittelbar sind. So eignen sich BAC-Klone hervorragend zur Untersuchung der nukleären Anordnung von Chromatin mit verschiedenen Eigenschaften. Sie ermöglichen eine Analyse der Determinanten, die für die Ordnung der DNA im Zellkern oder z.B. auch für das lokale Faltungsverhalten einzelner subchromosomaler Segmente im entsprechenden Territorium verantwortlich sind.

Ausführliche Listen der in dieser Arbeit verwendeten BAC Klone, sowie eine detaillierte Anleitung zur Datenbankrecherche befinden sich im Anhang.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Metaphasechromosomen in Säugetierzellen haben einen definierten Aufbau bezüglich ihrer äußeren Form und Anordnung ihrer DNA-Sequenzen. Durch Bänderungstechniken (siehe Abschnitt 1.1.2.2) lassen sich verschieden strukturierte, chromosomale Segmente, die R- und G-Banden, darstellen. Diese Banden zeigen deutliche Unterschiede in ihren Eigenschaften, wie zum Beispiel bezüglich ihrer Gendichte, der transkriptionellen Aktivität ihrer Gene, ihres GC-Gehalts, oder auch bezüglich ihres Replikationsverhaltens während der S-Phase (siehe Abschnitt 1.1.2.3). Während die Organisation des Chromatins in Form von Metaphasechromosomen inzwischen gut verstanden ist, fehlt noch der Einblick, wie die distinkten chromosomalen Segmente der Chromosomen in den variabel formbaren Chromosomenterritorien der Interphase angeordnet sind. Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre konnten zwar zeigen, dass sich in vielen Zelltypen genreiches, transkriptionell aktives und früh replizierendes Chromatin bevorzugt im Inneren der Zellkerne aufhält, während das genarme, transkriptionell inaktive und spät replizierende Chromatin vorrangig an der Zellkernperipherie zu finden ist. Dennoch ist bislang noch nicht wirklich verstanden, welche der Chromatineigenschaften, wie die lokale Gendichte, die Expression oder die Replikationszeit, tatsächlich einen ausschlaggebenden Einfluss auf die räumliche Anordnung im Zellkern haben und welche dieser Eigenschaften nur aufgrund ihrer Korrelation mit einem „dominanten“ Merkmal eine spezifische Verteilung im Interphasekern aufweisen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieser Frage weiter nachzugehen. Hierzu arbeiteten wir mit einer Reihe von BAC Klonen (siehe Abschnitt 1.3), die sich aufgrund ihrer flexiblen Einsatzweise hervorragend zur Analyse der zellulären Anordnung von Chromatin mit verschiedenen Eigenschaften eignen. Mittels Datenbankrecherche lassen sich die Eigenschaften jedes BAC Klons, wie Gendichte, Bandenzuordnung, GC-Gehalt oder auch transkriptionelle Aktivität genau bestimmen. So wurden Pools aus BAC Klonen der menschlichen Chromosomen 11, 12, 18 und 19 zusammengestellt, die speziell R- und G-Banden spezifische Regionen, genreiche bzw. genarme Segmente sowie hoch bzw. niedrig exprimierte Gene repräsentieren. Mit Hilfe der multicolor 3D-FISH Technik, Bildverarbeitung und computergestützter, quantitativer Auswertungen wurde die Lage dieser durch die BAC Pools repräsentierten Regionen im Zellkern sowie bezüglich ihrer CTs analysiert. Dazu wurden mit Hilfe einer im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Software die absoluten bzw. normalisierten Abstände der in einem Experiment jeweils korrespondierenden BAC Pools zur Zellkernoberfläche bzw. zur Territoriumsfläche bestimmt. Mittels einer Korrelationsanalyse zwischen bestimmten Chromatineigenschaften der BAC Pools (Gendichte, GC Gehalt, Replikationszeit in der S-Phase und transkriptionelle Aktivität) und der gemittelten, radialen Position der BAC Pools im Zellkern sollte der Einfluss dieser Eigenschaften auf die räumliche Anordnung des Chromatins im Zellkern überprüft werden.

Zusätzlich sollte eine strukturelle Analyse der untersuchten CTs durchgeführt werden. Dazu gehörten die Beschreibung der bereits in früheren Arbeiten beobachteten polaren Organisation der CTs (siehe Abschnitt 1.1.3.3), sowie der Versuch einer quantitativen Auswertung. Die

verschiedene Kompaktierung des Chromatins innerhalb der CTs sollte anhand spezifischer Antikörper gegen spezielle Histonmodifikationen (siehe Abschnitt 1.2.2.2) untersucht werden. Zusätzlich sollte der Frage nachgegangen werden, ob es an den Grenzen benachbarter Chromosomenterritorien zu Vermischung des Chromatinmaterials kommen kann. Hierzu wurde anhand der Daten eines Multicolor FISH Experiments der Chromatinanteil eines benachbarten Territoriums in einem Referenzterritorium gemessen, sowie die Abstände dieses Chromatins zur Oberfläche des Referenzterritoriums bestimmt. Als strukturelle Besonderheit der CT Organisation sollte das bereits in früheren Arbeiten beschriebene Phänomen des „looping out“ (siehe Abschnitt 1.1.3.4) anhand der extrem genreichen und transkriptionell hoch aktiven Region 11p15.5 analysiert und neu beleuchtet werden. Hier wurde die Lage dieser Region im Zellkern bzw. bezüglich des Territoriums bestimmt, Abstandsmessungen durchgeführt und die Struktur des ausloopenden Segments beschrieben.

2. Material und Methoden

2.1 Zellmaterial und verwendete DNA-Sonden

2.1.1 Zellmaterial

- Humane Lymphozyten wurden aus frisch entnommenem, heparinisiertem Vollblut gesunder Probanden gewonnen.
- Die lymphoblastoide Zelllinie wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. Stefan Müller zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden humane Lymphozyten eines gesunden Probanden mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert.
- Bei den humanen Fibroblasten handelte es sich um normale, diploide, weibliche Zellen, die aus einer Hautbiopsie gewonnen wurden und aus frühen Passagen entnommen wurden.

2.1.2 DNA-Sonden

- Die Bac-Klone für die humanen Chromosomen 11, 12, 18 und 19 wurden teilweise mit freundlicher Genehmigung von Dr. Thomas Ried (NCI, Bethesda, MD) zur Verfügung gestellt und teilweise vom BACPAC Resources Center (Oakland, CA) bestellt. Eine ausführliche Übersicht über die verwendeten BAC-Klone und ihre Eigenschaften findet sich im Anhang im Abschnitt 7.1.
- Die chromosomspezifischen „painting“ Sonden waren im Labor verfügbar. Das Ausgangsmaterial für diese Proben wurde mittels Durchflußzytographie sortiert, ihre repetitiven Sequenzen depletiert und anschließend mittels DOP-PCR (siehe Abschnitt 2.4.4) amplifiziert.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Ansetzen einer Zellkultur

Material:

- Medium, je nach Zelltyp:
 - Fibroblasten: Dulbecco`s MEM Medium
 - Lymphoblastoide Zellen: RPMI 1640 Medium
- Fetales Kälberserum (FCS)
- Streptomycin/Penicillin

- Pipetten, 10ml
- Falcon-Gewebekulturflasche (25cm³)
- Falconröhrchen, 15ml
- Zentrifuge
- Sterilbank
- Wasserbad 37°C
- Brutschrank mit 37°C, 5% CO₂, 80%iger Luftfeuchtigkeit

Methode:

Alle Arbeitsschritte erfolgen in der Sterilbank:

- Medium vorbereiten: 500ml Medium
50ml FCS
5ml Streptomycin/Penicillin
gut mischen und auf 37°C im Wasserbad vorwärmen
- Ein 15ml Falconröhrchen mit 8ml vorgewärmtem Medium vorbereiten.
- Die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37°C auftauen und möglichst rasch in die vorbereiteten Falconröhrchen überführen.
- Zellen bei 1000rpm 5min abzentrifugieren, den Überstand (enthält restliches Einfriermedium mit DMSO) verwerfen.
- Zellpellet in 10ml frischem Medium aufnehmen und in eine 50ml Gewebekulturflasche übertragen.
- Im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ einige Tage wachsen lassen, bei adhärenen Zellen bildet sich ein konfluent gewachsener Monolayer, in Suspension wachsende Zellen trüben das Medium mit zunehmendem Wachstum.

2.2.2 Isolierung und Kultivierung von Lymphozyten aus Vollblut

Material:

- Heparinisiertes Vollblut gesunder Probanden (10ml Blut + 50µl Na-Heparin 5U/µl)
- LeucoSEP-Röhrchen
- Ficoll
- Hanks-Medium
- RPMI 1640 Medium

- Fetales Kälberserum (FCS)
- Streptomycin/Penicillin
- Phytohämagglutinin (PHA)
- Sterile Einmalpipetten, 3ml
- Falcon-Gewebekulturflaschen (75cm³)
- Sterilbank
- Zentrifuge
- Wasserbad 37°C
- Brutschrank mit 37°C, 5% CO₂, 80% relativer Luftfeuchtigkeit
- Durchlicht/Phasenkontrastmikroskop

Methode:

Alle Arbeitsschritte erfolgen in der Sterilbank:

- Medium vorbereiten: *Für stimulierte Lymphozyten:*
80ml Medium
20ml FCS
1ml Streptomycin/Penicillin (10000E/10000 µg/ml)
gut mischen und auf 37°C im Wasserbad vorwärmen

Für unstimulierte Lymphozyten:
5ml Medium
5ml FCS
gut mischen und auf 37°C im Wasserbad vorwärmen
- 15ml Ficoll in ein LeucoSEP-Röhrchen füllen und 30sec bei 2000 rpm abzentrifugieren. Darauf achten dass das Ficoll danach luftblasenfrei an den Filter anschließt. Gegebenfalls noch etwas Ficoll zugeben und erneut zentrifugieren.
- 10ml heparinisiertes Blut in das LeucoSEP-Röhrchen überführen und 15min bei 2000 rpm zentrifugieren.
- Anschließend den „buffy coat“ mit einer sterilen Einmalpipette abnehmen, in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführen und mit Hanks Medium auffüllen.
- Zellen 10min bei 1000 rpm zentrifugieren, Überstand bis auf kleinen Rest abnehmen und Pellet in diesem Rest resuspendieren. Erneut mit Hanks Medium auffüllen und 10min bei 1000rpm zentrifugieren. Diesen Waschschrift insgesamt dreimal wiederholen.
- *Unstimulierte Lymphozyten:* Pellet in 4ml RPMI/50%FCS Medium resuspendieren und weiterverarbeiten.

- *Stimulierte Lymphozyten:* Pellet in 4ml RPMI/20%FCS Medium resuspendieren und in eine vorbereitete Zellkulturflasche mit 40ml Komplettmedium + 400µl PHA überführen. 72h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren.

2.2.3 Umsetzen (Subkultivierung) einer Zellkultur

a) Adhärente Zellen

Material:

- 1x CMF-PBS (calcium and magnesium free phosphate buffered saline)
- Medium, je nach Zelltyp:
 - Fibroblasten: Dulbecco`s MEM Medium
 - HeLa Zellen: RPMI 1640 Medium
- Fetales Kälberserum (FCS)
- Streptomycin/Penicillin
- Trypsin/EDTA-Lösung, auf 37°C vorgewärmt
- Pipetten, 10ml, 1ml
- Falcon-Gewebekulturflaschen, 50ml (25cm³)
- Sterilbank
- Wasserbad 37°C
- Brutschrank mit 37°C, 5% CO₂, 80% relativer Luftfeuchtigkeit
- Durchlicht/Phasenkontrastmikroskop

Methode:

Alle Arbeitsschritte erfolgen in der Sterilbank

- Medium vorbereiten:
 - 500ml Medium
 - 50ml FCS
 - 5ml Streptomycin/Penicillin
 - gut mischen und auf 37°C im Wasserbad vorwärmen
- Altes Medium aus der Kulturflasche mit konfluenten Zellen abgießen.
- Zellen einmal mit 10ml CMF-PBS waschen, um das restliche Medium zu entfernen.
- 1ml Trypsin/EDTA zugeben, durch Schwenken gleichmäßig auf Boden der Kulturflasche verteilen.
- Kulturflasche für 3-5min zurück in den Inkubator stellen.

- Sich noch nicht in Suspension befindende Zellen werden durch Klopfen vom Boden gelöst. Die Kontrolle erfolgt mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops: trypsinierte Zellen sind durch ihre kugelige Gestalt erkennbar, sie schwimmen in der Lösung.
- Zellen in 4ml frischen Kompletmedium aufnehmen und gut resuspendieren. Durch die Zugabe des Mediums wird das Trypsin deaktiviert.
- Eine neue Kulturflasche mit 9ml Kompletmedium vorbereiten.
- 1ml der trypsinierten Zellsuspension in die vorbereitete, frische Kulturflasche zugeben.
- Die Zellen werden wieder zurück in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gestellt. Bei Erreichen einer neuen Konfluenz ist eine neue Subkultivierung erforderlich.

b) In Suspension wachsende Zellen

Material:

- RPMI 1640 Medium
- Fetales Kälberserum (FCS)
- Streptomycin/Penicillin
- Pipetten, 10ml, 1ml
- Falcon-Gewebekulturflaschen (25cm³)
- Sterilbank
- Wasserbad 37°C
- Brutschrank mit 37°C, 5% CO₂, 80% relativer Luftfeuchtigkeit

Methode:

Alle Arbeitsschritte erfolgen in der Sterilbank

- Medium vorbereiten: 500ml RPMI 1640 Medium
 50ml FCS
 5ml Streptomycin/Penicillin
 gut mischen und auf 37°C im Wasserbad vorwärmen
- Eine neue Kulturflasche mit 8ml Kompletmedium vorbereiten.
- 2ml der „alten“ Zellkultur entnehmen und in die vorbereitete, frische Kulturflasche übertragen.

- Die Zellen werden wieder zurück in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gestellt. Wann eine neue Subkultivierung nötig ist, ist anhand der Trübung des Mediums erkennbar.

2.2.4 Kultivierung von E.coli mit BAC-Klonen

Material:

- E.coli Agar-Stechkultur
- LB-Medium (NaCl, Yeast-extract, Peptone, H₂O)
- Agar
- Antibiotika-Stocklösung (z.B. Chloramphenicol, Kanamycin)
- Petrischalen
- Falcon-Röhrchen, 15ml + 50ml
- Impföse
- Bunsenbrenner
- Wärmeschüttler
- Brutschrank mit 37°C, 5% CO₂, 80% relativer Luftfeuchtigkeit

Methode:

- LB-Medium vorbereiten: 10g NaCl
5g Yeast-extract
10g Peptone
Ad 1l H₂O
Auf pH = 7 einstellen, fertiges Medium autoklavieren
- Agarplatten herstellen: pro Platte 10ml LB-Medium + 150mg Agar (1,5%)
(Medium in der Sterilbank abnehmen!)
im Glaskolben in der Mikrowelle aufkochen
anschließend auf ~60°C abkühlen lassen
benötigtes Antibiotika zugeben (siehe „clone information“!)
(z.B. Chloramphenicol Endkonzentration 12,5µg/ml)
Platte gleichmäßig ausgießen und 30min auskühlen lassen
mit Parafilm luftdicht verschließen
bis zur Verwendung verkehrt herum im Kühlschrank lagern
- Mit über dem Bunsenbrenner abgeflammtter Impföse Bakterien aus der Stechkultur entnehmen und nach der 13-Strich Methode auf der Platte ausstreichen.
- Die Platten über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubieren.

- *Vorkultur ansetzen:* pro Vorkultur ein 15ml Falcon-Röhrchen mit 5ml LB-Medium vorbereiten (Medium in der Sterilbank abnehmen!) und das benötigte Antibiotika zugeben (siehe „clone information“, z.B. Chloramphenicol Endkonzentration 12,5µg/ml).
- Mit steriler Impföse eine einzelne Bakterienkolonie von der Platte entnehmen und in die Vorkultur übertragen.
- Die Röhrchen werden 5-7h auf dem Wärmeschüttler bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit sollten die Bakterien gewachsen sein, was sich durch eine Trübung des Mediums kontrollieren lässt.
- *Übernachtskultur ansetzen:* pro Vorkultur ein 50ml Falcon-Röhrchen mit 35ml LB-Medium vorbereiten (Medium in der Sterilbank abnehmen!) und das benötigte Antibiotika zugeben (siehe „clone information“, z.B. Chloramphenicol Endkonzentration 12,5µg/ml).
- Die Vorkultur wird komplett in die Übernachtskultur überführt und über Nacht auf dem Wärmeschüttler bei 37°C inkubiert. Ein erfolgreiches Hochziehen der Bakterien kann an der Trübung des Mediums erkannt werden.

2.2.5 Herstellung von Glycerolstocks der hochgezogenen E.coli Kulturen

Material:

- Übernachtskultur der E.coli Bakterien
- Glycerol
- Cryoröhrchen
- Eis
- -80°C Gefrierschrank

Methode:

- 50% Glycerollösung (H₂O_{dest}) herstellen, autoklavieren und auf RT abkühlen lassen
- In der Sterilbank 300µl der 50% Glycerollösung in die Cryoröhrchen vorlegen
- 300µl der E.coli Übernachtskultur zugeben (außerhalb der Sterilbank!)
- Röhrchen 1h auf Eis äquilibrieren
- Fertige Glycerolstocks werden bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Aus den Glycerolstocks kann nun jederzeit bei Bedarf durch Animpfen einer Vorkultur neue Bakterienkulturen hochgezogen werden.

2.3 Minipräparation der BAC-Klone

Material:

- Übernachtskultur der E.coli Bakterien
- Alkalischer Lysispuffer 1, 2 und 3
- TE-Puffer bzw H₂O bidest
- NaCl
- NH₄Ac
- Isopropanol
- 70% Ethanol (eiskalt)
- 1% RNase
- Eis
- 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Zentrifuge, Eppendorfszentrifuge

Methode:

- Lösungen vorbereiten: *Alkalischer Lysispuffer 1*
50mM Glucose
2mM Tris-HCl (pH = 8,0)
10mM EDTA
Auf pH = 8 einstellen

Alkalischer Lysispuffer 2
0,2 M NaOH
1% SDS

Alkalischer Lysispuffer 3
3M KaAc (pH = 5,2)
pH mit Essigsäure und viel Geduld einstellen

TE-Puffer
10mM Tris-HCl (pH = 7,5)
0,1mM EDTA

5M NaCl Lösung

10M NH₄Ac Lösung

- Übernacht-Kultur (40 ml): 10 min bei 4000 rpm abzentrifugieren.
- Überstand verwerfen (abgiessen).
- 1.2 ml Lysispuffer 1 dazugeben durch vortexen resuspendieren.
- Suspension in 2x 2ml Epi-Tubes überführen (0.6 ml jeweils).
- 0.6 ml Lysispuffer 2 dazugeben und vorsichtig mischen (ab hier nicht mehr vortexen!).
- 5 min bei RT stehen lassen (Lösung sollte fast durchsichtig werden).
- 0.6 ml Lysispuffer 3 dazugeben und vorsichtig mischen (8-10 über Kopf schwenken) ⇒ dickes, weisses Protein-Präzipitat fällt aus (E. coli- DNA) ⇒ BAC-DNA ist im Überstand.
- 5 min auf Eis stellen.
- 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren (falls möglich bei 4°C).
- Tubes auf Eis stellen, Überstand in frisches 2ml Eppendorf-Tube übertragen (wieder auf 2 Tubes = 4 Tubes pro BAC).
- Die letzten zwei Schritte wiederholen (optional).
- 0,8 ml (0.9 x Volumen) Isopropanol dazugeben (um die BAC DNA zu präzipitieren), mischen, 5min auf Eis stellen.
- 30min in kalter Zentrifuge bei 13000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen.
- 0.5 ml kalten 70% Ethanol dazugeben und ein paar mal über Kopf mischen, um das Pellet zu waschen.
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- Pellet bei RT oder im Vakuum trocknen lassen bis es durchsichtig ist (Ethanol muss ganz verdampft sein).
- Pellet in 200 µl H₂O_{bidest} (Summe aus 4 Tubes) oder TE-Puffer resuspendieren.
- RNase Verdau 1h bei 37° C, 40ng/ml RNase benötigt (1%ige Stocksolution: 0,8µl in 200µl DNA-Lösung).

- Testen der DNA-Konzentration auf einem 1% Agarose Gel oder mittels eines Photometers. Die DNA kann bei -20°C gelagert werden.

2.4 DOP-PCR

2.4.1 Primäre DOP-PCR der isolierten BAC-DNA

Die **D**egenerate **O**ligonucleotide **P**rimed PCR, kurz DOP-PCR (Telenius et al., 1992) beruht auf einem universellen Primer, der es im Prinzip möglich macht, jede beliebige DNA-Sequenz zu amplifizieren. Dieser Primer ist partiell degeneriert, das heißt er enthält im mittleren Abschnitt einen Bereich mit einer zufälligen Nukleotidabfolge. Dies ermöglicht unter wenig stringenten Bedingungen ein Annealing an viele verschiedene Sequenzen.

Für die Amplifizierung der BAC-DNA wurde in dieser Arbeit nicht der übliche 6MW-Primer (Biotech GmbH) sondern eine Kombination aus zwei modifizierten Primern genutzt. Diese als „DOP2“ bzw. „DOP3“ bezeichnete Primer tragen an ihrem 3' Ende eine Nukleotidsequenz die gewährleistet, dass menschliche DNA um das sechsfache besser amplifiziert wird als Bakterien-DNA. Jeder Primer für sich amplifiziert dabei bestimmte Targetsequenzen bevorzugt. Mit der Kombination der Primer soll eine vollständigere Repräsentation des Targets erreicht werden (Fiegler et al., 2003).

Material:

- Puffer D 5x (Invitrogen):
 - Tris/HCl (300 mM)
 - MgCl₂ (17,5 mM)
 - KCl(NH₄)₂SO₃ (15 mM)
 - pH = 8,5
- DOP2-Primer (5'-ccgactcgagnnnnnttaggag-3')
- DOP3-Primer (5'-ccgactcgagnnnnnttctag-3')
- Detergenz W1 (Gibco BRL)
- dNTPs
- Taq-Polymerase (5U/μl, Pharmacia Biotech)
- isolierte BAC-DNA, 1:10 Verdünnung (Endkonzentration ~50-200 ng/μl)
- sterile 0,5ml Eppendorf-Tubes
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Thermocycler

Methode:

Zunächst wird ein **Mastermix** (für 20 Standartansätze) nach folgender Tabelle angesetzt:

Tabelle 2.4.1.1: Mastermix für DOP2-/DOP3-PCR

Menge	Reagenz	Endkonzentration
200 µl	Puffer D (5x)	10%
100 µl	DOP2 bzw. DOP3 Primer (20µM)	2µM
100 µl	Detergenz W1(1%)	0,1%
80 µl	dNTP-Mix (each 2,5mM)	200µM
480 µl	H ₂ O	-
Σ = 960 µl		

1x Reaktionsansatz: 48µl MM +2µl BAC-DNA + 0.5µl Taq-Pol (2,5U/µl)

Die primäre DOP-PCR wird nach folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 2.4.1.2: Thermocycler-Programm für primäre DOP2-/DOP3-PCR

Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Start-Denaturierung	96°C	3min 00“
10	Denaturierung	94°C	1min 30“
	Primeranlagerung	30°C	2min 30“
	Extension	72°C	3min 00“
30	Denaturierung	94°C	1min 00“
	Primeranlagerung	62°C	1min 30“
	Extension	72°C	2min 00“
1	Denaturierung	94°C	1min 00“
	Primeranlagerung	62°C	1min 30“
	Schluß-Extension	72°C	8min 00“
	Gesamtdauer		3h 39min

Im Anschluss an die PCR werden jeweils 2µl Amplifikat mit 3µl 6x Gel-Ladepuffer (1:2 verdünnt) auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Als Marker dient λ/HindIII-DNA, von der ebenfalls 2µl in eine Spur aufgetragen wird.

2.4.2 Sekundäre DOP-PCR der BAC-DNA

Die sekundäre DOP2-/DOP3-PCR verläuft nach demselben Protokoll wie die primäre PCR-Reaktion, nur die zehn niederstringenten Zyklen (Annealingtemperatur 30°C, siehe Tabelle

2.4.1.1) werden weggelassen. Das verkürzt die Gesamtdauer der PCR-Reaktion auf 2h 29min. Der Mastermix entspricht dem der primären DOP2-/DOP3-PCR (siehe Tabelle 2.4.1.2).

2.4.3 Label DOP-PCR der BAC-DNA

In dieser Reaktion werden die Amplifikate aus der primären oder sekundären DOP-PCR mit Hapten- bzw Fluorochromgekoppelten dUTPs markiert. Diese werden anstelle des Thymidins in die DNA eingebaut.

Material:

- Cetus-II-Puffer (Roche): Tris-HCl (100 mM)
KCl (500 mM)
pH = 8,3
- MgCl₂
- DOP2-Primer (5'-ccgactcgagnnnnntaggag-3')
- DOP3-Primer (5'-ccgactcgagnnnnnttctag-3')
- dNTPs
- Biotin-16-UTP / Dig-11-UTP / DNP-16-UTP / Tamra-dUTP (je 1mM)
- Taq-Polymerase (5U/μl, Pharmacia Biotech)
- DOP2-/DOP3-Amplificate aus einer primären/sekundären PCR
- 0,5ml Eppendorf-Tubes
- Thermocycler

Methode:

Zunächst wird ein Mastermix (für 20 Standardansätze) nach folgender Tabelle angesetzt:

Tabelle 2.4.3.1: Mastermix für Label-DOP2-/DOP3-PCR

Menge	Reagenz	Endkonzentration
100 μl	Cetus-II-Puffer	50mM KCl, 10mM Tris
80 μl	MgCl ₂ (25mM)	2mM
100 μl	DOP2 bzw. DOP3-Primer (20μM)	2μM
50 μl	ACG-Mix (each 2mM)	100μM
80μl	dTTP (1mM)	80μM
530 μl	H ₂ O	-
Σ = 940 μl		

1x Reaktionsansatz:

46µl MM + 3µl markiertes dUTP + 2µl Amplifikat + 0,5µl Taq-Pol (=2,5U)

Die Label-DOP-PCR wird nach folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 2.4.3.2: Thermocycler-Programm für Label-DOP2-/DOP3-PCR

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

Im Anschluss an die PCR werden jeweils 2µl Amplifikat mit 3µl 6x Gel-Ladepuffer (1:2 verdünnt) auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Als Marker dient λ /HindIII-DNA, von der ebenfalls 2µl in eine Spur aufgetragen wird.

2.4.4 Sekundäre DOP-PCR der paint-Sonden

Primäre Amplifikate der paint-Sonden für das menschliche Chromosom 12, 18 und 19 waren im Labor bereits vorhanden. Für eine sekundäre Amplifizierung mittels DOP-PCR wurden der herkömmliche 6MW-Primer (Biotech GmbH) und ein im Vergleich zur primären Amplifikation leicht abgeändertes Thermocycler-Programm verwendet.

Material:

- Puffer D 5x (Invitrogen): Tris/HCl (300 mM)
MgCl₂ (17,5 mM)
KCl(NH₄)₂SO₃ (15 mM)
pH = 8,5
- 6MW-Primer (5'-ccgactcgagnnnnnatgtgg-3')
- Detergenz W1 (Gibco BRL)
- dNTPs
- Taq-Polymerase (5U/µl, Pharmacia Biotech)
- sterile 0,5ml Eppendorf-Tubes
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Thermocycler

Methode :

Zunächst wird ein Mastermix (20x) nach folgender Tabelle angesetzt:

Tabelle 2.4.4.1: Mastermix für DOP-PCR

Menge	Reagenz	Endkonzentration
200 µl	Puffer D (5x)	20%
120 µl	6 MW-Primer (17µM)	1,7-2µM
100 µl	Detergenz W1(1%)	0,1%
80 µl	dNTP-Mix (each 2,5mM)	200µM
450 µl	H ₂ O	-
Σ = 950 µl		

1x Reaktionsansatz: 48,5µl MM + 1µl DNA-Template + 0.5µl Taq-Polymerase

Die sekundäre DOP-PCR wird nach folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 2.4.4.2: Thermocycler-Programm für sekundäre DOP-PCR

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

Im Anschluss an die PCR werden jeweils 2µl Amplifikat mit 3µl 6x Gel-Ladepuffer (1:2 verdünnt) auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Als Marker dient λ/HindIII-DNA, von der ebenfalls 2µl in eine Spur aufgetragen wird.

2.4.5 Label DOP-PCR der paint-Sonden**Material:**

- Cetus-II-Puffer (Roche): Tris-HCl (100 mM)
KCl (500 mM)
pH = 8,3

- MgCl₂
- 6MW-Primer (5'-ccgactcgagnnnnnatgtgg-3')
- dNTPs
- Biotin-16-UTP / Dig-11-UTP / DNP-16-UTP
- Taq-Polymerase (5U/μl)
- 0,5ml Eppendorf-Tubes
- Thermocycler

Methode :

Zunächst wird ein Mastermix (für 20 Standardansätze) nach folgender Tabelle angesetzt :

Tabelle 2.4.5.1: Mastermix für Label-DOP-PCR

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

1x Reaktionsansatz: 47,5μl MM + 2μl Amplifikat + 0,5μl Taq-Polymerase

Die Label-DOP-PCR wird nach folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 2.4.5.2: Thermocycler-Programm für Label-DOP-PCR

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

Im Anschluss an die PCR werden jeweils 2µl Amplifikat mit 3µl 6x Gel-Ladepuffer (1:2 verdünnt) auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Als Marker dient λ/HindIII-DNA, von der ebenfalls 2µl in eine Spur aufgetragen wird.

2.5 Restriktionsanalyse der isolierten BAC-DNA

Um zu überprüfen ob die isolierte BAC-DNA tatsächlich auch der gewünschten Sequenz entspricht wurde sie mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Das daraus resultierende Muster wurde mit dem aus der bekannten Sequenz zu erwartenden Muster verglichen. Nur BACs die identische Muster aufwiesen wurden weiter verwendet.

Die Restriktionsanalyse der bekannten Sequenz wurde mit dem Programm pDRAW32 (<http://www.acaclone.com/>) durchgeführt. In dieses Programm wurde die vollständige Sequenz des zu testenden BAC-Klons (Information aus einer Datenbank erhalten, z.B. NCBI oder ensembl) eingeladen. Zusätzlich muss auch die Sequenz des Vektorsystems eingegeben werden, welche ebenfalls Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthält (Information zu den Vektorsystemen unter <http://bacpac.chori.org>). Da die gewünschte DNA-Sequenz in zwei möglichen Orientierungen im Vektor vorliegen kann, was ebenfalls Auswirkungen auf die Längen der Restriktionsfragmente haben kann, wurde die BAC-Sequenz auch noch einmal invertiert eingelesen. Im Programm wurde dann eine Auswahl der Restriktionsenzyme getroffen, mit denen ein Verdau simuliert wurde. Das Ergebnis enthielt detaillierte Informationen über Anzahl und Länge der Fragmente sowie die graphische Darstellung einer simulierten Gelelektrophorese. Diese Darstellung wurde zum Vergleich mit dem Ergebnis des tatsächlich durchgeführten Verdaus herangezogen.

Eine detaillierte Beschreibung der Datenbanksuche und der Programm Benutzung findet sich im Anhang unter dem Abschnitt 7.2.

2.5.1 Restriktionsverdau

Material:

- Zu testende BAC-DNA (benötigte Konzentration 500 – 1000ng/µl)
- Restriktionsenzyme und Puffer, z.B.:
 - Swal + NEB-Puffer 3 (New England Biolabs)
 - EcoRV + NEB-Puffer 3 (New England Biolabs)
 - SACII + NEB-Puffer 4 (New England Biolabs)
 - BAMHI + SuRE/Cut B (Boehringer, Mannheim)
- BSA-Lösung (10%)
- H₂O_{bidest}
- 0,5M EDTA-Lösung
- Wasserbäder

Methode :

- Ansatz mit SmaI: 30µl BAC-DNA + 4µl NEB-Puffer 3 + 4µl BSA +2 µl SmaI
2h bei 25°C im Wasserbad inkubieren
Enzym anschließend 20min bei 65°C im Wasserbad inaktivieren
- Ansatz mit EcoRV: 30µl BAC-DNA + 4µl NEB-Puffer 3 + 4µl BSA +2 µl EcoRV
2h bei 37°C im Wasserbad inkubieren
Enzym anschließend mit 2µl EDTA-Lösung inaktivieren
- Ansatz mit BamHI: 30µl BAC-DNA + 4µl SuRE/Cut B + 4µl H₂O_{bidest} +2 µl BamHI
2h bei 37°C im Wasserbad inkubieren
Enzym anschließend 20min bei 65°C im Wasserbad inaktivieren
- Ansatz mit SacII: 30µl BAC-DNA + 4µl NEB-Puffer 4 + 4µl H₂O_{bidest} +2 µl SacII
2h bei 25°C im Wasserbad inkubieren
Enzym anschließend 20min bei 65°C im Wasserbad inaktivieren

2.5.2 Auftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese

Material:

- Restringierte BAC-DNA (40µl Ansatz)
- Gene Ruler 1kb Größenmarker
- 1%iges Agarosegel (beim Gießen Kamm mit großen Taschen verwenden)
- 6x Auftragspuffer, enthält: 0,25% Xylencyanol (Bande läuft bei 4kb)
0,25% Bromphenolblau (Bande läuft bei 300bp)
Glycerin
- Ethidiumbromid-Stocklösung (5mg/ml)
- TAE-Puffer
- Gelkammer, Spannungsgeber
- Transilluminator

Methode :

- Der gesamte Reaktionsansatz wird mit 8µl Auftragspuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen
- In die erste und letzte Gelspur werden 10µl 1kb-Größenmarker + 8µl Auftragspuffer aufgetragen
- Das Gel läuft bei 80V und 120mA

2.6 Semiquantitative RT-PCR

Um die transkriptionelle Aktivität einiger Gene in bestimmten Zelltypen zu bestätigen, wurde eine RT-PCR (reverse transcription) durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Gesamt-RNA aus einer Zellkultur isoliert. Hoch exprimierte Gene sind hier mit einer deutlich höheren Kopienzahl an mRNA vertreten als niedrig (basal) exprimierte Gene. In einer reversen Transkriptase-Reaktion mit einem oligo-dT-Primer wurde einsträngige cDNA der enthaltenen mRNAs synthetisiert. Mit einem anschließenden RNase-Verdau wird der Ansatz von aller tRNA, rRNA und mRNA gesäubert. Die einsträngige cDNA diente nun als Vorlage für die eigentliche RT-PCR Reaktion. Mit dem Programm FastPCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>) und Sequenzinformationen aus einer Datenbank (NCBI oder ensembl) wurden genspezifische Primer ermittelt. Diese Primer wurden dann bei der Firma MWG Biotech bestellt (http://www.mwg-biotech.com/html/s_synthesis/s_primer_design.shtml). Hoch exprimierte Gene ergaben in der PCR-Reaktion bereits nach wenigen Amplifikationszyklen spezifische Fragmente während niedrig exprimierte Gene auch nach Ablauf aller 35 Zyklen keine spezifische Gelbande aufwiesen.

Eine detaillierte Beschreibung des Primer-designs mittels FastPCR findet sich im Anhang unter dem Abschnitt 7.3.

2.6.1 RNA-Isolation

Material:

- Konfluente Zellkultur
- 1x CMF-PBS (calcium and magnesium free phosphate buffered saline)
- Trizol (Tech-Line)
- Chloroform (Merck)
- Isopropanol (Merck)
- DEPC-Wasser: 1l H₂O_{dest}
 1ml DEPC (Diethylpyrocarbonat, Sigma-Aldrich) lösen
 autoklavieren
- 75% Ethanol in DEPC-Wasser
- Biopur-Eppendorf-Röhrchen (RNase-frei)
- Falcon-Röhrchen 50ml
- Gekühlte Eppendorf-Zentrifuge (+4°C)
- -80°C Gefrierschrank

Methode:

a) in Suspension wachsende Zellen:

- Zellkultur in ein 50ml Falconröhrchen überführen und 10min bei 1000rpm abzentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet in 5-10ml 1xCMF-PBS resuspendieren, nochmals 10min bei 1000rpm abzentrifugieren
- Überstand bis auf kleinen Rest verwerfen, Pellet darin resuspendieren
- 2ml Trizol zugeben, mit Pipette vorsichtig mischen bis Lösung viskös wird
- Lösung in 1ml Aliquots in Biopur-Eppendorf-Reaktionsgefäße aufteilen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahren

b) adhärent wachsende Zellen:

- Medium aus Kulturflasche abgießen und mit 1x CMF-PBS waschen
- 6ml Trizol pro 75cm³ Kulturflasche zugeben, Zellen darin aufnehmen
- mit Pipette vorsichtig auf- und abziehen bis Lösung viskös wird
- Lösung in 1ml Aliquots in Biopur-Eppendorf-Reaktionsgefäße aufteilen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahren

Die weitere Vorgehensweise ist für beide Zelltypen gleich:

- Zellsuspension bei 37°C im Heizblock möglichst schnell auftauen, vortexen und pro Eppendorftube 200µl Chloroform zugeben
- Ansätze mit Hand mischen, circa 3min bei RT inkubieren bis Phasentrennung sichtbar wird (3Phasen: rosa Trizolschicht, weiße Proteinschicht, klarer Überstand)
- 10min bei 12000rpm und +4°C abzentrifugieren, anschließend den Überstand (ohne Protein aus Interphase) abnehmen (etwa 500µl) und in ein frisches Biopur-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- Auf das abgenommene Volumen wird das selbe Volumen Isopropanol gegeben und 10min bei RT inkubiert

- 10min bei 12000rpm und +4°C abzentrifugieren, Überstand entfernen (Vorsicht, Pellet ist nicht sichtbar)
- 1ml 75% Ethanol (in DEPC-Wasser) zugeben (Pellet wird sichtbar)
- 10min bei 12000rpm und +4°C abzentrifugieren, Überstand entfernen, Pellet trocknen lassen (nicht im Vakuum)
- Pellet in 10-30µl DECP-Wasser resuspendieren (je nach Größe des Pellets), bei -80°C lagern

2.6.2 Photometrische Messung der RNA-Konzentration

Material:

- Isolierte RNA
- TE-Puffer: 10mM Tris-HCl (pH = 7,5)
0,1mM EDTA
- Quarzküvette
- Photometer

Methode :

- 1:500 und 1:250 Verdünnungen aus isolierter RNA mit TE-Puffer herstellen
- Photometer mit TE-Puffer eichen
- Absorption der Probe bei 260nm, 280nm und Ratio 260/280 messen (Reinheit von Proteinen)
- Nach jeder Probe die Quarzküvette mehrfach mit TE-Puffer ausspülen
- Die RNA-Konzentration berechnet sich nach folgender Formel:

$$(Abs_{260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40) / 1000 = n \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

2.6.3 Kontrolle der RNA mittels Gelelektrophorese

Material:

- Isolierte RNA (1µg)
- RNase freie Agarose (Endkonzentration 1,2%)
- DEPC-Wasser: 1l H₂O_{dest}
1ml DEPC (Diethylpyrocarbonat) lösen, autoklavieren
- 10x MOPS-Puffer: 41,2g MOPS (MP Biochemicals Inc.)
800ml DEPC-Wasser
13ml 3M Na Ac
mit NaOH auf pH = 7,0 einstellen
+ 10ml 0,5M EDTA (pH = 8)
- 1x MOPS-Puffer
- Formaldehyd, 3,7%
- Formamid
- Ethidiumbromid
- Loading Puffer
- Wärmeschüttler 65°C
- Eis
- Gelkammer, Gelkamm, Spannungsgeber
- Transilluminator

Methode:

- 0,6g Agarose in 43,5ml DEPC-Wasser aufkochen (beheizbarer Magnetrührer), auf 60°C abkühlen lassen
- 5ml 10x MOPS-Puffer + 1,5ml Formaldehyd zugeben, Gel gießen
- Als Laufpuffer wird 1x MOPS-Puffer verwendet
- 3µl RNA (~ 1-2µg) + 1µl 10x MOPS-Puffer + 1,7µl Formaldehyd + 5µl Formamid + 1µl Ethidiumbromid mischen und 15min bei 65°C inkubieren
- 1min auf Eis kühlen und abzentrifugieren
- 1µl Auftragspuffer zugeben
- Das Gel läuft bei 100V und 45mA, alle 20min wird der Puffer aus beiden Gelkammern mit einer Pipette vermischt um die Bildung eines pH-Gradienten zu verhindern

- Nach dem Lauf wird das Gel kurz in DEPC-Wasser entfärbt und anschließend photographiert

Ergebnis des RNA-Gels: zwei, im besten Fall drei getrennte Banden: Bande 1 und 2 sind rRNA, der kaum sichtbare Schmier dazwischen besteht aus mRNA und hnRNA, die 3. Bande ist tRNA.

2.6.4 Erststrang cDNA-Synthese

Material:

- Isolierte RNA (~ 5µg)
- Oligo(dT) Primer
- dNTP-Mix (10mM each)
- 5x Firststrang-puffer (Invitrogen)
- 0,1M DTT (Dithiothreitol)
- RNaseOut™, RNase Inhibitor
- Superscript™ II, reverse Transkriptase (Invitrogen)
- RNaseH
- Heizblock 65°C, 42°C, 70°C
- Eis
- Wasserbad 37°C

Methode :

- 5µg der isolierten DNA werden in einem Volumen von 10µl benötigt
- 1µl Oligo(dT) Primer (0,5ng/µl) + 1µl dNTP-Mix zur RNA geben, 5min bei 65°C inkubieren, 2min auf Eis abkühlen und abzentrifugieren
- Zum Reaktionsansatz 4µl 5x FS-Puffer, 2µl DDT und 1µl RNaseOut (40U/ml) zugeben
- 2min bei 42°C inkubieren
- 1µl Superscript™II zugeben (200U/µl) und 50min auf 52°C inkubieren
- Anschließend die Reaktion 15min auf 70°C inaktivieren
- 1µl RNaseH (2U/µl) zugeben und 20min bei 37°C inkubieren
- Fertige einsträngige cDNA bei +4°C lagern

2.6.5 Genspezifische PCR

Die genspezifischen Primer wurden mit der Software FastPCR ermittelt (siehe Anhang 7.3).

Material:

- Erststrang cDNA
- 10x PCR-Puffer (Pharmacia)
- dNTP-Mix (10mM each)
- Forward Primer, Reverse Primer, je 10µM
- Taq-Polymerase (5U/µl)
- 0,5ml Eppendorf-Tubes
- Thermocycler

Methode:

Zunächst wird ein Mastermix (40x) nach folgender Tabelle angesetzt :

Tabelle 2.6.5.1: Mastermix für RT-PCR

Menge	Reagenz	Endkonzentration
200 µl	Pharmacia-PCR-Puffer	1x
160 µl	dNTP-Mix (each 2,5mM)	800µM
1340 µl	H ₂ O	-

1x Reaktionsansatz:

42,5µl Mastermix + 2µl Erststrang cDNA + 2,5µl Forward Primer + 2,5µl Reverse Primer
+ 0,5µl Taq-Polymerase (=2,5U)

Die RT-PCR wird nach folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 2.6.5.2: Thermocycler-Programm für RT-PCR

Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Start-Denaturierung	94°C	3min 00“
35	Denaturierung	94°C	0min 30“
	Primeranlagerung	X°C	0min 30“
	Extension	72°C	0min 45“
1	Denaturierung	94°C	0min 30“
	Primeranlagerung	X°C	0min 30“
	Extension	72°C	5min 00“

X°C ist ein Platzhalter für die jeweilige optimale Annealing Temperatur.

Jede der genspezifischen PCRs wird in drei Ansätzen gestartet. Nach 15 bzw. 22 Zyklen wird der Thermocycler für die Entnahme je eines Ansatzes kurz gestoppt. Der dritte Ansatz bleibt bis zum Schluß in der Maschine.

Im Anschluss an die PCR werden jeweils 5µl Amplifikat mit 3µl 6x Gel-Ladepuffer (1:2 verdünnt) auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. 5µl 100kb Größenmarker werden in die erste Spur geladen.

Hochexprimierte Gene zeigen eine spezifische Bande in allen drei Proben, während niedrig exprimierte Gene sogar im 35 Zyklus Ansatz keine spezifische PCR-Reaktion zeigen.

2.7 Herstellung von Metaphasepräparaten

2.7.1 Fixierung von Lymphozyten

Material:

- Stimulierte Lymphozytenkultur (72h nach PHA Stimulierung)
- 1 ml Colcemid (10µg/ml)
- 0,45% KCl-Lösung, vorgewärmt auf 37°C
- Fixativ (Methanol/Eisessig 3:1, v:v), auf -20°C gekühlt
- 75cm³ Gewebekulturflaschen
- Falconröhrchen 15ml + 50ml
- Brutschrank mit 37°C, 5%CO₂, 80%tiger Luftfeuchtigkeit
- Einmal-Plastikpipetten, 3ml
- Zentrifuge

Methode:

- 0,5ml Colcemid zur Zellkultur zugeben, mischen und 40min bei 37°C inkubieren
- Zellen + Medium in 2x 50ml Falcons gleichmäßig überführen und 10min bei 1000rpm zentrifugieren
- Überstand bis auf die letzten 5ml abnehmen, Rest durch sanftes Auf- und Abpipettieren resuspendieren. Vorsichtig die auf 37°C vorgewärmte 0,45% KCl-Lösung zugeben (die ersten 5ml am Rand + leicht in der Hand schütteln, dann auf dem Vortex sanft schütteln und auf 30-40ml auffüllen)
- Bei 37°C 15-20min im Wasserbad inkubieren. In dieser Zeit platzen Erythrozyten, die Lymphozyten quellen auf.

- 10min bei 1000rpm zentrifugieren
- Überstand bis auf die letzten 5 ml verwerfen, Zellen resuspendieren
- Falconröhrchen mit eiskaltem Fixativ auffüllen (wieder sehr vorsichtig, erst 15ml langsam am Rand zugeben, danach auf Vortex sanft schütteln und auf 30-40ml auffüllen)
- Zentrifugieren 10min bei 1000rpm, Überstand bis auf 3-5ml verwerfen und Resuspension in kleines 14ml-Falcon überführen
- Waschschrift mit Fixativ 5-10 x wiederholen (je nach Sauberkeit der Präparate!)
- Letztes Mal Fixativ abnehmen und dann nur soviel neues Fixativ zugeben, dass die resuspendierte Lösung noch leicht milchig ist (etwa auf 2ml-2,5ml auffüllen)
- Zellen auf Eis stellen, oder bei -20°C lagern

2.7.2 Auftropfen von Präparaten

Material:

- In Ethanol/Ether (1:1) gereinigte Objektträger
- Fixierte Lymphozyten – Zellsuspension, auf Eis gestellt
- 200 μl Pipette
- 11x13cm Metallbox
- Wasserbad 55°C (3cm Abstand zwischen Wasser und Deckel)
- Alkoholreihe (70%, 90%, 100% EtOH) in Glasküvetten
- Phasenkontrastmikroskop

Methode (nach Deng et al., 2003):

- Metallbox auf Eis stellen, saubere Objektträger in Box legen, 2-3min kühlen
- Metallbox ins 55°C warme Wasserbad stellen, Zellsuspension aus etwa 1-2cm Höhe auf Objektträger auftropfen und Wasserbad anschließend sofort mit Deckel verschließen
- Objektträger etwa 1min inkubieren lassen bis sie vollständig getrocknet sind
- Spreitung und Dichte der Metaphasen unter dem Phasenkontrastmikroskop prüfen
- Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70% - 90% - 100%) je 3min dehydrieren

- Lagerung der fertigen Präparate in einer Objektträgerbox bei -20°C mit Trockenmittel

Vor der Verwendung für FISH-Experimente sollten die Präparate einige Tage altern. Ist diese Zeit nicht vorhanden können die Präparate auch über Nacht bei 40°C oder für 2h bei 60°C im Trocken-Ofen gealtert werden.

2.7.3 Pepsinierung

Material:

- Pepsinstammlösung 10% (100mg/ml)
- 1x PBS
- 10mM HCl-Lösung (1ml 1N HCl + 99ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$), in Glasküvette auf 37°C vorgewärmt
- Alkoholreihe (70%, 90%, 100% EtOH) in Glasküvetten

Methode:

- kurze Equilibrierung der luftgetrockneten Objektträger in 1x PBS
- Objektträger 5-10 min in Pepsinlösung inkubieren (50ml 0,01M HCl-Lösung + 25 μl Pepsin – Stammlösung (10% Lösung in H_2O))
- 2x 3min in 1x PBS waschen
- Dehydrierung der Präparate in aufsteigender Ethanolreihe (70% - 90% -100%), je 3min
- Präparate lufttrocknen

2.8 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

2.8.1 2D-FISH-Experimente

Material

Hybridisierungsmix:

- Markierte Sonden-DNA
- Cot-1-DNA
- Salmon testis DNA
- Ethanol abs. p. A.
- deionisiertes Formamid (pH=7)

- Hybridisierungs-Mastermix (20% Dextransulfat/2xSSC)
- Thermomixer 38°C
- Vakuumzentrifuge

Denaturierung und Hybridisierung:

- Hybridisierungsmix
- Metaphasepräparate
- Denaturierungslösung (70%Formamid/2xSSC), in Glasküvette auf 72°C vorgewärmt
- Aufsteigende, kalte Ethanolreihe (70%-90%-100%) in Glasküvetten
- Deckgläser 12x12mm
- Montagekleber Fixogum
- Wasserbad 72°C/80°C/30°C
- Metallbox

Waschungen und Detektion:

- 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 (4%BSA in 4xSSC/Tween)
- Nachweisreagenzien (Antikörper, je nach Markierung)
- DAPI-Färbelösung
- Antifade-Medium (Vectashield)
- Parafilm
- farbloser Nagellack
- Glasküvetten
- Wasserbad 37°C/60°C
- Schüttler

Methode:

Hybridisierungsmix:

- Die ideale DNA-Konzentration im Hybridisierungsmix liegt zwischen 20-30ng pro Sonde in 1µl Hybmix, d. h. etwa 250ng DNA pro Sonde in den angesetzten 10µl Mix
- Zugegeben wird ein 20 facher Überschuß an Cot-1-DNA (1µg/µl)
- Als Träger-DNA werden 2µl Salmon Sperm DNA verwendet

- 2,5 fache Menge an EtOH (100%) zugeben und etwa 30 min bei -20°C stehen lassen (= Ethanolfällung)
- 20-30min bei 13.000 rpm abzentrifugieren
- Überstand vorsichtig verwerfen
- Pellet in der Vakuumzentrifuge 5min trocknen
- Pellet in 5 μl deionisiertes Formamid durch Vortexen resuspendieren, anschließend etwa 30min bei 38°C im Thermomixer inkubieren, bis sich die DNA vollständig gelöst hat
- Zugabe von 5 μl Hybridisierungs-Mastermix (20% Dextransulfat in 2x SSC)
- Vortexen und wieder abzentrifugieren

Denaturierung der Proben und Präparate:

Präparate:

- 70%iges Formamid in Wasserbad auf 72°C erwärmen
- Objektträger mit Metaphasen 2min inkubieren
- Dehydrierung mit aufsteigender, kalter Ethanolreihe (70% - 90% - 100%) je 3min
- Präparate lufttrocknen lassen

Proben:

- Hybridisierungsmixe in 80°C heißen Wasserbad 5min denaturieren
- Anschließend 1-2min auf Eis stellen und abzentrifugieren
- Danach 20-30 min ins 37°C warme Wasserbad geben (\Rightarrow Preannealing von Cot-1 an Sonden)

Hybridisierung:

- Auftragen der Proben auf einen Objektträger auf vorher ausgewählten Bereichen
2 - 3 μl bei 20 x 20 / 18 x 18 Deckgläsern
1,5 – 1,8 μl bei 15 x 15 Deckgläsern
1 μl bei 12 x 12 Deckgläsern

- Deckgläser mit Fixogum fixieren
- Präparate in vorgewärmte Metallbox geben (37°C) und 24h - 48h lang im 37°C warmen Wasserbad inkubieren

Waschen:

- Fixogum mit spitzer Pinzette abziehen und Deckgläser abnehmen
- 2x 3min bei 37°C in 2x SSC waschen
- 3x 5min bei 60°C in 0,1x SSC (=stringente Waschung)
- kurz in 4x SSC bei 37°C equilibrieren

Detektion:

- 20–30 min Blocken in 4% BSA (in 4xSSC/Tween) bei 37°C auf dem Schüttler
- Antikörper-Stocklösung 5min bei 13.000 rpm abzentrifugieren, passende Verdünnung in 2%BSA-Lösung (in 4xSSC/Tween) erstellen, pro Slide 150µl auftragen
- Mit Parafilm abdecken (möglichst ohne Luftblasen!)
- Objektträger bei 37°C in einer feuchten, dunklen Kammer 30-45 min inkubieren
- Anschließend 3x 5 min in 4x SSC/Tween im Dunkeln waschen (37°C, Schüttler)
- Genauso mit dem 2.AK und gegebenenfalls mit dem 3.AK verfahren

Gegenfärbung mit DAPI:

- DAPI-Lösung ansetzen: DAPI-Stock-Lösung (500µg/ml) in SSC/Tween auf 0,05µg/ml verdünnen (5µl Stocklösung in 50 ml SSC/Tween)
- Präparate 2min in vorgewärmter DAPI-Lösung (in 4xSSC/T) färben
- Objektträger mit H₂O dest. gründlich abspülen und im Dunklen gut lufttrocknen lassen
- Mit Vectashield (Antifade) unter ein Deckglas einbetten (4-5 Tropfen pro Slide) und das Deckglas mit farblosen Nagellack versiegeln

2.8.2. 3D-FISH-Experimente

Material:

Aussähen der Zellen auf Coverslips:

- Coverslips 26x76mm (0,17+/-0,01mm Dicke)
- Ethanol/Ether (zum Reinigen der Coverslips)
- QuadriPERM plus Kulturschalen
- Medium (je nach Zelltyp)
- Trypsin/EDTA-Lösung, auf 37°C vorgewärmt
- steriles 1x CMF-PBS (calcium and magnesium free phosphate buffered saline)
- CO₂ Inkubator
- Polylysin-Hydrobromid (1mg/ml, frisch ansetzen)
- Zellzählkammer
- Zentrifuge
- Falconröhrchen
- Zellmedium mit 50%(v/v)FCS (je nach Zelltyp)

Fixierung:

- steriles 1x PBS
- 2x SSC
- 4%iges Paraformaldehyd/1xPBS (für HLy: 4%PFA/0.25xPBS)
- 1x PBS + 0,05% TritonX100
- 1x PBS + 0,5% TritonX100
- 20% Glycerin/1xPBS
- 0,1N HCl
- 50%Formamid/2xSSC
- flüssiger Stickstoff
- Glasküvetten

Pepsinierung (optional)

- Pepsinlösung (10%ige Lösung in H₂O)
- Paraformaldehyd
- HCl
- MgCl₂
- 2xSSC, 1xPBS
- Glasküvetten

Denaturierung und Hybridisierung:

- Fixierte Zellpräparate auf Coverslips in 50%Formamid/2xSSC
- Hybridisierungsmix mit gelabelten Sonden
- 70%iges Formamid in 2xSSC (auf 72°C vorgewärmt)
- Glasküvetten
- Wasserbad 37°C/72°C/80°C
- Deckglas 18x18mm
- Montagekleber Fixogum
- Metallbox
- Kleenextücher

Waschung, Detektion und Gegenfärbung:

- 2x SSC (auf 37°C vorgewärmt)
- 0,1x SSC (auf 60°C vorgewärmt)
- 4x SSC/Tween (0,2%) (auf 37°C vorgewärmt)
- Wasserbad 37°C/60°C
- Glasküvetten
- Parafilm
- Blockierungslösung (4%BSA in 4xSSC/Tween)
- Antikörperverdünnungslösung (2%BSA in 4xSSC/Tween)
- Nachweisreagenzien (Antikörper je nach Markierung)
- Deckgläser 24x32mm
- Schüttler
- TOPRO-Lösung bzw YOYO-Lösung für Gegenfärbung
- Antifade Vectashield
- Farbloser Nagellack

Methode:

Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen auf Coverslips

- Medium aus Kulturflasche abgießen
- Mit sterilem 1x PBS waschen
- Zellen trypsinieren, anschließend in 20-40ml Medium aufnehmen und durch auf- und abpipettieren resuspendieren
- In Ethanol/Ether gereinigte Coverslips lufttrocknen lassen, in Quadriperms verteilen

- Pro Schälchen 5ml der Zellsuspension zugeben
- Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ mehrere Tage inkubieren, bis Coverslips nahezu konfluent bewachsen sind

Anheftung von in Suspension wachsenden Zellen auf Coverslips

- Ein 2x2cm großer Bereich auf den in Ethanol/Ether gereinigten Coverslips mit 300µl der Polylysinlösung (1mg/ml) bedecken und 1h bei Raumtemperatur inkubieren
- Das Polylysin ablaufen lassen, die Coverslips kurz mit ddH₂O spülen und anschließend lufttrocknen lassen
- Konzentration der in Suspension wachsenden Zellen über eine Zählkammer bestimmen
- Benötigt wird eine Menge von 1x10⁶ Zellen pro Coverslip, entsprechendes Volumen der Zellsuspension in ein Falconröhrchen überführen und 10min bei 1000rpm abzentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet in 50%FCS/RPMI resuspendieren so dass eine Konzentration von etwa 3x10⁶ Zellen/ml entsteht
- Pro Coverslip 300µl dieser Zellsuspension auf den polylysinieren Bereich auftropfen
- Präparate 10-60min im Brutschrank bei 37°C inkubieren, in dieser Zeit heften sich die Zellen aufgrund des Polylysin auf der Coverslip-Oberfläche an

Fixierung:

- Zellen auf Coverslip 3x kurz in vorgewärmten 1xPBS (ohne Natriumazid!) waschen um das Medium vollständig zu entfernen (enthält störende Proteine)
Achtung: Lymphozyten in 0,25xPBS waschen!
- In 4% Paraformaldehyd 10min bei Raumtemperatur fixieren. Für die letzten 2min werden ein paar Tropfen 0,5% TritonX100/PBS auf die Oberfläche des PFAs gegeben (verhindert ein Austrocknen der Präparate)
- Anschließend 3x 5min in 0,05% TritonX100/PBS waschen
- 5min in 0,5% TritonX100/PBS bei Raumtemperatur inkubieren
- Die Coverslips direkt in 20% Glycerol/PBS übertragen, mindestens 30min inkubieren lassen. Die Präparate können auch so über Nacht stehen bleiben.

- Coverslips im flüssigen Stickstoff etwa 30sec lang einfrieren, anschließend bei Raumtemperatur auftauen lassen und in 20% Glycerol/PBS tauchen. Diese Prozedur 4-6x wiederholen
- 3x 5min in 1x PBS waschen
- Coverslips 5-10min lang in 0,1M HCl inkubieren
- 2x 1min in 2xSSC waschen, um das HCl vollständig zu entfernen
- Coverslips in 50%FA/2xSSC equilibrieren und altern lassen (mindestens über Nacht lagern, am besten ein paar Tage lang, bis zu sechs Monaten ohne Qualitätsverlust lagerbar)

Pepsinierung (optional)

- *Pepsinlösung ansetzen:*
49,5ml H₂O + 500µl 1N HCl + 10µl Pepsin Stocklösung (10%), im Wasserbad auf 37°C vorwärmen
- *1%iges PFA ansetzen:*
1g PFA + 100ml 1xPBS, unter ständigem Rühren (Rührfischchen) auf 60°C erhitzen bis Lösung klar wird, anschließend auf RT abkühlen lassen
- Präparate 2min in 2xSSC, anschließend 3min in 1xPBS waschen
- Präparate 4-8min in der Pepsinlösung inkubieren (dabei Anheftung der Zellen mit dem Phasenkontrastmikroskop kontrollieren!)
- Postfixieren in 1% PFA/1xPBS
- 2x 3min in 1xPBS waschen
- 2x5min in 2xSSC waschen
- Präparate zurück in 50%FA/2xSSC stellen, mindestens 1-2h lagern bevor die Hybridisierung angesetzt wird

Denaturierung der Proben und Präparate

Proben:

- Hybridisierungsmixe im 80°C heißem Wasserbad 5min denaturieren
- Anschließend 1-2min auf Eis stellen und abzentrifugieren
- Danach 20-30min ins 37°C warme Wasserbad geben (⇒ Preannealing von Cot-1 an Sonden)

Präparate:

- 70% Formamid im Wasserbad auf 72°C erwärmen
- Objektträger 2min inkubieren
- Anschließend Coverslips sofort in kaltes 50% Formamid (in 2xSSC) zurückstellen und dort bis zur Hybridisierung aufbewahren, diese sollte allerdings möglichst schnell angesetzt werden

Hybridisierung

- 3-4µl des Hybridisierungsmixes auf ein 18x18mm großes Deckglas auftragen
- Coverslip aus dem 50% Formamid nehmen, abtropfen lassen und das vorbereitete Deckglas mit dem Hybridisierungsmix etwa 1,5cm vom unterem Rand entfernt auflegen (möglichst ohne Luftblasen)
- Die Feuchtigkeit um den Rand des Deckglases wird mit einem Kleenextuch vorsichtig entfernt
- Das Deckglas wird mit Fixogum fixiert, dabei muss darauf geachtet werden, dass das Deckglas nicht verrutscht.
- Die fertigen Präparate werden in eine vorgewärmte Metallbox gegeben (37°C, lichtdicht) und circa 48h lang im 37°C Wasserbad inkubiert.

Waschen

- Fixogum abziehen und Deckgläser vorsichtig entfernen (am Besten durch Eintauchen in erste Waschlösung)

- 3x 3min bei 37°C in 2x SSC waschen
- 3x 5min bei 60°C in 0,1x SSC waschen (=stringente Waschung)
- kurz in 4x SSC bei 37°C equilibrieren

Detektion

- 15min Blocken mit 4% BSA (in 4xSSC/Tween) bei 37°C
- AK 5min bei 13.000 rpm abzentrifugieren, passende Verdünnung in 2%BSA Lösung (in 4xSSC/Tween) erstellen
- 150µl der AK-Verdünnung auf einen Objektträger geben und diesen mit Parafilm abdecken, möglichst ohne Luftblasen
- Präparate bei 37°C in einer feuchten Kammer 45 min inkubieren (lichtdicht!)
- Anschließend 3x5 min in 4x SSC/Tween im Dunklen waschen, um überschüssige AK zu entfernen (37°C, Schüttler)
- Genauso mit dem 2.AK und gegebenenfalls mit dem 3.AK verfahren

Gegenfärbung

TOPRO:

- Eine 5µM TOPRO-Arbeitslösung (in 1xPBS oder 2xSSC) herstellen, pro Coverslip 150µl einrechnen
- Die Coverslips in eine vorgewärmte Metallbox geben, pro Präparat 150µl TOPRO-Lösung auftragen
- Die Coverslips werden mit einem Stück Parafilm abgedeckt und so 5-10min lang bei 37°C im Dunklen inkubiert (Wasserbad)
- Kurz in 1xPBS oder 2xSSC abspülen

YOYO:

- Aus der 1M Stock-Lösung eine 2,5µM Arbeitslösung herstellen (2,5µl in 1ml DMSO)

- Diese Arbeitslösung nochmals um den Faktor 1000 mit 1xPBS oder 2xSSC verdünnen (Endkonzentration 2,5nM) und in eine Küvette füllen
- Präparate 40min bei 37°C im Dunklen inkubieren
- Anschließend 2x2min in 1xPBS oder 2xSSC waschen

DAPI:

- DAPI-Stock-Lösung (500µg/ml) in SSC/Tween auf 0,05µg/ml verdünnen (5µl Stocklösung in 50 ml SSC/Tween)
- Präparate 10min in vorgewärmter DAPI-Lösung (in 4xSSC/T) färben
- Kurz in 1xPBS oder 2xSSC abspülen

Versiegeln

- Ein 24x32 Deckglas mit 1-2 Tropfen Vectashield versehen und auf den hybridisierten Bereich auflegen
- Die Feuchtigkeit um den Rand des Deckglases wird mit einem Kleenextuch vorsichtig entfernt
- Anschließend wird das Deckglas mit Nagellack luftdicht versiegelt

2.9 Mikroskopie

2.9.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die Phasenkontrastmikroskopie wurde hauptsächlich verwendet, um das Wachstumsverhalten von Zellkulturen zu überwachen. So wurde zum Beispiel vor einer Subkultivierung der Zellen deren Konfluenz überprüft oder entschieden, wann die nötige Zelldichte zur Durchführung von Versuchen erreicht war. Fertige Präparate wurden nach der Fixierung der Zellen auf ihre Qualität hin untersucht.

Bei Metaphasenpräparaten wurden mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops Areale mit möglichst vielen gespreiteten Chromosomen gesucht und für eine spätere Hybridisierung im Rahmen eines 2D-FISH-Experimentes gekennzeichnet.

Es wurde ein Mikroskop des Typs Axiovert 25C der Firma Carl Zeiss (Jena) verwendet. Tabelle 2.9.1.1 gibt einen Überblick über die Ausstattung.

Tabelle 2.9.1.1: Phasenkontrastmikroskopie

Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25 C, Carl Zeiss (Jena)		
Objektive	CP Achromat x5 / 0,12 CP Achromat x10 / 0,25 Ph1 LD Achrostigmat x20 / 0,3 Ph1 LD Achrostigmat x40 / 0,55 Ph2	Carl Zeiss, Jena

2.9.2 Epifluoreszenzmikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskopie hauptsächlich für die Auswertung und Dokumentation der 2D-FISH-Experimente verwendet. Außerdem wurde am Epifluoreszenzmikroskop die Qualität der 3D-FISH-Experimente überprüft. Es wurde die Vollständigkeit sowie die Stärke der Signale kontrolliert, bevor die Präparate am konfokalen Mikroskop gescannt wurden.

Es wurde ein Mikroskop des Typs Axiophot 2 der Firma Carl Zeiss (Jena) verwendet. Tabelle 2.9.2.1 gibt Auskunft über die Ausstattung.

Tabelle 2.9.2.1: Epifluoreszenzmikroskopie

Epifluoreszenzmikroskop Axiophot 2, Carl Zeiss (Jena)		
Objektive	Plan-Neofluar 16x / 0,5 multi Plan-Neofluar 40x / 1,3 oil Plan-Apochromat 63x / 1,4 oil Plan-Neofluar 100x / 1,3 oil Fluar 40x / 1,3 Ph3 oil	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzfilter	DAPI (BP353-377nm FT 395nm LP 397nm) FITC (BP450-490nm FT 497nm LP 502-542nm) Cy3 (BP534-558nm FT 560nm BP 575-640nm) Cy5 (BP575-625nm FT 645nm BP 660-710nm) Triple-Filter (TBP353/495/570 FT 410/505/585 TBP 460/530/610)	Carl Zeiss, Jena
CCD Kamera	Coolview CCD Camera System MicroMAX 512 BFT	Applied Imaging Newcastle Upon Tyne, UK Visitron Systems

Epifluoreszenzmikroskop Axiophot 2, Carl Zeiss (Jena)		
Software	Cytovision Metavue	Applied Imaging Newcastle Upon Tyne, UK

2.9.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Mittels der konfokalen Laser-scanning Mikroskope wurden die 3D-FISH Experimente dokumentiert. Es wurden 8-bit Bilderstapel der fixierten und hybridisierten Zellen erstellt, die die Analyse der räumlichen Verteilung der detektierten Signale ermöglichten (siehe Abschnitt 2.11 Quantitative Auswertungsmethoden). Gescannt wurde mit einer Voxelgröße von 49nm-100nm in x,y Richtung und 200nm-325nm in z-Richtung.

Die meisten Daten, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden, wurden mit einem LSM410 der Firma Carl Zeiss (Jena) aufgenommen. Das TCS SP2 der Firma Leica (Heidelberg) stand erst gegen Ende dieser Doktorarbeit zur Verfügung. Die Tabellen 2.9.3.1 und 2.9.3.2 zeigen die Ausstattung dieser Mikroskope.

Tabelle 2.9.3.1: Konfokale Mikroskopie, LSM410

Konfokales Laser-scanning Mikroskop LSM410, Carl Zeiss (Jena)		
Objektive	Plan-Neofluar 63x / 1,25 oil Ph3 Plan-Apochromat 63x / 1,4 oil	Carl Zeiss, Jena
Laser	Ar+ Laser 488nm, 15mW HeNe Laser 543nm, 0,5mW HeNe Laser 633nm, 5mW	Carl Zeiss, Jena
Dichromatischer Spiegel	FT 488/543	Carl Zeiss, Jena
Emission Filter	FITC (BP 502-542) Cy3 (BP 575-640) Cy5 (LP 650)	Carl Zeiss, Jena
Software	LSM 410 software Version 3.95	Carl Zeiss, Jena

Tabelle 2.9.3.2: Konfokale Mikroskopie, SP2

Konfokales Laser-scanning Mikroskop TCS SP2, Leica (Heidelberg)		
Objektive	Plan-Apochromat 63x / 1,4 oil	Leica, Heidelberg
Laser	UV-Laser: 405nm Ar+ Laser: 458nm, 5mW 476nm, 5mW 488nm, 20mW 496nm, 5mW 514nm, 20mW DPSS-Laser: 561nm, 10mW	Leica, Heidelberg

Lasere	HeNe-Laser: 594nm, 2,5mW 633nm, 10mW	
Emission Filter	Einstellbares Detektionssystem DAPI FITC Alexa 514 Cy3 Texas Red Cy5	Leica, Heidelberg
Software	TCS-SP2 software	Leica, Heidelberg

2.10 Bildbearbeitung

2.10.1 Prozessierung

Die durch die konfokale Mikroskopie erhaltenen Einzelbilder wurden mittels der Software ImageJ (Version 1.35i, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) prozessiert und für die quantitative Auswertung vorbereitet. Es wurden Bilderstapel erstellt, der axiale Shift korrigiert (anhand von aktuellen Daten einer Shift-Messung mittels beads) und eine Hintergrundreduzierung durch die Ermittlung und Anwendung eines Schwellwertes durchgeführt. Bei Bedarf wurde dieser Prozess durch das Filtern mit einem Gauss Filter unterstützt.

Einzelbilder wurden mit dem Programm Photoshop (Adobe) bearbeitet.

3D-Rekonstruktionen wurden mit der Software Amira 3.2 (TGS) erstellt.

2.10.2 Dekonvolution

Ein mikroskopisches Bild weist immer eine gewisse Unschärfe auf, die durch das optische System verursacht wird. So ist immer Streulicht aus benachbarten Ebenen der Focusebene in einer Aufnahme enthalten. Kennt man alle Aberrationen, die durch die Aufnahmeapparatur eingeführt werden und deren Auswirkungen auf die einzelnen Bildpunkte, kann man mit einem Algorithmus das Originalbild zurückrechnen. Die dazu benötigte PSF (point spread function, die Funktion, die die Unschärfe eines Punktes darstellt) kann für ein gegebenes Mikroskop-Setup theoretisch berechnet oder experimentell bestimmt werden, indem ein Bild von einem fluoreszierenden „bead“ aufgenommen wird.

Für diese Arbeit wurde ein Teil der Daten mit der Software Huygens Essential 2.7 (SVI) unter Verwendung des „Maximum-likelihood-estimation“ (MLE) Algorithmus einer gemessenen PSF dekonvolviert.

Tabelle 2.10.2.1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Parameter für die Dekonvolution:

Tabelle 2.10.2.1: Parameter für die Dekonvolution

Parameter	Einstellung	
Numerical aperture	1.4 (63x oil objective)	
Lens medium refractive index	1.518 (Immersionsöl)	
Specimen medium refractive index	1.457 (Vectashield)	
Pinholeradius Leica SP2 = $(0,61 \times \lambda_{\text{excitation}} \times N_{\text{airydisk}}) / NA$ Leica SP2: $N_{\text{airydisk}} = 1$	DAPI FITC Cy3 / TAMRA TexasRed Cy5	176 nm 213 nm 244 nm 256 nm 276 nm
Excitation Wavelength	DAPI FITC Cy3 TAMRA TexasRed Cy5	405 nm 488 nm 561 nm 561 nm 594 nm 633 nm
Emission Wavelength	DAPI FITC Cy3 TAMRA TexasRed Cy5	461 nm 519 nm 563 nm 568 nm 615 nm 670 nm
Microscope Type	confocal	
Method	cmle	
Signal to noise	< 10 = noisy 10 < 20 = moderate background > 20 = low noise	
Max Iterations	10-20	
Timeout	6000	
Quality Criterion	0.1	
Background Mode	auto	

2.11 Quantitative Auswertungsmethoden

2.11.1 Auswertungen mit der 3D-RRD Software: Analyse der relativen, radialen Verteilung von Signalen in einer Referenzstruktur

Die relative radiale Verteilung der BAC-Signale wurde mit Hilfe der 3D-RRD (3D relative radial distribution) Software ausgewertet, die von Dr. J. von Hase (Arbeitsgruppe C. Cremer, Kirchhoff Institut für Physik, Universität Heidelberg) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe

von T. Cremer entwickelt wurde. Dieses Programm misst relative, radiale Abstände in 3D von beliebigen Signalen zum Mittelpunkt von Objekten (z.B. eines Zellkerns) anhand der Voxelverteilung der Signale. Das Programm wurde in C⁺⁺ geschrieben und läuft unter Linux in der Khoros Software Umgebung. Detaillierte Beschreibungen der Software finden sich in Veröffentlichungen von Cremer et al (2001, 2003) und in der Doktorarbeit von Dr. J. von Hase (von Hase, 2002). Die wichtigsten Schritte werden im Folgenden erklärt:

Filter

Um die Oberflächen der Signalobjekte zu glätten und somit die folgende Segmentierung zu erleichtern, werden die Bilderstapel mit einem 2D Gauss Filter bearbeitet. Für die Gegenfärbung wird dabei ein dreistufiger Filter mit folgenden Masken verwendet: [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 Signale hingegen werden nur einmal mit der ersten Maske gefiltert.

Definition des Schwellenwerts

Um unspezifischen Hintergrund einer Hybridisierung von den Signalen trennen zu können, muss ein Schwellwert definiert werden. Alle Voxel deren Grauwerte geringer sind als dieser Schwellwert werden dann auf den Wert null gesetzt.

Dieser Schwellwert wird durch einen iterativen, automatischen Vorgang ermittelt. Das Programm startet mit einem Schwellwert T₁, der die mittlere Voxelintensität aller Voxel des Datensatzes darstellt. Dann wird der Mittelpunkt aller Voxelintensitäten unterhalb von T₁ (E₁) sowie oberhalb von T₁ berechnet (E₂). E₁ wird als mittlere Intensität des Hintergrunds, E₂ als mittlere Intensität des Signals angesehen. Nun wird ein neuer Schwellwert T₂ erstellt, der die genaue Mitte zwischen E₁ und E₂ darstellt. Ausgehend von diesem neuen Schwellwert T₂ wiederholt sich das Verfahren so lange, bis sich die neu berechneten Schwellwerte nicht mehr ändern, also konvergieren (siehe Abb.2.11.1.1).

Dieser Schwellwert T kann vom Anwender durch den Wert (v) beeinflusst werden. Der Wert T berechnet sich nach der Formel

$$T = (1-v)*E1 + v*E2$$

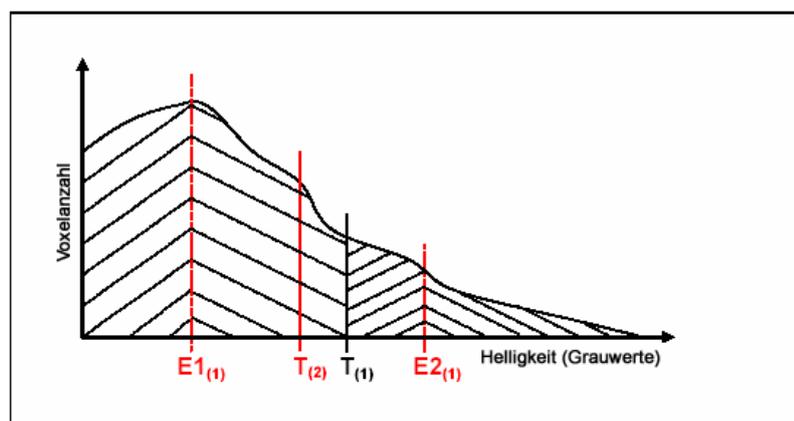


Abb. 2.11.1.1: 3D-RRD Programm
Automatische Berechnung des Schwellwertes

Ist ($v = 0,5$) werden $E1$ und $E2$ gleich gewertet und der Schwellwert ergibt sich aus der Formel $T = (E1+E2)/2$, was der genauen Mitte dieser Werte entspricht. Setzt man höhere v -Werte ein, resultiert das in einem höheren Schwellwert. Dadurch würde ein hellerer Hintergrund verschwinden, die Signale würden aber auch kleiner werden. Ein niedriger v -Wert ergibt einen niedrigen Schwellwert. Für (v) können alle Werte zwischen 0 und 1 eingesetzt werden. Kontrollieren kann der Anwender den richtigen Schwellwert über eine Darstellung des segmentierten Signalobjektes mit der Khorosfunktion Animate. Es werden sowohl der originale Datensatz wie auch der segmentierte Datensatz nebeneinander gezeigt, so dass die Signale verglichen werden können. Bei Bedarf kann der Schwellwert durch eine Veränderung des v -Wertes korrigiert werden.

Definition der Gegenfärbung

Um die Ausdehnung der Gegenfärbung der Referenzstruktur so exakt wie möglich definieren zu können wird ein weiterer Segmentierungsschritt angewendet. Zunächst wird der Intensitäts-Schwerpunkt der Gegenfärbung aus dem bereits schwellwertkorrigierten Datensatz berechnet. Dann wird jeder Voxel mit einem Grauwert über null durch eine gerade Linie mit diesem Schwerpunkt verbunden. Durchläuft nun eine dieser Linien einen Voxelbereich, der zuvor bei der Schwellwertkorrektur gleich Null gesetzt wurde oder von vorn herein den Wert null inne hatte und somit als außerhalb der Gegenfärbung liegend klassifiziert wurde, wird der dazugehörige Voxel ebenfalls gleich Null gesetzt. Dadurch werden alle Voxel außerhalb der Gegenfärbung, die unterhalb des Schwellwerts liegen, gelöscht.

Dieser Schritt limitiert allerdings auch die Form der Objekte, die mit Hilfe dieses Programms ausgewertet werden können. Ideal sind runde bis oval geformte Oberflächen wie Zellkerne. Ein sichelförmiges Chromosomenterritorium dagegen würde in diesem Schritt abgeschnitten werden (siehe Abb.2.11.1.2). Aus diesem Grund konnten in dieser Arbeit mit diesem Programm nicht alle Chromosomenterritorien als Gegenfärbung ausgewertet werden, es musste eine sorgfältige Auswahl nach der äußeren Form getroffen werden.

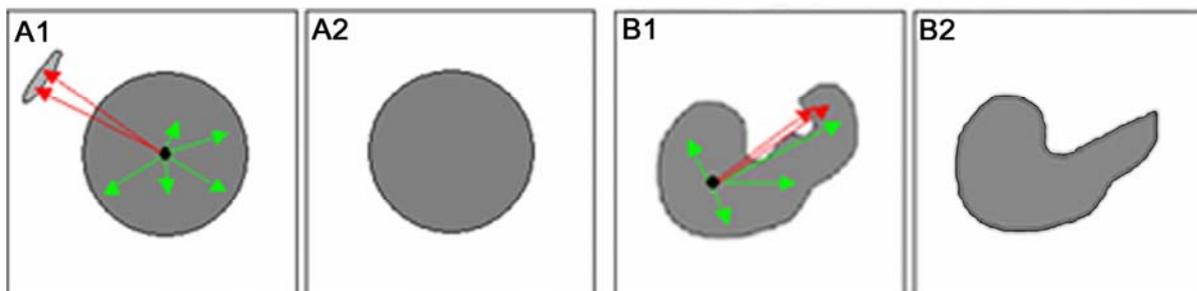


Abb. 2.11.1.2: Segmentierung mit dem 3D-RRD Programm

Jeder Voxel wird mit dem Intensitäts-Schwerpunkt des Objektes durch eine gerade Linie verbunden. Durchläuft nun eine Linie einen Bereich mit dem Grauwert null (hier rot dargestellt), werden die entsprechenden Voxel ebenfalls auf null gesetzt. Grüne Linien stehen für Voxel, die in diesem Segmentierungsschritt nicht gelöscht werden.

A Segmentierung eines runden Objektes, z.B.: ein Zellkern. (A1) Ausgangssituation (A2) Resultat

B Segmentierung eines unregelmäßigen Objektes, z.B.: ein CT. (B1) Ausgangssituation (B2) Resultat

Berechnung der relativen, radialen Abstände und Segmentierung

Alle berechneten Abstände werden von dem Programm als relative Abstände angegeben. Das wird erreicht, indem der absolute Abstand eines Voxels zum Gegenfärbungsmittelpunkt durch den Abstand des am periphersten gelegenen Voxels der Gegenfärbung, der auf der selben Linie durch den Mittelpunkt der Gegenfärbung und dem zu messenden Voxel liegt, geteilt wird (siehe Abb. 2.11.1.3). So liegen alle Werte zwischen 0 bzw. 0% (der Voxel liegt genau im Mittelpunkt) und 1 bzw. 100% (der Voxel liegt genau auf der Oberfläche der Gegenfärbung). Als Mittelpunkt der Gegenfärbung wird hierbei der geometrische Schwerpunkt und nicht der Intensitäts-Schwerpunkt verwendet, das bedeutet die Voxel der Gegenfärbung werden nicht nach ihrer Intensität (ihrem Grauwert) gewertet.

Um die limitierte Auflösung des Mikroskops (und damit auch die des damit erstellten Datensatzes) auszugleichen, wird der Zellkern in 25 Schalen mit gleichem Abstand unterteilt. Die äußerste Schale entspricht dabei der Oberfläche der segmentierten Gegenfärbung, die inneren Schalen spiegeln ebenfalls diese Form wieder. Jede Schale hat die Dicke Δr ($\Delta r = 1/25 r_0$, siehe Abb.2.11.1.3), was mit einem zunehmenden Volumen in den äußeren Schalen einhergeht. Die ermittelten, relativen Abstände der Signalvoxel werden nun diesen Schalen zugeordnet (alle Werte zwischen 0 und 0,04 werden Schale 1 zugeordnet, die Werte zwischen 0,04 und 0,08 der Schale 2 usw.).

Der relative DNA-Gehalt definiert sich schließlich als die Gesamtintensität der Voxel in einer Schale geteilt durch die Gesamtintensität aller Voxel des Signals in allen Schalen, also der Anteil eines angefärbten Objekts innerhalb einer Schale. In der graphischen Darstellung wird der relative DNA-Gehalt auf der Ordinate aufgetragen, während die einzelnen Schalen auf der Abszisse zu finden sind.

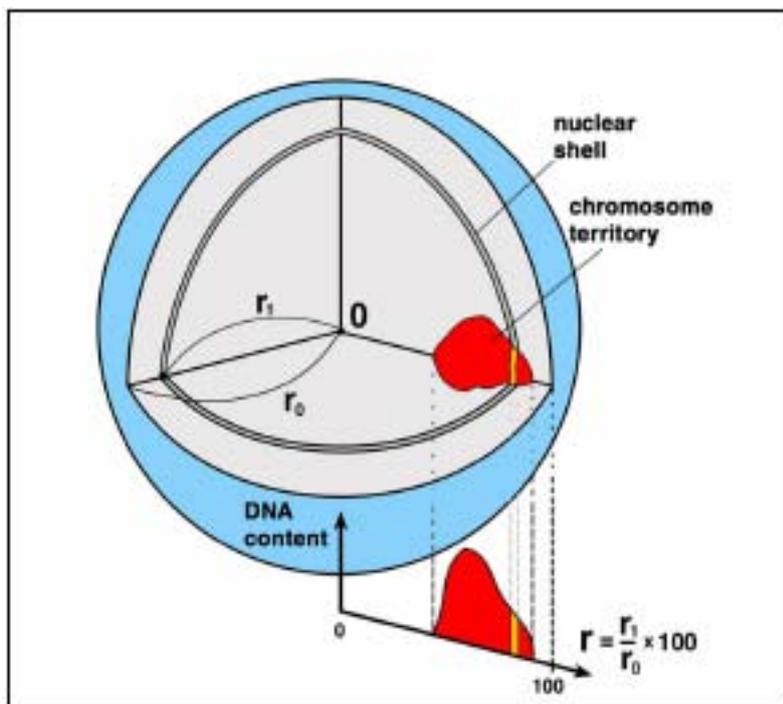


Abb. 2.11.1.3: 3D-RRD Programm Schematisches Beispiel. Als Gegenfärbung ist ein Zellkern (blau) dargestellt, das auszuwertende Signal ist ein CT (rot).

r = relativer Abstand

r_1 = absoluter Abstand des Voxels

r_0 = absoluter Radius

0 = Mittelpunkt der Gegenfärbung

Mit Gelb sind die Voxel des segmentierten Signals markiert, die sich in der gezeigten Schale befinden. Der relative DNA Gehalt des Signals wird als Kurve dargestellt

(Bild mit freundlicher Genehmigung aus Tanabe et al., 2002b)

Die relative, radiale Verteilung eines Signals für die gesamte Stichprobenzahl einer Auswertung wird schließlich aus den Mittelwerten der einzelnen DNA Gehalte jedes Kerns in den einzelnen Schalen zusammengestellt. Zusätzlich wird die Standardabweichung und die Standardabweichung der Mitte berechnet

Das Skript *3dthresh.sh* ermöglicht dem Anwender die Anpassung des Schwellwertes über die oben beschriebenen v -Werte, *3dshell.sh* führt mit diesen Schwellwerten die eigentliche Auswertung durch und *3dfinal.sh* mittelt schließlich die Werte und berechnet die Standardabweichungen.

2.11.2 Erweiterung des 3D-RRD Programms: Auswertung von CTs

Wie bereits beschrieben konnten nicht alle CTs aufgrund ihrer unregelmäßigen Form mit dem 3D-RRD Programm ausgewertet werden. Ein weiteres Problem stellte die Verteilung der BAC-Signale dar. In nahezu allen Territorien konnten Signale gefunden werden, die an der Grenze der Territorien oder sogar außerhalb der Territorien lokalisieren. Dieses Phänomen kann mehrere Ursachen haben. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die verwendeten paint-Sonden nicht 100% der Territorien nachweisen, aber auch mangelnde Auflösung des Mikroskops oder ein höherer Hintergrund und damit ein etwas zu hoch angesetzter Schwellwert könnten dazu beitragen. Nachgewiesener Weise kann es in Einzelfällen auch zur Ausstülpung großer „Chromatinloops“ aus dem Territorium kommen (Spector, 2003; Volpi et al., 2000; Williams et al., 2002). Solche Signale würden für die Auswertung verloren gehen, da die Schalen nur innerhalb des segmentierten Chromosomenterritoriums angelegt werden.

Daher wurde in Zusammenarbeit mit Dr. J. von Hase für diese Arbeit eine Erweiterung der 3D-RRD Software entwickelt. Es wurde zusätzlich ein frei wählbarer Faktor eingeführt, mit dem sich die angelegten Schalen beliebig vergrößern lassen. Für die Auswertung der Territorien in dieser Arbeit wurden 15 Schalen angelegt. Für die Vergrößerung der Schalen wurde der Faktor drei gewählt. So verbleiben noch 5 innere Schalen in den Territorien, 10 weitere umgeben sie als äußere Schalen (siehe Abb.2.11.2.1). Diese äußeren Schalen können nun auch Signale dokumentieren, die sich außerhalb des darstellbaren Territoriums befinden.

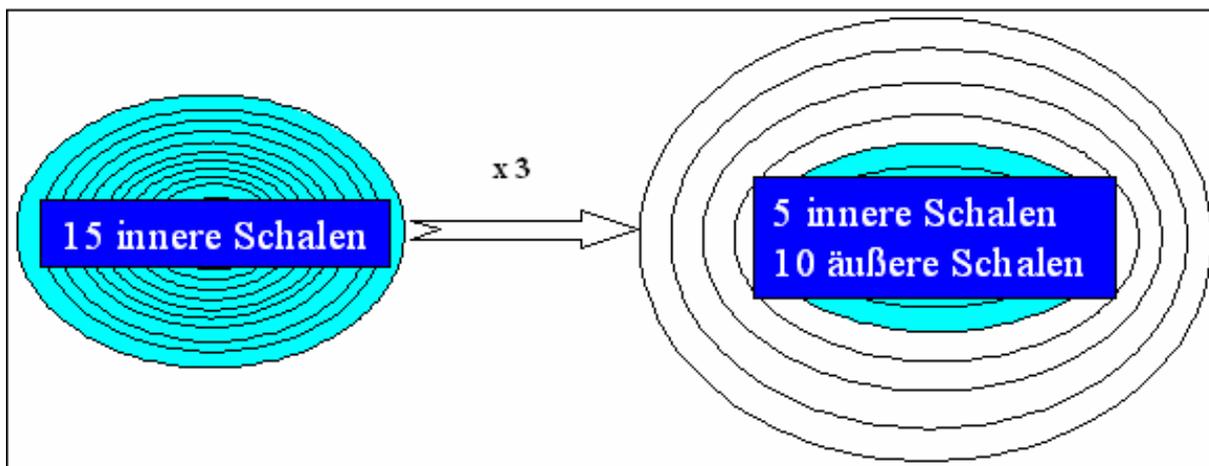


Abb. 2.11.2.1: Erweiterung des 3D-RRD Programmes

15 angelegte Schalen werden mit dem Faktor 3 vergrößert. Das resultiert in 5 inneren und 10 äußeren Schalen.

Die Skripte für die Erweiterung werden *3dshellsvergr.sh* und *3dfinalvergr.sh* genannt. Die Bestimmung des Schwellwertes erfolgt nach wie vor über *3dthresh.sh*

2.11.3 Auswertungen mit der ADS Software: Bestimmung von absoluten Abständen zur Oberfläche einer Referenzstruktur

Die Abstände der BAC-Signale zur Oberfläche der Chromosomenterritorien wurden mit Hilfe der ADS (absolute distances to surfaces) Software ausgewertet, die von Dr. J. von Hase (Arbeitsgruppe C. Cremer, Kirchhoff Institut für Physik, Universität Heidelberg) in Kooperation mit dieser Arbeit entwickelt wurde. Das Programm wurde in C⁺⁺ geschrieben und läuft unter Linux in der Khoros Software Umgebung.

Die ADS-Software ermittelt die kürzesten Abstände eines Signals zur Oberfläche eines beliebigen Objektes. Die wichtigsten Schritte werden im Folgenden erklärt:

Hintergrundreduzierung über einen Schwellwert

Das Programm entfernt den störenden Hintergrund einer Hybridisierung mittels eines Schwellwertes [th], der vom Anwender für jeden einzelnen Zellkern und jeden einzelnen Farbkanal individuell festgelegt werden kann. Dabei werden alle Grauwerte des bereits normalisierten Bilderstapels, die unterhalb der definierten Schwelle liegen, auf null gesetzt.

Dieser Schwellwert kann in der Software selbst bestimmt werden, es ist aber auch möglich bereits ermittelte Werte aus anderen Programmen (wie z.B. ImageJ) zu verwenden.

Hintergrundreduzierung über die Objektgröße

Zusätzlich kann in der ADS-Software auch eine Hintergrundreduzierung über die Definition einer Mindestobjektgröße erreicht werden. Nach Anwendung des vorher ermittelten Schwellwertes zählt das Programm alle verbliebenen Objekte und gibt deren Voxelanzahl an. Dabei werden alle Voxel zu einem Objekt gezählt, die sich entweder an einer Seitenfläche, einer Kante oder einer Ecke berühren. Nun kann man eine Mindestvoxelanzahl über den Wert [os] bestimmen. Alle Objekte deren Voxelanzahl unter diesem Wert liegen werden gelöscht (bzw. ihre Voxel auf null gesetzt).

Kontrollieren kann der Anwender den richtigen Grenzwert über eine Darstellung der Objekte mit der Khorosfunktion Animate. Es werden sowohl der originale Datensatz wie auch der Datensatz nach der Objektgrößenkorrektur nebeneinander gezeigt, so dass die Signale verglichen werden können. Zusätzlich definiert das Programm in einer Textausgabe die Größe (Voxelanzahl) der nach der Korrektur verbliebenen Objekte. Bei Bedarf kann der Wert [os] korrigiert werden.

Definition des auszuwertenden Bereiches

Der Anwender kann die Größe des auszuwertenden Bereiches frei bestimmen. Dies geschieht über die Variablen [dmin] und [dmax]. [dmin] gibt dabei den maximalen Abstand zur Oberfläche an, der im Inneren eines auszuwertenden Objektes gemessen werden soll, [dmax] entsprechend den maximalen Abstand zur Oberfläche, der außerhalb des auszuwertenden Objektes gemessen werden soll. Nun kann auch noch die Schalendicke [db] definiert werden,

die bestimmt in wie viele Klassen die später errechneten Abstände mittels einer Häufigkeitsverteilung eingeordnet werden. Sinnvoll für die Festlegung der Schalendicke [db] ist eine Orientierung an dem zum Scannen der Zellen benutzten Abstand in der z-Richtung. [dmin] und [dmax] sollten ein Vielfaches von [db] sein. Die Eingabe dieser Variablen erfolgt in der Einheit [nm].

Zusätzlich zu den so definierten Schalen legt das Programm automatisch noch eine innere sowie eine äußere Zusatzschale an. Die innere Zusatzschale umfasst dabei den Bereich ab der letzten definierten inneren Schale bis $-\infty$, die äußere Zusatzschale den Bereich ab der letzten definierten äußeren Schale bis $+\infty$. So wird sichergestellt, dass kein Signal verloren gehen kann.

In der Abbildung 2.11.3.1 werden diese Variablen noch einmal graphisch dargestellt:

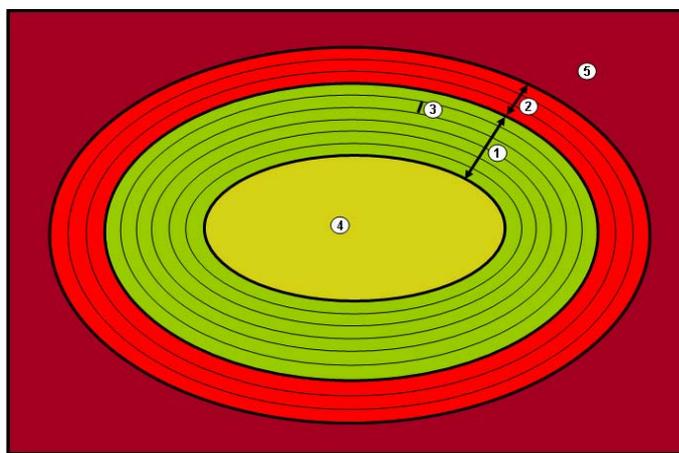


Abb 2.11.3.1: Variablen im ADS-Programm

- 1) [dmin], innere Schalen sind in grün dargestellt
- 2) [dmax], äußere Schalen sind in rot dargestellt
- 3) [db], Schichtdicke der einzelnen Schalen
- 4) $-\infty$ Schale
- 5) $+\infty$ Schale

Definierung der CT-Oberfläche und Messung der Abstände

Ein großer Vorteil der ADS Software gegenüber der 3D-RRD Software ist, dass das Programm beliebig geformte Oberflächen auswerten kann, z. B. auch sichelförmige CTs wie in Abbildung 2.11.1.2. Die Ausdehnung eines Objekts wird durch seine Helligkeit, bzw. durch eine schwellwertrelevante Helligkeitsänderung in seiner Umgebung definiert. Das bedeutet praktisch, dass alle Voxel, deren Grauwert über dem vorher ermittelten Schwellwert liegen, zu dem auszuwertenden Objekt gezählt werden, auch wenn sie räumlich getrennt sind. Hier wird noch einmal die Bedeutung des richtig gewählten [os] Wertes deutlich.

Nun soll der Abstand eines Signals zu dieser Oberfläche ermittelt werden. Hierbei betrachtet das Programm jeden Signalvoxel extra. Die Vorgehensweise des Programms kann durch folgende Vorstellung erklärt werden: Zunächst wird eine imaginäre Kugel um den Voxel gelegt. Liegt in oder auf ihr keine relevante Helligkeitsänderung vor, so befindet sich auch kein Stück der Oberfläche in ihr. Nun wird die Kugel schrittweise vergrößert, solange bis mindestens ein Punkt der Kugelschale diese schwellwertabhängige Helligkeitsänderung überschreitet und somit die Oberfläche erreicht. Der Radius dieser Kugel entspricht dem Abstand vom Kugelmittelpunkt, der der zu untersuchende Signalvoxel ist, zur Oberfläche (siehe Abb. 2.11.3.2). Die Software verwendet für diesen Schritt stetig größer werdende Vektoren, die von dem zu untersuchenden Signalvoxel ausgehen. Die einzelnen Vektorenlängen werden dabei durch die Voxeldimension der Aufnahme bestimmt.

Um die limitierte Auflösung des Mikroskops (und damit auch die des damit erstellten Datensatzes) auszugleichen, wird das auszuwertende Objekt nun in die vorher definierten Schalen unterteilt. Die Oberflächen dieser Schalen haben alle exakt den gleichen Abstand zur Oberfläche ihrer benachbarten Schalen, sie sind äquidistant. Das hat zur Folge, dass die Form der Objekte von Schale zu Schale nicht erhalten bleibt. Nach außen hin sehen die Schalen zunehmend kugelförmiger aus, nach innen wird die Form immer zerklüfteter, es können auch voneinander getrennte Regionen entstehen, die zur selben Schale gehören (siehe Abb. 2.11.3.2)

Die gemessenen Abstände der Signalvoxel werden mittels einer Häufigkeitsverteilung diesen Schalen zugeordnet, wobei die Schalen den Klassen entsprechen. Der relative DNA-Gehalt definiert sich schließlich als die Gesamtintensität der Voxel in einer Schale geteilt durch die Gesamtintensität aller Voxel des Signals in allen Schalen, also der Anteil eines angefärbten Objekts innerhalb einer Schale. In der graphischen Darstellung wird der relative DNA-Gehalt auf der Ordinate aufgetragen, während die einzelnen Schalen auf der Abszisse zu finden sind.

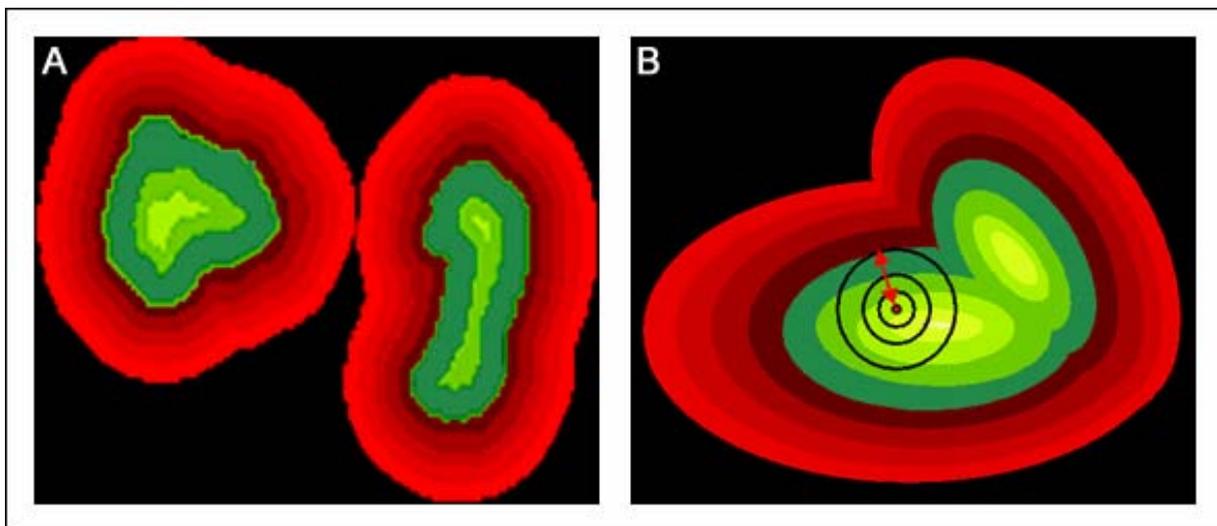


Abb. 2.11.3.2: Das ADS Programm

A) Darstellung der Segmentierung zweier CTs in der ADS Software. Der gesamte grüne Bereich entspricht der Ausdehnung der Territorien. Die äußeren Schalen sind in rot, die inneren Schalen in grün dargestellt.

B) Schematische Darstellung der Abstandsmessung mittels ADS. Der gesamte grüne Bereich entspricht der Ausdehnung eines Territoriums. Die äußeren Schalen sind in rot, die inneren Schalen in grün dargestellt. Der Abstand des Signals zur Oberfläche des Territoriums wird durch immer größere Kugeln gemessen, die um das Signal gelegt werden. Berührt die Kugelschale mit nur einem Punkt die Oberfläche gibt ihr Radius den kleinstmöglichen Abstand an.

Die Abstandsverteilung eines Signals zur Oberfläche der Referenzstruktur für die gesamte Stichprobenzahl einer Auswertung wird schließlich aus den Mittelwerten der einzelnen DNA Gehalte in den einzelnen Schalen zusammengestellt. Zusätzlich wird die Standardabweichung und die Standardabweichung der Mitte berechnet.

Das Skript `schwewert_delete.sh` ermöglicht dem Anwender die Anpassung des Schwellwertes [th] und die Einführung einer Mindestvoxelanzahl über Definition des Wertes

[os], *schalen.sh* führt mit diesen Werten die eigentliche Auswertung durch und *auswertung.sh* mittelt schließlich die Werte und berechnet die Standardabweichungen.

Eine genaue Anleitung zum ADS-Programm findet sich im Abschnitt 7.4. im Anhang.

2.11.4 Auswertungen mit der eADS Software

Das eADS Programm wurde von Tobias Thormeyer im Rahmen seiner Diplomarbeit in unserem Labor entwickelt. Es ist eine Weiterentwicklung des ADS Programms von Johann von Hase, die es ermöglicht große Datenmengen effektiv in einer kürzeren Zeit auszuwerten. Die Programmierung erfolgte in der Entwicklungsumgebung von MATLAB v7 (Mathworks). Einzelne Subroutinen wurden in C/C++ geschrieben. Das Programm ist in verschiedenen Versionen unter Windows, Linux und Macintosh lauffähig.

Das Programm ist in der Lage die kürzeste Distanz sowie die mittlere oder auch die mediane Distanz eines Signals zu einer definierten Oberfläche einer Referenzstruktur (z.B. eines Zellkerns, eines Chromosomenterritoriums oder ähnliches) zu messen, unabhängig von ihrer Form. Die Auswertung erfolgt voxelbasiert.

Der Benutzer hat die Auswahl zwischen zwei Auswertungsmethoden, die beide ein identisches Ergebnis liefern, aber je nach Art der eingelesenen Dateien eine schnellere Laufzeit garantieren. Enthält der Referenzdatensatz eine geringe Anzahl an Voxeln aber dafür eine große Oberfläche (wie zum Beispiel hyperkondensiertes Chromatin oder unregelmäßig geformte Chromosomenterritorien) wird die „iterative Methode“ empfohlen, hat die Referenzstruktur dagegen eine große Anzahl an Voxeln aber eine relativ geringe Oberfläche (wie zum Beispiel ein Zellkern) liefert die „non-iterative Methode“ ein schnelleres Ergebnis.

Auswertungen mit der iterativen Methode

Zunächst wird mit dem eADS-Filemaker eine Parameterdatei erstellt, die die Informationen der auszuwertenden Daten enthält (wie Voxeldimensionen, Schwellwerte, Bildgröße, Definition des Referenzkanals bzw. der Signalkanäle, Mindestobjektgrößen und ähnliches). Diese Parameterdatei wird vom Programm ausgelesen und die Bilder anhand der spezifischen Parameter für die Auswertung vorbereitet. Es wird der angegebene Schwellwert gesetzt, eine 3D Objekterkennung durchgeführt und Objekte, die kleiner als die vorgegebene Mindestobjektgröße sind, gelöscht. Diese Prozessierung erfolgt für den Referenzkanal sowie für alle Signalkanäle.

Nun startet der Algorithmus zur Distanzbestimmung. Dabei werden um das zu vermessende Signal im 3D-Raum drei verschiedene Radien (abhängig von der angegebenen Voxeldimension in x, y und z Richtung) gelegt. Da die Voxelgröße in z-Richtung in den verwendeten Datensätzen größer ist als die Voxelgrößen in x und y-Richtung entsteht hierbei ein Ellipsoid. Alle Voxel innerhalb des Volumens dieses Ellipsoids werden für die Auswertung berücksichtigt. Ist innerhalb des Ellipsoids kein Voxel enthalten das im Referenzkanal eine schwellwertrelevante Helligkeitsveränderung aufweist, werden die Radien solange iterativ vergrößert (wobei Radiengröße = Voxeldimension x Iteration) bis diese schwellwertrelevante Helligkeitsveränderung für mindestens einen Voxel gefunden wird. Dann werden die Koordinaten dieses Voxels bestimmt und über die Koordinaten des zu

vermessenden Signals die Distanz zwischen diesen beiden Punkten bestimmt. Sollten mehrere „Referenzvoxel“ gefunden worden sein, werden alle Abstände gemessen und je nach Programmeinstellung daraus der kürzeste, der mittlere oder der mediane Abstand ermittelt.

Ist die Distanzmessung für alle Signalvoxel abgeschlossen erfolgt eine Einordnung der gemessenen Abstände in Klassen, wobei der maximale Abstand die Anzahl der Klassen vorgibt. Die gewünschte Klassengröße wurde vorher vom Anwender in der Parameterdatei definiert.

Zusätzlich werden noch die nach der Intensität der Voxel gewichteten Häufigkeiten ermittelt. Dafür wird für jeden Kanal die maximale Intensität ermittelt und auf 256 Grauwerte normalisiert. Die Gewichtung jedes einzelnen Signalvoxels wird nach folgender Formel durchgeführt:

$$G = \frac{256}{(I_{\max} - I_{\min} + 1) \cdot (I_{(x,y,z)} - (I_{\min} - 1))}$$

I_{\max} = maximale Intensität
 I_{\min} = minimale Intensität
 $I_{(x,y,z)}$ = Intensität des Voxels

Die gewichteten Häufigkeiten werden für den Referenzkanal sowie für alle Signalkanäle in jedem verwendeten Datensatz einzeln ermittelt. Die Summe der Intensitäten aller Klassen für jeden Kanal wird auf 100% gesetzt.

Zusätzlich werden für alle Kanäle statistische Werte berechnet, wie das gewichtete und nicht gewichtete erste und dritte Quartil, der gewichtete und nicht gewichtete Median und Mittelwert sowie der minimale und maximale Abstand.

Die gewichteten Häufigkeiten der einzelnen Klassen werden über alle in der Auswertung verwendeten Datensätze gemittelt. Die Standardabweichung sowie der Fehler des Mittelwertes werden ebenfalls berechnet. Alle diese Werte sind in einer Auswertungsdatei („auswertung.asc“) zu finden, die mit Excel oder anderen Texteditoren ausgelesen werden kann.

Auswertung mit der non-iterativen Methode

Auch für die non-iterative Methode wird mit dem eADS-Filemaker eine Parameterdatei erstellt, die alle relevanten Informationen der auszuwertenden Daten enthält (wie Voxeldimensionen, Schwellwerte, Bildgröße, Definition des Referenzkanals bzw. der Signalkanäle, Mindestobjektgrößen und ähnliches). Diese Parameterdatei wird vom Programm ausgelesen und die Bilder anhand der spezifischen Parameter für die Auswertung vorbereitet. Es wird der angegebene Schwellwert gesetzt, eine 3D-Objekterkennung durchgeführt und Objekte die kleiner als die vorgegebene Mindestobjektgröße sind gelöscht. Diese Prozessierung erfolgt für den Referenzkanal sowie für alle Signalkanäle.

Nun startet der Algorithmus zur Distanzbestimmung. Zunächst wird die Oberfläche der Referenzstruktur bestimmt. Dafür werden alle Koordinaten der Referenzvoxel gespeichert, die mit mindestens einer Seitenlänge unmittelbar an einen Voxel mit einer Intensität von null angrenzen. Für die Abstandsmessung werden nun alle Abstände zwischen diesen

Referenzvoxeln und dem auszuwertenden Signalvoxel berechnet und der kürzeste (bzw. der mediane oder mittlere) Abstand daraus ermittelt.

Die Einordnung der ermittelten Distanzen in Klassen, die Gewichtung nach der Intensität sowie die Berechnung der gemittelten Häufigkeitsverteilung und der statistischen Größen erfolgt wie bereits für die iterative Methode beschrieben.

Normalisierung der absoluten Abstände

Das eADS Programm ermittelt absolute Distanzen (in nm). Um die Ergebnisse der Abstandsmessungen innerhalb von Zellkernen verschiedener Experimente miteinander vergleichen zu können, kann eine Normalisierung durchgeführt werden. Hierfür muss der Referenzkanal als zusätzlicher Signalkanal definiert werden, um die Häufigkeitsverteilung der möglichen Abstände innerhalb eines Zellkerns zu erhalten. Aus diesen Werten wird für jeden Zellkern die maximale Distanz selektiert und für die Normalisierung auf 1 gesetzt. Alle gefundenen Abstände in den zu einem bestimmten Zellkern gehörenden Signalkanälen werden durch diesen Maximalwert geteilt und die daraus resultierenden Werte (zwischen 0 und 1) werden mittels einer Häufigkeitsverteilung in zehn Klassen geordnet. Die Gewichtung nach der Intensität sowie die Berechnung der gemittelten Häufigkeitsverteilung und der statistischen Größen erfolgt wie bereits für die iterative Methode beschrieben.

2.11.5 Distanzmessungen mit ImageJ (Version 1.35i): Messung der Abstände zwischen mehreren Signalen

Die Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) bietet verschiedene Möglichkeiten Abstände zwischen mehreren Objekten im 3D-Raum zu bestimmen. In dieser Arbeit wurden die Distanzen zwischen verschiedenen BAC-Signalen sowohl über die Koordinaten der Intensitätsschwerpunkte (intensity gravity center) der Signale berechnet (PlugIn: „SyncMeasure3D“), wie auch mit dem von Joachim Walter entwickeltem PlugIn „Correlation function 3D“, das eine voxelbasierte Auswertung der Abstände durchführt.

2.11.5.1 Distanzmessungen mit „SyncMeasure3D“

Das PlugIn „SyncMeasure3D“ kann 3D-Abstände zwischen den Intensitätsschwerpunkten beliebig vieler Objekte berechnen. Um die Ergebnisse in μm zu erhalten, wurde zunächst im Programm die Voxeldimensionen des auszuwertenden Bildstapels definiert (Image – Properties). Dann wurde das PlugIn aktiviert (Analyse – Tools – SyncMeasure3D) und pro auszuwertendem BAC-Signal eine Kopie des Bildstapels geöffnet. Alle offenen Bildstapel wurden synchronisiert (im Sync-Measure-Fenster: „Synchronize all“, dabei das Feld „Synchronize Cursor“ inaktivieren), und in jeder Kopie ein auszuwertendes BAC-Signal durch Einrahmen (freehand selections) markiert. Nach Aktivierung der Messungsoptionen (im Sync-Measure-Fenster: „Start Measurements“) konnte zusätzlich für jeden Bilderstapel ein eigener Schwellwert und bei Bedarf der Ausschnitt an z-Sections, der das auszuwertende Signal beinhaltet, bestimmt werden. Durch einen Doppelklick in eine beliebige markierte Region wurde die Berechnung gestartet. Die Ergebnisdatei enthielt unter anderem die

Koordinaten der einzelnen Intensitätsschwerpunkte sowie alle Abstände zwischen allen markierten BAC-Signalen. Sie wurde in Excel geöffnet und weiter verarbeitet. Hier wurden die gemessenen Abstände in Form einer Häufigkeitsverteilung graphisch dargestellt und sowohl insgesamt als auch für die einzelnen Chromosomenterritorien gemittelt. Als Signifikanztest wurde der Kolmogoroff Smirnow Test verwendet.

Auf diese Weise wurden in dieser Arbeit für einen Teil der Experimente die Abstände aller Signale eines BAC-Pools zum entsprechenden Chromosomenterritorium gemessen (z.B.: R-BACs zu CT, G-BACs zu CT), sowie alle Abstände innerhalb eines BAC-Pools (z.B.: R-BACs zu R-BACs, G-BACs zu G-BACs) und alle Abstände zwischen den BAC-Signalen zweier korrespondierender BAC-Pools (z.B.: R-BACs zu G-BACs).

2.11.5.2 Distanzmessungen mit „Correlation function 3D“

Das von Joachim Walter entwickelte PlugIn „Correlation function 3D“ misst Distanzen zwischen beliebig vielen Objekten auf eine voxelbasierte Weise. Hier werden alle Signalvoxel innerhalb eines Farbkanals erfasst und die Distanzen innerhalb eines Farbkanals sowie zwischen zwei verschiedenen Farbkanälen berechnet.

In dieser Arbeit wurde mit einer Stapelverarbeitung gearbeitet, die es ermöglichte eine größere Stichprobenzahl an Chromosomenterritorien in einer Berechnung zusammenzufassen. Dafür wurde zunächst eine Parameterdatei für den auszuwertenden Datensatz angelegt, die die Schwellwerte und Voxeldimensionen inklusive Einheit (μm) enthielt. Zusätzlich wurde ein maximaler Abstand (Referenzlänge, $10\mu\text{m}$) und die Klassengröße für die Häufigkeitsverteilung (bin size, $0.2\mu\text{m}$) festgelegt. Dann wurde ein Vorlageskript für die Stapelverarbeitung angelegt, in dem die Pfade für die Bilddateien, den Ergebnisordner und die Namen für die einzelnen Ergebnisdateien festgelegt wurden. Das PlugIn wurde gestartet, indem dieses fertige Vorlageskript mittels „drag and drop“ in die ImageJ Konsole gezogen wurde. In dem sich öffnenden Fenster wurde die Anwendung gestartet (File – Run Macro). In den angelegten Ergebnisdateien finden sich für jeden ausgewerteten Datensatz nochmals die Angaben aus der Parameterdatei sowie die Gesamtzahl der Signalvoxel innerhalb eines Farbkanals, deren Gesamtintensität sowie eine Häufigkeitsverteilung der Abstände in Prozent. Mit Excel wurden die Häufigkeiten in den einzelnen Klassen gemittelt, die Standardabweichung bestimmt und beides graphisch dargestellt.

Auf diese Weise wurden in dieser Arbeit für einen Teil der Experimente alle Abstände innerhalb eines BAC-Pools (z.B.: R-BACs zu R-BACs, G-BACs zu G-BACs) und alle Abstände zwischen den BAC-Signalen zweier korrespondierender BAC-Pools (z.B.: R-BACs zu G-BACs) gemessen.

Im Anhang findet sich unter dem Abschnitt 7.5 ein Beispiel für eine Parameterdatei und ein Vorlageskript für die Stapelverarbeitung mit diesem PlugIn.

2.11.6 Statistische Auswertung

Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm SigmaStat v3.00 verwendet. Für die Verteilungskurven der 3D-RRD, ADS und eADS Auswertungen wurde der Wilcoxon Signed

Rank Sum Test verwendet, als Werte wurden hierbei die gewichteten Mittelwerte der Verteilungen der einzelnen ausgewerteten Zellkerne/Chromosomenterritorien eingesetzt. Für die statistische Auswertung der linearen Regression wurde der R^2_{adj} angegeben.

Für die Distanzmessungen mittels ImageJ wurde der Kolmogoroff Smirnow Test verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Zusammenstellung der BAC-pools

3.1.1 Eigenschaften der menschlichen Chromosomen 11, 12, 18 und 19

In dieser Arbeit wurde die räumliche Anordnung von subchromosomalen Chromatinabschnitten mit bestimmten Eigenschaften im Zellkern sowie deren Organisation innerhalb ihres Chromosomenterritoriums untersucht. Für diese Analyse wurden die menschlichen Chromosomen 11, 12, 18 und 19 auf Grund ihrer verschiedenen Eigenschaften ausgewählt.

Chromosom 19 ist mit einer durchschnittlichen Gendichte von 27,5 Genen pro Mb das genreichste Chromosom im menschlichen Genom. Die Gene sind in etwa gleichmäßig über das ganze Chromosom verteilt, mit Ausnahme der genarmen Region 19p12 – 19q12, die das Centromer umschließt (siehe Abb. 3.1.1.1). Die exakte Gendichte in diesem 18Mb langen Abschnitt ist nicht bekannt, da die dort häufig vorkommenden repetitiven Sequenzen eine durchgängige Sequenzierung verhindern (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens). Das Chromosom 19 lässt sich nahezu zu gleichen Teilen in R- und nur schwach gefärbten G-Banden aufteilen, die Gesamtheit aller G-Banden weist überraschenderweise sogar eine leicht höhere mittlere Gendichte auf als die R-Banden. Weiterhin enthält es ungewöhnlich viele Alu-Sequenzen (diese nehmen mehr als 25% des gesamten Chromosoms ein), einen hohen GC-Gehalt und es zeigt, wieder mit Ausnahme der Pericentromerregion, insgesamt eine sehr hohe transkriptionelle Aktivität und eine frühe Replikationszeit (Caron et al., 2001; Grimwood et al., 2004; Versteeg et al., 2003). Tabelle 3.1.1.1 gibt eine Übersicht über die Eigenschaften des menschlichen Chromosoms 19.

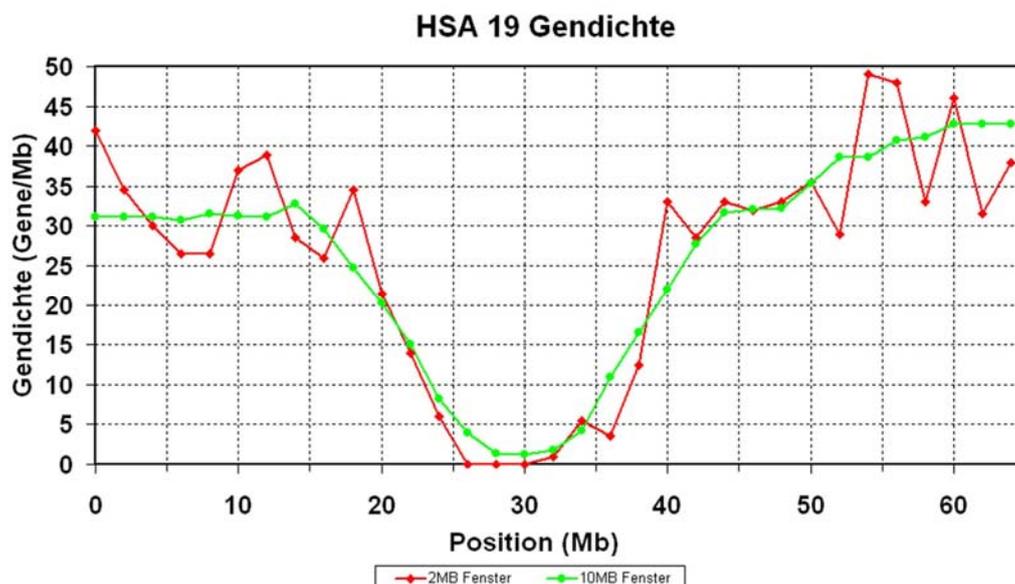


Abb. 3.1.1.1: Gendichteverteilung im menschlichen Chromosom 19

Die Abszisse zeigt die Position auf dem Chromosom in Mb, die Ordinate die Gendichte in Gene/Mb. Die rote Kurve beschreibt die Gendichten, die in einem 2Mb Fenster um die jeweilige Position auf dem Chromosom ermittelt wurden. Die grüne Kurve zeigt entsprechend die Gendichten, die in einem 10Mb Fenster um die jeweilige Position ermittelt wurde.

Tabelle 3.1.1.1: Bandeneigenschaften vom menschlichen Chromosom 19

Bande	R/G	Länge (Mb)	Replikations Index	Enthaltene Gene	Gendichte (Gene/Mb)	GC-Gehalt (%)	enthaltene Alu Seq.	Alu Seq. Dichte (Alu/Mb)
19p13.3	R	6.9	1.66	220	31.8	54.4	7953	1153
19p13.2	G	5.7	1.63	178	31.2	48.8	7593	1332
19p13.13	R	1.2	1.66	40	33.3	50.8	1540	1283
19p13.12	G	2.3	1.66	80	34.7	49.1	2505	1089
19p13.11	R	3.7	1.70	113	30.5	52.3	4862	1314
19p12	G	6.9	1.37	55	7.9	40.9	3049	442
19p11	G(cen)	2.5	-	0	0	-	-	-
19q11	G(cen)	1.7	-	0	0	-	-	-
19q12	G	6.9	1.38	19	2,7	43.9	1331	193
19q13.11	R	4.2	1.57	53	12.6	46.3	2464	587
19q13.12	G	3.1	1.55	95	31.6	46.3	2577	831
19q13.13	R	0.5	1.69	5	10	48.8	425	850
19q13.2	G	4.7	1.69	159	33.8	49.1	4335	922
19q13.31	R	2.1	1.60	72	34.2	45.4	1500	714
19q13.32	G	1.6	1.70	110	68.7	49.1	4486	2804
19q13.33	R	2.2	1.69	110	50	52.4	2594	1179
19q13.41	G	2.3	1.51	86	37.4	45.8	1925	837
19q13.42	R	2.7	1.54	109	40.4	49.4	2747	1017
19q13.43	G	2.8	1.51	91	32.5	45.9	2185	780

CT 19	Summe	64	---	1595	---	---	54071	---
CT 19	Mittel	---	1.59	---	27.5	48.16	3181	1019
R-Banden	Summe	23.5	---	722	---	---	24085	---
R-Banden	Mittel	---	1.64	---	30.4	50	3011	1012
G-Banden*	Summe	22.5	---	799	---	---	25606	---
G-Banden*	Mittel	---	1.61	---	38.5	47.7	3658	955

* ohne Centromerregion

Das menschliche Chromosom 18 ist im Gegensatz dazu eines der genärmsten Chromosomen im menschlichen Genom, mit einer durchschnittlichen Gendichte von nur 5,4 Genen pro Mb. Auch hier sind die verhältnismäßig wenigen Gene in etwa gleichmäßig über das ganze Chromosom verteilt (siehe Abb. 3.1.1.2). Es ist gleichmäßig in R- und G- Banden aufgeteilt, seine G-Banden sind aber deutlich intensiver gefärbt als die des humanen Chromosoms 19 und weisen auch eine geringere Gendichte als die R-Banden auf (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens). Der GC-Gehalt des gesamten Chromosoms liegt bei nur 39,9%, die transkriptionelle Aktivität ist insgesamt sehr niedrig (Caron et al., 2001; Francke, 1994; Nusbaum et al., 2005; Versteeg et al., 2003). Tabelle 3.1.1.2 gibt eine Übersicht über die Eigenschaften des menschlichen Chromosoms 18.

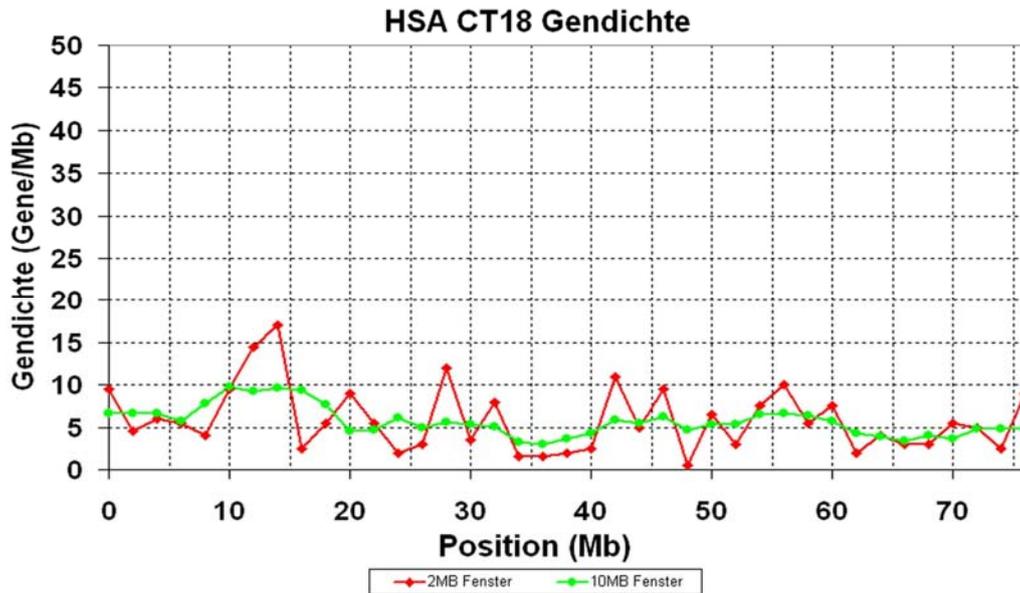


Abb. 3.1.1.2: Gendichteverteilung im menschlichen Chromosom 18

Die Abszisse zeigt die Position auf dem Chromosom in Mb, die Ordinate die Gendichte in Gene/Mb. Die rote Kurve beschreibt die Gendichten, die in einem 2Mb Fenster um die jeweilige Position auf dem Chromosom ermittelt wurden. Die grüne Kurve zeigt entsprechend die Gendichten, die in einem 10Mb Fenster um die jeweilige Position ermittelt wurde.

Tabelle 3.1.1.2: Bandeneigenschaften vom menschlichen Chromosom 18

Bande	R/G	Länge (Mb)	Replikations Index	enthaltene Gene	Gendichte (Gene/Mb)	GC-Gehalt (%)	enthaltene Alu Seq.	Alu Seq. Dichte (Alu/Mb)
18p11.32	R	2.9	1.50	21	7.2	39.2	1146	395
18p11.31	G	4.3	1.43	26	6.0	40	1517	353
18p11.23	R	1.3	1.32	3	2.3	41.3	423	325
18p11.22	G	2.4	1.67	21	8.7	42.4	1024	427
18p11.21	R	4.5	1.55	49	10.9	42.1	2342	350
18p11.1	G (cen)	1.9	1.51	4	2.1	40.3	419	221
18q11.2	R	6	1.57	39	6.5	40.8	2844	474
18q12.1	G	7.7	1.35	31	4	36.8	1740	226
18q12.2	R	4.5	1.44	19	4.2	40.3	1009	224
18q12.3	G	6.3	1.36	14	2.2	37.7	1069	170
18q21.1	R	6.7	1.53	37	5.5	42.9	2342	350
18q21.2	G	4	1.47	13	3.3	37.6	932	233
18q21.31	R	2.1	1.61	16	7.6	42.1	914	435
18q21.32	G	2.5	1.53	20	8	39.5	919	368
18q21.33	R	2.6	1.59	20	7.7	40.3	975	375
18q22.1	G	5.2	1.29	12	2.3	35.3	888	171
18q22.2	R	2	1.41	7	3.5	37.6	482	241
18q22.3	G	4.4	1.33	16	3.6	38.2	832	189
18q23	R	4.9	1.40	38	7.8	44.5	1112	227

CT18	Summe	76.2	---	406	---	---	22929	---
CT18	Mittel	---	1.47	---	5.4	39.9	1207	303
R-Banden	Summe	37.5	---	249	---	---	13589	---
R-Banden	Mittel	---	1.49	---	6.3	41.1	1323	349
G-Banden*	Summe	36.5	---	153	---	---	8921	---
G-Banden*	Mittel	---	1.43	---	4.8	38.4	1115	267

* ohne Centromerregion

Das Chromosom 12 besitzt eine für das menschliche Genom durchschnittliche Länge von 132 Mb und eine mittlere Gendichte von etwa 10 Genen pro Mb. Die Verteilung der Gene unterscheidet sich von der gleichmäßigen auf Chromosom 18 und 19, hier gibt es drei Bereiche, die eine deutlich höhere Gendichte als das restliche Chromosom aufweisen (siehe Abb. 3.1.1.3). Diese Bereiche befinden sich in Telomernähe am p-Arm (12p12.3 – 12p13.32), auf dem q-Arm kurz unterhalb des Centromers (12q13.11 - 12q12.3) und wiederum in Telomernähe auf dem q-Arm (12q21.2 – 12q21.33). Diese Cluster sind zwar deutlich genreicher, werden aber noch nicht als RIDGES bezeichnet. Die G-Banden sind mit 62,4 Mb (ohne die Centromerregion) etwas stärker vertreten als die R-Banden (56,9 Mb), und weisen ebenfalls wie beim Chromosom 18 intensive Färbungen auf. Der mittlere GC-Gehalt beträgt 41,2%, die transkriptionelle Aktivität korreliert mit der Verteilung der Gendichte, ist aber für das menschliche Genom nicht außergewöhnlich hoch (Caron et al., 2001; Versteeg et al., 2003). Tabelle 3.1.1.3 gibt eine Übersicht über die Eigenschaften des menschlichen Chromosoms 12.

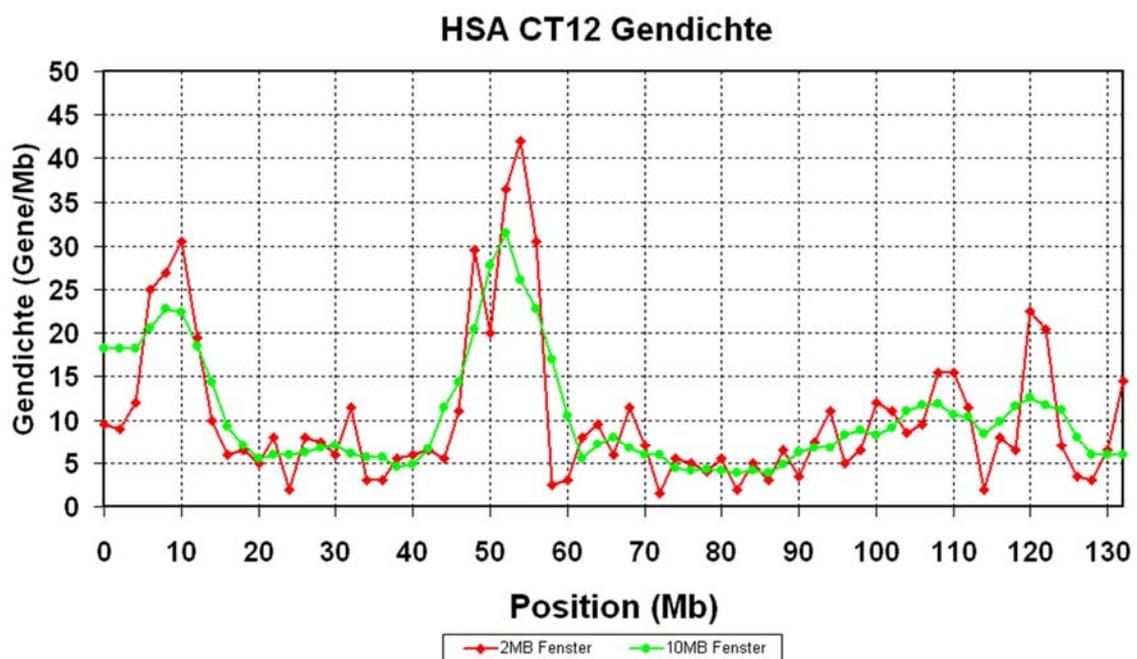


Abb. 3.1.1.3: Gendichteverteilung im menschlichen Chromosom 12

Die Abszisse zeigt die Position auf dem Chromosom in Mb, die Ordinate die Gendichte in Gene/Mb. Die rote Kurve beschreibt die Gendichten, die in einem 2Mb Fenster um die jeweilige Position auf dem Chromosom ermittelt wurden. Die grüne Kurve zeigt entsprechend die Gendichten, die in einem 10Mb Fenster um die jeweilige Position ermittelt wurde. Die drei genreicheren Segmente zeichnen sich deutlich vom restlichen Chromosom ab.

Tabelle 3.1.1.3: Bandeneigenschaften vom menschlichen Chromosom 12

Bande	R/G	Länge (Mb)	Replikations Index	enthaltene Gene	Gendichte (Gene/Mb)	GC-Gehalt (%)	enthaltene Alu Seq.	Alu Seq. Dichte (Alu/Mb)
12p13.33	R	3.1	1.63	32	10.3	45.3	1680	542
12p13.32	G	2.3	1.58	26	11.3	44.5	571	248
12p13.31	R	4.9	1.66	115	23.5	43.1	2679	547
12p13.2	G	2.9	1.68	57	19.6	39.9	1289	444
12p13.1	R	1.8	1.52	13	7.2	41.2	718	399
12p12.3	G	5.3	1.40	34	6.4	37.2	1359	256
12p12.2	R	1.4	1.35	6	4.3	36.5	252	180
12p12.1	G	4.9	1.50	30	6.1	37.7	1401	286
12p11.23	R	1.4	1.75	15	10.7	39	463	331
12p11.22	G	2.9	1.44	9	3.1	38.3	647	223
12p11.21	R	2.7	1.60	25	9.3	41.8	1909	707
12p11.1	G(cen)	4.2	1.33	12	2.8	39.3	222	53
12q11	G(cen)	6.5	1.33	20	3.1	38.1	97	15
12q12	G	1.9	1.47	8	4.2	37.5	1963	1033
12q13.11	R	2.7	1.62	36	13.3	40.9	867	321
12q13.12	G	2.2	1.73	50	22.7	45.7	2574	1170
12q13.13	R	3.5	1.65	110	31.4	47.4	2243	641
12q13.2	G	1.8	1.62	61	33.9	42.1	833	463
12q13.3	R	1.4	1.75	57	40.7	47.3	1364	974
12q14.1	G	4.9	1.42	22	4.5	37.4	1046	213
12q14.2	R	1.8	1.53	13	7.2	39.7	939	522
12q14.3	G	2.8	1.57	20	7.1	39.2	910	325
12q15	R	3.9	1.53	32	8.2	39.3	1442	370
12q21.1	G	3.2	1.39	17	5.3	35.9	748	234
12q21.2	R	4.4	1.44	17	3.8	35.3	1274	290
12q21.31	G	5.4	1.34	23	4.2	35.6	1115	206
12q21.32	R	1.9	1.34	8	4.2	35.2	976	514
12q21.33	G	3.9	1.51	17	4.3	36.8	716	184
12q22	R	3.6	1.72	30	8.3	41	2037	566
12q23.1	G	4.3	1.49	22	5.11	39.4	1991	463
12q23.2	R	2.2	1.65	14	6.4	39.4	844	384
12q23.3	G	4.9	1.62	39	7.9	42.4	1766	360
12q24.11	R	2.6	1.67	44	16.9	45.4	2303	886
12q24.12	G	0.9	1.73	14	15.5	47.4	692	769
12q24.13	R	1.9	1.66	24	12.6	45.9	1609	847
12q24.21	G	2.4	1.43	8	3.3	43.5	929	387
12q24.22	R	1.5	1.59	10	6.6	46.3	961	641
12q24.23	G	2.6	1.54	23	8.8	44	1712	658
12q24.31	R	6.1	1.66	87	14.3	46.2	5620	921
12q24.32	G	2.9	1.38	17	5.9	42.5	936	323
12q24.33	R	4.1	1.45	44	10.7	48	1594	389

CT12	Summe	130	---	1261	---	---	55291	---
CT12	Mittel	---	1.54	---	10.6	41.2	1349	470
R-Banden	Summe	56.9	---	732	---	---	31774	---
R-Banden	Mittel	---	1.59	---	12.5	42.2	1589	549
G-Banden*	Summe	62.4	---	497	---	---	23198	---
G-Banden*	Mittel	---	1.52	---	9.4	40.4	1221	434

* ohne Centromerregion

Das menschliche Chromosom 11 ist dem Chromosom 12 in Bezug auf die R-/G-Bandenzusammensetzung sehr ähnlich. Es hat eine leicht höhere mittlere Gendichte von 13 Genen pro Mb, die Gendichte variiert ebenfalls deutlich entlang des Metaphasenchromosoms (siehe Abb. 3.1.1.4). Im Gegensatz zum Chromosom 12 zeigen diese dicht gepackten Gencluster aber auch eine ungewöhnlich hohe transkriptionelle Aktivität in verschiedenen Geweben. Daher sind sie als RIDGEs charakterisiert worden (Caron et al., 2001; Versteeg et al., 2003). Ein RIDGE auf dem Chromosom 11 umfasst die telomernahe Bande 11p15.5. Es konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass einzelne Cosmide/PACs aus diesem Bereich weit aus dem eigentlichen Chromosomenterritorium „ausloopen“ können (Gilbert et al., 2004; Mahy et al., 2002a). Um dieses Phänomen näher zu untersuchen wurde die gesamte Bande mittels eines BAC-Contigs nachgewiesen. Tabelle 3.1.1.5 gibt eine Übersicht über die Eigenschaften der Bande 11p15.5.

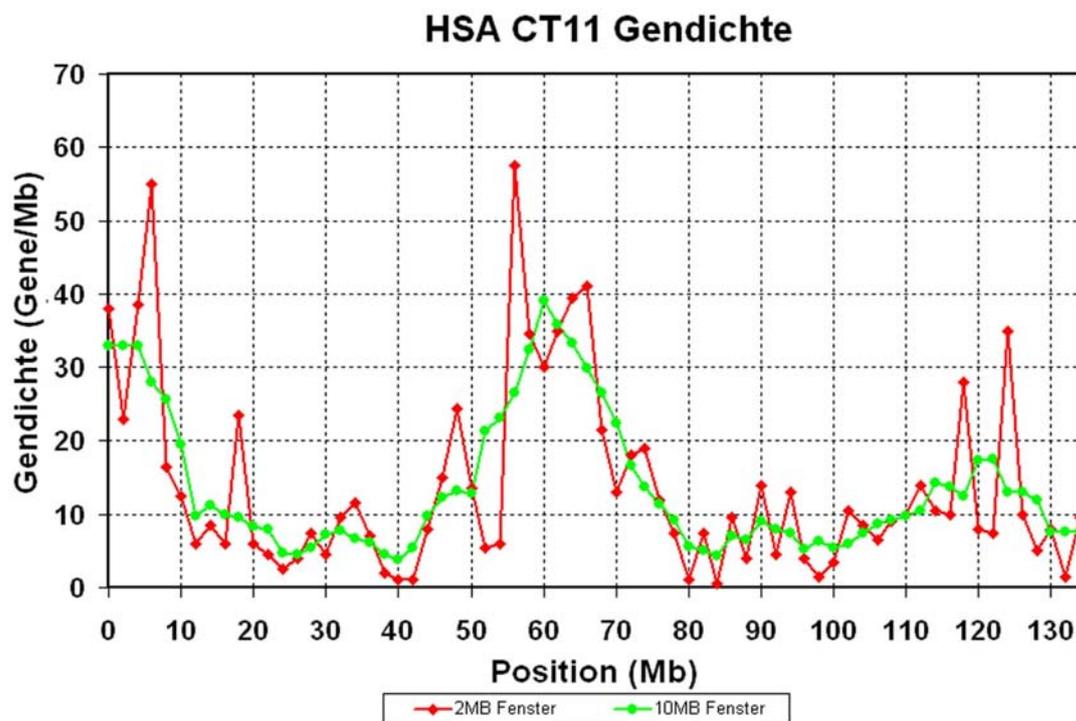


Abb. 3.1.1.4: Gendichteverteilung im menschlichen Chromosom 11

Die Abszisse zeigt die Position auf dem Chromosom in Mb, die Ordinate die Gendichte in Gene/Mb. Die rote Kurve beschreibt die Gendichten, die in einem 2Mb Fenster um die jeweilige Position auf dem Chromosom ermittelt wurden. Die grüne Kurve zeigt entsprechend die Gendichten, die in einem 10Mb Fenster um die jeweilige Position ermittelt wurde. Die drei genreicheren Segmente zeichnen sich deutlich vom restlichen Chromosom ab.

Tabelle 3.1.1.4: Bandeneigenschaften von HSA 11p15.5

Bande	R/G	Länge (Mb)	Replikations Index	enthaltene Gene	Gendichte (Gene/Mb)	GC-Gehalt (%)	enthaltene Alu Seq.	Alu Seq. Dichte (Alu/Mb)
11p15.5	R	2.8	1,61	88	31.4	54.6	1151	411

3.1.2 Spezifische BACs für R- und G-Banden

Um die räumliche Anordnung von R- und G-Banden eines Chromosoms in Bezug auf Chromosomenterritorien und Interphasezellkerne untersuchen zu können, wurden BAC-Pools erstellt, die entweder nur Sequenzen aus R-Banden („R-Pool“) oder nur Sequenzen aus G-Banden („G-Pool“) enthielten. Da die genauen Grenzen zwischen R- und G-Banden noch nicht bekannt sind und auch der Übergang von dem einen auf den anderen Bandentyp auf molekularem Level nicht definiert ist (Furey and Haussler, 2003), wurden hierfür nur BACs ausgewählt, die an einem zentralen Bereich innerhalb einer ausgewählten Bande hybridisieren. R-/G-Pools wurden für Chromosom 18 (R-pool: 15 BACs, G-pool 12 BACs), Chromosom 19 (R-Pool: 8 BACs, G-Pool 8 BACs) und Chromosom 12 (R-Pool: 20 BACs, G-Pool 28 BACs) erstellt. Die Abbildung 3.1 (A-C) zeigt eine schematische Übersicht über die verwendeten Pools und das Ergebnis einer Testhybridisierung auf Metaphasen menschlicher Lymphozyten.

Tabelle 3.1.2.1 zeigt einige Eigenschaften der erstellten R-/G-Pools, wie die mittlere Gendichte innerhalb eines 2Mb und eines 10Mb Fensters, den gemittelten Replikationsindex und die transkriptionelle Aktivität der einzelnen BACs.

Die Tabellen 7.1.1, 7.1.4 und 7.1.5 im Anhang geben detaillierte Informationen über alle für diese Pools verwendeten BAC-Klone, wie ID, Bandenzuordnung, Position, Gendichte, Anzahl der enthaltenen Gene, GC-Gehalt, transkriptionelle Aktivität und Replikationsindex. Alle diese Informationen wurden, wie im Anhang unter Abschnitt 7.6 Datenbankrecherche beschrieben, zusammengetragen.

Tabelle 3.1.2.1: Eigenschaften der R-/G-Banden-Pools für HSA 12, 18 und 19

	12 R (20 BACs)		12 G (28BACs)		18 R (15 BACs)		18 G (12BACs)		19 R (8 BACs)		19 G (8 BACs)	
Gendichte 2Mb Fenster	16.6		8.6		7.2		4.7		32.4		30.1	
Gendichte 10Mb Fenster	13.4		9.4		5.7		5.0		30.9		33.5	
Mittlerer Replikations Index (früh-mittel-spät)	1.63 (11 - 7 - 2)		1.45 (4 - 11 - 13)		1.55 (2 - 12 - 1)		1.39 (0 - 5 - 7)		1.63 (6 - 2 - 0)		1.56 (4 - 2 - 2)	
Expression	HLy	HFb	HLy	HFb	HLy	HFb	HLy	HFb	HLy	HFb	HLy	HFb
hoch	1	11	1	3	1	1	0	0	0	2	0	3
mittel	6	7	1	3	1	3	0	2	4	5	2	3
niedrig	13	2	22	18	12	10	8	6	3	0	5	1
unbekannt	0	0	4	4	1	1	4	4	1	1	1	1

3.1.3 Spezifische BACs für genreiche und genarme Segmente

Verschiedene Arbeiten in den vergangenen Jahren konnten zeigen, dass die Gendichte eines Chromosoms Einfluss auf seine Platzierung innerhalb des Zellkerns hat (Boyle et al., 2001; Cremer et al., 2003; Cremer et al., 2001b; Croft et al., 1999) Um zu untersuchen wie weit die Gendichte auch einen Einfluss auf die subchromosomale Organisation hat, wurden BAC-Pools von genreichen und genarmen Segmenten erstellt. Dafür eignete sich das Chromosom 12 wegen seiner spezifischen Gendichteverteilung (siehe Abb. 3.1.1.3) besonders gut.

Für den genreichen Pool wurden insgesamt 19 BACs aus drei gendichten Bereichen ausgewählt:

- 12p12.3 – 12p13.32: umfasst ~10,5Mb, enthält ~ 38 Gene/Mb, 6BACs
- 12q13.11 – 12q13.3: umfasst ~ 11 Mb, enthält ~ 31 Gene/Mb, 6 BACs
- 12q24.11 – 12q24.32: umfasst ~ 16 Mb, enthält ~ 16 Gene/Mb, 7 BACs

Für den genarmen Pool wurden insgesamt 12 BACs aus zwei genarmen Bereichen ausgewählt:

- 12p11.22 – 12p12.3: umfasst ~ 15 Mb, enthält ~ 6,5 Gene/Mb, 6 BACs
- 12q21.2 – 12q21.33: umfasst ~ 18 Mb, enthält ~ 5 Gene/Mb, 6 BACs

Die Abbildung 3.1 (D) zeigt eine schematische Übersicht über die verwendeten Pools und das Ergebnis einer Testhybridisierung auf Metaphasen menschlicher Lymphozyten.

Die konstante, hohe Gendichte entlang des Chromosoms 19 nimmt nur in der Perichromatinregion deutlich ab (siehe Abb. 3.1.1.1.). Aus diesem Bereich wurden insgesamt 19 BACs für den genarmen Pool von Chromosom 19 ausgewählt:

- 19q12: umfasst ~6,9 Mb, enthält ~7,9 Gene/Mb, 11 BACs
- 19p12: umfasst ~6,9 Mb, enthält ~2,7 Gene/Mb, 8 BACs

Die Gendichten in diesen beiden Banden sind nur ungefähre Annäherungen, da die dort häufig vorkommenden repetitiven Sequenzen eine durchgängige Sequenzierung verhindern (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens). Als genreiche Referenz zu diesem genarmen Pool wurde der gesamte paint des Chromosoms 19 verwendet, von dem über Bildarbeit mittels der Software ImageJ alle Signalvoxel des genarmen Pools abgezogen wurden.

Die Abbildung 3.1 (E) zeigt eine schematische Übersicht über den verwendeten Pool und das Ergebnis einer Testhybridisierung auf Metaphasen menschlicher Lymphozyten.

Da Chromosom 18 eine gleichmäßige Verteilung der Gendichte aufweist, war es für dieses Chromosom nicht möglich entsprechende gendichte-abhängige BAC Pools zu erstellen (siehe Abb. 3.1.1.2).

Tabelle 3.1.3.1 zeigt einige Eigenschaften der erstellten genarmen Pools von Chromosom 12 und 19 und des genreichen Pools von Chromosom 12, wie die Zuordnung zu R- und G-Banden, die mittleren Gendichten innerhalb eines 2Mb und eines 10Mb Fensters, dem gemittelten Replikationsindex und die transkriptionelle Aktivität der einzelnen BACs.

Die Tabellen 7.1.1 und 7.1.7 im Anhang geben detaillierte Informationen über alle für diese Pools verwendeten BAC-Klone, wie ID, Bandenzuordnung, Position, Gendichte, Anzahl der enthaltenen Gene, GC-Gehalt, transkriptionelle Aktivität und Replikationsindex. Alle diese Informationen wurden, wie im Anhang unter Abschnitt 7.6 beschrieben, zusammengetragen.

Die Experimente mit den von Gendichte abhängigen BAC Pools von Chromosom 12 und ein Großteil der anschließenden Bildbearbeitung wurden von Dorothee Biener im Rahmen

ihrer von mir mitbetreuten medizinischen Doktorarbeit durchgeführt, alle Auswertungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nochmals von mir wiederholt.

Tabelle 3.1.3.1: Eigenschaften der genreichen/genarmen Pools für HSA 12 und 19

	12 genreicher Pool (19 BACs)		12 genarmer Pool (12BACs)		19 genarmer Pool (19 BACs)	
R / G Banden	12 / 7		2 / 10		0 / 19	
Gendichte 2Mb Fenster	20.3		5.2		9.3	
Gendichte 10Mb Fenster	16.5		5.2		9.5	
Mittlerer Replikations Index (früh-mittel-spät)	1.62 (11 - 6 - 2)		1.42 (0 - 5 - 7)		1.38 (2 - 3 - 14)	
Expression	HLy	HFb	HLy	HFb	HLy	HFb
hoch	1	11	0	1	0	1
mittel	4	4	0	2	1	0
niedrig	14	4	11	8	8	8
unbekannt	0	0	1	1	10	10

Wie bereits beschrieben ähnelt das menschliche Chromosom 11 bezüglich der Bandenzusammensetzung, Gendichte und deren Verteilung sehr dem Chromosom 12. Es enthält jedoch einige Gencluster, deren Expression in verschiedenen Geweben ungewöhnlich hoch ist (Caron, 2001). Ein solcher, als RIDGE charakterisierter Bereich ist die direkt ans Telomer des kurzen Arms anschließende Bande 11p15.5. Es konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass einzelne Cosmide/PACs aus diesem Bereich bis zu mehreren μm weit entfernt von ihrem eigentlichen Chromosomenterritorium liegen können (Gilbert et al., 2004; Mahy et al., 2002a). Um dieses Phänomen des „looping out“ näher zu untersuchen wurde fast die gesamte Bande mittels eines 2,3 Mb langen BAC-Contigs nachgewiesen. Dieses Contig enthält nur zwei kleine Lücken (etwa 100 und etwa 300 kb) und umfasst insgesamt 14 BACs.

Die Abbildung 3.1 (F) zeigt eine schematische Übersicht über den verwendeten Pool und das Ergebnis einer Testhybridisierung auf Metaphasen menschlicher Lymphozyten. Tabelle 3.1.3.2 zeigt einige Eigenschaften des BAC-Contigs für die Region 11p15.5, wie die Zuordnung zu R- und G-Banden, die mittleren Gendichten innerhalb eines 2Mb und eines 10Mb Fensters, dem gemittelten Replikationsindex und die transkriptionelle Aktivität der einzelnen BACs.

Die Tabelle 7.1.8 im Anhang zeigt detaillierte Informationen über alle für dieses Contig verwendeten BAC-Klone, wie ID, Bandenzuordnung, Position, Gendichte, Anzahl der enthaltenen Gene, GC-Gehalt, transkriptionelle Aktivität und Replikationsindex. Alle diese Informationen wurden, wie im Anhang unter Abschnitt 7.6 Datenbankrecherche beschrieben, zusammengetragen.

Die Experimente mit den von Gendichte abhängigen BAC Pool von Chromosom 11 sowie ein Teil der anschließenden Bildbearbeitung und Auswertungen wurden von Sandra Dittrich im Rahmen ihrer von mir mitbetreuten Diplomarbeit durchgeführt.

Tabelle 3.1.3.2: Eigenschaften des BAC-Contigs für die Region 11p15.5

	BAC-Contig von 11p15.5 (14 BACs)	
R / G Banden	14 / 0	
Gendichte 2Mb Fenster	28.6	
Gendichte 10Mb Fenster	30.6	
Mittlerer Replikations Index (früh-mittel-spät)	1.64 (7 - 7 - 0)	
Expression	HLy	HFb
hoch	4	9
mittel	5	3
niedrig	5	2
unbekannt	0	0

3.1.4 Spezifische BACs für hoch und niedrig exprimierte Sequenzen

Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre beschäftigten sich mit der Platzierung von einzelnen transkriptionell aktiven und inaktiven Genen innerhalb ihres Chromosomenterritoriums (Cremer et al., 2006a; Gilbert et al., 2005; Kosak and Groudine, 2004; Scheuermann et al., 2004; van Driel et al., 2003; Williams, 2003). Um einen globaleren Einblick in die räumliche Anordnung von aktiven und inaktiven Genen bezüglich ihres Chromosomenterritoriums und des Zellkerns zu erlangen, wurden BAC-Pools erstellt, die hoch bzw. niedrig exprimierte Gene repräsentieren. Dafür analysierten wir die Ergebnisse eines Expressionsprofils, das im Labor von Dr. Michael Speicher (Institut für humane Genetik, TU München) mittels des Affymetrix Chips U133A durchgeführt wurde. BAC-Klone, die oft mehrere Gene enthalten können, wurden für den hoch exprimierten Pool ausgewählt, wenn sie zumindest ein Gen trugen, das einen Expressions-Intensitäts-Wert von über 1000 zeigte, unabhängig von den Expressionsniveaus der anderen Gene. Für den niedrig exprimierten Pool wurden nur BACs ausgewählt, deren enthaltene Gene einen Expressions-Intensitäts-Wert von weniger als 250 hatten. Die Expressionsniveaus dieser Gene wurde mittels RT-PCR überprüft, und nur BACs deren Gene diese Kontrolle bestanden wurden in den endgültigen Pool aufgenommen. Da Chromosom 19 eine insgesamt sehr hohe Expression und Chromosom 18 eine durchgehend niedrige Expression ihrer Gene aufweisen, eignete sich nur das Chromosom 12 aufgrund seiner inhomogenen Genaktivität entlang des Metaphasechromosoms für diese Analyse (Caron et al., 2001). Da sich die transkriptionelle Aktivität einzelner Gene in verschiedenen Zelltypen deutlich unterscheiden kann, wurden für humane Lymphozyten und humane Fibroblasten je eigene Pools zusammengestellt. Es wurde Wert darauf gelegt, dass die ausgewählten BACs möglichst weit über das Metaphasechromosom verteilt liegen, um eine Repräsentation des gesamten Chromosoms zu ermöglichen.

Die Abbildung 3.1 (G-H) zeigt eine schematische Übersicht über die verwendeten Pools und das Ergebnis einer Testhybridisierung auf Metaphasen menschlicher Lymphozyten.

Tabelle 3.1.4.1 zeigt einige Eigenschaften der erstellten hoch bzw. niedrig exprimierten Pools von Chromosom 12 für humane Lymphozyten und Fibroblasten, wie die Zuordnung zu R-

und G-Banden, die mittleren Gendichten innerhalb eines 2Mb und eines 10Mb Fensters und den gemittelten Replikationsindex.

Die Tabellen 7.1.2 und 7.1.3 im Anhang geben detaillierte Informationen über alle für diese Pools verwendeten BAC-Klone, wie ID, Bandenzuordnung, Position, Gendichte, Anzahl der enthaltenen Gene, GC-Gehalt, transkriptionelle Aktivität und Replikationsindex. Alle diese Informationen wurden, wie im Anhang unter Abschnitt 7.6 Datenbankrecherche beschrieben, zusammengetragen.

Die Experimente mit den von der Expression abhängigen BAC Pools wurden von Alexandra Kölbl im Rahmen ihrer von mir mitbetreuten Diplomarbeit durchgeführt, die Bildbearbeitung und weiterführende Auswertung ihrer Daten wurden von mir für diese Arbeit nochmals wiederholt.

Tabelle 3.1.4.1: Eigenschaften der hoch bzw. niedrig exprimierten Pools für HSA 12 in HLy und HFb

	Hoch exprimiert für HSA 12 in HLy (12BACs)	Niedrig exprimiert für HSA 12 in HLy (10BACs)	Hoch exprimiert für HSA 12 in HFb (9 BACs)	Niedrig exprimiert für HSA 12 in HFb (9 BACs)
R / G Banden	5 / 7	4 / 6	6 / 3	6 / 3
Gendichte 2Mb Fenster	16.5	10.5	16.6	15.7
Gendichte 10Mb Fenster	12.6	10.5	14.3	12.3
Mittlerer Replikations Index (früh-mittel-spät)	1.70 (10 - 2 - 0)	1.45 (2 - 3 - 5)	1.65 (7 - 1 - 1)	1.51 (2 - 4 - 3)

Die Abbildung 3.1 zeigt eine Übersicht über alle erstellten BAC-Pools:

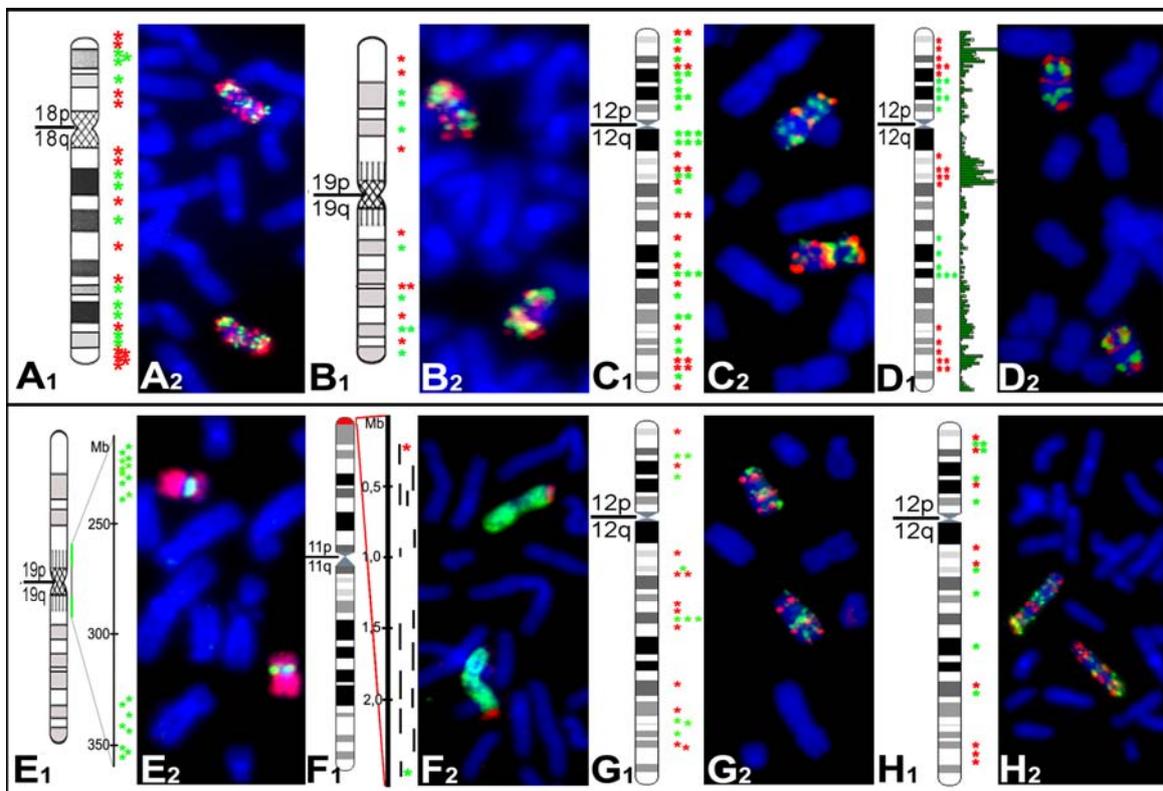


Abb.3.1: Übersicht über alle verwendeten BAC-Pools

A₁-H₁ zeigen eine schematische Übersicht über die chromosomale Position jedes BACs (markiert durch einen Stern), der für einen Pool ausgewählt wurde, anhand eines Ideogrammes (Bandenauflösung: 850).

A₂-H₂ zeigen 2D-FISH Testhybridisierungen der jeweiligen Pools auf Metaphasechromosomen (blau, DAPI-Färbung) von menschlichen Lymphozyten.

(A) „R-/G-Banden Pool“ von HSA 18, mit 15 R-BACs (rot) und 12 G-BACs (grün).

(B) „R-/G-Banden Pool“ von HSA 19, mit 8 R-BACs (rot) und 8 G-BACs (grün).

(C) „R-/G-Banden Pool“ von HSA 12, mit 20 R-BACs (rot) und 28 G-BACs (grün).

(D) „Gendichte Pool“ von HSA 12, mit 19 BACs für den genreichen Pool (rot) und 28 BACs für den genarmen Pool (grün).

(E) „Genarmer Pool“ von HSA 19, mit 19 BACs für den genarmen Pool (grün), die Paint-Sonde von Chromosom 19 ist als genreiche Referenz in rot dargestellt.

(F) „BAC-Contig“ für die Region 11p15.5, mit 14 BACs. Die exakte Position jedes BACs ist mit einem schwarzen Balken gezeigt, das Contig ist in der Hybridisierung rot, der paint von Chromosom 11 grün dargestellt.

(G) „Expression Pool“ von HSA 12 für menschliche Lymphozyten, mit 12 BACs für den hoch exprimierten Pool (rot) und 10 BACs für den niedrig exprimierten Pool (grün).

(H) „Expression Pool“ von HSA 12 für menschliche Fibroblasten, mit 9 BACs für den hoch exprimierten Pool (rot) und 9 BACs für den niedrig exprimierten Pool (grün).

3.2 Auswahl spezifischer BACs für die Untersuchung von Genen mit inversen Eigenschaften

In einem eigenen Experiment wurde versucht zu klären, welchen Einfluss die Gendichte der Umgebung bzw. die Expression eines Gens auf die radiale Position dieser Sequenz im Zellkern hat. Dafür wurden drei BACs von Chromosom 12 verwendet, die Gene mit inversen Eigenschaften bezüglich dieser Faktoren enthielten. Ein Gen (ATP5B) wird hoch exprimiert und befindet sich in einer gendichten Umgebung, ein zweites (NAP1L1) wird ebenfalls hoch exprimiert, ist aber in einer genarmen Umgebung zu finden. Das letzte Gen (NEUROD4) befindet sich schließlich in einer gendichten Umgebung, weist aber nur eine niedrige Expression auf. Die Untersuchung der räumlichen Anordnung dieser Gene wurde in menschlichen Lymphozyten durchgeführt. Das FISH Experiment wurde von Alexandra Kölbl durchgeführt, die Bildbearbeitung und weiterführende Auswertung von mir erstellt.

Tabelle 3.2.1 zeigt einige Eigenschaften der verwendeten BACs, wie die Zuordnung zu R- und G-Banden, die mittleren Gendichten innerhalb eines 2Mb und eines 10Mb Fensters, den gemittelten Replikations Index und die Expression des untersuchten Gens.

Die Tabelle 7.1.6 im Anhang zeigt detaillierte Informationen über die für dieses Experiment verwendeten BAC-Klone, wie ID, Bandenzuordnung, Position, Gendichte, Anzahl der enthaltenen Gene, GC-Gehalt, transkriptionelle Aktivität und Replikationsindex. Alle diese Informationen wurden, wie im Anhang unter Abschnitt 7.6 Datenbankrecherche beschrieben, zusammengetragen.

Tabelle 3.2.1: BACs für die Untersuchung von Genen mit inversen Eigenschaften

	BAC Genreiche Umgebung hohe Expression	BAC Genreiche Umgebung niedrige Expression	BAC Genarme Umgebung hohe Expression
Gene	ATP5B	NEUROD4	NAP1L1
R / G Banden	R	G	R
Gendichte 2Mb Fenster	37.5	23.5	5.5
Gendichte 10Mb Fenster	24.6	28.8	2.8
Mittlerer Replikations Index	1.80 früh	1.47 mittel	1.62 mittel
Expression Intensitäts Wert	1855	19	1770

3.3 Durchführung der Experimente

3.3.1 Isolation, Amplifizierung und Testhybridisierung der BACs

Die in dieser Arbeit verwendeten BACs wurden teilweise mit freundlicher Genehmigung von Dr. Thomas Ried (NCI, Bethesda, MD) in Form von bereits isolierter DNA zur Verfügung gestellt und teilweise beim BACPAC Resources Center (Oakland, CA) bestellt. Die bestellten BACs wurden mittels Mini-Präparation, wie im Abschnitt 2.3 beschrieben, aus den E.coli-Zellen isoliert. Abbildung 3.3.1.1 zeigt als Beispiel ein Gelfoto einer Mini-Präparation.

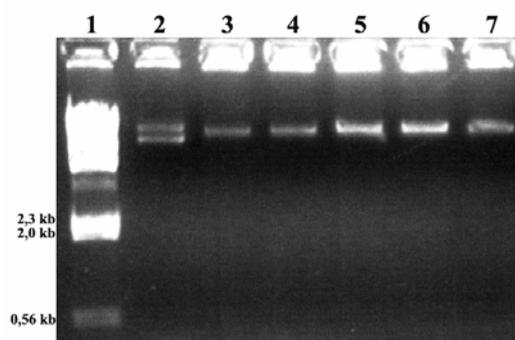


Abb.3.3.1.1: Gelfoto einer Mini-Präparation
Spur 1 Lamda/Hind III Längenmarker, Spur 2-7 BAC 11/I1 bis BAC 11/I6

Anschließend wurde die isolierte BAC-DNA mittels DOP-PCR wie im Abschnitt 2.4. beschrieben amplifiziert und anschließend in einer Label-DOP-PCR-Reaktion indirekt markiert. Abbildung 3.3.1.2 zeigt als Beispiel Gelfotos dieser PCR-Reaktionen.

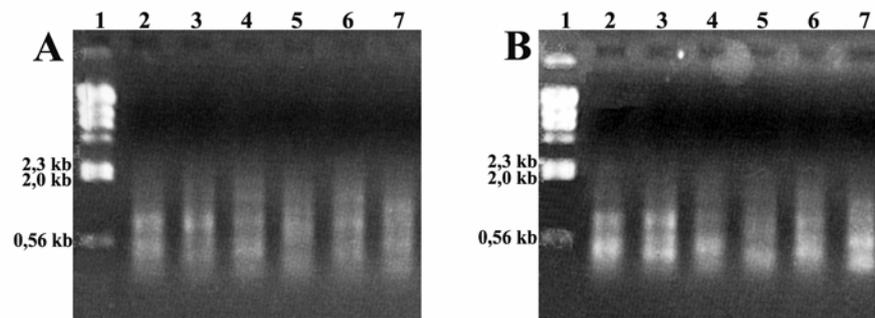


Abb.3.3.1.2: Gelfotos der DOP-PCR Amplifikate

(A) Primäre DOP2/3 – PCR, Spur 1 Lamda/Hind III Längenmarker, Spur 2-4 DOP2-Produkte von BAC 11/I1, 11/I2 und 11/I3, Spur 5-7 DOP3-Produkte von BAC 11/I1, 11/I2 und 11/I3

(B) Label DOP2/3 – PCR, Spur 1 Lamda/Hind III Längenmarker, Spur 2-4 DOP2-Label-Produkte von BAC 11/I1, 11/I2 und 11/I3, Spur 5-7 DOP3-Label-Produkte von BAC 11/I1, 11/I2 und 11/I3

Um das Hybridisierungsverhalten der BACs zu testen, wurden, wie im Abschnitt 2.8 beschrieben, 2D-FISH Testhybridisierungen auf Metaphasen menschlicher Lymphozyten durchgeführt. Nur BACs, die ohne Kreuzhybridisierungen ein deutliches Signal in der gewünschten Region des Ziel-Chromosoms zeigten, wurden für die weiteren Versuche verwendet. Abbildung 3.3.1.3 zeigt Beispiele für diese Testhybridisierungen.

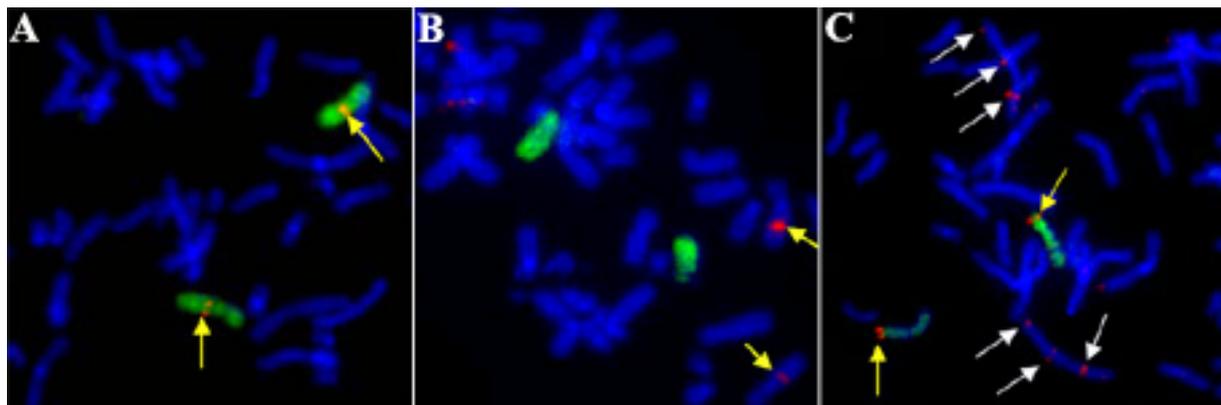


Abb.3.3.1.3: Beispiele für 2D-FISH Testhybridisierungen

Gegenfärbung der Metaphasechromosomen mit DAPI (blau).

(A) BAC 12LyEx22 (rot) hybridisiert deutlich und sauber auf Chromosom 12 (grün)

(B) BAC 12LyEx8 (rot) hybridisiert nicht auf Chromosom 12 (grün)

(C) Kreuzhybridisierung: BAC 12LyEx36 (rot) hybridisiert auf Chromosom 12 (grün) sowie mehrfach auf Chromosom 1 (weiße Pfeile)

3.3.2 Testen der ausgewählten BACs mittels Restriktionsverdau und RT-PCR

Mit 2D-FISH Hybridisierungen kann lediglich eine ungefähre Lokalisierung eines BACs auf dem gewünschten Chromosom bestätigt werden. Um sicher zu gehen, dass die ausgewählten BACs tatsächlich die exakte, in der Datenbank angegebene Sequenz enthalten, wurde für eine Stichprobe der verwendeten BACs zusätzlich eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden mit dem Programm pDRAW32 die Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme in der BAC-Sequenz analysiert, ein Verdau simuliert und das zu erwartende Ergebnis einer Gelelektrophorese der entstehenden Fragmente gezeigt. Dieses wurde dann mit dem

tatsächlichen Ergebnis des Restriktionsverdaus verglichen. BACs die keinerlei Übereinstimmung zeigten wurden für die folgenden Experimente nicht weiter verwendet.

Die Restriktionsanalyse wurde wie in Abschnitt 2.5 beschrieben durchgeführt, eine ausführliche Anleitung zum Programm pDRAW32 findet sich im Anhang im Abschnitt 7.2.

Abbildung 3.3.2.1 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines simulierten sowie des entsprechenden tatsächlich durchgeführten Restriktionsverdaus.

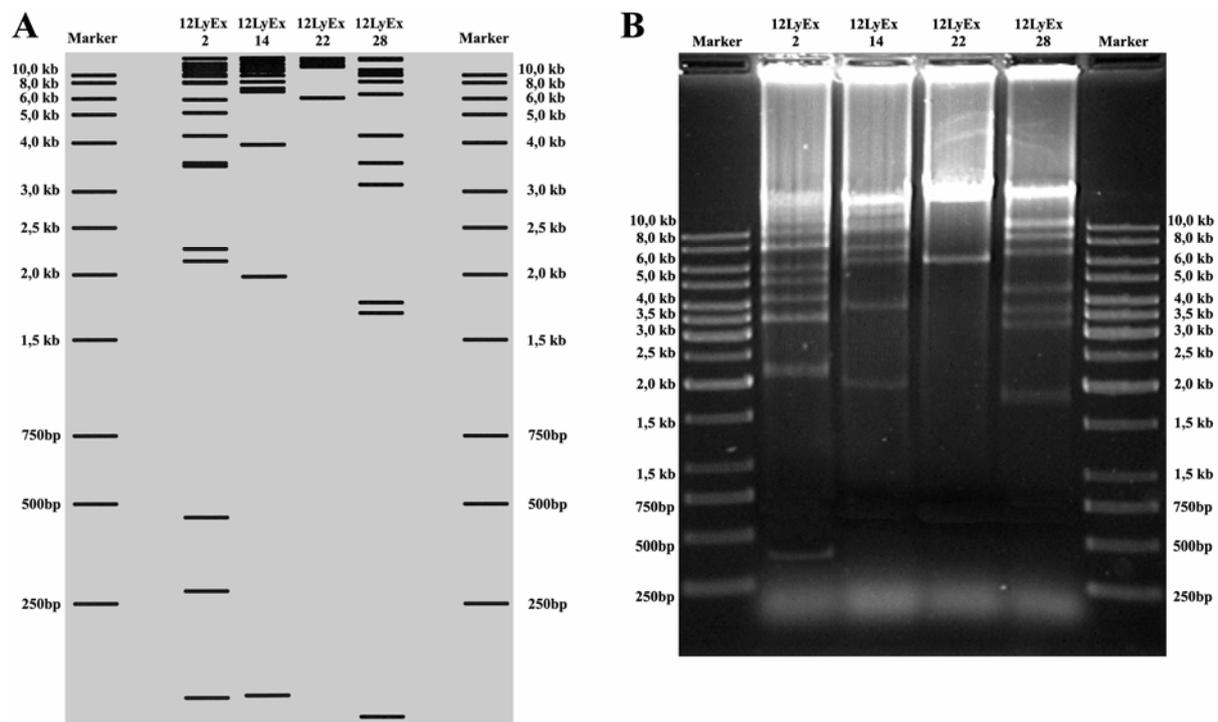


Abb.3.3.2.1: Restriktionsverdau mit SwaI

(A) Ergebnis eines simulierten SwaI-Restriktionsverdaus vierer BACs (12LyEx-2, -14, -22, -28) mittels der Software pDRAW32. Zu sehen ist die Auftrennung der zu erwartenden Fragmente in einem Agarosegel.

(B) Ergebnis des SwaI-Restriktionsverdaus derselben BACs (12LyEx-2, -14, -22, -28). Wie man erkennen kann stimmen die Fragmente mit der erwarteten Auftrennung in (A) gut überein.

Die BACs für die hoch exprimierten und niedrig exprimierten Pools des Chromosoms 12 für humane Lymphozyten und Fibroblasten wurden noch einem weiteren Test unterzogen. Hierbei wurden die Daten des Expressionsprofils (Affymetrix Chip U133A), nach denen die BACs ausgewählt wurden (siehe Abschnitt 3.1.4), mittels RT-PCR verifiziert. Für die BACs der hoch exprimierten Pools wurde die transkriptionelle Aktivität der enthaltenen Gene getestet, deren Expressions-Intensitäts-Wert höher als 1000 war. Für die BACs der niedrig exprimierten Pools wurden alle enthaltenen Gene getestet (Auswahlkriterium war ein Expressions-Intensitäts-Wert von weniger als 250 aller enthaltenen Gene). Nur BACs deren Ergebnisse mit den erwarteten Daten des Expressionsprofils übereinstimmten wurden im weiteren Verlauf für die Versuche verwendet.

Die dazu nötige RNA-Isolation aus HLy und HFb, die Erststrangsynthese der cDNA und die RT-PCR wurden wie im Abschnitt 2.6 beschrieben durchgeführt. Spezifische Primer wurden

mit der Software FastPCR ermittelt, eine genaue Anleitung des Programms findet sich im Anhang im Abschnitt 7.3.

Abbildung 3.3.2.2 zeigt ein Gelfoto einer RNA-Isolation aus humanen Fibroblasten sowie das Ergebnis dreier genspezifischer RT-PCRs.

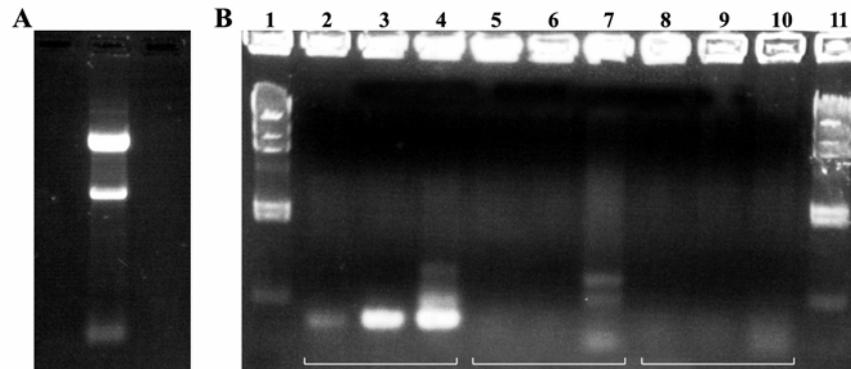


Abb.3.3.2.2: Test der genspezifischen transkriptionellen Aktivität mittels RT-PCR

(A) RNA-Gel: Ergebnis einer gesamtgenomischen RNA-Isolation aus humanen Fibroblasten. Die erste und zweite Bande besteht aus rRNA, der Schmier dazwischen besteht aus mRNA und hnRNA, die dritte Bande zeigt die tRNA.

(B) DNA-Gel: Ergebnis einer RT-PCR. Spur 1 und 11 enthält Lamda/Hind III Marker, die Spuren 2, bis 4 zeigen die PCR-Produkte des in HFbs hoch exprimierten Gens IGFBP6 nach 15, 22 und 35 Zyklen, die Spuren 5-7 zeigen die PCR-Produkte des in HFbs niedrig exprimierten Gens NTS nach 15, 22 und 35 Zyklen und die Spuren 8 bis 10 zeigen die PCR-Produkte des in HFbs ebenfalls niedrig exprimierten Gens IGF1. Die beiden niedrig exprimierten Gene zeigen auch nach 35 Zyklen noch kein spezifisches Amplifikat, während dieses beim hoch exprimierten Gen bereits nach 15 Zyklen zu erahnen und nach 22 Zyklen deutlich zu sehen ist.

3.3.3 Durchführung der 3D-FISH Experimente

Die so getesteten BAC-Klone wurden in den unter Abschnitt 3.1.2 bis 3.1.4 beschriebenen Pools zusammengefasst. Dafür wurden zunächst „Pre-Pools“, bestehend aus 2-3µl primärem DOP2 bzw. DOP3-Amplifikat pro gewünschten BAC-Klon, angelegt. Um mehr Ausgangsmaterial für die folgenden Versuche zu haben wurden diese DOP2/3 Pre-Pools in einer normalen sekundären DOP-PCR-Reaktion noch einmal amplifiziert und anschließend mit dem gewünschten Hapten indirekt oder mit dem gewünschten Fluorochrom in einer Label DOP-PCR direkt markiert (siehe Abschnitt 2.4).

Die zusammengehörigen Pools (z.B.: 18R und 18G) wurden in einem Hybridisierungsmix (siehe Abschnitt 2.8.2) vereint. Da am Anfang dieser Arbeit nur das konfokale Laser Scanning Mikroskop LSM410 (Zeiss) mit nur drei Laserlinien (siehe Abschnitt 2.9) zur Verfügung stand, mussten für die Experimente 18RG, 19RG, 12RG und 12Gendichte je zwei Experimente angesetzt werden. Im ersten Experiment wurde im Hybridisierungsmix auch der dazugehörige Chromosomenpaint zugegeben, um die Signal-Verteilung bezüglich des Chromosomenterritoriums auswerten zu können. Im zweiten Experiment wurden die zusammengehörenden Pools alleine hybridisiert und der freibleibende Fluorochromkanal für

die Gegenfärbung des Kernes genutzt, um die radiale Signal-Verteilung im Zellkern analysieren zu können. Für die Experimente mit dem 19-Gendichte-Pool sowie mit den 12-Expression-Pools stand bereits das TCS SP2 (Leica, siehe Abschnitt 2.9) mit weiteren Laserlinien zu Verfügung, was eine größere Auswahl an simultan verwendbaren Fluorochromen zur Folge hatte.

Die 3D-FISH Experimente wurden wie im Abschnitt 2.8.2 beschrieben durchgeführt. Pro BAC-Pool wurden 30µl gelabeltes DOP-PCR-Amplifikat, pro Chromosomenpaint 20µl gelabeltes DOP-PCR-Amplifikat in den Hybridisierungsmix eingesetzt.

Tabelle 3.3.3.1 gibt Auskunft über die verschiedenen Markierungen und Detektionen für die einzelnen Experimente. Das Markierungs- und Nachweisschema für humane Lymphozyten und humane Fibroblasten war identisch.

Tabelle .3.3.3.1: Übersicht über verwendete Markierungen und Detektionsschemata

Experiment	Pool	Markierung	Detektion
18 RG	Pool 18R	DNP	1.) Rabbit anti DNP 2.) Goat anti Rabbit-Cy3
	Pool 18G	DIG	1.) Mouse anti DIG 2.) Goat anti Mouse-Alexa 488
	18 paint	BIO	1.) Avidin-Cy5 2.) Goat anti Avidin-Bio 3.) Avidin-Cy5
	Gegenfärbung	---	TOPRO
19 RG	Pool 19 R	DNP	1.) Rabbit anti DNP 2.) Goat anti Rabbit-Cy3
	Pool 19 G	DIG	1.) Mouse anti DIG 2.) Goat anti Mouse-Alexa 488
	19 paint	BIO	1.) Avidin-Cy5 2.) Goat anti Avidin-Bio 3.) Avidin-Cy5
	Gegenfärbung	---	TOPRO
12 RG	Pool 12 R	DIG	1.) Mouse anti DIG 2.) Goat anti Mouse-Alexa 488
	Pool 12 G	DNP	1.) Rabbit anti DNP 2.) Goat anti Rabbit-Cy3
	12 paint	BIO	1.) Avidin-Cy5 2.) Goat anti Avidin-Bio 3.) Avidin-Cy5
	Gegenfärbung	---	TOPRO
12 Gendichte	Pool 12 genreich	BIO	1.) Avidin-Cy5 2.) Goat anti Avidin-Bio 3.) Avidin-Cy5
	Pool 12 genarm	DIG	1.) Mouse anti DIG-Cy3 2.) Sheep anti Mouse-Cy3
	12 paint	DNP	1.) Rabbit anti DNP 2.) Goat anti Rabbit-Fitc
	Gegenfärbung	---	YOYO

19 Gendichte	Pool 19 genarm	TAMRA	-----
	19 paint	DIG	1.) Mouse anti DIG 2.) Goat anti Mouse-Alexa 488
	Gegenfärbung	---	DAPI
12 Expression	Pool 12 hoch expr.	TAMRA	-----
	Pool 12 niedrig expr.	DIG	1.) Rabbit anti DIG 2.) Goat anti Rabbit-TexasRed
	12 paint	BIO	1.) Avidin-Cy5 2.) Goat anti Avidin-Bio 3.) Avidin-Cy5
	Gegenfärbung	---	DAPI

Um cyclierende Zellen zu identifizieren wurde ein BrdU-Labeling durchgeführt. Dafür wurden sich in der S-Phase befindende Zellen 45min vor der Fixierung durch Zugabe von BrdU (Endkonzentration 5 μ M) ins Medium markiert. Das integrierte BrdU wurde nach der FISH-Detektion mittels Antikörper in einem „Zwei-Layer-System“ nachgewiesen (Mouse anti BrdU (Roche), Goat anti Mouse-Alexa350 oder Goat anti Mouse-Alexa488).

Zellen in der G₀-Phase wurden über das zellzyklus-abhängige Protein Ki67 identifiziert, welches nur in cyclierenden Zellen, nicht aber in G₀-Phase Zellen im Zellkern nachzuweisen ist. Es wurde ebenfalls mittels Antikörper in einem „Zwei-Layer-System“ nachgewiesen (Mouse anti pKi67, Goat anti Mouse-Alexa350 oder Goat anti Mouse-Alexa488).

Von jedem durchgeführten Experiment wurden am konfokalen Mikroskop lichtoptische Schnitte von 20-30 Zellkernen aufgenommen. Diese Daten wurden mittels der Software ImageJ prozessiert und so für die Auswertungen vorbereitet.

Die Abbildung 3.3.3.1 zeigt Beispiele für die durchgeführten 3D-FISH Experimente.

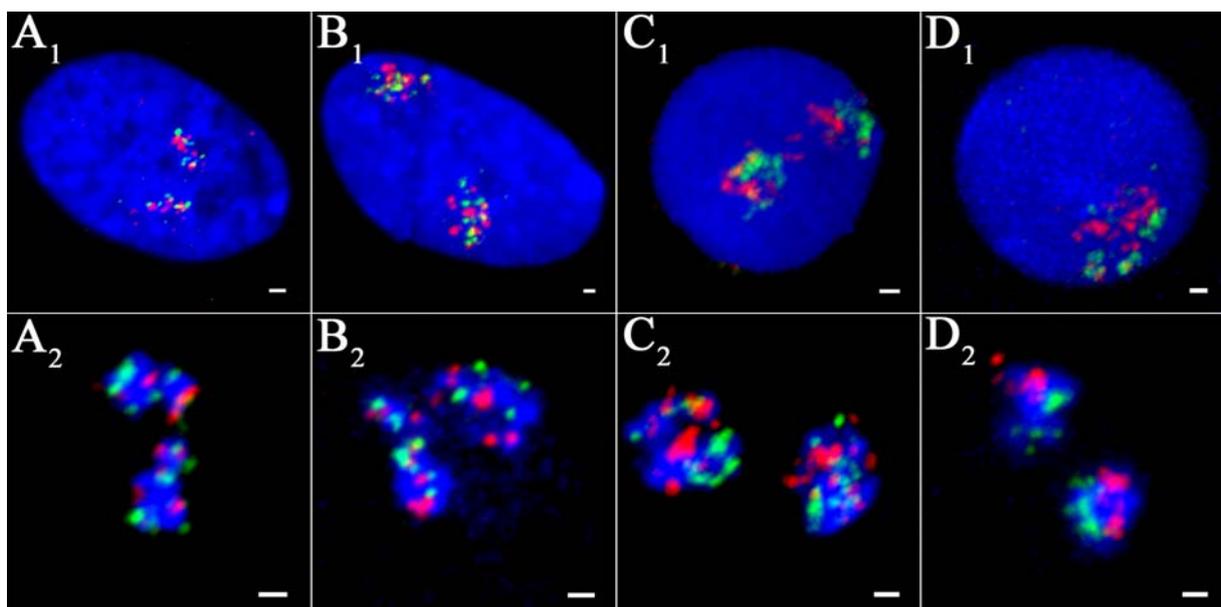


Abb.3.3.3.1: Beispiele für die durchgeführten 3D-FISH Experimente

Maximum Z-Projektionen, (1) zeigt die Verteilung der BAC-Pools im Kern, (2) zeigt die Verteilung der BAC-Pools bezüglich der korrespondierenden Chromosomenterritorien. Die Balken entsprechen 1 μ m. (A) HFb, 18R-Pool (rot), 18G-Pool (grün), Gegenfärbung (1) bzw. Chromosomenpaint 18 (2)

(blau). (B) HFb, 19R-Pool (rot), 19G-Pool (grün), Gegenfärbung (1) bzw. Chromosomenpaint 19 (2) (blau). (C) HLY, 12R-Pool (rot), 12G-Pool (grün), Gegenfärbung (1) bzw. Chromosomenpaint 12 (2) (blau). (D) HLY, 12genreicher Pool (rot), 12genarmer Pool (grün), Gegenfärbung (1) bzw. Chromosomenpaint 12 (2) (blau)

3.4 Anordnung der BAC-Pools innerhalb des Zellkerns

3.4.1 Entwicklung eines geeigneten Auswertungsprogrammes

Die so durchgeführten Experimente wurden zunächst mit dem im Labor bereits etablierten Programm 3D-RRD quantitativ ausgewertet. Diese Software unterteilt im Zuge der Auswertung den Zellkern in 25 radiale Schalen, in welche die Signalvoxel eingeordnet werden (genaue Beschreibung siehe Abschnitt 2.11.1). Diese Schalen spiegeln die äußere Form des segmentierten Zellkerns wieder. Da die rund geformten Zellkerne der Lymphozyten in jede Richtung nahezu denselben Radius aufweisen, zeigen die resultierenden Schalen auch überall die gleiche Dicke auf. Egal wo ein Signal mit einem definierten Abstand zur Oberfläche im Zellkern liegt, es wird immer in dieselbe Schale eingeordnet. Ein Problem ergab sich bei dieser Auswertung allerdings bei den humanen Fibroblasten. Aufgrund der sehr flachen, ellipsoiden Form ihrer Zellkerne hatten die angelegten Schalen verschiedene Dicken in den verschiedenen räumlichen Ausrichtungen. Je nach Lage eines Signals mit einem definierten Abstand zur Zellkernoberfläche im Kern wurde es zu verschiedenen Schalen zugeordnet (siehe Abbildung 3.4.1 A). Dies hatte eine Unschärfe der Ergebnisse zur Folge.

Eine Lösung dieses Problems stellte das mit Unterstützung von Dr. Johann von Hase (Kirchhoff Institut für Physik, Universität Heidelberg) für diese Arbeit entwickelte Programm ADS dar. Dieses Programm misst absolute Abstände von Signalen zur Oberfläche der gewünschten Referenzstruktur (z.B. Zellkerne oder Chromosomenterritorien, genaue Beschreibung im Abschnitt 2.11.3). Auch dafür wird der Zellkern segmentiert, aber anders als beim 3D-RRD Programm beginnt die ADS Software ausgehend von der Oberfläche äquidistante Schalen anzulegen. Die äußere Form der Referenzstruktur geht dabei zunehmend verloren, die entstehenden Schalen allerdings haben in jeder räumlichen Ausdehnung die selbe Dicke, und ein Signal mit einem definierten Abstand zur Oberfläche wird unabhängig von seiner Position im Zellkern immer in dieselbe Schale eingeteilt werden.

Dieser Sachverhalt wird in der Abbildung 3.4.1 nochmals anhand einer schematischen Darstellung verdeutlicht.

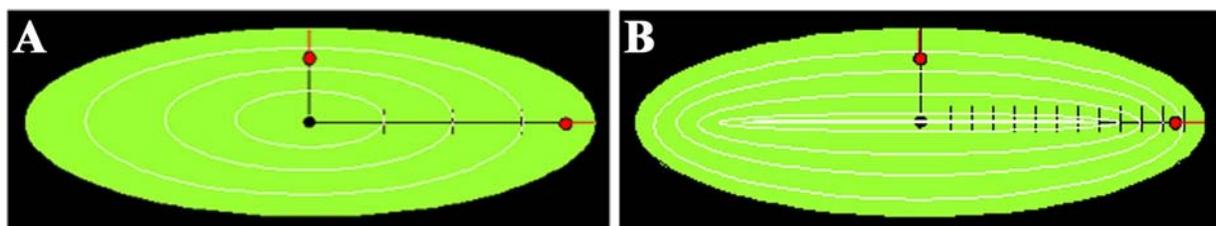


Abb.3.4.1: Unterschiede in der quantitativen Auswertung mittels 3D-RRD und ADS

(A) 3D-RRD: Die angelegten Schalen haben in alle Richtungen den gleichen radialen Abstand zueinander. Da in ellipsoiden Zellkernen (grün) der Radius in x-Richtung größer ist als in y-Richtung,

weisen die Schalen in x-Richtung auch eine größere Dicke auf. Ein Signal mit einem definierten Abstand zur Oberfläche (rot) wird je nach Lage im Zellkern in verschiedene Schalen eingeordnet.

(B) ADS: Die Schalen werden ausgehend von der Zellkernoberfläche äquidistant angelegt. Hier wird ein Signal mit einem definierten Abstand zum Rand (rot) immer in dieselbe Schale eingeordnet, unabhängig von seiner Position im Zellkern.

Die ADS Software wurde von Tobias Thormeyer im Rahmen seiner Diplomarbeit in unserem Labor weiterentwickelt. Das daraus resultierende Programm eADS ermöglichte es, große Datenmengen in einer kürzeren Zeit effektiv auszuwerten. Außerdem wurde in Zusammenarbeit mit dieser Arbeit die Option einer zusätzlichen Normierung der absoluten Abstände entwickelt, welche eine bessere Vergleichsmöglichkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Experimenten am selben Zelltyp bietet. Eine genaue Beschreibung des Programms findet sich im Abschnitt 2.11.4. Da sich dieses Programm sowohl für Lymphozyten- als auch für Fibroblasten-Zellkerne als geeignet herausstellte, wurden alle Experimente mit dieser Software nochmals ausgewertet.

3.4.2 Anordnung der BAC-Pools innerhalb des Zellkerns

Alle Experimente wurden mit dem eADS Programm ausgewertet, das die kürzesten absoluten Abstände jedes Signalvoxels zur Oberfläche angibt. Um die Ergebnisse verschiedener Experimente miteinander vergleichen zu können wurden die Werte über den größten möglichen Abstand in jedem Zellkern normiert (siehe Abschnitt 2.11.4.). Tabelle 3.4.2 gibt Auskunft über die erhaltenen gemittelten relativen Abstände zur Zellkernoberfläche (**ARD-NB** = average relative distance to the nuclear border), sowie die Unterschiede in den ARD-NBs zweier in einem Experiment verglichenen BAC-Pools (ΔD).

BAC-Pool	Hly/HLb		HFb	
	S	G0	S	G0
A CT #12 Gendichte	$D_{\text{genreich}} = 31.17\%$ $D_{\text{genarm}} = 10.13\%$ $\Delta D = 21.04\%$ 24/24(100%) ($p < 0.001$)	$D_{\text{genreich}} = 37.15\%$ $D_{\text{genarm}} = 14.19\%$ $\Delta D = 22.96\%$ 21/21(100%) ($p < 0.001$)	$D_{\text{genreich}} = 48.76\%$ $D_{\text{genarm}} = 37.29\%$ $\Delta D = 11.47\%$ 28/30(93%) ($p < 0.001$)	$D_{\text{genreich}} = 45.36\%$ $D_{\text{genarm}} = 36.81\%$ $\Delta D = 8.55\%$ 24/26(92%) ($p < 0.001$)
B CT #19 Gendichte	---	$D_{\text{CT}} = 59.69\%$ $D_{\text{genarm}} = 38.21\%$ $\Delta D = 21.48\%$ 24/25(96%) ($p < 0.001$)	---	$D_{\text{CT}} = 52.13\%$ $D_{\text{genarm}} = 42.05\%$ $\Delta D = 10.08\%$ 20/22(91%) ($p < 0.001$)
C CT #12 Expression	$D_{\text{hoch}} = 23.66\%$ $D_{\text{niedrig}} = 19.3\%$ $\Delta D = 4.36\%$ 15/20 (75%) ($p = 0.027$)	$D_{\text{hoch}} = 28.53\%$ $D_{\text{niedrig}} = 22.79\%$ $\Delta D = 5.74\%$ 16/19 (84%) ($p < 0.001$)	$D_{\text{hoch}} = 42.71\%$ $D_{\text{niedrig}} = 36.02\%$ $\Delta D = 6.69\%$ 17/21(81%) ($p = 0.001$)	$D_{\text{hoch}} = 47.16\%$ $D_{\text{niedrig}} = 37.88\%$ $\Delta D = 9.28\%$ 15/20(75%) ($p < 0.001$)
D CT #12 R-/G- banden	$D_{\text{R}} = 36.47\%$ $D_{\text{G}} = 24.2\%$ $\Delta D = 12.27\%$ 13/15(86%) ($p < 0.001$)	$D_{\text{R}} = 40.1\%$ $D_{\text{G}} = 23.11\%$ $\Delta D = 16.99\%$ 28/28(100%) ($p < 0.001$)	$D_{\text{R}} = 62.17\%$ $D_{\text{G}} = 54.55\%$ $\Delta D = 7.62\%$ 21/25(84%) ($p < 0.001$)	$D_{\text{R}} = 42.92\%$ $D_{\text{G}} = 40.06\%$ $\Delta D = 2.86\%$ 12/18(66%) ($p = 0.081$)

E CT #18 R-/G- banden	$D_R = 31.88\%$ $D_G = 20.38\%$ $\Delta D = 11.5\%$ 28/28(100%) ($p < 0.001$)	$D_R = 37.5\%$ $D_G = 28.55\%$ $\Delta D = 8.95\%$ 17/19(89%) ($p < 0.001$)	$D_R = 45.54\%$ $D_G = 36.91\%$ $\Delta D = 8.63\%$ 22/25(88%) ($p < 0.001$)	$D_R = 60.64\%$ $D_G = 54.61\%$ $\Delta D = 6.03\%$ 16/23(70%) ($p = 0.004$)
F CT #19 R-/G- banden	$D_R = 59.75\%$ $D_G = 58.92\%$ $\Delta D = 0.83\%$ 13/22(59%) ($p = 0.436$)	$D_R = 58.78\%$ $D_G = 58.03\%$ $\Delta D = 0.75\%$ 13/23(56%) ($p = 0.537$)	$D_R = 65.38\%$ $D_G = 61.91\%$ $\Delta D = 3.47\%$ 17/24(71%) ($p = 0.015$)	$D_R = 69.58\%$ $D_G = 62.63\%$ $\Delta D = 6.95\%$ 23/23(100%) ($p < 0.001$)
G CT #11 11p15.5	---	$D_{p15.5} = 49.69\%$ $D_{CT11} = 28.99\%$ $\Delta D = 20.7\%$ 22/23(95%) ($p < 0.001$)		$D_{p15.5} = 54.52\%$ $D_{CT11} = 40.65\%$ $\Delta D = 13.87\%$ 17/19(89%) ($p < 0.001$)

Tabelle.3.4.2: ARD-NB

Die ersten zwei Zeilen in jeder Tabellenzelle zeigen die Werte der gemittelten relativen Abstände der in einem Experiment korrespondierenden BAC-Pools zur Oberfläche des Zellkerns (ARD-NB). ΔD gibt den Unterschied in der Verteilung zwischen den zusammengehörigen BAC-Pools an. Die vierte Zeile gibt Auskunft über die absolute Anzahl und den Prozentsatz der Zellkerne in den jeweiligen Experimenten für die folgende Verteilung zutrifft: $D_{\text{genreich}} > D_{\text{genarm}}$ (Spalte A und B), $D_{\text{hoch}} > D_{\text{niedrig}}$ (Spalte C), $D_R > D_G$ (Spalte D, E und F) und $D_{p15.5} > D_{CT11}$ (Spalte G). Die letzte Zeile gibt die Signifikanz der Unterschiede an (Wilcoxon signed Rank Sum Test), grau unterlegte Spalten weisen auf nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) hin.

Die Abbildung 3.4.2.1 stellt die in der Tabelle 3.4.2 angegebenen Ergebnisse graphisch dar und die Abbildung 3.4.2.2 zeigt schließlich exemplarisch einige repräsentative Verteilungskurven für ausgewählte Experimente. Eine vollständige Übersicht aller Verteilungskurven findet sich im Anhang unter Abschnitt 7.7.

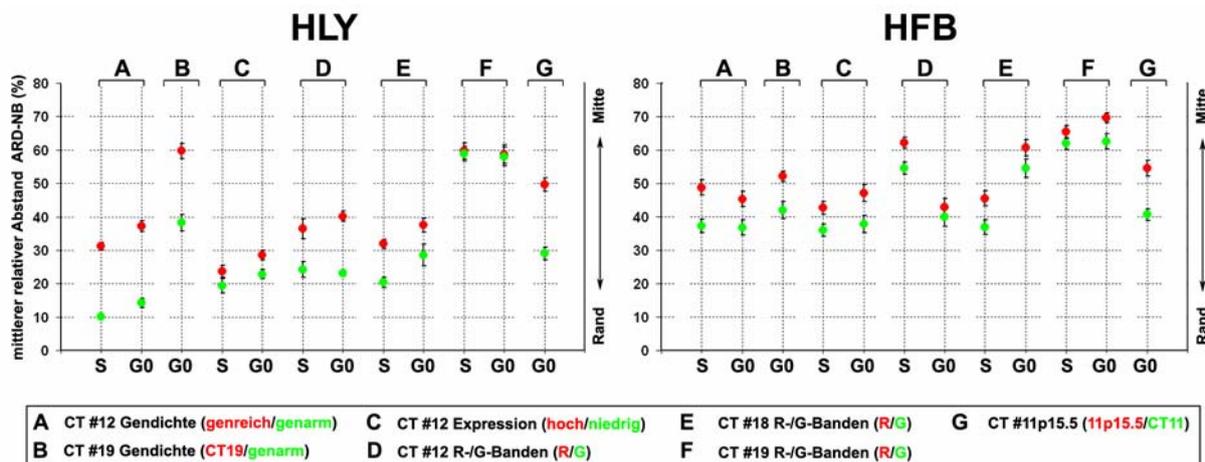


Abbildung.3.4.2.1: Graphische Darstellung der ARD-NBs

Der linke Graph zeigt die Ergebnisse der humanen Lymphozyten (HLY), der rechte die Ergebnisse der humanen Fibroblasten (HFB). Die Ordinate gibt den gemittelten relativen Abstand zur Zellkernoberfläche in Prozent an (ARD-NB). Die Buchstaben A bis G entsprechen der Einteilung der Experimente in Tabelle 3.4.2., die Abszisse gibt Auskunft über die Zellzyklusphase, in denen sich die untersuchten Zellen befanden. Rote Punkte repräsentieren den genreichen Pool von CT #12 sowie die genreichen Abschnitte von #19 (A und B), den hoch exprimierten Pool von CT #12 (C), die R-Banden Pools von CT #12, #18 und #19 (D, E und F) bzw. die Region 11p15.5 von CT #11 (G). Die grünen Punkte stehen für den genarmen Pool von CT #12 und #19 (A und B), den niedrig exprimierten Pool

von CT #12 (C), die G-Banden Pools von CT #12, #18 und #19 (D, E und F) bzw. das gesamte CT #11 (G).

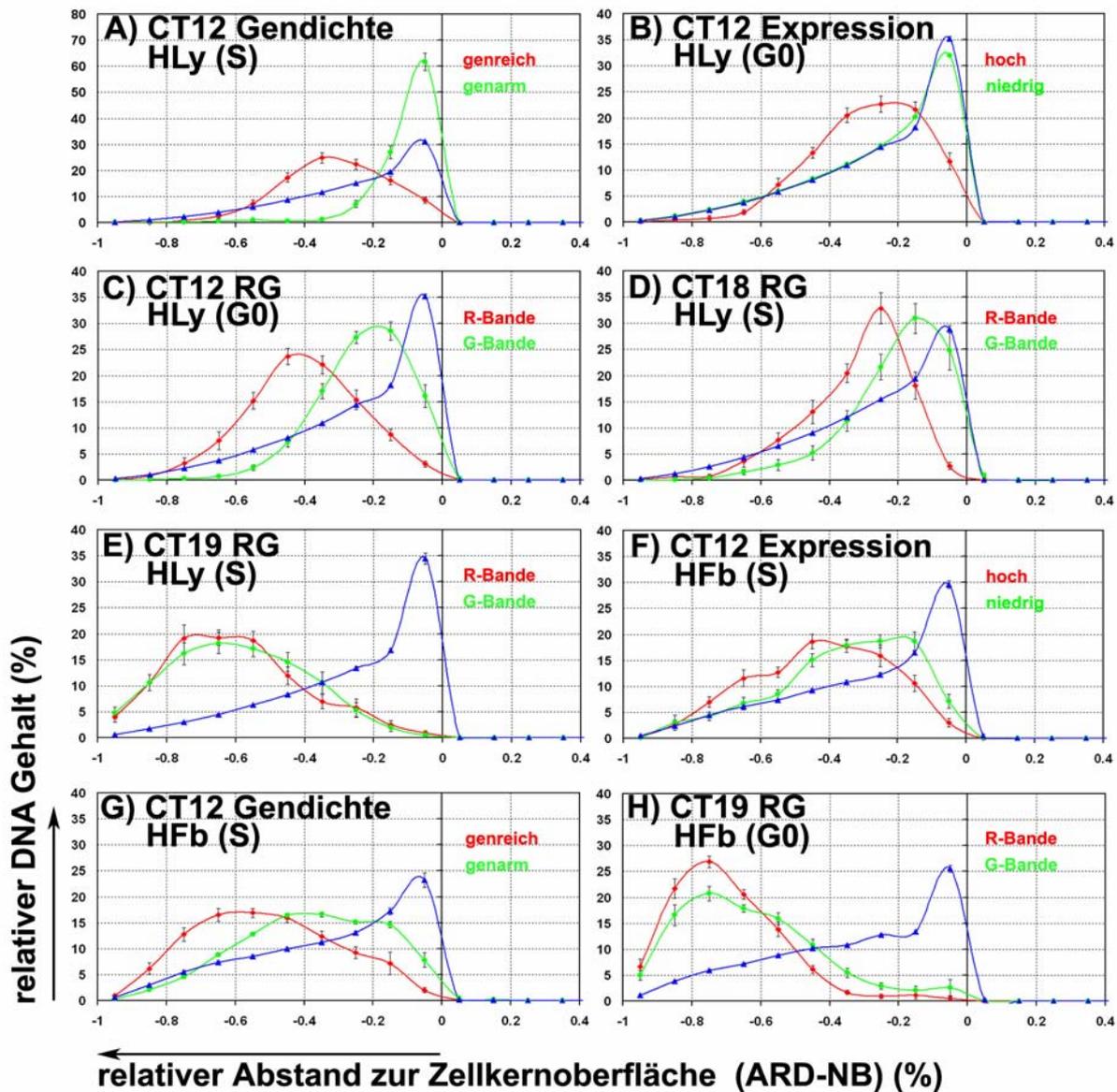


Abbildung.3.4.2.2: Beispiele für Verteilungskurven (Auswertungen mit eADS)

Die Ordinate zeigt den relativen DNA Gehalt der BAC-Pools in Prozent, die Abszisse gibt den normalisierten Abstand der Signalvoxel zur Oberfläche des Zellkerns an. Negative Werte zeigen dabei das Innere des Zellkerns, der Wert „0“ repräsentiert den segmentierten Zellkernrand, positive Werte spiegeln das Äußere des Zellkerns wieder. Außerhalb des Zellkerns sind erwartungsgemäß keine Signalvoxel gefunden worden, die erste äußere Schale hat für alle Kurven den Wert null. Der scheinbar angezeigte DNA Gehalt der Kurven außerhalb des Zellkerns kommt durch die Interpolation zwischen den Werten benachbarter Schalen in dieser Darstellungsweise zustande.

Die blaue Kurve zeigt die Kerngegenfärbung. Die roten Kurven repräsentieren die Abstandsverteilungen des genreichen BAC-Pools von CT #12 in Hly (A), des hoch exprimierten BAC-Pools von CT #12 in HLY (B), der R-Banden-BAC-Pools von CT #12, #18 und #19 in HLY (C, D und E), des hoch exprimierten BAC-Pools von CT #12 in HFb (F), des genreichen BAC-Pools von CT #12 in HFb (G) sowie des R-Banden BAC-Pools von CT #19 in HFb (H). Die grünen Kurven repräsentieren die Abstandsverteilungen des genarmen BAC-Pools von CT #12 in Hly (A), des niedrig exprimierten BAC-Pools von CT #12 in HLY (B), der G-Banden-BAC-Pools von CT #12, #18 und

#19 in HLY (C, D und E), des niedrig exprimierten BAC-Pools von CT #12 in HFb (F), des genarmen BAC-Pools von CT #12 in HFb (G) sowie des G-Banden BAC-Pools von CT #19 in HFb (H). (A) hat eine andere Skalaeinheit bezüglich der Ordinate.

In allen Experimenten wurden die genreichen, die hoch exprimierten sowie die R-Banden BAC-Pools weiter innen im Zellkern gefunden als ihre korrespondierenden BAC-Pools (genarmer, niedrig exprimierter, bzw. G-Banden BAC-Pool). Dies trifft sowohl für humane Lymphozyten wie auch für humane Fibroblasten zu. Es konnte auch kein Unterschied zwischen ruhenden (G0-Phase) und zyklierenden (S-Phase) Zellen gefunden werden. Die Abbildung 3.4.2.1 verdeutlicht dieses Ergebnis. Es ist leicht zu erkennen, dass in allen Experimenten die roten Punkte, die die erstgenannten BAC-Pools repräsentieren, eine internere Position im Zellkern einnehmen als die entsprechend korrespondierenden BAC-Pools, die durch die grünen Punkte dargestellt werden. In nur drei Experimenten war dieser Unterschied nicht signifikant (HFb 12RG G0-Phase, HLY 19RG S-Phase und HLY 19RG G0-Phase, siehe grau unterlegte Zellen in Tabelle 3.4.2.), dennoch konnte auch hier die eben beschriebene Verteilung beobachtet werden.

Die sehr genreiche und transkriptionell sehr aktive Region 11p15.5 wurde ebenfalls in beiden Zelltypen (HLY und HFb) in einer zentraleren Position im Zellkern gefunden als das restliche Chromosomenterritorium #11.

Die größten Unterschiede in diesen Verteilungen konnten für die BAC-Pools ermittelt werden, die die genreichen und genarmen Segmente von CT #12 und #19 repräsentieren (siehe Tabelle 3.4.2, ΔD). In diesen Experimenten zeigte sich eine deutliche Polarität in der Anordnung der BAC-Pools, die schon bei der Betrachtung mit dem Auge klar erkennbar ist. Während genarme Segmente peripher angeordnet sind, nehmen die genreichen Abschnitte internere Positionen im Zellkern ein. Ein besonders interessantes Beispiel dafür ist das insgesamt sehr genreiche CT #19, das, wie in früheren Arbeiten bereits beschrieben (Boyle et al., 2001; Cremer et al., 2003; Cremer et al., 2001b; Croft et al., 1999), einen sehr zentralen Platz im Zellkern einnimmt. In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass der einzige genarme Abschnitt des Chromosoms, der das Centromer umgibt, oft aus dem restlichen Territorium herausragt und sich mit dem Centromer in Richtung Zellkernperipherie erstreckt. Die Abbildung 3.4.2.3 zeigt Beispiele für diese deutlich erkennbare Polarität.

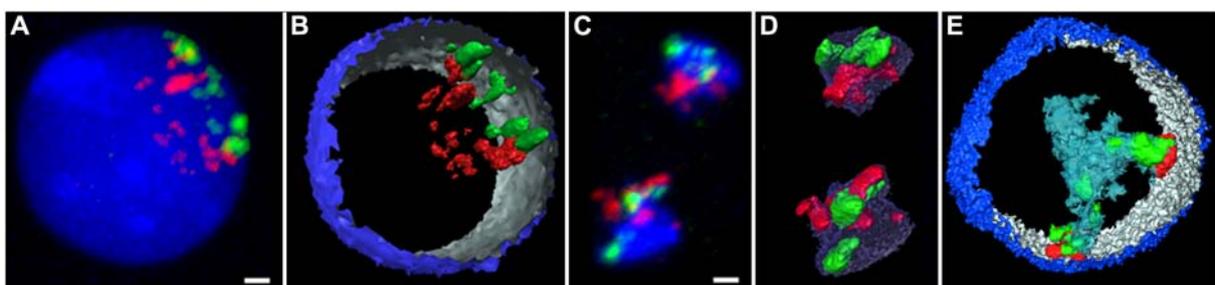


Abbildung.3.4.2.3: Verteilung von genreichen und genarmen Segmenten von CT #12 und #19 in HLY (A) Maximum Z-Projektion der Kerngegenfärbung (blau), des genreichen BAC-Pools (rot) und des genarmen BAC-Pools (grün) von CT #12. Der Bar repräsentiert 1 μ m. (B) 3D-Rekonstruktion desselben Zellkerns mittels der Software TGS Amira 3.1.1. Der Zellkern ist angeschnitten dargestellt (innere Oberfläche silber-grau, äußere Oberfläche blau). (C) Maximum Z-Projektion zweier CTs #12 (blau), des genreichen BAC-Pools (rot) und des genarmen BAC-Pools (grün) von CT #12. Der Bar

repräsentiert 1 μm . **(D)** 3D-Rekonstruktion derselben CTs mittels der Software TGS Amira 3.1.1. **(E)** 3D-Rekonstruktion mittels TGS Amira 3.1.1 zweier benachbarter CTs #19 (helles blau), des genarmen BAC-Pools (grün) und des Centromers (rot) von CT #19. Der Zellkern ist angeschnitten dargestellt (innere Oberfläche silber-grau, äußere Oberfläche blau). Diese Aufnahme wurde von Sandra Dittrich im Rahmen ihrer Diplomarbeit erstellt. In allen Beispielen ist die polare Anordnung der korrespondierenden BAC-Pools bezüglich des Zellkerns sowie der CTs deutlich erkennbar.

Die mit der Expression korrelierten BAC-Pools zeigten in den humanen Lymphozyten einen deutlich kleineren Unterschied bezüglich ihrer Verteilung. Die hoch exprimierten Sequenzen lagen zwar signifikant interner im Kern als die niedrig exprimierten Sequenzen, die Differenz ΔD der mittleren relativen radialen Positionen der BAC-Pools betrug allerdings nur etwa 5% vom Kernradius (siehe Tabelle 3.4.2). In den humanen Fibroblasten war dieser Unterschied allerdings nur geringfügig kleiner als der für die Gendichte-abhängigen BAC-Pools. Beim Vergleich der Ergebnisse zwischen Lymphozyten und Fibroblasten muss jedoch beachtet werden, dass sich die mit der Expression korrelierten BAC-Pools für diese beiden Zelltypen aufgrund deren unterschiedlicher Expressionsprofile in ihrer BAC-Klon Zusammensetzung deutlich unterscheiden (siehe Abbildung 3.1).

Bei einem Vergleich der ARD-NBs der R- und G-Banden BAC-Pools in den Lymphozyten zeigten sich chromosomenspezifische Unterschiede. Für alle Chromosomen konnte gezeigt werden, dass die R-Banden BACs weiter innen im Kern lokalisiert sind als die G-Banden BACs, allerdings ist dieses Phänomen unterschiedlich stark ausgeprägt. Während sich für Chromosom 12 und 18 relativ deutliche Unterschiede nachweisen ließen, lagen die Werte ΔD für das Chromosom 19 unter einem Prozent, die Verteilung der R- und G-Banden BACs war hier auch nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,436 - 0,537$). Das lässt sich vielleicht mit dem homogenen Aufbau des Chromosoms 19 erklären. Wie bereits im Abschnitt 3.1.1 beschrieben ist das Chromosom 19 mit Ausnahme der Centromerregion (die in diesen BAC-Pools allerdings nicht repräsentiert wurde) durchgehend sehr genreich. Mit einer Giemsa-Färbung lassen sich zwar G-Banden nachweisen, diese sind aber alle nur sehr schwach gefärbt. Offensichtlich haben die nur geringen Unterschiede in der Sequenzzusammensetzung der R- und der nur leicht gefärbten G-Banden des Chromosoms 19 keine deutlichen Auswirkungen auf die räumliche Anordnung dieser Segmente im Zellkern.

In den humanen Fibroblasten dagegen konnten für alle drei Chromosomen ähnliche Werte ΔD festgestellt werden. Hier zeigten auch die R- und G-Banden Pools des Chromosoms 19 einen signifikanten Unterschied in ihrer Verteilung. Eine mögliche Erklärung dafür ist die flache, ellipsoide Form des Zellkerns der Fibroblasten. In den runden Zellkernen der Lymphozyten hat das Chromosom 19 alleine schon durch seine zentrale Position einen deutlichen Abstand zur genarmen und tendenziell inhibierend wirkenden Peripherie. In den flachen Zellkernen der Fibroblasten ist dieser Abstand zur Peripherie aufgrund der begrenzten räumlichen Ausdehnung sehr viel schwerer zu gewährleisten. Um aktive Sequenzen in einer internen, genreichen Umgebung zu platzieren, ist daher vielleicht auch eine größere Strukturierung des Chromosomenterritoriums von Nöten, die sich in einem signifikanten Unterschied in der Verteilung der R- und G-Banden bezüglich des Zellkerns widerspiegelt.

Einen nicht signifikanten Unterschied in der Verteilung der R- und G- Banden BAC-Pools wurde in den Fibroblasten für das Chromosom 12 nur in ruhenden (G₀-Phase) Zellen gefunden. Dies mag an einer „unglücklichen“ Auswahl der ausgewerteten Zellkerne liegen. Der allgemeine Trend, dass die R-Banden eine internere Position als die G-Banden innehaben, konnte aber auch hier bestätigt werden.

Vergleicht man die ARD-NBs aller R-Banden BAC-Pools bzw. G-Banden BAC-Pools innerhalb eines Zelltyps findet man einen relativ großen Wertebereich. Die Zuordnung einer DNA-Sequenz zu einer beliebigen R- oder G-Bande an sich sagt noch nichts über ihre Positionierung im Zellkern aus. So kann beispielsweise auch ein Abschnitt auf einer G-Bande des Chromosoms 19 interner liegen als ein Abschnitt auf einer R-Bande des Chromosoms 12 oder auch 18.

Um herauszufinden welcher Faktor entscheidend für die spezifische topologische Anordnung von Chromatin ist, wurde eine Korrelationsanalyse für alle verwendeten BAC-Pools durchgeführt. Dabei wurde der gemittelte relative Abstand zur Zellkernoberfläche (ARD-NB) gegen die mittlere Gendichte, den gemittelten GC-Gehalt, den mittleren Replikationsindex bzw. gegen ein gemittelt Expressionlevel der BAC-Pools aufgetragen. Die Abbildung 3.4.2.4 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.

Die mittlere Gendichte der BAC-Pools wurde für ein 2Mb sowie für ein 10Mb Fenster berechnet. Dafür wurde mit Hilfe der NCBI Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) die Anzahl der Gene in einem Bereich von 2Mb bzw. 10Mb um jeden BAC-Klon herum ermittelt.

Der gemittelte GC-Gehalt eines BAC-Pools setzt sich aus den einzelnen GC-Gehalten der darin enthaltenen BAC-Klone zusammen. Diese wurden mit Hilfe des Programms FastPCR aus den Sequenzen der Klone ermittelt.

Der mittlere Replikationsindex der BAC-Pools ist der Mittelwert der einzelnen Replikationszeiten der im Pool enthaltenen BAC-Klone. Gab es für einen BAC-Klon keine diesbezüglichen Daten wurde als Referenzklon ein nah benachbarter BAC-Klon verwendet. Die Daten zum Replikationstiming wurden mit freundlicher Genehmigung von Heike Fiegler (Wellcome Trust Center Sanger Institute, Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt. Dafür wurden Zellen in der S- bzw. G₁-Phase einer lymphoblastoiden Zelllinie (HRC575) mittels Durchflußzytometrie isoliert, deren DNA verschieden markiert und auf einen Array co-hybridisiert. Das Fluoreszenzverhältnis für jeden spot wurde berechnet. Ein Verhältnis von S:G₁ = 2:1 weist auf eine sehr frühe Replikationszeit, ein Verhältnis von S:G₁ = 1:1 auf eine sehr späte Replikationszeit hin. Nach einer Normalisierung ergaben sich Werte für die einzelnen BACs zwischen 1,0 (späte Replikation) und 2,0 (frühe Replikation) (Fiegler et al., 2006; Woodfine et al., 2004). Da gezeigt werden konnte, dass das Replikationstiming für das menschliche Chromosom 22 in lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten sehr ähnlich ist (White et al., 2004), wurden diese Replikationsdaten auch für die Korrelationsanalyse in Fibroblasten herangezogen.

Das mittlere Expressionsniveau wurde aus den Daten des von Dr. Michael Speicher (Institut für humane Genetik, Graz, Österreich) zur Verfügung gestellten Expressionsprofils (basierend auf den Affymetrix Chip U133A) berechnet. Dafür wurde von jedem in einem Pool

enthaltenen BAC jeweils nur der Wert des am höchsten exprimierten Gens verwendet und zu einem Durchschnittswert gemittelt.

Im Anhang sind im Abschnitt 7.1 ausführliche Tabellen angefügt, die diese Eigenschaften für jeden einzelnen verwendeten BAC-Klon aufführen.

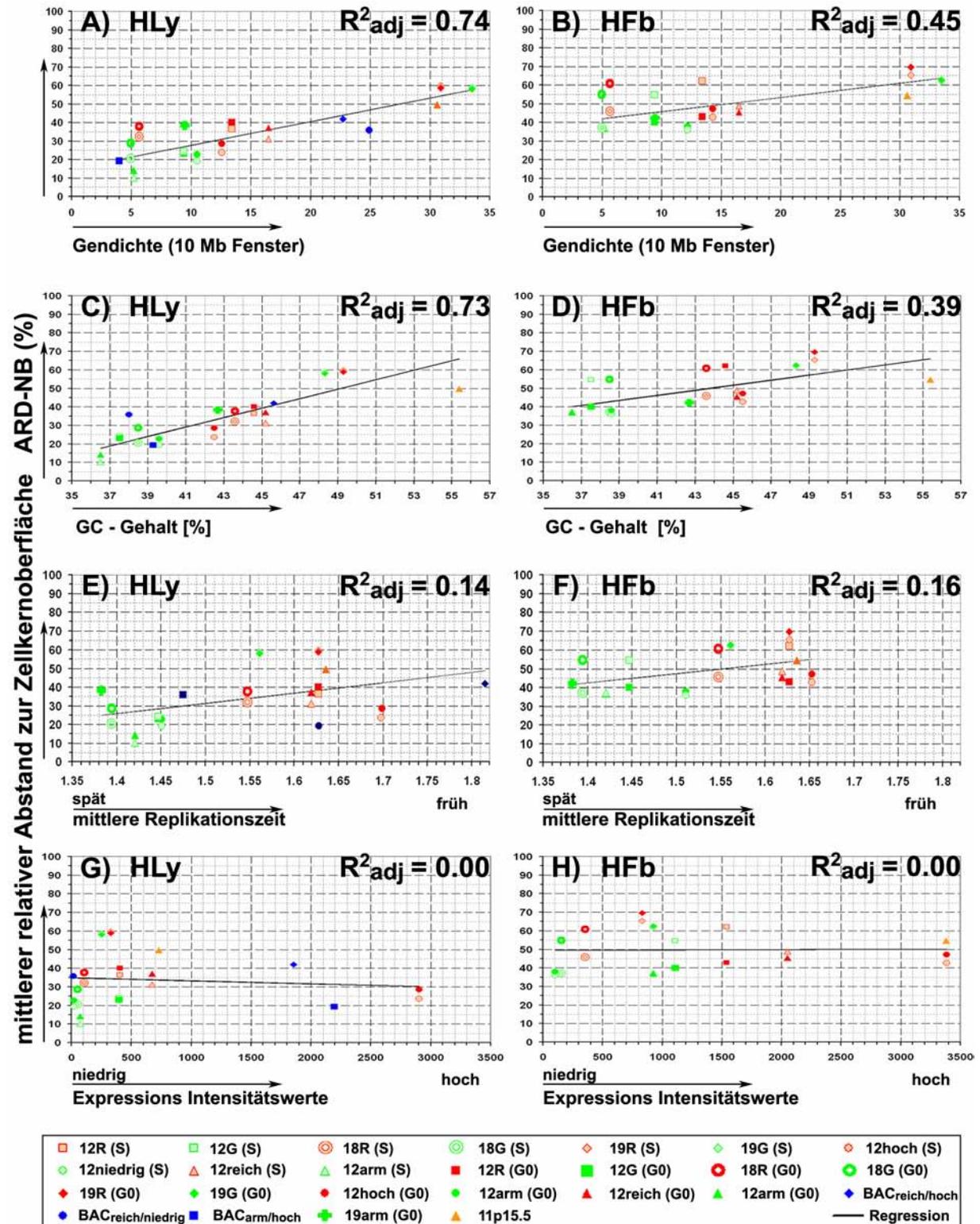


Abbildung.3.4.2.4: Korrelationsanalysen

Die Ordinate gibt in allen Graphen den mittleren relativen Abstand der BAC-Pools zur Zellkernoberfläche an. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Chromatineigenschaften, für die eine

Korrelationsanalyse durchgeführt wurde, wie die Gendichte (**A** und **B**), der GC-Gehalt (**C** und **D**), die mittlere Replikationszeit (**E** und **F**) und das Expressionsniveau (**G** und **H**). Die Legende erklärt die Symbole für die einzelnen BAC-Pools. Die schwarze Linie ist die Regressionskurve, der Wert der linearen Regression wurde über den „adjusted correlation coefficient R^2_{adj} “ (Sigma Stat) ermittelt.

Die größte Korrelation zeigte sich zwischen dem ARD-NB und der Gendichte (ermittelt für ein 10 Mb Fenster) für alle BAC-Pools, unabhängig davon für welches Experiment sie ursprünglich zusammengestellt wurden (Analyse der Anordnung von Segmenten verschiedener Gendichten, verschiedener Expression oder der Anordnung von R- und G-Banden). Eine nahezu gleich gute Korrelation ergab sich auch für den ARD-NB und der Gendichte im 2Mb Fenster ($R^2_{adj} = 0,72$). Der Korrelationswert war in den humanen Lymphozyten erwartungsgemäß höher als in den humanen Fibroblasten. Für diese flachen Zellkerne wurde bereits dokumentiert, dass eine Anordnung der Chromosomenterritorien nach der Größe eine deutliche Rolle spielt (Bolzer et al., 2005), dennoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die auch Gendichte einen Einfluss auf die Topologie in diesen Zellkernen hat. Eine ähnlich hohe Korrelation wurde für den ARD-NB mit dem GC-Gehalt gefunden. Dies ist nicht überraschend, da der GC-Gehalt mit der Gendichte von DNA-Segmenten in naher Beziehung steht (Saccone and Bernardi, 2001; Versteeg et al., 2003). Für ARD-NB und das Replikationstiming der BAC-Pools ergab sich ein deutlich geringerer Korrelationswert und für ARD-NB und Expressionsniveau konnte gar kein Zusammenhang ermittelt werden. Die Expression an sich scheint offensichtlich nicht der entscheidende Faktor für eine höhere Ordnung im Zellkern zu sein, während die Gendichte (und damit einhergehend der GC-Gehalt) offensichtlich großen Einfluß haben.

3.4.3 Untersuchung der räumlichen Anordnung im Zellkern von Genen mit inversen Eigenschaften

Die im Abschnitt 3.4.2 beschriebene Korrelationsanalyse unterstützt die Annahme, dass die regionale Gendichte der entscheidende Faktor für die radiale Platzierung eines bestimmten DNA-Segments im Zellkern ist. Die Expression alleine dagegen scheint keine Rolle zu spielen. Um diese Hypothese näher zu untersuchen wurde in einem weiteren Experiment die Lage von Genen im Zellkern untersucht, die bezüglich Expression und Gendichte ihrer Umgebung genau inverse Eigenschaften aufzeigten. Ein in diesem Ansatz untersuchtes Gen ist ATP5B, das in der gendichten R-Bande 12q13.13 lokalisiert ist und in humanen Lymphozyten stark exprimiert wird. Das zweite Gen NAP1L1 befindet sich in einer genarmen Umgebung in der R-Bande 12q21.2, wird aber ebenfalls in humanen Lymphozyten stark exprimiert. Das dritte untersuchte Gen NEUROD4 zeigt dagegen nur eine sehr geringe transkriptionelle Aktivität in humanen Lymphozyten, ist aber in der genreichen G-Bande 12q13.2 lokalisiert. Es wurden für dieses Experiment drei BAC-Klone ausgewählt, die diese Gene enthalten. Im Abschnitt 3.2 sind die Auswahl und die Eigenschaften dieser Klone beschrieben.

Die Tabelle 3.4.3 zeigt die Ergebnisse der Analyse der räumlichen Verteilung dieser BAC-Klone in humanen Lymphozyten mittels der eADS Software, die Abbildung 3.4.3 zeigt die dazu gehörige Verteilungskurve.

Eigenschaften der BAC-Klone	ARD-NB	Häufigkeit und Signifikanzen der Verteilungen		
		BAC (A)	BAC (B)	BAC (C)
BAC (A) Genreich hohe Expression ATP5B	41.95%	---	(A)/(B) 12/20 (60%) n.s. ($p=0.154$)	(A)/(C) 20/20 (100%) s. ($p<0.001$)
BAC (B) Genreich niedrige Expression NEUROD4	35.85%	(B)/(A) 8/20 (40%) n.s. ($p=0.154$)	---	(B)/(C) 16/20 (80%) s. ($p<0.001$)
BAC (C) Genarm hohe Expression NAP1L1	19.26%	(C)/(A) 0/20 (0%) s. ($p<0.001$)	(C)/(B) 4/20 (20%) s. ($p<0.001$)	---

Tabelle.3.4.3: ARD-NB einzelner Gene mit inversen Eigenschaften

Der linke Teil der Tabelle gibt die gemittelten relativen Abstände zur Oberfläche des Zellkerns (ARD-NB) der einzelnen BAC-Klone an. Der rechte Teil der Tabelle gibt Auskunft über die Häufigkeit (in absoluten Zahlen und Prozentsatz der Zellkerne) einer spezifischen Verteilung der BAC-Klone im Zellkern, bei der der erstgenannte BAC-Klon eine internere Position innehat. Die letzte Zeile gibt die Signifikanz der Unterschiede an (Wilcoxon signed Rank Sum Test), grau unterlegte Spalten weisen auf nicht signifikante Unterschiede ($p>0,05$) hin.

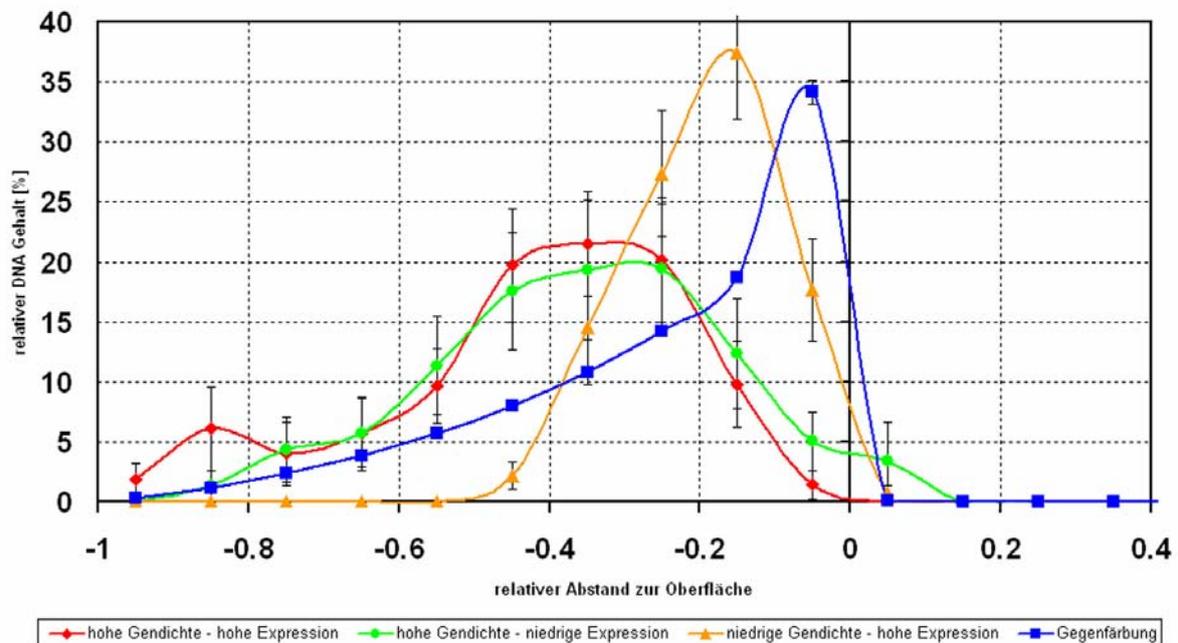


Abb. 3.4.3: eADS-Verteilungskurve für BACs mit inversen Eigenschaften in humanen Lymphozyten. Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt der BAC-Pools in Prozent, die Abszisse gibt den normalisierten Abstand der Signalvoxel zur Oberfläche des Zellkerns an. Negative Werte zeigen dabei das Innere des Zellkerns, der Wert „0“ repräsentiert den segmentierten Zellkernrand, positive Werte spiegeln das Äußere des Zellkerns wieder. Der scheinbar angezeigte DNA Gehalt der Kurven außerhalb des Zellkerns kommt durch die Interpolation zwischen den Werten benachbarter Schalen in

dieser Darstellungsweise zustande. Der einzige tatsächliche Wert außerhalb des Zellkerns (grüne Kurve) lässt sich durch den insgesamt recht hohen Hintergrund der Hybridisierung erklären. Die blaue Kurve zeigt die Kerngegenfärbung. Die rote Kurve repräsentiert die Abstandsverteilung des genreichen BAC-Klons mit dem hoch exprimierten Gen ATP5B, die grüne Kurve zeigt die Abstandsverteilung des genreichen BAC-Klons mit dem niedrig exprimierten Gen NEUROD4, die orange Kurve stellt die Verteilungskurve des genarmen BAC-Klons mit dem hoch exprimierten Gen NAP1L1 dar.

Obwohl sich ATP5B und NEUROD4 deutlich in ihrer Expression unterscheiden (siehe Tabelle 3.2.1), zeigten beide sehr ähnliche Verteilungskurven. Sie hatten beide eine deutlich internere Position im Zellkern inne als das hoch exprimierte Gen NAP1L1, das in der Zellkernperipherie zu finden war. Die Positionierung dieser Gene scheint sich nur nach der Gendichte in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft zu richten, genreiche Segmente befinden sich interner im Kern als genarme Abschnitte. Die hohe transkriptionelle Aktivität von NAP1L1 hat offensichtlich keinen Einfluss auf diese Anordnung, es hat aufgrund seiner genarmen Umgebung eine peripherere Position als NEUROD4, welches nur basal exprimiert wird.

Dieses Experiment unterstützt die Beobachtung, dass die lokale Gendichte der entscheidende Faktor für eine höhere radiale Ordnung im Zellkern ist.

3.5 Anordnung der BAC-Pools innerhalb der Chromosomenterritorien

3.5.1 Entwicklung eines geeigneten Auswertungsprogrammes

Zu Beginn dieser Arbeit gab es in unserem Labor noch kein geeignetes Programm mit dessen Hilfe die räumliche Anordnung von spezifischen Sequenzen innerhalb eines Chromosomenterritoriums quantitativ analysiert werden konnte. Das 3D-RRD Programm (siehe Abschnitt 2.11.1) war dazu zwar im Prinzip in der Lage, allerdings berücksichtigt es keine Signale die außerhalb der zu untersuchenden Referenzstruktur (also in diesem Fall das Chromosomenterritorium) liegen. In nahezu allen Territorien konnten aber Signale gefunden werden, die an der Grenze oder sogar außerhalb der Territorien lokalisieren. Dieses Phänomen kann mehrere Ursachen haben. Eine mögliche Erklärung ist, dass die verwendeten paint-Sonden nicht 100% der Territorien nachweisen, aber auch mangelnde Auflösung des Mikroskops oder ein höherer Hintergrund und damit ein etwas zu hoch angesetzter Schwellenwert könnten dazu beitragen. Nachgewiesener Weise kann es in Einzelfällen auch zur Ausstülpung großer „Chromatinloops“ aus dem Territorium kommen (Spector, 2003; Volpi et al., 2000; Williams et al., 2002). Solche Signale würden für die Auswertung verloren gehen, da die vom 3D-RRD Programm angelegten Schalen nur das Innere des segmentierten Chromosomenterritoriums repräsentieren. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Johann von Hase (Kirchhoff Institute für Physik, Universität Heidelberg) eine Erweiterung für die Software entwickelt (siehe Abschnitt 2.11.2), die es ermöglichte auch Schalen außerhalb des Chromosomenterritoriums anzulegen. Mit diesen äußeren Schalen konnte nun die Gesamtheit der BAC-Pool Signale erfasst werden. Dennoch zeigte das Programm deutliche Einschränkungen. Aufgrund der spezifischen Segmentierung der Referenzstruktur konnten

nur Territorien ausgewertet werden, die eine regelmäßige, runde bis ovale Form aufwiesen (siehe Abbildung 2.11.1.2). Unregelmäßig geformte CTs mussten von vorn herein von dieser Auswertung ausgeschlossen werden. Des Weiteren unterteilt das Programm das Territorium in radiale Schalen, ausgehend vom Schwerpunkt. Da die für die Auswertung ausgewählten CTs niemals runde, sondern eher ovale Formen hatten, hatten sie auch verschieden lange Radii in den verschiedenen räumlichen Ausrichtungen. Dies spiegelt sich in den vom Programm angelegten Schalen wieder, die ebenfalls entsprechend des jeweiligen Radius verschiedene Dicken in den verschiedenen Richtungen aufwiesen. Je nach Lage eines BAC-Signals im Territorium konnte es also zu verschiedenen Schalen zugeordnet werden (siehe Abb. 3.4.1), was natürlich eine Unschärfe der Ergebnisse zur Folge hatte. Einige exemplarische Ergebnisse der Auswertung mit dem erweiterten 3D-RRD Programm sind im Anhang im Abschnitt 7.8.1 zu finden.

Auch hier stellte das mit Unterstützung von Dr. Johann von Hase (Kirchhoff Institut für Physik, Universität Heidelberg) für diese Arbeit entwickelte Programm ADS eine bessere Alternative zur Auswertung dar. Dieses Programm misst absolute Abstände von Signalen zur Oberfläche der gewünschten Referenzstruktur (z.B. Zellkerne oder Chromosomenterritorien, genaue Beschreibung im Abschnitt 2.11.3). Auch dafür wird das CT segmentiert, aber anders als beim 3D-RRD Programm beginnt die ADS Software ausgehend von der Oberfläche in beide Richtungen (nach innen und außen) äquidistante Schalen anzulegen. Die entstehenden Schalen haben dabei in jeder räumlichen Ausdehnung die selbe Dicke, und ein Signal mit einem definierten Abstand zur Oberfläche wird unabhängig von seiner Position im Territorium immer in dieselbe Schale eingeteilt werden (siehe Abb 3.4.1).

Alle Experimente zur Verteilung der BAC-Pools innerhalb von Chromosomenterritorien wurden daher mit dem ADS-Programm ausgewertet.

3.5.2 Anordnung der BAC-Pools in Bezug zur Oberfläche der Chromosomenterritorien

Alle Experimente wurden mit dem ADS Programm ausgewertet, das die kürzesten absoluten Abstände jedes Signalvoxels zur Oberfläche angibt. Tabelle 3.5.2 gibt Auskunft über die erhaltenen gemittelten Abstände zur Oberfläche der Territorien sowie die Unterschiede in den Abständen zweier in einem Experiment verglichenen BAC-Pools (ΔD).

BAC Pool	Hly/HLb		HFb	
	S	G0	S	G0
A CT #12 Gendichte	$D_{\text{genreich}} = -694\text{nm}$ $D_{\text{genarm}} = -685\text{nm}$ $\Delta D = -9\text{nm}$ 12/21 (57%) ($p=0.465$)	$D_{\text{genreich}} = -625\text{nm}$ $D_{\text{genarm}} = -652\text{nm}$ $\Delta D = +27\text{nm}$ 13/24 (54%) ($p=0.353$)	$D_{\text{genreich}} = -692\text{nm}$ $D_{\text{genarm}} = -697\text{nm}$ $\Delta D = +5\text{nm}$ 9/18 (50%) ($p=0.966$)	$D_{\text{genreich}} = -655\text{nm}$ $D_{\text{genarm}} = -712\text{nm}$ $\Delta D = +57\text{nm}$ 14/26 (54%) ($p=0.178$)
B CT #12 R-/G- Banden	$D_R = -623.55\text{nm}$ $D_G = -667.26\text{nm}$ $\Delta D = +43.71\text{nm}$ 7/18 (39%) ($p=0.196$)	$D_R = -721.8\text{nm}$ $D_G = -768.5\text{nm}$ $\Delta D = +46.7\text{nm}$ 11/25 (44%) ($p=0.197$)	$D_R = -647.11\text{nm}$ $D_G = -686.65\text{nm}$ $\Delta D = +39.39\text{nm}$ 10/30 (33%) ($p=0.109$)	$D_R = -395.2\text{nm}$ $D_G = -289.2\text{nm}$ $\Delta D = -105\text{nm}$ 14/19 (74%) ($p<0.002$)

C CT #18 R-/G- Banden	$D_R = -380.4\text{nm}$ $D_G = -429.8\text{nm}$ $\Delta D = +49.4\text{nm}$ 11/26(42%) ($p=0.195$)	$D_R = -400.6\text{nm}$ $D_G = -420.2\text{nm}$ $\Delta D = +19.6\text{nm}$ 10/20(50%) ($p=0.498$)	$D_R = -416\text{nm}$ $D_G = -394.1\text{nm}$ $\Delta D = -21.9\text{nm}$ 16/30(53%) ($p=0.422$)	$D_R = -434.2\text{nm}$ $D_G = -460.1\text{nm}$ $\Delta D = +25.9\text{nm}$ 9/20(45%) ($p=0.756$)
D CT #19 R-/G-Banden	$D_R = -266.37\text{nm}$ $D_G = -275.76\text{nm}$ $\Delta D = +9.39\text{nm}$ 10/20 (50%) ($p=0.756$)	$D_R = -311.7\text{nm}$ $D_G = -349.2\text{nm}$ $\Delta D = +37.5\text{nm}$ 12/27(44%) ($p=0.524$)	$D_R = -265.1\text{nm}$ $D_G = -223.29\text{nm}$ $\Delta D = -41.81\text{nm}$ 12/20(60%) ($p=0.729$)	$D_R = -418.75\text{nm}$ $D_G = -433.96\text{nm}$ $\Delta D = +15.21\text{nm}$ 11/23(48%) ($p=0.338$)
E CT #12 Expression	$D_{\text{hoch}} = -360\text{nm}$ $D_{\text{niedrig}} = -282\text{nm}$ $\Delta D = -78\text{nm}$ 17/24(70%) ($p=0.025$)	$D_{\text{hoch}} = -343\text{nm}$ $D_{\text{niedrig}} = -335\text{nm}$ $\Delta D = -8\text{nm}$ 12/25(48%) ($p=0.893$)	$D_{\text{hoch}} = -468\text{nm}$ $D_{\text{niedrig}} = -408\text{nm}$ $\Delta D = -60\text{nm}$ 16/23(70%) ($p=0.02$)	$D_{\text{hoch}} = -373\text{nm}$ $D_{\text{niedrig}} = -424\text{nm}$ $\Delta D = +51\text{nm}$ 10/21(47%) ($p=0.102$)

Tabelle.3.5.2: Absolute Abstände zur Oberfläche der Chromosomenterritorien

Die ersten zwei Zeilen in jeder Tabellenzeile zeigen die Werte der gemittelten absoluten Abstände (D) der in einem Experiment korrespondierenden BAC-Pools zur Oberfläche des Territoriums. ΔD gibt den Unterschied in der Verteilung zwischen den zusammengehörigen BAC-Pools an. Die vierte Zeile gibt Auskunft über die absolute Anzahl und den Prozentsatz der Zellkerne in den jeweiligen Experimenten für die folgende Verteilung zutrifft: $D_{\text{genreich}} > D_{\text{genarm}}$ (Spalte A), $D_R > D_G$ (Spalte B, C und D) und $D_{\text{hoch}} > D_{\text{niedrig}}$ (Spalte E). Die letzte Zeile gibt die Signifikanz der Unterschiede an (Wilcoxon signed Rank Sum Test), grau unterlegte Spalten weisen auf nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) hin.

Die Abbildung 3.5.2.1 stellt die in der Tabelle 3.5.2 angegebenen Ergebnisse graphisch dar und die Abbildung 3.5.2.2 zeigt schließlich exemplarisch einige repräsentative Verteilungskurven für ausgewählte Experimente. Eine vollständige Übersicht aller Verteilungskurven findet sich im Anhang unter Abschnitt 7.8.2.

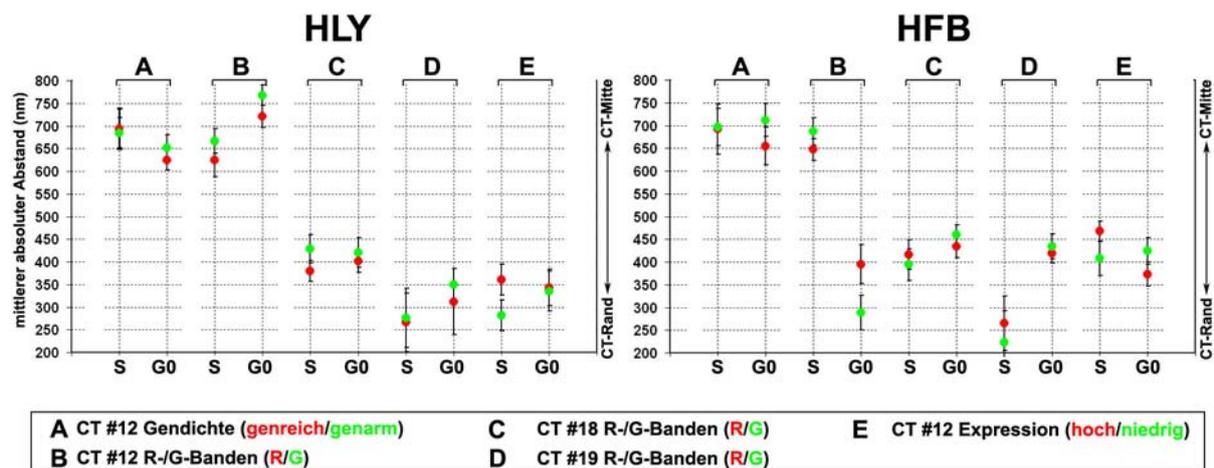


Abbildung.3.5.2.1: Graphische Darstellung der absoluten Abstände der BAC-Pools zur CT Oberfläche

Der linke Graph zeigt die Ergebnisse für die humanen Lymphozyten (HLY), der rechte die Ergebnisse für die humanen Fibroblasten (HFB). Die Ordinate gibt den gemittelten absoluten Abstand zur Territoriumsoberfläche in nm an. Die Buchstaben A bis E entsprechen der Einteilung der Experimente in Tabelle 3.5.2., die Abszisse gibt Auskunft über die Zellzyklusphase, in denen die untersuchten Zellen sich befanden. Rote Punkte repräsentieren den genreichen Pool von CT #12 (A), die R-Banden Pools von CT #12, #18 und #19 (B, C und D) sowie den hoch exprimierten Pool von CT #12 (E). Die

grünen Punkte stehen für den genarmen Pool von CT #12 (A), die G-Banden Pools von CT #12, #18 und #19 (B, C und D) bzw. den niedrig exprimierten Pool von CT #12 (E).

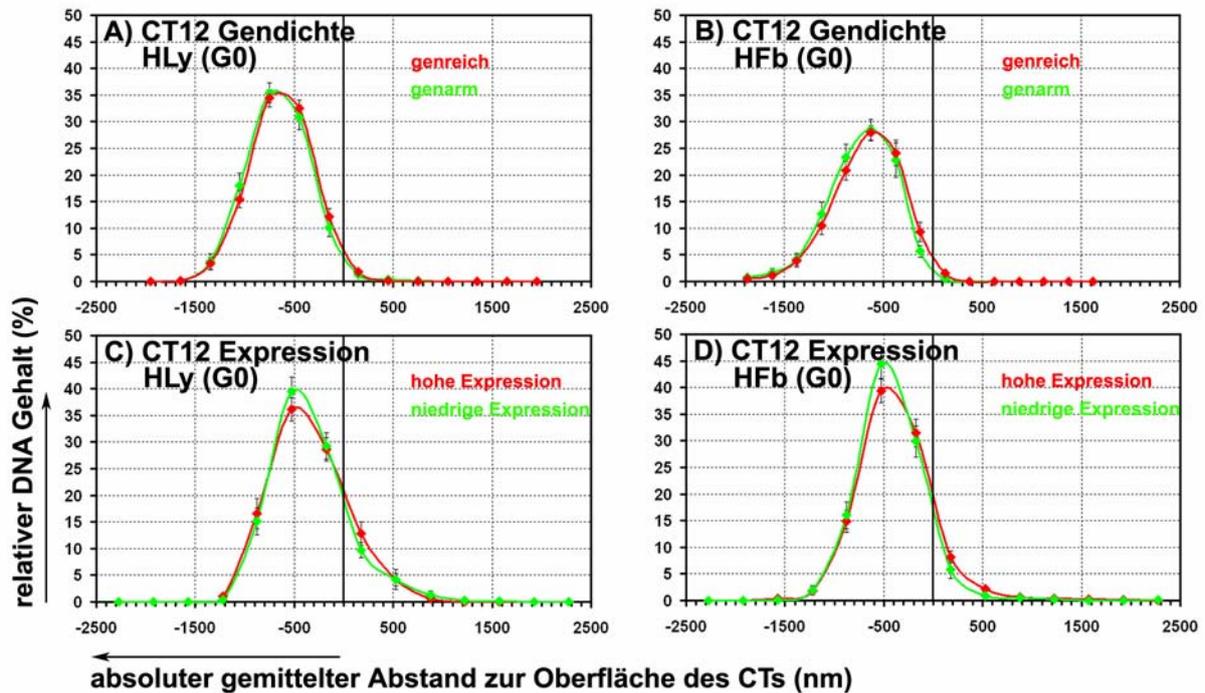


Abbildung.3.5.2.2: Beispiele für Verteilungskurven (Auswertungen mit eADS)

Die Ordinate zeigt den relativen DNA Gehalt der BAC-Pools in Prozent, die Abszisse gibt den gemittelten, absoluten Abstand der Signalvoxel zur Oberfläche des Chromosomenterritoriums an. Negative Werte zeigen dabei das Innere des CTs, der Wert „0“ repräsentiert die segmentierte Territoriumsoberfläche, positive Werte spiegeln die äußere, nukleäre Umgebung des CTs wieder.

Die roten Kurven repräsentieren die Abstandsverteilungen des genreichen BAC-Pools von CT #12 in Hly (A) und HFb (B), bzw. des hoch exprimierten BAC-Pools von CT #12 in HLY (C) und in HFb (D). Die grünen Kurven repräsentieren die Abstandsverteilungen des genarmen BAC-Pools von CT #12 in Hly (A) und HFb (B), bzw. des niedrig exprimierten BAC-Pools von CT #12 in HLY (C) und HFb (D).

Wie man in der Abbildung 3.5.2.1 deutlich erkennen kann variierten die mittleren, absoluten Abstände der BAC-Pools zur Oberfläche der CTs in den einzelnen Experimenten beträchtlich. Dies mag zum einen mit den unterschiedlichen Hybridisierungsqualitäten der Experimente zusammenhängen. Hybridisierungen mit höherem Hintergrund benötigten auch eine stärkere Bildbearbeitung und einen höheren Schwellenwert für die quantitative Auswertung, was mit einer artifiziellen Verkleinerung der Territorien einhergehen kann. Des Weiteren muss auch die unterschiedliche Größe der untersuchten Chromosomen in Betracht gezogen werden. Das menschliche Chromosom 12 ist mit seinen 132Mb fast doppelt so groß wie das humane Chromosom 18 oder auch 19, daher können in den größeren Territorien auch größere Abstände gefunden werden. Dies lässt sich in den Spalten A und B der Abbildung 3.5.2.1, die die Ergebnisse der Gendichte-abhängigen BAC-Pools sowie die R-/G-Banden BAC-Pools von Chromosom 12 repräsentieren, gut nachvollziehen. Die kleineren Abstände in Spalte E, die die Ergebnisse der Expressions-abhängigen BAC-Pools von Chromosom 12 zeigt, lassen sich vielleicht durch die Art der BAC-Pools erklären. Für die Gendichte-abhängigen BAC-Pools sowie die R-/G-Banden BAC-Pools wurde keinerlei Rücksicht auf das

Expressionsniveau der ausgewählten BAC-Klone genommen. Sie wurden lediglich nach ihrer Lage in genreicher oder genarmer Umgebung bzw. in R- oder G-Banden ausgewählt. Die Expressions-abhängigen BAC-Pools dagegen repräsentieren Sequenzen, die alle exprimiert werden – entweder für den Zelltyp außergewöhnlich hoch oder zumindest basal auf einem geringen Grundniveau. Auch wenn, wie man der Abbildung 3.5.2.1 entnehmen kann, für eine erfolgreiche Expression eine direkte Lage an der Oberfläche der Chromosomenterritorien wohl nicht nötig ist, so ist ein geringerer Abstand zur Oberfläche durchaus nachvollziehbar. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Anordnung der zwei in einem Experiment verglichenen, korrespondierenden BAC-Pools mit Bezug auf die Territoriums Oberfläche überall sehr ähnlich war. Die Unterschiede ΔD waren sehr klein (siehe Tabelle 3.5.2). Bis auf drei Ausnahmen konnten auch keine signifikanten Unterschiede in den Verteilungen gefunden werden.

Interessanter Weise wurden die BACs die niedrig exprimierte Sequenzen repräsentierten sowohl in humanen Lymphozyten wie auch in den humanen Fibroblasten näher an der Territoriums Oberfläche gefunden als die BACs, die hoch exprimierte Gene trugen.

3.5.3 Polare Anordnung der BAC-Pools innerhalb der Chromosomenterritorien

Wie im Abschnitt 3.5.2 beschrieben, konnte im Bezug auf die Oberfläche der Chromosomenterritorien kein Unterschied in der Verteilung der in den Experimenten jeweilig miteinander korrespondierenden BAC-Pools gefunden werden. Die BACs beider Pools zeigten sehr ähnliche Abstandsverteilungen. Dennoch konnte ein signifikanter Unterschied in der Anordnung der BAC-Pools bezüglich des Zellkerns dokumentiert werden (siehe Abschnitt 3.4). Die genreichen, hoch exprimierten und R-Banden BAC-Pools zeigten eine deutlich internere radiale Position im Kern als die genarmen, niedrig exprimierten und G-Banden BAC-Pools. Diese deutlich polare Verteilung der BAC-Pools kann auch in den Territorien bei Betrachtung mit dem Auge erkannt werden. Am deutlichsten sichtbar war diese Anordnung bei den Experimenten mit den Gendichte-abhängigen BAC-Pools, aber auch für die R- und G-Banden BAC-Pools, sowie für die Expressions-abhängigen BAC-Pools konnte diese polare Verteilung in den Chromsomenterritorien gefunden werden. Die Abbildung 3.5.3 zeigt exemplarisch einige Territorien aus verschiedenen Experimenten, in denen die polare Anordnung der BACs mit dem Auge deutlich zu erkennen ist.

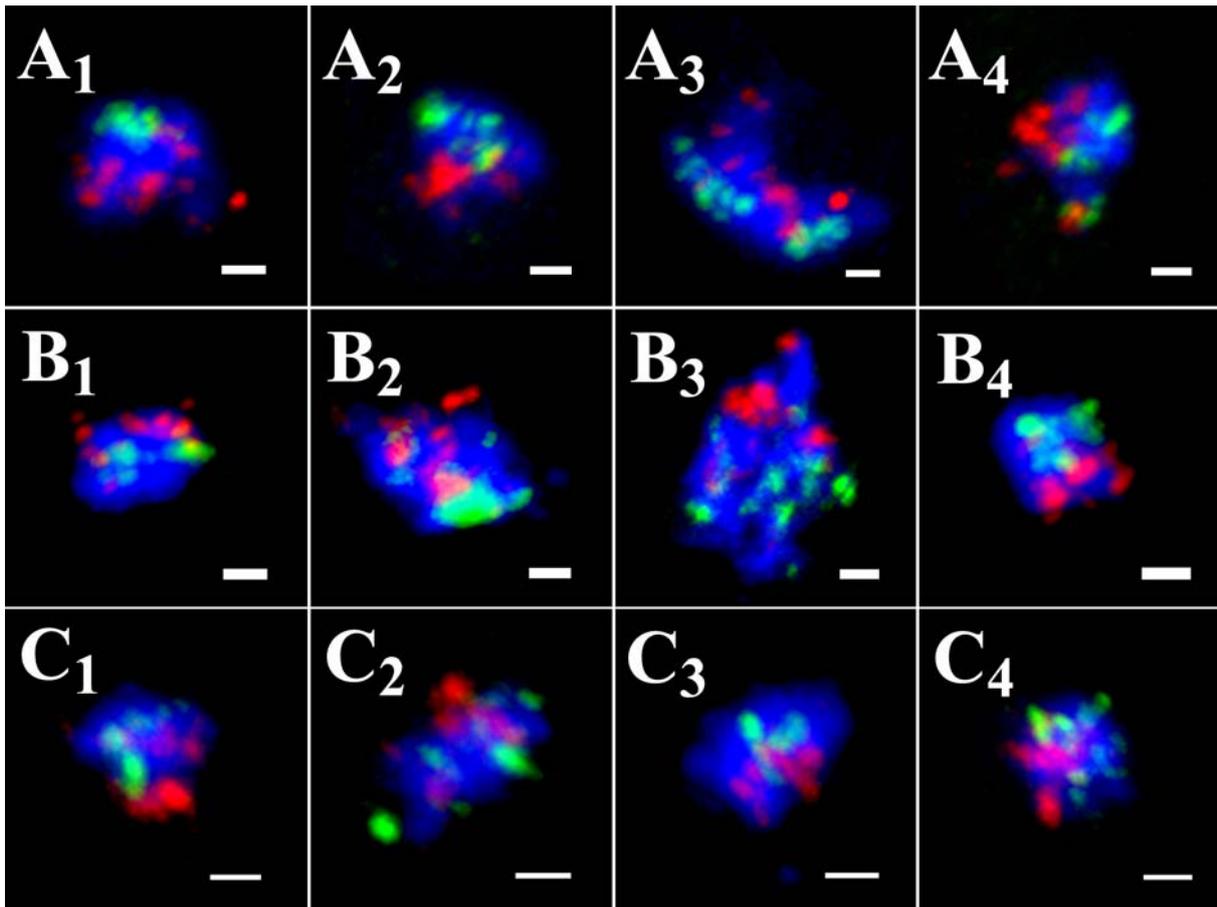


Abbildung 3.5.3: Beispiele für die polare Anordnung der BACs in Chromosomenterritorien

Maximum Z-Projektionen von Bildstapeln lichtoptischer Schnitte verschiedener 3D-FISH Experimente in humanen Lymphozyten. Die Chromosomenterritorien #12 sind in blau dargestellt. Rot repräsentiert den genreichen BAC-Pool von CT #12 (A), den R-Banden BAC-Pool von CT #12 (B) bzw. den hoch exprimierten BAC-Pool von CT #12 (C). In grün ist der genarme BAC-Pool von CT #12 (A), der G-Banden BAC-Pool (B) sowie der niedrig exprimierte BAC-Pool von CT #12 (C) dargestellt.

Um zu versuchen diese polare Anordnung innerhalb der CTs anhand einer quantitativen Auswertung zu dokumentieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Abstandsmessungen zwischen den Signalen der BAC-Klone durchgeführt. Dazu wurde die Software ImageJ verwendet.

3.5.3.1 Abstandsmessungen zwischen Intensitätsschwerpunkten

Das ImageJ Plugin „SyncMeasure3D“ kann 3D-Abstände zwischen den Intensitätsschwerpunkten beliebig vieler Objekte messen. Eine genaue Anleitung befindet sich im Abschnitt 2.11.5.1. Die Art der mit dieser Software durchgeführten Distanzmessungen soll anhand eines Beispiels hier verdeutlicht werden. Dafür wurde das Experiment „12RG“ in humanen Lymphozyten (G0-Phase) ausgewählt. Wie aus der Tabelle 3.5.2 zu entnehmen ist, zeigen die R-Banden und G-Banden BAC-Pools in diesem Experiment den größten Unterschied ΔD (46,7nm) in der Verteilung bezüglich der Chromosomenterritorien, der in allen Auswertungen für die humanen Lymphozyten gefunden werden konnte. Zusätzlich

zeigten die R- und G-Banden BAC-Pools eine deutlich polare Anordnung im Zellkern, was in der Tabelle 3.4.2 und in der Abbildung 3.4.2.2 dokumentiert ist.

Es wurden verschiedene Abstände berechnet:

1.) Messung der Abstände aller R-Banden BACs bzw. aller G-Banden BACs zum Intensitätsschwerpunkt des entsprechenden CTs (R – CT/G – CT)

Mit dieser Auswertung sollte die Verteilung der R- und G-Banden BACs innerhalb ihrer Territorien untersucht werden. Laut Literatur enthalten die G-Banden weniger und eher niedrig exprimierte, oft gewebspezifische Gene (Craig and Bickmore, 1993; Sadoni et al., 1999). Daher wäre eine Anordnung der G-Banden-Domänen weiter im Inneren der Territorien vorstellbar, während sich die R-Banden mit ihren transkriptionell hoch aktiven Haushaltsgenen (Larsen et al., 1992) eher an der leichter zugänglichen Oberfläche aufhalten könnten. Eine solche Anordnung sollte sich in verschiedenen großen Abständen zum Intensitätsschwerpunkt widerspiegeln.

Die Tabellen 3.5.3.1.1 und 3.5.3.1.2 zeigen die Ergebnisse dieser Distanzmessungen, und die Abbildung 3.5.3.1.1 zeigt eine graphische Darstellung der Ergebnisse.

	R - CT	G - CT	Differenz
Mittelwert aller Abstände	1.7919 µm	1.7199 µm	0.072 µm
Standardabweichung	0.831 µm	0.726 µm	---
Maximaler Abstand	4.46 µm	3.79 µm	---
Minimaler Abstand	0.302 µm	0.212 µm	---
Anzahl gemessener Abstände	179	147	---

Tabelle 3.5.3.1.1: HLy, 12RG, CT, G0: Abstände der BACs zu den Intensitätsschwerpunkten der CTs
Die Tabelle gibt die Mittelwerte aller gemessener Abstände zwischen den Intensitätsschwerpunkten der R-Banden BACs bzw. der G-Banden BACs und der dazugehörigen Chromosomenterritorien an (R-CT, bzw. G-CT), sowie die Standardabweichung, den maximalen bzw. minimalen gemessenen Abstand und die Anzahl der durchgeführten Messungen.

CT	Abstände G – CT (µm)	Abstände R – CT (µm)	Differenz R – G (µm)	CT	Abstände G – CT (µm)	Abstände R – CT (µm)	Differenz R – G (µm)
1	2.015	1.923	- 0.092	11	1.177	1.532	- 0.355
2	2.174	2.280	+ 0.106	12	2.385	1.918	- 0.467
3	2.073	1.945	- 0.128	13	1.804	1.889	+ 0.086
4	1.681	1.630	- 0.051	14	1.310	1.348	+ 0.038
5	1.118	1.309	+ 0.192	15	2.043	1.956	- 0.087
6	1.201	1.462	+ 0.261	16	1.716	1.383	- 0.333
7	1.681	2.058	+ 0.377	17	1.860	1.649	- 0.211
8	1.558	2.246	+ 0.688	18	1.578	1.877	+ 0.299
9	1.538	1.027	- 0.511	19	1.728	1.808	+ 0.080
10	1.673	1.786	+ 0.114				

Tabelle 3.5.3.1.2: HLy, 12RG, CT, G0: Abstände der BACs zu den Intensitätsschwerpunkten der einzelnen CTs

Die Tabelle gibt die Mittelwerte der innerhalb eines CTs gemessenen Abstände zwischen den Intensitätsschwerpunkten der R-Banden BACs bzw. der G-Banden BACs und der dazugehörigen Chromosomenterritorien an (R-CT, bzw. G-CT), sowie deren Differenz. Rote Werte weisen auf den in einem CT höheren Abstand hin.

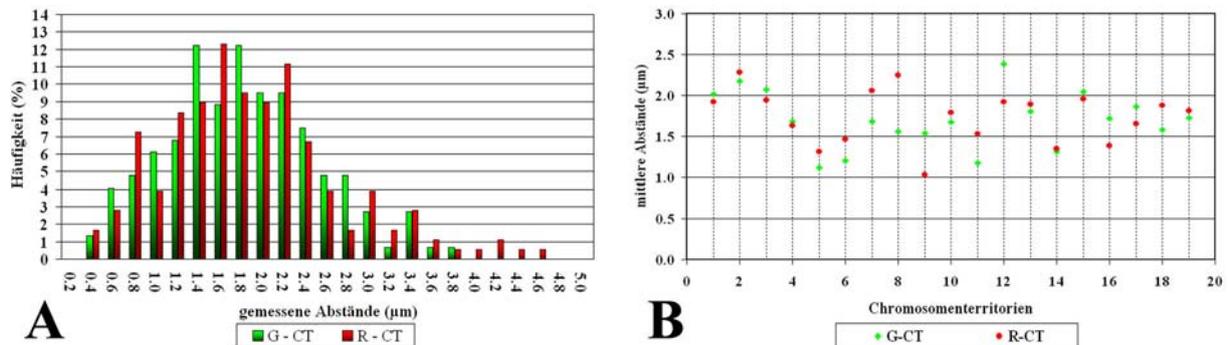


Abbildung 3.5.3.1.1: HLy, 12RG, CT, G0: Graphische Darstellung der Abstände zwischen den BACs und den Intensitätsschwerpunkten der CTs

(A) Häufigkeitsverteilung: Die Abszisse zeigt die gemessenen Abstände zum Intensitätsschwerpunkt der CTs in µm, die Ordinate gibt die Häufigkeit in Prozent an mit der ein bestimmter Abstand gemessen wurde. Rote Balken repräsentieren die R-Banden BACs, grüne Balken zeigen die G-Banden BACs.

(B) Graphische Darstellung der mittleren Abstände in den einzelnen CTs. Die Abszisse zeigt die CTs, die Ordinate gibt Abstände zum Intensitätsschwerpunkt der CTs in µm an. Rote Punkte repräsentieren die R-Banden BACs, grüne Punkte zeigen die G-Banden BACs.

Mit dieser Abstandsmessung konnte keine unterschiedliche Verteilung der BAC-Pools bezüglich des Intensitätsschwerpunktes der Chromosomenterritorien festgestellt werden. Die R-Banden BACs zeigen in diesem Beispiel im Mittel nur einen geringfügig größeren Abstand (siehe Tabelle 3.5.3.1.1) als die G-Banden BACs, was mit dem Ergebnis der eADS Auswertung übereinstimmt (siehe Tabelle 3.5.2). Die Häufigkeitsverteilungen der gemessenen Abstände (Abb. 3.5.3.1.1 A) ergaben keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$ Kolmogoroff-Smirnoff-Test). Auch die mittleren Abstände in den einzelnen Territorien sind recht variabel. Für die Hälfte der vermessenen CTs wurden größere Abstände für die R-Banden BACs gefunden, in der anderen Hälfte hatten die G-Banden BACs größere Abstände zum Intensitätsschwerpunkt des CTs (siehe Tabelle 3.5.3.1.2 und Abb. 3.5.3.1.1 B). Es scheint diesbezüglich keine Präferenz für eine Anordnung zu geben. Die Vorstellung, dass sich G-Banden Domänen tendenziell im Inneren von Territorien befinden konnte nicht bestätigt werden.

2.) Messung der Abstände aller R-Banden bzw. G-Banden BACs untereinander (R – R/G – G)

Mit diesen Messungen sollte die Organisation der R- und G-Banden untersucht werden. Den G-Banden BACs wird in der Literatur eine geringere transkriptionelle Aktivität zugeschrieben (Craig and Bickmore, 1993). Daher wäre es vorstellbar, dass diese Domänen stärker kondensiert und vielleicht auch in Clustern innerhalb der CTs vorliegen. Dieses Phänomen

sollte sich mit kleineren G – G Abständen (im Vergleich zu den R – R Abständen) nachweisen lassen. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind mit den Abstandsmessungen des nächsten Punktes zusammengefasst dargestellt.

3.) Messung der Abstände aller R-Banden BACs zu allen G-Banden BACs (R – G)

Mit dieser Auswertung sollte schließlich die beobachtete polare Verteilung der BACs innerhalb der CTs quantitativ bestätigt werden. Dafür sollten die R - G Abstände im Vergleich mit den R – R und G – G Abständen größer ausfallen.

Die Tabellen 3.5.3.1.3 und 3.5.3.1.4 zeigen die Ergebnisse dieser Distanzmessungen, und die Abbildung 3.5.3.1.2 zeigt eine graphische Darstellung der Ergebnisse.

	R - R	G - G	R - G
Mittelwert aller Abstände	2.497 μm	2.332 μm	2.41 μm
Standartabweichung	1.154 μm	1.099 μm	1.134 μm
Maximaler Abstand	6.358 μm	5.517 μm	6.486 μm
Minimaler Abstand	0.018 μm	0.324 μm	0.04 μm
Anzahl gemessener Abstände	813	520	1397

Tabelle 3.5.3.1.3: HLy, 12RG, CT, G0: Abstände zwischen den Intensitätsschwerpunkten der BACs

Die Tabelle gibt die Mittelwerte aller gemessener Abstände zwischen den Intensitätsschwerpunkten der R-Banden BACs bzw. der G-Banden BACs zueinander (R - R, G - G bzw. R - G) an, sowie die Standardabweichung, den maximalen bzw. minimalen gemessenen Abstand und die Anzahl der durchgeführten Messungen.

CT	Abstände G – G (μm)	Abstände R – R (μm)	Abstände R – G (μm)	CT	Abstände G – G (μm)	Abstände R – R (μm)	Abstände R – G (μm)
1	2.88	2.49	2.60	11	1.67	2.24	1.90
2	1.97	3.05	2.56	12	3.49	2.71	2.98
3	2.90	2.74	2.72	13	2.52	2.34	2.73
4	2.34	2.32	2.22	14	1.94	1.46	2.04
5	1.76	1.91	1.71	15	2.88	2.71	2.67
6	1.68	2.12	1.97	16	2.34	1.99	2.12
7	2.49	2.58	2.61	17	2.46	2.46	2.31
8	1.89	2.81	2.78	18	2.26	2.76	2.38
9	2.24	1.43	1.79	19	2.03	2.23	2.04
10	2.32	2.37	2.36				

Tabelle 3.5.3.1.4: HLy, 12RG, CT, G0: Abstände zwischen den Intensitätsschwerpunkten der BACs in den einzelnen CTs

Die Tabelle gibt die Mittelwerte der innerhalb eines CTs gemessenen Abstände zwischen den Intensitätsschwerpunkten der R-Banden BACs bzw. der G-Banden BACs untereinander sowie zwischen einander an (R – R, G – G, bzw. R - G). Rote Werte weisen auf den in einem CT größten Abstand hin.

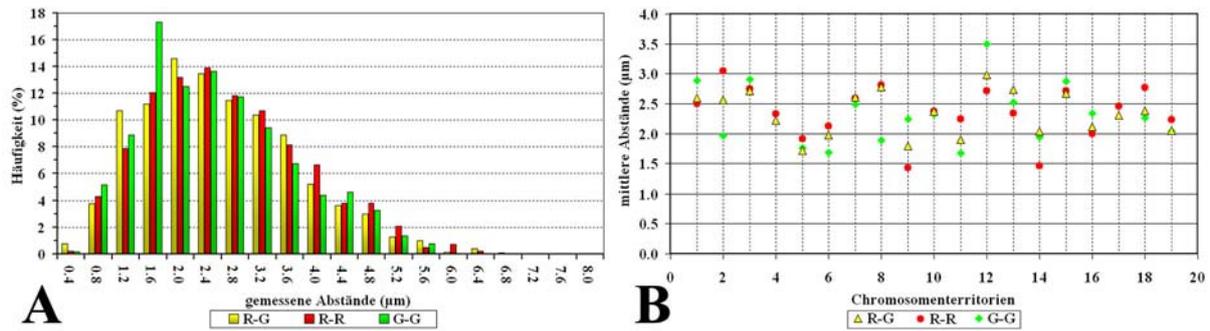


Abbildung 3.5.3.1.2: HLY, 12RG, CT, G0: Graphische Darstellung der Abstände zwischen den Intensitätsschwerpunkten der BACs

(A) Häufigkeitsverteilung: Die Abszisse zeigt die gemessenen Abstände zum Intensitätsschwerpunkt der CTs in μm , die Ordinate gibt die Häufigkeit in Prozent an mit der ein bestimmter Abstand gemessen wurde. Rote Balken repräsentieren die R-R Abstände, grüne Balken zeigen die G-G Abstände, gelbe Balken stehen für die R-G Abstände.

(B) Graphische Darstellung der mittleren Abstände in den einzelnen CTs. Die Abszisse zeigt die CTs, die Ordinate gibt die mittleren Abstände zwischen den Intensitätsschwerpunkten der BACs in μm an. Rote Punkte repräsentieren die R-R Abstände, grüne Punkte zeigen die G-G Abstände, gelbe Punkte stehen für die R-G Abstände.

Auch mit diesen Abstandsmessungen konnten keine Unterschiede in der Organisation der R- und G-Banden Domänen festgestellt werden. Die R-Banden BACs zeigen zwar in diesem Beispiel im Mittel einen geringfügig größeren Abstand zueinander als die G-Banden BACs (siehe Tabelle 3.5.3.1.3), die Häufigkeitsverteilungen der gemessenen Abstände (Abb. 3.5.3.1.2 A) ergaben aber keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$ Kolmogoroff-Smirnoff-Test). Auch in den einzelnen Territorien zeigten sich die mittleren R – R und G – G Abstände als recht variabel. Für die Hälfte der vermessenen CTs wurden größere Abstände zwischen den R-Banden BACs gefunden, in der anderen Hälfte hatten die G-Banden BACs größere Abstände zueinander (siehe Tabelle 3.5.3.1.4 und Abb. 3.5.3.1.2 B). Eine generelle Präferenz für eine Clusterung der G-Banden Domänen konnte somit nicht nachgewiesen werden. Interessant in diesem Beispiel ist allerdings die kleinere Zahl an ausgewerteten G-BAC Signalen. Obwohl der G-Banden BAC-Pool von Chromosom 12 aus 28 BACs besteht konnten deutlich weniger einzelne BAC-Signale in den Territorien identifiziert werden als bei dem aus nur 20 BACs bestehenden R-Banden BAC Pool (siehe Tabelle 3.5.3.1.3). Dabei muss allerdings beachtet werden, dass viele der G-Banden BACs von vorneherein nahe benachbarte Positionen auf dem Metaphasechromosom einnehmen (siehe Abbildung 3.1).

Um die mit dem Auge sichtbare polare Verteilung der BACs in den Chromosomenterritorien quantitativ nachweisen zu können, wurde erwartet, dass die R – G Abstände größer sind als die R – R bzw. G – G Abstände. Diese Erwartung konnte nicht bestätigt werden. Der gemittelte R – G Abstand lag im selben Wertebereich wie die R – R und G – G Abstände, er war sogar geringfügig kleiner als der R – R Abstand. Die Häufigkeitsverteilungen zwischen R – G und R – R bzw. R – G und G – G zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (in beiden Fällen war $p > 0,05$, Kolmogoroff-Smirnoff-Test). Und in diesem Experiment konnte auch nur in 3 von den 19 ausgewerteten Territorien ein geringfügig größerer R – G Abstand gefunden werden (siehe Tabelle 3.5.3.1.4 und Abb. 3.5.3.1.2).

Eine mögliche Erklärung für dieses auf den ersten Blick unerwartete Ergebnis liegt vielleicht in der sehr flexiblen äußeren Form der Chromosomenterritorien. Es sind durchaus Strukturen denkbar, in denen trotz einer polaren Anordnung der BAC-Signale bezüglich des Zellkerns die R – R/G – G Abstände größer sein könnten als die R – G Abstände. Des Weiteren ist die in Z-Projektionen sichtbare Polarität wahrscheinlich nicht strikt genug, um diesen Unterschied in der Abstandsverteilung tatsächlich quantitativ belegen zu können. Betrachtet man die Beispiele in der Abbildung 3.5.3 kann man die Ordnung innerhalb der Chromosomenterritorien zwar klar erkennen, dennoch findet man auch in nahezu jedem Territorium einige BAC-Signale die nicht dieser strikten Verteilung folgen. Diese „Ausreißer“ können unter Umständen mit dafür verantwortlich sein, dass sich die R – G Abstände im selben Wertebereich befinden wie die R – R und G – G Abstände.

Die Ergebnisse der anderen, ebenfalls mit dem ImageJ - PlugIn „SyncMeasure3D“ ausgewerteten Experimente stimmen mit dem oben aufgeführten Beispiel überein. Weder in humanen Lymphozyten, noch in humanen Fibroblasten konnten Unterschiede in der Verteilung der BAC-Pools bezüglich des Intensitätsschwerpunktes der CTs bzw. in den Abständen untereinander gefunden werden. Die Tabelle 3.5.3.1.5 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der mit dieser Methode ausgewerteten Experimente.

Experiment	R – CT (μm)	G – CT (μm)	R – R (μm)	G – G (μm)	R – G (μm)
HFb 18 RG, G0	1.239	1.166	1.727	1.688	1.716
HFb 18 RG, S	1.341	1.468	1.883	1.999	---
HLb 18 RG, G0	1.154	1.123	1.645	1.585	1.650
HLb 18 RG, S	2.185	2.142	2.938	2.860	3.110
HFb 19 RG, G0	1.519	1.427	1.843	1.821	1.839
HFb 19 RG, S	1.691	1.564	2.464	2.329	---
HLb 19 RG, S	2.080	2.040	2.961	2.825	2.965
HFb 12 RG, G0	1.541	1.474	2.035	2.170	2.143
HFb 12 RG, S	1.473	1.562	2.009	2.145	---
HLy 12 RG, G0	1.792	1.720	2.497	2.332	2.402

Tabelle 3.5.3.1.5: Übersicht über die mit „SyncMeasure3D“ ausgewerteten Experimente

Die Tabelle gibt die Mittelwerte aller gemessener Abstände zwischen den Intensitätsschwerpunkten der R-Banden BACs bzw. der G-Banden BACs zueinander (R – R, G – G bzw. R – G) an, sowie die gemittelten Abstände zu den Intensitätsschwerpunkten der CTs (R – CT bzw. G – CT).

Eine weitere Erklärung für das unerwartete Ergebnis könnte auch im Messverfahren an sich begründet sein. Das PlugIn „SyncMeasure3D“ misst die Abstände zwischen den Intensitätsschwerpunkten der BAC-Signale. Liegen mehrere BACs eines Pools nahe

zusammen und bilden einen Cluster werden sie als nur ein BAC-Signal mit nur einem Intensitätsschwerpunkt behandelt. Tatsächlich vorhandene, sehr kleine Abstände zwischen diesen BACs werden also nicht für die Auswertung berücksichtigt. Des Weiteren mussten die BAC-Signale per Hand durch Markierungen identifiziert werden (siehe Abschnitt 2.11.5.1). Dabei war es oft schwierig Signale von benachbarten BAC-Klonen von einander zu trennen. Dies mag ebenfalls zu einer Unschärfe der Messergebnisse beigetragen haben.

Um zu überprüfen, ob die eben erwähnten Faktoren tatsächlich einen Einfluss auf das Ergebnis dieser Auswertungsmethode hatten, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Joachim Walter (Biozentrum der LMU, München) ein PlugIn für die Software ImageJ entwickelt, die diese Messungen in einer automatisierten und voxelbasierten Art und Weise durchführte. Die Ergebnisse dieses Testes sind im Abschnitt 3.5.3.2 dargestellt.

3.5.3.2 Voxelbasierte Abstandsmessungen

Das von Dr. Joachim Walter für diese Arbeit entwickelte ImageJ PlugIn „Correlation function 3D“ misst Distanzen zwischen beliebig vielen Objekten in einer automatisierten, voxelbasierten Weise. Dafür werden alle Signalvoxel innerhalb eines Farbkanals erfasst und die Distanzen zwischen ihnen innerhalb eines Farbkanals (entspricht R – R, G – G) sowie zwischen zwei verschiedenen Farbkanälen berechnet (entspricht R – G). Eine genaue Anleitung befindet sich im Abschnitt 2.11.5.2.

Um das PlugIn zu überprüfen und einen Eindruck von den zu erwartenden Ergebnissen zu bekommen wurde ein Test mit zwei in ImageJ künstlich erstellten Bilderstapeln durchgeführt. Ein Bilderstapel simuliert eine gleiche Verteilung der Signalvoxel zweier BAC-Pools innerhalb eines CTs, der zweite Bilderstapel enthält eine polare Verteilung. Beide Datensätze wurden mit dem PlugIn quantitativ ausgewertet. Die Abbildung 3.5.3.2.1 zeigt das Ergebnis dieses Tests.

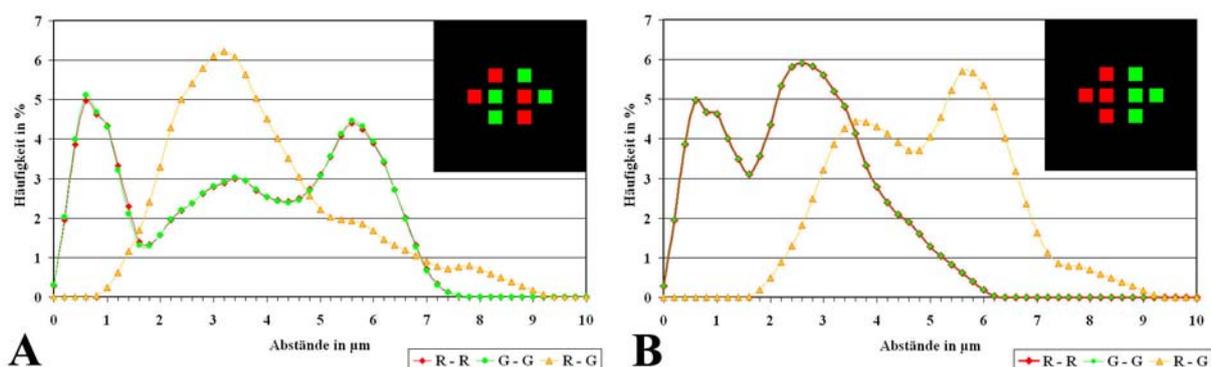


Abbildung 3.5.3.2.1: Testauswertung mit dem ImageJ PlugIn „Correlation function 3D“

Die Abszisse zeigt die gemessenen Abstände in μm , die Ordinate gibt die Häufigkeit in Prozent an, mit der ein bestimmter Abstand gemessen wurde. Rechts oben in den Zeichnungsflächen der Graphen ist der jeweils ausgewertete Datensatz mit der simulierten Verteilung abgebildet. Jedes Kästchen stellt ein simuliertes BAC-Signal dar. Die roten Kurven repräsentieren die R-R Abstände, die grünen Kurven zeigen die G-G Abstände, die gelben Kurven stehen für die R-G Abstände.

(A) Häufigkeitsverteilung der voxelbasierten Abstandsmessung bei einer simulierten, gleichen Verteilung (B) Häufigkeitsverteilung der voxelbasierten Abstandsmessung bei einer simulierten, polaren Verteilung

Das Ergebnis dieser Testauswertung bestätigt die erwartete Verteilung. Rote und grüne Voxel sind in beiden Beispielen so verteilt, dass sie insgesamt identische Abstände zueinander haben, daher sind auch die grünen und roten Häufigkeitsverteilungskurven in beiden Fällen mit einander identisch.

In der Auswertung der gleichen Verteilung (Abbildung 3.5.3.2.1 A) sind drei Peaks in den Verteilungskurven der R – R/G – G Abstände erkennbar. Der erste repräsentiert die kleinen Abstände, die zwischen den Signalvoxeln innerhalb eines simulierten BAC-Signals vorliegen, der mittlere Peak zeigt die Abstände zwischen den Voxeln der nahe benachbarten BAC-Signale und der letzte Peak repräsentiert schließlich die größeren Abstände zwischen den weiter entfernten BAC-Signalen. In der Verteilungskurve der R – G Abstände fehlt typischerweise dieser erste Peak, da hier nur die Abstände zwischen den Voxeln verschiedener BAC-Signale und nicht die Abstände zwischen den Voxeln innerhalb eines BAC-Signals gemessen werden. Das Maximum der R – G Abstandsverteilung liegt im mittleren Bereich der R – R/G – G Abstände, jeder simulierte rote BAC liegt in unmittelbarer Nachbarschaft eines grünen und umgekehrt, daher überwiegen diese mittleren Distanzen. Es gibt aber auch einen kleinen Prozentsatz an Abständen, die größer sind als die R – R/G – G Abstände.

In der Auswertung der polaren Verteilung (Abbildung 3.5.3.2.1 B) zeigt die Verteilungskurve der R – R/G – G Abstände nur zwei Peaks. Aufgrund der polaren Anordnung fehlen die großen Abstände zwischen weit entfernt liegenden BACs. Die Kurve für die R – G Distanzen zeigt eine deutliche Verschiebung nach rechts. Auch sie zeigt zwei Peaks, den ersten für die Voxel der BAC-Signale die an der „Grenze“ zwischen den beiden polaren Clustern liegen, der zweite Peak zeigt die größeren Abstände zwischen den weiter entfernten BAC-Signalen.

Ein ähnliches Ergebnis wurde nun auch für eine Auswertung der echten Chromosomenterritorien erwartet. Dafür wurden ebenfalls zwei Experimente exemplarisch ausgesucht und deren Ergebnisse miteinander verglichen. Das war zum einen das Experiment 19RG (S-Phase) in humanen Lymphozyten, das als Beispiel für eine gleiche Verteilung der BACs ausgewählt wurde. Wie in der Tabelle 3.4.2 und der Abbildung 3.4.2.2 bereits dokumentiert wurde, zeigen diese BAC-Pools keinen signifikanten Unterschied bezüglich ihrer Verteilung im Zellkern. Als Beispiel für eine polare Verteilung wurde das Experiment 12 Gendichte in humanen Lymphozyten ausgewählt. Hier zeigten 100% der ausgewerteten Zellkerne die deutliche, polare Anordnung, bei der die BACs des genreichen Pools internere Positionen im Zellkern inne hatten als die BACs des genarmen Pools. Der Unterschied ΔD ist mit 21.04% vom Zellkernradius einer der größten, der in allen durchgeführten Experimenten gefunden werden konnte (siehe Tabelle 3.4.2. und Abb. 3.4.2.2).

Die Abbildung 3.5.3.2.2 zeigt das Ergebnis dieser Auswertung, die Tabelle 3.5.3.2 enthält die statistische Auswertung.

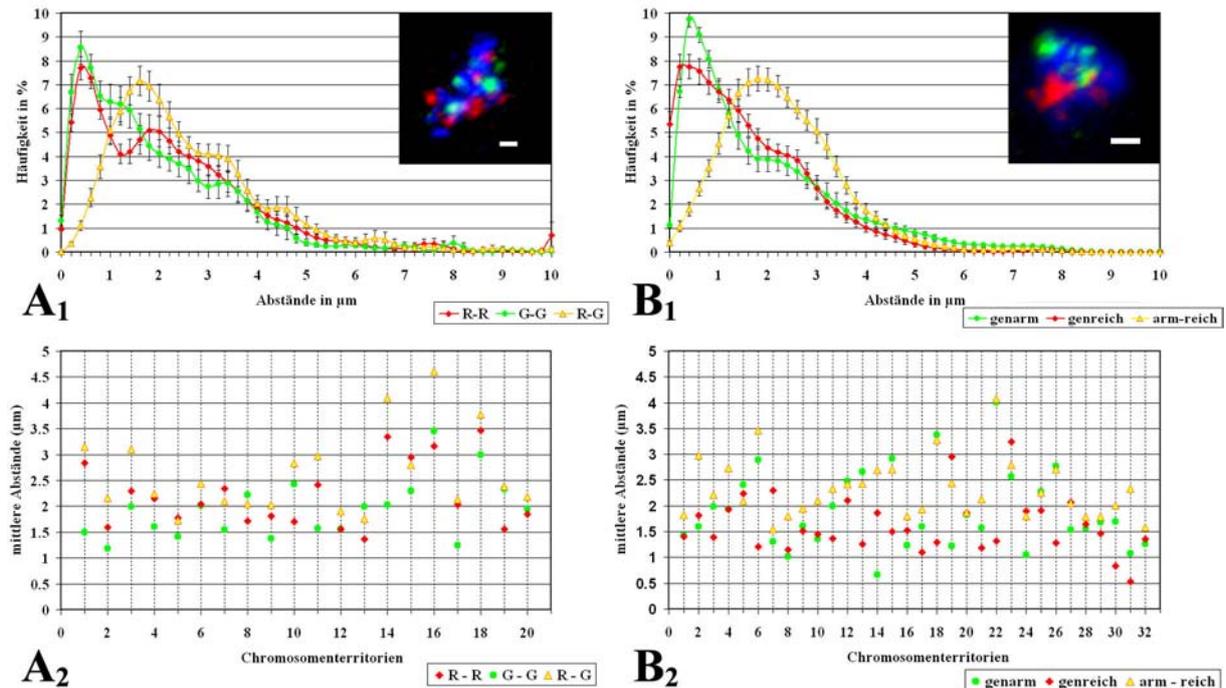


Abbildung 3.5.3.2.2: Auswertung mit dem ImageJ PlugIn „Correlation function 3D“

(A1) HLb 19RG S-Phase, Häufigkeitsverteilung der gemessenen Abstände: Die Abszisse zeigt die gemessenen Abstände in μm , die Ordinate gibt die Häufigkeit in Prozent an, mit der ein bestimmter Abstand gemessen wurde. Rechts oben in der Zeichnungsfläche des Graphen ist als ein Beispiel die Z-Projektion eines CT #19 (blau) mit R-BACs (rot) und G-BACs (grün) abgebildet. Die rote Kurve repräsentiert die R-R Abstände, die grüne Kurve zeigt die G-G Abstände, die gelbe Kurve steht für die R-G Abstände.

(A2) HLb 19RG S-Phase, graphische Darstellung der mittleren Abstände in den einzelnen CTs. Die Abszisse zeigt die CTs, die Ordinate gibt die gemittelten Abstände zwischen den Signalvoxeln der BACs in μm an. Rote Punkte repräsentieren die R-R Abstände, grüne Punkte zeigen die G-G Abstände, gelbe Punkte stehen für die R-G Abstände

(B1) HLy 12Gendichte S-Phase, Häufigkeitsverteilung der gemessenen Abstände: Die Abszisse zeigt die gemessenen Abstände in μm , die Ordinate gibt die Häufigkeit in Prozent an, mit der ein bestimmter Abstand gemessen wurde. Rechts oben in der Zeichnungsfläche des Graphen ist als ein Beispiel die Z-Projektion eines CT #12 (blau) mit genreichen BACs (rot) und genarmen BACs (grün) abgebildet. Die rote Kurve repräsentiert die Abstände zwischen den Signalvoxeln der genreichen BACs, die grüne Kurve die zwischen den genarmen BACs, die gelbe Kurve steht für die Abstände zwischen den Signalvoxeln der genreichen und genarmen BAC-Pools.

(B2) HLy 12Gendichte S-Phase, graphische Darstellung der mittleren Abstände in den einzelnen CTs. Die Abszisse zeigt die CTs, die Ordinate gibt die gemittelten Abstände zwischen den Signalvoxeln der BACs in μm an. Die roten Punkte repräsentieren die Abstände zwischen den Signalvoxeln des genreichen BAC-Pools, die grünen Punkte zeigen die Distanzen zwischen den Signalvoxeln des genarmen BAC-Pools und die gelben Punkte stehen für die Abstände zwischen den Signalvoxeln der genreichen und genarmen BAC-Pools.

19G – 19G	19R – 19R	n.s. (p = 0.083)	Wilcoxon
19G – 19G	19R – 19G	s. (p = 0.001)	Wilcoxon
19R – 19R	19R – 19G	s. (p = 0.001)	Wilcoxon
12genarm - 12genarm	12genreich – 12genreich	n.s. (p = 0.167)	Wilcoxon
12genarm – 12genarm	12genarm - 12genreich	s. (p = 0.001)	Wilcoxon
12genreich - 12genreich	12genarm - 12genreich	s. (p = 0.001)	Wilcoxon
19R – 19G	12genarm - 12genreich	n.s. (p = 0.150)	Whitney-Mann

Tabelle 3.5.3.2: Statistiktests der Auswertungen mit dem ImageJ PlugIn „Correlation function 3D“

Die ersten beiden Tabellenspalten geben die Häufigkeitsverteilungen an, die im Statistiktest miteinander verglichen worden sind. Die dritte Spalte zeigt das Ergebnis und die vierte Spalte gibt den verwendeten Statistiktest an. Getestet wurden die Mittelwerte der jeweiligen Abstände der einzelnen CTs.

Dieses Ergebnis macht deutlich, dass auch mit dieser neu entwickelten Auswertmethode die polare Verteilung der BAC-Pools innerhalb der CTs nicht quantitativ nachweisbar ist. In beiden Auswertungen waren die Abstände zwischen den Signalvoxeln eines BAC-Pools (R – R, G – G, bzw. genarm – genarm, genreich – genreich, rote bzw. grüne Kurven) sehr ähnlich, es konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Die Häufigkeitsverteilungen der Distanzen zwischen den Signalvoxeln der jeweils korrespondierenden BAC-Pools (R – G bzw. genarm – genreich, gelbe Kurven) unterschieden sich allerdings in beiden Fällen signifikant von den beiden anderen Verteilungen (rote und grüne Kurven), auch im Experiment 19RG in dem die BAC-Pools keine deutliche Polarität in ihrer Verteilung zeigen. Diese Signifikanz kommt vielleicht schon alleine durch das Fehlen der sehr kleinen Abstände innerhalb der BAC-Signale in den gelben Kurven zustande. Ein Vergleich der beiden gelben Kurven der verschiedenen Experimente miteinander ergab wiederum keinen signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 3.5.3.2).

Auch die mittleren Distanzen in den einzelnen Territorien unterscheiden sich nicht zwischen den beiden Experimenten (siehe Abb. 3.5.3.2.2, A2/B2). Es wurden in beiden Experimenten gemittelte Abstände zwischen den korrespondierenden BAC-Pools gefunden, die sowohl größer, gleich oder auch kleiner als die Abstände innerhalb eines BAC-Pools waren. Auch das weist wieder auf die große Flexibilität der Formen hin, die Chromosomenterritorien im Interphasezellkern einnehmen können.

Abschließend lässt sich feststellen, dass sich wahrscheinlich aufgrund der sehr unterschiedlichen Strukturen der Territorien die mit dem Auge beobachtbare Polarität der Verteilung der BAC-Pools innerhalb der CTs zumindest mit Distanzmessungen dieser Art nicht nachweisen lässt. Die Abbildung 3.5.3.2.3 zeigt als Beispiel drei verschiedene CTs in denen die hier durchgeführten Distanzmessungen jeweils zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Die einzige Methode mit der die Polarität der CTs quantitativ nachgewiesen werden konnte war die Analyse der radialen Verteilung der BAC-Pools innerhalb der Zellkerne.

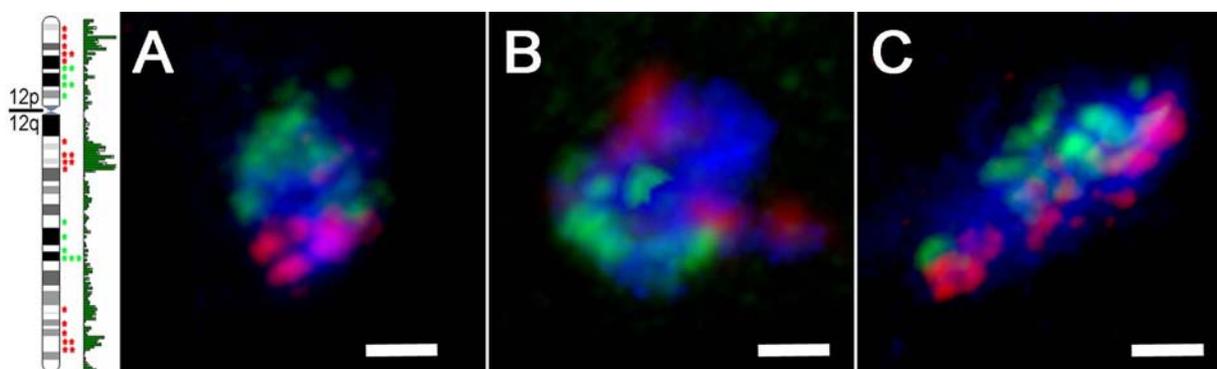


Abbildung 3.5.3.3: Beispiele für die hohe Plastizität der CTs

Gezeigt sind drei verschiedene CTs #12 (blau), die mit den über die Gendichte definierten BAC-Pools hybridisiert wurden (Schema ganz links). Genreiche BAC Klone sind in rot, genarme BAC Klone in grün dargestellt. Die Balken entsprechen jeweils 1µm.

(A) Die Abstände zwischen den genreichen bzw. genarmen BAC Klonen sind im Mittel kleiner als die Abstände zwischen genreichen und genarmen BAC Klonen. (B) Die Abstände zwischen den genreichen BAC Klonen sind im Mittel größer als die Abstände zwischen den genarmen BAC Klonen bzw. als die Abstände zwischen den genreichen und genarmen BAC Klonen. (C) Die Abstände zwischen den genreichen bzw. genarmen BAC Klonen entsprechen im Mittel in etwa den Abständen zwischen genreichen und genarmen BAC Klonen.

3.5.4 Analyse der CT-Struktur: Maximum Brightness Center (MBCs)

Bei der näheren Betrachtung der Hybridisierungsergebnisse chromosomaler Paintsonden fällt eine inhomogene Markierung der Chromosomenterritorien auf. Es gibt in jedem Territorium Bereiche die eine deutlich stärkere Färbung aufweisen als das restliche Material. Dies lässt auf Domänen mit einer höheren DNA-Dichte rückschließen, in denen die DNA deutlich stärker kompaktiert vorliegt. Diese Bereiche wurden als MBCs (= **M**aximum **B**rightness **C**enter) definiert. Besonders deutlich lassen sie sich mittels einer Maximum Z-Projektion des Bilderstapels eines CTs darstellen. Die Annahme liegt nahe, dass diese stärker gefärbten Bereiche dem chromosomalen Heterochromatin entsprechen.

Verschiedene Territorien können in den verschiedenen Zellkernen eine unterschiedliche Anzahl an MBCs aufweisen. Es wurde immer mindestens ein bis hin zu fünf oder sechs MBCs pro CT gefunden. Die Abbildung 3.5.4.1 zeigt dafür einige Beispiele.

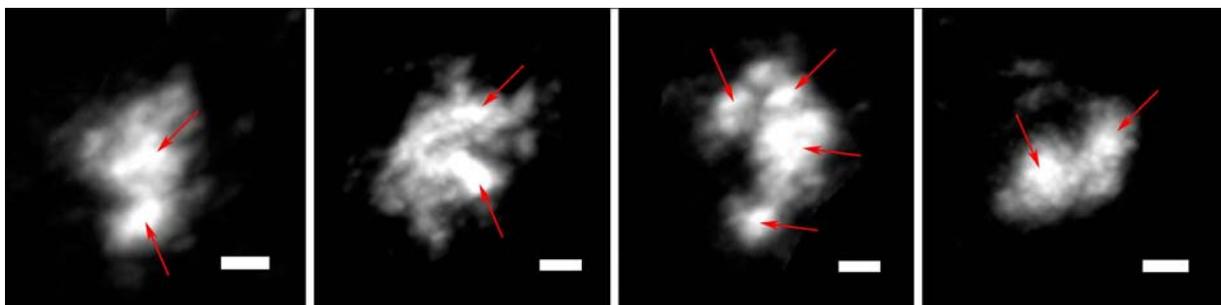


Abbildung 3.5.4.1: Beispiele für MBCs (**M**aximum **B**rightness **C**enters) in verschiedenen CTs

Die Abbildung zeigt Maximum Z-Projektionen vierer verschiedener Chromosomenterritorien #12. Die unterschiedliche Intensität der Markierung ist deutlich zu erkennen. Rote Pfeile indizieren die MBCs in den Territorien.

Im Folgenden wurden einige Eigenschaften der MBCs sowie die räumliche Orientierung der in dieser Arbeit verwendeten BAC-Pools bezüglich der MBCs untersucht.

Zunächst wurden die MBCs der Territorien isoliert dargestellt. Dafür wurde mit Hilfe des Programms ImageJ ein sehr hoher Schwellenwert auf die Bilderstapel angewendet, der alle schwächer gefärbten Abschnitte der Territorien eliminiert und lediglich noch die Signalvoxel der intensiv gefärbten MBCs umfasst. Diese Schwellenwerte lagen in der Regel zwischen 200 und 220. Die Abbildung 3.5.4.2 zeigt anhand eines Beispiels diesen Vorgang.

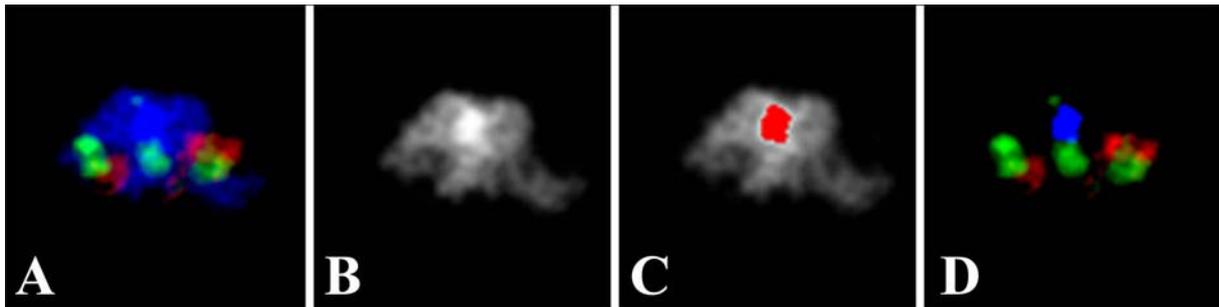


Abbildung 3.5.4.2: Isolierung der MBCs aus den Bilderstapeln der CTs

(A) Maximum Z-Projektion eines Chromosomenpaint #18 (blau) eines humanen Fibroblasten, die R-Banden-BACs sind in rot, die G-Banden-BACs in grün dargestellt. (B) Maximum Z-Projektion desselben Territoriums als Grauwertbild. Deutlich lässt sich ein MBC erkennen. (C) Der gewählte Schwellenwert umfasst nur das intensiv gefärbte MBC, während das restliche CT-Material nicht mehr berücksichtigt wird. (D) Nach Anwendung des Schwellenwertes: Maximum Z-Projektion des isolierten MBCs (blau), der R-Banden-BACs (rot) und der G-Banden-BACs (grün).

Die Eigenschaften der so aus den Datensätzen isolierten MBCs wurden nun näher untersucht. Dafür wurde als erstes ihre Verteilung innerhalb der Chromosomenterritorien analysiert. Dies geschah mittels der Software ADS, mit der die kürzesten Abstände aller Signalvoxel der MBCs zur Oberfläche der dazugehörigen Territorien vermessen wurden (für eine genaue Beschreibung der Software siehe Abschnitt 2.11.3). In der Abbildung 3.4.5.3 (A) ist das Ergebnis dieser Auswertung graphisch dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass die MBCs zentral im Inneren der Territorien lokalisiert sind. Während die größten Abstände zur Oberfläche für die Territorien an sich bei etwa $1\mu\text{m}$ lagen, war das Maximum der MBC Verteilungskurve bei einem Abstand von 750nm zur Territorienoberfläche zu finden.

In einem weiteren Versuch wurde das Verhältnis der MBCs zum pericentromerischen Heterochromatin untersucht. Unter der Annahme, dass auch die MBCs vorwiegend aus Heterochromatin bestehen wäre eine Kolo-kalisation dieser beiden Strukturen in den Territorien durchaus vorstellbar. Aufgrund der vielen repetitiven Abschnitte, die in den Centromerbereichen zu finden sind, sind ihre Sequenzen nicht in den depletierten chromosomalen paint Sonden enthalten. Für diese Analyse wurden daher mit freundlicher Genehmigung von Claudia Weierich die Daten eines 3D-FISH Experimentes herangezogen, indem sie zusätzlich zum chromosomalen paint #12 eine Centromersonde für das Chromosom #12 hybridiert hatte. Die Auswertung erfolgte wieder mit dem ADS Programm, das Ergebnis dieser Analyse ist in der Abbildung 3.4.5.3 (B) graphisch dargestellt. Es wurden die kürzesten Abstände aller Centromer Signalvoxel zu den MBCs vermessen. Das Ergebnis zeigt dass Centromere und MBCs nicht kolo-kalisieren, und sich auch nur ein kleiner Prozentsatz der Centromer-DNA in unmittelbarer Nachbarschaft zu den MBCs aufhält (~ 8 Prozent). Eine Clusterung der beiden Strukturen kann damit ausgeschlossen werden. Das Maximum der Verteilungskurve der Centromere wurde bei einem Abstand von $625 - 875\text{nm}$ zur Oberfläche der MBCs gefunden. Dies deckt sich gut mit den vorherigen Ergebnissen. Für die MBCs wurde eine zentrale Position innerhalb der Territorien gefunden (siehe oben) während die Centromere in humanen Lymphozyten vorzugsweise an der Peripherie ihrer CTs lokalisieren (Chevret et al., 2000; Weierich et al., 2003).

In einem weiteren Ansatz sollten schließlich die in den MBCs enthaltenen DNA-Sequenzen analysiert werden. Dafür wurde die Kolokalisation der MBCs mit verschiedenen Antikörpern gegen spezielle posttranslationelle Histonmodifikationen, die charakteristisch für Euchromatin sowie für konstitutives bzw. fakultatives Heterochromatin sind, untersucht. Die Daten für diese Untersuchung wurden mit freundlicher Genehmigung von Roman Zinner zur Verfügung gestellt. Zusätzlich zur Hybridisierung mit einem chromosomalen paint #12 hatte er in drei verschiedenen Ansätzen eine Immunfärbung mit je einem spezifischen Antikörper durchgeführt. Der Antikörper gegen triH3K4 ist ein Marker für Euchromatin, die Histonmodifikation triH3K9 ist typisch für konstitutives Heterochromatin, während der Antikörper gegen triH3K27 spezifisch fakultatives Heterochromatin detektiert. Die Kolokalisationsanalyse der Antikörper mit den MBCs wurde mit Hilfe der Software ImageJ durchgeführt (Manders Koeffizient, für eine genauere Beschreibung der Antikörper und der Auswertung siehe Zinner et al., 2005), das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 3.4.5.3 (C) in Form eines Kreisdiagrammes dargestellt. Wie bereits erwartet zeigt mehr als 85% der MBCs heterochromatische Histonmodifikationen (~53% Kolokalisation mit triH3K27 und ~33% Kolokalisation mit triH3K9) während nur ~16% des MBC Materials mit dem Antikörper für Euchromatin kolokalisierte. Dass die Aufsummierung der Prozentzahlen nicht exakt 100% ergibt lässt sich durch eine geringe Überlappung der Antikörpersignale untereinander erklären (Zinner et al., 2005).

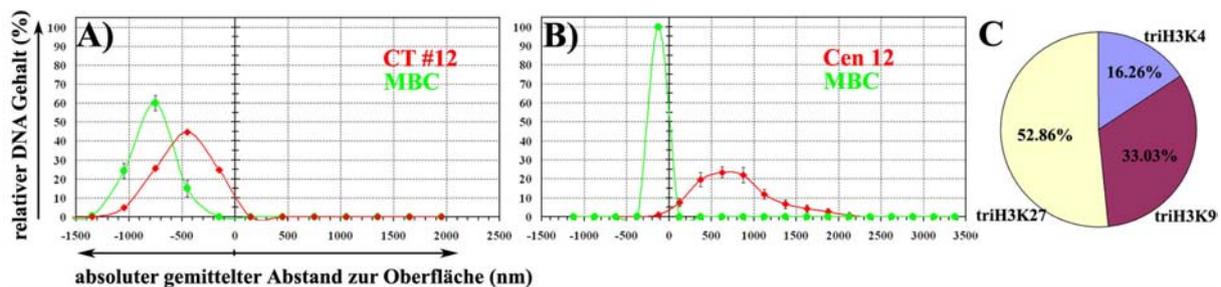


Abbildung 3.5.4.3: Eigenschaften der MBCs

(A) ADS-Auswertung der kürzesten Abstände der MBCs #12 zur Oberfläche der CTs #12. Die Ordinate zeigt den relativen DNA Gehalt in Prozent, die Abszisse gibt den gemittelten, absoluten Abstand der Signalvoxel zur Oberfläche des Chromosomenterritoriums an. Negative Werte zeigen dabei das Innere des CTs, der Wert „0“ repräsentiert die segmentierte Territoriumsoberfläche, positive Werte spiegeln die äußere, nukleäre Umgebung des CTs wieder.

Die rote Kurve repräsentiert die Abstandsverteilung des CT #12, die grüne Kurve zeigt die Abstandsverteilung der MBCs.

(B) ADS-Auswertung der kürzesten Abstände der Centromere #12 zur Oberfläche der MBCs #12. Die Ordinate zeigt den relativen DNA Gehalt in Prozent, die Abszisse gibt den gemittelten, absoluten Abstand der Signalvoxel zur Oberfläche der MBCs an. Negative Werte zeigen dabei das Innere der MBCs, der Wert „0“ repräsentiert die segmentierte MBC-Oberfläche, positive Werte spiegeln die äußere, nukleäre Umgebung der MBCs wieder.

Die rote Kurve repräsentiert die Abstandsverteilung der Centromere #12, die grüne Kurve zeigt die Abstandsverteilung der MBCs.

(C) Kolokalisationsanalyse der MBCs #12 mit spezifischen Antikörpern gegen Histonmodifikationen. TriH3K27 charakterisiert fakultatives Heterochromatin, triH3K9 wird typischerweise in konstitutiven Heterochromatin gefunden, während triH3K4 vorwiegend in Euchromatin gefunden wird.

Im Folgenden wurde nun die Anordnung der in dieser Arbeit verwendeten BAC-Pools im Bezug auf die Oberfläche der MBCs untersucht. Alle Experimente wurden mit dem ADS Programm ausgewertet, das die kürzesten absoluten Abstände jedes Signalvoxels zur Oberfläche angibt. Tabelle 3.5.4 gibt Auskunft über die erhaltenen gemittelten Abstände zur Oberfläche der MBCs sowie die Unterschiede in den Abständen zweier in einem Experiment verglichenen BAC-Pools (ΔD).

BAC Pool	Hly/HLb		HFb	
	S	G0	S	G0
A CT #12 Gendichte	$D_{\text{genreich}}=1469\text{nm}$ $D_{\text{genarm}}=1195\text{nm}$ $\Delta D=+274\text{nm}$ 22/28 (78%) ($p=0.016$)	$D_{\text{genreich}}=773\text{nm}$ $D_{\text{genarm}}=659\text{nm}$ $\Delta D=+114\text{nm}$ 21/30(70%) ($p=0.026$)	$D_{\text{genreich}}=1059\text{nm}$ $D_{\text{genarm}}=941\text{nm}$ $\Delta D=+118\text{nm}$ 24/33(72%) ($p=0.031$)	$D_{\text{genreich}}=987\text{nm}$ $D_{\text{genarm}}=845\text{nm}$ $\Delta D=+142\text{nm}$ 22/30(73%) ($p=0.022$)
B CT #12 R-/G- Banden	$D_R=937\text{nm}$ $D_G=658\text{nm}$ $\Delta D=+279\text{nm}$ 11/19(57%) ($p=0.134$)	$D_R=786\text{nm}$ $D_G=451\text{nm}$ $\Delta D=+335\text{nm}$ 23/27(85%) ($p<0.001$)	$D_R=598\text{nm}$ $D_G=599\text{nm}$ $\Delta D=-1\text{nm}$ 18/29(62%) ($p=0.545$)	$D_R=583\text{nm}$ $D_G=686\text{nm}$ $\Delta D=-103\text{nm}$ 8/22(36%) ($p=0.127$)
C CT #18 R-/G- Banden	$D_R=935\text{nm}$ $D_G=668\text{nm}$ $\Delta D=+267\text{nm}$ 17/26(65%) ($p=0.115$)	$D_R=401\text{nm}$ $D_G=499\text{nm}$ $\Delta D=-98\text{nm}$ 8/20(40%) ($p=0.216$)	$D_R=745\text{nm}$ $D_G=585\text{nm}$ $\Delta D=-160\text{nm}$ 11/30(36%) ($p=0.199$)	$D_R=789\text{nm}$ $D_G=491\text{nm}$ $\Delta D=+298\text{nm}$ 12/20(60%) ($p=0.143$)
D CT #19 R-/G-Banden	$D_R=557\text{nm}$ $D_G=636\text{nm}$ $\Delta D=-79\text{nm}$ 7/20(35%) ($p=0.114$)	$D_R=789\text{nm}$ $D_G=813\text{nm}$ $\Delta D=-24\text{nm}$ 15/28 (54%) ($p=0.690$)	$D_R=404\text{nm}$ $D_G=417\text{nm}$ $\Delta D=-13\text{nm}$ 13/23 (56%) ($p=0.843$)	$D_R=527\text{nm}$ $D_G=536\text{nm}$ $\Delta D=-9\text{nm}$ 9/21 (42%) ($p=0.424$)
E CT #12 Expression	$D_{\text{hoch}}=732\text{nm}$ $D_{\text{niedrig}}=831\text{nm}$ $\Delta D=-99\text{nm}$ 10/24(42%) ($p=0.297$)	$D_{\text{hoch}}=790\text{nm}$ $D_{\text{niedrig}}=632\text{nm}$ $\Delta D=+158\text{nm}$ 12/21(57%) ($p=0.126$)	$D_{\text{hoch}}=1263\text{nm}$ $D_{\text{niedrig}}=1265\text{nm}$ $\Delta D=-2\text{nm}$ 12/25(48%) ($p=0.590$)	$D_{\text{hoch}}=1583\text{nm}$ $D_{\text{niedrig}}=1357\text{nm}$ $\Delta D=+226\text{nm}$ 18/27(67%) ($p=0.199$)

Tabelle.3.5.4: Absolute Abstände zur Oberfläche der MBCs (Maximum Brightness Center)

Die ersten zwei Zeilen in jeder Tabellenzelle zeigen die Werte der gemittelten Abstände (D) der in einem Experiment korrespondierenden BAC-Pools zur Oberfläche der MBCs. ΔD gibt den Unterschied in der Verteilung zwischen den zusammengehörigen BAC-Pools an. Die vierte Zeile gibt Auskunft über die absolute Anzahl und den Prozentsatz der Zellkerne in den jeweiligen Experimenten für die folgende Verteilung zutrifft: $D_{\text{genreich}} > D_{\text{genarm}}$ (Spalte **A**), $D_R > D_G$ (Spalte **B**, **C** und **D**) und $D_{\text{hoch}} > D_{\text{niedrig}}$ (Spalte **E**). Die letzte Zeile gibt die Signifikanz der Unterschiede an (Wilcoxon signed Rank Sum Test), grau unterlegte Spalten weisen auf nicht signifikante Unterschiede ($p>0,05$) hin.

Die Abbildung 3.5.4.4 stellt die in der Tabelle 3.5.4 angegebenen Ergebnisse graphisch dar und die Abbildung 3.5.4.5 zeigt schließlich exemplarisch einige repräsentative Verteilungskurven für ausgewählte Experimente. Eine vollständige Übersicht aller Verteilungskurven findet sich im Anhang unter Abschnitt 7.8.3.

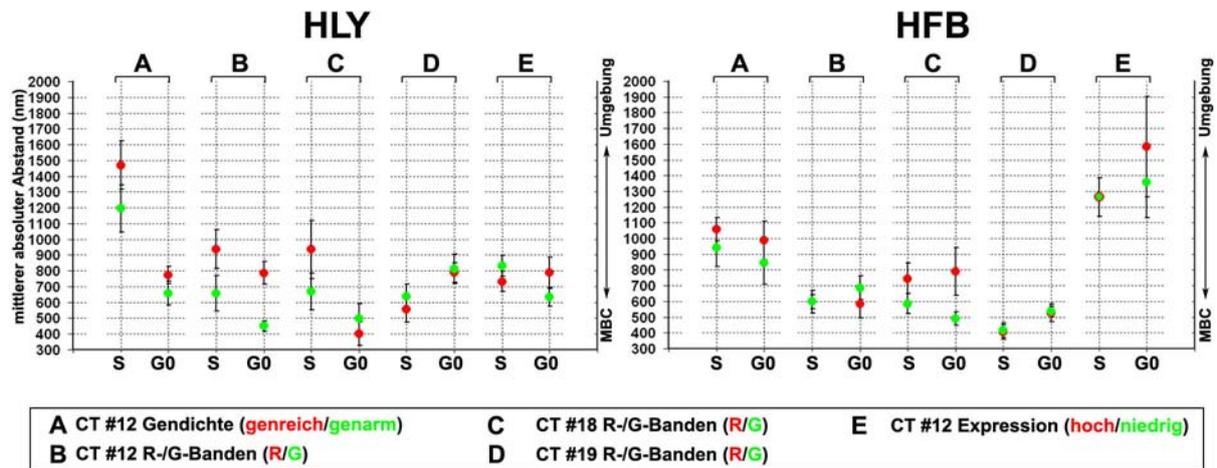


Abbildung.3.5.4.4: Graphische Darstellung der gemittelten absoluten Abstände der BAC-Pools zur MBC Oberfläche

Der linke Graph zeigt die Ergebnisse für die humanen Lymphozyten (HLY), der rechte die Ergebnisse für die humanen Fibroblasten (HFB). Die Ordinate gibt den gemittelten absoluten Abstand zur Oberfläche der MBCs in nm an. Die Buchstaben A bis E entsprechen der Einteilung der Experimente in Tabelle 3.5.4., die Abszisse gibt Auskunft über die Zellzyklusphase, in denen die untersuchten Zellen sich befanden. Rote Punkte repräsentieren den genreichen Pool von CT #12 (A), die R-Banden Pools von CT #12, #18 und #19 (B, C und D) sowie den hoch exprimierten Pool von CT #12 (E). Die grünen Punkte stehen für den genarmen Pool von CT #12 (A), die G-Banden Pools von CT #12, #18 und #19 (B, C und D) bzw. den niedrig exprimierten Pool von CT #12 (E).

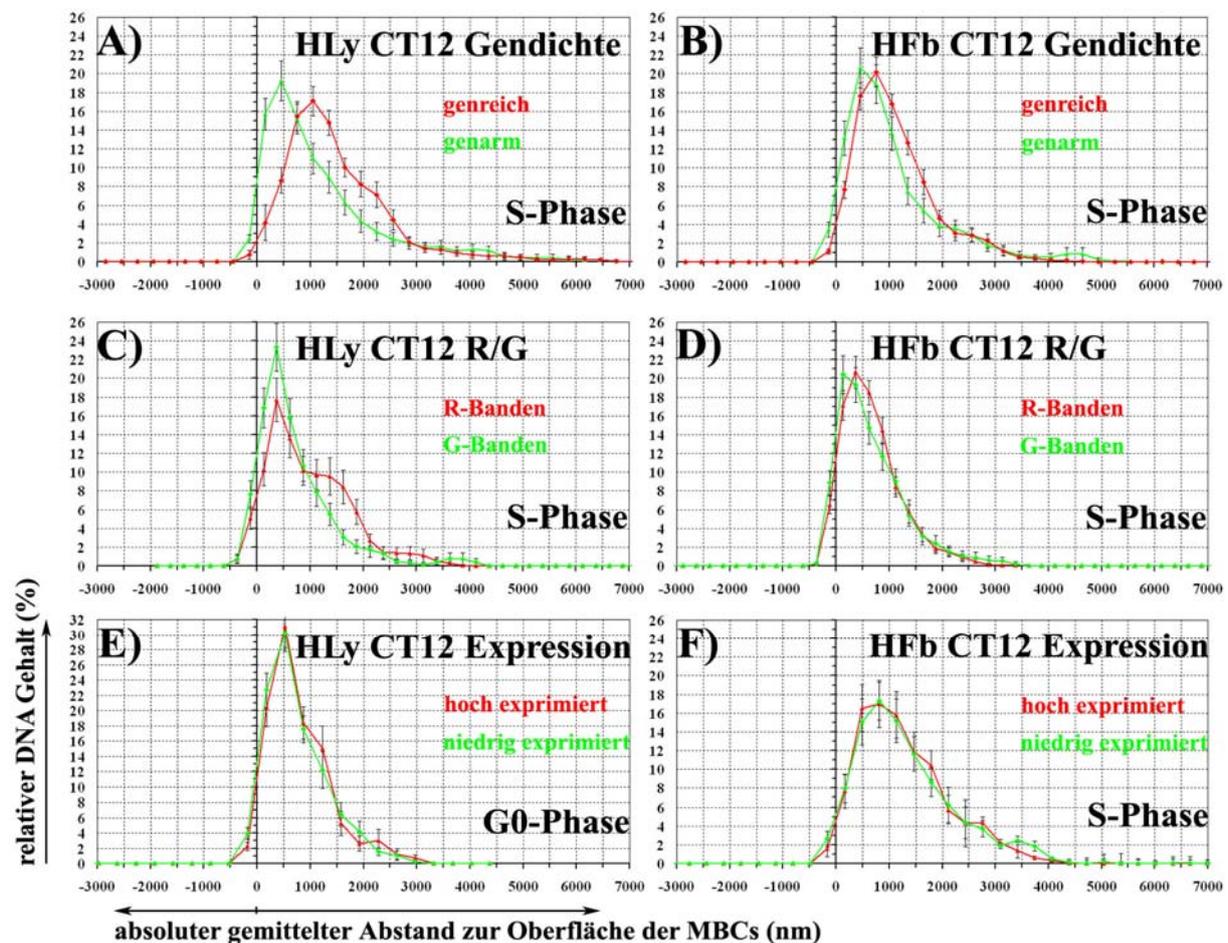


Abbildung.3.5.4.5: Beispiele für die Verteilungskurven (Auswertungen mit eADS)

Die Ordinate zeigt den relativen DNA Gehalt der BAC-Pools in Prozent, die Abszisse gibt den gemittelten, absoluten Abstand der Signalvoxel zur Oberfläche der MBCs (maximum brightness center) in nm an. Negative Werte zeigen dabei das Innere der MBCs, der Wert „0“ repräsentiert die segmentierte MBC-Oberfläche, positive Werte spiegeln die äußere, nukleäre Umgebung wider.

Die roten Kurven repräsentieren die Abstandsverteilungen des genreichen BAC-Pools von CT #12 in HLy (**A**) und HFb (**B**), des R-Banden BAC-Pools von CT #12 in HLy (**C**) und HFb (**D**) bzw. des hoch exprimierten BAC-Pools von CT #12 in HLy (**E**) und in HFb (**F**). Die grünen Kurven repräsentieren die Abstandsverteilungen des genarmen BAC-Pools von CT #12 in HLy (**A**) und HFb (**B**), des G-Banden BAC-Pools von CT #12 in HLy (**C**) und HFb (**D**) bzw. des niedrig exprimierten BAC-Pools von CT #12 in HLy (**E**) und HFb (**F**).

Signifikante Unterschiede in der räumlichen Verteilung bezüglich der MBCs konnten nur für die Gendichte abhängigen BAC-Pools gefunden werden, sowie für das Experiment 12RG in ruhenden humanen Lymphozyten. Hier lagen die BAC Klone des genarmen bzw. des G-Banden Pools näher an den MBCs als die BAC Klone des genreichen bzw. des R-Banden Pools. Für die Daten aller anderen Experimente konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilung festgestellt werden (siehe Tabelle 3.5.4).

Interessanterweise ist für die nicht signifikanten Auswertungsergebnisse auch keine Präferenz für die Anordnung der BAC-Pools bezüglich der MBCs erkennbar. Wie aus der Abbildung 3.5.4 hervorgeht, sind nicht nur die BAC-Pools, denen in der Literatur eher inaktive Eigenschaften zugeschrieben werden (G-Banden, niedrige Expression), näher an den MBCs zu finden, sondern es gibt auch Experimente in denen ihre korrespondierenden Pools mit den laut Literatur eher aktiven Eigenschaften (R-Banden, hohe Expression) näher an den MBCs lokalisieren.

Durchgängig sehr niedrige Unterschiede ΔD zwischen den korrespondierenden BAC-Pools wurden sowohl in den humanen Lymphozyten wie auch in den humanen Fibroblasten für das Experiment 19 RG gefunden. Das mag wieder darauf zurück zu führen sein, daß sich die R- und G-Banden des Chromosoms 19 in ihren Eigenschaften sehr ähnlich sind (siehe Abschnitt 3.1.1).

Die MBCs sind eine Struktur, die sich aus dem unterschiedlichen Kompaktierungsgrad der DNA innerhalb eines CTs ergibt, sie enthalten die dichter gepackten Domänen eines Territoriums. Aus den Ergebnissen dieser Versuche lässt sich schließen, dass die Stärke der Kondensierung mit der lokalen Gendichte in einem näheren Zusammenhang steht. Je genärmer eine Region ist desto höher ist wohl auch ihre Kompaktierung, womit die Wahrscheinlichkeit wächst sie in unmittelbarer Nähe eines MBCs zu finden. Die Zuordnung einer Sequenz zu R- oder G-Banden bzw. die Stärke ihrer transkriptionellen Aktivität alleine scheint dagegen nicht unmittelbar mit dem Grad ihrer Kondensierung zu korrelieren.

Allerdings muss bei diesen Ergebnissen beachtet werden, dass es sich bei den MBCs um eine biologisch nicht exakt definierbare Struktur handelt. Ihre Darstellung ist bislang nur durch eine subjektive, graphische Prozessierung der Bilddaten möglich. Da keine genauen Informationen über die an den MBCs beteiligten Sequenzen vorliegen, ist eine Verifizierung der Ergebnisse durch Kontrollexperimente (z.B. Detektion der MBCs mit FISH-Sonden) bislang noch nicht möglich.

3.5.5 Das Phänomen des „Looping out“

Mit keinem der bislang durchgeführten Experimente konnte die Hypothese bestätigt werden, daß gendichte und/oder sehr stark exprimierte Regionen typischer Weise an der Oberfläche der CTs liegen oder sogar weit aus dem dazugehörigen Territorium herausragen (Mahy et al., 2002a; Volpi et al., 2000; Williams, 2003). Im Gegenteil: in allen von uns untersuchten Chromosomenterritorien wurde der Hauptteil aller BAC-Signale im Inneren der CTs gefunden. Nur etwa 8-10% der Signale lagen im Durchschnitt außerhalb der segmentierten Oberfläche, und davon befand sich ein Großteil im Abstand von 400nm zum Territorium. In keinem Experiment wurden BAC Signale gefunden, die weiter als 1µm entfernt von der Oberfläche der CTs lagen (siehe Abbildung 3.5.2.2).

Um das Phänomen des „looping out“ näher zu untersuchen wurde in dieser Arbeit die Region 11p15.5 analysiert. Es wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, dass diese direkt an das Telomer des kurzen Arms anschließende Region des humanen Chromosoms #11 typischer Weise ausloopt, einzelne Cosmide und PACs wurden im Abstand von mehr als 1,5µm zur Oberfläche der Territorien gefunden (Gilbert et al., 2004; Mahy et al., 2002a). Um die Struktur der aus dem Territorium herausragenden Chromatinabschnitte zu untersuchen wurde ein BAC-Contig verwendet, das 2,3 Mb der insgesamt 2,8 Mb umfassenden Bande abdeckt. In diesem sehr genreichen Abschnitt sind etwa 80 Gene enthalten, von denen viele in humanen Fibroblasten (und auf einem etwas niedrigeren Niveau auch in humanen Lymphozyten) eine hohe transkriptionelle Aktivität aufweisen. Das Contig enthält nur zwei kleine Lücken (etwa 100 und etwa 300 kb) und umfasst insgesamt 14 BACs. Eine genaue Charakterisierung der Bande 11p15.5 bzw. der für das Contig verwendeten BACs ist im Abschnitt 3.1.1 bzw. 3.1.3 zu finden.

Das Contig zeigte eine hohe Variabilität in seiner Form und der Position bezüglich des CTs. Die Abbildung 3.5.5.1 zeigt einige Beispiele hierfür. In humanen Lymphozyten lag das Contig oft als relativ kompakte Struktur an der Oberfläche der Territorien (Abb. 3.5.5.1 A) während in den humanen Fibroblasten sehr viel mehr unterschiedliche Strukturen gefunden wurden. Dieses Phänomen lässt sich wahrscheinlich durch die in diesem Zelltyp ebenfalls sehr viel zerklüfteter Struktur der Territorien an sich erklären. Das Contig wurde hier intern an der chromosomalen Peripherie oder an der Oberfläche der CTs gefunden (Abb. 3.5.5.1 C). In vielen Beispielen befand es sich auch komplett außerhalb des segmentierten CTs (Abb. 3.5.5.1.B).

In den Zellkernen von humanen Fibroblasten ragte das Contig in 70,4% der untersuchten Territorien deutlich aus dem CT heraus. Bei den humanen Lymphozyten war dieser Prozentsatz etwas geringer, hier waren es nur 61% der untersuchten CTs bei denen die Region 11p15.5 ausloopte.

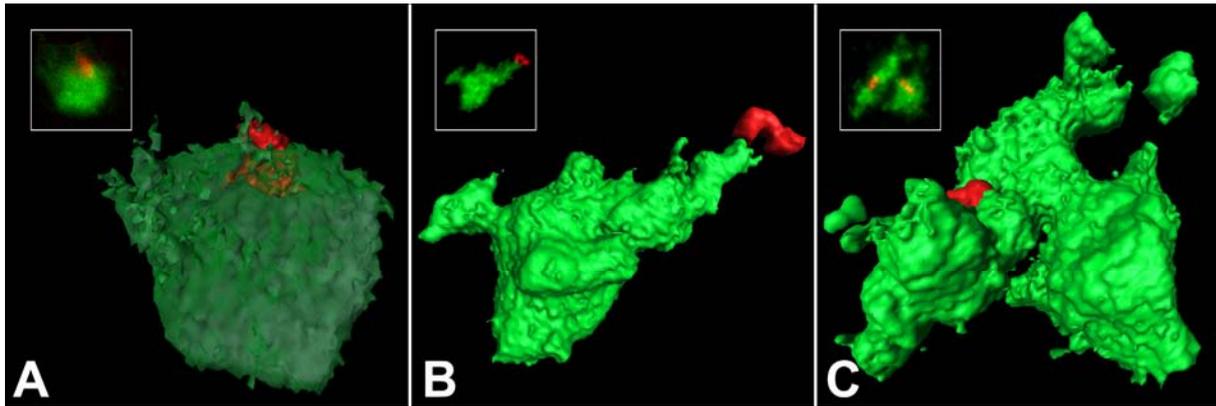


Abbildung 3.5.5.1: Beispiele für die 3D Anordnung des 11p15.5 BAC-Contigs im CT

3D-Rekonstruktionen (mittels der Amira 3.1.1 Software, TGS) von Chromosomenterritorien #11 (in grün dargestellt) und dem BAC-Contig (in rot dargestellt) in humanen Lymphozyten (A) und humanen Fibroblasten (B und C). Im Rahmen links oben befindet sich jeweils eine Maximum Z-Projektion der Bilddaten desselben CTs.

Da in humanen Fibroblasten eine größere Formenvielfalt des BAC Contigs beobachtet werden konnte, wurde in dieser Zelllinie eine genauere Strukturanalyse durchgeführt. Dafür wurden die beiden BAC Klone, die das Contig zu beiden Seiten begrenzen, unterschiedlich markiert und mit verschiedenen Fluorochromen nachgewiesen. Dadurch konnte Beginn und Ende der Struktur definiert werden. Die Abbildung 3.5.5.2 zeigt ein Beispiel für diesen Versuchsansatz. Die Variabilität der Struktur wird deutlich klar. In beiden Territorien befindet sich das Contig außerhalb des Territoriums, einmal jedoch in einer kompakten, kugeligen Form und einmal in einer ausgestreckten, fast linearen Form. Hier hat der äußerste, telomernahe BAC einen Abstand von etwa $2\mu\text{m}$ zur Oberfläche des Territoriums.

Es ist ebenfalls klar zu erkennen, dass die aus dem Territorium herausragende Struktur sehr kompakt ist und offensichtlich nicht auf einer dünnen DNA-Fibern auf dem Niveau der Solenoidstruktur (30nm Fiber, 30-40fache Kompaktierung der DNA) beruht. Der maximale Abstand zwischen den Intensitätsschwerpunkten des telomernahen und des centromernahen BACs, der mittels der Software ImageJ gemessen werden konnte, lag bei $3\mu\text{m}$. Geht man davon aus, dass die lineare DNA des haploiden menschlichen Genoms ($\sim 3000\text{Mb}$) eine Länge von 1m einnimmt, würde man für das hier verwendete Contig (2340kb) eine Länge von $780\mu\text{m}$ erwarten. Die tatsächliche gemessene, maximale Länge von $3\mu\text{m}$ lässt auf einen Kompaktierungsgrad von 260 schätzen. Dies ist deutlich höher als von Gilbert et al (2004; 2005; 2005) für aktive Sequenzen vorgeschlagen wurde.

Interessanterweise fehlt in beiden Fällen eine Überlappung mit der chromosomalen paint Sonde #11. Lediglich der centromernahe BAC Klon (in der Abbildung 3.5.5.2 in grün dargestellt) zeigt teilweise eine Kolo-kalisation. Die Region 11p15.5 ist mit ihrer hohen Gendichte allerdings eine „unique region“ und sollte, da sie auch keine repetitiven Elemente enthält ein Bestandteil der chromosomalen paint Sonde #11 sein. Die fehlende Hybridisierung lässt sich vielleicht durch den Überschuss und eine damit einhergehende Verdrängung der paint Sonde von den BAC Sonden erklären.

Dieses 3D-FISH Experiment (und die nachfolgenden Auswertungen) wurden von Sandra Dittrich in Rahmen ihrer von mir mitbetreuten Diplomarbeit durchgeführt.

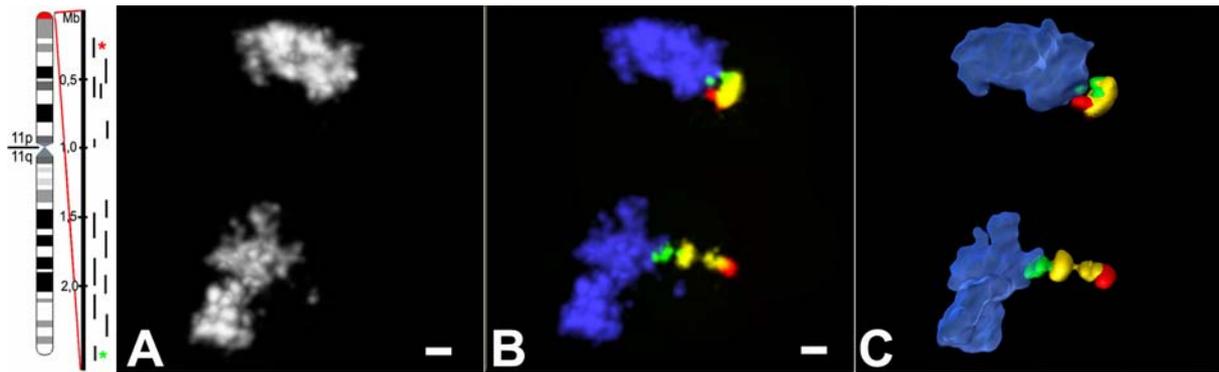


Abbildung 3.5.5.2: Beispiele für die 3D Anordnung des 11p15.5 BAC-Contigs im CT

Links ist ein Ideogramm des Chromosoms #11 zu sehen mit einer Übersicht der für das Contig verwendeten BAC Klone (schwarze Balken). Die beiden das Contig begrenzenden Klone, die in diesem Experiment speziell markiert und detektiert wurden, sind durch farbige Sternchen gekennzeichnet. (A) Maximum Z-Projektion zweier homologer CT #11, Grauwertbild. Der Bar entspricht 1 µm. (B) Maximum Z-Projektion derselben Territorien #12 (blau) und des BAC Contigs (gelb). Der telomernahe BAC wurde in rot, der centromernahe BAC in grün dargestellt. Der Bar entspricht 1 µm. (C) 3D Rekonstruktion (mittels Amira 3.1.1, TGS) derselben Territorien.

Um den Abstand, den das BAC Contig zur Oberfläche der Territorien einnehmen kann, zu definieren, wurde eine Auswertung mit dem eADS Programm durchgeführt (eine genaue Beschreibung des Programms findet sich im Abschnitt 2.11.4.). Die Abbildung 3.5.5.3 zeigt eine graphische Darstellung der Ergebnisse.

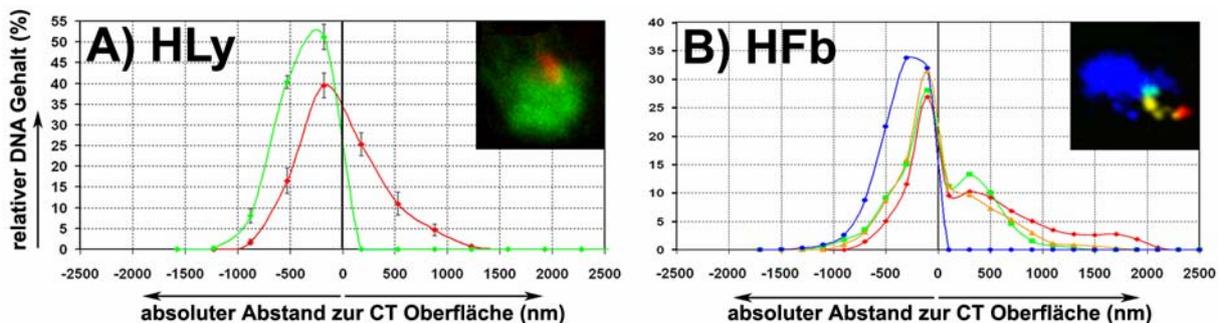


Abbildung.3.5.5.3: eADS: Abstände des BAC Contigs zur Oberfläche der CTs

Die Ordinate zeigt den relativen DNA Gehalt der BAC-Pools in Prozent, die Abszisse gibt den gemittelten, absoluten Abstand der Signalvoxel zur Oberfläche der CTs in nm an. Negative Werte zeigen dabei das Innere der CTs, der Wert „0“ repräsentiert die segmentierte CT-Oberfläche, positive Werte spiegeln die äußere, nukleäre Umgebung wider.

(A) Auswertung in den unstimulierten humanen Lymphozyten. Die grüne Kurve zeigt die DNA Verteilung der CTs #11, die rote Kurve beschreibt die Verteilung des BAC-Contigs. Rechts oben befindet sich als Beispiel für die ausgewerteten Daten eine Maximum Z-Projektion eines CT #11 (grün) und des BAC Contigs (rot).

(B) Auswertung in den humanen Fibroblasten (ohne Zellzykluskontrolle). Die blaue Kurve zeigt die Abstandsverteilung der CTs #11, die gelbe Kurve repräsentiert das BAC Contig, die rote Kurve beschreibt die Verteilung des telomernahen BACs, die grüne Kurve zeigt die Abstandsverteilung des centromernahen BACs. Rechts oben befindet sich als Beispiel für die ausgewerteten Daten eine Maximum Z-Projektion eines CT #11 (blau), des BAC Contigs (gelb) und den das Contig begrenzenden BACs (grün centromernahe BAC, rot telomernahe BAC).

Die Graphen zeigen deutlich die Tendenz der Region aus dem Territorium auszuloopen, wobei sich dennoch in beiden Zelllinien etwas mehr als die Hälfte des Contigmaterials im Inneren der CTs befindet. Das liegt daran, dass die Bande 11p15.5 in manchen Territorien gar nicht oder auch nur teilweise herausragt. In den humanen Lymphozyten lagen die maximalen Abstände zur Oberfläche bei $1,2\mu\text{m}$, in den humanen Fibroblasten wurden für den telomernahen BAC (in rot dargestellt) Abstände bis zu $2,3\mu\text{m}$ zur Oberfläche der CTs gemessen.

Um schließlich die räumliche Orientierung der Region 11p15.5 in Bezug zum gesamten CT #11 innerhalb des Zellkerns zu analysieren, wurden mit dem eADS Programm die kürzesten Abstände der paint Sonde #11 sowie des BAC Contigs zum Zellkernrand gemessen. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in der Abbildung 3.5.5.4 graphisch dargestellt.

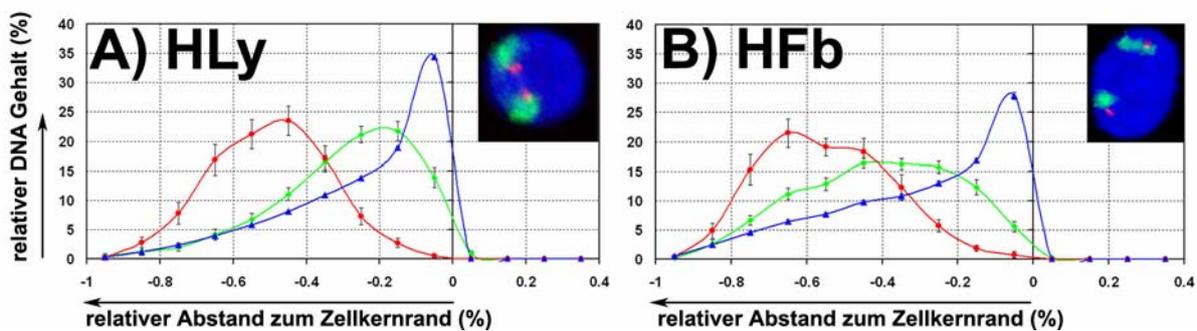


Abbildung.3.5.5.4: eADS: Abstände des BAC Contigs zur Oberfläche der Zellkerne

Die Ordinate zeigt den relativen DNA Gehalt der BAC-Pools in Prozent, die Abszisse gibt den gemittelten, relativen Abstand der Signalvoxel zur Oberfläche der CTs in Prozent an. Negative Werte zeigen dabei das Innere der Nuclei, der Wert „0“ repräsentiert die segmentierte Kernoberfläche, positive Werte spiegeln die cytoplasmatische Umgebung wider.

Die blauen Kurven repräsentieren die Kerngegenfärbung (DAPI), rote Kurven zeigen die Abstandsverteilung der BAC Contigs während die grünen Kurven die Verteilung der CTs #11 beschreiben. (A) Auswertung in den unstimulierten humanen Lymphozyten. (B) Auswertung in den humanen Fibroblasten (ohne Zellzykluskontrolle).

In beiden Zelltypen ist klar zu erkennen, dass die Region 11p15.5 signifikant interner im Kern liegt als das gesamte CT #11 ($p < 0,001$, Wilcoxon Signed Rank Sum Test). Das fingerförmig aus dem Territorium herausragende Material orientiert sich also zur Zellkernmitte. Da diese Bande extrem genreich ist, passt diese Beobachtung gut zu vorherigen Ergebnissen, die zeigten daß mit zunehmender Gendichte auch die Wahrscheinlichkeit einer zentralen Position im Zellkern steigt (Croft et al 1999, M.Cremer et al 2001, M.Cremer et al 2003).

3.5.6 Vermischung von Chromosomenterritorien

In einem weiteren Ansatz sollte untersucht werden, ob benachbarte CTs überlappen können, und wenn ja, in welchem Ausmaß sich das Chromatin miteinander vermischt. Dafür wurde ein 5 Farben FISH Experiment an unstimulierten, humanen Lymphozyten sowie an humanen Fibroblasten durchgeführt (siehe Abschnitt 2.8). Mittels FISH-Sonden wurde simultan das gesamte CT #11 und die im vorherigen Abschnitt beschriebene Region 11p15.5

nachgewiesen, sowie das gesamte CT #12 mit dem in dieser Arbeit bereits mehrfach verwendeten BAC-Pool für transkriptionell hoch aktive Gene des CTs #12 (siehe Abschnitt 3.1.4). Dieser Versuch wurde von Dr. Marion Cremer im Labor durchgeführt. Die Tabelle 3.5.6 gibt eine Übersicht über die verwendeten Markierungen und Nachweisschemata.

Sonde	Markierung	Nachweis
CT #11 (Chromosomale paint Sonde)	Biotin	1.) Avidin-Cy5 2.) Goat anti Avidin-Biotin 3.) Avidin-Cy5
11p15.5 (2,3Mb BAC Contig)	TexasRed	---
CT#12 (Chromosomale paint Sonde)	Digoxigenin	1.) Mouse anti Digoxigenin 2.) Goat anti Mouse Alexa488
BAC-Pool 12 für hoch exprimierte Gene	TAMRA	---
Gegenfärbung	---	DAPI

Tabelle 3.5.6: Markierung und Nachweisschemata für das 5-Farben FISH Experiment

Die Daten wurden am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop aufgenommen. Es wurden gezielt Zellkerne ausgewählt, in denen die markierten CTs in direkter Nachbarschaft zueinander lagen. Die Abbildung 3.5.6.1 zeigt Beispiele für die durchgeführten 3D-FISH Experimente. Die Bilder zeigen deutlich wie eng benachbarte CTs mit einander assoziiert sein können.

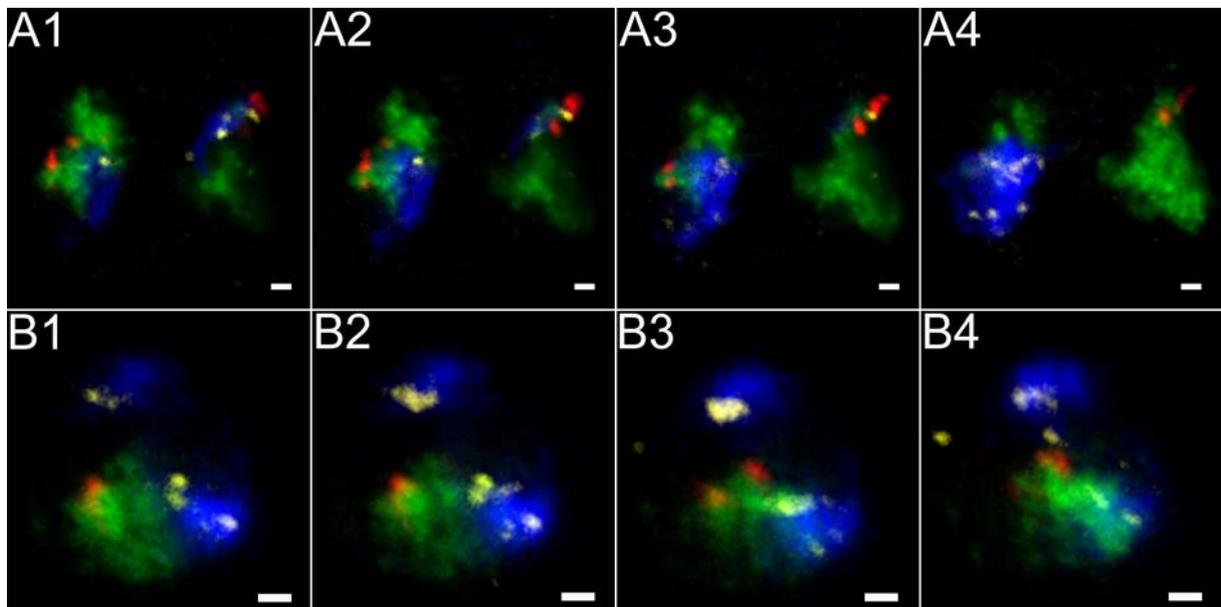


Abb. 3.5.6.1: Beispiele für 3D FISH Experimente zur Untersuchung der Vermischung benachbarter CTs

Darstellung von CT #11 (grün) mit der Region 11p15.5 (rot) und des CT #12 (blau) mit dem BAC-Pool für transkriptionell hoch aktive Gene (gelb) in humanen Fibroblasten (A) und humanen Lymphozyten (B). Die Abbildungen 1-4 zeigen jeweils direkt aufeinander folgende Sektionen des am konfokalen Lasermikroskop aufgenommenen Datensatzes eines Zellkerns. Der Größenstandart entspricht 1µm.

Diese Daten wurden mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten, quantitativen Auswertungsmethode eADS ausgewertet (siehe Abschnitt 2.11.4). Dabei wurden die kürzesten, absoluten Abstände aller Signalvoxel eines CTs sowie aller Signalvoxel des BAC-Pools bzw. des BAC Contigs zur segmentierten Oberfläche des Referenz CTs gemessen. Die Abbildung 3.5.6.2 zeigt die resultierenden Verteilungskurven aus dieser Auswertung.

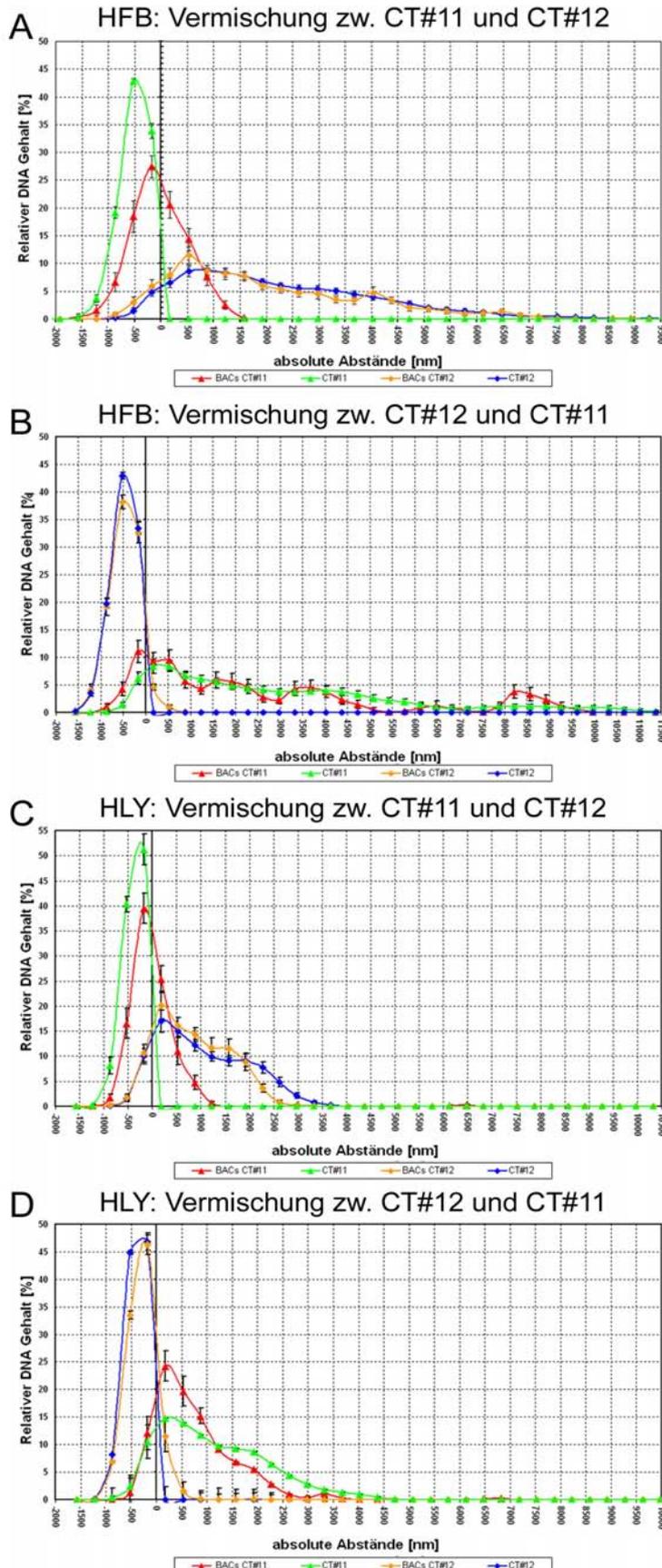


Abb. 3.5.6.2: Verteilungskurven der eADS Auswertung zur Überlappung benachbarter CTs

Die Graphen **A** und **B** dokumentieren die Analyse in humanen Fibroblasten, **C** und **D** stellen die Ergebnisse der Auswertung in humanen Lymphozyten dar. Die Ordinate zeigt den relativen DNA Gehalt der untersuchten FISH Sonden in Prozent, die Abzisse gibt den gemittelten, absoluten Abstand der Signalvoxel zur Oberfläche des entsprechenden CTs in nm an. In **A** und **C** ist das CT #11 die Referenzstruktur, in **B** und **D** ist es das CT #12. Negative Werte zeigen das Innere der Referenz-CTs, der Wert „0“ repräsentiert deren segmentierte Oberfläche, positive Werte spiegeln die äußere, nukleäre Umgebung wieder. Die grünen Kurven repräsentieren das CT #11, die roten Kurven zeigen die DNA-Verteilung des BAC Contigs für die Region 11p15.5. In blau ist das CT #12 dargestellt, während die gelben Kurven die Verteilung der BAC Klone des für hoch exprimierte Gene spezifischen Pools von Chromosom 12 repräsentieren.

Wie aus den Graphen abzuleiten ist, scheinen sich benachbarte CTs in beiden untersuchten Zelltypen zu einem geringen Prozentsatz zu vermischen.

In den Zellkernen der humanen Fibroblasten nehmen die CTs #11 und #12 ähnliche Volumina ein. Der maximale Radius liegt für beide CTs in einem ähnlichen Bereich, für alle untersuchten CTs #11 lag er bei 1,8µm während der maximale Radius aller analysierten CTs #12 bei 1,5µm lag. Passend zu den im Abschnitt 3.5.5 präsentierten Daten konnte gezeigt werden, dass die Region 11p15.5 gerne aus ihrem Territorium herausragt, 45% des DNA Gehaltes des BAC Contigs wurde außerhalb der segmentierten Oberfläche des CTs #11 gefunden. Die maximalen Abstände des Contigs zur CT Grenze betragen dabei Werte zwischen 2,5µm und 3µm. Die BAC Klone des Pools für die hoch exprimierten Gene des menschlichen Chromosoms 12 lagen dagegen deutlich im Inneren ihres CTs. Nur etwa 1,2% ihres gesamten DNA-Gehalts wurde außerhalb der Oberfläche gefunden, die maximalen Abstände zum CT #12 betragen hierbei nur etwa 0,5µm (Abbildung 3.5.6.2 **A** und **B**).

Es konnte gezeigt werden, dass Material des Chromosoms 12 bis zu 1,2µm weit in das CT #11 hineinragen kann. Insgesamt wurden aber nur 6,6% des DNA Gehalts aller untersuchten CTs #12 innerhalb der segmentierten CTs #11 dokumentiert, bereits 5% wurde allerdings im Abstand von nur 175 nm zur CT Hülle gefunden. Insgesamt 9,7% des DNA Gehalts des BAC Pools für die transkriptionell hoch aktiven Gene von CT #12 wurde ebenfalls innerhalb des CT #11 beobachtet, ebenfalls bereits 6% im Abstand von 175nm. Auch hier lag, wie zu erwarten, der maximal gefundene Abstand zur Oberfläche der CTs# 11 bei 1,2µm. Daraus lässt sich schließen dass aktive Gene auch im Territorium eines benachbarten CTs transkribiert werden können (Abbildung 3.5.6.2 **A**).

Umgekehrt verhielt es sich ähnlich. Die untersuchten CTs #11 ragten ebenfalls bis zu maximal 1,2µm in die CTs #12 hinein, hier war es etwa 8% des gesamten DNA Gehalts. Bereits 6% wurden allerdings im Abstand von 175nm gefunden. Die Region 11p15.5 verhielt sich hier etwas auffälliger, insgesamt wurde 16,5% ihres DNA-Gehalts innerhalb der Grenzen des CT #12 gefunden, allerdings 11% zeigte einen Abstand von nur 175nm und 4% einen Abstand von nur 525nm. Der maximale Wert der für die Region 11p15.5 dokumentiert werden konnte, lag bei 1,2 µm. Wie mit diesen Daten gezeigt werden konnte, kann ein DNA Segment offensichtlich aus seinem CT herausloopen und dabei in ein anderes CT hineinragen (Abbildung 3.5.6.2 **B**).

Die Auswertung desselben Experiments an humanen Lymphozyten brachte ähnliche Ergebnisse. Hier zeigten beide CTs #11 und #12 denselben maximalen Radius von 1,5µm. Es konnte ebenfalls bestätigt werden, dass die Region 11p15.5 gerne aus ihrem CT herausragt. Insgesamt wurde 42% des gesamten DNA Gehalts des BAC Contigs außerhalb des dazugehörigen CTs gefunden, der maximale Abstand war aber etwas geringer als in den Fibroblasten, er betrug nur 1,9µm. Auch das deckt sich mit den im Abschnitt 3.5.5 behandelten Daten. Die BAC Klone des für die hoch exprimierten Gene spezifischen Pools von Chromosom 12 wurden wieder zum größten Teil innerhalb ihres CT gefunden. Insgesamt befand sich zwar in diesem Versuch 13% des DNA Gehalts des Pools außerhalb der segmentierten Territoriumsgrenzen, allerdings wurden 11% bereits im Abstand von 175nm lokalisiert. Der maximale Abstand außerhalb des CTs, der für einen BAC Klon aus dem Pool dokumentiert werden konnte, lag bei 875nm (Abbildung 3.5.6.2 **C** und **D**).

Auch bei den humanen Lymphozyten konnte 11% des DNA-Gehalts der CTs #12 im Inneren der Territorien von Chromosom 11 gefunden werden, der maximale Abstand von der Oberfläche des CT #11 betrug dabei 1,2µm. Allerdings lagen wieder 10% des DNA-Gehalts der CTs #12 bereits in einem Abstand von nur 175nm zur segmentierten Oberfläche. Die BAC Klone des Pools für die hoch exprimierten Gene von Chromosom 12 verhielten sich ähnlich wie ihr CT, auch sie konnten maximal 1,2µm von der Oberfläche entfernt im Inneren der CTs #11 dokumentiert werden. Insgesamt 12% ihres DNA-Gehalts befand sich in den CTs #11, 10% wieder im Abstand von nur 175nm zur CT Hülle (Abbildung 3.5.6.2 C).

Umgekehrt verhält es sich wieder ähnlich, 13% des DNA-Gehalts der untersuchten CTs #11 befanden sich im Territorium von Chromosom 12. Wieder wurde der größte Anteil davon, 10%, im geringen Abstand von 175nm zur Oberfläche von CT #12 gefunden. Der maximale Abstand zur CT Oberfläche, der für Material von Chromosom 11 im CT #12 dokumentiert werden konnte, lag bei 1,2µm. Die Region 11p15.5 verhält sich exakt gleich wie ihr Territorium. Ebenfalls 13% des DNA Gehalts des BAC Contigs wurde im CT #12 gefunden, 10% lag direkt unter der Oberfläche im Abstand von nur 175nm. Maximal ragte die Region um 1,2µm in die CTs #12 hinein (Abbildung 3.5.6.2 D).

Es konnte also ganz klar eine Vermischung von Chromatin benachbarter Territorien nachgewiesen werden. Der Großteil der überlappenden Signale lag allerdings direkt an der Oberfläche der segmentierten CTs, im Abstand von nur 175nm. Hier ist es fraglich ob der für die Segmentierung gewählte Schwellenwert tatsächlich exakt genug für die durchgeführte Auswertung war, oder ob er falsch gewählt und damit vielleicht eines der beiden CTs (oder auch beide CTs) minimal artifiziell vergrößert hat. Des Weiteren liegt ein Abstand von nur 175nm deutlich unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops, es ist also eigentlich nicht möglich auf dem Niveau dieser geringen Abstände eine exakte Aussage über die Lage der subchromosomalen Abschnitte im Verhältnis zueinander zu treffen. So konnte zwar mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass es an den Grenzen benachbarter CTs zu Vermischungen kommen kann, es konnte aber nicht eindeutig geklärt werden, in welchem Ausmaß diese Überlappungen vorliegen. Um eine höhere Auflösung zu erreichen und damit eine genauere Aussage treffen zu können, wären elektronenmikroskopische Auswertungen notwendig.

4. Diskussion

4.1 Einfluss lokaler Chromatineigenschaften auf die Zellkernarchitektur

Verschiedene Chromatinabschnitte können sich in ihren lokalen Eigenschaften sehr unterscheiden. So gibt es zum Beispiel im menschlichen Genom große Unterschiede zwischen einzelnen Sequenzen in Bezug auf ihre Gendichte, ihre transkriptionelle Aktivität oder auch in Bezug auf ihre Replikationszeit in der S-Phase, um nur ein paar der Faktoren zu nennen. Einige dieser Chromatineigenschaften scheinen aus funktionellen Gründen eng miteinander gekoppelt zu sein. In den Metaphasechromosomen wird diese Koppelung deutlich im chromosomalen Bandenmuster wiedergespiegelt (für Bänderungstechniken siehe Abschnitt 1.1.2.2): Die R-Banden sind im Vergleich zu den G-Banden weniger stark kompaktiert, GC-reicher und beinhalten mehr SINEs (short interspersed elements, z.B. Alu-Sequenzen), sie sind ebenfalls genreicher und enthalten mehr ubiquitär exprimierte Haushaltsgene. Sie weisen auch einen höheren Grad an Histonacetylierung auf, was mit einer ebenfalls höheren transkriptionellen Aktivität einhergeht, und sie replizieren im Allgemeinen früher in der S-Phase (Craig and Bickmore, 1993; Furey and Haussler, 2003; Korenberg and Rykowski, 1988; Larsen et al., 1992; Woodfine et al., 2004; Zink et al., 1999). Viele dieser Eigenschaften sind in den letzten Jahren auf ihren Einfluss auf die nukleäre Topologie des Chromatins während der Interphase hin untersucht worden. So konnte z.B. ein Zusammenhang zwischen der Gendichte (Boyle et al., 2001; Cremer et al., 2003; Cremer et al., 2001b; Croft et al., 1999) des Expressionsniveaus (Lukasova et al., 2002; Zink et al., 2004), der früh und spät replizierender Foci (O'Keefe et al., 1992; Sadoni et al., 1999; Schermelleh et al., 2001), dem Gehalt an Alu-Sequenzen (Bolzer et al., 2005) sowie dem GC versus AT Gehalt (Saccone et al., 2002) und einer radialen Anordnung der entsprechenden Chromatinabschnitte im Zellkern verschiedener humaner Zelltypen gezeigt werden. Hier nehmen, vereinfacht dargestellt, die gendichteren, bzw. höher exprimierten, bzw. früh replizierenden, bzw. Alu- und/oder GC-reichen Domänen eine internere Position im Zellkern ein als Chromatinabschnitte mit konträren Eigenschaften. Diese Anordnung scheint evolutionär konserviert zu sein, da eine entsprechende Ordnung auch in Zellkernen verschiedenster Spezies wie z.B. Primaten, Maus, Huhn, Frosch, bis hin zu Hydra gefunden wurde (Alexandrova et al., 2003; Federico et al., 2005; Federico et al., 2006; Habermann et al., 2001; Mayer et al., 2005; Tanabe et al., 2005; Tanabe et al., 2002b). Das legt eine funktionelle Bedeutung dieser speziellen Topologie nahe.

Auch wenn einige Arbeiten der letzten Jahre auf die Bedeutung der Gendichte für die nukleäre Topologie hinweisen (siehe Abschnitt 4.3), ist noch nicht geklärt welche dieser oben genannten Faktoren tatsächlich einen ausschlaggebenden Einfluss auf die räumliche Anordnung des Chromatins im Zellkern haben und welche anderen Eigenschaften nur aufgrund ihrer Korrelation mit diesen „dominanten“ Merkmalen eine spezifische Verteilung im Interphasekern aufweisen. Ziel dieser Arbeit war es daher unter anderem die räumliche

Verteilung von Chromatin mit verschiedenen Eigenschaften im Zellkern direkt miteinander zu vergleichen und mögliche Korrelationen mit der Topologie herauszustellen.

4.2 BAC-Klone als Handwerkszeug für die Untersuchung der räumlichen Anordnung bestimmter Chromatinabschnitte im Zellkern

Um die räumliche Verteilung bestimmter subchromosomaler Segmente mit speziellen Eigenschaften im Zellkern analysieren zu können, wurde in dieser Arbeit die Topographie von einer Vielzahl definierter DNA-Abschnitte untersucht, die über die gesamte Länge der menschlichen Chromosomen #12, #18 und #19 sowie über einen kleinen Abschnitt des menschlichen Chromosoms #11 verteilt waren. Diese Abschnitte wurden durch FISH Experimenten mit Pools aus BAC Klonen sichtbar gemacht, die die entsprechenden DNA Sequenzen repräsentierten. Ein großer Vorteil der BAC-Klone war, dass ihre Eigenschaften genau definiert werden konnten, da durch Datenbankrecherche detaillierte Informationen wie die lokale Gendichte, Anzahl und Art der enthaltenen Gene, der GC-Gehalt oder auch die Zuordnung zu einer R- oder G-Bande ermittelt werden konnten. Zusätzlich dazu standen uns die Daten eines Expressionsprofils (mit freundlicher Genehmigung von Michael Speicher) sowie Replikationszeiten (mit freundlicher Genehmigung von Heike Fiegler) zur Verfügung, so dass auch die transkriptionelle Aktivität der enthaltenen Gene sowie das Replikationstiming der Klone bestimmt werden konnten. Aufgrund dieser umfangreichen Informationen war es nun möglich BAC-Pools zusammenzustellen, deren Eigenschaften genau definiert waren. Auch wenn das Kriterium für eine Poolzusammensetzung zum Beispiel die Zuordnung der enthaltenen BAC-Klone zu R-Banden Domänen war, ließ sich auf Grund der Einzeldaten der BAC-Klone die mittlere Gendichte, der mittlere GC-Gehalt usw. des gesamten Pools leicht bestimmen. Auch der Einsatz der BACs für die verschiedenen Pools war sehr flexibel. So konnte beispielsweise ein BAC-Klon, der in einer genreichen Region einer G-Bande liegt, und mindestens ein hoch exprimiertes Gen enthält sowohl für einen genreichen Pool, einen G-Banden-Pool oder auch für einen Pool für hohe transkriptionelle Aktivität ausgewählt werden.

In einzelnen Fällen kann die Datenbankrecherche durch Diskrepanzen zwischen verschiedenen Datenbanken erschwert werden. In dieser Arbeit wurde mit den Datenbanken NCBI und ensembl gearbeitet. Leider decken sich hier nicht alle Informationen über die BAC-Klone. Die genaue Position und Länge und damit auch die Angaben über enthaltene Gene können leicht zwischen den Datenbanken variieren. Daher wurde versucht nur mit BAC-Klonen zu arbeiten, deren Daten einander in beiden Quellen entsprachen.

Ein weiterer Nachteil der BAC-Klone liegt in ihrer relativ zeitaufwendigen Qualitätsprüfung im Vorfeld, bevor sie für die Experimente eingesetzt werden können. Erfahrungsgemäß zeigen 10% aller BAC Sonden Kreuz- oder Fehlhybridisierungen, häufig liegt die Ursache hierfür daran, dass bereits im versendenden Institut (in dieser Arbeit das BACPAC Resources Center in Oakland, CA) beim computerunterstützten Picken der bestellten Klone Fehler unterlaufen können. So sollte nach der erfolgreichen Minipräparation der Klone (siehe

Abschnitt 2.3) ihre Hybridisierungsqualität in einem 2D FISH Experiment überprüft werden. Doch damit kann man lediglich die Stärke des Signals bestimmen und eventuelle Kreuz- oder Fehlhybridisierungen ausschließen. Eine genaue Lokalisation des Hybridisierungsortes auf dem Chromosom ist damit nicht möglich. Um sicher zu gehen, dass die ausgewählten BACs tatsächlich die exakten, in der Datenbank angegebenen Sequenzen enthalten ist ein weiterer Test nötig. In dieser Arbeit wurden daher für einen Teil der BAC Klone stichprobenartig Restriktionsanalysen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.3.2). Eine alternative Testmethode wäre beispielsweise auch eine Amplifizierung der im BAC enthaltenen spezifischen Sequenz mittels spezieller Primer.

Sind diese Qualitätstest allerdings einmal durchgeführt sind die BAC-Klone aufgrund ihrer flexiblen Einsatzweise ein hervorragendes Werkzeug zur Untersuchung der nukleären Anordnung von Chromatin mit verschiedenen Eigenschaften. Sie ermöglichen eine Analyse der Determinanten, die für die Ordnung der DNA im Zellkern oder z.B. auch für das lokale Faltungsverhalten einzelner subchromosomaler Segmente im entsprechenden Territorium verantwortlich sind.

4.3 Die lokale Gendichte als wichtigster Faktor für die radiale Anordnung des Chromatins im Zellkern

Einfluss der Gendichte

Dass die Gendichte ein wichtiger Faktor für die radiale Anordnung von Chromatin im Zellkern ist, ist bereits seit einigen Jahren bekannt. Zunächst wurde dieses Phänomen für ganze Chromosomen in den runden Zellkernen menschlicher Lymphozyten beschrieben. Für diese Analysen eigneten sich besonders die Chromosomen 18 und 19, die sich nur unwesentlich in ihrer Größe, dafür deutlich in ihrem Gengehalt unterscheiden: Das 76,2 Mb große Chromosom 18 ist mit durchschnittlich 5,4 Genen pro Mb eines der genärmsten im menschlichen Genom, während das 64 Mb umfassende Chromosom 19 mit einer Gendichte von 27,5 Mb das genreichste menschliche Chromosom ist. Es konnte mit Untersuchungen an humanen Lymphozyten gezeigt werden, dass sich das genarme Chromosom 18 bevorzugt in der Kernperipherie aufhält, während das genreiche Chromosom 19 überwiegend im Inneren des Zellkerns gefunden wurde (Cremer et al., 2001b; Croft et al., 1999). Diese Anordnung wurde ebenfalls für eine Reihe weiterer menschlicher Zelltypen sowie in verschiedenen Krebszelllinien gefunden (Cremer et al., 2003). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in menschlichen Lymphozyten alle Chromosomen dieser von der Gendichte abhängigen, radialen Verteilung im Zellkern unterliegen, genreichere Chromosomen orientieren sich zum Zentrum des Kerns während die genärmeren Chromosomen in der Nähe des Zellkernrandes zu finden sind (Boyle et al., 2001; Cremer et al., 2001b). Eine Analyse der Translokationshäufigkeit zwischen den menschlichen Chromosomen konnte diese Ergebnisse ebenfalls bestätigen: die humanen Chromosomen 17, 19 und 21, die aufgrund ihrer Gendichte alle im Inneren des Zellkerns zu finden sind, zeigen eine erhöhte Translokationshäufigkeit untereinander, die wahrscheinlich auf ihre räumliche Nähe zueinander zurückzuführen ist (Bickmore and Teague, 2002). Diese von der Gendichte abhängige Anordnung bezieht sich

nicht nur auf ganze Chromosomen, sondern lässt sich ebenfalls für subchromosomale Segmente beobachten. So wurde beschrieben, dass translozierte Domänen derivativer Chromosomen nahezu die gleiche radiale Position im Zellkern einnehmen wie die entsprechenden nicht rearrangierten, normalen Chromosomen (Cremer et al., 2003; Croft et al., 1999). Dasselbe konnte auch für homologe Segmente verschiedener Spezies beobachtet werden, die deutliche Rearrangements in ihren Karyotypen zeigen (Neusser et al., 2007; Tanabe et al., 2002b). Selbst auf der Ebene einzelner Gene kann eine von der Gendichte abhängige Anordnung des Chromatins im Zellkern nachgewiesen werden. So nehmen einzelne Genloci im Vergleich zu intergenischen Sequenzen desselben CTs eine internere Position im Zellkern ein (Scheuermann et al., 2004). Ähnliche Ergebnisse konnten Skalnikova et al (2000) präsentieren, die für das centromerische Heterochromatin eine peripherere Position im Zellkern nachweisen konnten als für Gene desselben Chromosoms. In einer aktuellen Studie untersuchte Shopland et al (2006) in Zellen der Maus die 3D Faltung eines 4,3 Mb großen Abschnitt auf MMU 14, der aus 4 transkriptionell aktiven Genclustern besteht, die durch „gene deserts“ (Segmente ohne Gene) voneinander getrennt sind. Sie konnten dokumentieren, dass diese deserts sich vorzugsweise zur Zellkernperipherie hin orientierten während die Gencluster sich zum Inneren des Zellkerns hin ausrichteten. In einer anderen Studie konnte auch gezeigt werden, dass Gene, die in einer genreicheren Umgebung eingebettet sind, ebenfalls weiter im Inneren der Nuklei gefunden werden als Gene mit einer genarmen Nachbarschaft (Murmman et al., 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit gehen konform mit den eben genannten Beobachtungen. Zum einen nahm der genreiche BAC-Pool von Chromosom 12 in den runden Zellkernen der menschlichen Lymphozyten eine deutlich internere Position ein als der genarme BAC-Pool. Entsprechend wurde auch die centromerumspannende, genarme Region des Chromosoms 19 in einer signifikant periphereren Position gefunden als das übrige, genreiche Material des Chromosoms. Des Weiteren wurde auch eine hohe Korrelation zwischen der lokalen Gendichte und der nukleären, radialen Position jedes beliebigen, in dieser Arbeit verwendeten BAC-Pools festgestellt. Je genreicher ein Pool war, desto weiter innen wurde er im Zellkern gefunden (siehe Abbildung 3.4.2.4).

In den sehr flachen, ellipsoid geformten Zellkernen der humanen Fibroblasten ließ sich eine so strikte, von der Gendichte abhängige Anordnung bislang nicht nachweisen. Tatsächlich zeigten mehrere Studien, dass hier die Chromosomengröße offensichtlich eine wichtigere Rolle für die Anordnung des Chromatins in den Nuklei spielt (Bolzer et al., 2005; Cremer et al., 2001b; Croft et al., 1999). Auch der Vergleich der nukleären Position verschiedener Genloci, die unterschiedliche lokale Gendichten aufwiesen, zeigte keine Gendichte abhängige radiale Verteilung (Murmman et al., 2005). Allerdings wurden in dieser Studie in Fibroblasten die Position von nur drei Genen untersucht, die Möglichkeit durch Zufall an eine Ausnahme geraten zu sein ist relativ hoch. Nur für zyklierende Zellen konnte eine internere Position des humanen Chromosoms 19 im Vergleich zum Chromosom 18 gefunden werden, in ruhenden Zellen (G0-Phase) war ein solcher Unterschied nicht zu beobachten (Bridger et al., 2000). Mit einem Nachweis der Alu-Sequenzen, die bevorzugt in genreichen Sequenzen zu finden sind, konnte allerdings gezeigt werden, dass sich diese Sequenzen im Inneren der flachen Zellkerne anhäufen, während um den Zellkernrand eine Alu-Sequenz-freie Schale aus genarmen

Chromatinmaterial existiert (Bolzer et al., 2005), was zumindest auf eine Koexistenz einer Gendichte abhängigen Ordnung in diesem Zelltyp schließen lässt.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten wir deutlich zeigen, dass auch in den flachen Zellkernen der Fibroblasten eine von der Gendichte abhängige Anordnung des Chromatins auf dem subchromosomalen Niveau existiert. Der genreiche BAC-Pool des Chromosoms 12 hatte eine signifikant internere Position inne als der korrespondierende genarme Pool. Die centromerumspannende, genarme Region des Chromosoms 19 lag ebenfalls eindeutig peripherer als das restliche, genreiche Material des Chromosoms. Auch für diesen Zelltyp konnten wir eine deutliche Korrelation zwischen Gendichte und radialer Position im Zellkern nachweisen. Je genreicher ein BAC-Pool war desto interner war auch seine Position im Zellkern (siehe Abbildung 3.4.2.4). Der Korrelationswert R^2_{adj} ist für die humanen Fibroblasten allerdings deutlich niedriger als für die humanen Lymphozyten. Das lässt sich durch die extrem flache, ellipsoide Form ihrer Zellkerne erklären. Der durchschnittliche Durchmesser eines Fibroblastenkerns in z-Richtung beträgt nur $4,5\mu\text{m}$ (Mittelwert aus der Vermessung von 22 Zellkernen). Es existiert gar nicht ausreichend Platz, um eine so deutliche radiale Anordnung wie in den runden Kernen der Lymphozyten (durchschnittlicher Durchmesser $11\mu\text{m}$, Mittelwert aus der Vermessung von 20 Zellkernen) zu etablieren, fast jedes Chromosom hat zwangsweise irgendwo Kontakt mit der Zellkernmembran. Durch die Form des Zellkerns wird zusätzlich die Auswertung und damit auch der Nachweis einer von der Gendichte abhängigen Chromatinanordnung erschwert. Übliche Programme für die quantitative Auswertung der DNA-Verteilung unterteilen den Zellkern in radiale Schalen, ausgehend vom Mittelpunkt (z.B. 3D-RRD Software, siehe Abschnitt 2.11.1). Aufgrund der ellipsoiden Zellkernform haben die in diesen Zelltypen angelegten radialen Schalen allerdings verschiedene Dicken in den verschiedenen räumlichen Ausrichtungen. Daher kann ein Signal mit einem definierten Abstand zur Oberfläche, je nach Lage im Zellkern zu verschiedenen Schalen zugeordnet werden (siehe Abbildung 3.4.1). Eine Lösung war die für diese Arbeit entwickelte Software ADS (siehe Abschnitt 2.11.3), die den Zellkern für die Auswertung in äquidistante Schalen einteilt, ausgehend von der Oberfläche, und so wesentlich genauere Analysen liefert.

Einfluss der Transkription

Der Einfluss der transkriptionellen Aktivität bestimmter Chromatinabschnitte auf die Zellkernarchitektur ist ein umstrittenes Thema (Reviews zu diesem Thema: Kosak and Groudine, 2004; Lanctot et al., 2007; Parada et al., 2004b; van Driel et al., 2003). Es konnte an Beispielen gezeigt werden, dass transkribierte Gene eine internere Position im Zellkern inne haben als Gene ohne transkriptionelle Aktivität (Lukasova et al., 2002; Scheuermann et al., 2004). In diesen Studien wurde allerdings nur die Expression der untersuchten Gene betrachtet, auf die lokale Gendichte ihrer Umgebung wurde nicht eingegangen. Da Expression und Gendichte miteinander in enger Beziehung stehen (Versteeg et al., 2003), kann es sein, dass ihre Ergebnisse indirekt wieder eine von der Gendichte abhängige Verteilung widerspiegeln. Anhand einzelner Gene konnte allerdings belegt werden, dass sich ihre Position im Zellkern mit der Aktivierung oder Deaktivierung ihrer Transkription deutlich ändern kann. So wandert das zum Beispiel das Gen CFTR (codiert für einen Chlorid-Kanal)

mit seiner transkriptionellen Aktivierung von seiner peripheren Position am Zellkernrand etwas weiter ins Innere des Kerns. Dieses Phänomen konnte in mehreren verschiedenen Zelltypen beobachtet werden (Zink et al., 2004). Ein weiteres Beispiel kann man in der Differenzierung von T-Zellen in der Maus beobachten. In einem bestimmten Stadium der Entwicklung dieser Zellen gibt es sogenannte doppelt positive T-Vorläuferzellen, die sowohl den Oberflächenmarker CD4 wie CD8 exprimieren. In diesen Zellen liegt der CD4-Genlokus ungefähr auf der Hälfte zwischen Mittelpunkt und Rand des Zellkerns. Differenziert diese doppelt positive Zelle nun zu einer CD4⁺ T-Zelle (Helfer-T-Zelle, bindet an MHC-II gebundene Peptide) wandert das Gen weiter ins Innere des Zellkerns, bei einer Entwicklung zu einer CD8⁺ T-Zelle (Cytotoxische T-Zelle, bindet an MHC-I gebundene Peptide) wird der Genlokus inaktiv und ist in der Zellkernperipherie zu finden. Ein ähnliches Verhalten ist allerdings für den CD8-Genlokus nicht zu beobachten. Das CD8 Gen ändert seine Position nicht, unabhängig davon ob es in den doppelt positiven Zellen oder in den CD8⁺ T-Zellen transkriptionell aktiv oder in den CD4⁺ T-Zellen transkriptionell inaktiv ist (Kim et al., 2004). Das ist ein Hinweis darauf, dass eine Repositionierung im Zellkern offensichtlich keine nötige Voraussetzung für eine Veränderung der transkriptionellen Aktivität eines Genes ist. Auch andere Arbeiten weisen darauf hin, dass die Positionierung im Zellkern nicht generell mit der transkriptionellen Aktivität einer Sequenz korreliert. So zeigt zum Beispiel der Lokus des Interferon γ (Ifng) in den Zellkernen der T-Zellen eine periphere Lokalisation, unabhängig von seiner Expression, während sich im gleichen Zelltyp für das c-maf Gen sowie für das GATA-3 Gen (beides Regulatoren für T_H2 Cytokine) mit ihrer differenzierungsbedingten transkriptionellen Inaktivierung eine Repositionierung von einer internen Position an die Peripherie des Zellkerns dokumentieren lässt (Hewitt et al., 2004). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit der transkriptionellen Aktivierung des MASH I Gens in neuronalen Zellen auch up- und downstream gelegene, benachbarte Genorte mit ins Innere des Zellkerns wandern, auch wenn diese weiterhin nicht exprimiert werden (Williams et al., 2006). Der aktuelle Artikel von Lanctot et al (2007) bietet einen Überblick über dieses Thema.

Auch unsere Daten sprechen gegen einen generellen Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau von Genen und ihrer nukleären Position. Wir fanden zwar den hoch exprimierten BAC-Pool von Chromosom 12 in beiden Zelltypen signifikant interner im Zellkern lokalisiert als den niedrig exprimierten BAC-Pool desselben Chromosoms. Die Differenzen zwischen den relativen, gemittelten Abständen sind aber gering im Vergleich zu den Experimenten mit den anderen BAC Pools. Und auch diese Verteilung kann wiederum die von der Gendichte abhängige Anordnung des Chromatins im Zellkern widerspiegeln, da sich die Pools in ihrer Gendichte leicht unterscheiden (siehe Tabelle 3.1.4.1). Eine Korrelation zwischen Expression und radialer Anordnung konnten wir nicht feststellen, der Korrelationswert R^2_{adj} lag bei null. Anhand des Gens NAP1L1 konnten wir auch zeigen, dass hoch exprimierte Gene, die in einer genarmen Umgebung eingebettet sind, sich durchaus auch in der nukleären Peripherie aufhalten können. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits für das β -Globin Gen beschrieben, das auf dem peripher im Zellkern gelegenen humanen Chromosom 11 in einer AT-reichen Region lokalisiert ist, die nur in Erythrozyten aktiv wird (Brown et al., 2006). Es passt auch gut zu der Beobachtung, dass bei Nachweis aller

transkriptionell aktiver Loci genauso viel aktive Gene in der Peripherie wie im Inneren der Zellkerne gefunden werden (Wansink et al., 1993; Wei et al., 1998).

Insgesamt muss aber bei allen Studien, die sich mit den verschiedenen Expressionniveaus von Genen beschäftigen, bedacht werden, dass die Expressionsprofile normalerweise auf Mittelwerten mehrerer tausend Zellen beruhen. Man arbeitet sozusagen mit der Aktivität einer „Durchschnittszelle“, die es in Wirklichkeit gar nicht gibt. Auch unsere BAC-Pools wurden auf Basis eines Expressionsprofils, das aus der RNA vieler tausend Zellen erstellt wurde, zusammengesetzt. Analysen der Expressionsprofile einzelner Zellen haben allerdings ergeben, dass sich die transkriptionelle Aktivität einzelner Genloci zwischen Zellen desselben Zelltyps drastisch unterscheiden kann. Woher diese Unterschiede kommen und ob sie vielleicht einen Einfluss auf die variable Anordnung des Chromatins in den verschiedenen Zellen hat, ist bislang noch nicht geklärt (Levsky and Singer, 2003). Auf der anderen Seite wurde in dieser Arbeit mit Pools aus mehreren BAC Klonen gearbeitet und nicht mit spezifischen Sonden für einzelne Gene. Es wurden die mittleren, relativen, radialen Positionen dieser BAC Pools ermittelt, und mit den Positionen anderer BAC Pools verglichen. Zellspezifische Unterschiede in der Expression einzelner, auf den BAC Klonen enthaltener Gene sollten sich daher in unserem „globalen“ Ansatz herausmitteln und so nicht sonderlich ins Gewicht fallen.

Ein gleichzeitiger Nachweis von RNA und der Positionierung entsprechender DNA Sequenzen im Zellkern würde weitere Einblicke in den Zusammenhang zwischen Transkription und Positionierung im Zellkern bringen und wäre die sicherste Methode um das tatsächliche Expressionsverhalten einzelner Gene in den individuellen Kernen zu dokumentieren. Dieser Ansatz ist technisch schwierig, wurde aber bereits für einzelne Gene realisiert (siehe z.B. Bartova and Kozubek, 2006; Clemson et al., 2006; Harnicarova et al., 2006).

Einfluss der Zuordnung zu R- oder G-Banden

Mit der Verteilung von R- und G-Banden im Interphasenuklear haben sich bislang nur wenige Studien beschäftigt. Ferreira et al (1997) und Sadoni et al (1999) beschreiben eine Chromatinverteilung im Zellkern, bei der die G-Banden Domänen hauptsächlich in der Peripherie und an den Nukleoli zu finden sind während R-Banden Domänen im Inneren des Zellkerns verteilt sind. Hier werden die G-Banden den Replikationsfoci mit einer mittleren Replikationszeit gleichgesetzt. Diese Darstellung wird allerdings der heterogenen Zusammensetzung der G-Banden nicht gerecht. Francke et al (1994) unterscheiden nach der Färbungsintensität der Chromosomen vier verschiedene Subtypen von G-Banden, G1-G4, die in den Ideogrammen auch mit verschiedenen Färbungsintensitäten dargestellt werden, von hellgrau (G1) bis schwarz (G4). Es konnte gezeigt werden, dass sich diese Banden deutlich in ihrem GC-Gehalt unterscheiden. Während die G3- und G4-Banden zu den GC ärmsten Regionen im menschlichen Genom gehören, ist der GC-Gehalt der G2- und G1-Banden höher und teilweise mit dem der R-Banden (ohne T-Banden) vergleichbar (Saccone and Bernardi, 2001). Bei einer Hybridisierung von verschiedenen menschlichen Isochoren auf Interphasezellkernen konnten Saccone et al (2002) zeigen, dass lediglich die Proben, die auf den Metaphasechromosomen nur mit den G3- und G4- Banden kohybridisieren vorzugsweise

in der Peripherie (und um die Nukleoli) zu finden sind, während die Fraktionen, die den G2-, G1- sowie den R-Banden entsprechen, sich weiter innen im Zellkern gleichmäßig verteilen. Die extrem GC-reichen R- und T-Banden waren ausschließlich im Zentrum der Nuklei lokalisiert. Passend zu diesen Daten konnten auch Carvalho et al (2001) zeigen, dass die Anwesenheit von intensiv gefärbten G-Banden des Typ 3 und 4 am Centromer eines Chromosoms eine Auswirkung auf dessen Positionierung im Zellkern hat: Chromosomen mit stark gefärbten G3 und/oder G4-Banden in der pericentromerischen Region positionieren ihre Centromere an der Zellkernperipherie, während die Centromere von Chromosomen mit einer weniger intensiv gefärbten pericentromerischen Region bevorzugt an den Nukleoli gefunden wurden und damit weiter innen im Zellkern lagen. Ein weiterer Faktor, der unabhängig davon eine hohe Korrelation mit der Lokalisation eines Centromers an den Nukleoli aufwies, war das Vorhandensein einer NOR Region (nucleoli organising region) auf dem Chromosom. Diese Beobachtungen von Carvalho et al (2001) passen gut zu der von Saccone et al (2002) beschriebenen Verteilung der Bandentypen im Zellkern.

Unsere Ergebnisse zeigen ebenfalls eine unterschiedliche Anordnung von R- und G- Banden BAC Pools der untersuchten Chromosomen in den Zellkernen von menschlichen Lymphozyten und Fibroblasten. Die G-Banden BACs waren zwar im Mittel in einem größeren radialen Abstand zum Mittelpunkt der Nuklei zu finden als die R-Banden BACs, dennoch zeigen unsere Daten keine notwendige Assoziation der G-Banden mit der Zellkernperipherie. Auch bei diesen Versuchen unterschieden sich die einzelnen BAC Pools wieder in ihrer durchschnittlichen lokalen Gendichte, so dass die gefundene Verteilung, auch in Anlehnung an das Model von Saccone et al (2002), wieder die von der Gendichte abhängige Anordnung des Chromatins im Zellkern aufweisen könnte.

Die in dieser Arbeit verwendeten Pools für die G-Banden bestanden alle aus BAC Klonen, die eindeutig zu G-Banden zuzuordnen waren. Da die genauen Grenzen zwischen R- und G-Banden noch nicht bekannt sind und auch der Übergang von dem einen auf den andern Bandentyp auf molekularem Level nicht definiert ist (Furey and Haussler, 2003), wurden hierfür nur BACs ausgewählt, die an einem zentralen Bereich innerhalb einer ausgewählten Bande hybridisieren. Die vier verschiedenen Subtypen der G-Banden wurden bei der Pool-Zusammensetzung allerdings nicht beachtet. In den G-Banden Pools von Chromosom 12 und 18 sind BACs enthalten, die sowohl zu G1-, G2-, G3- wie auch G4-Banden zuzuordnen sind. Da Chromosom 19 nur G-Banden des G1-Subtyps besitzt, war nur hier die Zusammensetzung der BACs einheitlich. Die heterogene Zusammenstellung der Pools bezüglich der G-Subbandentypen kann erklären warum wir keine bevorzugte Anordnung der G-Banden an der Peripherie nachweisen konnten.

Ein weiterer Punkt, der bei unseren Ergebnissen zu beachten ist, ist dass die G-Banden Pools auf Basis der 850 Banden Auflösung definiert wurden. Es wurde aber beschrieben, dass mit zunehmender Länge der mitotischen Chromosomen kleine R-Banden in den großen G-Banden Domänen erscheinen können (Lehrer et al., 2004). Yunis et al (1981) konnten auf Chromosomen in der Prometaphase sogar eine Auflösung von 2000 Banden erreichen. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass einige BAC Klone eventuell Sequenzen enthalten, die bei einer höheren Bandenauflösung zu einer kleinen R-Banden zugeordnet werden können. Wieweit sich diese lokalen Unterschiede im Aufbau des Chromatins auf die

räumliche Anordnung einzelner Sequenzen im Zellkern auswirken ist bislang noch nicht geklärt.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die räumliche Verteilung verschiedener subchromosomaler Segmente mit verschiedenen Eigenschaften im Zellkern untersucht. Die Unterscheidung nach der lokalen Gendichte zeigte dabei den deutlichsten Unterschied in der Verteilung. Die Untersuchung der räumlichen Anordnung von hoch vs. niedrig exprimierten Genen bzw. R- vs. G-Banden zeigte zwar ebenfalls signifikante Unterschiede, diese lassen sich aber auch durch die verschiedenen durchschnittlichen Gendichten der verwendeten BAC-Pools erklären. Eine Korrelationsanalyse der Faktoren mit der radialen Anordnung im Zellkern bestätigte diese Hypothese. Der höchste Korrelationswert R^2_{adj} ergab sich für die mittlere lokale Gendichte der BAC-Pools, ermittelt in einem 10MB Fenster. Diese Ergebnisse gehen konform mit einer aktuellen Studie, in der postuliert wird, dass die Gendichte ein wichtiger Faktor für die radiale, nukleäre Topologie ist und die lokale Gendichte in der Tat einen größeren Einfluss auf die radiale Position eines Segments im Zellkern hat als die Gendichte des gesamten Chromosoms, auf dem es sich befindet (Murmam et al., 2005). Murmam et al (2005) beschreiben das 2 MB Fenster als ideale Größenordnung zur Bestimmung der lokalen Gendichte. In der Tat wurde in dieser Arbeit ein nahezu genauso hoher Korrelationswert für das 2 MB Fenster gefunden wie für das 10 MB Fenster. Welches Auflösungslevel der lokalen Gendichte (also z.B. 2 MB, 5 MB, oder 10 MB Fenster) den direktesten Einfluss auf die radiale Positionierung einer Sequenz hat, und ob das von Segment zu Segment unterschiedlich sein kann, bleibt noch zu klären. Dafür könnten weitere Experimente mit nah benachbarten BAC Klonen, die sich bezüglich der lokalen Gendichte unterscheiden, hilfreich sein.

4.4 Anordnung subchromosomaler Segmente innerhalb der Chromosomenterritorien

Metaphasechromosomen haben eine klare Struktur bezüglich der Anordnung ihrer DNA-Sequenz, ihrer äußeren Form und ihrem Bandenmuster, die in der Literatur bereits ausführlich beschrieben wurde (Review zu diesem Thema: Craig and Bickmore, 1993). Die Organisation von CTs, die in Interphasezellkernen sehr verschiedene, unregelmäßige Formen einnehmen können, ist dagegen bislang noch ein kontroverses Thema (Reviews zu diesem Thema: Cremer et al., 2006a; Cremer et al., 2004b; Williams, 2003).

Positionierung von Genen im Chromosomenterritorium

In einer frühen Arbeit zu diesem Thema wurden aktive Gene an der Oberfläche von CTs gefunden, während nicht codierende Sequenzen im Inneren des CTs nachgewiesen wurden (Chevret et al., 2000; Kurz et al., 1996). Das passte gut zu dem ICD – Modell, das von einem nukleären Kanalsystem ausging, welches sich, ausgehend von den Kernporen, zwischen den CTs im Zellkern erstreckt. In dieser DNA-freien Interchromosom – Domäne halten sich

nukleäre Proteine auf, die für so wichtige Vorgänge wie z.B. Transkription, Splicing, DNA-Reparatur oder auch Replikation benötigt werden. Zusätzlich ermöglicht sie den gerichteten Transport von prozessierter RNA durch die Kernporen aus dem Zellkern (Cremer et al., 1993; Zirbel et al., 1993). Es wurde angenommen, dass transkriptionell aktive Gene an der Oberfläche der CTs liegen müssen, während das Innere der Territorien für die Kernproteine unzugänglich ist. Passend zu diesem Modell konnten Dietzel et al (1999) zeigen, dass die Lage bestimmter Gene von ihrer Aktivität abhängt. So wurde das X-chromosomale ANT2 Gen (Xq24-25, wird mit der X-Inaktivierung ausgeschaltet) im CT des aktiven X Chromosoms an der Oberfläche gefunden, während es beim inaktiven X-Chromosom weiter im Inneren des Territoriums gefunden wurde. In einer Arbeit, in der naszente, mit BrdU markierte RNA zusammen mit Chromosomenpaint Sonden dargestellt wurde, konnte allerdings nachgewiesen werden, dass RNA-Transkripte über das ganze CT #19 sowie über das ganze CT des aktiven X-Chromosoms verteilt gefunden werden konnten (Verschure et al., 1999). Zusätzlich wurde in einer Elektronenmikroskopie Studie gezeigt, dass sich der DNA-freie Raum nicht nur zwischen den CTs erstreckt, sondern auch Kanäle durch die CTs hindurch laufen (Visser et al., 2000). Diese Beobachtungen führten unter anderem zur Entwicklung des CT-IC Modells, demnach die einzelnen CTs von einem Netz aus Kanälen des Interchromatin Compartments durchzogen werden und so eine schwammartige Struktur aufweisen. Am Übergang zwischen dem IC und subchromosomalen Domänen, der sogenannten Perichromatin Region (PR) finden alle relevanten nukleären Vorgänge wie Transkription, Splicing, Reparatur oder auch Replikation statt (Fakan, 2004a). Nach diesem Modell können aktive Gene also nicht nur an der Oberfläche sondern auch im Inneren der CTs liegen, solange sie Zugang zum IC bzw. zur PR haben (Reviews zu diesem Modell: Cremer et al., 2004a; Cremer and Cremer, 2001a).

Die Ergebnisse dieser Arbeit passen gut zu diesem Modell. Die BAC-Klone aller verwendeten Pools waren gleichmäßig in den CTs verteilt, es konnten mittels Abstandsmessungen zur CT-Oberfläche keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung zwischen genreichen und genarmen BAC-Klonen, hoch und niedrig exprimierten BAC-Klonen bzw. R- und G-Banden BAC-Klonen innerhalb der CTs gefunden werden. Unsere Daten sprechen dagegen, dass die Oberfläche der CTs ein besonderer Reaktionsraum für besonders gendichte bzw. transkriptionell hoch aktive Sequenzen ist, Transkription kann offensichtlich auch im Inneren der CTs stattfinden. Das geht konform mit einer Studie von Mahy et al, in der ebenfalls nachgewiesen werden konnte, dass aktive Gene auch im Inneren der CTs positioniert sein können (2002b).

Ein Widerspruch bildet sich allerdings mit einer Studie von Tajbakhsh et al (2000), die beschreibt, dass die AT-reichsten Fraktionen des menschlichen Genoms, die Isochore L1 und L2, tendenziell häufiger im Inneren der CTs zu finden waren, als die GC-reichste Fraktion, das Isochor H3, welches gleichmäßig über das Volumen der CTs verteilt lag. Die in dieser Studie veröffentlichten Bilder zeigen zwar das typische polare Verteilungsmuster, welches auch in dieser Arbeit für CTs beschrieben werden konnte (siehe Abschnitt 3.5.3): die H3-Fraktion liegt deutlich nur in der dem Zellkernmittelpunkt zugewandten Seite des CTs. Damit gehen die Daten von Tajbakhsh et al (2000) auch konform mit den Ergebnissen der Studie von Saccone et al (2002), in der für die H3-Fraktion eine interne und für die L1 Fraktion eine

periphere Position im Zellkern nachgewiesen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar dieselbe radiale Verteilung im Zellkern festgestellt werden, es wurde aber kein Unterschied in der Anordnung von besonders genreichen und genarmen Segmenten des menschlichen Chromosoms #12 bezüglich der Oberfläche der Territorien gefunden. Tajbakhsh et al (2000) dagegen finden die AT-reiche L1 Fraktion, die genarmen Chromatinabschnitten gleichgesetzt wird (Bernardi, 1995; Saccone and Bernardi, 2001), häufiger intern lokalisiert als an der Oberfläche der CTs liegend. Dies mag allerdings an der von Tajbakhsh et al verwendeten Auswertungsmethode liegen, die lediglich die Intensitätsschwerpunkte der relativ großen Signalfoci berücksichtigt, nicht aber ihre gesamten Volumina. Desweiteren werden die Territorien einem automatisch generierten Schwellenwert unterzogen, der zu deutlich sichtbaren Veränderungen an der CT Struktur führt. Durch diese Vorgänge werden die Daten artifiziell so stark beeinträchtigt, dass eine objektive Auswertung nicht mehr gewährleistet ist.

Das Phänomen des „Looping Out“

In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass extrem genreiche und hoch aktive Gencluster dazu neigen, aus ihren Territorien herauszuragen. Dieses Phänomen wird als „looping out“ bezeichnet. Einzelne Gene konnten dabei in Abständen von mehr als 2µm von der Oberfläche ihres CTs im Zellkern lokalisiert werden (c-myc: Bartova and Kozubek, 2006; Hoxgene: Chambeyron et al., 2005; Region 11p15.5: Mahy et al., 2002a; MHC: Volpi et al., 2000; EDC: Williams et al., 2002). In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit den verschiedenen BAC-Pools konnten wir dieses Phänomen nicht beobachten. In den von uns untersuchten CTs #12, #18 und #19 wurde der Hauptteil aller BAC-Signale, ganz egal von welchem Pool sie stammten, im Inneren der CTs gefunden. Nur etwa 8-10% der Signale lagen pro Experiment außerhalb der segmentierten Oberfläche des CTs, und auch hier waren die maximalen Abstände kleiner als 1µm. Es ist auch zweifelhaft, ob diese Abstände nicht artifiziell sind. Zum einen muss bedacht werden, dass die Suppression der repetitiven Sequenzen während der Hybridisierung eine inkomplette Darstellung des CTs zur Folge hat. Alleine die gleichmäßig verteilten interspersed elements (siehe Tabellen 3.1.1.1 – 3.1.1.3, Chromosomeneigenschaften) nehmen insgesamt etwa 40% des menschlichen Genoms ein (Waterston et al., 2002). Das humane Chromosom 19 besteht beispielsweise zu 25% aus Alu-Sequenzen (Grimwood et al., 2004), die mit der chromosomalen Paint-Sonde nicht nachgewiesen werden können. Des Weiteren spielt natürlich auch die Hybridisierungsqualität eine Rolle, da mit einem steigenden Hintergrundsignal auch eine starke Bildbearbeitung einhergeht, was einen höheren Schwellenwert und damit eine artifizielle Verkleinerung des eigentlich angefärbten CTs zur Folge hat. Wegen diesem Thresholdproblem sind absolute Abstandsmessungen prinzipiell problematisch. Daher wurden in dieser Arbeit hauptsächlich vergleichende Messungen an voneinander unabhängigen Sonden durchgeführt um aussagekräftigere Ergebnisse präsentieren zu können. Die in dieser Arbeit im geringen Abstand außerhalb des CTs gefundenen BAC-Signale der Chromosomen 12, 18 und 19 wurden aufgrund der eben diskutierten Fakten nicht als „looping out“ definiert.

Um die Struktur eines ausloopenden Chromatinabschnitts näher zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe eines 2,3 Mb umfassenden BAC-Contigs die sehr genreiche und hoch

exprimierte Region 11p15.5 untersucht. Diese direkt an das p-Telomer anschließende R-Bande des humanen Chromosoms 11 wurde ausgewählt, da bereits einzelne Cosmide und PACs aus diesem Chromosomenabschnitt in einem Abstand von mindestens 1,5 μ m zur Oberfläche des CTs gefunden wurden (Gilbert et al., 2004; Mahy et al., 2002a).

Wir konnten bestätigen, dass diese Region häufig aus den CTs herausragt. Unsere Daten zeigen, dass die aus dem Territorium ausloopende Struktur sehr kompakt ist und offensichtlich nicht aus dünnen DNA-Fibern auf dem Niveau der Solenoidstruktur (30nm Fiber, 30-40fache Kompaktierung der DNA) beruht. Das Solenoid wird allerdings als die DNA-Konformation angesehen, in der transkriptionell aktive Sequenzen im Zellkern vorliegen (Gilbert et al., 2005). Geht man davon aus, dass das haploide menschliche Genom mit seinen 3000Mb einen ausgestreckten DNA-Faden von 1m Länge ergeben würde, müsste man für das in diesem Versuch verwendete Contig (2340kb) eine Länge von 780 μ m erwarten, falls die DNA linear vorliegen würde. Der maximale Abstand zwischen den Intensitätsschwerpunkten des telomernahen und des centromernahen BACs, der mittels der Software ImageJ gemessen werden konnte, lag bei etwa 3 μ m, was einen Kompaktionsfaktor der DNA von mindestens 260 impliziert. Das ist deutlich höher als von Gilbert et al (2004; 2005) für eine offene, für die Transkription zugängliche Struktur der Chromatinfiber erwartet wurde.

Die Funktion des looping out aus einem Chromosomenterritorium bleibt noch umstritten. Während Mahy et al (2002a) vorschlugen, dass dieses Phänomen unter genreichen, transkriptionell aktiven Segmenten weit verbreitet zu sein scheint, konnten wir es beispielsweise nicht für die sehr genreichen Abschnitte des humanen Chromosoms 12 nachweisen. Dies scheint also kein allgemein gültiges Prinzip zu sein. Die von Gilbert et al (2004) gefundene, offene Konformation der häufig ausloopenden Chromatinsegmente scheint ebenfalls nicht spezifisch für dieses Phänomen zu sein, da für die nicht ausloopenden, genreichen Segmente des humanen Chromosoms 12 dieselbe offene Konformation festgestellt werden konnte. Auch ist noch nicht geklärt, ob die loops zielgerichtet aus dem Territorium ragen – um z.B. in Kontakt zu treten mit bestimmten nukleären Strukturen wie SC35 Domänen (Ansammlung von metabolischen Faktoren für mRNA, Review zu diesem Thema: Moen et al., 1995), wie das bereits für einige aktive Gene und Regionen nachgewiesen werden konnte (Moen et al., 2004; Shopland et al., 2003), oder um sich beispielsweise mit anderen aktiven Genen desselben oder benachbarter Chromosomen aus regulativen Gründen zu einem Cluster zusammenzulagern ("Kissing Phänomen", siehe Kioussis, 2005). Das in dieser Arbeit verwendete BAC Contig für die Region 11p15.5 wurde nicht in allen untersuchten Territorien außerhalb der segmentierten Oberfläche gefunden. In den Zellkernen der humanen Fibroblasten zeigten immerhin 29,6% der CTs ein internes Signal, bei den humanen Lymphozyten waren es sogar 39% der analysierten CTs. Des Weiteren verhielten sich auch die beiden homologen CTs eines Zellkerns nicht immer gleich: in 22% der Fibroblastenkerne loopte die Region 11p15.5 nur in einem der beiden CTs aus, bei den humanen Lymphozyten zeigten 26% der Zellkerne diese heterogene Anordnung. Wir konnten für die ausloopenden Contigs eine hohe Variabilität in den Abständen zur Oberfläche der CTs sowie in der Struktur nachweisen (siehe Abbildung 3.5.5.2). Das alles spricht eher gegen ein zielstrebiges Ausloopen der Region sondern macht mehr den Eindruck eines im

Nukleoplasma diffundierenden, dynamischen Segments. Auch wenn gezeigt wurde, dass die gesamte Anordnung des Chromatins im Zellkern während einer Interphase (mit Ausnahme der frühen G1 Phase) weitgehend stabil bleibt (Walter et al., 2003; Zink et al., 1998), konnten Chubb et al (2002) doch nachweisen, dass Chromatinabschnitte in Zellkernen von Säugetieren im Rahmen bestimmter Grenzen frei diffundieren können. Die Vorstellung liegt nahe, dass die in den Interchromatin Space hineinloopende Chromatinsegmente eine größere Bewegungsfreiheit im Zellkern aufweisen, als Genloci, die sich im Inneren der CTs befinden (Williams, 2003). Wenn das Ausloopen nicht zielgerichtet ist, könnte es auch sein, dass dieses Phänomen die Funktion hat die ausgeloopte DNA vom Einfluss des benachbarten Chromatin zu isolieren. Die Basis der Loops könnte in diesem Fall als Insulator Element fungieren (Chambeyron and Bickmore, 2004b).

Der Zusammenhang zwischen dem Ausloopen eines Segments und seiner Transkription ist ein kontroverses Thema. Es wurde vorgeschlagen, dass dieses Phänomen eine direkte Folge der hohen transkriptionellen Aktivität der betroffenen Gencluster ist (Chambeyron and Bickmore, 2004a; Mahy et al., 2002a). Für den β -Globin Locus konnte allerdings beobachtet werden, dass das Looping bereits vor der transkriptionellen Aktivierung des Gens stattfindet. So ist das Ausloopen bestimmter Regionen offensichtlich keine Konsequenz der Transkription dieses Segments an sich, sondern deutet vielmehr auf eine potentiell mögliche Expression der enthaltenen Gene hin (Ragoczy et al., 2003). Der Nachweis, dass die Positionierung von bestimmten Genen bezüglich der Oberfläche ihres CTs nicht immer von ihrer Expression abhängt, bestätigte diese Annahme. So wurde das inaktive Gen *Fgfr2* trotz der fehlenden Expression in noch 19% der untersuchten murinen Zellkernen außerhalb seines CTs gefunden, und das tatsächlich nur in 29% der analysierten Zellen aktive Gen *Uros* wurde dennoch in 79% der Kerne in einer ausgeloopten Position gefunden (Osborne et al., 2004).

Beim β -Globin Gen scheint die LCR (locus control region) das Ausloopen zu kontrollieren. In mutierten Zelllinien, in denen die LCR deletiert ist, wurde der Genlocus an der Oberfläche des CTs gefunden, hier konnte kein Ausloopen beobachtet werden. Wurde die β -Globin LCR durch die ektopische LCR des *IgH* Locus (aus B-Zellen) ausgetauscht, konnte wieder beobachtet werden, dass die das β -Globin Gen enthaltene Region aus dem CT herausragt – diesmal scheint sie aber gezielt in die Nähe von pericentromerischen Heterochromatin gebracht zu werden (Ragoczy et al., 2003). In diesem Fall scheint das Looping eher einen repressiven Einfluss auf die betroffene Region zu nehmen. Ein ähnliches Phänomen konnte in dieser Arbeit bei der Analyse der räumlichen Anordnung genarmer und genreicher Abschnitte des CT #19 in den Zellkernen von humanen Lymphozyten und Fibroblasten beobachtet werden. Das durchgehend genreiche humane Chromosom 19 enthält nur eine, das Centromer umspannende genarme Region (19p12-19q12), die mittels eines Pools von 19 BAC Klonen nachgewiesen wurde. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Segment deutlich peripherer im Zellkern angeordnet ist, als der Rest des zentral gelegenen Territoriums. Das Centromer scheint regelrecht aus dem CT herauszuloopen und sich in Richtung des Zellkernrandes zu erstrecken (siehe Abbildung 3.4.2.3). Auch das könnte eine repressive Wirkung auf die wenigen, in der centromerumspannenden Region enthaltenen Gene haben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Phänomen des Looping out kein für alle besonders genreichen Chromatinabschnitte gültiges Prinzip ist, sondern eher eine, für

besondere Gencluster geltende Ausnahme darstellt. Die hier diskutierten Ergebnisse sprechen gegen eine einfache Korrelation einer erhöhten Transkription einer genreichen Sequenz und ihrem Ausloopen aus dem CT. Das Phänomen scheint vielmehr eine Vielzahl an Auswirkungen haben zu können, und spielt wohl eine wichtige Rolle in der Feinregulierung der transkriptionellen Aktivierung oder Repression ausgewählter Genloci in verschiedenen Zelltypen (Review zu diesem Thema: Kosak and Groudine, 2004).

Die Vermischung von benachbarten Chromosomenterritorien

Mit der Beobachtung der aus ihren Territorien ausloopenden Gene (siehe vorheriger Abschnitt) stellte sich die Frage, inwiefern dieses Phänomen zu Vermischungen zwischen CTs führen kann. Im CT-IC Modell (siehe Abschnitt 1.1.3.4) wurde davon ausgegangen, dass CTs distinkte, durch die Interchromatin Domäne voneinander abgegrenzte Räume im Zellkern einnehmen (Cremer and Cremer, 2001a), eine Überlappung von benachbarten CTs wurde zunächst ausgeschlossen. Die Arbeitsgruppe von Wendy Bickmore, die sich intensiv mit der ausloopenden Region 11p15.5 beschäftigte (Mahy et al., 2002a; Mahy et al., 2002b), schlug in einem Übersichtsartikel vor, dass besonders gendichte Sequenzen während ihrer hoch aktiven Transkription aus dem Territorium in Form von dünnen DNA-loops herausragen können und sich so auch mit anderen, ebenfalls aus Territorien ausloopenden Chromatinabschnitten benachbarter CTs vermischen können. Sie postulierte, dass die Organisation von Chromatin im Zellkern vielleicht eine Mischung aus dem CT-IC Modell mit seinen diskreten Territorien und der kompletten Dekondensierung der mitotischen Chromosomen zu sich vermischenden Chromatinfibern, wie es noch vor 30 Jahren angenommen wurde, sei (Chubb and Bickmore, 2003). Doch gegen diese Vorstellung sprechen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an der gesamten Region 11p15.5 mit einem 2,35Mb abdeckenden BAC-Contig. Wie bereits im vorherigen Abschnitt ausführlich diskutiert wurde, zeigte das ausloopende Segment eine kompakte, fingerartige Struktur auf, deren Kompaktierungsfaktor weit über dem der postulierten 30nm Fiber lag. Auch wenn bislang noch nicht überprüft wurde, ob die Chromatinstruktur, die für diesen Abschnitt beobachtet wurde, auch typisch für andere ausloopende Regionen ist, gehen wir aufgrund unserer Beobachtungen davon aus, dass sich ausloopende Segmente benachbarter CTs zwar im IC treffen, sich aber nicht überlappen oder vermischen, da die kompakte Form der „loops“ ein solches Verhalten gar nicht zulassen würde (siehe auch Cremer et al., 2004b). Dennoch blieb die Frage offen, ob ausloopende Segmente vielleicht in benachbarte CTs eindringen oder diese sogar durchdringen können. Des Weiteren konnte in Versuchen gezeigt werden, dass benachbarte CTs durchaus auch direkt aneinander anschließen können (Albiez et al., 2006). Doch ob es an solchen „Übergängen“ zu Überlappungen des Chromatins kommt und wenn ja, in welchem Ausmass, war ebenfalls noch nicht geklärt. Um diese Fragen zu beantworten, wurde ein 5-Farben FISH Experiment durchgeführt, indem die CTs #11 und #12 sowie das BAC Contig für die Region 11p15.5 und der BAC Pool für die hoch exprimierten Gene von HSA12 simultan nachgewiesen wurden (siehe Abschnitt 3.5.6). Es wurden nur Zellkerne untersucht, in denen die heterologen CTs in direkter Nachbarschaft zueinander lagen. Wie die quantitative Auswertung zeigt, kommt es tatsächlich zu Vermischungen der CTs. Material von CT #11 sowie von der Region 11p15.5 konnten bis zu 1,2µm in das Territorium von CT

#12 vordringen. Umgekehrt wurde das gleiche Ergebnis für die CTs #12 gefunden, auch im CT #11 wurde Material von CT #12 sowie des dazugehörigen BAC Pools in einem maximalen Abstand von 1,2 μm zur Oberfläche gefunden. Da aber nur geringe DNA-Mengen soweit im Inneren des benachbarten CTs gefunden wurde, kann man, passend zum CT-IC Modell, davon ausgehen, dass es sich hierbei um vereinzelte, ausloopende Segmente der Territorien handelt, die sich, einem Kanal des IC folgend, in das benachbarte CT erstrecken (siehe auch Abbildung 1.1.3.4 A). Der Großteil des sich vermischenden Materials zweier benachbarter CTs wurde direkt an der Oberfläche des CTs in einem Abstand von nur 175nm gefunden. Doch die Ergebnisse dieser quantitativen Evaluierung mit der eADS Software sind mit sehr viel Vorsicht zu betrachten. Zum einen liegt der Abstand von 175nm weit unter den Auflösungsgrenzen des konfokalen Mikroskops (xy-Richtung 200-300nm, z-Richtung 600nm). Die vorliegenden Daten konnten auch nicht zufriedenstellend dekonvolviert werden, da der verwendete z-Abstand der einzelnen Sektionen bei der Aufnahme für diesen Vorgang zu groß gewählt wurde (325nm). Des Weiteren wurden die Aufnahmen von Hand bearbeitet und als Vorbereitung für die Auswertung ein subjektiver Intensitäts-Schwellenwert festgelegt. Schon kleinere Änderungen in diesem Schwellenwert können die Ausmaße des segmentierten Referenz-CTs vergrößern bzw. verkleinern und so in dieser Auswertung ein anderes Ergebnis liefern. Letzlich sollte auch bedacht werden, dass mit der FISH Prozedur an sich die Chromatinanordnung im Kern artifiziell verändert wird. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass mit der 3D Fixierung mittels 4% Paraformaldehyd Chromatinstrukturen bis zur Ebene der 1Mb Domänen bewahrt werden (Heppenger et al., 2006; Solovei et al., 2002), zerstört die benötigte Hitzedenaturierung nachweislich die Ultrastruktur der DNA (Solovei et al., 2002). So kann das Ausmaß der Überlagerung von Chromatin an den Grenzen von CTs mit 3D FISH Experimenten am konfokalen Laser Scanning Mikroskop wohl nicht eindeutig bestimmt werden.

Zu völlig anderen Ergebnissen bezüglich der Vermischung von CTs kam eine andere, aktuelle Studie (Branco and Pombo, 2006). Hier wurden FISH Experimente mit chromosomalen Sonden auf ultradünnen Gefrierschnitten (z-Richtung: 150nm Durchmesser) durchgeführt („Cryo-FISH“). Die Autoren postulieren aufgrund ihrer Beobachtungen, dass sich bis zu 41% eines Territoriums mit dem restlichen Genom vermischen kann. Infolge dessen lehnen sie die Existenz einer Interchromatin Domäne, wie sie das CT-IC Modell vorschlägt, ab. Doch auch diese Ergebnisse müssen sehr kritisch betrachtet werden. Auch wenn sich die Auflösung des Lichtmikroskops in z-Richtung aufgrund der dünnen Schnitte deutlich verbessert (Schnittdicke = Auflösung = 150nm), ist die Auflösung in xy-Richtung immer noch limitiert, sie bleibt bei 200-300nm. Bei Betrachtung der Abbildungen fällt ebenfalls auf, dass weder ein passender Intensitäts-Schwellenwert bestimmt wurde, noch alternativ eine Dekonvolution der Daten durchgeführt wurde. Die Signale zeigen eine deutliche Unschärfe, die wohl von Streulicht verursacht wird. Dieses nicht beachtete Streulicht verfälscht die Auswertung, es vergrößert artifiziell die CTs und führt damit zu einem höheren Prozentsatz an sich vermischenden Chromatins.

Aufgrund der dünnen Schnitte gehen die Autoren auch davon aus, dass es zu keiner Überlagerung von Signalen in z-Richtung kommen kann. Überlagerungen der Farbkanäle wurden daher als tatsächliche Vermischung feiner Fibern des Chromatinmaterials angesehen.

Doch auch wenn die maximal gemessene Größe der 1Mb Domänen bei etwa 500nm liegt (Albiez et al., 2006; Koberna et al., 2005) spricht nichts dagegen, dass in einem Gefrierschnitt von nur 150nm Dicke zwei jeweils unvollständige, angeschnittene 1Mb Domänen direkt übereinander liegen und damit eine Mischfarbe erzeugen (Albiez et al., 2006).

Um eine noch bessere Auflösung zu erreichen führten die Autoren mit denselben Schnitten Untersuchungen am Elektronenmikroskop durch. Dafür wurden die bereits am Lichtmikroskop dokumentierten Präparate mit Gold gekoppelten Antikörper behandelt, die die zur FISH Detektion verwendeten Fluorochrome (Fitsc und Rhodamin) binden. Um die verschiedenen chromosomalen Sonden in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen identifizieren zu können, wurden für die verschiedenen Fluorochrome Goldkonjugate mit unterschiedlichen Größen verwendet (5nm und 10nm). Doch in diesem Experiment fehlt eine quantitative Auswertung vollständig. In der Veröffentlichung wird lediglich eine Abbildung gezeigt, auf der eine Vermischung der chromosomalen Sonden zu erkennen ist. Auch auf einen möglichen Hintergrund, den die Gold konjugierten Antikörper verursachen könnten, wird nicht eingegangen. Interessanterweise sind auf den am Elektronenmikroskop erstellten Aufnahmen deutlich DNA-freie Räume zu beobachten, die in der Veröffentlichung nicht behandelt werden. Das könnten die Kanäle der vom CT-IC Modell postulierten Interchromatindomäne sein, die von den Autoren abgelehnt wird.

Letztendlich bleibt es bislang ungeklärt, in wieweit benachbarte CTs miteinander überlappen und dabei ihr Chromatin vermischen (für einen Übersichtsartikel siehe Aten and Kanaar, 2006). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass einzelne, aus einem CT herausragende chromosomale Segmente offensichtlich weit in die Fläche benachbarter CTs hineinragen können. Nebeneinander positionierte CTs können in direktem Kontakt miteinander stehen und so ein durchgängiges 3D Chromatin Netzwerk im Zellkern bilden, das vom Kanalsystem der Interchromatin Domäne durchzogen wird (Albiez et al., 2006).

Die polare Organisation der Chromosomenterritorien

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die im vorherigen Abschnitt (4.3) beschriebene von der Gendichte abhängige Anordnung des Chromatins im Zellkern sich auch in den CTs erkennen lässt: wir konnten bei Betrachtung mit dem Auge eine deutlich polare Anordnung der verschiedenen komplementären BAC-Pools in den Territorien beobachten. Diese Polarität war am deutlichsten bei dem über die Gendichte definierten BAC-Pool ausgeprägt, hier lagen die BAC Klone des genreichen Pools bevorzugt in der dem Mittelpunkt des Zellkerns zugewandten Hälfte des CTs, während sich die BAC Klone des genarmen Pools oft in den Abschnitten der Territorien befanden, die sich zur Zellkernperipherie hin orientieren. Aber auch in den Experimenten mit den R-/G-Pools bzw. den über die Expression definierten Pools konnten CTs gefunden werden, die alleine durch Betrachtung mit dem Auge eine deutliche polare Anordnung erkennen ließen (siehe Abbildung 3.5.3). Diese von uns beobachtete Polarität der CTs konnte bereits früher im Bezug auf andere Chromatineigenschaften nachgewiesen werden. So konnte z.B. mittels einer doppelten Replikationsmarkierung in Kombination mit 3D-FISH gezeigt werden, dass sich früh replizierendes Material der menschlichen Chromosomen 13 und 15 zum Zellkernmittelpunkt hin orientiert, während die spät replizierende Segmente in der der Zellkernperipherie zugewandten Hälfte der Territorien

zu finden sind (Zink et al., 1999). Saccone et al (2002) konnten zeigen, dass CTs auch bezüglich des GC-Gehaltes eine Polarität aufweisen: GC-arme Sequenzen liegen in dem der Zellkernperipherie zugewandten Seite der CTs, während die GC-reichen Abschnitte weiter ins Innere der Kerne hineinragen. Da ein hoher GC-Gehalt und eine frühe Replikationszeit in der S-Phase mit einer hohen Gendichte korreliert (Caron et al., 2001; Versteeg et al., 2003; Woodfine et al., 2004), gehen diese Studien mit unseren Beobachtungen konform.

In dieser Arbeit wurde versucht, die mit dem Auge beobachtbare Polarität der CTs mittels verschiedener Abstandsmessungen zwischen den einzelnen BAC-Klonen der verschiedenen Pools quantitativ darzustellen. Dazu wurden, wie in Abschnitt 3.5.3 ausführlich dargestellt, die Distanzen zwischen allen BACs eines Pools (z.B. R-BAC – R-BAC bzw. G-BAC – G-BAC) gemessen, sowie alle Abstände zwischen den BAC Klonen der miteinander korrespondierenden Pools (z.B.: R-BAC – G-BAC). Diese Messungen wurden zum einen zwischen den Intensitätsschwerpunkten der BAC Klone, sowie in einer voxelbasierten Art und Weise durchgeführt. Es wurde erwartet kleinere R-R bzw. G-G Abstände zu finden als R-G Abstände. Diese Erwartung konnte nicht bestätigt werden. Das lag wohl an der hohen Flexibilität in der Struktur der Chromosomenterritorien. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass p- und q- Arme der Metaphasenchromosomen auch in den CTs distinkte Domänen einnehmen (Dietzel et al., 1998), und angenommen wird, dass das Chromatin in den CTs nur etwa fünfmal weniger stark kondensiert vorliegt als in Metaphasenchromosomen (Manders et al., 2003), sprechen unsere Ergebnisse doch gegen die Annahme, dass die Struktur der Metaphasenchromosomen in den CTs der Interphase in etwa erhalten bleibt und die Dekondensierung am Anfang der G1-Phase sich nur auf die Breite, nicht aber auf die Höhe der CTs auswirkt (Claussen, 2005; Lemke et al., 2002; Weise et al., 2002). Mit einer Erweiterung der 3C Methode (chromosome conformation capture, Dekker et al., 2002) konnten erst kürzlich weitere Beweise für die hohe Plastizität der CTs erbracht werden (Simonis et al., 2006; Wurtele and Verreault, 2006; Zhao et al., 2006). Die sogenannte 4C Methode (chromosome conformation capture-on-chip: Simonis et al., 2006; bzw. circular chromosome conformation capture: Zhao et al., 2006) ermöglicht eine genom-weite Identifizierung von Sequenzen, die im Interphasezellkern mit einem bestimmten Genlokus assoziieren. So konnte gezeigt werden, dass z.B. mit dem HoxB1 Genlokus nicht nur Sequenzen der unmittelbaren Nachbarschaft interagieren, sondern auch die Assoziierung von weit entfernten, distalen intra- und inter-chromosomalen Chromosomenabschnitten nachgewiesen werden, was die hohe Verformbarkeit der CTs deutlich macht (Wurtele and Verreault, 2006). Dementsprechend konnte auch Simonis et al (2006) nachweisen, dass einige der mit dem murinen β -Globin Lokus in cis interagierenden Sequenzen viele Mb entfernt auf dem Chromosom MMU7 liegen können. Auch die von uns aufgenommenen Daten zeigen eine hohe Plastizität der CTs, deren Topographie sich deutlich von der der Metaphasenchromosomen unterscheidet. So sind auch Strukturen von Territorien beobachtbar in denen die R-G Abstände kleiner oder gleich den R-R/G-G Abständen sind. Die Abbildung 3.5.5.2.3 zeigt Beispiele für solche Arrangements. So bleibt die einzige Methode, mit denen die Polarität der CTs bislang nachgewiesen werden kann, die Analyse der radialen Verteilung der BAC-Pools innerhalb der Zellkerne.

MBCs

Bei Betrachtung der in 3D-FISH Experimenten durch Paint-Sonden detektierten CTs fallen Bereiche auf, die sich durch ihre intensivere Färbung deutlich vom restlichen Territorium abheben. Diese meist intern liegenden, stark gefärbten Bereiche wurden in dieser Arbeit als Maximum Brightness Centers (MBCs) der CTs definiert. Aufgrund ihrer kompakten Struktur wurde angenommen, dass es sich bei ihnen um heterochromatisierte DNA-Abschnitte handelt. Dieser Zusammenhang konnte mittels simultanen Immunfärbungen mit Antikörpern gegen spezielle posttranslationelle Histonmodifikationen (siehe Abschnitt 1.2.2.2) bestätigt werden. Diese Modifikationen der Histonproteine können die Chromatinstruktur beeinflussen, dies geschieht wahrscheinlich durch die Rekrutierung DNA-bindender Proteine bzw. Proteinkomplexe (Reviews zu diesem Thema: Craig, 2005; Gilbert and Ramsahoye, 2005; Peters et al., 2003). In dieser Arbeit wurde der Gehalt bestimmter methylierter N-terminaler Lysinreste (K) des Histons H3 in den MBCs bestimmt. Die Antikörper gegen trimethyliertes H3K27, ein Marker der mit fakultativen Heterochromatin assoziiert wird (Cao et al., 2002; Chadwick and Willard, 2004; Gilbert et al., 2003), und gegen trimethyliertes H3K9, welches in konstitutivem Heterochromatin gefunden wird (Lachner et al., 2003; Peters et al., 2003) kolokalisierten mit dem Großteil des MBC Materials (53% bzw. 33%). Trimethyliertes H3K4, der Marker für Euchromatin (Bernstein et al., 2005; Lachner et al., 2003) war dagegen nur in 16% des MBC Materials zu finden. Dass die aufsummierten Prozentzahlen ein wenig mehr als 100% ergeben lässt sich durch die minimale Überlappung der Histonmodifikationen erklären (Zinner et al., 2005). Diese Analyse zeigt bei einem Vergleich mit einer aktuellen Studie (Zinner et al., 2007), dass die MBCs unverhältnismäßig viel Heterochromatin beinhalten. Hier wurde u. A. die Kolokalisation der chromosomalen Sonden von HSA 18 und 19 mit den Antikörpern gegen die Histonmethylierungen triH3K9, triH3K27 und triH3K4 dokumentiert. Es wurde gezeigt, dass im Schnitt etwa 30% der chromosomalen Sonde von HSA 18 und 19 mit dem Antikörper von triH3K9 kolokalisiert. Diese Regionen können weder der pericentromerischen Region noch anderen Anreicherungen von repetitiven Sequenzen entsprechen, da diese Abschnitte der chromosomalen Sonde während der FISH Prozedur mit C₀t-1 DNA suppremiert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Experimente von Brinkman et al (2006), der den Marker für konstitutives Heterochromatin auch in kodierenden Sequenzen auf Autosomen nachgewiesen hat. Bezüglich der Methylierung triH3K9 zeigen die untersuchten MBCs offensichtlich einen normalen Anteil, auch ihr Material kolokalisierte zu etwa 30% mit dem spezifischen Antikörper. Die tri-Methylierung von H3K27 dagegen ist in den MBCs deutlich überpräsentiert. Während nur 10% der chromosomalen Sonden von HSA 18 und 19 mit Antikörpern gegen diese Histonmodifikation kolokalisierten (Zinner et al., 2007), waren es bei den MBCs 53% ihres Materials. Dieser Marker wird mit fakultativen Heterochromatin in Zusammenhang gebracht, da er zum Beispiel in großen Mengen im Territorium des inaktiven X-Chromosoms zu finden ist (66% Kolokalisation, Zinner et al., 2007). Er konnte aber auch an den Genorten einiger weniger autosomaler Gene, wie das Cluster der Hox Gene nachgewiesen werden (Cao et al., 2005; Cao et al., 2002), sowie bei Genen, die dem Imprinting unterliegen (Delaval and Feil, 2004). Der Anteil einer chromosomalen Sonde, der mit Antikörpern gegen trimethyliertes H3K4 kolokalisiert, hängt, wie Zinner et al (2007) zeigen konnte, stark vom Chromosom ab. Während 40% des Materials

des genreichen und transkriptionell hoch aktiven HSA 19 eine Kolokalisation mit dieser Histonmodifikation für Euchromatin zeigten, waren es beim genarmen und insgesamt transkriptionell ziemlich inaktiven HSA 18 nur 10%. Die MBCs lagen mit etwa 16% Kolokalisation in einem guten Mittelmaß, wie es für das Chromosom 12 ebenfalls zu erwarten ist. Die eben angestellten Vergleiche können allerdings nur als Anhaltspunkte dienen, da die genaue Verteilung der untersuchten Histonmodifikationen in HSA 12 nicht bekannt ist.

Bei der Analyse der Abstände der verschiedenen BAC-Pools zur Oberfläche der MBCs konnte für die von der Gendichte abhängigen BAC-Pools ein signifikanter Unterschied gefunden werden, hier waren die genarmen BAC Klone näher mit den MBCs assoziiert als die genreichen BAC Klone. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die MBCs zum größten Teil aus Heterochromatin bestehen, war dieses Ergebnis zu erwarten. Die genarmen Segmente der humanen Chromosomen enthalten mehr gewebsspezifische Gene, die in den meisten Geweben zum fakultativen Heterochromatin beitragen (Craig and Bickmore, 1993).

Für die von der Expression abhängigen BAC-Pools konnte kein Unterschied gefunden werden, ihre Verteilungskurven sind einander in allen Experimenten sehr ähnlich (siehe Anhang, Abschnitt 7.8.3). Verschure et al (1999) konnten bereits zeigen, dass Transkription überall im Territorium stattfinden kann. Des Weiteren ist bekannt, dass nicht nur Proteinkodierende Gene sondern auch viele andere DNA-Sequenzen, die keinen open reading frame enthalten, im menschlichen Genom transkribiert werden (Mattick, 2003). Diese sogenannten ncRNAs (noncoding RNAs) nehmen sogar einen Großteil der gesamten transkriptionellen Produktion in Säugerzellen ein. So konnte mit Hilfe einer Maus c-DNA Bibliothek gezeigt werden, dass etwa die Hälfte aller Transkripte aus ncRNAs besteht (Okazaki et al., 2002). Ob diese ncRNAs einfach wieder abgebaut werden oder ob zumindest ein Teil von ihnen biologische Funktion übernehmen ist bislang noch unklar (Mattick, 2003). Es ist also durchaus vorstellbar, dass zum Beispiel auch bestimmte Abschnitte des fakultativen Heterochromatins exprimiert werden – so könnten auch die MBCs einige transkriptionell aktive Sequenzen enthalten. Da fakultatives Heterochromatin die Transkription offensichtlich nicht generell inhibiert, scheint es plausibel, dass für BACs die hoch exprimierte Gene enthalten und für BACs die niedrig exprimierte Gene enthalten eine sehr ähnliche Abstandsverteilung zur Oberfläche der MBCs gefunden wurde.

Dass für die räumliche Verteilung der RG BAC Pools bezüglich der MBCs kein signifikanter Unterschied gefunden werden konnte, erscheint auf den ersten Blick merkwürdig. G-Banden sind AT-reich, replizieren im Allgemeinen später in der S-Phase und enthalten mehr gewebsspezifische Gene als die R-Banden (Craig and Bickmore, 1993). Es wird angenommen, dass fakultatives Heterochromatin zum größten Teil aus G-Banden besteht, da mit seiner Bildung die permanente Stilllegung der enthaltenen gewebsspezifischen Gene sichergestellt wird (Craig, 2005). Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass MBCs zu einem großen Teil aus fakultativem Heterochromatin bestehen, kann man auch eine nähere Assoziation der G-Banden mit den MBCs erwarten. Dies war aber nicht der Fall. Für das menschliche Chromosom 19 liegt eine Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis in seinem homogenen Aufbau. Wie in der Abbildung 3.1.1.1 zu erkennen ist, enthält es entlang dem gesamten Metaphasenchromosom eine etwa gleich bleibende hohe Gendichte, mit Ausnahme der Centromerregion, die allerdings im RG Pool nicht enthalten war. Des Weiteren enthält das

gesamte Chromosom 19 nur G-Banden des G1 Subtyps, die sich bezüglich des GC-Gehalts nur unwesentlich von R-Banden unterscheiden (Francke, 1994; Saccone and Bernardi, 2001). Es zeigt auch eine starke, einheitliche Färbung bei Nachweis der Alu-Sequenzen, hier ist keine Bänderung erkennbar (Bolzer et al., 2005). Die Expression ist ebenfalls überall auf dem Chromosom sehr hoch (Caron et al., 2001; Versteeg et al., 2003). Da sich die R- und G-Banden des humanen Chromosoms 19 dementsprechend kaum in ihren Eigenschaften unterscheiden erklärt sich auch warum bei diesem Chromosom keine Unterschiede in ihrer Lage bezüglich der MBCs ergaben.

Beim humanen Chromosom 18 mag es sich ähnlich verhalten. Hier ist die Gendichte über das ganze Metaphasechromosom verteilt gleichmäßig niedrig (siehe Abbildung 3.1.1.2), der Nachweis der Alu-Sequenzen ergibt kaum ein Signal (Bolzer et al., 2005), diese sind insgesamt nur in geringer Menge auf dem Chromosom enthalten (siehe Tabelle 3.1.1.2). Die Expression ist durchgehend niedrig (Caron et al., 2001; Versteeg et al., 2003). Zusätzlich lässt seine Lokalisation am Zellkernrand darauf schließen, dass große Teile dieses Chromosoms zum Heterochromatin der Zellkerne beitragen. Dieses Chromosom ist also ebenfalls in seinem Aufbau der R- und G-Banden sehr homogen, was den fehlenden Unterschied in der Anordnung der RG BAC Poole in Bezug auf die MBCs erklären könnte.

Das menschliche Chromosom 12 ist in diesem Zusammenhang wesentlich inhomogener aufgebaut. Die R- und G-Banden zeigen hier deutliche Unterschiede in Bezug auf ihre Replikationszeiten in der S-Phase, ihre Gendichte, ihrem GC-Gehalt und die Anzahl der enthaltenen Alu-Sequenzen (siehe Tabelle 3.1.1.3). Einzelne Chromosomensegmente zeigen ebenfalls deutliche Unterschiede in ihrem Expressionsniveau (Bolzer et al., 2005; Caron et al., 2001; Versteeg et al., 2003). Tatsächlich zeigen die Verteilungskurven für die humanen Lymphozyten den erwarteten Unterschied, hier waren die G-Banden BAC Klone näher mit den MBCs assoziiert als die R-Banden BAC-Klone. Für die nicht stimulierten Zellen (G0-Phase) war dieser Unterschied in der Verteilung auch signifikant. Bei den humanen Fibroblasten allerdings war dieser Unterschied nicht erkennbar, hier sehen die Verteilungskurven für die R- und G-Banden BAC Klone einander wieder sehr ähnlich. Das lässt sich vielleicht durch die extrem flache Zellkernform dieses Zelltyps erklären. Wie im Abschnitt 4.3 bereits erörtert, konnte auch für die Fibroblasten eine von der Gendichte abhängige, radiale Anordnung des Chromatins gezeigt werden. Auch innerhalb der CTs konnte gezeigt werden, dass der genarme BAC Pool von Chromosom 12 signifikant näher an den MBCs lokalisiert als der genreiche BAC Pool. Die Unterschiede in den Eigenschaften aller R- und G-Banden bezüglich der Gendichte scheinen allerdings nicht stark genug ausgeprägt zu sein, um in diesen flachen Zellkernen ebenfalls einen Unterschied in ihrer Lokalisation bezüglich der MBCs feststellen zu können. Das kann daran liegen, dass die BAC Klone für den RG Pool gleichmäßig über das gesamte Metaphasechromosom verteilt sind (siehe Abbildung 3.1). So sind aber auch R-Banden aus genarmen Regionen genauso vertreten wie G-Banden aus extrem genreichen Regionen. Dies mag in den flachen Zellkernen der Fibroblasten, in denen die CTs kaum Platz haben sich in z-Richtung auszudehnen, dazu führen, dass die Abstände der R- und G-Banden zur Oberfläche der MBCs im Mittel wieder gleich sind.

Die Struktur der CTs der Pflanze *Arabidopsis* konnte inzwischen detailliert beschrieben werden. Hier wirken die stark kondensierten, centromerischen Heterochromatin-Abschnitte als organisierende Zentren, welche als Chromocenter im Zellkern nachzuweisen sind. Von diesen Zentren ausgehend bilden die genreichen Chromosomenarme multiple Schleifen („loops“) und formen so insgesamt eine Rosetten-ähnliche Struktur (Fransz et al., 2002). Es wurde bereits vorgeschlagen, dass die Territorien der deutlich komplexer aufgebauten Chromosomen von Säugetieren eine ähnliche strukturelle Organisation aufweisen könnten. Da sie mehr Heterochromatin und nicht-kodierende Sequenzen enthalten als die Chromosomen der Pflanze *Arabidopsis* wurde postuliert, dass sie vermutlich mehrere organisierende Zentren aus Heterochromatin enthalten und dementsprechend auch multiple Rosetten-ähnliche Strukturen bilden (van Driel et al., 2003). Diese organisierenden Zentren könnten den hier beschriebenen MBCs entsprechen.

Allerdings muss bei diesen Ergebnissen beachtet werden, dass es sich bei den MBCs um eine biologisch nicht exakt definierbare Struktur handelt, wie zum Beispiel Centromere oder nukleäre bodies. Es gibt keine spezifischen Nachweismethoden wie beispielsweise eine spezielle Immunfärbung oder FISH Sonden. Die Darstellung der MBCs ist bislang nur durch graphische Prozessierung der Bilddaten möglich und ist damit subjektiv, da sie durch die Anwendung eines frei auswählbaren Schwellenwertes erfolgt. Da keine genauen Informationen über die an den MBCs beteiligten Sequenzen vorliegen, ist eine Verifizierung der aus den Ergebnissen gewonnenen Hypothesen durch weitere Versuche bisher nicht möglich.

4.5 Funktionelle Bedeutung der beschriebenen Ordnung im Zellkern

Von allen in dieser Arbeit untersuchten Eigenschaften scheint die lokale Gendichte den größten Einfluss auf die radiale Anordnung des Chromatins im Zellkern zu haben. Hier stellt sich zwangsläufig die Frage nach der biologischen Bedeutung dieser, in den unterschiedlichsten Zelltypen und Spezien konservierten, nukleären Anordnung (Cremer et al., 2003; Tanabe et al., 2002b). Zu dieser Fragestellung gibt es verschiedene Ansichten und Hypothesen. So könnte zum Beispiel die enge Nachbarschaft vieler transkriptionell aktiver Gene im Zentrum des Zellkerns eine gemeinsame Regulierung dieser Gene zur Folge haben. Einzelne Gene können sich so z.B. Transkriptionsmaschinerien oder Splicingfaktoren teilen, was eine effizientere Expression gewährleistet. Bestimmte Transkriptionsfaktoren finden ihre verschiedenen Ziel-Gene im Inneren des Zellkerns in unmittelbarer Nähe zueinander, was die Regulation der Expression vereinfacht und beschleunigt (Osborne et al., 2004; Shopland et al., 2003; Spilianakis et al., 2005). Desweiteren kann im Inneren des Kerns fertig prozessierte mRNA schnell und effektiv ins Cytoplasma transportiert werden, da in allen Richtungen Zellporen für ihren Export zur Verfügung stehen. Würden große Mengen an RNA direkt an der Peripherie produziert werden, könnten die wenigen direkt benachbarten Zellporen überlastet werden, es käme also entweder zu einem „Stau“ oder die mRNA müsste weite Strecken durch den Zellkern transportiert werden um eine „freie“ Pore zu erreichen. Diese Vorstellung ist jedoch bislang rein hypothetisch und wurde noch nicht von Experimenten

unterstützt. Modellierungsversuche am Computer könnten beitragen diese Idee zu bestätigen. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit bietet die „Bodyguard Hypothese“, derzufolge das stärker kompaktierte Heterochromatin eine beschützende Rolle spielt. Es umgibt das intern liegende Euchromatin wie eine schützende Schale, die ein in den Zellkern eindringendes Mutagen oder auch einen Virus abfangen soll (Hens et al., 1982; Hsu, 1975). Diese Hypothese ist allerdings sehr umstritten (Tanabe et al., 2002a). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Doppelstrangbrüche in der DNA nach Bestrahlung oder nach der Behandlung mit Endonukleasen bevorzugt im Euchromatin zu finden waren, und nicht, wie nach dieser Vorstellung zu erwarten wäre, im Heterochromatin abgefangen wurden (Balajee et al., 1994; Gazave et al., 2005; Holmberg and Jonasson, 1973; Slijepcevic and Natarajan, 1994).

Eine weitere drängende Frage dreht sich um die Mechanismen, die diese spezielle radiale Anordnung des Chromatins im Zellkern etablieren und während des gesamten Zellzyklus aufrechterhalten. Es ist bereits bekannt, dass das genarme Heterochromatin mit der nukleären Lamina assoziiert ist. Dazu ist ein hoch kompliziertes Zusammenspiel aus verschiedenen DNA-bindenden Proteinen und nukleären Membranproteinen notwendig. Ist dieses komplexe System gestört, kann das verheerende Folgen für den betroffenen Organismus haben. Mutationen in diesem Mechanismus führen oft zu den sogenannten Laminopathien, Krankheiten zu denen beispielsweise die Progerie (Hutchinson Gilford) oder die Emery Dreifuss Muskeldystrophie gehören (Reviews zu diesem Thema: Gruenbaum et al., 2005; Maraldi et al., 2005). Interessanterweise sind im Gegenzug dazu keine Mechanismen bekannt, die das genreiche Euchromatin im Inneren des Zellkerns befestigen. Vielleicht ist das auch gar nicht mehr nötig, da durch die Aufhängung des Heterochromatins an die Lamina kein anderer Aufenthaltsort für das Euchromatin mehr möglich ist als das Innere des Zellkerns. Dies passt auch gut zu der Beobachtung, dass einige gendichte und transkriptionell sehr aktive Regionen eine größere Bewegungsfreiheit im Zellkern zu haben scheinen als peripheres oder an Nukleoli assoziiertes Heterochromatin (Chubb et al., 2002; Gilbert et al., 2004). Ein weiterer Mechanismus, der für die Aufrechterhaltung der nukleären Ordnung verantwortlich sein kann, ist das Phänomen des „molecular crowding“. Makromoleküle haben die Eigenschaft in geschlossenen Systemen ab einer bestimmten Konzentration geordnete Phasen zu bilden. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung bestimmter nukleärer Kompartimente wie z.B. PML bodies oder Nukleoli von der spezifischen Konzentration der Makromoleküle innerhalb des Zellkerns abhängt. Diese Strukturen lösten sich bei einer Behandlung der Zellen mit einem hypotonen Puffer, welches eine drastische Zunahme des Kernvolumens zur Folge hatte, auf. Sie bildeten sich erst wieder neu, als die Zellkerne im normalen Medium wieder ihr ursprüngliches Volumen und damit auch die normale Konzentration an Makromolekülen zurückgewannen (Hancock, 2004b). Wenn das Crowding eine so wichtige Rolle für die Anordnung von nukleären Proteinen übernimmt, liegt die Annahme nahe, dass auch das Chromatin von diesem Phänomen beeinflusst wird. So bilden sich vielleicht nur aufgrund der hohen molekularen Konzentration innerhalb der Zellkerne zwei Phasen: dichter gepacktes Heterochromatin und aufgelockertes Euchromatin. Da das Heterochromatin an die Lamina geheftet wird, bleibt für das Euchromatin automatisch nur das Zellkerninnere als Aufenthaltsort. Es wird sogar angenommen, dass der molecular-crowding-Effekt Einfluss auf

die Faltung und Kompaktierung der Chromosomenterritorien haben kann (Hancock, 2004a). Zusätzlich könnten kovalente und nicht kovalente Protein-Protein, Protein-DNA, DNA-DNA und RNA-DNA Interaktionen als „Interchromatin linker“ wirken, die helfen die Chromatinanordnung im Zellkern während einer Interphase aufrecht zu erhalten (Adkins et al., 2004).

Bei all diesen Überlegungen darf allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass die hier beschriebene, von der Gendichte abhängige radiale Anordnung des Chromatins im Zellkern nicht zwangsläufig für alle Zelltypen gelten muss. Auch wenn sie in vielen verschiedenen Zelltypen und in unterschiedlichen Spezies nachgewiesen werden konnte, schließen diese Befunde nicht die Existenz einer andersgearteten Chromatinanordnung in Zellkernen aus. Tatsächlich konnte z.B. in den Zellkernen der Photorezeptoren von nachtaktiven Säugern eine genau umgekehrte Organisation des Chromatins festgestellt werden. Hier ist das genreiche Material näher zur Zellkernperipherie hin orientiert als zum Mittelpunkt des Kerns. Ob diese, nur bei den nachtaktiven Tieren gefundene Ausnahme eine funktionelle Bedeutung oder einen anderen Hintergrund hat, bleibt noch zu klären (Solovei et al., 2007).

5. Zusammenfassung

Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre konnten zeigen, dass sich in unterschiedlichen Zelltypen und Spezies genreiches, transkriptionell aktives und früh replizierendes Chromatin bevorzugt im Inneren eines Zellkerns lokalisiert ist, während das genarme, transkriptionell inaktive und spät replizierende Chromatin vorrangig an der Zellkernperipherie zu finden ist. Dennoch ist bislang noch nicht wirklich verstanden, welche der Chromatineigenschaften, wie die lokale Gendichte, die transkriptionelle Aktivität oder die Replikationszeit, tatsächlich einen ausschlaggebenden Einfluss auf die räumliche Anordnung im Zellkern haben und welche dieser Eigenschaften eher aufgrund ihrer Korrelation mit diesen „dominanten“ Merkmalen eine spezifische Verteilung im Interphasekern aufweisen.

Um dieses Problem zu untersuchen, stellten wir Pools aus BAC Klonen von der menschlichen Chromosomen 11, 12, 18 und 19 für R- bzw. G-Banden-spezifische Regionen, für genreiche bzw. genarme Segmente sowie für hoch bzw. niedrig exprimierte Gene zusammen. Mittels Vielfarben 3D FISH, konfokaler Mikroskopie, Bildverarbeitung und computergestützter, quantitativer Auswertungen wurde die Lage der von den BAC Pools repräsentierten Regionen im Zellkern sowie ihre Anordnung bezüglich ihrer Chromosomenterritorien analysiert.

Sowohl in den humanen Lymphozyten wie in den humanen Fibroblasten fanden wir den R-Banden Pool, den genreichen Pool sowie den Pool, der die hoch exprimierten Gene enthielt, weiter im Zellkerninneren als ihre jeweils korrespondierenden Pools (G-Banden, genarmer Pool, bzw. niedrig exprimierte Gene), wobei die deutlichsten Unterschiede hier für die von der Gendichte abhängigen BAC Pools gefunden wurden.

Für jeden BAC Pool wurde mittels sorgfältiger Datenbankrecherche die mittlere lokale Gendichte, der mittlere GC Gehalt, die Replikationszeit sowie das mittlere Expressionsniveau bestimmt. Anschließend wurde eine Korrelationsanalyse dieser Parameter mit der berechneten mittleren, relativen Position der Pools im Zellkern durchgeführt. Die höchste Korrelation ergab sich für die Gendichte und den GC-Gehalt, während wir zeigen konnten, dass das Expressionsniveau, die Zuordnung zu einer R- oder G-Bande, sowie das Replikationstiming offensichtlich so gut wie keinen Einfluss auf die radiale Anordnung des Chromatins im Zellkern hat.

Diese radiale Positionierung der verschiedenen Pools spiegelte sich auch in ihrer Anordnung bezüglich der Chromosomenterritorien wieder. Diese zeigen eine polare Anordnung in Bezug auf den Zellkern: Genreiche Segmente waren zum Mittelpunkt des Zellkerns hin orientiert, während die genarmen Segmente in der Hälfte des CTs zu finden waren, die sich in Richtung der Peripherie erstreckte. Etwas weniger deutlich ausgeprägt wurde diese Anordnung auch für die R-/G-Banden Pools sowie für die von der transkriptionellen Aktivität abhängigen Pools beobachtet. Dies spricht für eine deutliche strukturelle Transformation bei der Umwandlung der Metaphasenchromosomen zu den CTs der Interphase, die Territorien haben eine hohe Plastizität.

Wir konnten bestätigen, dass die extrem genreiche und hoch transkriptionell aktive Region 11p15.5 oft weit aus ihrem CT herausragt. Ein ähnliches Verhalten konnte jedoch nicht für

die ebenfalls sehr reichen und transkriptionell aktiven Segmente des Chromosoms 12 beobachtet werden. Das spricht gegen die Annahme, dass dieses Phänomen des „looping outs“ eine typische Anordnung für Chromatinabschnitte mit hoher Dichte und hoher transkriptioneller Aktivität ist, sondern eher eine Ausnahme einzelner Segmente mit solchen Eigenschaften darstellt.

Mit der Analyse eng benachbarter Chromosomenterritorien konnten wir dokumentieren, dass es an den Grenzen der Territorien tatsächlich zu Überlappungen von Chromatinmaterial kommen kann. Wir konnten zeigen, dass einzelne Segmente weit in das benachbarte Territorium hineinreichen können. Eine quantitative Einschätzung des sich vermischenden Materials war aufgrund der limitierten Auflösung des confokalen Mikroskops nicht möglich, hier sind noch weitere Versuche nötig.

Wir konnten keine Unterschiede für die Verteilung der BAC Pools der Chromosomen 12, 18 und 19 bezüglich der Oberfläche der CTs finden. R- und G-Banden, geneiche und genearme Segmente sowie hoch und niedrig exprimierte Gene scheinen gleichmäßig im gesamten Territorium verteilt zu sein. Die äußere, das CT einschließende Oberfläche scheint entgegen der Erwartung offensichtlich kein wichtiger Reaktionsort für besonders geneiche bzw. hoch exprimierte Sequenzen zu sein.

6. Literaturverzeichnis

- Abney, J.R., B. Cutler, M.L. Fillbach, D. Axelrod, and B.A. Scalettar. 1997. Chromatin dynamics in interphase nuclei and its implications for nuclear structure. *J Cell Biol.* 137:1459-68.
- Adachi, Y., M. Luke, and U.K. Laemmli. 1991. Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation. *Cell.* 64:137-48.
- Adams, C.C., and J.L. Workman. 1993. Nucleosome displacement in transcription. *Cell.* 72:305-8.
- Adkins, N.L., M. Watts, and P.T. Georgel. 2004. To the 30-nm chromatin fiber and beyond. *Biochim Biophys Acta.* 1677:12-23.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. 1990. *Molekularbiologie der Zelle.* VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Albiez, H., M. Cremer, C. Tiberi, L. Vecchio, L. Schermelleh, S. Dittrich, K. Kupper, B. Joffe, T. Thormeyer, J. von Hase, S. Yang, K. Rohr, H. Leonhardt, I. Solovei, C. Cremer, S. Fakan, and T. Cremer. 2006. Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome Res.* 14:707-33.
- Alexandrova, O., I. Solovei, T. Cremer, and C.N. David. 2003. Replication labeling patterns and chromosome territories typical of mammalian nuclei are conserved in the early metazoan Hydra. *Chromosoma.* 112:190-200.
- Amrichova, J., E. Lukasova, S. Kozubek, and M. Kozubek. 2003. Nuclear and territorial topography of chromosome telomeres in human lymphocytes. *Exp Cell Res.* 289:11-26.
- Aten, J.A., and R. Kanaar. 2006. Chromosomal organization: mingling with the neighbors. *PLoS Biol.* 4:e155.
- Balajee, A.S., H.J. Oh, and A.T. Natarajan. 1994. Analysis of restriction enzyme-induced chromosome aberrations in the interstitial telomeric repeat sequences of CHO and CHE cells by FISH. *Mutat Res.* 307:307-13.
- Bartova, E., and S. Kozubek. 2006. Nuclear architecture in the light of gene expression and cell differentiation studies. *Biol Cell.* 98:323-36.
- Bartova, E., S. Kozubek, P. Jirsova, M. Kozubek, H. Gajova, E. Lukasova, M. Skalnikova, A. Ganova, I. Koutna, and M. Hausmann. 2002. Nuclear structure and gene activity in human differentiated cells. *J Struct Biol.* 139:76-89.
- Beato, M., and K. Eisefeld. 1997. Transcription factor access to chromatin. *Nucleic Acids Res.* 25:3559-63.
- Belmont, A.S., and K. Bruce. 1994. Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J Cell Biol.* 127:287-302.
- Belmont, A.S., S. Dietzel, A.C. Nye, Y.G. Strukov, and T. Tumber. 1999. Large-scale chromatin structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 11:307-11.
- Berezney, R., D.D. Dubey, and J.A. Huberman. 2000. Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma.* 108:471-84.
- Bernardi, G. 1995. The human genome: organization and evolutionary history. *Annu Rev Genet.* 29:445-76.
- Bernstein, B.E., M. Kamal, K. Lindblad-Toh, S. Bekiranov, D.K. Bailey, D.J. Huebert, S. McMahon, E.K. Karlsson, E.J. Kulbokas, 3rd, T.R. Gingeras, S.L. Schreiber, and E.S. Lander. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell.* 120:169-81.

- Bickmore, W.A., and P. Teague. 2002. Influences of chromosome size, gene density and nuclear position on the frequency of constitutional translocations in the human population. *Chromosome Res.* 10:707-15.
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16:6-21.
- Black, B.E., D.R. Foltz, S. Chakravarthy, K. Luger, V.L. Woods, Jr., and D.W. Cleveland. 2004. Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature.* 430:578-82.
- 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.
- Boxer, L.M., and C.V. Dang. 2001. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene.* 20:5595-610.
- 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.
- Branco, M.R., and A. Pombo. 2006. Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol.* 4:e138.
- 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.
- Bridger, J.M., H. Herrmann, C. Munkel, and P. Lichter. 1998. Identification of an interchromosomal compartment by polymerization of nuclear-targeted vimentin. *J Cell Sci.* 111 (Pt 9):1241-53.
- Brinkman, A.B., T. Roelofsen, S.W. Pennings, J.H. Martens, T. Jenuwein, and H.G. Stunnenberg. 2006. Histone modification patterns associated with the human X chromosome. *EMBO Rep.* 7:628-34.
- Brockdorff, N. 2002. X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind Xist RNA. *Trends Genet.* 18:352-8.
- Brown, J.M., J. Leach, J.E. Reittie, A. Atzberger, J. Lee-Prudhoe, W.G. Wood, D.R. Higgs, F.J. Iborra, and V.J. Buckle. 2006. Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active. *J Cell Biol.* 172:177-87.
- Brown, K.E., S.S. Guest, S.T. Smale, K. Hahm, M. Merckenschlager, and A.G. Fisher. 1997. Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell.* 91:845-54.
- Brown, S.W. 1966. Heterochromatin. *Science.* 151:417-25.
- Camargo, M., and J. Cervenka. 1982. Patterns of DNA replication of human chromosomes. II. Replication map and replication model. *Am J Hum Genet.* 34:757-80.
- Cao, R., Y. Tsukada, and Y. Zhang. 2005. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell.* 20:845-54.
- Cao, R., L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R.S. Jones, and Y. Zhang. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science.* 298:1039-43.
- 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.
- Carvalho, C., H.M. Pereira, J. Ferreira, C. Pina, D. Mendonca, A.C. Rosa, and M. Carmo-Fonseca. 2001. Chromosomal G-dark bands determine the spatial organization of centromeric heterochromatin in the nucleus. *Mol Biol Cell.* 12:3563-72.

- Chadwick, B.P., and H.F. Willard. 2004. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:17450-5.
- Chambeyron, S., and W.A. Bickmore. 2004a. Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes Dev*. 18:1119-30.
- Chambeyron, S., and W.A. Bickmore. 2004b. Does looping and clustering in the nucleus regulate gene expression? *Curr Opin Cell Biol*. 16:256-62.
- Chambeyron, S., N.R. Da Silva, K.A. Lawson, and W.A. Bickmore. 2005. Nuclear reorganisation of the Hoxb complex during mouse embryonic development. *Development*. 132:2215-23.
- Cheung, P., C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi. 2000. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*. 103:263-71.
- Cheung, V.G., N. Nowak, W. Jang, I.R. Kirsch, S. Zhao, X.N. Chen, T.S. Furey, U.J. Kim, W.L. Kuo, M. Olivier, J. Conroy, A. Kasprzyk, H. Massa, R. Yonescu, S. Sait, C. Thoreen, A. Snijders, E. Lemyre, J.A. Bailey, A. Bruzel, W.D. Burrill, S.M. Clegg, S. Collins, P. Dhami, C. Friedman, C.S. Han, S. Herrick, J. Lee, A.H. Ligon, S. Lowry, M. Morley, S. Narasimhan, K. Osoegawa, Z. Peng, I. Plajzer-Frick, B.J. Quade, D. Scott, K. Sirotkin, A.A. Thorpe, J.W. Gray, J. Hudson, D. Pinkel, T. Ried, L. Rowen, G.L. Shen-Ong, R.L. Strausberg, E. Birney, D.F. Callen, J.F. Cheng, D.R. Cox, N.A. Doggett, N.P. Carter, E.E. Eichler, D. Haussler, J.R. Korenberg, C.C. Morton, D. Albertson, G. Schuler, P.J. de Jong, and B.J. Trask. 2001. Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature*. 409:953-8.
- Chevret, E., E.V. Volpi, and D. Sheer. 2000. Mini review: form and function in the human interphase chromosome [In Process Citation]. *Cytogenet. Cell Genet*. 90:13-21.
- Chubb, J.R., and W.A. Bickmore. 2003. Considering nuclear compartmentalization in the light of nuclear dynamics. *Cell*. 112:403-6.
- Chubb, J.R., S. Boyle, P. Perry, and W.A. Bickmore. 2002. Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Curr Biol*. 12:439-45.
- Claussen, U. 2005. Chromosomics. *Cytogenet Genome Res*. 111:101-6.
- Clemson, C.M., L.L. Hall, M. Byron, J. McNeil, and J.B. Lawrence. 2006. The X chromosome is organized into a gene-rich outer rim and an internal core containing silenced nongenic sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:7688-93.
- Cornforth, M.N., K.M. Greulich-Bode, B.D. Loucas, J. Arsuaga, M. Vazquez, R.K. Sachs, M. Bruckner, M. Molls, P. Hahnfeldt, L. Hlatky, and D.J. Brenner. 2002. Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells. *J Cell Biol*. 159:237-44.
- Costanzi, C., and J.R. Pehrson. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*. 393:599-601.
- Craig, J.M. 2005. Heterochromatin--many flavours, common themes. *Bioessays*. 27:17-28.
- Craig, J.M., and W.A. Bickmore. 1993. Chromosome bands--flavours to savour. *Bioessays*. 15:349-54.
- Craig, J.M., and W.A. Bickmore. 1994. The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nat Genet*. 7:376-82.
- Cremer, M., 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. von 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*. 9:541-67.

- Cremer, M., R. Zinner, S. Stein, H. Albiez, B. Wagler, C. Cremer, and T. Cremer. 2004a. Three dimensional analysis of histone methylation patterns in normal and tumor cell nuclei. *Eur J Histochem.* 48:15-28.
- Cremer, T. 1985. Von der Zellenlehre zu Chromosomentheorie. Springer Verlag.
- Cremer, T., and C. Cremer. 2001a. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet.* 2:292-301.
- Cremer, T., and C. Cremer. 2006. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present. *Eur J Histochem.* 50:223-72.
- Cremer, T., C. Cremer, H. Baumann, E.K. Luedtke, K. Sperling, V. Teuber, and C. Zorn. 1982a. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum Genet.* 60:46-56.
- Cremer, T., C. Cremer, T. Schneider, H. Baumann, L. Hens, and M. Kirsch-Volders. 1982b. Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of Chinese hamster cells by laser-UV-microirradiation experiments. *Hum Genet.* 62:201-9.
- Cremer, T., M. Cremer, S. Dietzel, S. Muller, I. Solovei, and S. Fakan. 2006a. Chromosome territories - a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol.*
- Cremer, T., K. Kupper, S. Dietzel, and S. Fakan. 2004b. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol Cell.* 96:555-67.
- Cremer, T., A. Kurz, R. Zirbel, S. Dietzel, B. Rinke, E. Schrock, M.R. Speicher, U. Mathieu, A. Jauch, P. Emmerich, H. Scherthan, T. Ried, C. Cremer, and P. Lichter. 1993. Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 58:777-92.
- 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.
- Dehghani, H., G. Dellaire, and D.P. Bazett-Jones. 2005. Organization of chromatin in the interphase mammalian cell. *Micron.* 36:95-108.
- Dekker, J., K. Rippe, M. Dekker, and N. Kleckner. 2002. Capturing chromosome conformation. *Science.* 295:1306-11.
- DeLange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E., Bonner, J. 1969a. Calf and pea histone IV.II. The complete amino acid sequence of calf thymus histone IV; presence of epsilon-N-acetyllysine. *J. Biol. Chem.* 244:319-334.
- DeLange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E., Bonner, J. 1969b. Calf and pea histone IV.III. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV; comparison with the homologous calf thymus histone. *J. Biol. Chem.* 244:5669-5679.
- Delaval, K., and R. Feil. 2004. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev.* 14:188-95.
- Deng, W., S.W. Tsao, J.N. Lucas, C.S. Leung, and A.L. Cheung. 2003. A new method for improving metaphase chromosome spreading. *Cytometry A.* 51:46-51.
- Dietzel, S., A. Jauch, D. Kienle, G. Qu, H. Holtgreve-Grez, R. Eils, C. Munkel, M. Bittner, P.S. Meltzer, J.M. Trent, and T. Cremer. 1998. Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei. *Chromosome Res.* 6:25-33.
- Dietzel, S., K. Schiebel, G. Little, P. Edelmann, G.A. Rappold, R. Eils, C. Cremer, and T. Cremer. 1999. The 3D positioning of ANT2 and ANT3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity [In Process Citation]. *Exp Cell Res.* 252:363-75.

- Dimitrova, D.S., and D.M. Gilbert. 1999. The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase. *Mol Cell*. 4:983-93.
- Dorigo, B., T. Schalch, A. Kulangara, S. Duda, R.R. Schroeder, and T.J. Richmond. 2004. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*. 306:1571-3.
- Drouin, R., N. Lemieux, and C.L. Richer. 1991. Chromosome condensation from prophase to late metaphase: relationship to chromosome bands and their replication time. *Cytogenet Cell Genet*. 57:91-9.
- Dundr, M., and T. Misteli. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J*. 356:297-310.
- Earnshaw, W.C., and M.M. Heck. 1985. Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. *J Cell Biol*. 100:1716-25.
- Elliott, B., and M. Jasin. 2002. Double-strand breaks and translocations in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 59:373-85.
- Espada, J., and M. Esteller. 2007. Epigenetic control of nuclear architecture. *Cell Mol Life Sci*.
- Esteller, M. 2005. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 45:629-56.
- Fakan, S. 2004a. The functional architecture of the nucleus as analysed by ultrastructural cytochemistry. *Histochem Cell Biol*. 122:83-93.
- Fakan, S. 2004b. Ultrastructural cytochemical analyses of nuclear functional architecture. *Eur J Histochem*. 48:5-14.
- Fan, J.Y., F. Gordon, K. Luger, J.C. Hansen, and D.J. Tremethick. 2002. The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol*. 9:172-6.
- Federico, C., C.D. Cantarella, C. Scavo, S. Saccone, B. Bed'Hom, and G. Bernardi. 2005. Avian genomes: different karyotypes but a similar distribution of the GC-richest chromosome regions at interphase. *Chromosome Res*. 13:785-93.
- Federico, C., C. Scavo, C.D. Cantarella, S. Motta, S. Saccone, and G. Bernardi. 2006. Gene-rich and gene-poor chromosomal regions have different locations in the interphase nuclei of cold-blooded vertebrates. *Chromosoma*. 115:123-8.
- Felsenfeld, G., and M. Groudine. 2003. Controlling the double helix. *Nature*. 421:448-53.
- Felsenfeld, G., and J.D. McGhee. 1986. Structure of the 30 nm chromatin fiber. *Cell*. 44:375-7.
- Ferreira, J., G. Paoletta, C. Ramos, and A.I. Lamond. 1997. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J Cell Biol*. 139:1597-610.
- Festenstein, R., and D. Kioussis. 2000. Locus control regions and epigenetic chromatin modifiers. *Curr Opin Genet Dev*. 10:199-203.
- Fiegler, H., P. Carr, E.J. Douglas, D.C. Burford, S. Hunt, C.E. Scott, J. Smith, D. Vetrie, P. Gorman, I.P. Tomlinson, and N.P. Carter. 2003. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer*. 36:361-74.
- Fiegler, H., R. Redon, D. Andrews, C. Scott, R. Andrews, C. Carder, R. Clark, O. Dovey, P. Ellis, L. Feuk, P. Hunt, D. Kalaitzopoulos, J. Larkin, L. Montgomery, G.H. Perry, B.W. Plumb, K. Porter, R.E. Rigby, D. Rigler, A. Valesia, C. Langford, S.W. Humphray, S.W. Scherer, C. Lee, M.E. Hurles, and N.P. Carter. 2006. Accurate and reliable high-throughput detection of copy number variation in the human genome. . *Genome Research submitted*.
- Finch, J.T., and A. Klug. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73:1897-901.

- Fischle, W., Y. Wang, and C.D. Allis. 2003. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature*. 425:475-9.
- Flemming, W. 1882. Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. In *Archiv für Mikroskopische Anatomie*. v. la valette St. George and W. Waldeyer, editors. Verlag von Max hen & Sohn, Bonn. 1-87.
- Flindt, R. 1985. *Biologie in Zahlen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Foster, H.A., and J.M. Bridger. 2005. The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organisation and nuclear architecture. *Chromosoma*. 114:212-29.
- Francastel, C., D. Schubeler, D.I. Martin, and M. Groudine. 2000. Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1:137-43.
- Francke, U. 1994. Digitized and differentially shaded human chromosome ideograms for genomic applications. *Cytogenet Cell Genet*. 65:206-18.
- Franz, P., J.H. De Jong, M. Lysak, M.R. Castiglione, and I. Schubert. 2002. Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:14584-9.
- Fuks, F. 2005. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev*. 15:490-5.
- Furey, T.S., and D. Haussler. 2003. Integration of the cytogenetic map with the draft human genome sequence. *Hum Mol Genet*. 12:1037-44.
- Gasser, S.M., and U.K. Laemmli. 1986. The organisation of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *Embo J*. 5:511-518.
- Gasser, S.M., T. Laroche, J. Falquet, E. Boy de la Tour, and U.K. Laemmli. 1986. Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol*. 188:613-29.
- Gazave, E., P. Gautier, S. Gilchrist, and W.A. Bickmore. 2005. Does radial nuclear organisation influence DNA damage? *Chromosome Res*. 13:377-88.
- 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.
- Gilbert, N., S. Boyle, H. Sutherland, J. de Las Heras, J. Allan, T. Jenuwein, and W.A. Bickmore. 2003. Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1. *Embo J*. 22:5540-50.
- Gilbert, N., S. Gilchrist, and W.A. Bickmore. 2005. Chromatin organization in the mammalian nucleus. *Int Rev Cytol*. 242:283-336.
- Gilbert, N., and B. Ramsahoye. 2005. The relationship between chromatin structure and transcriptional activity in mammalian genomes. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 4:129-42.
- Grimwood, J., L.A. Gordon, A. Olsen, A. Terry, J. Schmutz, J. Lamerdin, U. Hellsten, D. Goodstein, O. Couronne, M. Tran-Gyamfi, A. Aerts, M. Altherr, L. Ashworth, E. Bajorek, S. Black, E. Branscomb, S. Caenepeel, A. Carrano, C. Caoile, Y.M. Chan, M. Christensen, C.A. Cleland, A. Copeland, E. Dalin, P. Dehal, M. Denys, J.C. Detter, J. Escobar, D. Flowers, D. Fotopulos, C. Garcia, A.M. Georgescu, T. Glavina, M. Gomez, E. Gonzales, M. Groza, N. Hammon, T. Hawkins, L. Haydu, I. Ho, W. Huang, S. Israni, J. Jett, K. Kadner, H. Kimball, A. Kobayashi, V. Larionov, S.H. Leem, F. Lopez, Y. Lou, S. Lowry, S. Malfatti, D. Martinez, P. McCready, C. Medina, J. Morgan, K. Nelson, M. Nolan, I. Ovcharenko, S. Pitluck, M. Pollard, A.P. Popkie, P. Predki, G. Quan, L. Ramirez, S. Rash, J. Retterer, A. Rodriguez, S. Rogers, A. Salamov, A. Salazar, X. She, D. Smith, T. Slezak, V. Solovyev, N. Thayer, H. Tice, M. Tsai, A. Ustaszewska, N. Vo, M. Wagner, J. Wheeler, K. Wu, G. Xie, J. Yang, I. Dubchak, T.S. Furey, P. DeJong, M. Dickson, D. Gordon, E.E. Eichler, L.A. Pennacchio, P. Richardson, L. Stubbs, D.S. Rokhsar, R.M. Myers, E.M. Rubin, and

- S.M. Lucas. 2004. The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature*. 428:529-35.
- Gruenbaum, Y., A. Margalit, R.D. Goldman, D.K. Shumaker, and K.L. Wilson. 2005. The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:21-31.
- Habermann, F.A., M. Cremer, J. Walter, G. Kreth, J. von Hase, K. Bauer, J. Wienberg, C. Cremer, T. Cremer, and I. Solovei. 2001. Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells. *Chromosome Res*. 9:569-84.
- Hancock, R. 2004a. Internal organisation of the nucleus: assembly of compartments by macromolecular crowding and the nuclear matrix model. *Biol Cell*. 96:595-601.
- Hancock, R. 2004b. A role for macromolecular crowding effects in the assembly and function of compartments in the nucleus. *J Struct Biol*. 146:281-90.
- Harnden, K. 1985. ISCN: An International System For Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, Basel.
- Harnicarova, A., S. Kozubek, J. Pachernik, J. Krejci, and E. Bartova. 2006. Distinct nuclear arrangement of active and inactive c-myc genes in control and differentiated colon carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 312:4019-35.
- Heitz, E. 1928. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb. Wiss. Botanik*. 1:762-818.
- Hendrich, B., and A. Bird. 1998. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*. 18:6538-47.
- Hens, L., M. Kirsch-Volders, L. Verschaeve, and C. Susanne. 1982. The central localization of the small and early replicating chromosomes in human diploid metaphase figures. *Hum Genet*. 60:249-56.
- Hepperger, C., S. Otten, J. von Hase, and S. Dietzel. 2006. Preservation of large-scale chromatin structure in FISH experiments. *Chromosoma*.
- Herrmann, H., A. Eckelt, M. Brettel, C. Grund, and W.W. Franke. 1993. Temperature-sensitive intermediate filament assembly. Alternative structures of *Xenopus laevis* vimentin in vitro and in vivo. *J Mol Biol*. 234:99-113.
- Hewitt, S.L., F.A. High, S.L. Reiner, A.G. Fisher, and M. Merkenschlager. 2004. Nuclear repositioning marks the selective exclusion of lineage-inappropriate transcription factor loci during T helper cell differentiation. *Eur J Immunol*. 34:3604-13.
- Hirano, T., R. Kobayashi, and M. Hirano. 1997. Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein. *Cell*. 89:511-21.
- Holmberg, M., and J. Jonasson. 1973. Preferential location of x-ray induced chromosome breakage in the R-bands of human chromosomes. *Hereditas*. 74:57-67.
- Hsu, T.C. 1975. A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. *Genetics*. 79 Suppl:137-50.
- Iwase, S., F. Lan, P. Bayliss, L. de la Torre-Ubieta, M. Huarte, H. Heng Qi, J.R. Whetstine, A. Bonni, T.M. Roberts, and Y. Shi. 2007. The X-Linked Mental Retardation Gene SMCX/JARID1C Defines a Family of Histone H3 Lysine 4 Demethylases. *Cell*.
- Jackson, D.A., and A. Pombo. 1998. Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol*. 140:1285-95.
- Jeppesen, P., and B.M. Turner. 1993. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*. 74:281-9.
- Jones, P.A., and D. Takai. 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 293:1068-70.
- 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.

- Kioussis, D. 2005. Gene regulation: kissing chromosomes. *Nature*. 435:579-80.
- Kipp, M., F. Gohring, T. Ostendorp, C.M. van Drunen, R. van Driel, M. Przybylski, and F.O. Fackelmayer. 2000. SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Mol Cell Biol*. 20:7480-9.
- Koberna, K., A. Ligasova, J. Malinsky, A. Pliss, A.J. Siegel, Z. Cvackova, H. Fidlerova, M. Masata, M. Fialova, I. Raska, and R. Berezney. 2005. Electron microscopy of DNA replication in 3-D: evidence for similar-sized replication foci throughout S-phase. *J Cell Biochem*. 94:126-38.
- Korenberg, J.R., and M.C. Rykowski. 1988. Human genome organization: Alu, lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands. *Cell*. 53:391-400.
- Kornberg, R.D. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*. 184:868-71.
- Kornberg, R.D., and Y. Lorch. 1992. Chromatin structure and transcription. *Annu Rev Cell Biol*. 8:563-87.
- Kosak, S.T., and M. Groudine. 2004. Form follows function: The genomic organization of cellular differentiation. *Genes Dev*. 18:1371-84.
- Kourmouli, N., P. Jeppesen, S. Mahadevhaiah, P. Burgoyne, R. Wu, D.M. Gilbert, S. Bongiorno, G. Prantera, L. Fanti, S. Pimpinelli, W. Shi, R. Fundele, and P.B. Singh. 2004. Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J Cell Sci*. 117:2491-501.
- 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.
- Labrador, M., and V.G. Corces. 2002. Setting the boundaries of chromatin domains and nuclear organization. *Cell*. 111:151-4.
- Lachner, M., R.J. O'Sullivan, and T. Jenuwein. 2003. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci*. 116:2117-24.
- Laemmli, U.K., S.M. Cheng, K.W. Adolph, J.R. Paulson, J.A. Brown, and W.R. Baumbach. 1978. Metaphase chromosome structure: the role of nonhistone proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 42 Pt 1:351-60.
- Laemmli, U.K., E. Kas, L. Poljak, and Y. Adachi. 1992. Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr Opin Genet Dev*. 2:275-85.
- Lanctot, C., T. Cheutin, M. Cremer, G. Cavalli, and T. Cremer. 2007. Dynamic genome architecture and the regulation of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* in press.
- Lander, E.S., L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chissoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409:860-921.

- Larsen, F., G. Gundersen, R. Lopez, and H. Prydz. 1992. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*. 13:1095-107.
- Lehrer, H., A. Weise, S. Michel, H. Starke, K. Mrasek, A. Heller, A. Kuechler, U. Claussen, and T. Liehr. 2004. The hierarchically organized splitting of chromosome bands into sub-bands analyzed by multicolor banding (MCB). *Cytogenet Genome Res.* 105:25-8.
- Lemke, J., J. Claussen, S. Michel, I. Chudoba, P. Muhlig, M. Westermann, K. Sperling, N. Rubtsov, U.W. Grummt, P. Ullmann, K. Kromeyer-Hauschild, T. Liehr, and U. Claussen. 2002. The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase. *Am J Hum Genet.* 71:1051-9.
- 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.
- Lichter, P., T. Cremer, J. Borden, L. Manuelidis, and D.C. Ward. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet.* 80:224-34.
- Luger, K., A.W. Mader, R.K. Richmond, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 389:251-60.
- Lukasova, E., S. Kozubek, M. Kozubek, M. Falk, and J. Amrichova. 2002. The 3D structure of human chromosomes in cell nuclei. *Chromosome Res.* 10:535-48.
- Ma, H., J. Samarabandu, R.S. Devdhar, R. Acharya, P.C. Cheng, C. Meng, and R. Berezney. 1998. Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells. *J Cell Biol.* 143:1415-25.
- Maeshima, K., M. Eltsov, and U.K. Laemmli. 2005. Chromosome structure: improved immunolabeling for electron microscopy. *Chromosoma.* 114:365-75.
- Maeshima, K., and U.K. Laemmli. 2003. A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev Cell.* 4:467-80.
- 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.
- Manders, E.M., A.E. Visser, A. Koppen, W.C. de Leeuw, R. van Liere, G.J. Brakenhoff, and R. van Driel. 2003. Four-dimensional imaging of chromatin dynamics during the assembly of the interphase nucleus. *Chromosome Res.* 11:537-47.
- Manuelidis, L. 1985. Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Hum Genet.* 71:288-93.
- Maraldi, N.M., S. Squarzone, P. Sabatelli, C. Capanni, E. Mattioli, A. Ognibene, and G. Lattanzi. 2005. Laminopathies: involvement of structural nuclear proteins in the pathogenesis of an increasing number of human diseases. *J Cell Physiol.* 203:319-27.
- Mattick, J.S. 2003. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays.* 25:930-9.
- Mayer, R., A. Brero, J. von Hase, T. Schroeder, T. Cremer, and S. Dietzel. 2005. Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse. *BMC Cell Biol.* 6:44.
- McKittrick, E., P.R. Gafken, K. Ahmad, and S. Henikoff. 2004. Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:1525-30.
- McPherson, J.D., M. Marra, L. Hillier, R.H. Waterston, A. Chinwalla, J. Wallis, M. Sekhon, K. Wylie, E.R. Mardis, R.K. Wilson, R. Fulton, T.A. Kucaba, C. Wagner-McPherson,

- W.B. Barbazuk, S.G. Gregory, S.J. Humphray, L. French, R.S. Evans, G. Bethel, A. Whittaker, J.L. Holden, O.T. McCann, A. Dunham, C. Soderlund, C.E. Scott, D.R. Bentley, G. Schuler, H.C. Chen, W. Jang, E.D. Green, J.R. Idol, V.V. Maduro, K.T. Montgomery, E. Lee, A. Miller, S. Emerling, Kucherlapati, R. Gibbs, S. Scherer, J.H. Gorrell, E. Sodergren, K. Clerc-Blankenburg, P. Tabor, S. Naylor, D. Garcia, P.J. de Jong, J.J. Catanese, N. Nowak, K. Osoegawa, S. Qin, L. Rowen, A. Madan, M. Dors, L. Hood, B. Trask, C. Friedman, H. Massa, V.G. Cheung, I.R. Kirsch, T. Reid, R. Yonescu, J. Weissenbach, T. Bruls, R. Heilig, E. Branscomb, A. Olsen, N. Doggett, J.F. Cheng, T. Hawkins, R.M. Myers, J. Shang, L. Ramirez, J. Schmutz, O. Velasquez, K. Dixon, N.E. Stone, D.R. Cox, D. Haussler, W.J. Kent, T. Furey, S. Rogic, S. Kennedy, S. Jones, A. Rosenthal, G. Wen, M. Schilhabel, G. Gloeckner, G. Nyakatura, R. Siebert, B. Schlegelberger, J. Korenberg, X.N. Chen, A. Fujiyama, M. Hattori, A. Toyoda, T. Yada, H.S. Park, Y. Sakaki, N. Shimizu, S. Asakawa, et al. 2001. A physical map of the human genome. *Nature*. 409:934-41.
- Misteli, T. 2005. Concepts in nuclear architecture. *Bioessays*. 27:477-87.
- Mitelman, F. 2000. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res*. 462:247-53.
- Moen, P.T., Jr., C.V. Johnson, M. Byron, L.S. Shopland, I.L. de la Serna, A.N. Imbalzano, and J.B. Lawrence. 2004. Repositioning of muscle-specific genes relative to the periphery of SC-35 domains during skeletal myogenesis. *Mol Biol Cell*. 15:197-206.
- Moen, P.T., Jr., K.P. Smith, and J.B. Lawrence. 1995. Compartmentalization of specific pre-mRNA metabolism: an emerging view. *Hum Mol Genet*. 4 Spec No:1779-89.
- Murmann, A.E., J. Gao, M. Encinosa, M. Gautier, M.E. Peter, R. Eils, P. Lichter, and J.D. Rowley. 2005. Local gene density predicts the spatial position of genetic loci in the interphase nucleus. *311:14-26*. 311:14-26.
- Nakamura, H., T. Morita, and C. Sato. 1986. Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus. *Exp Cell Res*. 165:291-7.
- Nan, X., H.H. Ng, C.A. Johnson, C.D. Laherty, B.M. Turner, R.N. Eisenman, and A. Bird. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 393:386-9.
- Neusser, M., V. Schubel, A. Koch, T. Cremer, and S. Mueller. 2007. Comparative analysis of the three-dimensional genome architecture in interphase nuclei of primates. *Chromosoma*. in press.
- Ng, H.H., D.N. Ciccone, K.B. Morshead, M.A. Oettinger, and K. Struhl. 2003. Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:1820-5.
- Nusbaum, C., M.C. Zody, M.L. Borowsky, M. Kamal, C.D. Kodira, T.D. Taylor, C.A. Whittaker, J.L. Chang, C.A. Cuomo, K. Dewar, M.G. FitzGerald, X. Yang, A. Abouelleil, N.R. Allen, S. Anderson, T. Bloom, B. Bugalter, J. Butler, A. Cook, D. DeCaprio, R. Engels, M. Garber, A. Gnirke, N. Hafez, J.L. Hall, C.H. Norman, T. Itoh, D.B. Jaffe, Y. Kuroki, J. Lehoczky, A. Lui, P. Macdonald, E. Mauceli, T.S. Mikkelsen, J.W. Naylor, R. Nicol, C. Nguyen, H. Noguchi, S.B. O'Leary, K. O'Neill, B. Piqani, C.L. Smith, J.A. Talamas, K. Topham, Y. Totoki, A. Toyoda, H.M. Wain, S.K. Young, Q. Zeng, A.R. Zimmer, A. Fujiyama, M. Hattori, B.W. Birren, Y. Sakaki, and E.S. Lander. 2005. DNA sequence and analysis of human chromosome 18. *Nature*. 437:551-5.
- O'Keefe, R.T., S.C. Henderson, and D.L. Spector. 1992. Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J Cell Biol*. 116:1095-110.
- Okazaki, Y., M. Furuno, T. Kasukawa, J. Adachi, H. Bono, S. Kondo, I. Nikaido, N. Osato, R. Saito, H. Suzuki, I. Yamanaka, H. Kiyosawa, K. Yagi, Y. Tomaru, Y. Hasegawa,

- A. Nogami, C. Schonbach, T. Gojobori, R. Baldarelli, D.P. Hill, C. Bult, D.A. Hume, J. Quackenbush, L.M. Schriml, A. Kanapin, H. Matsuda, S. Batalov, K.W. Beisel, J.A. Blake, D. Bradt, V. Brusic, C. Chothia, L.E. Corbani, S. Cousins, E. Dalla, T.A. Dragani, C.F. Fletcher, A. Forrest, K.S. Frazer, T. Gaasterland, M. Gariboldi, C. Gissi, A. Godzik, J. Gough, S. Grimmond, S. Gustincich, N. Hirokawa, I.J. Jackson, E.D. Jarvis, A. Kanai, H. Kawaji, Y. Kawasaki, R.M. Kedzierski, B.L. King, A. Konagaya, I.V. Kurochkin, Y. Lee, B. Lenhard, P.A. Lyons, D.R. Maglott, L. Maltais, L. Marchionni, L. McKenzie, H. Miki, T. Nagashima, K. Numata, T. Okido, W.J. Pavan, G. Pertea, G. Pesole, N. Petrovsky, R. Pillai, J.U. Pontius, D. Qi, S. Ramachandran, T. Ravasi, J.C. Reed, D.J. Reed, J. Reid, B.Z. Ring, M. Ringwald, A. Sandelin, C. Schneider, C.A. Semple, M. Setou, K. Shimada, R. Sultana, Y. Takenaka, M.S. Taylor, R.D. Teasdale, M. Tomita, R. Verardo, L. Wagner, C. Wahlestedt, Y. Wang, Y. Watanabe, C. Wells, L.G. Wilming, A. Wynshaw-Boris, M. Yanagisawa, et al. 2002. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*. 420:563-73.
- Olins, A.L., and D.E. Olins. 1974. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science*. 183:330-2.
- Osborne, C.S., L. Chakalova, K.E. Brown, D. Carter, A. Horton, E. Debrand, B. Goyenechea, J.A. Mitchell, S. Lopes, W. Reik, and P. Fraser. 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet*. 36:1065-71.
- Osoegawa, K., A.G. Mammoser, C. Wu, E. Frengen, C. Zeng, J.J. Catanese, and P.J. de Jong. 2001. A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. *Genome Res*. 11:483-96.
- Parada, L., and T. Misteli. 2002. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol*. 12:425-32.
- Parada, L.A., P.G. McQueen, and T. Misteli. 2004a. Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol*. 5:R44.
- 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., S. Sotiriou, and T. Misteli. 2004b. Spatial genome organization. *Exp Cell Res*. 296:64-70.
- Paulson, J.R., and U.K. Laemmli. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*. 12:817-28.
- Peters, A.H., S. Kubicek, K. Mechtler, R.J. O'Sullivan, A.A. Derijck, L. Perez-Burgos, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Tachibana, Y. Shinkai, J.H. Martens, and T. Jenuwein. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell*. 12:1577-89.
- Pinkel, D., J.W. Gray, B. Trask, G. van den Engh, J. Fuscoe, and H. van Dekken. 1986. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51 Pt 1:151-7.
- Plath, K., J. Fang, S.K. Mlynarczyk-Evans, R. Cao, K.A. Worringer, H. Wang, C.C. de la Cruz, A.P. Otte, B. Panning, and Y. Zhang. 2003. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*. 300:131-5.
- Plath, K., S. Mlynarczyk-Evans, D.A. Nusinow, and B. Panning. 2002. Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu Rev Genet*. 36:233-78.
- Ragoczy, T., A. Telling, T. Sawado, M. Groudine, and S.T. Kosak. 2003. A genetic analysis of chromosome territory looping: diverse roles for distal regulatory elements. *Chromosome Res*. 11:513-25.
- Rappold, G.A., T. Cremer, H.D. Hager, K.E. Davies, C.R. Muller, and T. Yang. 1984. Sex chromosome positions in human interphase nuclei as studied by in situ hybridization with chromosome specific DNA probes. *Hum Genet*. 67:317-25.

- Reichenzeller, M., A. Burzlaff, P. Lichter, and H. Herrmann. 2000. In vivo observation of a nuclear channel-like system: evidence for a distinct interchromosomal domain compartment in interphase cells. *J Struct Biol.* 129:175-85.
- Rice, J.C., and C.D. Allis. 2001. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 13:263-73.
- Rice, J.C., S.D. Briggs, B. Ueberheide, C.M. Barber, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, Y. Shinkai, and C.D. Allis. 2003. Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell.* 12:1591-8.
- Richmond, T.J., and C.A. Davey. 2003. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature.* 423:145-50.
- Richter, K., M. Reichenzeller, S.M. Gorisch, U. Schmidt, M.O. Scheuermann, H. Herrmann, and P. Lichter. 2005. Characterization of a nuclear compartment shared by nuclear bodies applying ectopic protein expression and correlative light and electron microscopy. *Exp Cell Res.* 303:128-37.
- Robertson, K.D. 2005. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 6:597-610.
- 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. 1998. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet.* 32:495-519.
- Saccone, S., and G. Bernardi. 2001. Human chromosomal banding by in situ hybridization of isochores. *Methods Cell Sci.* 23:7-15.
- Saccone, S., C. Federico, and G. Bernardi. 2002. Localization of the gene-richest and the gene-poorest isochores in the interphase nuclei of mammals and birds. *Gene.* 300:169-78.
- 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.
- Saitoh, Y., and U.K. Laemmli. 1994. Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell.* 76:609-22.
- Sarraf, S.A., and I. Stancheva. 2004. Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell.* 15:595-605.
- Schaft, D., A. Roguev, K.M. Kotovic, A. Shevchenko, M. Sarov, A. Shevchenko, K.M. Neugebauer, and A.F. Stewart. 2003. The histone 3 lysine 36 methyltransferase, SET2, is involved in transcriptional elongation. *Nucleic Acids Res.* 31:2475-82.
- Schardin, M., T. Cremer, H.D. Hager, and M. Lang. 1985. Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Hum Genet.* 71:281-7.
- Schermelleh, L., I. Solovei, D. Zink, and T. Cremer. 2001. Two-color fluorescence labeling of early and mid-to-late replicating chromatin in living cells. *Chromosome Res.* 9:77-80.
- Scheuermann, M.O., A.E. Murmann, K. Richter, S.M. Gorisch, H. Herrmann, and P. Lichter. 2005. Characterization of nuclear compartments identified by ectopic markers in mammalian cells with distinctly different karyotype. *Chromosoma.* 114:39-53.
- Scheuermann, M.O., J. Tajbakhsh, A. Kurz, K. Saracoglu, R. Eils, and P. Lichter. 2004. Topology of genes and nontranscribed sequences in human interphase nuclei. *Exp Cell Res.* 301:266-79.
- Schneider, R., A.J. Bannister, F.A. Myers, A.W. Thorne, C. Crane-Robinson, and T. Kouzarides. 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol.* 6:73-7.
- Selig, S., K. Okumura, D.C. Ward, and H. Cedar. 1992. Delineation of DNA replication time zones by fluorescence in situ hybridization. *Embo J.* 11:1217-25.

- Shi, Y., and J.R. Whetstone. 2007. Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell*. 25:1-14.
- Shopland, L.S., C.V. Johnson, M. Byron, J. McNeil, and J.B. Lawrence. 2003. Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods. *J Cell Biol*. 162:981-90.
- Shopland, L.S., C.R. Lynch, K.A. Peterson, K. Thornton, N. Kepper, J. Hase, S. Stein, S. Vincent, K.R. Molloy, G. Kreth, C. Cremer, C.J. Bult, and T.P. O'Brien. 2006. Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence. *J Cell Biol*. 174:27-38.
- Simonis, M., P. Klous, E. Splinter, Y. Moshkin, R. Willemsen, E. de Wit, B. van Steensel, and W. de Laat. 2006. Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat Genet*. 38:1348-54.
- Simpson, R.T. 1978. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry*. 17:5524-31.
- 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.
- Slijepcevic, P., and A.T. Natarajan. 1994. Distribution of X-ray-induced G2 chromatid damage among Chinese hamster chromosomes: influence of chromatin conformation. *Mutat Res*. 323:113-9.
- 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.
- Solovei, I., C. Lanctot, S. Kösem, and T. Cremer. 2007. Unique organization of rod photoreceptor cell nuclei observed in nocturnal mammalian species. . *submitted*.
- Spector, D.L. 2001. Nuclear domains. *J Cell Sci*. 114:2891-3.
- Spector, D.L. 2003. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem*. 72:573-608.
- Spilianakis, C.G., M.D. Lalioti, T. Town, G.R. Lee, and R.A. Flavell. 2005. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*. 435:637-45.
- Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-5.
- Taddei, A., F. Hediger, F.R. Neumann, and S.M. Gasser. 2004. The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu Rev Genet*. 38:305-45.
- Tajbakhsh, J., H. Luz, H. Bornfleth, S. Lampel, C. Cremer, and P. Lichter. 2000. Spatial distribution of GC- and AT-rich DNA sequences within human chromosome territories. *Exp Cell Res*. 255:229-37.
- Takebayashi, S., K. Sugimura, T. Saito, C. Sato, Y. Fukushima, H. Taguchi, and K. Okumura. 2005. Regulation of replication at the R/G chromosomal band boundary and pericentromeric heterochromatin of mammalian cells. *Exp Cell Res*. 304:162-74.
- Tanabe, H., F.A. Habermann, I. Solovei, M. Cremer, and T. Cremer. 2002a. Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat Res*. 504:37-45.
- Tanabe, H., K. Kupper, T. Ishida, M. Neusser, and H. Mizusawa. 2005. Inter- and intra-specific gene-density-correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. *Cytogenet Genome Res*. 108:255-61.

- Tanabe, H., S. Muller, M. Neusser, J. von Hase, E. Calcagno, M. Cremer, I. Solovei, C. Cremer, and T. Cremer. 2002b. Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:4424-9.
- Telenius, H., A.H. Pelmear, A. Tunnacliffe, N.P. Carter, A. Behmel, M.A. Ferguson-Smith, M. Nordenskjold, R. Pfragner, and B.A. Ponder. 1992. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer*. 4:257-63.
- Thomas, J.O. 1999. Histone H1: location and role. *Curr Opin Cell Biol*. 11:312-7.
- van Driel, R., P.F. Fransz, and P.J. Verschure. 2003. The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci*. 116:4067-75.
- Venter, J.C., M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt, J.D. Gocayne, P. Amanatides, R.M. Ballew, D.H. Huson, J.R. Wortman, Q. Zhang, C.D. Kodira, X.H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P.D. Thomas, J. Zhang, G.L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A.G. Clark, J. Nadeau, V.A. McKusick, N. Zinder, A.J. Levine, R.J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A.E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T.J. Heiman, M.E. Higgins, R.R. Ji, Z. Ke, K.A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G.V. Merkulov, N. Milshina, H.M. Moore, A.K. Naik, V.A. Narayan, B. Neelam, D. Nuskern, D.B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science*. 291:1304-51.
- 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., and J.A. Aten. 1999. Chromosomes as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei. *J Cell Sci*. 112 (Pt 19):3353-60.
- Visser, A.E., F. Jaunin, S. Fakan, and J.A. Aten. 2000. High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J Cell Sci*. 113 (Pt 14):2585-93.
- Volkel, P., and P.O. Angrand. 2007. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie*. 89:1-20.
- Volpi, E.V., E. Chevret, T. Jones, R. Vatcheva, J. Williamson, S. Beck, R.D. Campbell, M. Goldsworthy, S.H. Powis, J. Ragoussis, J. Trowsdale, and D. Sheer. 2000. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci*. 113 (Pt 9):1565-76.
- Wakelin, L.P., W.D. McFadyen, A. Walpole, and I.A. Roos. 1984. Interaction of phenylthiolato-(2,2',2''-terpyridine)platinum(II) cation with DNA. *Biochem J*. 222:203-15.
- 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.

- Wansink, D.G., W. Schul, I. van der Kraan, B. van Steensel, R. van Driel, and L. de Jong. 1993. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J Cell Biol.* 122:283-93.
- Warburton, P.E., C.A. Cooke, S. Bourassa, O. Vafa, B.A. Sullivan, G. Stetten, G. Gimelli, D. Warburton, C. Tyler-Smith, K.F. Sullivan, G.G. Poirier, and W.C. Earnshaw. 1997. Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol.* 7:901-4.
- Waterston, R.H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J.F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S.E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M.R. Brent, D.G. Brown, S.D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R.D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A.T. Chinwalla, D.M. Church, M. Clamp, C. Clee, F.S. Collins, L.L. Cook, R.R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K.D. Delehaunty, J. Deri, E.T. Dermitzakis, C. Dewey, N.J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D.M. Dunn, S.R. Eddy, L. Elnitski, R.D. Emes, P. Eswara, E. Eyra, A. Felsenfeld, G.A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W.N. Frankel, L.A. Fulton, R.S. Fulton, T.S. Furey, D. Gage, R.A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T.A. Graves, E.D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R.C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L.W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D.B. Jaffe, L.S. Johnson, M. Jones, T.A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E.K. Karlsson, et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 420:520-62.
- Watt, F.a.M., P.L. 1988. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes and Dev.* 2:1136-1143.
- Wei, X., J. Samarabandu, R.S. Devdhar, A.J. Siegel, R. Acharya, and R. Berezney. 1998. Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science.* 281:1502-6.
- Wei, Y., L. Yu, J. Bowen, M.A. Gorovsky, and C.D. Allis. 1999. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell.* 97:99-109.
- 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.
- Weise, A., H. Starke, A. Heller, C. Uwe, and T. Liehr. 2002. Evidence for interphase DNA decondensation transverse to the chromosome axis: a multicolor banding analysis. *Int J Mol Med.* 9:359-61.
- West, A.G., M. Gaszner, and G. Felsenfeld. 2002. Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* 16:271-88.
- White, E.J., O. Emanuelsson, D. Scalzo, T. Royce, S. Kosak, E.J. Oakeley, S. Weissman, M. Gerstein, M. Groudine, M. Snyder, and D. Schubeler. 2004. DNA replication-timing analysis of human chromosome 22 at high resolution and different developmental states. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:17771-6.
- Williams, R.R. 2003. Transcription and the territory: the ins and outs of gene positioning. *Trends Genet.* 19:298-302.
- Williams, R.R., V. Azuara, P. Perry, S. Sauer, M. Dvorkina, H. Jorgensen, J. Roix, P. McQueen, T. Misteli, M. Merkenschlager, and A.G. Fisher. 2006. Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus. *J Cell Sci.* 119:132-40.

- 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.
- Wischnitzer, S. 1973. The submicroscopic morphology of the interphase nucleus. *Int Rev Cytol.* 34:1-48.
- Woodfine, K., H. Fiegler, D.M. Beare, J.E. Collins, O.T. McCann, B.D. Young, S. Debernardi, R. Mott, I. Dunham, and N.P. Carter. 2004. Replication timing of the human genome. *Hum Mol Genet.* 13:191-202.
- Wurtele, H., and A. Verreault. 2006. Histone post-translational modifications and the response to DNA double-strand breaks. *Curr Opin Cell Biol.* 18:137-44.
- 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.
- Yunis, J.J. 1981. Mid-prophase human chromosomes. The attainment of 2000 bands. *Hum Genet.* 56:293-8.
- Zhao, Z., G. Tavoosidana, M. Sjolinder, A. Gondor, P. Mariano, S. Wang, C. Kanduri, M. Lezcano, K.S. Sandhu, U. Singh, V. Pant, V. Tiwari, S. Kurukuti, and R. Ohlsson. 2006. Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet.* 38:1341-7.
- Zink, D., M.D. Amaral, A. Englmann, S. Lang, L.A. Clarke, C. Rudolph, F. Alt, K. Luther, C. Braz, N. Sadoni, J. Rosenecker, and D. Schindelbauer. 2004. Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *J Cell Biol.* 166:815-25.
- Zink, D., H. Bornfleth, A. Visser, C. Cremer, and T. Cremer. 1999. Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories. *Exp Cell Res.* 247:176-88.
- Zink, D., T. Cremer, R. Saffrich, R. Fischer, M.F. Trendelenburg, W. Ansorge, and E.H. Stelzer. 1998. Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum Genet.* 102:241-51.
- Zinner, R., H. Albiez, J. Walter, A.H. Peters, T. Cremer, and M. Cremer. 2005. Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones. *Histochem Cell Biol.* 1-17.
- Zinner, R., K. Teller, T. Cremer, and M. Cremer. 2007. Biochemistry meets nuclear architecture: Spatial colocalization of various histone methylations to specific chromosome territories, chromatin segments and differentially expressed genes analyzed by multicolor immuno-FISH. *in press.*
- 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

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, **Prof. Dr. Thomas Cremer** dafür bedanken, dass er mich mit seiner Begeisterung für die Zellkernarchitektur ansteckte und mir die Möglichkeit bot in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Seine positive fachliche sowie persönliche Betreuung während meiner Promotion war mir stets eine große Hilfe.

Ein großer Dank gebührt auch **Dr. Marion Cremer** für ihre perfekte Betreuung, die vielen Diskussion und Anregungen und das Weitergeben ihres schier unermesslich scheinenden Erfahrungsschatzes. Ihre Unterstützung trug massgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Bei **Dr. Angelika Böttger** möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation bedanken.

Vielen Dank an **Dr. Johann von Hase, Alexandra Kölbl, Dorothee Biener, Sandra Dittrich** und **Tobias Thormeyer**, deren Zusammenarbeit es ermöglichte die Datenflut dieser Dissertation zu bewältigen.

Ein Dankeschön auch an alle anderen aktuellen sowie ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe, die dazu beigetragen haben, ein hervorragendes Arbeitsklima zu schaffen: **Dr. Stefan Müller** und **Dr. Michaela Neusser** für die aufbauenden Gespräche während der Zigarettenpausen, **Dr. Sandro Brero** und **Dr. Lothar Schermelleh** für ihre Vorbildfunktion, **Dr. Joachim Walter** für die kleinen Makros und für die Programmierung diverser Auswertungssoftware, **Dr. Steffen Dietzel** für die Diskussionen und die mehrfache, fachmännische Hilfe bei Computerproblemen, **Dr. Irina Solovei** für ihre didaktisch einzigartigen Folien, **Dr. Boris Joffe** für den Versuch, mir die Statistik begreiflich zu machen, **Dr. Robert Mayer** für seine unschlagbare Ironie, **Daniela Köhler** einfach dafür, dass sie da ist, **Kathrin Teller** für ihre Einblicke in die Relativität und ihr Verständnis für gr. Fragen, **Heiner Albiez** für fröhliche Mittagessen in Südfrankreich, **Roman Zinner** für die hochwertigen, musikalischen Beiträge in Miesbach und unzählige Espressi, **Claudia Hepperger** für Isarparties und die Geschichten vom Pferd, **Florian (Peter) Grasser** dafür, dass er mich forderte und förderte (und fürs Kuchenrezept von seiner Mama), **Hilmar Strickfaden** für seine Textsicherheit bezüglich aller Ärztesongs, sowie **Andreas Zunhammer** und **Jens Nagel** für die Planung einer perfekten Weihnachtsfeier.

Ein besonderer Dank gebührt **Claudia Weierich**, die mir in ihrer hilfsbereiten, selbstlosen Art während meiner gesamten Doktorarbeit stets mit Rat und Tat unerschütterlich zur Seite stand, sowie meinem Freund **Dominik Faitz**, der während der Schreibphase meine Unausgeschlafenheit und die daraus resultierende, schlechte Laune, sowie diverse Verzweiflungsanfälle mit seiner bewundernswerten ruhigen und liebevollen Art auffing.

Ein Danke auch an **meine Eltern** für ihre Unterstützung und ihre unerschrockenen Motivierungsversuche, sowie an meinen ehemaligen Biologielehrer **Ulrich Haeckel**, der den Stein ins Rollen gebracht hat.

Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name	Katrin Küpper
Geburtsdatum und Ort	24.02.1976 in München
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

Sept. 1982- Juli 1986	Grundschule
Sept. 1986- Juni 1995	Gymnasium
30. Juni 1995	Abschluss: Abitur

Studium

Okt. 1995 – Juli 2001	Studiengang Diplom Biologie Ludwig-Maximilians-Universität München
19. Juli 2001	Abschluss: Diplom-Biologin univ.

Berufliche Praxis

13. Aug. 2001 – 30. Nov. 2001	Infratest Sozialforschung Datenprüferin IAB Betriebspanel 2001
1. Dez. 2001 – 30. März 2007	Doktorarbeit Biologie Ludwig-Maximilian-Universität München Anthropologie und Humangenetik Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Cremer Thema: <i>Untersuchungen zur Zellkernarchitektur: Analyse des Einflusses verschiedener Chromatineigenschaften auf die räumliche Anordnung subchromosomaler Segmente bezüglich der Zellkerne sowie der Chromosomenterritorien anhand von HSA 11, 12, 18 und 19.</i>

Vorraussichtlicher Termin der Doktorprüfung	Mai 2007
--	----------

Publikationen

Albiez, H., M. Cremer, C. Tiberi, L. Vecchio, L. Schermelleh, S. Dittrich, K. Kupper, B. Joffe, T. Thormeyer, J. von Hase, S. Yang, K. Rohr, H. Leonhardt, I. Solovei, C. Cremer, S. Fakan, and T. Cremer. **2006**. Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome Res.* 14:707-33.

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, 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.

Kupper, K., A. Kolbl, D. Biener, S. Dittrich, J. von Hase, T. Thormeyer, H. Fiegler, N.P. Carter, M.R. Speicher, T. Cremer, and M. Cremer. **2007**. Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma*.

Tanabe, H., K. Kupper, T. Ishida, M. Neusser, and H. Mizusawa. **2005**. Inter- and intra-specific gene-density-correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. *Cytogenet Genome Res.* 108:255-61.

Von Hase, J., K. Kupper, H. Albiez, C. Weierich, D. Köhler, G. Kreth, K. Mills, C. Cremer. **In preparation**. High precision absolute distance determination from intra nuclear surfaces (ADS) versus relative radial distances (RRD) in fluorescence microscopy.

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Materialien und Quellen durchgeführt habe.

München, den 15.03.2007

Katrin Küpper

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit bestätige ich, dass ich vor dieser Arbeit keine anderen Promotionsversuche unternommen habe. Dies ist meine erste und einzige Dissertation.

München, den 15.03.2007

Katrin Küpper

7. Anhang

7.1 Übersicht über die verwendeten BAC-Klone.....	184
7.2 Silico-Verdau mit pDRAW32.....	192
7.3 Primersuche mit FastPCR.....	197
7.3.1 Fast PCR.....	197
7.3.2 Liste alle verwendeter Primer.....	200
7.4 Anleitung für das ADS Programm.....	201
7.5 Distanzmessung mit dem ImageJ PlugIn „Correlation function 3D“.....	205
7.5.1 Parameterdatei.....	205
7.5.2 Vorlageskript.....	206
7.6 Datenbankrecherche.....	210
7.6.1 Bandenzuordnung.....	210
7.6.2 Position.....	210
7.6.3 Anzahl der enthaltenen Gene und Gendichte.....	210
7.6.4 GC-Gehalt.....	211
7.6.5 Transkriptionelle Aktivität.....	211
7.6.6 Replikationsindex.....	212
7.6.7 Anzahl und Dichte der Alu-Sequenzen.....	212
7.7 Anordnung der BAC-Pools innerhalb des Zellkerns.....	213
7.7.1 Ergebnisse der humanen Lymphozyten.....	213
7.7.2 Ergebnisse der humanen Fibroblasten.....	216
7.8 Anordnung der BAC-Pools innerhalb der Chromosomenterritorien.....	218
7.8.1 Beispiele für die Auswertungen mit dem erweiterten 3D-RRD Programm.....	218
7.8.2 Anordnung der BACs im Bezug zur Oberfläche der Chromosomenterritorien....	219
7.8.3 Analyse der CT-Struktur: Maximum Brightness Center (MBCs).....	221

7.1 Übersicht über die verwendeten BAC-Klone

Table 7.1.1: R-/G-Banden BAC pool und Gendichte BAC pool von Chromosom 12

Clone ID	Internal ID	Band assignment	Position	G/R band	Pool assignments	Gene density 2Mb	Gene density 10Mb	Genes contained	GC content	Transcriptional activity	Replication Index	Reference Clone
RP11-283I3	12/1	12p13.33	155K – 330K	R	R -	9	16.5	4	45.3%	HLy: low HFb: median	1.605 median	---
RP11-359B12	12/2	12p13.33	860K – 1085K	R	R -	9	16.5	3	43.4%	HLy: median HFb: median	1.717 early	---
RP11-388F6	12/3	12p13.32	4315K – 4485K	G (1)	G gene-rich	12.5	16.5	4	41.7%	HLy: low HFb: median	1.667 early	---
RP11-433J6	12/4	12p13.31	6580K-6750K	R	R gene-rich	28	19.7	10	49.5%	HLy: median HFb: high	1.736 early	---
RP11-13C13	12/5	12p13.2	10125K-10290K	G (2)	G gene-rich	28	19.5	6	39.8%	HLy: low HFb: high	1.645 early	---
RP11-4N23	12/6	12p13.1	13505K-13640K	R	R gene-rich	9	13	1	41.1%	HLy: low HFb: low	1.461 median	---
RP11-502N13	12/7	12p13.1	14520K-14700K	R	R gene-rich	9	11.4	3	40.5%	HLy: low HFb: median	1.565 median	RP11-109N5
RP11-489N6	12/8	12p12.3	15980K-16170K	G (3)	G gene-rich	7.5	7	1	38.8%	HLy: low HFb: median	1.433 median	---
RP11-69C13	12/9	12p12.3	16640K-16785K	G (3)	G gene-poor	6	7.3	1	35.8%	HLy: low HFb: low	1.373 late	---
RP11-871F6	12/10	12p12.3	17425K-17640K	G (3)	G gene-poor	4	7.2	2	35.3%	HLy: ??? HFb: ???	1.292 late	RP11-161L1
RP11-729I10	12/11	12p12.1	21775K-21960K	G (3)	G gene-poor	9	4.8	2	36.5%	HLy: low HFb: low	1.357 late	RP11-59N23
RP11-12D15	12/12	12p12.1	22210K-22370K	G (3)	G gene-poor	7	5.4	1	38.5%	HLy: low HFb: low	1.455 median	---
RP11-877E17	12/13	12p12.1	25985K-26165K	G (3)	G gene-poor	8	5.9	1	38.7%	HLy: low HFb: low	1.625 median	RP11-16A24
RP11-485K18	12/14	12p11.22	28290K-28465K	G (2)	G gene-poor	5.5	6.2	1	34.8%	HLy: low HFb: median	1.352 late	RP11-425D17
RP11-498B21	12/15	12q12	39750K-39940K	G (3)	G -	3.5	4.4	0	36.0%	HLy: low HFb: low	1.311 late	---
RP11-490D11	12/16	12q12	40110K-40280K	G (3)	G -	5.5	4.5	1	36.7%	HLy: low HFb: low	1.333 late	RP11-184I5
RP11-510P12	12/17	12q12	41500K-41670K	G (3)	G -	9	5.6	0	37.8%	HLy: low HFb: low	1.388 late	---
RP11-624G19	12/18	12q12	42530K-42690K	G (3)	G -	6	9.1	2	38.7%	HLy: ??? HFb: ???	1.500 median	RP11-329A19
RP11-559C10	12/19	12q12	43180K-43370K	G (3)	G -	6	10	1	36.7%	HLy: low HFb: low	1.459 median	---
RP11-176J16	12/20	12q12	43510K-43650K	G (3)	G -	4.5	10.5	1	37.4%	HLy: low HFb: low	1.431 median	---
RP11-480H15	12/21	12q13.11	47235K-47425K	R	R gene-rich	28.5	18.7	6	44.5%	HLy: low HFb: median	1.569 median	---

RP11-1100L3	12/22	12q13.13	50550K-50765K	R	R gene-rich	29	27.5	6	50.6%	HLy: low HFb: high	1.591 median	RP11-324C17
RP11-624J6	12/23	12q13.13	51750K-51955K	R	R gene-rich	38	30.2	10	51.6%	HLy: low HFb: high	1.610 median	RP11-323I9
RP11-681G7	12/24	12q13.2	53145K-53355K	G (1)	G gene-rich	27	26	6	42.2%	HLy: median HFb: low	1.660 early	RP11-192J19
RP11-973D8	12/25	12q13.2	54580K-54795K	G (1)	G gene-rich	38.5	23.8	10	47.0%	HLy: high HFb: high	1.784 early	RP11-152L9
RP11-799O6	12/26	12q13.3	55625K-55825K	R	R gene-rich	37.5	21.8	10	48.3%	HLy: low HFb: high	1.772 early	RP11-545N8
RP11-557F20	12/27	12q14.1	57605K-57765K	G (2)	G -	2.5	16.2	0	36.5%	HLy: low HFb: low	1.283 late	---
RP11-1143G9	12/28	12q15	67910K-68060K	R	R -	10	6.4	3	38.3%	HLy: low HFb: median	1.670 early	RP11-324P9
RP11-1022D13	12/29	12q15	68180K-68370K	R	R -	11	6.3	5	41.7%	HLy: high HFb: high	1.665 early	RP11-15L3
RP11-148D15	12/30	12q21.2	76670K-76845K	R	R gene-poor	2	3.6	1	36.0%	HLy: low HFb: median	1.363 late	---
RP11-362A1	12/31	12q21.31	80805K-80950K	G (3)	G gene-poor	2.5	3	0	36.1%	HLy: low HFb: low	1.304 late	---
RP11-900F13	12/32	12q21.32	87350K-87525K	R	R gene-poor	5	3.9	1	37.1%	HLy: low HFb: low	1.391 late	RP11-464G3
RP11-81H17	12/33	12q21.33	88300K-88485K	G (3)	G gene-poor	4	4.9	3	38.9%	HLy: low HFb: low	1.563 median	---
RP11-40P18	12/34	12q21.33	89170K-89360K	G (3)	G gene-poor	6	4.9	0	35.3%	HLy: low HFb: low	1.515 median	---
RP11-917O5	12/35	12q21.33	89910K-90090K	G (3)	G gene-poor	3.5	5	3	34.6%	HLy: low HFb: high	1.462 median	RP11-424L2
RP11-18B24	12/36	12q22	92275K-92430K	R	R -	6.5	5.4	3	43.7%	HLy: median HFb: high	1.688 early	---
RP11-690J15	12/37	12q23.1	96845K-97030K	G (2)	G -	4	7.1	0	39.4%	HLy: low HFb: low	1.331 late	RP11-552H16
RP11-482D24	12/38	12q23.3	105550K-105730K	G (2)	G -	8	10.2	2	41.3%	HLy: low HFb: low	1.556 median	---
RP11-90N16	12/39	12q23.3	106080K-106245K	G (2)	G -	8	10.5	1	42.7%	HLy: ??? HFb: ???	1.501 median	RP11-561I21
RP11-608E13	12/40	12q24.11	108465K-108625K	R	R gene-rich	17.5	11.4	2	49.8%	HLy: median HFb: high	1.656 early	RP1-7G5
RP11-25E2	12/41	12q24.21	113915K-114105K	G (2)	G gene-rich	3.5	8.5	0	41.3%	HLy: low HFb: low	1.293 late	---
RP11-131H7	12/42	12q24.23	117565K-117755K	G (2)	G gene-rich	7.5	11	0	42.4%	HLy: low HFb: low	1.356 late	---
RP11-87C12	12/43	12q24.31	120770K-120960K	R	R gene-rich	18.5	11.9	3	48.4%	HLy: low HFb: high	1.780 early	---
RP11-512M8	12/44	12q24.31	121150K-121340K	R	R gene-rich	18.5	11.9	5	46.5%	HLy: low HFb: high	1.811 early	---
RP11-486O12	12/45	12q24.31	122415K-122615K	R	R gene-rich	16	11.6	6	48.1%	HLy: median HFb: high	1.654 early	---
RP11-380L11	12/46	12q24.31	122825K-123025K	R	R gene-rich	13	11.9	3	47.6%	HLy: median HFb: high	1.720 early	---
RP11-205M16	12/47	12q24.32	125875K-126030K	G (2)	G -	5	8.6	1	40.0%	HLy: ??? HFb: ???	1.276 late	RP11-111F6
RP11-394D10	12/48	12q24.33	132135K-132315K	R	R -	17.5	8.2	5	40.7%	HLy: low HFb: median	1.520 median	RP11-46H11

Table 7.1.2: Expression BAC pool für humane Lymphozyten von Chromosom 12

Clone ID	Internal ID	Band assignment	Position	G/R band	Gene density 2Mb	Gene density 10Mb	Genes contained	GC content	Transcriptional activity (=Pool assignment)	Replication Index	Reference Clone
RP11-74M9	12LyEx1	12p13.32	4253K-4279K	G(1)	11.5	17.5	1	43.7%	high	1.685 early	RP11-264F23
RP11-688K16	12LyEx4	12p13.1	13084K-13235K	R	10.5	14	2	41.7%	low	1.573 median	RP11-484P22
RP11-161A14	12LyEx5	12p13.1	13253K-13430K	R	9	13.4	1	41.4%	low	1.537 median	RP11-97G17
RP11-233G1	12LyEx6	12p12.3	14833K-15013K	G(3)	10	10.7	4	37.5%	high	1.593 median	---
RP11-80N2	12LyEx7	12p12.2	20833K-21009K	R	8	4.9	1	35.6%	low	1.289 late	---
RP11-161E16	12LyEx9	12q13.12	48413K-48564K	G(1)	23.5	21.1	2	45.9%	high	1.761 early	---
RP11-616L12	12LyEx14	12q13.2	53665K-53867K	G(1)	31.5	24.9	1	38.0%	low	1.475 median	RP11-101M22
RP11-973D8	12LyEx15	12q13.2	54583K-54797K	G(1)	38.5	23.8	9	45.5%	high	1.784 early	RP11-152L9
RP11-369C14	12LyEx16	12q13.3	55287K-55437K	R	41.5	22.7	5	45.6%	high	1.815 early	---
RP11-5J6	12LyEx18	12q15	66705K-66882K	R	8.5	7.1	2	37.51%	high	1.672 early	---
RP11-1022D13	12LyEx19	12q15	68179K-68369K	R	11	6.3	2	38.9%	high	1.664 early	RP11-23C15
RP11-98E6	12LyEx22	12q21.1	71041K-71192K	G(2)	4.5	5.8	1	34.3%	low	1.364 late	---
RP11-385F23	12LyEx23	12q21.1	71191K-71299K	G(2)	4.5	5.8	1	32.9%	low	1.296 late	---
RP11-12K6	12LyEx24	12q21.1	71276K-71427K	G(2)	3.5	5.7	1	35.3%	low	1.381 late	---
RP11-290L1	12LyEx25	12q21.2	74591K-74770K	R	7	4	2	39.3%	high	1.628 median	---
RP11-481K9	12LyEx26	12q23.1	97449K-97545K	G(2)	3.5	6.8	2	41.3%	high	1.678 early	---
RP11-490H24	12LyEx30	12q23.3	102819K-102991K	G(2)	7	8.1	4	39.7%	high	1.747 early	---
RP11-76H21	12LyEx31	12q24.11	109864K-110015K	R	14.5	10.9	1	46.0%	low	1.676 early	RP3 -336P3
RP11-176D08	12LyEx32	12q24.11-24.12	110096K-110254K	R + G(2)	15.5	10.6	1	48.3%	low	1.671 early	RP11-379N20
RP11-636B16	12LyEx33	12q24.21	113425K-113575K	G(2)	3.5	8.8	1	43.5%	low	1.253 late	RP11-324E24
RP11-144B2	12LyEx34	12q24.23	119040K-119260K	G(2)	18	11.8	4	48.4%	high	1.678 early	---
RP11-50I20	12LyEx35	12q24.23-24.23	119242K-119392K	G(2) + R	18.5	11.7	4	46.9%	high	1.678 early	RP11-144B2

Table 7.1.3: Expression BAC pool für humane Fibroblasten von Chromosom 12

Clone ID	Internal ID	Band assignment	Position	G/R band	Gene density 2Mb	Gene density 10Mb	Genes contained	GC content	Transcriptional activity (=pool assignment)	Replication Index	Reference Clone
RP11-150J21	12FbEx3	12p13.31	6742K-6893K	R	30.5	19.6	8	51.8%	high	1.776 early	RP11-8J11
RP11-157G21	12FbEx4	12p13.31	7460K-7637K	R	31	19.6	1	37.9%	low	1.509 median	---
RP11-69M1	12FbEx5	12p13.1	7988K-8174K	R	20.5	20.1	4	43.7%	low	1.701 early	---
RP11-20D14	12FbEx6	12p12.31	8690K-8864K	R	21.5	19.8	1	42.6%	high	1.645 early	---
RP11-118B22	12FbEx7	12p13.1	9190K-9317K	R	23	19.4	2	37.6%	low	1.599 median	---
RP11-80N2	12FbEx8	12p12.2	20833K-21009K	R	8	4.9	1	36.7%	low	1.289 late	---
RP11-92H16	12FbEx9	12p12.1	21633K-21784K	G(3)	9.5	4.8	2	38.1%	high	1.363 late	---
RP11-993B23	12FbEx12	12p11.22	27882K-28040K	G(2)	8	6.2	1	39.8%	low	1.71 early	RP11-299E2
RP11-76H15	12FbEx13	12q13.11	45001K-45162K	R	5.5	12.7	1	39.1%	high	1.638 early	RP11-474P2
RP11-1136G11	12FbEx15	12q13.13	51745K-51903K	R	38	30.5	5	48.5%	high	1.61 median	RP11-323I9
RP11-616L12	12FbEx17	12q13.2	53665K-53867K	G(1)	31.5	24.9	1	38.0%	low	1.475 median	RP11-101M22
RP11-715H19	12FbEx19	12q14.2	61745K-61896K	R	7	4.6	1	38.6%	low	1.391 late	RP11-263K23
RP11-18J9	12FbEx21	12q21.31	84703K-84875K	G(3)	4.5	3.2	2	35.0%	low	1.293 late	---
RP11-481K9	12FbEx22	12q23.1	97449K-97545K	G(2)	3.5	6.8	2	42.5%	high	1.678 early	---
RP11-210L7	12FbEx23	12q23.2	101290K-101460K	R	8	6.9	1	40.6%	low	1.632 median	---
RP11-144B2	12FbEx24	12q24.23	119040K-119225K	G	18	11.8	6	49.9%	high	1.678 early	---
RP11-282O18	12FbEx25	12q24.31	122244K-122332K	R	17	11.5	3	47.1%	high	1.699 early	---
RP11-592O2	12FbEx26	12q24.31	123817K-123939K	R	6	11.3	2	50.0%	high	1.789 early	RP11-22H15

Table 7.1.4: R-/G-Banden BAC pool von Chromosom 18

Clone ID	Internal ID	Band assignment	Position	G/R band (= pool assignment)	Gene density 2Mb	Gene density 10Mb	Genes contained	GC content	Transcriptional activity	Replication Index	Reference Clone
RP11-88C10	18/1	18p11.32	620K-782K	R	8.5	6.2	4	42.3%	HLb: high HFb: high	1.542 median	RP11-552E8
RP11-78H1	18/2	18p11.32	2136K-2307K	R	4.5	6.2	0	38.6%	HLb: low HFb: low	1.559 median	RP11-46L19
RP11-113J12	18/3	18p11.31	3431K-3596K	G(2)	8	6.2	2	43.1%	HLb: low HFb: median	1.572 median	RP11-537E1

RP11-102E12	18/4	18p11.31	4457K-4614K	G(2)	4	6.2	0	36.4%	HLb: low HFb: low	1.270 late	RP11-183C12
RP11-105C15	18/5	18p11.31	5910K-6063K	G(2)	6	5.5	1	41.2%	HLb: ??? HFb: ???	1.550 median	RP11-489P16
RP11-24G5	18/6	18p11.22	10150K-10317K	G (1-2)	8.5	8.2	1	43.7%	HLb: ??? HFb: ???	1.544 median	RP11-138E9
RP11-151D11	18/7	18p11.21	13082K-13241K	R	9	8.2	0	44.9%	HLb: low HFb: low	1.612 median	RP11-240N19
RP11-16A21	18/8	18p11.21	12430K-12610K	R	10.5	7.9	1	40.8%	HLb: ??? HFb: ???	1.658 early	RP11-16G23
RP11-10G8	18/9	18q11.2	17274K-17431K	R	6	7.2	2	41.7%	HLb: low HFb: low	1.584 median	RP11-380C8
RP11-59E12	18/10	18q11.2	19624K-19811K	R	9	5.2	1	42.6%	HLb: low HFb: low	1.784 early	RP11-403A21
RP11-111H24	18/11	18q12.1	23277K-23441K	G(3)	4	5.4	1	37.2%	HLb: ??? HFb: ???	1.247 late	RP11-164E4
RP11-19F14	18/12	18q12.1	28038K-28227K	G(3)	9.5	4.8	2	39.9%	HLb: low HFb: low	1.576 median	RP11-344B2
RP11-90B5	18/13	18q12.2	32375K-32552K	R	5.5	3.8	1	41.8%	HLb: low HFb: median	1.532 median	RP11-60O17
RP11-265I6	18/14	18q12.3	35983K-36149K	G(2)	0.5	2.7	0	35.3%	HLb: low HFb: low	1.279 late	RP11-10C23
RP11-20H17	18/15	18q21.1	44018K-44172K	R	3.5	4.6	0	45.1%	HLb: low HFb: low	1.542 median	RP11-199B23
RP11-153B11	18/16	18q21.31	52818K-52977K	R	7	5.3	3	44.3%	HLb: low HFb: low	1.495 median	RP11-353J7
RP11-40D15	18/17	18q21.32	56786K-56946K	G(2)	5.5	6.5	0	36.1%	HLb: low HFb: low	1.280 late	RP11-90N14
RP11-3K7	18/18	18q22.1	61064K-61219K	G(3)	0.5	4.0	0	34.7%	HLb: low HFb: low	1.267 late	---
RP11-105L16	18/19	18q22.1	64478K-64627K	G(3)	2	2.4	1	36.6%	HLb: ??? HFb: ???	1.391 late	RP11-106E15
RP11-49H23	18/20	18q22.2	64908K-65089K	R	2.5	2.0	0	34.9%	HLb: low HFb: low	1.326 late	RP11-553N15
RP11-57F7	18/21	18q22.3	66823K-66981K	G (1-2)	2.5	2.8	0	36.3%	HLb: low HFb: low	1.339 late	RP11-23D16
RP11-53N15	18/22	18q22.3	70032K-70196K	G (1-2)	5	4.5	1	41.6%	HLb: low HFb: median	1.420 median	RP11-504H5
RP11-61A18	18/23	18q23	72100K-72260K	R	5	5.7	1	44.9%	HLb: low HFb: low	1.493 median	RP11-504I13
RP11-4B17	18/24	18q23	72860K-72909K	R	5.5	5.7	0	48.2%	HLb: low HFb: low	1.589 median	RP11-321H2
RP11-130J1	18/25	18q23	73050K-73219K	R	6	5.7	2	42.4%	HLb: low HFb: low	1.491 median	---
RP11-7H17	18/26	18q23	75216K-75402K	R	12.5	5.7	2	55.2%	HLb: low HFb: median	1.437 median	RP11-196B3
RP11-87C15	18/27	18q23	75818K-75974K	R	12.5	5.7	5	46.2%	HLb: median HFb: median	1.571 median	RP11-93F7

Table 7.1.5: R-/G-Banden BAC pool von Chromosom 19

Clone ID	Internal ID	Band assignment	Position	G/R band (= pool assignment)	Gene density 2Mb	Gene density 10Mb	Genes contained	GC-content	Transcriptional activity	Replication Index	Reference Clone
RP11-268O21	19/1	19p13.3	2928K-3109K	R	30	30.9	6	54,7%	HLy: median HFb: high	1.671 early	---
RP11-565J3	19/2	19p13.3	5713K-5893K	R	25	30,8	11	54,8%	HLy: low HFb: median	1.623 early	RP11-137E22
RP11-79F15	19/3	19p13.2	8750K-8864K	G(1)	31	30.1	3	45,4%	HLy: ??? HFb: ???	1.587 Median	RP11-203K6
RP11-197O4	19/4	19p13.2	10249K-10410K	G(1)	32	31.5	8	54,4%	HLy: median HFb: median	1.743 early	RP11-475E8
RP11-737I1	19/5	19p13.12	15475K-15676K	G(1)	33	31.7	6	47,1%	HLy: low HFb: high	1.620 early	RP11-143B9
RP11-413M18	19/6	19p13.11	16712K-16899K	R	29	27.8	4	50,9%	HLy: low HFb: median	1.634 early	RP11-348B24
RP11-31D10	19/9	19q13.11	39390K-39546K	R	20.5	19.8	3	45,3%	HLy: low HFb: median	1.731 early	---
RP11-44B13	19/10	19q13.12	42039K-42219K	G (1-2)	26	28	6	40,8%	HLy: low HFb: low	1.399 late	RP11-240N23
RP11-46C6	19/11	19q13.31	48622K-48834K	R	32	32.5	10	50,3%	HLy: median HFb: high	1.682 early	---
RP11-21J15	19/12	19q13.31	49372K-49522K	R	36	34.7	6	47,7%	HLy: median HFb: median	1.466 median	RP11-350D9
RP11-43N16	19/13	19q13.32	52549K-52717K	G (1-2)	25	36.7	6	53,8%	HLy: low HFb: high	1.623 early	---
RP11-50I11	19/14	19q13.33	54367K-54539K	R	52	37	4	46,9%	HLy: median HFb: median	1.710 early	---
RP11-795B6	19/15	19q13.41	55987K-56202K	G (1-2)	39	37.9	13	50,0%	HLy: low HFb: median	1.656 early	RP11-288H1
RP11-44L20	19/16	19q13.41	58164K-58336K	G (1-2)	28.5	38.5	7	45,4%	HLy: median HFb: high	1.384 late	RP11-357H4
RP11-45K21	19/17	19q13.42	61094K-61269K	R	34.5	33.4	3	44,2%	HLy: ??? HFb: ???	1.502 median	RP11-345A9
RP11-420P11	19/18	19q13.43	63217K-633879K	G (1-2)	32.5	33.4	6	49,4%	HLy: low HFb: median	1.479 median	RP11-354N17

Table 7.1.6: BACs für die Untersuchung von Genen mit inversen Eigenschaften (Chromosom 12)

Clone ID	Internal ID	Band assignment	Position	G/R band	Gene density 2Mb	Gene density 10Mb	Genes contained	GC content	Transcriptional activity (=Pool assignment)	Replication Index	Reference Clone
RP11-616L12	12LyEx14	12q13.2	53665K-53867K	G(1)	31.5	24.9	NEUROD4	38.0%	low	1.475 median	RP11-101M22
RP11-369C14	12LyEx16	12q13.3	55287K-55437K	R	41.5	22.7	ATP5B	45.6%	high	1.815 early	---
RP11-290L1	12LyEx25	12q21.2	74591K-74770K	R	7	4	NAP1L1	39.3%	high	1.628 median	---

Table 7.1.7: Genarmer BAC Pool für das Chromosom 19

Clone ID	Internal ID	Band assignment	Position	G/R band	Gene density 2Mb	Gene density 10Mb	Genes contained	GC-content	Transcriptional activity	Replication timing	Reference Clone
RP11-1146H23	2/19cen	19p12	21403K-21554K	G cen	14	15.9	3	42.9%	HLy: ??? HFb: ???	1.362 late	RP11-431C20
RP11-161F3	3/19cen	19p12	21609K-21759K	G Cen	15	15.3	2	40,4%	HLy: ??? HFb: ???	1.398 late	---
RP11-878D12	5/19cen	19p12	21947K-22098K	G Cen	15	14.9	2	40.3%	HLy: low HFb: low	1.321 late	RP11-103A8
RP11-977H24	6/19cen	19p12	22126K-22277K	G Cen	14.5	14.6	2	39.4%	HLy: ??? HFb: ???	1.288 late	RP11-157B13
RP11-39F10	7/19cen	19p12	22278K-22446K	G Cen	14	13.5	4	40.6%	HLy: ??? HFb: ???	1.305 late	RP11-383J11
RP11-884E6	8/19cen	19p12	22463K-22613K	G Cen	12	12.8	3	45.5%	HLy: ??? HFb: ???	1.281 late	RP11-10111
RP11-1007G22	9/19cen	19p12	22639K-22832K	G Cen	13.5	12.5	3	41,2%	HLy: ??? HFb: ???	1.296 late	CTC-452A6
RP11-1010N23	10/19cen	19p12	22880K-23030K	G Cen	14	11.7	1	40.9%	HLy: ??? HFb: ???	1.344 late	RP11-119P7
RP11-425G11	12/19cen	19p12	23198K-23349K	G Cen	13	10.5	2	41.7%	HLy: low HFb: low	1.376 late	RP11-164G16
RP11-274A19	15/19cen	19p12	23638K-23807K	G Cen	8	9.1	2	41,3%	HLy: ??? HFb: ???	1.418 median	RP11-255H23
RP11-845E4	16/19cen	19p12	23807K-23958K	G Cen	7	8.5	2	41.1%	HLy: ??? HFb: ???	1.418 median	RP11-255H23
RP11-762E17	20/19cen	19q12	32839K-32989K	G Cen	1	3	0	42,3%	HLy: low HFb: low	1.380 late	RP11-197B9
RP11-467P20	22/19cen	19q12	33135K-33286K	G Cen	2	3.4	0	42,6%	HLy: low HFb: low	1.374 late	RP11-112O13
RP11-965L14	24/19cen	19q12	33502K-33652K	G Cen	3	4.3	0	43.5%	HLy: low HFb: low	1.303 late	RP11-140G12
RP11-156I11	27/19cen	19q12	34004K-34186K	G Cen	5.5	4.6	2	45.9%	HLy: ??? HFb: ???	1.330 late	RP11-348J8
RP11-360M15	28/19cen	19q12	34201K-34351K	G Cen	6.5	4.7	0	46.5%	HLy: low HFb: low	1.323 late	RP11-19L17
RP11-17N20	33/19cen	19q12	35067K-35218K	G Cen	6.5	6.5	3	39,8%	HLy: median HFb: high	1.682 early	RP11-419O10
RP11-141M12	34/19cen	19q12	35236K-35387K	G Cen	6	7.2	0	47,8%	HLy: low HFb: low	1.621 early	---
RP11-924I2	35/19cen	19q12	35387K-35584K	G cen	6	8	0	47.1%	HLy: low HFb: low	1.465 median	RP11-108K22

Table 7.1.8: BAC-Contig für die Region 11p15.5

Clone ID	Internal ID	Band assignment	Position	G/R band	Gene density 2Mb	Gene density 10Mb	Genes contained	GC content	Transcriptional activity	Replication timing	Reference Clone
RP11-240G10	11/T3	11p15.5	202K-329K	R	36.5	30.6	11	51,9%	HLy: high HFb: high	1.777	RP11-326C3
RP11-326C3	11/T4	11p15.5	205K-346K	R	36.5	30.6	10	51,3%	HLy: high HFb: high	1.777	---
RP13-46H24	11/T6	11p15.5	368K-533K	R	36.5	30.6	8	59,5%	HLy: median HFb: high	1.748	---
RP11-412M16	11/T7	11p15.5	476K-626K	R	36.5	30.6	10	58,3%	HLy: median HFb: high	1.542	RP11-392J11
RP11-496I9	11/T8	11p15.5	531K-635K	R	36.5	30.6	9	59,5%	HLy: median HFb: median	1.542	RP11-392J11
RP11-1391J7	11/T10	11p15.5	808K-927K	R	36.5	30.6	7	60,2%	HLy: median HFb: high	1.737	RP11-51L17
RP11-1335O1	11/T11	11p15.5	927K-1002K	R	36.5	30.6	1	53,5%	HLy: low HFb: high	1.699	RP11-401C19
RP11-371C18	11/I1	11p15.5	1369K-1501K	R	30.5	30.6	2	60,1%	HLy: ??? HFb: ???	1.529	---
RP13-25N22	11/I2	11p15.5	1482K-1672K	R	27.5	30.6	6	54,0%	HLy: low HFb: low	1.590	---
RP11-295K3	11/I3	11p15.5	1585K-1785K	R	16	30.6	6	52,2%	HLy: low HFb: median	1.624	---
RP11-534I22	11/I4	11p15.5	1787K-1975K	R	20	30.6	7	59,2%	HLy: high HFb: high	1.705	---
RP5-998N23	11/I5	11p15.5	1922K-2060K	R	21	30.6	2	51,2%	HLy: median HFb: high	1.705	RP11-534I22
RP11-889I17	11/I6	11p15.5	2055K-2225K	R	19.5	30.6	4	55,2%	HLy: low HFb: median	1.520	RP11-1075F20
RP5-1075F20	11/I7	11p15.5	2223K-2364K	R	18.5	30.6	3	53,2%	HLy: high HFb: high	1.520	---
RP11-847E17	11/I10	11p15.5	2426K-2542K	R	20	30.6	1	51,3%	HLy: low HFb: low	1.534	RP11-113A6

7.2 Silico-Verdau mit pDRAW32

Suche nach der BAC-Sequenz bei Ensembl:

Auf der Ensembl-Startseite (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html) kann man den wissenschaftlichen Namen des gesuchten BAC-Klons eingeben und suchen lassen. Unter *TextView* werden die Suchresultate angezeigt (Abb.7.2.1). Dort wird auf den Namen des gewünschten BACs geklickt. Es öffnet sich die Seite *ContigView* auf der "Export Sequence as FASTA" angewählt wird (Abb.7.2.2) Daraufhin erscheint die Seite *ExportView* auf der die Lage des BACs auf dem entsprechenden Chromosom in Basenpaaren angegeben ist (Abb. 7.2.3). Hier wird überprüft, ob "Text" ausgewählt ist und anschließend auf "Continue" geklickt. Dann öffnet sich ein neues Fenster, in dem die Sequenz des BACs angezeigt wird (Abb.7.2.4). Die Sequenz wird kopiert und in pDRAW32 eingefügt. Das Fenster mit der BAC-Sequenz muss vor einer neuen Suche unbedingt geschlossen werden. Eine neue Suche kann dann auch von der Seite *TextView* aus gestartet werden.

Abb. 7.2.1: Ensembl *TextView*

The screenshot shows the Ensembl Human *TextView* search page. The search criteria are set to 'Homo sapiens' and 'All' indexes. The search term 'rp11-80n2' is entered. The results section shows one match: '1. Clone: RP11-80N2'. Below this, it states: 'Clone RP11-80N2 is mapped to Chromosome 12, and has EMBL accession(s)/synonyms AC011604.10, 12p12(FHCRC), RP11-80N2, BCM, FinishAc, clone and length 175606 bps'. It also provides links for 'Contigview' and 'Cytoview'.

Abb.7.2.2: Ensembl *ContigView*

The screenshot shows the Ensembl Human *ContigView* interface for Chromosome 12. The main track shows the chromosome with a red box highlighting a region. Below this, there are several tracks: 'Rat synteny', 'Chimp synteny', 'Mouse synteny', 'Chicken synteny', and 'Dog synteny'. The 'DNA(contigs)' track shows several contigs, including 'AC112777.7.1.16438', 'AC011604.10.1.17561', and 'AC022335.8.1.15'. The 'Markers' track shows 'D12S1882', 'D12S1836', and 'D12S1885'. The 'Ensembl Genes' track shows 'PDE3A', 'SLC01C1', 'SLC01B3', 'SLC01B1', and 'SLC01A2'. The 'ncRNA Genes' track shows 'ENSG00000195019' and 'ENSG00000192558'. A 'Gene legend' at the bottom indicates that red bars represent 'ENSG PSEUDOGENE' and black bars represent 'ENSEMBL PREDICTED GENES (KNOWN)'.

Abb.7.2.3: Ensembl *ExportView*

Abb. 7.2.4: BAC-Sequenz (Ausschnitt)

```
>12 dna:chromosome chromosome:NCBI35:12:20832482:21010087:1
GTATCTGTTGTATGTTTTTTCATTTGAGTTTAACATGAAGCTTACAGATCCTATCTTATA
ACCCATTATTTAAACTGATGAAAACATAACACTGATTAGATAAACAAACAAACATGTAGA
GAGGAAACTAATAAAAATTCACACTTTAACTTTGTCTTCCCAATTTTAACTTTTTGTT
GTTTCTCTTTATGTCTTATGCTACTGTCTATGTGTTGAAATGTTGTAGTTATCATTTTTT
ATTCATTCATCATTTAGTCTTTCTATTTAAGTCGAGAACTTACATATCACAATTACAGT
GTTATACTAATCTATGATTTTCTATCTGTTTACTAGTACCAGTGATTTTTTTACCTTCTG
ATGATATCTTCTTGCTCATTGACACATTTTTCTTTTAGCATGAATAACTCCTATTAGCAT
TTCTTGTAGGACAGGTCTGGTGTGATGAAATCCCTCAGCTTTCATTTCTTTGGGAAGGT
CTTTGGGTTTTTTCATACTTACAGTATATTTTCACTGGACATACTATTCTAAGGTAATG
TTTTTTCTTTAAGCACTTTAAATATGTCATACCATTCTCTCCTGACCTGTAAAGTTTCCA
CTGAAAAGTCTGCTGAAAGAAATATGGAACTCCATTGTATGTTATTTGTTTCATTTCTC
TTGATGCTTTTAGGATCCTTTCTTTTCTTTGACCTTTGACAGTTTGCTTATGAAATGCC
```

Suche nach der BAC-Sequenz bei NCBI:

Auf der Startseite (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/) wird der gewünschte Organismus, also *Homo sapiens*, ausgewählt und unter "Search for" der wissenschaftliche Name des gesuchten BAC-Klons eingegeben. Unter *Homo sapiens genome view* wird die Suchergebnisse angezeigt (Abb.7.2.5). Dort wird in der Zeile des wirklich gewünschten BAC auf "Clone", und auf der sich dann öffnenden Seite auf den Namen des BACs geklickt (Abb.7.2.6). Unter *Clone Registry* (Abb. 7.2.7) wird bei "Sequence Information" auf "Accession" geklickt, woraufhin sich eine Seite mit Sequenzinformationen über diesen BAC öffnet, die ganz am Ende auch die Sequenz des BACs enthält (Abb.7.2.8), die dann kopiert und in pDRAW32 eingefügt wird.

Abb.7.2.7: Clone Registry

The screenshot shows the Clone Registry interface. At the top, there are navigation tabs: BLAST, OMIM, Taxonomy, and Structure. Below these is a search bar with a dropdown menu and a 'Go' button. The main content area displays the following information:

Clone-ID: RP11-80N2 **CurrState:** Accessioned
Comment: Baylor project HMLX 12p12-31.7-37.2

AC011604 is a component of human 12 contig NT_009714

FingerPrint Information: No

Sequence Information

Accession	G. Center	State	SeqLen(bp)
AC011604	BCM	finished	175606

Gene Information

Symbol	Position	Method	Center
SLCO1B3	12p12	Annot	NCBI

Abb.7.2.8: NCBI Sequence Viewer

```

1  gaattctttc ttcagtttga tcaattctgt tgtaaagaga ctggtatatt cttcatatca
61  gctgcatttt ttcacatctg taatttctac ttaattcttc ttaattatatt caatctctgt
121 taaatgtatc tgataaaaat ctgaattcat tctctgtggt atcttgaatt ccttttagtt
181 tcctcetaaac agctattttg aattatctgc ctgaaaggtc atatatctat gtttcttcaa
241 gattggtcct tagtgcctta tctagttgat ttggtgaggt tatgttttc tagatggtgt
301 tgatgcttgt agatgttctt tgggtgtctgg acattgaaga attaggtatt tattgtaatc
361 ttcacagtct gggcttgttt gtgctgtccc ttgggaaagc tttctaggtg tttcaacgga
421 cttgtgcccc agcccaatga cactgtggtg tttgcagact catagacgta ccaccttggg
481 agccttggat aagatctgga aqaattctct qqattaccaq qcagagactc ttgattcttt

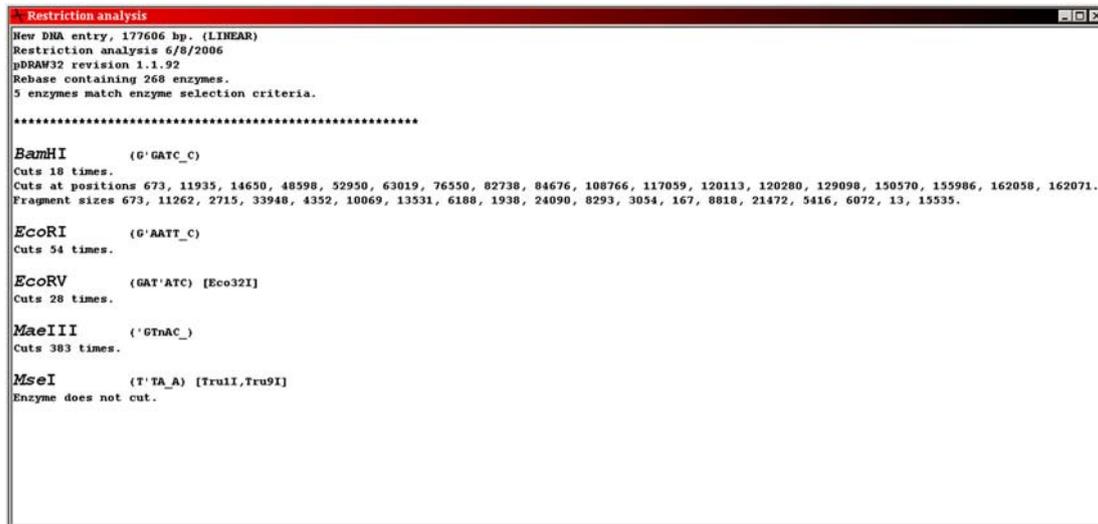
```

Das Programm pDRAW32 wird geöffnet und die Sequenz des BACs eingegeben (File - New - Enter new sequence - ok). Die Sequenz des Vektor-Backbones muss ebenfalls an die BAC-Sequenz angehängt werden (Edit - Sequence, Information und Sequenz zu den Vektorsystemen unter <http://bacpac.chori.org>).

Nun können im Programm diverse Restriktionsenzyme ausgewählt werden (Settings - Enzyme selection - Explicitly select, "Explicitly selected enzymes only" aktivieren). Mit "Apply" werden die Schnittstellen dieser Enzyme im BAC angezeigt.

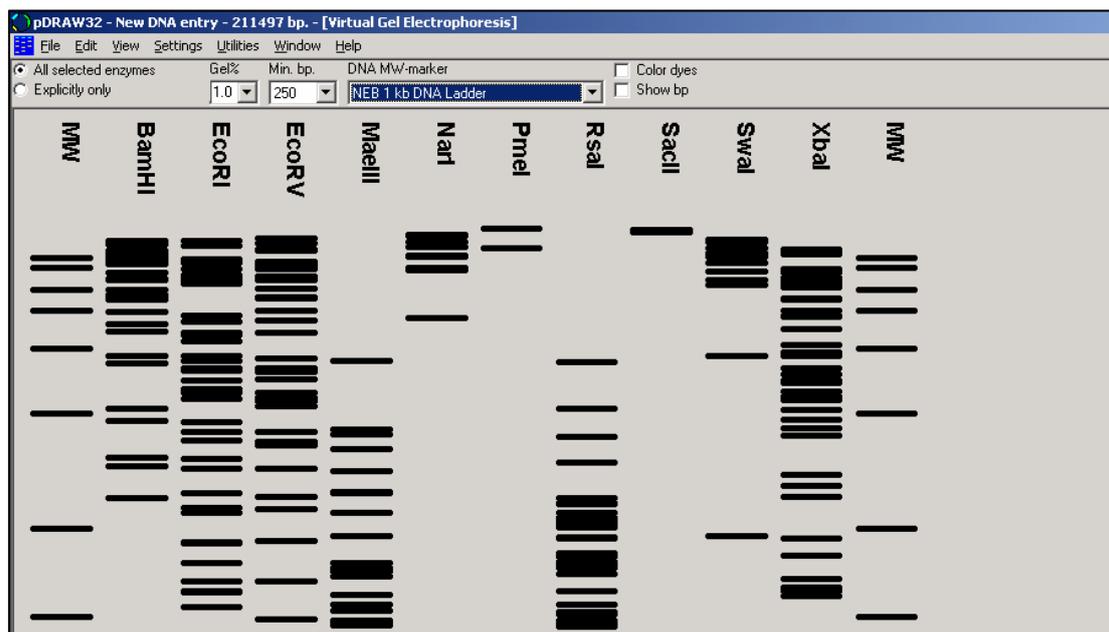
Unter "View" - "Restriction analysis" öffnet sich ein Fenster, in dem die ausgewählten Enzyme mit ihrer Schnittsequenz, der Anzahl der entstehenden Fragmente, und der entstehenden Fragmentgrößen ausgegeben werden (Abb. 7.2.9).

Abb.7.2.9 Entstehende Fragmentgrößen



Unter "View" - "Agarose Gel Electrophoresis" kann ein virtuelles Gel erstellt werden, bei dem auch der Molekulargewichtsstandard und die Prozentigkeit des Gels gewählt werden können (Abb. 7.2.10)

Abb.7.2.10 Virtuelles Gel



Da die gewünschte DNA-Sequenz in zwei möglichen Orientierungen im Vektor beinhaltet sein kann, was ebenfalls Auswirkungen auf die Längen der Restriktionsfragmente haben kann, sollte die BAC-Sequenz auch noch einmal invertiert eingelesen werden. Dafür wird die Sequenz des BACs unter "Edit" → "Invert Sequence" invertiert, bevor die Vektor-Sequenz angehängt wird.

7.3 Primersuche mit FastPCR

7.3.1 Fast PCR

In das Suchfeld auf der Startseite der ensembl Datenbank (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html) wird der Name des gewünschten Gens eingegeben. Es werden alle Gene mit dem gesuchten Namen in allen Organismen angezeigt, das interessierende Gen wird ausgewählt. Unter *GeneView* wird in der Zeile "Transcript" auf "Transcript info" geklickt. Ganz am Ende des sich neu öffnenden Fensters (Ensembl Transcript Report) ist die "Transcript Sequence" angegeben, die kopiert und in FastPCR eingegeben wird. Die Exons des Gens sind abwechselnd in blau und schwarz angegeben (Abb.7.3.1). Außerdem notiert man sich die Länge des Transkriptes, die in der Zeile "Transcript information" angegeben wird.

Weitere Informationen zur Sequenz erhält man in der *GeneView* unter "View Exon Information" (Abb. 7.3.2). Von dieser Seite benötigt man folgende Informationen:

- Start und Ende des 3'UTR (in pink angezeigt)
- Start und Ende des vorletzten Exons

Der Endpunkt des 3'UTR entspricht der Gesamtlänge des Transkripts. Den Startpunkt erhält man indem man von der Transkriptlänge die Länge des 3'UTR abzieht. Genauso geht man für die Ermittlung des Start-/Endpunktes des vorletzten Exons vor: Endpunkt = Transkriptlänge - Gesamtlänge des letzten Exons (inklusive 3'UTR), Startpunkt = Transkriptlänge - die Gesamtlänge des letzten + vorletzten Exons.

Das Programm FastPCR wird geöffnet. Unter "File" und "Example" kann man sich eine Vorlage für die Eingabe beschaffen, in der lediglich die angegebene Sequenz durch die Sequenz des gesuchten Gens ersetzt wird. In die Befehlszeile werden die Bereiche für Forward Primer (im vorletzten Exon) und Reverse Primer (im 3'UTR) eingetragen (Abb.7.3.3). Es sollte "Standard PCR" aktiviert sein, dann kann das Programm mit "Run" gestartet werden.

Es öffnet sich eine Textdatei mit dem Ergebnis. Es werden jeweils bis zu 50 forward und 50 reverse Primer, mit genauer Lage, Schmelztemperatur, Molekulargewicht, GC-Gehalt, PCR-Effizienz und der Sequenz von 5' nach 3' ausgegeben (Abb. 7.3.4).

Außerdem werden bis zu 50 Primerkombinationen erstellt, mit Angabe der Länge des zu erwartenden PCR-Produktes und der optimalen Annealing-Temperatur. Man wählt eine Kombination, bei der das PCR-Produkt zwischen 200bp und 800bp groß ist.

Abb. 7.3.1: Transkript Sequenz (cDNA)

Transcript sequence

```

AGTTCACCCAATGGACCTGCCTACTGCAGCGTAGGCCTCGCCTCAACGGCAGGAGAGCAG
GGGGCTGCGGTTGCTGCAGCCTTCAGTCTCCACCCGGACTACGCCATGTTGGGGTTTGTG
GGTCGGGTGGCCGCTGCTCCGGCTCCGGGGCTTGGGGAGACTCACCCCTCAGCGTCG
CTGCCCCAGCTCAGCTCTTACTGCGGGCCGCTCCGACGGCGCTCCATCTCTCAGGGAC
TATGGCGCGCAACATCTCTTCGCCAAAAGCAGGCGCCGCCACCGGGCGCATCGTGGCG
GTCATTGGCGCACTGGTGGACGTCAGTTTGTATGAGGGACTACCACCAATTCTAAATGCC
CTGGAAGTGCAGGGCAGGGAGACCAGACTGTTTTGGAGGTGGCCAGCATTGGGTGAG
AGCACAGTAAAGACTATTGCTATGGATGGTACAGAAGGCTTGGTTAGAGGCCAGAAAATTA
CTGGATTCTGGTGCACCAATCAAAATTCTCTTGGTCTGAGACTTTGGGCAGAAATCATG
AATGTCATTGGAGAACCTATTGATGAAAGAGGTCCTCATCAAAACCAAAACAAATTGCTCCC
ATTCTGCTGAGGCTCCAGAGTTCTATGGAAATGAGTGTGAGCAGGAAATTCGGTGAAT
GGTATCAAGGTTGTGATCTGCTAGCTCCCTATGCCAAGGGTGGCAAAATTTGGGCTTTTT
GGTGGTGTGGAGTTGGCAAGACTGTACTGATCATGGAGTTAATCAACAAATGTCCGCAAA
CCCCATGGTGGTTACTCTGTGTTTGGTGGTGTGGTGGAGGACCCGTCAGAGCAATGAT
TTATACCATGAAATGATTGAATCTGGTGTATCAACTTAAAAGATGCCACCTCTAAGGTA
GCGCTGGTATATGGTCAAAATGAATGAACCACTGGTGTCTGTCGCCCGGGTAGCTGACT
GGGCTGACTGTGGCTGAATACTTCAGAGACCAGAAAGGTCAGATGTACTGCTATTTATT
GATAACATCTTTCGCTTACCCAGGCTGGTTGAGAGGTGTCTGCATTATTGGGCCGAAATC
CTTTCTGCTGTGGGCTATCAGCCTACCCCTGGCCACTGACATGGGTACTATGCAGGAAAGA
ATTACCACTACCAAGAGGGGATCTATCACTCTGTACAGGCTATCTATGTGCTGCTGAT
GACTTGAATGACCTGCCCTGCTACTACGTTTGGCCATTTGGATGCTACCCTGTACTG
TCGCTGCCATTGCTGAGCTGGGCATCTATCCAGCTGTGGATCCTCTAGACTCCACCTCT
CGTATCATGGATCCCAACATTGTTGGCAGTGAACATTACGATGTTGCCCGTGGGGTGC
AAGATCCTGCAGGACTACAAATCCCTCCAGGATATCATTGCCATCCTGGGTATGGATGAA
TTTTCTGAGGAAAGACAAGTTGACCGTGTCCCGTGCACGGAAATACAGCGTTTCTTGTCT
CAGCCATTCCAGGTTGCTGAGGTTCTCACAGGTCATATGGGAAAGCTGGTACCCTGAA
GAGCCTATCAAGGATTCAGCAGATTTGGCAGTGAAATGACCATCTCCAGAAACAG
GCCTTCTATGTTGGGACCCATTGAAGAGCTGTGGCAAAAGCTGATAGCTGGCTGAA
GAGCATTCATCGTGGGGGCTTTTCTCTCTGACTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
AAAAGCTTCATTTTTCTGTGTAGGCTGCACAAAGGCTTGAATGAAGATATATTCTTCT
GAACAGTATTTAAGGTTTCCAAATAAAATGTACACCCCTC
                
```

Show the following features:

Number residues:

Refresh

Abb. 7.3.2: Transkript-Information

Exon Information							
No.	Exon / Intron	Chr	Strand	Start	End	Length	Sequence
5' upstream sequence							
1	ENSE00001292470	12	1	6513918	6513996	79 bp	AAATTGAGCCCGCAGCTCCCGCTTCGCTCTGCTCTCTGCTGACAGCTCAGCCGA TCTTCCTTTGGCTGGCCAG gtgaagagggggagagaaacecg.....ctcaetgttctctctccctccggcag
Intron 1-2							
2	ENSE00001044483	12	1	6514237	6514288	52 bp	CCGAGCCACATCGCTCAGACACCATGGGGAAGGTGAAGTCGGAGTCAACGG
Intron 2-3							
3	ENSE0000086922	12	1	6514289	6515920	1632 bp	gtgagttcgggggtggctgggggc.....tgcccttttgcctcttctgtctcttag
Intron 3-4							
4	ENSE00000715213	12	1	6515921	6516020	100 bp	ATTGGTCTGATTGGGCGCTGGTCCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTAAAGTGGATAT TGTGCCATCAATGACCCCTTCATTGACCTCAACTACATG gtgagtctacatggtgagccca.....ttcatcaccctcaagtattccccag
Intron 4-5							
5	ENSE00000715216	12	1	6516021	6516110	90 bp	GTTTACATGTTCCAATATGATTCACCCATGGCAAAATTCATGGCAGCTCAAGGCTGAG AACGGGAAGCTGTGCATCAATGGAATCCATCACTCTCCAGGA gtgagtgaagacagaaatggaagaa.....ctgcaactcttttctctctctctag
Intron 5-6							
6	ENSE00000715219	12	1	6516347	6516437	91 bp	GCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTGGGCGCATGCTGGCGCTGAGTACGTCGTGGAATCCAC TGCGCTTCCACCACTGGAGAAGGCTGG gtgagtgagggggccggggag.....ataactgtctgtctctctctctctag
Intron 6-7							
7	ENSE00000715222	12	1	6516438	6516527	90 bp	GCTCATTTGACGGGGGAGCCAAAAGGCTCATCATCTGCCCCCTCTGCTGATGCCCC ATGTTCTGATGGTGTGACCATGAGAAATGATGACCAACGCTCAAGATCATGAG gtgaggaagcagggccgtggagaa.....ctgcccctctctctctctctctctag
Intron 7-8							
8	ENSE00000715225	12	1	6516644	6516735	92 bp	CAATGCTCTGCACCACTGCTTAGCACCCCTGGCCCAAGGTCATCATGACAACTT TGATCTGGAAGGACTCATG gtatgagagctggggaaatggagctg.....ctgagggctcaactctctctctag
Intron 8-9							
9	ENSE00001318714	12	1	6517011	6517423	413 bp	ACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGATGGCCCTCCGGAAACTG TGGCGTATGGCCGGGGCTCTCCAGAAATCATCTCCCTGCTTACTGGCGCTGCCAAG CCTTGGCCAGGTCATCTGAGCTGACCGGAGCTCACTGGCAGGCTTCCGCTGC CCACCTGCACAGTGTGAGGGTGGACCTGCTGGCTGATGAAAACCTGCCAAATAT GATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCTCGGAGGGCCCTCAAGGGCATCTGGGG TACACTGAGCACCAGTGGTCTCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCTCCACTTT GAGCTGGGGCTGGCATTGGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCCTG gtatgtgctggggccagagactgg.....ctgcaactcttttctctctctag
3' downstream sequence							
agttaacttctctgtcttattctagggtctggggcagaggggaggaagc.....							

Abb.7.3.3: FastPCR-Fenster

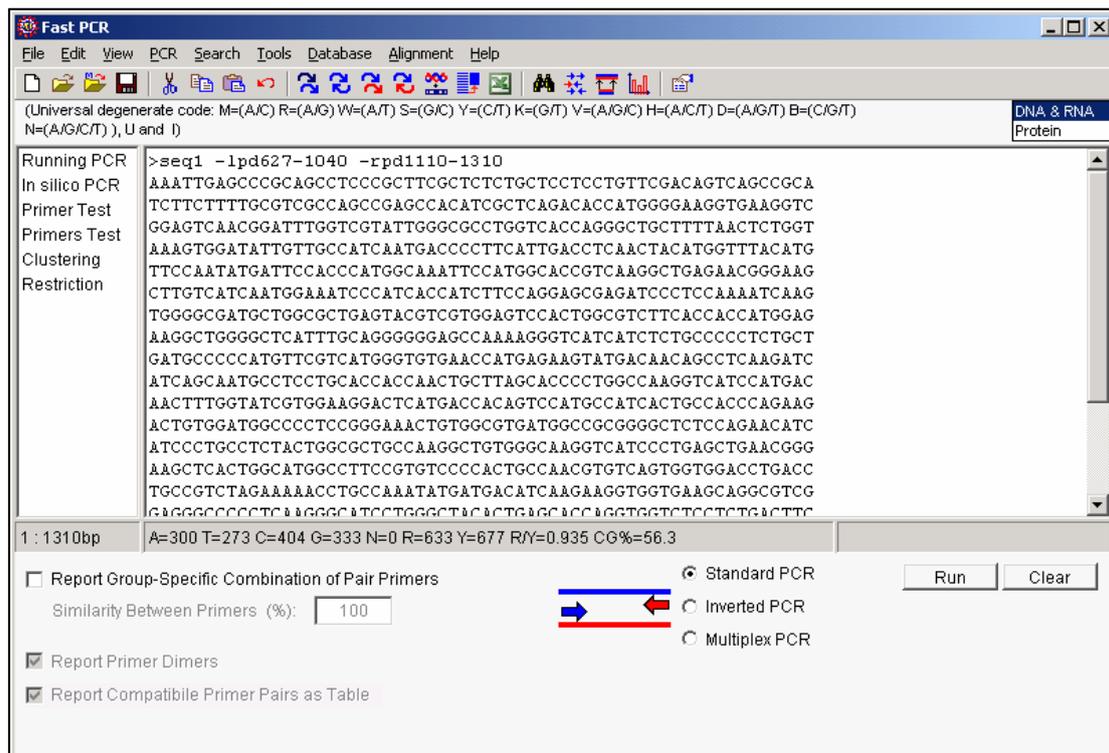
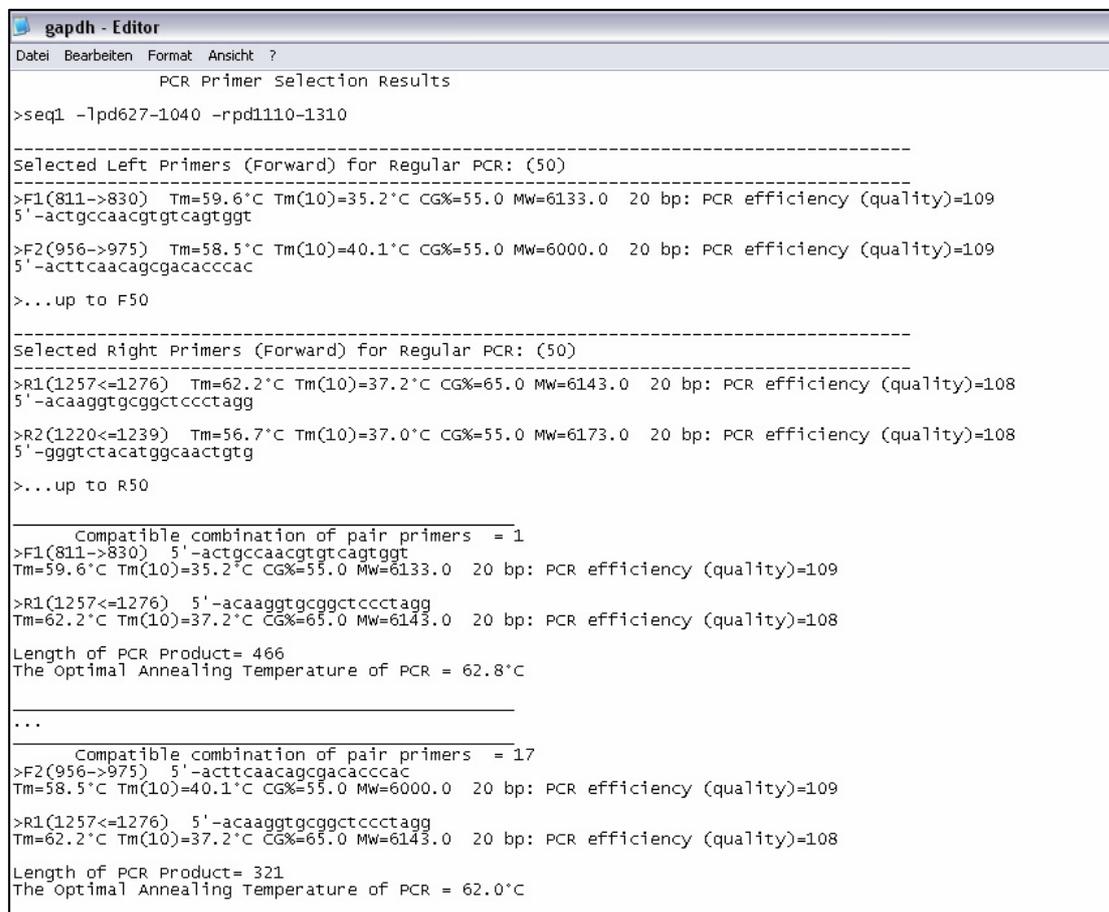


Abb.7.3.4: Ergebnis-Datei mit Primern und Primerkombinationen



7.3.2 Liste alle verwendeter Primer

In der Tabelle 7.3.2.1 sind alle Gene aufgeführt, deren Expression im Rahmen dieser Arbeit mittels RT-PCR überprüft wurde.

Tabelle 7.3.2.1: Primer für die RT-PCR

Gene	Forward-Primer	Reverse-Primer	Optimal annealing temperature	PCR-Fragment
ABCC9	5'-tgcggtgtcactgaaggtg	5'-aggccattctgtggcgag	58,5°C	303bp
ACVR1B	5'tgtgatcagaagctgctcc	5'agagctccatgccattagg	61,4°C	396bp
ADCY6	5'-agctggaagttcacctgcag	5'-gagtcattgtgcacacatgg	61,8°C	540bp
APAF1	5'agctgtacctatggaggct	5'tgcatcctaaggacaaactg	53,9°C	463bp
AVPR1A	5'-tgggttcttgaatagctgc	5'-tttctgggaatcagacctgc	55,3°C	487bp
C3AR1	5'-tgacgatcaagtccaacac	5'-cactatgtgattgcctaagagc	58,6°C	523bp
CCND2	5'accgtgatgatcgcaactg	5'gctgtacttcaaattaggcacc	58,7°C	488bp
CCT2	5'agcgacaggttctctgagtcagc	5'ccgataaacagattccacagtc	56,9°C	205bp
CD163	5'-cggctgcagtttctcaagagg	5'-cggctgcagtttctcaagagg	56,5°C	291bp
CD63	5'-atccctccatgtcgaagaacc	5'-tggaggatactattccactcc	58,7°C	301bp
CDK2AP1	5'-gatcagaccacgtacgcag	5'-aggcaactacagtttgctg	56,6°C	408bp
CLECSF6	5'-caatgagcgtgctgtgtgc	5'-tccagtacaggctctggcac	57,0°C	337bp
COX6A1	5'tgtgtacctgaagtcgcacc	5'tccatgtgcagagtaacggctc	59,9°C	233bp
CSAD	5'gattaccacgaaaggctgtc	5'ttacaggcgtgagccactgc	61,4°C	301bp
CUTL2	5'ccgagctggacacgtactcc	5'actcactgtctgagccggtg	62,1°C	303bp
DDX23	5'-ggctacagatgtggctggtc	5'-acgcaggcctctgacctgag	61,3°C	469bp
DKFZ566B183	5'-tgtcacgacaccagcacaactc	5'-ctacctgtgtactacgcagg	58,1°C	347bp
EMP1	5'cctcaagacagtgcaggcct	5'tggcagtagagaatcccctc	60,6°C	464bp
EPS8	5'tgaggacagtctgccctgaagg	5'tgctcactcaggtttgcattg	56,8°C	327bp
FLJ10292	5'ctgataggggtggccgacag	5'tgtccaacctatggactcaag	54,6°C	386bp
FOXJ2	5'-gaactcttatggcaccac	5'-tcggcagcatcttgcagtgg	60,7°C	345bp
GAPD	5'actccaacgtgtcagtggt	5'acaagggtcggctccctagg	62,8°C	466bp
GAPDH	5'tcaagggcatcctgggtacac	5'tctcaaggggtctacatggca	61,0°C	337bp
GSG1	5'gcgactgtcaactgggtccag	5'ttagcccagaacctggcacag	61,2°C	680bp
IFNG	5'acgagatgacttcgaaaagctg	5'ggatcttgcattaggttgctgc	55,0°C	456bp
IGF1	5'-tgaacctcaagctgtctac	5'-tctggtttcaaagtagcagg	52,8°C	284bp
IGFBP6	5'cgtagacatctggactcagtc	5'agctccatgttctccagtgg	62,6°C	282bp
IGFBP6	5'-tgccgtagacatctggactcag	5'-tgttgagtgatgacagctcc	61,7°C	299bp
ITGB7	5'accacacgcaggccattgtg	5'accagggtcttacagaccac	61,2°C	324bp

KCNJ8	5'-agctgctccacgggtgcagtg	5'-actacagaaagtgtgttc	56,4°C	386bp
KLRA1	5'tggcacctcattgcagtgactc	5'gaatgaaggctctgggctccag	57,0°C	548bp
LDHB	5'-tggattaagtgtggctgatc	5'-tgttcaagagctcagattgc	56,0°C	423bp
MFAP5	5'-agcatgaggactatgccagc	5'-accatgttgccaggctcgtc	57,8°C	607bp
NEUROD4	5'tccaggaacggccagtgacc	5'agcatggcatgactgcctcag	60,9°C	381bp
NTS	5'-tcatgaagaggagctgtgttc	5'-cacaacacatcatgctgaag	53,8°C	481bp
PAMCI	5'-ttgtgggagctcagcccagc	5'-ctgaagcaatgagtcactgt	55,7°C	636bp
PFDN5	5'-tccctgggaagctcatgatgtg	5'-agccacgccc aaagggtgtc	61,0°C	297bp
PTHLH	5'-gcagccgctcaagacacctg	5'-tcacaatgaccaatgtgcag	57,5°C	346bp
PZP	5'-gtgacaaatcagacgctaag	5'-tgtataggacagagaatccacc	55,1°C	213bp
RARG	5'ctacatgttccaaggatgc	5'agatggtcagctgtgcctgaagc	61,0°C	307bp
RND1	5'-agtactctgatggagctgtcc	5'-tgtatggttctctcagcgtcagg	61,0°C	500bp
RPLP0	5'-tccgcaatgtgccagtgctg	5'-aaactggctaagttggttc	59,4°C	329bp
SFRS9	5'tgctgaaactggatgacacc	5'tccatagtagagcaaccac	56,1°C	464bp
SLC25A3	5'-agcagtgcttctctgtctcaag	5'-tcaaccaacaatggtcatggtc	56,0°C	502bp
SLC38A2	5'-tggccaactgcatgtcaacc	5'-acggttcaccaatgtagc	55,3°C	412bp
SLCO1B3	5'tctctgcaacaggaggaccac	5'agtgaaagaccaggaacacctc	56,0°C	523bp
SOAT2	5'tcatgatgcatgaccagcgac	5'aggtgcctcgactcagagcca	62,9°C	299bp
STYK1	5'accagtagctgcacacatac	5'atgtgtagagtccatccag	58,2°C	405bp
TBX3	5'tccacctccagcagcagctc	5'agacgtgtctgggacgggtc	66,5°C	513bp
TEGT	5'acctcatgatgatcctggcca	5'acaggaactgtgcgatacc	56,9°C	475bp
TPI1/TPIS	5'-tggatggctcctgtgggtg	5'-gtggttcacatacacagcac	60,1°C	487bp
TRHDE	5'actatgatgggtagctgtgc	5'tgtacagctgaagcaatcatggct	56,5°C	389bp
WNK1	5'-agcctcaccagtgatggtg	5'tggaagccatactgtgtg	60,7°C	400bp

7.4 Anleitung für das ADS Programm

Daten vorbereiten

Die Daten werden mit ImageJ vorbereitet. Es werden tif-Stapel erstellt, die je nach Bedarf bereits in ImageJ bearbeitet werden um den Hintergrund zu reduzieren. Die Bildstapel werden nach folgendem System benannt:

Farbkanal 1 (beliebiges Fluorochrom, z.B. Cy3, Fite, usw.): 1-1.tif
 Farbkanal 2 (beliebiges Fluorochrom, z.B. Fite, Cy5, usw.): 1-2.tif
 Farbkanal 3 (beliebiges Fluorochrom, GEGENFÄRBUNG): 1-3.tif

Die erste Ziffer steht dabei für den Zellkern, die zweite für den Farbkanal. 18-2.tif wäre demnach die Bezeichnung für den zweiten Farbkanal im Zellkern 18. Wichtig ist, dass die Gegenfärbung immer als dritter Kanal definiert wird. Das gilt auch für Auswertungen mit nur 2 Farbkanälen (1-1.tif, 1-3.tif, 2-1.tif, 2-3.tif, usw.) oder 4 Farbkanälen, hier ist der dritte Kanal ebenfalls für die Gegenfärbung reserviert, das zusätzliche Signal wird unter 1-4.tif gespeichert.

Threshold bestimmen

Mit ImageJ wird für jeden Bildstapel ein Threshold bestimmt (*Image/Adjust/Threshold*). Dieser Wert wird in eine Tabelle übertragen. (aber kein Apply in ImageJ, benötigt werden die ganz normalen Stacks, nur Werte übertragen!!!) Diese Werte werden im ADS-Programm als Schwellenwert benötigt.

Vorbereitungen unter Linux

Das Programm läuft unter Linux in der Khoros Software Umgebung. Die vorbereiteten Bilderstapel werden mit dem Konqueror in den gewünschten Ordner übertragen (Zugriff auf Herkules */mnt/herkules/user*, bzw. auf den alten Rechnern *smb://cremerlab@herkules/user/*). Zusätzlich müssen auch die shells „**schalen_Zusatzschale_os123_th.sh**“ und „**auswertung_Zusatzschale_os123.sh**“ in den gewünschten Ordner kopiert werden. Es gibt spezielle shells für die Auswertungen mit zwei, drei, vier, fünf oder sechs Farbkanälen (zu finden unter *“home/cremerlab/shellsbackup/ADS“*).

Nun wird ein Befehlsfenster in dem entsprechenden Ordner geöffnet (*F4* bzw. *Strg+T*). Mit dem Befehl *ls* kann der Inhalt des Ordners im Befehlsfenster angezeigt werden, mit *cd* kann in den Ordnern navigiert werden (Unterverzeichnis: *cd Name*, höhere Ebene: *cd ..*).

Die shell „**schalen_Zusatzschale_os123_th**“ wird mit dem Editorprogramm „Kwrite“ geöffnet: *kwrite schalen_Zusatzschale_os123_th*

Nun werden die benötigten Parameter in diese shell eingetragen:

Zeile 8: $lx = \text{Voxelsize } x \text{ in nm}$

Zeile 9: $ly = \text{Voxelsize } y \text{ in nm}$

Zeile 10: $lz = \text{Voxelsize } z \text{ in nm}$

Zeile 11: Die gewünschte Schichtdicke der Schalen *db*, empfehlenswert $lz + 1$

Zeile 12: Maximaler Abstand nach Innen, negatives Vielfaches von *db* - 1

Zeile 13: Maximaler Abstand nach Außen, positives Vielfaches von *db* + 1

Zeile 15: ImageJ - Schwellenwert für Farbkanal 1, aus Tabelle

Zeile 16: ImageJ - Schwellenwert für Farbkanal 2, aus Tabelle

Zeile 17: ImageJ - Schwellenwert für Gegenfärbung, aus Tabelle

Zeilen 19 bis 21 werden nur benötigt, falls eine zusätzliche Hintergrundreduzierung mittels Objektgröße gewünscht wird. Dafür werden os-Werte mittels der shell „**schwellewert_delete_os123_th.sh**“ ermittelt (siehe 4.). Ist das nicht der Fall, werden alle drei os-Werte auf 2 gesetzt.

Zeile 19: Mindestobjektgröße für Farbkanal 1
 Zeile 20: Mindestobjektgröße für Farbkanal 2
 Zeile 21: Mindestobjektgröße für Gegenfärbung
 Zeile 23: Pfad, in dem die Bilderstapel zu finden sind
 Zeile 42: Zellkerne, für die diese Parameter zutreffen

Unter *Ansicht/Zeilennummern anzeigen* kann man sich die Zeilennummer anzeigen lassen.

Unterhalb von Zeile 42 ist NICHTS MEHR ZU ÄNDERN!!!!!!!

Die so veränderte shell wird unter neuem Namen gespeichert: *Datei/Speichern unter*, z.B.: *schalen_Zusatzschale_os123_th_1.sh*, wenn die Parameter für den ersten Kern zutreffen. So werden shells mit spezifischen Parametern für alle auszuwertenden Zellkerne angelegt.

Schließlich werden alle diese shells in einer Stapelverarbeitung zusammengefasst. Dafür wird ein leeres Kwrite über den Befehl *kwrite* geöffnet. Hier werden nun alle erstellten shells mit dem Ausführbefehl „/“ aufgeführt. Zusätzlich sollte man noch die Bildschirmausgabe des Programms in einer Textdatei sichern, dies erfolgt über den Befehl „tee“. Ein solches Kwrite würde also wie folgt aussehen:

```
./schalen_Zusatzschale_os123_th_1.sh | tee skript1.txt
./schalen_Zusatzschale_os123_th_2.sh | tee skript2.txt
./schalen_Zusatzschale_os123_th_3.sh | tee skript3.txt
Usw.
```

Das Symbol “[“ erhält man mit *Alt Gr + >/< Taste*.

Dieses Kwrite wird nun mit „Speichern unter“ unter einem beliebigen Namen und der Endung „**.sh**“ gespeichert (z.B. *Exp1.sh*).

Nun müssen alle shells ausführbar gemacht werden. Das erfolgt mit dem Befehl „*chmod a+x *.sh*“. Den Erfolg kann man an der Farbe der shells in der Liste („ls“) erkennen: schwarze shells sind nicht ausführbar, grüne dagegen schon.

Hintergrundreduzierung mittels Objektgröße

Zusätzlich zum Schwellenwert *th* kann der Hintergrund auch mittels einer Mindestvoxelgröße *os* für Objekte reduziert werden. Dieser Wert definiert die Mindestgröße, die ein Objekt im Bilderstapel haben muss, um als Signal gewertet zu werden. Alle Objekte, die weniger Voxel haben werden gelöscht.

Der *os*-Wert wird mit der shell „**schwellewert_delete_os123_th.sh**“ ermittelt. Diese shell wird im Befehlsfenster ebenfalls mit dem Editor *Kwrite* geöffnet: „*kwrite schwellewert_delete_os123_th.sh*“.

Nun werden die benötigten Parameter in diese shell eingetragen:

Zeile 15: Pfad, in dem die Bilderstapel zu finden sind

Zeile 24: ImageJ - Schwellenwert für Farbkanal 1, aus Tabelle

Zeile 25: ImageJ - Schwellenwert für Farbkanal 2, aus Tabelle

Zeile 26: ImageJ - Schwellenwert für Gegenfärbung, aus Tabelle

Zeile 28: Mindestobjektgröße für Farbkanal 1

Zeile 29: Mindestobjektgröße für Farbkanal 2

Zeile 30: Mindestobjektgröße für Gegenfärbung

Zeile 36: Zellkerne, für die diese Parameter zutreffen

Unter *Ansicht/Zeilennummern anzeigen* kann man sich die Zeilennummer anzeigen lassen.

SONST IST IN DIESER SHELL NICHTS MEHR ZU ÄNDERN!

Die so veränderte shell wird gespeichert (*Datei/Speichern*). Nun kann man sie im Befehlsfenster mit dem Befehl „/“ ausführen: „./schwellwert_delete_os123_th.sh“.

Es werden pro Farbkanal vier Animate geöffnet. Das erste zeigt den Originaldatensatz, das zweite den Bilderstapel nach Anwendung des Schwellenwertes th, das dritte die Anzahl der Objekte vor der Reduzierung mittels des os-Wertes und das vierte schließlich das Ergebnis der Objektmindestgröße. Sowohl der th-Wert wie auch der os-Wert können vom Anwender beliebig oft korrigiert werden. Über Options/Colormaps/Greyscale im Animatefenster erhält man eine farbige Darstellung. Im Befehlsfenster wird außerdem aufgelistet, wie viele Objekte bereits über den os-Wert gelöscht wurden. Die verbleibenden Objekte werden mit Voxelgröße und einer ID-Nummer, die dem Greyscale entspricht, aufgeführt. Über diese ID-Nummer können sie im Animatefenster auch identifiziert werden: geht man mit dem Cursor auf ein Objekt, wird die entsprechende ID-Nummer und die Koordinaten unten im Animatefenster angezeigt. Die ausgewählten os-Werte und gegebenenfalls korrigierten th-Werte sollten ebenfalls notiert werden.

Ausführen des Programms

Bevor man das Programm laufen lässt, ist es empfehlenswert, den Inhalt des tmp-Ordners, der eventuell noch Daten einer vorherigen Auswertung enthält, zu löschen. Das geht am einfachsten über den Konqueror.

Mit dem Befehl „/“ wird die shell, die die Stapelverarbeitung enthält gestartet: „./Exp1.sh“. Das Programm beginnt zu rechnen. Bei Fehlermeldungen kann das Programm mit „Strg + C“ gestoppt werden.

Auswertung

In der vorhergehenden Berechnung wurde eine Output-Datei mit dem Namen „Feinheit.asc“ erstellt. Diese kann mit dem Editor Kwrite gelesen werden: *kwrite Feinheit.asc*. Die Datei enthält nur eine Zahl, welche die Anzahl der vom Programm angelegten Schalen angibt. Dieser Wert muss in die shell **auswertung_Zusatzschale_os123.sh** eingetragen werden.

Dafür wird diese ebenfalls mit *kwrite auswertung_Zusatzschale_os123.sh* geöffnet. In Zeile 16 ist K, die Anzahl der durchgelaufenen Zellkerne einzutragen, in Zeile 17 ist die Feinheit F, also die Anzahl der Schalen, die in Feinheit.asc enthalten ist, einzutragen.

Die so angepasste shell wird gespeichert.

Mit dem Befehl „*^*“ wird die Auswertung gestartet. Da in der Ausgabe bereits die Statistiktests enthalten sind, sollte diese wieder mittels des „tee“ Befehls in ein Textfile gespeichert werden: *./auswertung_Zusatzschale_os123.sh | tee Auswertung.txt*.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt unter Windows mit Excel, daher müssen alle erstellten Daten mit Hilfe des Konquerors wieder zurück auf eine Windowspartition übertragen werden.

7.5 Distanzmessung mit dem ImageJ PlugIn „Correlation function 3D“

7.5.1 Parameterdatei

Die Parameterdatei ist eine Textdatei, die am besten mit Excel geöffnet werden sollte. Tabelle 7.5.1.1 enthält ein Beispiel für eine solche Datei

Tabelle 7.5.1.1: Parameterdatei für das ImageJ PlugIn „Correlation function 3D“

Territory No	Threshold 1	Threshold 2	Ref Length	bin size	x-pixelsize	y-pixelsize	z-pixelsize	length unit
1	46	49	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
2	40	30	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
3	40	40	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
4	40	39	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
5	49	35	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
6	30	44	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
7	39	43	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
8	42	39	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
9	40	40	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
10	43	40	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
11	44	43	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
12	44	46	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
13	40	44	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
14	34	39	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
15	40	35	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
16	48	50	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
17	42	51	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
18	40	42	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
19	41	36	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm
20	65	42	10	0.02	0.066	0.066	0.2	µm

7.5.2 Vorlageskript

Im Folgenden ist das Makro für die Stapelverarbeitung mit dem ImageJ PlugIn “Correlation function 3D” aufgeführt. Der Anwender ,muss lediglich den Pfad angeben, in dem die Parameterdatei zu finden ist (parametersFilename), in dem die auszuwertenden Bilder zu finden sind (dataPath) und einen Namen für die Ergebnisdateien sowie deren gewünschten Speicherort eingeben (outputFilenameR/G/RG). Mit diesen Veränderungen wird das Skript gespeichert, und dann mittels „drag and drop“ in die ImageJ Konsole gezogen. Mit Strg +R kann das Programm dann gestartet werden.

```
parametersFilename = "D:/Katrin_Hera(F)/Katrin/Evaluation_Distances_Joachim/HLb_19RGpaint_S-params.txt";
dataPath="D:/Katrin_Hera(F)/Katrin/Confocal/CT19Bacs/HLb/HLb_19RGpaint_S/HLb_19RGpaint_S_Khoros/";
outputFilenameR = "D:/Katrin_Hera(F)/Katrin/Evaluation_Distances_Joachim/Ergebnis_3D-RAC_HLb_19RGpaint_S/Results-1.txt";
outputFilenameG = "D:/Katrin_Hera(F)/Katrin/Evaluation_Distances_Joachim/Ergebnis_3D-RAC_HLb_19RGpaint_S/Results-2.txt";
outputFilenameRG = "D:/Katrin_Hera(F)/Katrin/Evaluation_Distances_Joachim/Ergebnis_3D-RAC_HLb_19RGpaint_S/Results-1_2.txt";

// Parameter file contains:
// TerritoryNo Threshold1 Threshold2 RefLength bin size x-pixelsize y-pixelsize z-pixelsize length unit
// A "/" at the line start indicates a comment

open(parametersFilename);
parameters = getInfo();
run("Close");
list = split(parameters, "\n");

for (i=0; i<list.length; i++) {
    line = list[i];
    if ( ! startsWith(line, "//") && !(lengthOf(line) == 0) ) {

        // Read parameters from line.
        line = split(list[i], "\t");
        territoryNo = line[0];
        threshold1 = line[1];
        threshold2 = line[2];
        reflength = line[3];
    }
}
```

```
binsize = line[4];
xPixelsize = line[5];
yPixelsize = line[6];
zPixelsize = line[7];
unit = line[8];

path1 = dataPath+territoryNo+"-1.tif";
path2 = dataPath+territoryNo+"-2.tif";

// Write to log window to show progress.
print("Analyzing territory "+territoryNo+" time: "+getTime()+" ms");

// Open image to be analyzed.
open(path1);
imageName1 = territoryNo+"-1";
id1 = getImageID();
rename(imageName1);

open(path2);
imageName2 = territoryNo+"-2";
id2 = getImageID();
rename(imageName2);

// correlation function of R-bands
// Prepare parameters of the "Correlation function 3D" plugin and run it.
CorrFuncArgs = "stack1="+imageName1+" threshold_1="+threshold1;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" stack2="+imageName1+" threshold_2="+threshold1;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" reference_length="+reflength;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" bin_size="+binsize;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" x-pixelsize="+xPixelsize+" y-pixelsize="+yPixelsize+" z-
pixelsize="+zPixelsize;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" unit="+unit;
// Commenting out display distance image considerably speeds up processing.
// CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" display_distance_image ";
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" append_results_to_file ";
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" results_file_name=["+outputFilenameR+"] ";
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" results_line_start=["+territoryNo+"\t"];
run("Correlation function 3D", CorrFuncArgs);

// correlation function of G-bands
```

```

// Prepare parameters of the "Correlation function 3D" plugin and run it.
CorrFuncArgs = "stack1="+imageName2+" threshold_1="+threshold2;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" stack2="+imageName2+" threshold_2="+threshold2;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" reference_length="+reflength;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" bin_size="+binsize;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" x-pixelsize="+xPixelsize+" y-pixelsize="+yPixelsize+" z-
pixelsize="+zPixelsize;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" unit="+unit;
// Commenting out display distance image considerably speeds up processing.
// CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" display_distance_image ";
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" append_results_to_file ";
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" results_file_name=["+outputFilenameG+"] ";
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" results_line_start=["+territoryNo+"\t"];
run("Correlation function 3D", CorrFuncArgs);

// correlation function R-bands to G-bands
// Prepare parameters of the "Correlation function 3D" plugin and run it.
CorrFuncArgs = "stack1="+imageName1+" threshold_1="+threshold1;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" stack2="+imageName2+" threshold_2="+threshold2;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" reference_length="+reflength;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" bin_size="+binsize;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" x-pixelsize="+xPixelsize+" y-pixelsize="+yPixelsize+" z-
pixelsize="+zPixelsize;
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" unit="+unit;
// Commenting out display distance image considerably speeds up processing.
// CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" display_distance_image ";
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" append_results_to_file ";
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" results_file_name=["+outputFilenameRG+"] ";
CorrFuncArgs = CorrFuncArgs+" results_line_start=["+territoryNo+"\t"];
run("Correlation function 3D", CorrFuncArgs);

if (isOpen(id1)) {
    selectImage(id1);
    close();
}
if (isOpen(id2)) {
    selectImage(id2);
    close();
}
}

```

```
}  
  
// Write to log window to show progress.  
print("Finished. time: "+getTime()+" ms");
```

7.6 Datenbankrecherche

Zunächst muss der interessierende BAC-Klon in der gewünschten Datenbank aufgerufen werden:

Ensembl:

Auf der Ensembl-Startseite (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html) kann man den wissenschaftlichen Namen des gesuchten BAC-Klons eingeben und suchen lassen. Unter *TextView* werden die Suchresultate angezeigt (Abb.7.2.1). Dort wird auf den Namen des gewünschten BACs geklickt. Es öffnet sich die Seite *ContigView*.

NCBI:

Auf der Startseite (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/) wird der gewünschte Organismus (Homo sapiens) ausgewählt und unter "Search for" der wissenschaftliche Name des gesuchten BAC-Klons eingegeben. Unter *Homo_sapiens genome view* wird die Suchergebnisse angezeigt (Abb.7.2.5). Dort wird in der Zeile des wirklich gewünschten BAC Klons („reference“) auf "Clone", geklickt (Abb.7.2.6).

7.6.1 Bandenzuordnung

In beiden Datenbanken kann man dem abgebildeten Ideogramm des Chromosoms entnehmen zu welcher Bande der interessierende BAC Klone zuzuordnen ist.

7.6.2 Position

Ensembl:

Durch Click mit der linken Maustaste auf den BAC Klon von Interesse wird ein Fenster aktiviert, das Zusatzinformationen zum Klon enthält, wie die genaue Position auf dem Chromosom und die Länge des Klons in Basenpaaren.

NCBI:

Unter *Table View* (ganz unten auf der Seite) kann man sich eine Liste anzeigen lassen, die die Start- und Endpositionen aller in der angezeigten Region enthaltener BAC Klone enthält.

7.6.3 Anzahl der enthaltenen Gene und Gendichte

Zunächst muss die Position des Mittelpunkts des BAC Klons aus den Angaben der Datenbank berechnet werden. Diese Position wird dann auch zum Mittelpunkt des gewünschten MB-Fensters. Wenn also z.B. die Gendichte innerhalb eines 2 MB Fensters gewünscht wird, wird von der mittleren Position jeweils 1 MB abgezogen bzw. addiert und diese berechneten Positionen als neue Grenzen für die Anzeige in die Datenbank eingegeben.

Ensembl:

Unten auf der Seite bei „*Select type to export*“ „*Features in this region*“ auswählen und auf *Export* klicken, die Anzahl der enthaltenen Gene wird daraufhin als Tabelle angezeigt. Diese Anzahl wird durch die Größe des gewünschten MB Fensters geteilt um die Gendichte zu berechnen.

NCBI:

Unten auf der Seite wird unter dem Punkt „*Genes On Sequence*“ die genaue Länge der ausgewählten Region sowie die Anzahl der in dieser Region enthaltenen Gene angezeigt. Diese Anzahl wird durch die Größe des gewünschten MB Fensters geteilt um die Gendichte zu berechnen.

7.6.4 GC-Gehalt*Ensembl:*

Auf der Seite *ContigView* wird „*Export Sequence as FASTA*“ angewählt (siehe Abb.7.2.2). Daraufhin erscheint die Seite „*ExportView*“ auf der die Lage des BACs auf dem entsprechenden Chromosom in Basenpaaren angegeben ist (siehe Abb. 7.2.3). Hier wird überprüft, ob „*Text*“ ausgewählt ist und anschließend auf „*Continue*“ geklickt. Dann öffnet sich ein neues Fenster, in dem die Sequenz des BACs angezeigt wird (Abb.7.2.4). Die Sequenz wird kopiert und in das Programm FastPCR eingefügt. Nach dem Einladen der Sequenz zeigt FastPCR automatisch den GC- und AT-Gehalt in der Fußzeile an.

NCBI:

Auf den Namen des BAC Klons klicken (siehe Abb.7.2.6). Unter „*Clone Registry*“ (siehe Abb. 7.2.7) wird bei „*Sequence Information*“ auf „*Accession*“ geklickt, woraufhin sich eine Seite mit Sequenzinformationen über diesen BAC öffnet, die ganz am Ende auch die Sequenz des BACs enthält (siehe Abb.7.2.8). Die Sequenz wird kopiert und in das Programm FastPCR eingefügt. Nach dem Einladen der Sequenz zeigt FastPCR automatisch den GC- und AT-Gehalt in der Fußzeile an.

7.6.5 Transkriptionelle Aktivität

Um die transkriptionelle Aktivität der auf dem interessierenden BAC Klon enthaltenen Gene zu bestimmen, werden die Daten eines Expressionsprofils benötigt. In dieser Arbeit wurden uns die Ergebnisse eines solchen Profils von Prof. Dr. Michael Speicher zur Verfügung gestellt. Das Profil wurde mit dem GeneChip U133A der Firma Affymetrix erstellt. Um auf die Daten einzelner Gene zurückgreifen zu können, müssen erst ihre Affymetrix-Nummern ermittelt werden. Das geschieht auf der Website (<http://www.affymetrix.com/index.affx>): „*NETAFFX*“ auswählen und auf „*NetAffx Analysis Center*“ klicken. Nach der Anmeldung (die Registrierung ist schnell und kostenlos) unter dem Punkt „*Expression*“ die „*Quick Query*“ auswählen und auf „*Begin*“ klicken. Den richtigen Chip auswählen (U133A) und im

Suchfeld den Namen des gesuchten Gens eingeben. Es wird als Ergebnis eine Liste der dazugehörigen Affymetrix-Nummern angezeigt, diese Nummern werden notiert und mit ihnen in den Datentabellen des Expressionsprofils nach den entsprechenden Intensitätswerten der Gene gesucht.

7.6.6 Replikationsindex

Die Daten des Replikationsverhaltens der BAC Klone wurden von Dr. Heike Fieger zur Verfügung gestellt. Dafür wurden Zellen in der S- bzw. G1-Phase einer lymphoblastoiden Zelllinie (HRC575) mittels Durchflußzytometrie isoliert, deren DNA verschieden markiert und auf einen Array co-hybridisiert. Das Fluoreszenzverhältnis für jeden spot wurde berechnet. Ein Verhältnis von S:G1 = 2:1 weist auf eine sehr frühe Replikationszeit, ein Verhältnis von S:G1 = 1:1 auf eine sehr späte Replikationszeit hin. Nach einer Normalisierung ergaben sich Werte für die einzelnen BACs zwischen 1,0 (späte Replikation) und 2,0 (frühe Replikation). War ein gewünschter BAC Klon auf der Liste nicht vorhanden, wurde stellvertretend als Referenzklon ein direkt benachbarter Klon ausgewählt.

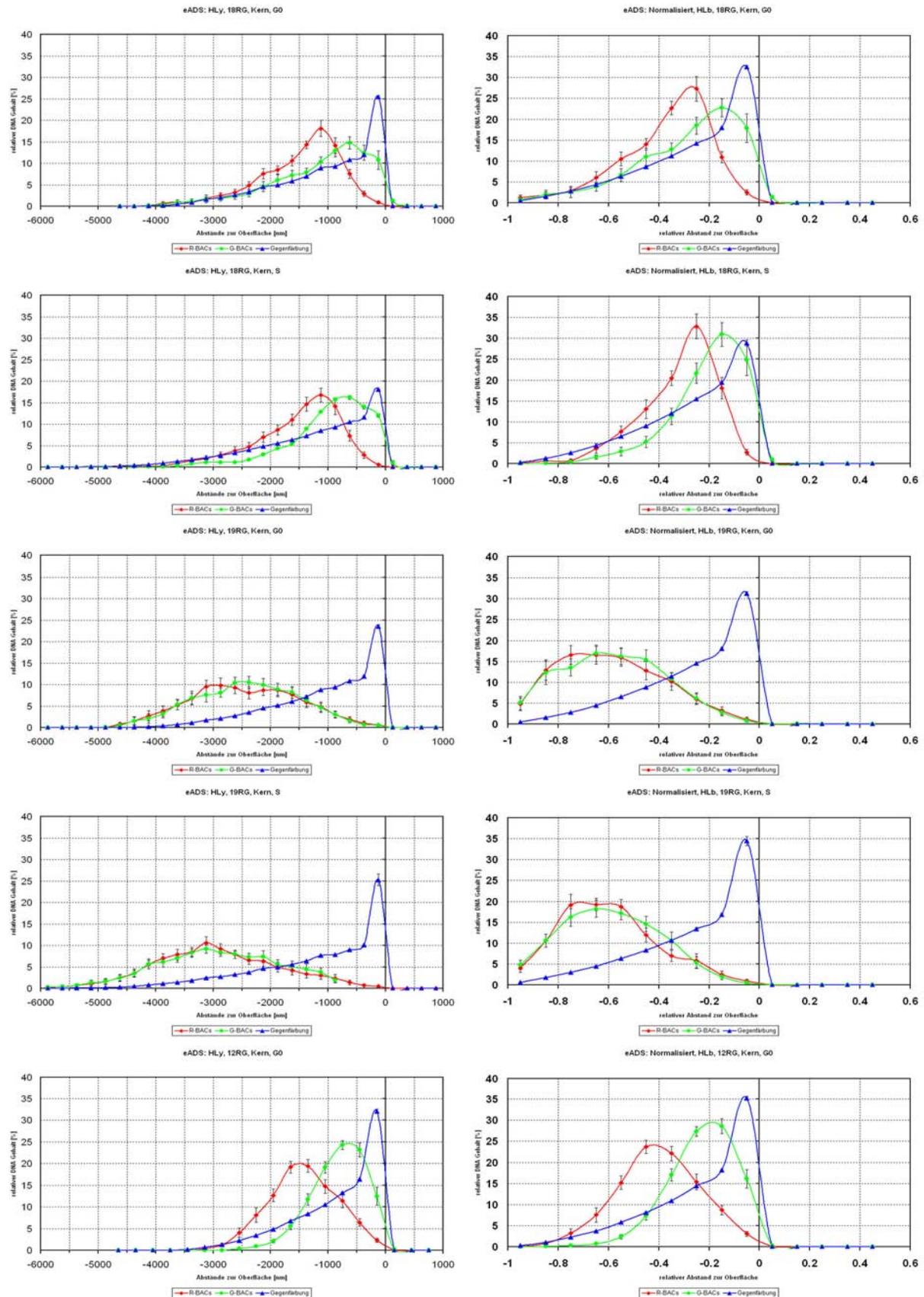
7.6.7 Anzahl und Dichte der Alu-Sequenzen

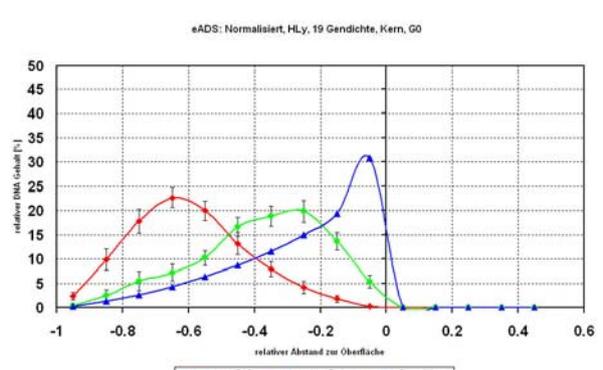
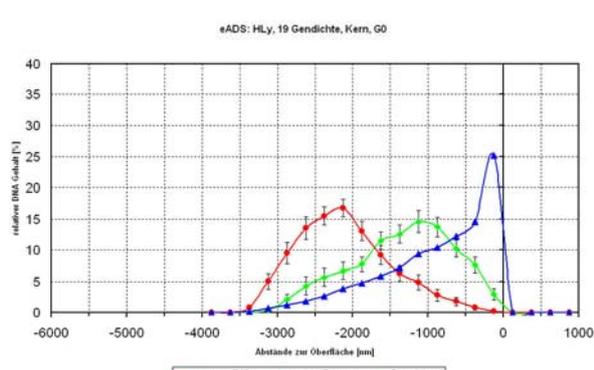
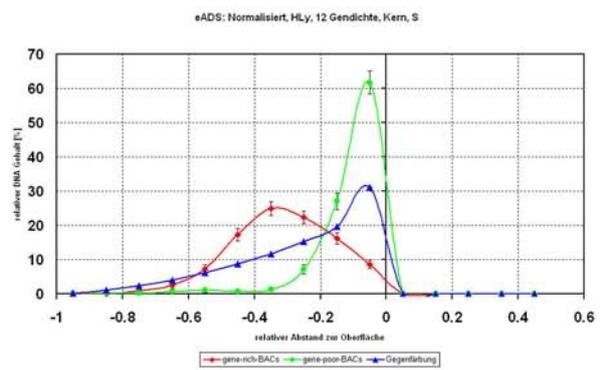
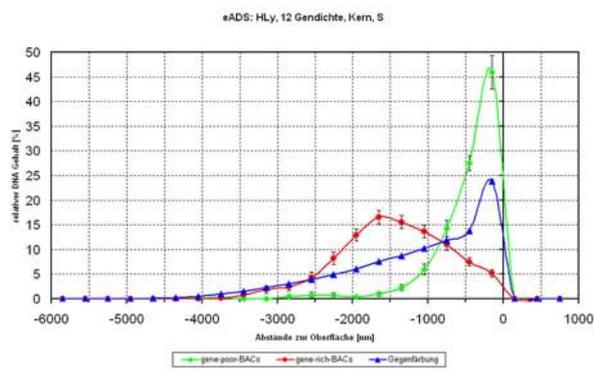
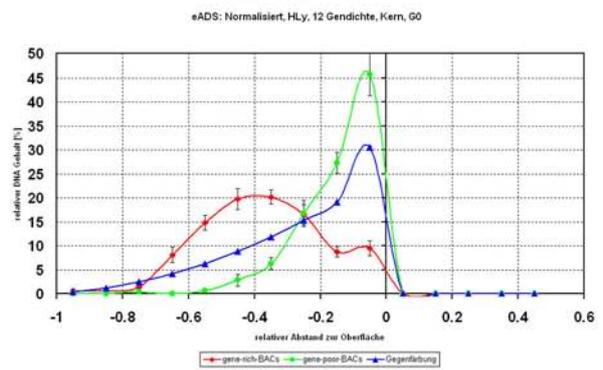
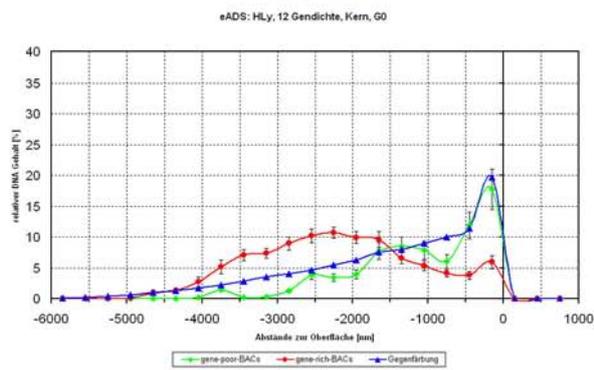
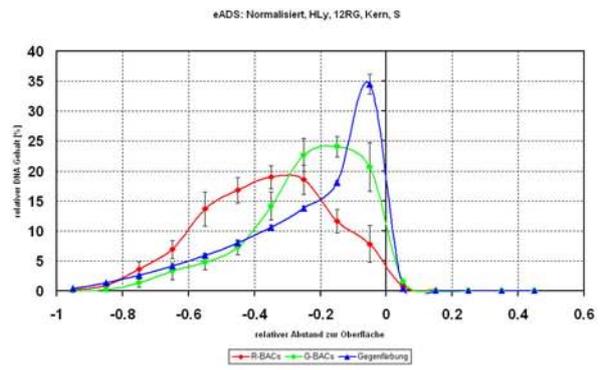
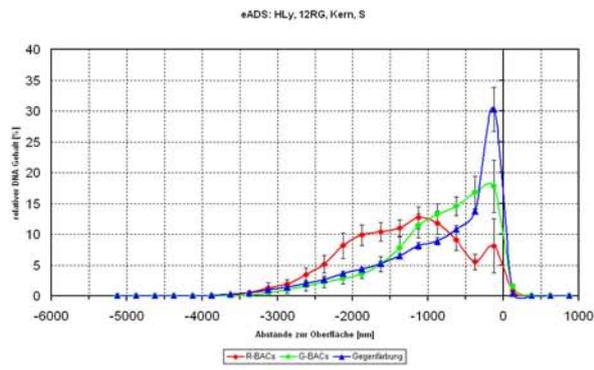
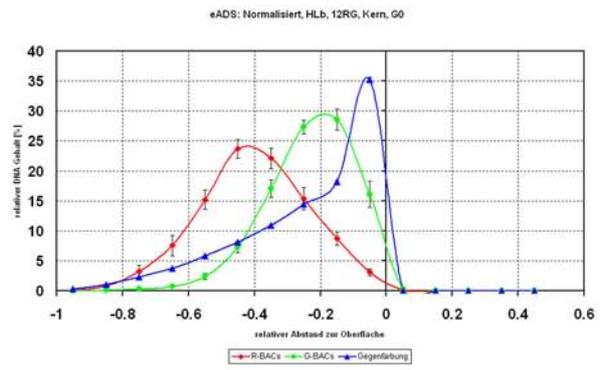
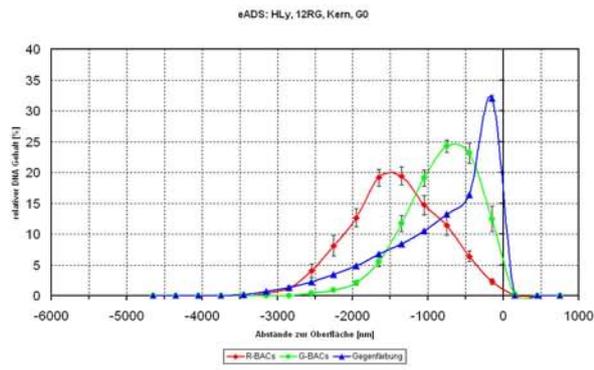
Ensembl:

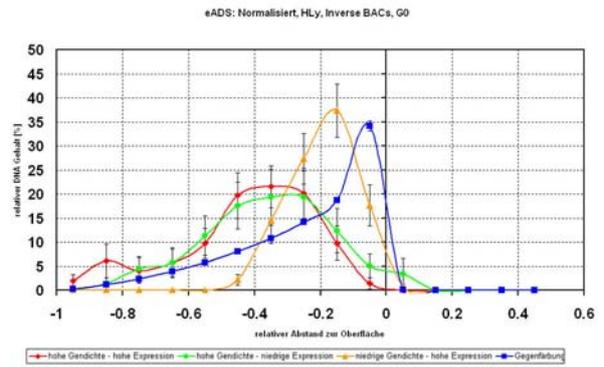
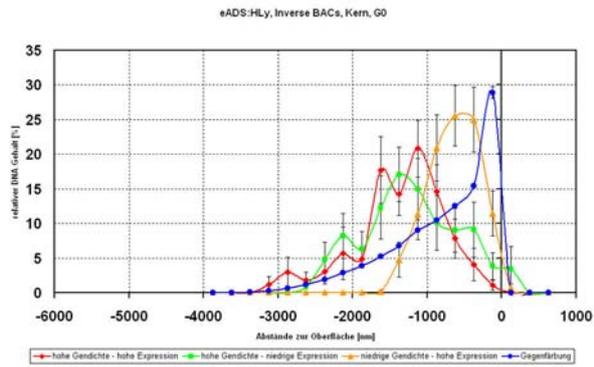
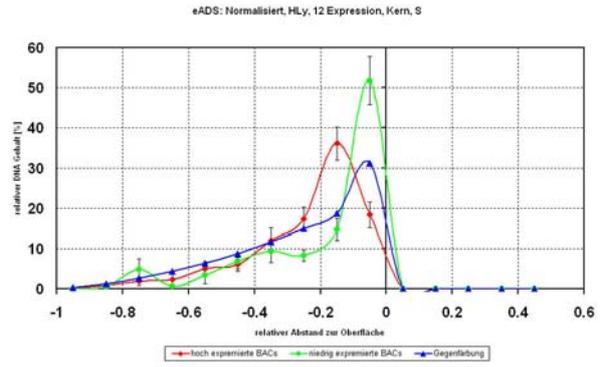
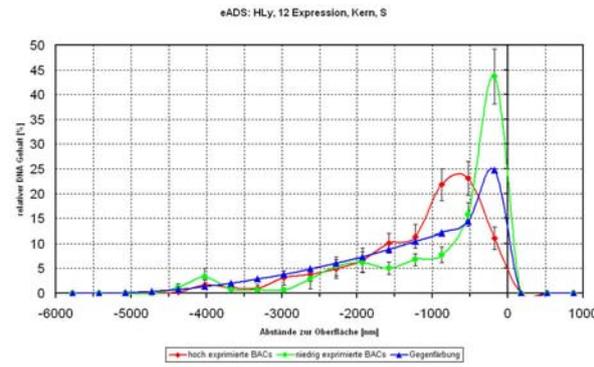
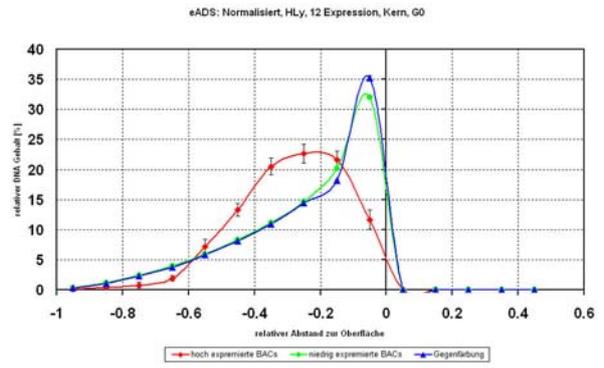
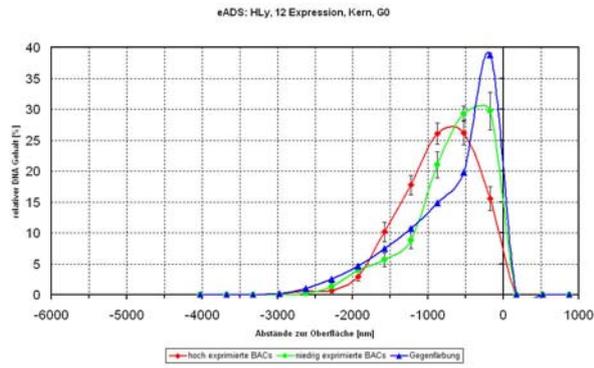
Auf der Seite *ContigView* wird auf der linken Seite „*Export EMBL file*“ ausgewählt. Daraufhin erscheint die Seite „*ExportView*“ auf der die interessierenden Eigenschaften der Sequenz ausgewählt werden können, hier wird „*Repeat features*“ ausgewählt, das „*outputformat*“ sollte auf „*text*“ stehen. Nach Click auf „*Continue*“ erscheint eine Liste mit allen repeat Sequenzen des BAC Klons, diese Liste als Textfile abspeichern und mit Word öffnen. Mit der Word Funktion „Suchen – Ersetzen“ kann die Anzahl der gewünschten Alu-Sequenzen ermittelt werden (Word zählt alle Ersetzungen die es durchführt und gibt diese Summe an). Diese Anzahl wird durch die Länge der untersuchten Sequenz geteilt um die Dichte der Alu-repeats bestimmen zu können.

7.7 Anordnung der BAC-Pools innerhalb des Zellkerns

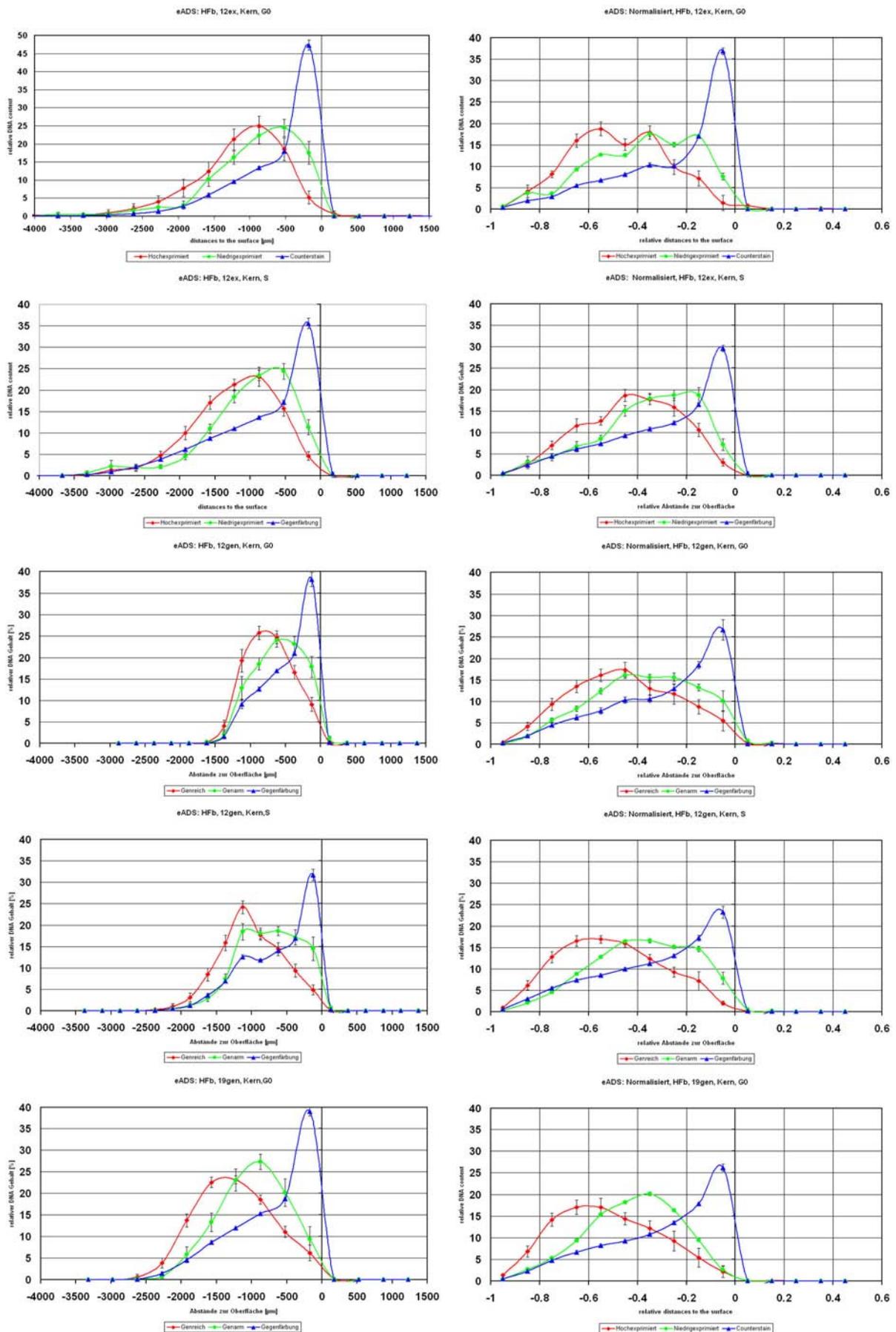
7.7.1 Ergebnisse der humanen Lymphozyten

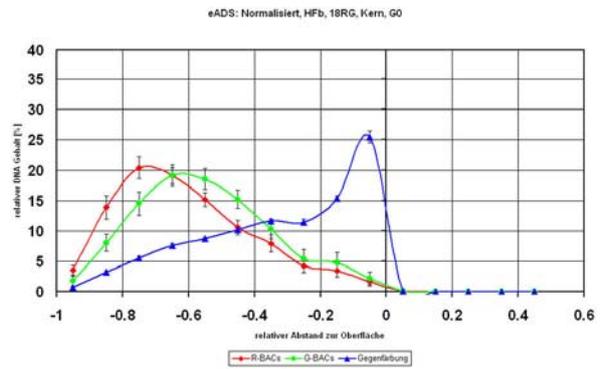
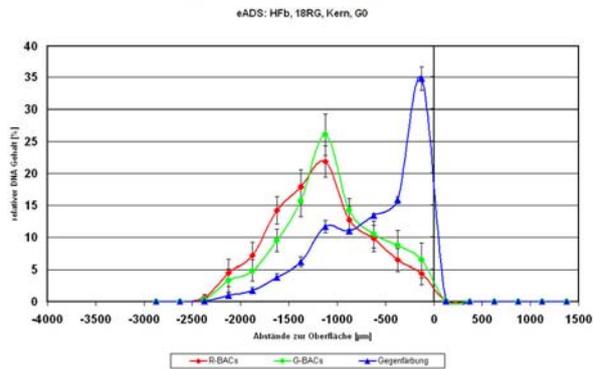
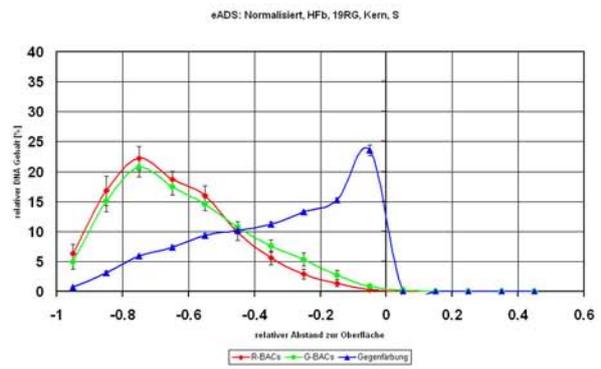
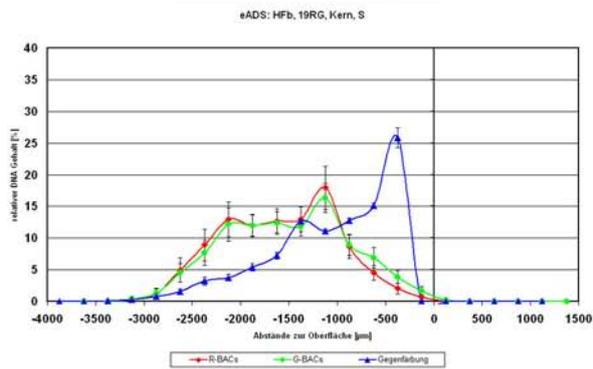
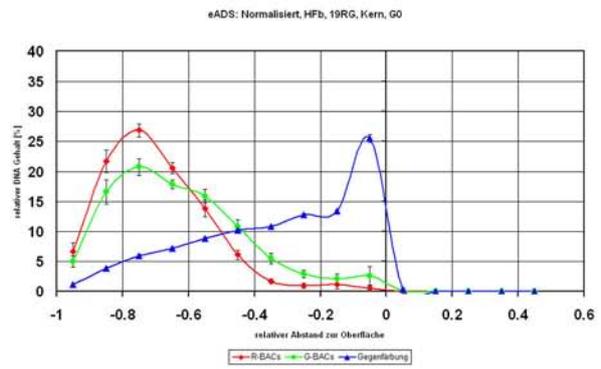
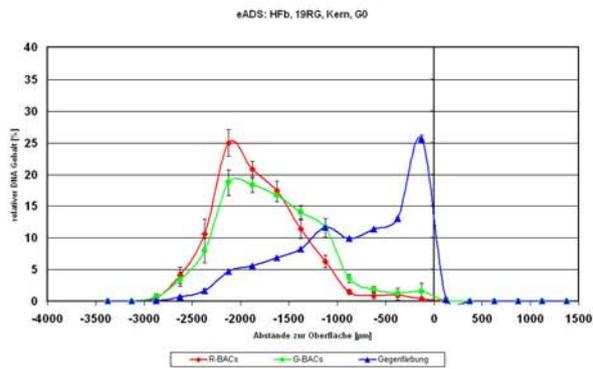
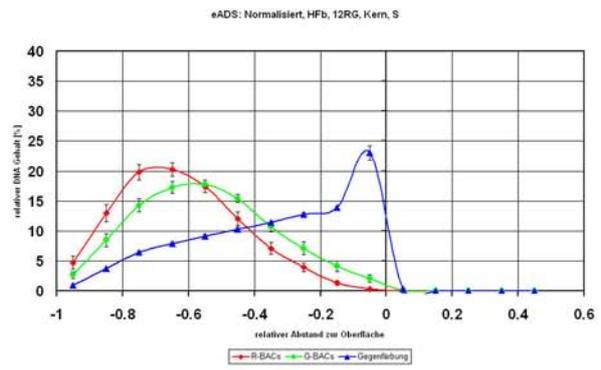
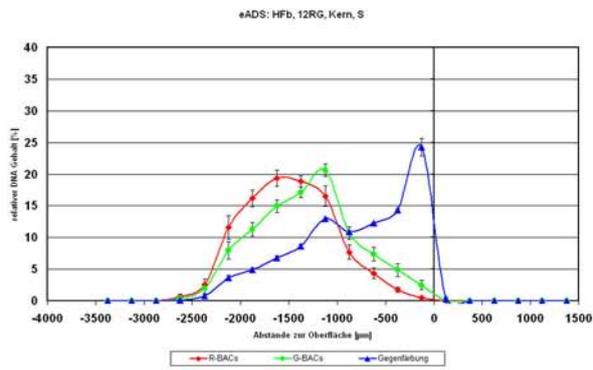
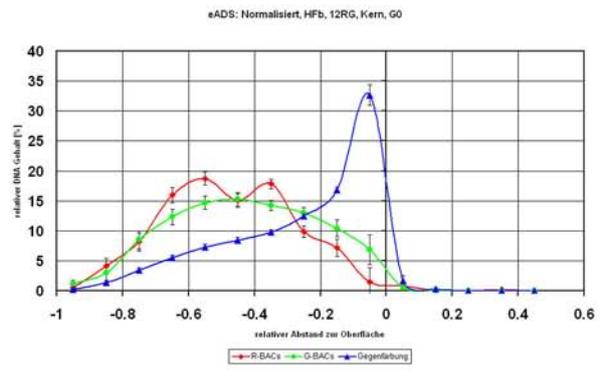
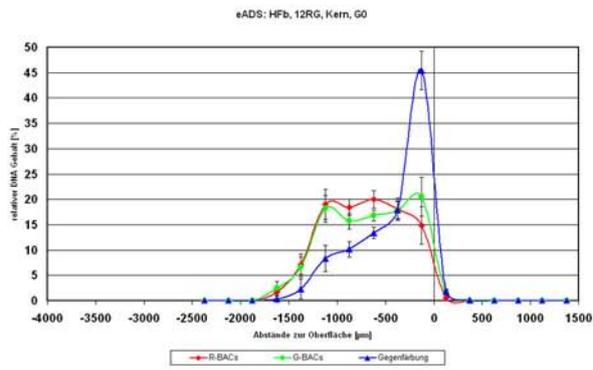


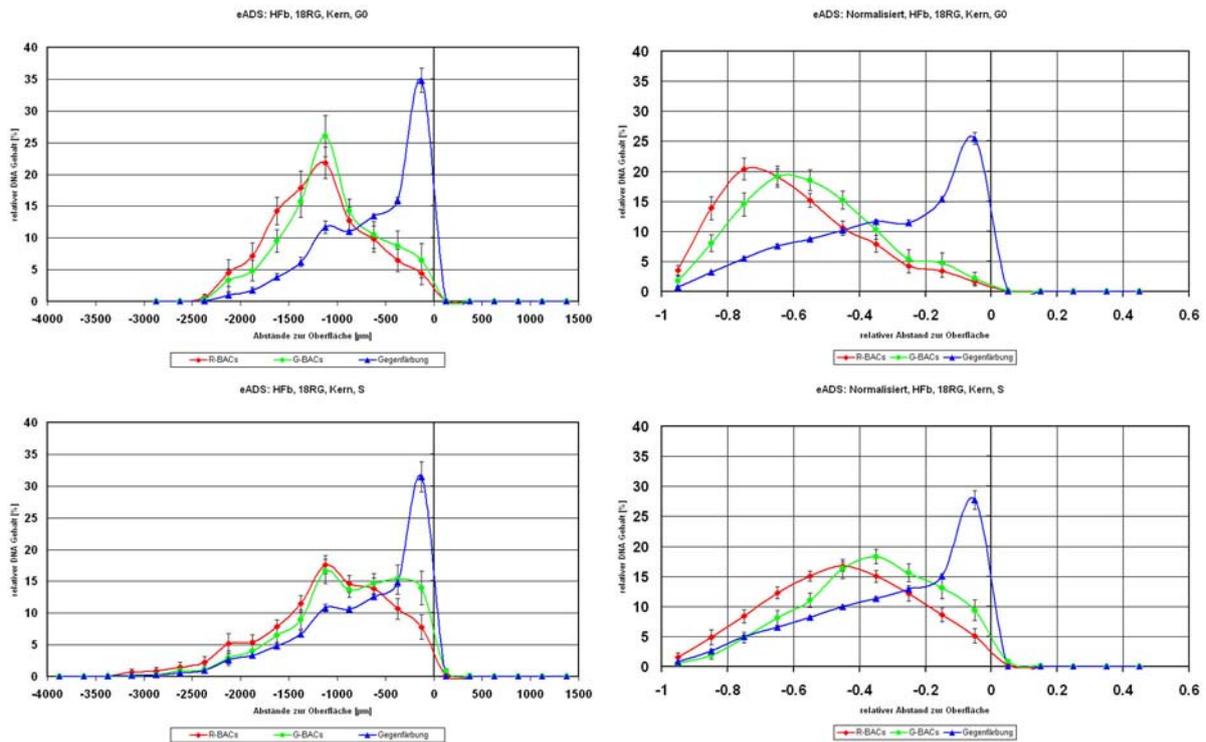




7.7.2 Ergebnisse der humanen Fibroblasten

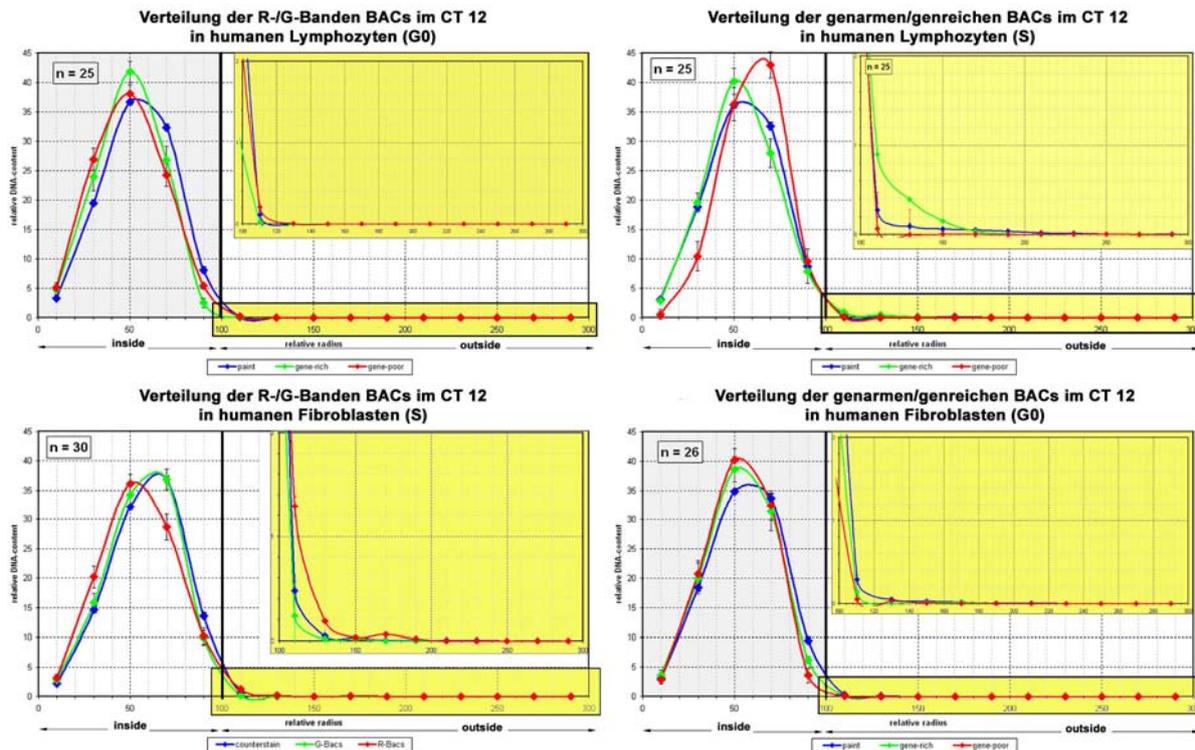






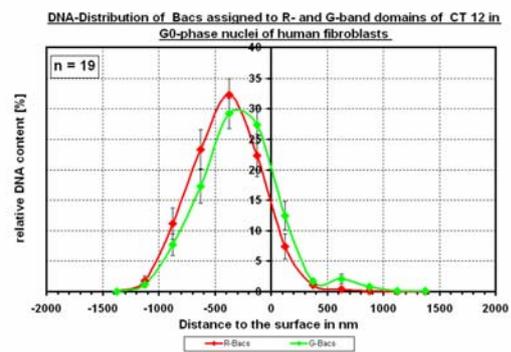
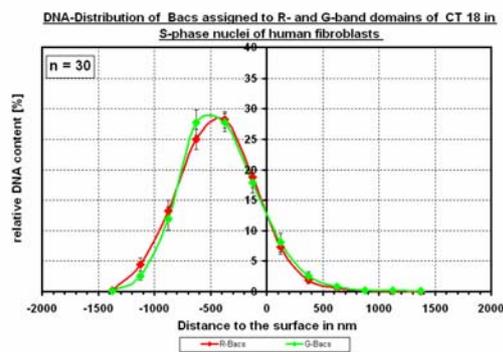
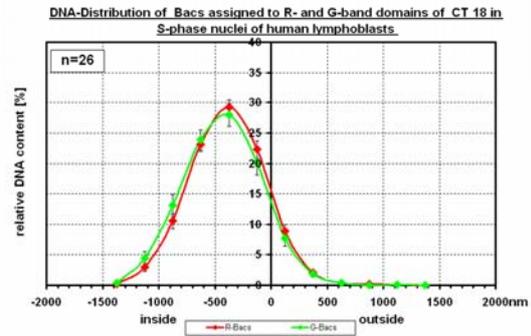
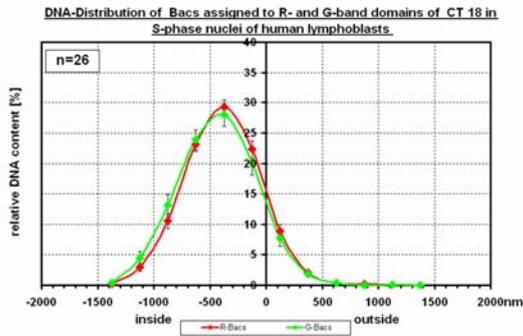
7.8 Anordnung der BAC-Pools innerhalb der Chromosomenterritorien

7.8.1 Beispiele für die Auswertungen mit dem erweiterten 3D-RRD Programm

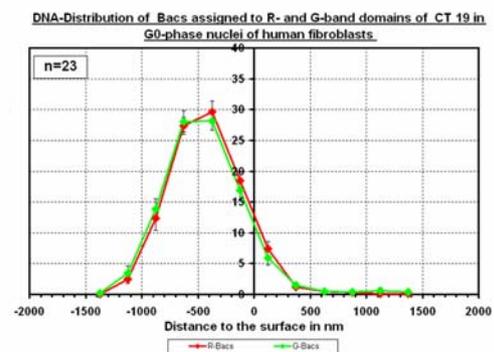
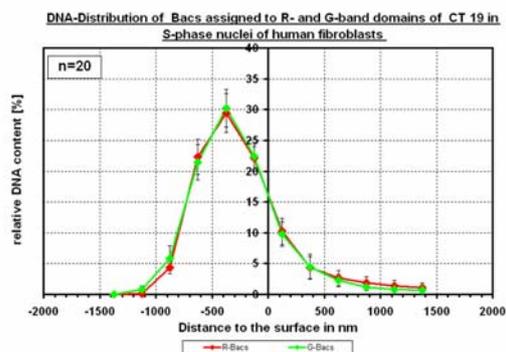
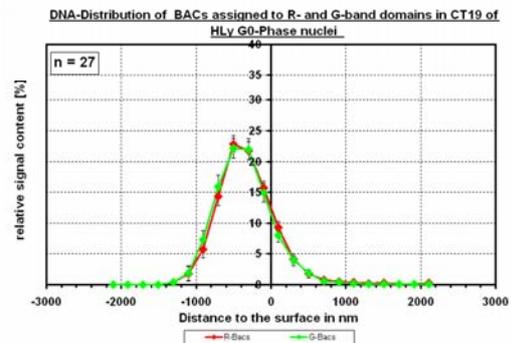
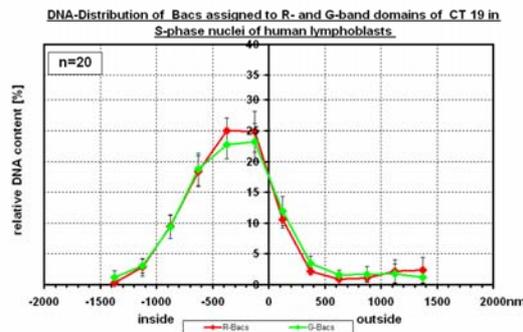


7.8.2 Anordnung der BACs im Bezug zur Oberfläche der Chromosomenterritorien

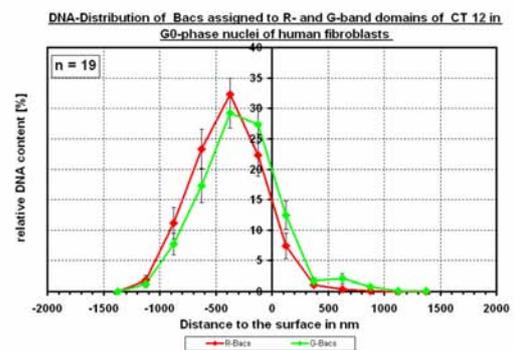
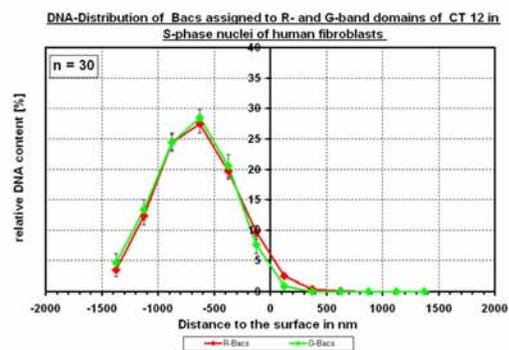
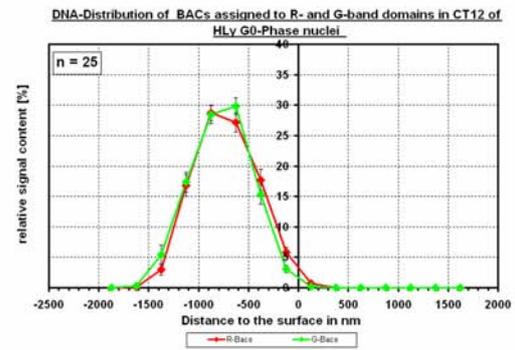
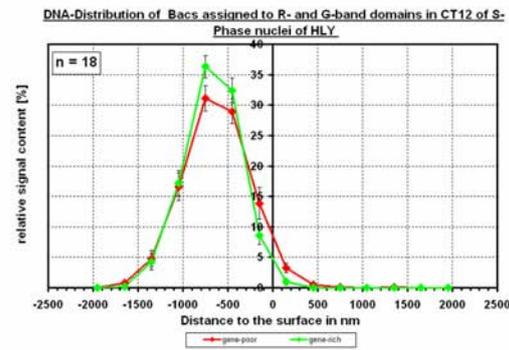
CT 18 RG PAINT ADS



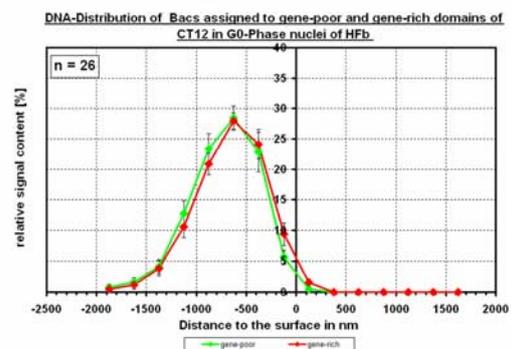
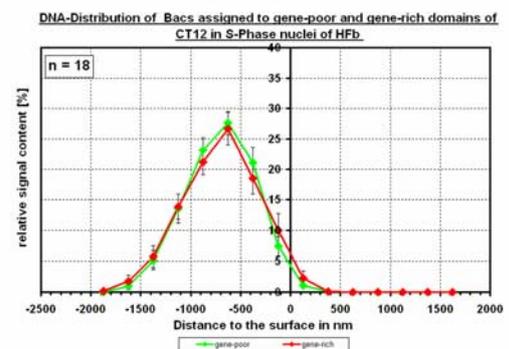
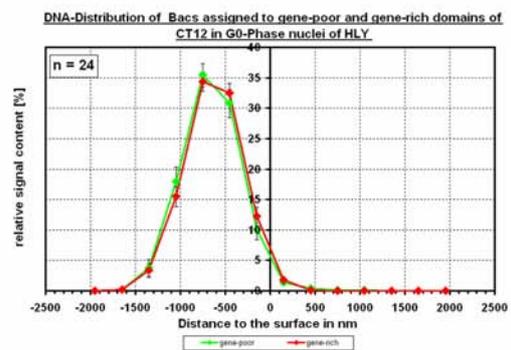
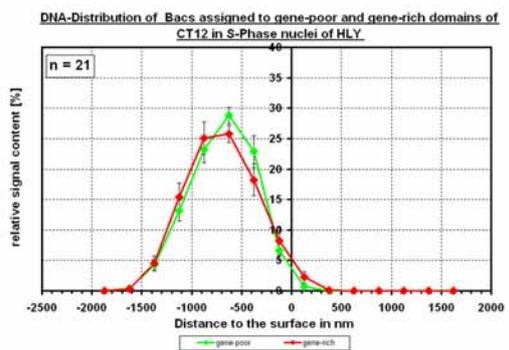
CT 19 RG PAINT ADS



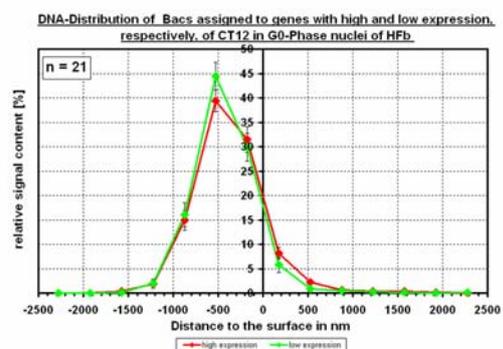
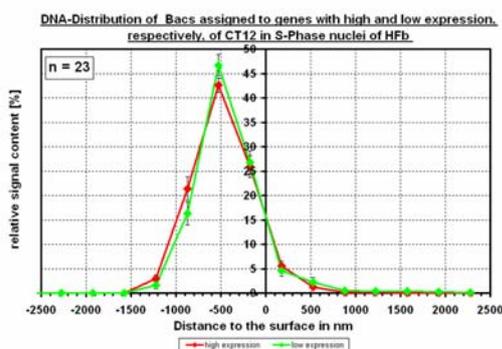
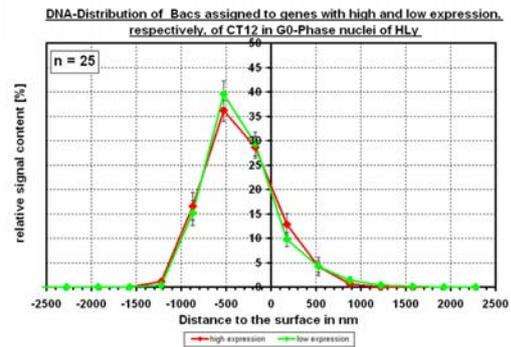
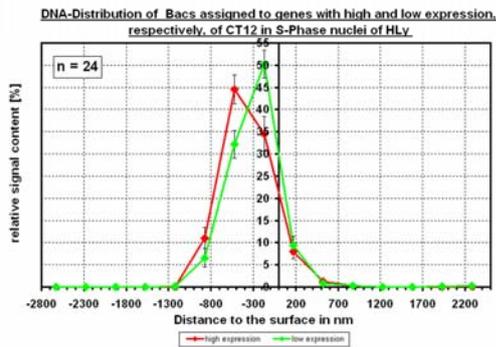
CT 12 RG PAINT ADS



CT 12 genepoor/generich PAINT ADS

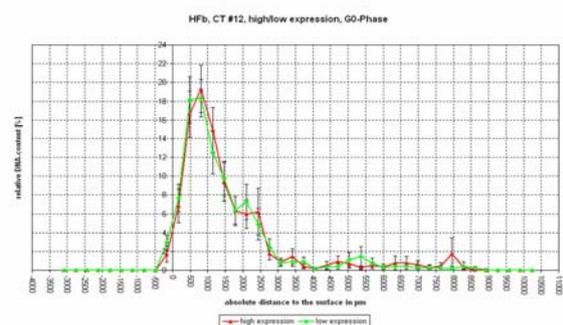
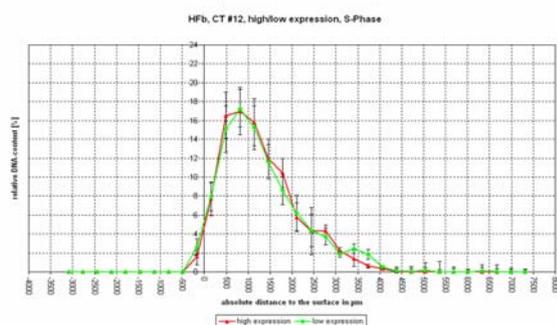
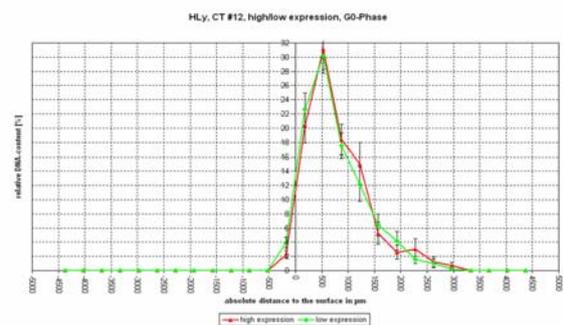
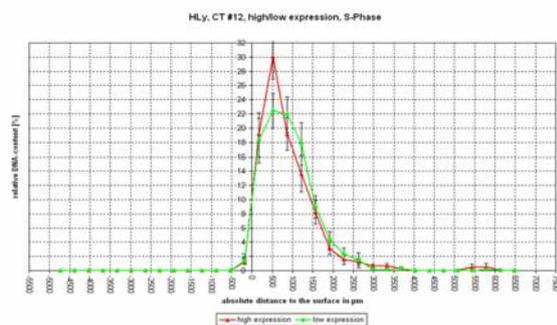


CT 12 high/low expression PAINT ADS

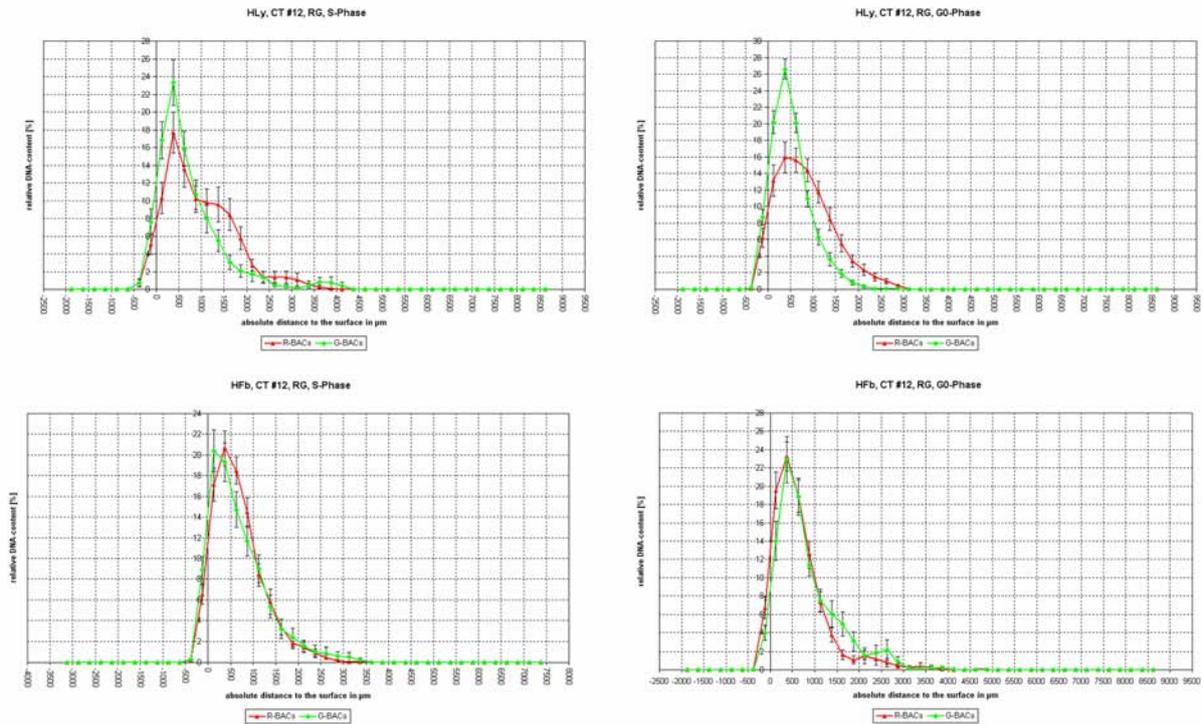


7.8.3 Analyse der CT-Struktur: Maximum Brightness Center (MBCs)

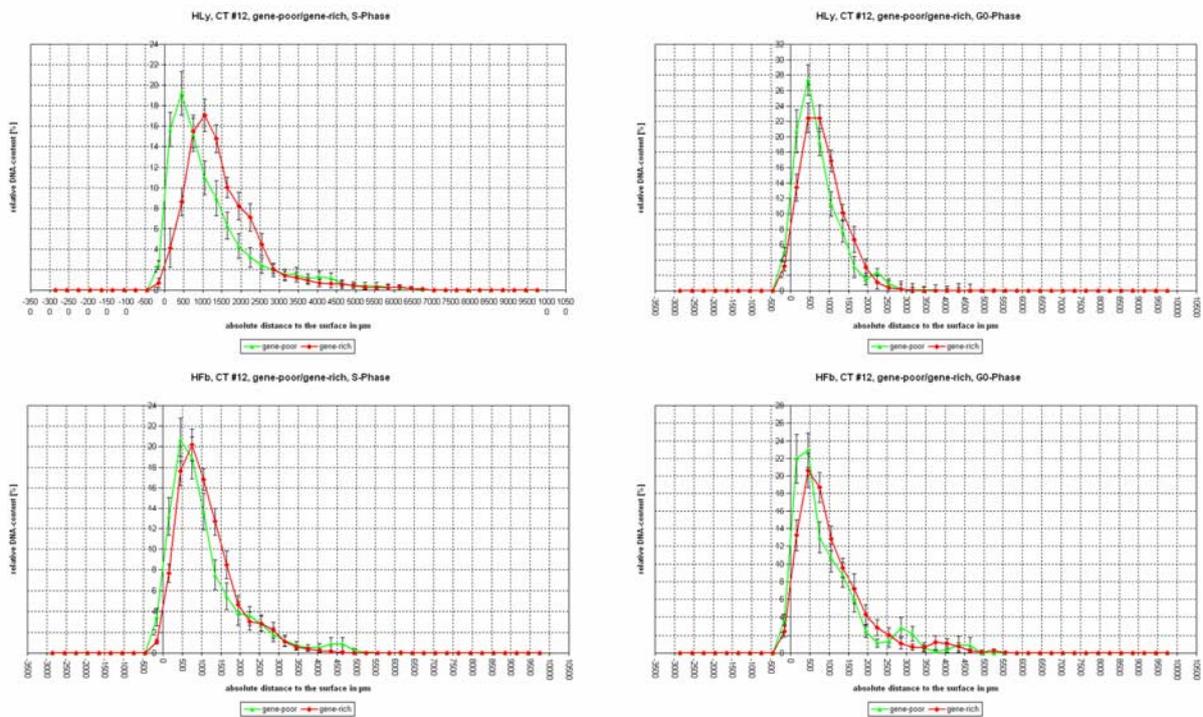
CT 12 high/low expression PAINT MBC (eADS)



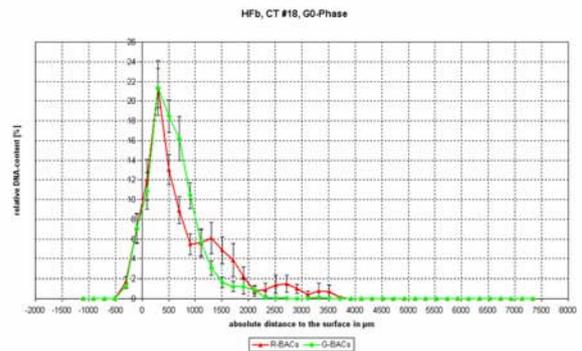
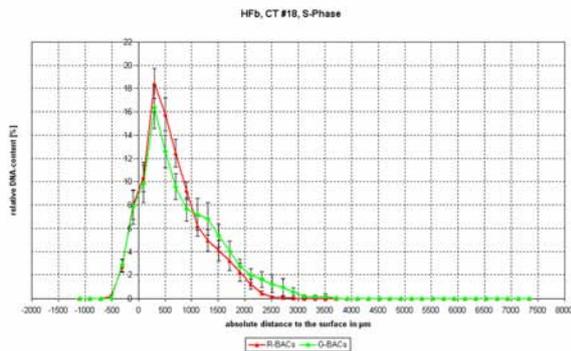
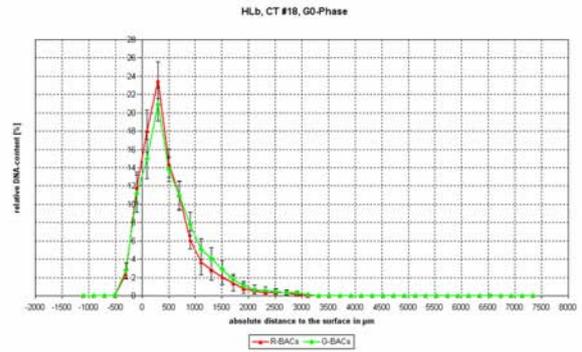
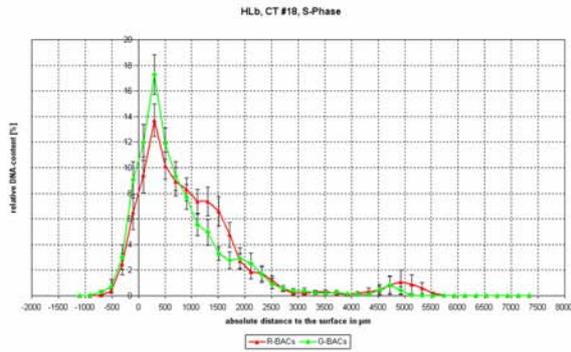
CT 12 RG PAINT MBC (eADS)



CT 12 genepoor/generich PAINT MBC (eADS)



CT 18 RG PAINT MBC (eADS)



CT 19 RG PAINT MBC (eADS)

