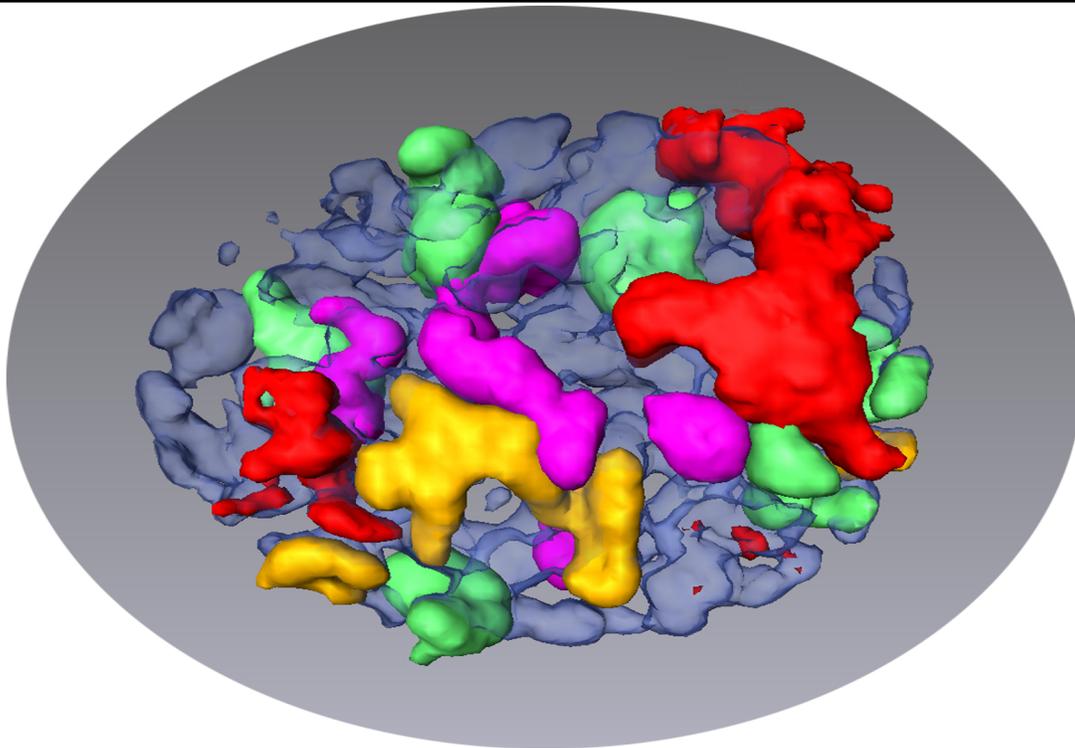




Untersuchungen
zur Frage einer Repositionierung
von Chromosomen, subchromosomalen Elementen
und spezifischen Loci durch die Mitose
und nach transkriptioneller Aktivierung



Andreas Zunhammer

Dissertation an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Eingereicht am 15.06.2011

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Cremer
Zweitgutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger
Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Zusammenfassung.....	4
2. Einleitung.....	8
2.1. Zellkernarchitektur.....	8
2.1.1. Einführung.....	8
2.1.2. Chromosomenterritorien und das CT- IC- Modell.....	9
2.2. Kernkompartimente und Interchromatinkompartiment.....	12
2.2.1. Nukleolus.....	12
2.2.2. Splicing Speckles.....	13
2.2.3. Cajal Bodies.....	13
2.2.4. PML- Bodies.....	14
2.2.5. Lamina.....	14
2.3. Radiale Verteilungen.....	14
2.3.1. Chromosomenterritorien in der Interphase.....	14
2.3.2. Radiale Verteilung in Abhängigkeit von der Gendichte.....	15
2.3.3. Größenabhängige Verteilung.....	16
2.3.4. Verteilung in Abhängigkeit von Gendichte und Größe.....	16
2.3.5. Radiale Anordnungen in der Mitose.....	17
2.3.6. Lebendzellversuche zu Chromatinanordnungen in Interphase und Mitose.....	19
2.3.7. Radiale Anordnungen von Zentromeren in Interphase und Mitose.....	22
2.3.8. Verteilungen von Minichromosomen und eines durch Amplifikation vergrößerten Chromosoms in Interphase und Metaphase.....	24
2.3.9. Evolutionäre Aspekte einer radialen Chromatinverteilung.....	25
2.3.10. CT-Positionierungen in postmitotischen und seneszenten Zellen.....	26
2.4. Nachbarschaften von CTs.....	28
2.5. Genpositionierung und Differenzierung.....	30
2.6. Chromatinmobilität.....	32
2.7. Translokation und DNA- Reparatur.....	34
2.8. Kotranskription und Koregulation durch räumliche Interaktionen.....	36
3. Material und Methoden.....	40
3.1. Verwendete Materialien.....	40
3.2. Zellmaterial.....	48
3.2.1. Fruchtwasserzellen (Amniotic Fluid Cells AFC).....	48
3.2.2. Humane Fibroblasten (HFB).....	48
3.2.3. DLD1- Zellen.....	48
3.2.4. Human Mammary Epithelial Cells (HMEC).....	49
3.2.5. HeLa Gold Zellen.....	49
3.2.6. HeLa Zellen.....	50
3.2.7. IMR-90 Zellen.....	50
3.2.8. HFB-0 Horvath.....	51
3.2.9. Humane Lymphozyten (HLy).....	51
3.2.10. Humane Fibroblasten mit einem Small Accessory Chromosome (SAC).....	51
3.2.11. Fibroblasten des Chinesischen Hamsters mit einem Human Chromosomal Vector (HCV).....	51
3.2.12. Maus-A9-Zellen mit HCV.....	52
3.2.13. Primäre Mausfibroblasten mit HCV.....	52
3.2.14. Kelly- Zellen.....	53
3.2.15. MCF 7- Zellen.....	53
3.2.16. MCF 7 + paGFP H4 bzw. ER- GFP.....	54
3.2.17. RPE1- Zellen.....	54

3.3. Zellkultur:.....	55
3.3.1. Auftauen und Kultivierung von Zellen	55
3.3.2. Kultivierung und Ausdünnen der Zellen.....	55
3.3.3. Einfrieren von Zellen	56
3.4. Herstellung von Metaphasepräparaten	56
3.4.1. In Suspension wachsende Zellen/Isolation der Lymphozyten	56
3.4.2. Adhärent wachsende Zellen	57
3.4.3. Auftropfen von Metaphasepräparaten.....	58
3.5. BAC Sonden.....	59
3.5.1. Kultivierung von E.coli und DNA Präparation.....	59
3.6. Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)	61
3.6.1. Vorbereitung der Sonden	61
3.6.1.1. Amplifikation von DNA- Sonden mittels DOP- PCR	61
3.6.1.2. Whole Genome Amplification (WGA)	63
3.6.2. Markieren von DNA Sonden.....	63
3.6.2.1. Label DOP PCR	63
3.6.2.2. Nicktranslation (NT)	65
3.6.3. Fixieren von Zellen auf Deckgläsern für 3D FISH/ImmunoFISH.....	65
3.6.4. Vorbereiten des Hybridisierungsmix (HM)	67
3.6.5. Denaturierung und Hybridisierung.....	68
3.6.6. Stringenzwaschungen und Detektion der Sonden.....	68
3.7. BrdU- Markierung und ImmunoFISH.....	69
3.8. Monitoring.....	71
3.9. Seneszenzassoziierter β - Galaktosidase Test (SA- β - Gal- Test).....	74
3.10. Stimulierung von Zellen mit Östrogen.....	76
3.10.1. Extraktion von Gesamt- RNA	76
3.10.2. Reverse Transkription	77
3.10.3. Genspezifische PCR.....	77
3.10.4. TaqMan Sonden	78
3.10.5. Validierung der Sonden und qPCR	79
3.10.6. RealTime qPCR.....	80
3.11. (Transiente) Transfektion von Zellen für die Lebendzellmikroskopie	81
3.12. Evaluationsprogramme.....	82
3.12.1. 3D RRD.....	82
3.12.2. eADS	83
3.13. Mikroskopie	84
3.13.1. Phasenkontrastmikroskopie.....	84
3.13.2. Epifluoreszenzmikroskopie.....	84
3.13.3. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	85
3.13.4. Lebendzellmikroskopie	86
3.14. Bildbearbeitung	87
3.14.1. Adobe Photoshop 7.0, 9.0 CS2, 11.0 CS4.....	87
3.14.2. Image J 1.41o	87
3.14.3. Volocity 5.2.....	88
3.14.4. Amira 4.2, 5.2, 5.3.....	88
3.15. Statistik.....	89
3.15.1. SigmaStat 3.0 SPSS Inc.	89
3.16. Vermeidung einer bewussten oder unbewussten Vorauswahl	90
4. Ergebnisse:	92
4.1. Die größenabhängige radiale Verteilung von Chromosomenterritorien in Interphasekernen und Metaphasenplatten	92

4.2. Radiale Verteilung von Minichromosomen und eines durch Amplifikation vergrößerten Chromosoms in Interphase und Metaphase	103
4.2.1. SACs in humanen Fibroblasten.....	104
4.2.2. HCVs auf Hamsterfibroblasten	106
4.2.3. HCVs in Maus A9- Zellen	108
4.2.4. HCVs in primären Mausfibroblasten	109
4.2.5. HSR in Kelly Zellen.....	110
4.3. Radiale Verteilung von Zentromeren großer und kleiner Chromosomen in Inter- und Metaphase.....	113
4.4. Bevorzugte Assoziationen von Zentromeren an Nukleolus und Lamina in Abhängigkeit der größenabhängigen Lokalisation ihrer CTs	118
4.5. Ähnlichkeit von Tochterzellklonen.....	121
4.6. Radiale Anordnungen in Lebendzellversuchen.....	128
4.7. Positionsänderungen von Genloci nach Stimulation der Transkription.....	134
4.7.1. Auswirkungen von replikativer Seneszenz auf die Lokalisierung von nukleolusassoziierten Chromatindomänen.....	134
4.7.1.1. Der PSG- Cluster in HeLa Zellen	134
4.7.1.2. Der PSG- Cluster in IMR90 Zellen.....	149
4.7.1.3. Weitere NAD- Regionen in IMR90 Zellen	152
4.7.2. Östrogenstimulation von MCF 7 Zellen.....	155
5. Diskussion	162
5.1. Methodische Aspekte von FISH- Experimenten auf dreidimensionalen Metaphasen	163
5.2. Korrelation einer größenbasierten Verteilung in Interphase und Metaphase.....	165
5.3. Auch Minichromosomen und eine HSR zeigen eine größenabhängige Verteilung....	169
5.3.1. Die Lage von Minichromosomen aus zweidimensionaler Sicht.....	169
5.3.2. Minichromosomen sind in dreidimensionalen Kernen häufig mit der Lamina assoziiert	174
5.4. Die radiale Lage der HSR in der Interphase wird von transkriptioneller Aktivität bestimmt.....	176
5.5. Die zweidimensionale Position von Zentromeren entspricht der größenabhängigen Position ihrer Chromosomen.....	177
5.6. Die dreidimensionale Lage von Zentromeren lässt sich nicht von der Größe der Chromosomen ableiten.....	179
5.7. Der Winkel zwischen Tochterkernen erlaubt keinen Rückschluss auf die Ähnlichkeit der CT- Anordnungen	182
5.8. Die Mitose verändert die Nachbarschaften von Chromatin, die relative radiale Lage bleibt jedoch erhalten	186
5.9. Auswirkungen von Transkriptionsänderungen auf die Anordnung im Kern.....	188
5.9.1. Trotz Hochregulation verändert der PSG- Cluster seine perinukleoläre Position nicht	188
5.9.2. Die Stimulation mit Östrogen liefert keine Hinweise auf die Reorganisationen im Kern.....	192
6. Ausblick	198
7. Referenzen.....	200
8. Abkürzungen	212
9. Abbildungsverzeichnis	213
10. Publikationen.....	215
11. Curriculum Vitae.....	216
12. Danksagung.....	218
Ehrenwörtliche Versicherung.....	220

1. Zusammenfassung

Viele Studien berichten von nicht-zufälligen Anordnungen von Chromosomenterritorien (CTs) in Zellkernen. Dabei herrscht Uneinigkeit, von welchen Parametern diese Verteilungsmuster abhängig sind, wann sie sich herausbilden und ob die Muster und damit Nachbarschaften von CTs in zyklierenden Zellen auch über die Mitose hinweg erhalten werden oder ob nichtzufällige Anordnungen während der Mitose verloren gehen und zu Beginn der Interphase neu gebildet werden müssen.

Um dieses Problem genauer zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit 3D-Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) Experimente auf fünf unterschiedlichen Zelllinien mit relativ flachen Kernen durchgeführt. Aus früheren Untersuchungen war bereits bekannt, dass der Abstand der Chromosomenterritorien von dem in einer 2D-Projektion erkennbaren Kernrand mit dem DNA-Gehalt der Chromosomen korreliert. Große Chromosomen liegen nahe am Kernrand, kleine Chromosomen näher am Kernzentrum. In dieser Dissertation wurde zum ersten Mal ein systematischer Vergleich der Anordnungen in Metaphasenplatten mit den Anordnungen in Zellkernen durchgeführt. Dazu wurden Kombinationen von FISH-Sonden zu Chromosomenpools zusammengestellt, bestehend aus großen, mittelgroßen und kleinen Chromosomen, sowie NOR (Nukleolusorganisatorregion)-tragenden Chromosomen. Korrelationsanalysen bestätigen einen klaren Zusammenhang zwischen den Anordnungen von CTs während der Interphase und der Anordnung mitotischer Chromosomen in der Metaphasenplatte. In beiden Stadien zeigte sich eine Abhängigkeit der Anordnungen von der Größe der CTs in den untersuchten Zelltypen: kleine und akrozentrische Chromosomen nehmen einen zentralen Platz ein, große und mittlere Chromosomen besetzen die Regionen am Kernrand bzw. in der Peripherie der Metaphase-Platte.

Um herauszufinden, ob die Anordnung nach Größe auch für pathologische, natürlich vorkommende oder künstliche erzeugte Chromosomen gilt, wurden zentromerhaltige Minichromosomen und daraus generierte kleine, ebenfalls zentromerhaltige, lineare und zirkuläre Vektoren auf ihre Lage im Kern hin untersucht. Auch hier wurde sowohl in Interphasekernen als auch in Metaphasenplatten eine zentrale Lage gefunden. In einem weiteren Experiment wurde die Neuroblastom-Zelllinie Kelly untersucht. Sie enthält zwei pathologische HSA17 Chromosomen, die eine HSR (*H*omogeneously *S*taining *R*egion) des MYCN Gens mit etwa 100 Mb enthalten. Dadurch erreichen die beiden Chromosomen einen DNA-Gehalt, der in etwa dem Gehalt von HSA1 entspricht. In den oben beschriebenen Experimenten nehmen die HSA17 Territorien in Metaphaseplatten und Interphasekernen

einen zentralen Bereich ein, während die HSA1 Territorien in der Peripherie der Metaphaseplatten bzw. am Kernrand liegen. Im Gegensatz dazu zeigen die pathologischen HSA17 in Metaphasenplatten von Kelly Zellen eine periphere Lage. In der Interphase lässt sich eine zentrale oder periphere Lage der pathologischen HSA17 Territorien auf Grund der starken Dekondensation der HSR nicht schlüssig beurteilen.

Untersuchungen über die Positionen der Zentromere bestätigen die mehr zentrale bzw. mehr periphere Lage der Zentromere in den Interphasekernen in Korrelation mit der Größe der zugehörigen Chromosomen. Die Unterschiede dieser Anordnung sind jedoch in der Metaphase deutlich ausgeprägter als in der Interphase. Dieser Befund weist erneut darauf hin, dass Chromatinbewegungen in den sich neu bildenden Tochterzellkernen wesentlich für die endgültige Position von dichtem und genarmem Chromatin sind. Entgegen der Erwartung konnte eine bevorzugte Assoziation von Zentromeren kleiner Chromosomen an den Nukleoli und von Zentromeren größerer Chromosomen an der Lamina nicht nachgewiesen werden.

Aus früheren Untersuchungen von Tochterzellkern-Paaren ist bekannt, dass die meisten Paare eine hohe Ähnlichkeit der CT- Anordnung aufweisen, einige wenige Paare zeigen jedoch starke Anordnungsunterschiede (Daniela Köhler 2008). Als mögliche Erklärung wurde postuliert, dass solche Unähnlichkeiten zwischen den Tochterkernen Folge unterschiedlicher Elongationsrichtungen bei der Ausdehnung der neu gebildeten Tochterkerne sind. Für die vorliegende Arbeit wurde nun überprüft, ob der Winkel, den die beiden Kerne zu Beginn der G₁- Phase zueinander bilden, ein Gradmesser dafür sein könnte, wie unterschiedlich diese Elongationsrichtungen sind. Eine durchgeführte Analyse zeigte jedoch keinen Zusammenhang zwischen dem Winkel der beiden Kerne zueinander und dem Grad an Unähnlichkeit.

Im Gegensatz zur Konservierung der radialen Anordnung von Metaphasechromosomen und CTs während der Interphase zeigten Experimente mit einer *in vivo* Markierung von Chromosomen zu Beginn der Prophase, dass sich die Nachbarschaft der Chromosomen während der Prometaphase sehr stark verändern kann (Strickfaden, Zunhammer et al., 2010). Die in der Metaphaseplatte etablierte neue Nachbarschaftsanordnung der Chromosomen wird stabil an die beiden Tochterzellkerne weitergegeben und bedingt die meist hohe Ähnlichkeit der CT- Anordnung in Tochterzellkern- Paaren. Dagegen können sich die Nachbarschaften der CTs in den beiden Tochterzellkernen von den Nachbarschaften im Mutterzellkern stark unterscheiden. Die hier vorgelegten Untersuchungen zeigen nun außerdem, dass die radiale Anordnung des Chromatins trotz aller Änderungen von Nachbarschaften erhalten bleibt und der Mitose hierbei eine wichtige Rolle beim Erhalt der Anordnung zukommt. Alle Zentromere werden nach der Anheftung der Mikrotubuli unabhängig von der Größe der Chromosomen

zentral in der Metaphaseplatte angeordnet. Die Arme großer Chromosomen reichen dabei wesentlich weiter zur Peripherie der Metaphaseplatte. Diese Anordnung bleibt auch in den Anaphaserosetten und bis zur Neubildung der Tochterkerne erhalten. Auf diese Weise gelangen die Territorien der großen Chromosomen bevorzugt zum Kernrand. Diese Befunde zeigen die hohe Bedeutung der Zentromere und des Spindelapparats für eine größenabhängige, radiale Verteilung von CTs in aufeinanderfolgenden Generationen von zyklierenden Zellen. Das Zusammenwirken von Zentromeren und Spindelapparat allein genügt jedoch nicht, um zelltypspezifische Unterschiede der radialen Anordnung zu erklären. Hierfür könnten stochastische Dekondensationsprozesse oder auch gerichtete Bewegungen des Chromatins in der frühen G1-Phase verantwortlich sein, ebenso wie die transkriptionelle Aktivität von Genen.

Letztere Möglichkeit wurde im Rahmen dieser Dissertation untersucht, nämlich ob die Induktion der Transkription einen Einfluss auf die Lage der entsprechenden Genloci im Kern hat. Dabei wurden potentiell langfristige (Tage) und kurzfristige Reorganisationen (<1 Stunde) der Loci im Zellkern überprüft. Im ersten Fall wurde durch Behandlung mit BrdU innerhalb weniger Tage replikative Seneszenz induziert. Vor und nach dieser Induktion wurde die Lage eines Genclusters bestimmt, der in einer sog. *Nucleolus Associated Domain* (NAD) liegt. Dieser Cluster ist normalerweise inaktiv, wird aber in seneszenten Zellen aktiviert und hochreguliert. Die Hypothese einer Repositionierung dieses Locus von der als repressiv geltenden perinukleolären Region in transkriptionell aktive, weiter vom Nukleolus entfernt liegende Bereiche, konnte nicht bestätigt werden. Im Gegenteil nahm der Assoziationscharakter tendenziell sogar eher zu. Im zweiten Fall wurden mit gleichem Resultat Zellen untersucht, die Seneszenz Assoziierte Heterochromatin Foci (SAHF) ausbilden. Diese Resultate sprechen überraschenderweise für die Hypothese, dass Transkriptionsaktivität auch in der perinukleolären Region möglich ist.

In einer weiteren Experimentreihe wurden die Ergebnisse einer Veröffentlichung von Hu et al. (2008) überprüft. Die Autoren beschrieben, dass zwei östrogenabhängige Genloci (GREB1 auf HSA2 und TFF1 auf HSA21) nach Induktion mit Östrogen innerhalb von einer Stunde aufeinander zuwandern, kolokalisieren und gemeinsam reguliert werden. Da ein derartiger Effekt mit größeren Umstrukturierungen im Kern einhergehen sollte, wurden Lebendzelleexperimente mit MCF7-Zellen durchgeführt, die transient mit photoaktivierbarem GFP-H4 und mRFP-PCNA oder mRFP-H2B transfiziert waren. Die erfolgreiche Induktion wurde über die Verlagerung eines eGFP-markierten Östrogenrezeptors vom Zytoplasma in den Kern überprüft. Eine durchgeführte qPCR ergab im Gegensatz zum Befund von Hu et al.

(2008) jedoch nur eine moderate Hochregulation der beiden Gene. Photoaktivierte Streifen von Histon H4-paGFP auf Zellkernen östrogeninduzierter MCF7- Zellen gaben jedoch sowohl in Kurzzeit- als auch Langzeitexperimenten keinen Hinweis auf großräumige Bewegungen von CTs im Kern. Die Regionen der beiden Genloci wurden mit 3D FISH-Experimenten genauer untersucht. In 146 untersuchten Kernen, davon stammte etwa eine Hälfte von östrogenstimulierten, die andere von unstimulierten MCF7- Zellen, veränderten sich die 3D- Distanzen zwischen den Loci nach der Stimulation nicht. Nur in einem einzigen Fall wurde eine Kolo-kalisation der beiden Loci gefunden. Beide Loci lagen vor und nach Östrogenstimulierung an der Oberfläche der CTs. 3D- FISH Experimente mit BAC- Pools, die die TFF1 und GREB1 Loci jeweils 1MB in 3' und 5' Richtung umspannen, gaben keinen Hinweis darauf, dass diese Loci auf großen Chromatinschleifen liegen, die nach der Östrogenstimulierung aus den CTs herausragen.

2. Einleitung

2.1. Zellkernarchitektur

2.1.1. Einführung

1909 veröffentlichte der Würzburger Biologe Theodor Boveri (1862- 1915) einen Aufsatz mit dem Titel „Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalcephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität“ (Boveri, 1909). Hierin schreibt er jedem Chromosom eine Individualität hinsichtlich seiner Vererbungseigenschaften zu.

Als erster prägte er den Begriff Chromosomenterritorium (CT) und baute damit die Theorie von Carl Rabl aus, der die Anordnung der Chromosomen in der Mitose studierte und eine ähnliche Anordnung auch in der Interphase vermutete (Rabl, 1885). Jedes Chromosom nimmt demnach ein eigenes Territorium ein und vermischt sich nicht mit anderen. Erst etwa 70 Jahre später wurde dieses Konzept territorialer Anordnung überprüft und mittels UV-Mikrobestrahlung von Chromatin bestätigt (Zorn et al., 1979). Durch die Entwicklung der Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH, Manuelidis, 1985) konnten erstmals in fixierten Zellen einzelne Chromosomen sowohl in Mitose als auch in der Interphase spezifisch angefärbt werden. Anfangs konnten aufgrund der Beschränkungen bei der Anzahl der verfügbaren Fluoreszenzfarbstoffe nur wenige Chromosomen gleichzeitig in einem Zellkern aufgenommen werden. Die Entwicklung der „Multicolor- FISH“ ermöglichte es, alle Chromosomenterritorien eines Interphasekerns gleichzeitig sichtbar zu machen (Bolzer et al., 2005). Durch den Einsatz von modernen Konfokalmikroskopen und photoaktivierbarer Fluoreszenz in transgenen Fusionsproteinen ist es kürzlich gelungen, CTs in lebenden Zellen durch die Mitose und in der darauffolgenden Interphase in 4D zu verfolgen (Muller et al., 2010; Strickfaden et al., 2010). Diese Experimente konnten darüber hinaus ebenfalls das Konzept der territorialen Anordnung der Chromosomen in lebenden Interphasekernen bestätigen.

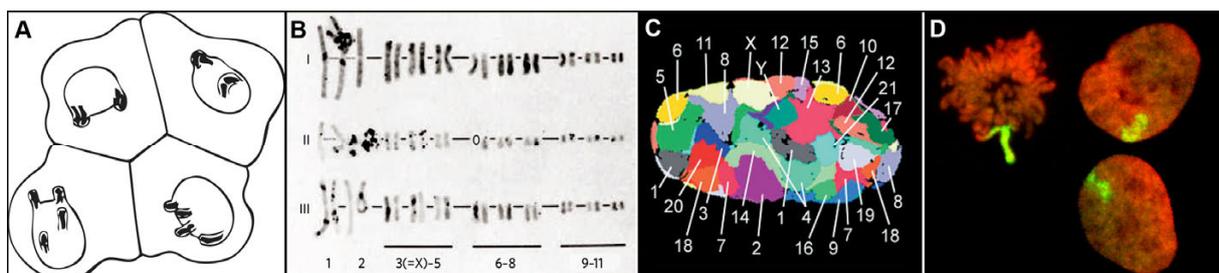


Abb.1: Übersicht einiger entscheidender Experimente zum Nachweis von Chromosomenterritorien über einen Zeitraum von 100 Jahren.

In (A) ist ein Embryo im Vierzellstadium von *Parascaris equorum* dargestellt, an dem Theodor Boveri über die Vergleiche der Kernfortsätze seine Theorien über Territorien aufstellte (Boveri, 1909). (B)

zeigt das Karyogramm einer Zelle, dessen Kern in der Interphase punktuell mit UV bestrahlt wurde. Die Reparatur von DNA-Schäden im mikrobestrahlten Kernareal wurde durch den Einbau von radioaktivem Thymidin autoradiographisch nachgewiesen. Die dunklen Foci auf den Chromosomen des Karyogramms entsprechen dem markierten Thymidin und beschränken sich auf wenige Chromosomen, was für territoriale Anordnung spricht (Zorn et al., 1979). In (C) ist die Projektion eines dreidimensionalen Zellkerns (humaner Fibroblast, 46 XY) dargestellt, in dem mittels Vielfarben-FISH alle Chromosomen gleichzeitig angefärbt sind (Bolzer et al., 2005). (D) beweist die Existenz von Territorien mit Lebendzellversuchen. In der Prometaphase wurde ein herausstehendes Chromosom mittels Photoaktivierung markiert, das in beiden Tochterzellen nach Ende der Mitose (rechts) jeweils zu einem zusammenhängenden Bezirk, einem Chromosomenterritorium, dekondensiert (Strickfaden et al., 2010).

Mittlerweile ist die territoriale Anordnung der Chromosomen in Interphasenzellen allgemein anerkannt (zur Übersicht über die Forschungen an CTs: Cremer and Cremer, 2006a, b; Cremer and Cremer, 2010). Kürzlich konnte die Existenz der CTs auch mit molekularbiologischen Verfahren nachgewiesen werden (Lieberman-Aiden et al., 2009).

2.1.2. Chromosomenterritorien und das CT-IC-Modell

Der Zellkern ist eine geordnete, dreidimensionale Struktur mit nichtzufälligen Anordnungen der Komponenten, die in ihrer Gesamtheit einen wesentlichen Einfluss auf Regulation und Transkription von Genen haben. Der folgende Abschnitt soll in Kürze den Aufbau von Chromosomen und das CT-IC Modell beschreiben. Auf für diese Arbeit wichtige Aspekte dieses Modells, aber auch anderer Modelle wird später genauer eingegangen.

Im Gegensatz zu mitotischen Chromosomen liegen Interphasechromosomen dekondensiert vor. Ihre Territorien stellen die oberste Organisationsstufe von linearer DNA dar. Dabei besitzen sie stärker kondensierte, konstitutive heterochromatische, fakultativ heterochromatische oder dekondensierte, euchromatische Bereiche, die mit Gendichte korreliert sind (Gilbert et al., 2004). Im Kern ordnen sich CTs in einer evolutionär konservierten (Koehler et al., 2009), nichtzufälligen radialen Organisationsstruktur an, die teils von der Gendichte (Croft et al., 1999), teils von der Chromosomengröße abhängig ist (Bolzer et al., 2005). Dadurch ergeben sich Implikationen für die verschiedenen, (ko-)regulierten Vorgänge wie z.B. Transkription, Prozessierung und Replikation (Cremer and Cremer, 2001; Albiez et al., 2006; Lanctot et al., 2007; Cremer and Cremer, 2010). Aufgebaut sind CTs aus etwa 1Mb großen Chromatindomänen, die gemeinsam repliziert und deswegen Replikationsfoci genannt werden. Sie bleiben auch in allen anderen Zellzyklusphasen erhalten (Berezney et al., 2000). Solche Foci können sich zu Chromatindomänen unterschiedlicher Größe zusammenschließen, die miteinander verbunden sind. Auch im dekondensierten Zustand der Interphase besitzen CTs räumlich getrennte Chromosomenarme und Kompartimente (Dietzel et al., 1998), die sich nicht oder nur zu einem geringen Anteil mit

denen anderer Chromosomen vermischen (Visser et al., 2000). Der Zellkern ist jedoch nicht nur mit Chromatin gefüllt. Immunfluoreszenzfärbungen von RNA- Proteinen und gleichzeitige in situ Hybridisierung einzelner DNA Domänen erbrachten den Beweis, dass Transkription meist in anderen Kompartimenten stattfindet und nicht nur innerhalb von CTs. Dieser Raum wurde ICD (*interchromosomal domain*) genannt (Zirbel et al., 1993), später dann Interchromatincompartment (IC). Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit chromatinspezifischer Färbung offenbarten darauf große netzwerkartige Räume, die sich zwischen den Chromatindomänen erstrecken (Visser et al., 2000). Auch in Zellkernen lebender Zellen konnte das IC als kontingentes Netzwerk nachgewiesen werden. Die Behandlung von Zellkernen mit einer hyperosmolaren Lösung führte zu einer Kondensation des Chromatins und offenbarte ein verzweigtes, chromatinumspannendes Netzwerk mit feinen Verästelungen, die sich lakunenartig auch ins Innere von CTs erstrecken. Im kondensierten Zustand durchgeführte Immunfluoreszenzfärbungen legten nahe, dass das IC nahe an der Oberfläche der CTs der Ort von Replikation, Transkription, Prozessierung, Spleißen und Reparatur ist (Albiez et al., 2006). Hochauflösende serielle elektronenmikroskopische Aufnahmen und anschließende 3D- Rekonstruktion zeigten in Kernen verschiedener Zelltypen einen Chromatinanteil von ca. 30% bis 60%, der Rest wird vom Interchromatinkompartiment eingenommen (Rouquette et al., 2009). Durch die feinen Verästelungen des IC kann Transkription von Genen auch im Inneren von CTs stattfinden (Mahy et al., 2002b; Sadoni and Zink, 2004; Kupper et al., 2007) und nicht nur wie früher gedacht ausschließlich an der äußeren Oberfläche der CTs oder der Subdomänen (Bridger et al., 2005). Ein Großteil der aktiven Gene befindet sich jedoch in einer 100- 200nm breiten Schicht des ICs um die Chromatinoberfläche, die als Perichromatinregion (PR) bezeichnet wird und in der ein Großteil der Transkription und erste Prozessierungsschritte stattfinden (Fakan and van Driel, 2007; Niedojadlo et al., 2011). In das PR ragen dekondensierte Chromatinschleifen mit aktiven Genen aus den CTs und es finden sich Perichromatinfibrillen darin: naszente RNA assoziiert mit Transkriptionsfaktoren, Polymerasen, snRNPs und hnRNPs. DNA Replikation findet ebenfalls in der PR statt (Jaunin et al., 2000). Solimando et al., (2009) entdeckten auch beschädigtes Chromatin und Reparaturkomplexe in der Perichromatinregion. Zusammengefasst sprechen diese Befunde dafür, dass viele essentielle Vorgänge wie Transkription, Prozessierung und Spleißen, aber auch Reparatur vornehmlich in der PR stattfinden (Rouquette et al., 2010).

Andere Modelle, wie z.B. das „*InterChromatin Network*“- (ICN-) Modell, bezweifeln die Existenz der Perichromatinregion und des Interchromatinkompartiments und postulieren ein

massives Durchmischen der Chromatinschleifen sowohl intra- als auch interchromosomal (*cis* und *trans*) (Branco and Pombo, 2006). Das ICN- Modell unterscheidet auch nicht zwischen dem Inneren und der Peripherie von CTs. Lange Schleifen aktiver Gene (Chambeyron and Bickmore, 2004) könnten sich in benachbarten „*expression hubs*“ (Kosak and Groudine, 2004), „*transcription factories*“ (Fraser and Bickmore, 2007) oder in spezialisierten „*transcription factories*“ (Schoenfelder et al., 2010) treffen, um gemeinsam transkribiert zu werden. Gene, die sich auf großen Chromatinschleifen befinden, sollen durch Verlagerung in repressive Bereiche wie z.B. die Lamina stillgelegt werden. Hochbewegliche Chromatindomänen, die lange Schleifen in aktive oder inaktive Bereiche aussenden können, entsprechen den Vorstellungen des *Long Range Interaction*- (LRI-) Modells. Eine Übersicht über das CT-IC und andere Modelle zeigt die folgende Abbildung:

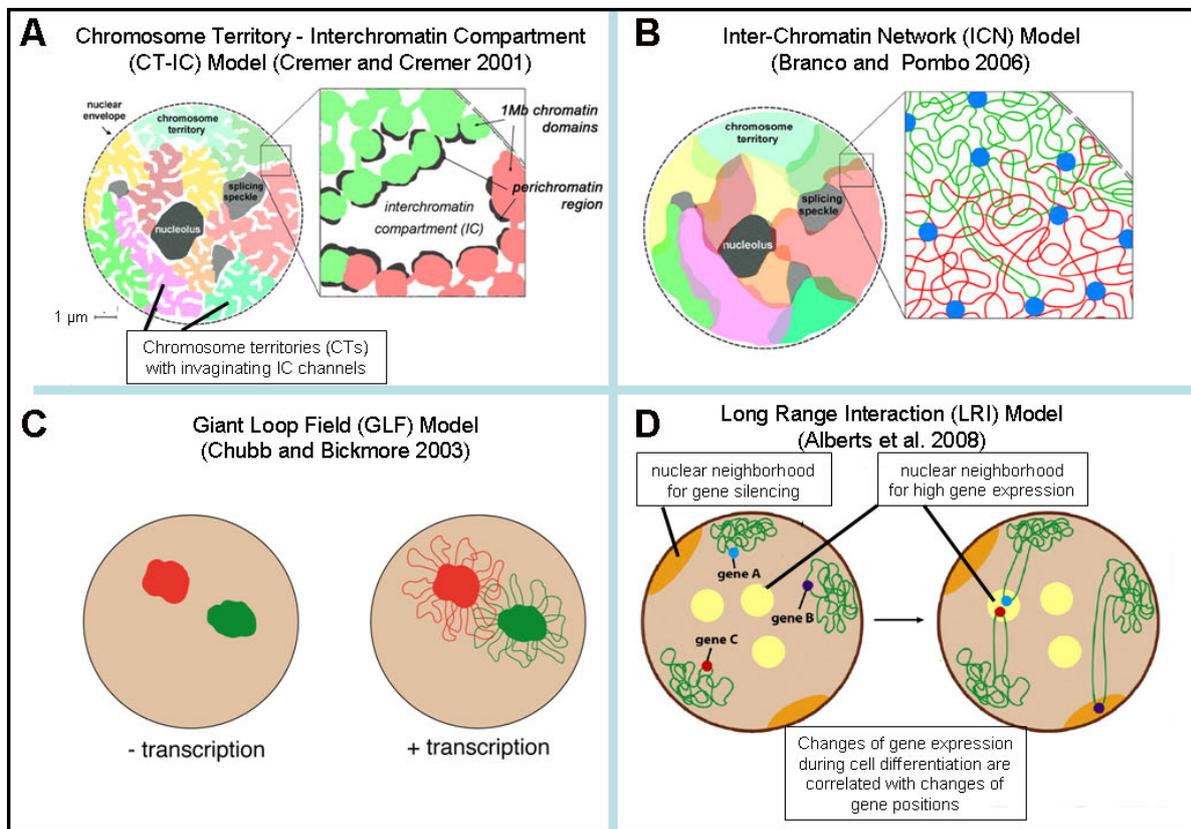


Abb. 2: Übersicht über das CT-IC Modell und andere Modelle.

Adaptiert aus Cremer and Zakhartchenko (2011 Fig.1.). (A): Das CT- IC Modell in vereinfachter Form. Gezeigt sind CTs, bestehend aus 1Mb großen Chromatindomänen, die miteinander verbunden sind. Das IC ist weitgehend DNA frei und erstreckt sich zwischen den Chromatindomänen. Als Grenzschicht zwischen CTs und IC ist die PR vermutlich das Hauptkompartiment für Transkription, Prozessierung und Spleißen, Replikation und DNA- Reparatur. Im ICN- Modell (B) gibt es keine distinkten Kompartimente mit verschiedenen Aufgaben wie IC und PR. Es postuliert stark dekondensierte Euchromatinfasern, die sich in *cis*, also innerhalb eines CTs, und *trans* mit benachbarten CTs vermischen und so Interaktion ermöglichen. Im *Giant Loop Field*- (GLF-) Modell (C) dekondensieren Chromatinabschnitte mit aktiven oder aktivierten Genen und bilden große Schleifen aus, die sich auch mit anderen *trans*- Schleifen vermischen können und sich in Feldern großer transkriptioneller Aktivität (*hubs*) treffen. Nach Deaktivierung der Bereiche ziehen sich die Schleifen wieder zum eigenen CT zurück. (D) zeigt das *Long Range Interaction*- (LRI-) Modell aus

dem aktuellen Standardlehrbuch von Alberts, (2008). Es basiert auf neuesten Ergebnissen von *trans*-Interaktionen, die vor Allem durch *chromosome conformation capture*- Techniken und deren Weiterentwicklungen erzielt wurden (siehe später). Ähnlich wie in (C) bilden sich über große Strecken lange Schleifen mit unterschiedlichen Genen aus, die in euchromatischen Bereichen oder *hubs* mit anderen Genen koreguliert und kotranskribiert oder auch in heterochromatischen Bereichen deaktiviert werden.

2.2. Kernkompartimente und Interchromatinkompartiment

CTs sind nur einer von vielen Bestandteilen des Zellkerns. Weitere Komponenten und funktionelle Kompartimente sind z.B. Nukleoli, *Splicing Speckles*, die Lamina, PML- und *Cajal Bodies*. Diese Komponenten finden sich im Interchromatinkompartiment, das sich zwischen und innerhalb der einzelnen CTs erstreckt. Die Funktion der einzelnen Komponenten und ihr Zusammenwirken im Kern soll im folgenden Abschnitt genauer erklärt werden.

2.2.1. Nukleolus

Die Nukleoli sind die prominentesten Vertreter der verschiedenen Kernkompartimente und bereits im Phasenkontrastmikroskop leicht erkennbar. In ihnen finden u. A. die rRNA-Synthese und der Zusammenbau ribosomaler Untereinheiten statt (Boisvert et al., 2007). Sie befinden sich immer in unmittelbarer Nachbarschaft zu den sogenannten NORs (nukleolusorganisierende Regionen), die auf den akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 liegen und auf denen die Sequenzen der 28S-, 18S, und 5,8S- rRNA codiert sind. Dabei sind nicht immer alle NOR- Regionen transkriptionell aktiv, nur solche, die den Transkriptionsfaktor für die RNA Pol I, UBF (*Upstream Binding Factor*), gebunden haben. Trotzdem sind auch inaktive NOR Regionen an Nukleoli zu finden (Sullivan et al., 2001; Smirnov et al., 2006).

Die Anzahl der Nukleoli variiert nicht nur von Zelltyp zu Zelltyp, ihre Anzahl kann sich auch in den verschiedenen Zellzyklusphasen verändern (Solovei, 2005). Quieszente und seneszente Zellen besitzen meist einen rundlich geformten Nukleolus (Bemiller and Lee, 1978; Solovei, 2005). Während der Mitose werden die Nukleoli in ihre Bestandteile zerlegt, wobei einige Elemente mit den NOR- Regionen (z.B. UBF) oder mit der Oberfläche von kondensierten Chromosomen (z.B. Prozessierungsproteine) assoziiert bleiben, andere nach der Auflösung der Kernmembran im Zytoplasma verstreut liegen. Gegen Ende der Mitose sammeln sich die verschiedenen Komponenten in den sogenannten *pre-nucleolar bodies* (PNBs), die diese Komponenten nach und nach freisetzen und in den sich neu bildenden Nukleoli akkumulieren. Dort lagern sich dann ebenfalls die NORs an und fusionieren, was zu einem fertigen,

funktionstüchtigen Nukleolus führt (Boisvert et al., 2007). Die Zusammensetzung des Proteoms von Nukleoli variiert, aber häufig gefundene Proteine legen nahe, dass Nukleoli neben den oben genannten Aufgaben auch an Zellzykluskontrolle, Mitose und Stressantwort beteiligt sind. Eine wichtige Rolle kommt dem Nukleolus auch in der zellulären Seneszenz und der Tumorgenese zu. Vornehmlich im Nukleolus lokalisierte Proteine wie B23/Nukleophosmin oder p14ARF sind direkt an der Regulation des Tumorsuppressors p53 beteiligt (Colombo et al., 2002; Wsierska-Gadek and Horvath, 2003; Mehta et al., 2007).

Die perinukleoläre Region, die vor allem aus perizentromerischem Heterochromatin besteht, gilt als transkriptionell repressiv (Nemeth et al., 2010). Daneben finden sich in den NADs (*Nucleolus Associated Domains*) genannten Bereichen repetitive Satelliten-DNA. Außerdem sind einige Genfamilien wie der PSG – Cluster (*Pregnancy Specific Glycoproteins*) und viele Sequenzen für Zinkfingerproteine im Vergleich zu anderen prominenten Heterochromatinbereichen wie laminassoziierten Domänen (LADs, *Lamin Associated Domains*) überproportional stark vertreten. In dieser Arbeit wurde die Positionierung des PSG- Clusters am Nukleolus nach Induktion replikativer Seneszenz untersucht.

2.2.2. Splicing Speckles

Splicing- oder *SC35 Speckles* sind Kernkörperchen, die sich im Elektronenmikroskop als granuläre Ketten (IGC; *Interchromatin Granule Clusters*) darstellen. Sie erreichen so insgesamt eine Größe bis zu einigen Mikrometern (Thiry, 1995). Sie dienen als Reservoirs von snRNPs, Untereinheiten des Spliceosoms und anderen Spleiß- Faktoren und sind so an der räumlichen Koordination von Transkription und Spleißen beteiligt (Lamond and Spector, 2003).

2.2.3. Cajal Bodies

Eine weitere Komponente sind die *Cajal Bodies*. Sie haben etwa einen halben bis einen μm Durchmesser. Gewöhnlich kommen mehrere *Cajal Bodies* im Kern vor, meist neben Clustern von Genen, die für Histone oder snRNAs codieren (Handwerger and Gall, 2006). Ihre genaue Funktion ist ungeklärt, jedoch enthalten sie Faktoren zur RNA- Prozessierung und sind vermutlich deswegen an Transkription, der Biogenese und dem Recycling von RNPs beteiligt (Misteli, 2008).

2.2.4. PML- Bodies

PML- (*ProMyelocytic Leukemia*) *Bodies* bilden sich durch Anreicherung eines Proteins gleichen Namens und sind ebenfalls an der transkriptionellen Regulation beteiligt. Des Weiteren sind sie an der Initiation der DNA- Reparatur und in der Folge an der Erhaltung der genomischen Stabilität und der Apoptose beteiligt (Boe et al., 2006).

2.2.5. Lamina

Die Lamina besteht aus einer Vielzahl von Proteinen und aus Laminen, die zu den intermediären Filamenten gehören. Sie befindet sich an der inneren Kernhülle und übt eine Stützfunktion aus, des Weiteren bildet sie Anheftungspunkte für das Chromatin. Die Lamina-assoziierten Chromatindomänen sind transkriptionell wenig aktiv, was für eine repressive Funktion der Lamina spricht (Guelen et al., 2008). Einige Krankheiten, Laminopathien genannt, sind auf Mutationen der Laminproteine zurückzuführen und äußern sich in vielfältiger Weise, z.B. in Muskeldystrophien oder vorzeitigem Altern. Zellkerne der letztgenannten Krankheit, dem *Hutchinson- Gilford- Progeria- Syndrom* (HGPS) zeigen Ähnlichkeiten in der Organisationsstruktur des Chromatins zu normal gealterten Zellkernen (Mehta et al., 2007). Dies legt nahe, dass die Lamina in ihrer Funktion einen großen Einfluss hat auf Chromatinregulation und eine Schlüsselfunktion in Seneszenz von Zellen und Altern im Allgemeinen besitzt.

2.3. Radiale Verteilungen

2.3.1. Chromosomenterritorien in der Interphase

Ein wichtiger Aspekt des CT- IC Modells ist die radiale Organisationsstruktur im Kern. Schon länger wird daran geforscht, wie sich Chromosomenterritorien oder allgemeiner Chromatin und andere Strukturen im Zellkern anordnen und welche Implikationen sich daraus für Transkription, Translation und andere Vorgänge im Zellkern ergeben (Blobel, 1985). Erste indirekte Hinweise, dass die Anordnung von Chromosomen im Kern nicht zufällig ist, ergaben Auswertungen von Metaphasenspreitungen (Hens et al., 1982; Wollenberg et al., 1982). Danach finden sich kleine Chromosomen mit einem hohen Anteil an früh-replizierendem Chromatin und relativ gendichte Chromosomen im Zentrum von 2D-Metaphasenplatten, während sich große Chromosomen mit einem hohen Anteil an relativ spät-replizierendem Chromatin außen anordnen. Einige Jahre später wurden die Untersuchungen auch auf dreidimensionale, mitotische Kerne ausgeweitet und eine größenabhängige radiale Verteilung für einige Chromosomen gefunden (Mosgoller et al.,

1991; Leitch et al., 1994). Zwei grundlegende Arten für die Ordnung im Kern werden diskutiert: die gendichteabhängige Anordnung und die größenabhängige Anordnung.

2.3.2. Radiale Verteilung in Abhängigkeit von der Gendichte

Das wohl bestuntersuchte Beispiel für eine gendichteabhängige Verteilung von CTs im Kern betrifft die Positionierung der menschlichen Chromosomen 18 und 19 (Croft et al., 1999). Beide Chromosomen sind relativ gleich groß, doch Chromosom 18 ist eines der genärmsten Chromosomen während Chromosom 19 dagegen das genreichste ist (HSA18: 8 Gene/Mb; HSA19: 28 Gene/Mb). Für Chromosom 18 Territorien ergibt sich eine signifikant stärker periphere Lage in menschlichen Lymphozyten als für das zentral gelegene Chromosom 19. Von Boyle et al. (2001) wurden alle Positionen von CTs in humanen Lymphoblasten untersucht und eine gendichteabhängige radiale Verteilung bestätigt. Diese gendichteabhängige Verteilung bestätigten Cremer et al. (2001) in Lymphozyten für insgesamt 11 Chromosomen. Kleine und genarme Chromosomen wie HSA18 und HSAY liegen peripher, genauso wie HSA1-5 und HSAX, die zwar groß, aber relativ genarm sind. Die kleineren und relativ genreichen Chromosomen HSA17, 19 und 20 befinden sich dagegen vermehrt im Zentrum. Eine weitere Bestätigung der Ergebnisse von Boyle et al (2001) für gendichteabhängige radiale Verteilungen von CTs in menschlichen Lymphozyten ergaben Untersuchungen von Weierich et al. (2003). Tanabe et al. (2002) konnten dieses Ordnungsprinzip anhand der homologen Sequenzen der menschlichen Chromosomen 18 und 19 in Lymphozyten von sieben verschiedenen Primatenarten nachweisen. Die Untersuchungen weiteten Neusser et al. (2007) auch auf andere Chromosomen unterschiedlicher Gendichte in Primatenlymphozyten aus und fanden eine Bestätigung des postulierten Ordnungsprinzips im Kern. Allen diesen Publikationen ist gemein, dass die meisten der untersuchten Zelltypen kugelige Kerne besitzen. Sowohl in kugeligen als auch eher flachen Kernen konnte die gendichteabhängige Verteilung der Chromosomen 18 und 19 bestätigt werden (Cremer et al., 2003) Sowohl normal diploide als auch Tumorzellen zeigten unabhängig von Translokationsereignissen diese Verteilung (Cremer et al., 2003). Des Weiteren konnten die Autoren zeigen, dass dieses Prinzip der Anordnung ein generelles zu sein scheint, da es beispielsweise in Blutvorläuferzellen und Blutzellen, in Tumorzellen und deren normalen Pendanten und in Tumorzellen unabhängig vom rearrangierten Karyotyp oder Translokationen gefunden wurde (Cremer et al., 2003).

2.3.3. Größenabhängige Verteilung

Neben der gendichtebestimmten Anordnung wurde auch eine größenabhängige Verteilung der Chromosomen beschrieben. Dies wurde klar, als Teile der oben genannten Untersuchungen zur Gendichte auf andere Zelltypen, z.B. Fibroblasten übertragen wurden. Diese Kerne besitzen einen ausgeprägt flachen, ellipsoiden Kern. In diesen Zellkernen wurden Anordnungsmuster entdeckt, die von den oben beschriebenen Mustern in mehr oder weniger kugeligen Zellkernen deutlich abweichen. Erste Ergebnisse dazu lieferten Sun et al. (2000). Anhand der besonderen Lage von Chromosomen in Prometaphasenrosetten von Fibroblasten mit Zentromeren, die in Richtung Zentrum gerichtet sind, nahmen sie an, dass allein aus physikalischen Gründen wie Größe und Masse der Chromosomen die kleineren Chromosomen nach Beendigung der Mitose im Zentrum verbleiben, während die größeren Chromosomen nach außen ausweichen. Und in der Tat konnten sie für neun verschiedene Chromosomen eine größenabhängige Verteilung finden. Zu übereinstimmenden Resultaten kamen Cremer et al. (2001), die die im vorigen Abschnitt für Lymphozyten beschriebenen Verteilungen in flachen Fibroblastenkernen testeten und auch eine größenabhängige radiale Verteilung fanden. Besonders deutlich waren die Ergebnisse für die Chromosomen 18 und Y, die in Lymphozyten eine stark periphere Lage aufgrund ihrer geringen Gendichte einnehmen, in Fibroblasten jedoch eine signifikant zentralere Position besitzen. Einige Zeit später wurden die Untersuchungen auf alle Chromosomen mit einer Vielfarben-FISH auf humanen Fibroblasten ausgeweitet. Es zeigte sich auch hier eine Größenabhängigkeit bezüglich der radialen Verteilung von Chromosomen in G₀- Zellen (Bolzer et al., 2005). Für einige Chromosomen konnte diese Verteilung auch für proliferierende Zellen bestätigt werden. Trotz der großen Unterschiede von HSA18 und 19 in der Gendichte zeigten ihre Territorien eine zentrale Verteilung sowohl bei HFB als auch bei Fruchtwasserzellen (*Amniotic Fluid Cells*, AFC), die ebenfalls flache, ellipsoide Kerne besitzen.

2.3.4. Verteilung in Abhängigkeit von Gendichte und Größe

Es gibt aber auch einige Publikationen, die in flachen Kernen eine positionelle Abhängigkeit der Chromosomen von der Gendichte (Croft et al., 1999; Boyle et al., 2001) oder beide Verteilungen finden, eine gendichteabhängige und eine größenbasierte Verteilung. Unterschiede in der Positionierung der beiden Chromosomen 18 und 19 konnten in proliferierenden, quieszenten oder seneszenten Zellen beobachtet werden (Bridger et al., 2000). Hierbei findet eine Repositionierung der Chromosomen 18 und 19 während des Übergangs zu quieszenten Zellen als auch umgekehrt von quieszenten zu proliferierenden

Zellen statt. Während die Chromosomen quieszenter Zellen eine größenabhängige Verteilung aufwiesen, beobachteten die Autoren nach Stimulierung und Wiedereintritt in den Zellzyklus eine eher gendichteabhängige Verteilung. Bolzer et al. (2005) fanden Hinweise dafür, dass trotz der oben angeführten Unterschiede in der Verteilung der Chromosomenterritorien auch wesentliche Übereinstimmungen in der radialen Anordnung des Chromatins bei kugeligen und flachen Zellkernen bestehen. Sowohl in Lymphozyten- als auch in Fibroblastenzellkernen fanden diese Autoren, dass sich Alu- und damit genreiche Chromatindomänen, entsprechend den R-Banden mitotischer Chromosomen, ausschließlich im Kerninneren befinden. Umrundet werden diese von gen- und Alu- armen Domänen, entsprechend den G/C- Banden, entlang der Kernperipherie. Auch in den Untersuchungen von Neusser et al. (2007) zeigten die Fibroblastenkerne einer Primatenart in Übereinstimmung mit Lymphozytenzellkernen für etwa gleich große Chromosomen eher gendichteabhängige Verteilungen. Generell wurde eine Polarität von CTs mit den genreichen Elementen in Richtung Zentrum und den genärmeren in Richtung Peripherie beobachtet. Diese Polarität bestätigten Kupper et al. (2007), die zeigen konnten, dass die radiale Verteilung im Kern und auch innerhalb eines CTs am besten mit der regionalen Gendichte und nicht mit der Expressionsrate oder dem Replikationszeitpunkt korreliert. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde die Existenz von CTs mit molekularbiologischen Mitteln bestätigt und auch eine räumliche Nähe von kleinen, genreichen Chromosomen bestätigt (Lieberman-Aiden et al., 2009). Neueste Untersuchungen von Heride et al. (2010) haben gezeigt, dass die radiale Anordnung am besten mit einem Quotient aus Gendichte und Chromosomengröße beschrieben wird. Dies führt zu der Annahme, dass die größenabhängige radiale Verteilung der Chromosomen nur ein grobes Einteilungsschema ist und weniger einen funktionellen Charakter hat, sondern mehr eine Folge geometrischer und physikalischer Zwänge ist, die sich aus der Anordnung in der Mitose ergeben. Auf subchromosomaler Ebene kommen auch andere Faktoren wie die Gendichte zum Tragen.

2.3.5. Radiale Anordnungen in der Mitose

Theodor Boveri stellte 1909 vier Kernthesen auf, wie sich Chromosomen in Interphase und Mitose verhalten und welche Änderungen im Verlauf eines Zellzyklus geschehen:

- (1) Chromosomen nehmen unterschiedliche Territorien (CTs) im Zellkern ein.
- (2) Die CT- Ordnung und Nachbarschaften werden während der Interphase stabil aufrechterhalten.

(3) Änderungen chromosomaler Nachbarschaften geschehen während der Mitose, genauer gesagt während der Prometaphase, wenn die Chromosomen an der Spindel befestigt werden und sich Richtung Metaphasenplatte bewegen. Daraus folgt, dass sich die chromosomale Anordnung in der Metaphasenplatte und der Interphase von einem Zellzyklus zum nächsten deutlich unterscheiden kann.

(4) Die Anordnungen und Nachbarschaften, die sich in der Metaphasenplatte bilden, bleiben in den zwei getrennten Chromatidenplatten über die Ana- und Telophase erhalten. Daraus resultieren große Symmetrien der CT- Anordnungen in den neugebildeten Tochterkernen.

Bereits 1885 entdeckte Carl Rabl, dass Chromosomen in der Ana- und Telophase eine besondere Orientierung einnehmen, mit den Zentromeren in Richtung der Zentrosomen und den Telomeren in Richtung der früheren Metaphasenplatte. Weiterhin nahm er an, dass diese Art der Anordnung, später Rabl- Konfiguration genannt, auch in der folgenden Interphase und bis zur Prophase bestehen bleibt (Rabl, 1885). In den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden diese Ideen wieder aufgegriffen und Anordnungen der Chromosomen vor allem während der Interphase untersucht (siehe oben). Chaly and Brown (1988) untersuchten die Bildung von Prometaphasenrosetten in mehreren Zelltypen. Mithilfe dieser Rosetten fanden sie einen Mechanismus, der die komplexen Bewegungen der mitotischen Chromosomen in der Übertragung der zweidimensionalen Anordnung von der Interphase zur Metaphase erklären konnte (siehe Fig 10 Chaly and Brown 1988). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde herausgefunden, dass die Zentromere kleiner Chromosomen in dreidimensionalen Metaphasen eine starke Affinität für das Zentrum der Metaphasenplatten aufweisen, während sich die Zentromere größerer und großer Chromosomen häufig außen anordnen. Zudem befanden sich die Zentromere der NOR- tragenden Chromosomen in unmittelbarer Nachbarschaft, resultierend aus deren Assoziationen mit den Nukleoli aus der vorhergehenden Interphase (Mosgoller et al., 1991). Mit ähnlichen Methoden, diesmal aber für ganze Chromosomen menschlicher Fibroblastenkerne, konnten auch Leitch et al. (1994) tendenziell eine größenmäßige Anordnung in der Metaphasenplatte feststellen. Ebenfalls große Ähnlichkeiten fanden Klein et al. (1998) in der zentralen Positionierung von NOR- Elementen im Vergleich zwischen Interphase und Metaphase menschlicher KB- Zellen. Die relativen Positionen bleiben dabei auch in den späten Mitosephasen erhalten und werden nicht zu Beginn der G₁- Phase neu gebildet. Dazu konnten sie auch detailgetreu die Übersetzung der zweidimensionalen Interphaseposition in eine senkrecht stehende Metaphasenplatte und zurück in die frühe Interphase mit den jeweiligen Positionen der NOR- Regionen zeigen.

Weitere Untersuchungen zu den Positionierungen in Prometaphasenrosetten postulierten nichtzufällige Anordnungen, aber nicht in Bezug auf die radiale Anordnung, sondern auf die Positionen der Homologen und als Folge aller Chromosomen zueinander. Dabei soll der maternale und paternale Anteil in zwei Halbkreisen, sog. haploiden Sets, getrennt gegenüber angeordnet sein (Nagele et al., 1995). Diese Anordnung soll nach der Prometaphase über alle restlichen Phasen der Mitose beibehalten werden. Eine Überprüfung dieser Behauptungen an verschiedenen Zelltypen widerlegte jedoch eine fixe Position homologer und heterologer Chromosomen in der Mitose, jedoch wurde bestätigt, dass die relativen Positionen über die Mitose hinweg erhalten bleiben (Allison and Nestor, 1999). Eine Korrelation von chromosomalen Arrangements zwischen Interphase und Mitose wurde auch bei Hühnerzellen gefunden, wobei die kleinen, genreichen Microchromosomen in beiden Phasen den zentraleren Teil einnehmen und sich die genarmen Macrochromosomen in der Peripherie befinden (Habermann et al., 2001). Diese Anordnung wird also über den Zellzyklus trotz aller Restrukturierungen während der komplexen Bewegungen in der Pro- und Prometaphase beibehalten.

2.3.6. Lebendzellversuche zu Chromatinanordnungen in Interphase und Mitose

Untersuchungen zur Dynamik der Chromosomen während der Mitose und der Bildung der Tochterkerne wurden von Gerlich et al. (2003) mit Hilfe von Lebendzellexperimenten durchgeführt. Dabei wurde die Fluoreszenz einer Hälfte des Zellkerns einer transgenen Zell-Linie, welche CFP- H2B und YFP- H2B exprimiert, parallel oder senkrecht zu einer angenommenen Spindelachse geblichen. In lebenden Zellen konnte, zumindest im Fall des parallelen Bleichens zur Spindel, in der Metaphase und den nachfolgenden Phasen das gleiche Muster wie in der vorausgegangenen Interphase beobachtet werden. Bleichen senkrecht zur Spindelachse produzierte in der Metaphase jedoch ein verstreutes Muster. Umso erstaunlicher war, dass nach Beendigung der Mitose in den nachfolgenden Tochterzellen wieder zusammenhängende Chromatinflächen zu finden waren. Für die Erklärung dieses Phänomens wurde ein Anaphasemechanismus postuliert, der auf unterschiedlichen Zeiten der Chromatidentrennung zu Beginn der Anaphase beruhen sollte. So sollte das Muster unabhängig von der Spindelposition über die Mitose hinweg in die nachfolgende Generation erhalten bleiben. Zu einem gegensätzlichen Ergebnis kamen Walter et al. (2003) in Lebendzellversuchen, die durch FISH- Experimente erweitert wurden. Sie konnten die von Gerlich et al. (2003) propagierten Ergebnisse mit Hilfe einer transgenen HeLa- GFP H2B

Linie nicht bestätigen. Im Gegensatz zu Gerlich et al. (2003) wurde die GFP Fluoreszenz im Zellkern bis auf einen kleinen Teil an den Kernpolen geblichen. In der Metaphase wurden sowohl Kerne mit verteiltem als auch zusammenhängendem fluoreszentem Chromatin gefunden. Es gab jedoch in der nachfolgenden Generation viele Kerne, die keine zusammenhängenden Chromatinbereiche besaßen. Dieses Ergebnis spricht gegen das Wirken eines angenommenen Anaphasemechanismus und für neu gebildete Nachbarschaften während der Prometaphase und der frühen G1- Phase. Der Grad an Neuverteilung des Chromatins ist also demnach abhängig von der Position der Spindel. Auch FISH- Experimente bestätigten, dass zwar bei vielen Tochterkernen eine große Ähnlichkeit untereinander vorhanden war, die Muster sich jedoch oft grundlegend von dem des Mutterkerns unterscheiden (Walter et al., 2003). Soweit bestätigten diese Ergebnisse die Thesen von Boveri: Die Existenz von CTs; die Annahme, dass die Anordnung in der Interphase stabil bleibt; dass sich die Nachbarschaften während der Prometaphase neu bilden und sich die Anordnung fundamental von der in der Interphase unterscheiden kann und schließlich, dass die großen Ähnlichkeiten der Nachbarschaften von Chromosomenterritorien in den Tochterzellkernen durch die symmetrische Weitergabe des Musters ab der Metaphase bedingt wird. Erklären lässt sich die Symmetrie der Tochterzellen durch die sog. „fallen rosettes“- Hypothese (Solovei et al., 2004b): die Metaphase steht hierbei senkrecht zur Wachstumsebene und durch die Polarität der Chromosomen sind alle gleich angeordnet mit den Kinetochoren in Richtung der Zentriolen. Am Ende der Anaphase fallen beide Rosetten in Richtung Substrat um, wobei es auf den Winkel der Metaphasenplatte in Relation zum Substrat ankommt, ob sie auf die Seite mit den Kinetochoren oder auf die andere Seite fallen. Die radiale Chromosomenanordnung wird dabei aber nicht grundlegend verändert und es ergibt sich ein relativ ähnliches Muster zwischen den beiden Tochterkernen, das spiegel- oder schiebesymmetrisch sein kann. Bei der Dekondensation von Chromosomen gegen Ende der Telophase und frühen G1 kann es aber noch zu (kleinen) Veränderungen kommen, was die endgültigen Positionen des Chromatins angeht (Bridger et al., 2000; Walter et al., 2003; Thomson et al., 2004). Dabei nimmt das Chromatin abhängig von der Gendichte und dem Replikationszeitpunkt, aber vermutlich unabhängig vom transkriptionellen Status seinen typischen Platz im inneren oder äußeren Kernbereich ein (Ferreira and Carmo-Fonseca, 1997). Im Gegensatz dazu konnten Manders et al. (2003) keine großskaligen Veränderung der relativen Positionen des Chromatins zueinander nach der Anaphase mehr feststellen. Dies bedeutet, dass die spätere Chromatinanordnung in den Tochterzellen bereits vor der Anaphase festgelegt sein sollte. Thomson et al. (2004) fanden dagegen Unähnlichkeiten in den Distanzen eines

fluoreszierenden Locus relativ zur Peripherie in den Tochterzellen bei Lebendzellversuchen und schlossen daraus, dass die radialen Anordnungen von der Mutter zu den Tochterkernen nicht genau über die Mitose hinweg übertragen, sondern de novo in G1 wiederhergestellt werden. Ebenfalls mit Lebendzellexperimenten versuchten Essers et al. (2005) zu zeigen, dass die Ordnung der Interphase in der Mitose verloren geht und auch in der frühen G1 noch verändert ist, aber im späteren Verlauf durch einen aktiven Mechanismus das Muster des Mutterkerns und damit vorherige Nachbarschaften in den Tochterzellen größtenteils wiederhergestellt werden. Zu gegensätzlichen Ansichten gelangten Cvackova et al. (2009), die Leberkarzinomzellen untersuchten, stabil transfiziert mit photokonvertierbarem Dendra2-H4. Sie bestätigten zwar ebenfalls die Chromatininstabilität in der Interphase, fanden aber in der Tochtergeneration rearrangierte Chromatinmuster, die zwar einige Merkmale und die relative Ordnung beibehalten, ansonsten aber nicht dem Muster in der Elterngeneration gleichen. Außerdem markierten sie die Bereiche um die Nukleoli und fanden in den Tochterkernen z.T. eine unterschiedliche Anzahl an Nukleoli und verstreutes photokonvertiertes Chromatin an unterschiedlichen Nukleoli. Dies ist ein Beleg dafür, dass zwar die radiale Ordnung erhalten bleibt, die Nachbarschaften aber nicht festgelegt sind. In einer Studie von Strickfaden et al. (2010) konnten die Ergebnisse von Walter et al. (2003) und Cvackova et al. (2009) bestätigt und die Arbeiten von Gerlich et al. (2003) und Essers et al. (2005) widerlegt werden. Mit Experimenten an RPE-1 Zellen mit stabil transfiziertem, photoaktivierbarem Chromatin und H2B-mRFP und auch an zwei anderen transgenen Zelllinien konnten alle Hypothesen Boveris bestätigt und die komplexen Bewegungen und Rearrangements der Mitose und die Auswirkungen dadurch auf die Chromatinmuster aufgedeckt werden. Es ist scheinbar die Position der Spindel dafür verantwortlich, wie groß der Grad an Ähnlichkeit von den Tochterzellen nach der Mitose mit dem Mutterkern ist. Liegt die Spindel parallel zu einer aktivierten Fläche, gibt es zusammenhängende Muster in Metaphase und in F1, liegt sie senkrecht, gibt es in beiden Stadien verstreute Muster (siehe Strickfaden et al. 2010, Fig. 6). GFP-Photoaktivierung von Chromatin senkrecht zur Spindel und gleichzeitiges Bleichen von mRFP parallel zur Spindel in G2 führte aber in den nachfolgenden Tochterzellen zu mehreren verstreuten photoaktivierten Chromatinflächen innerhalb zusammenhängender geblichener Bereiche. Dies bedeutet also, dass sich die Nachbarschaften unabhängig von der Position der Spindel auf alle Fälle ändern, aber die relativen radialen Positionen erhalten bleiben. Außerdem wurde gezeigt, dass diese komplexen Mischbewegungen zu Beginn der Prometaphase geschehen. Von da an ändern sich die relativen Positionen der aktivierten Chromatinbereiche jedoch nur noch wenig, was zu Ähnlichkeiten zwischen den

Tochterkernen führt. Dadurch sollte auch die relative radiale Anordnung von CTs in Metaphase- und Interphasekernen gleich sein.

2.3.7. Radiale Anordnungen von Zentromeren in Interphase und Mitose

Zentromere liegen meist am Rande von CTs und nur selten in ihrem Inneren. Sie haben eine Tendenz zur Clusterbildung und diese Cluster liegen meist in der Peripherie und nur zu einem kleinen Teil in der perinukleolären Region bei menschlichen und Mauslymphozyten in G_0 (Weierich et al., 2003). Eine Studie von Solovei et al. (2004) an einer Reihe von Zelltypen zeigt, dass die Positionierung der Zentromere während der verschiedenen Zellzyklusphasen dynamisch ist. So sind in der G_1 -Phase die meisten Zentromere gewebeübergreifend zentral und am Nukleolus lokalisiert, in späteren Phasen findet aber eine Repositionierung in Richtung Peripherie statt. In der G_2 -Phase aber gibt es wieder eine Bewegung zurück ins Kerninnere. In quieszenten oder ausdifferenzierten Zellen wie Fibroblasten ist die Positionierung der Zentromercluster unabhängig von der Zyklusphase hauptsächlich peripher (Solovei et al., 2004b). Zellen mit flachen, ellipsoiden Kernen zeigen außerdem eine asymmetrische Verteilung mit den meisten Zentromeren an der oberen oder unteren Seite der Kerne als Konsequenz der vorangegangenen Anaphase (siehe *fallen rosettes* Hypothese: Solovei et al. 2004b). Auch die Perizentromerregionen vieler Chromosomen, die hauptsächlich aus α -Satelliten-DNA bestehen und hauptsächlich um Nukleoli oder in der Kernperipherie lokalisiert sind, zeigen deutliche Unterschiede in ihrer Lokalisierung im Laufe der Differenzierung. So wurden die Volumina der heterochromatischen Cluster mit Sonden für Satelliten-DNA in Purkinje-Zellen von Mäusen während der postnatalen Entwicklung vermessen und das Verhältnis des Heterochromatins am Nukleolus (H_N) oder an der Peripherie (H_P) bestimmt. Dabei war das Verhältnis H_N/H_P anfangs bei etwa 50% zu 50%, nach 6 Tagen 85% zu 15% und in den darauffolgenden Stadien bei 70% zu 30% (Solovei et al., 2004a).

Die Frage der Positionierung, ob am Nukleolus oder an der Peripherie, könnte u.A. von diesen perizentromerischen Regionen abhängig sein. So gibt es in Lymphozyten eine Korrelation zwischen Positionierung und prozentualem Anteil an α -Satelliten. Die Zentromere von Chromosomen mit einem hohen Anteil davon liegen vorwiegend in der Peripherie (Carvalho et al., 2001). Dies passt zu der Verteilung ganzer CTs, die ebenfalls auf dem Gehalt an Heterochromatin und damit relativen Gengehalt basiert (Boyle et al., 2001). Die Zentromere der akrozentrischen Chromosomen liegen jedoch unabhängig vom Satellitengehalt meist

zentral am Nukleolus (Carvalho et al., 2001). Dies legt nahe, dass die Positionierung nicht vom Zentromer selbst, sondern von der Zusammensetzung des ganzen Chromosoms abhängig ist. Über die Lage von Zentromeren in der Mitose ist nicht viel bekannt. Als Folge der Mikrotubulibewegungen in der Pro- und Prometaphase werden alle Zentromere zentral in der Metaphasenplatte angeordnet (Fletcher, 1994). Aber auch innerhalb der zentralen Anordnung der Zentromere während der Metaphase fanden Mosgoller et al. (1991) eine größenabhängige radiale Verteilung der Zentromere in Fibroblasten, die auch bis zur Telophase erhalten bleibt. Dabei waren Zentromere kleiner und akrozentrischer Chromosomen in Clustern in der Mitte zu finden, während sich die Zentromere großer Chromosomen außen um die Cluster anordnen (eine Darstellung findet sich in Abb. 30). Die zentrale Position der Zentromere akrozentrischer Chromosomen in der Interphase und der Metaphase konnte von Klein et al. (1998) bestätigt werden. So nehmen die durch Immunfärbung markierten UBF- Proteine, die während der Interphase im Nukleolus angereichert sind und während der Mitose an NOR-Regionen der akrozentrischen Chromosomen binden, über den ganzen Zellzyklus hinweg sehr zentrale Positionen ein. Bereits während der späten G₂/Prophase zeigen viele Zelltypen bereits eine besondere Konfiguration mit den Zentromeren in Richtung des Kerninneren orientiert (Ferguson and Ward, 1992). Während der komplexen Chromatinbewegungen in der Pro- und Prometaphase liegen Kinetochorregionen unabhängig von der Lage der Spindeln und der sich daraus ergebenden 3D- Konfiguration der Prometaphase immer exponiert an der Oberfläche und haben Kontakt zu den Mikrotubuli (Chaly and Brown, 1988; Strickfaden et al., 2010). In der Metaphasenplatte sind alle Zentromere schließlich zentral angeordnet (Fletcher, 1994), ebenso in Anaphase, Telophase und früher G₁ (Solovei et al., 2004b). So lässt sich ein stimmiges Modell entwerfen, das die Bewegungen der Zentromere im Verlauf des Zellzyklus beschreibt. Im *mitotic preset*- Modell von Sun et al. (2000) sehen die Autoren die Konfiguration der Zentromere in der Metaphase als die Voraussetzung für die Anordnung von Zentromeren und der zugehörigen CTs in der darauffolgenden Interphase an. Zusammengenommen entsteht ein dynamisches Bild der Positionierung von Zentromeren oder naher Regionen mit differenzierungsspezifischen und zellzyklusspezifischen Unterschieden.

2.3.8. Verteilungen von Minichromosomen und eines durch Amplifikation vergrößerten Chromosoms in Interphase und Metaphase

Für diese Arbeit wurde die radiale Positionierung von SACs (*Small Accessory Chromosomes*), HCVs (*Human Chromosomal Vektor*) und eines durch eine Amplifikation vergrößerten Chromosoms untersucht. Diese Untersuchungen wurden von Prof. Thomas Cremer, Dr. Irina Solovei und mir geplant und von Isabel Liebhart im Rahmen ihrer Diplomarbeit unter meiner unmittelbaren Anleitung durchgeführt. Eine ausführlichere Einführung in dieses Thema ist bei Liebhart (2009) zu finden.

SACs oder sSMC (*Small Supernumerary Marker Chromosomes*), wie sie inzwischen zusammenfassend genannt werden sind natürlich vorkommende, kleine und manchmal zirkuläre Chromosomen, die hauptsächlich aus alphoiden Sequenzen und anderen heterochromatischen, oft perizentromerischen Bereichen bestehen. Durch ihren Mosaikcharakter und hohen Gehalt an repetitiven Sequenzen ist ihre ursprüngliche Herkunft mit herkömmlichen FISH- Methoden nur schwer zu erforschen. Da sie ein aktives Zentromer besitzen sind sie mitotisch stabil und werden an die Tochterzellen weitergegeben (Vermeesch et al., 1999). Ihre Entstehung ist nach wie vor ungeklärt. Etwa 0,05% der Neugeborenen besitzen ein sSMC und sie werden meist in pränataldiagnostischen Untersuchungen entdeckt. Klinische Symptome reichen von einem unauffälligen Phänotyp bis hin zu Entwicklungsverzögerungen, schwerer geistiger Retardierung und Infertilität (Liehr et al., 2006). Deswegen sind sie Gegenstand intensiver Forschung, um ihre genetische Zusammensetzung und eventuelle Folgen abschätzen zu können.

Die in dieser Arbeit untersuchten SACs sind ringförmige, kleine Chromosomen aus alphoidem Material von Chromosom 12 (Vermeesch et al., 1999). Ein anderes SAC, bestehend aus Sequenzen von Chromosom 1 und alphoiden Bereichen von Chromosom 20, wurde durch geeignete Klonierung in einen linearen und zirkulären HCV umgewandelt und stabil in die Keimbahn von Mäusen und Hamstern integriert, wo es als unabhängiges, stabil segregierendes Chromosom weitergegeben wird (Voet et al., 2001; Voet et al., 2003). Solche Vektoren sollten sich potenziell als sichere Genvektoren nutzen lassen, um Transgene einzuschleusen, da sie nicht ins Genom integrieren, wie z.B. virale Vektoren, die durch den unbekanntem Integrationsort Schaden anrichten können (Voet et al., 2003). Wie sich menschliche Vektoren in Zellen anderer Spezies radial anordnen, ist noch wenig bekannt. Hierzu gibt es zwei in Maus- Mensch- Hybrid- Zellen durchgeführte Studien. Dabei wird eine Positionierung anhand der Gendichte (Sengupta et al., 2008) oder eine Positionierung ähnlich

der von syntenen Chromosomen in der zur Hybridisierung verwendeten Zelle (Meaburn et al., 2008) diskutiert.

Eine andere Möglichkeit, Zusammenhänge zwischen der DNA- Zusammensetzung des Chromatins und eine radialen Anordnung im Zellkern zu untersuchen, stellen HSRs (*Homogeneously Staining Regions*) dar. HSRs sind Kennzeichen vieler Krebszellen, die aus oft massiver Amplifikation bestimmter Loci bestehen, oft sind es Entwicklungsgene. Der Name resultiert aus einer homogenen Färbung z.B. nach Giemsa oder FISH im Gegensatz zu dem sonst üblichen Bänderungsmuster. Ihre Entstehung ist noch nicht vollständig geklärt, es spricht aber vieles für eine Abfolge von Doppelstrangbrüchen, illegitimen Fusionen der Schwesterchromatiden und wiederum Brüchen, was zu einer Replikation und damit Amplifikation der bruchnahen Gene führt (*Review*: Shimizu 2009). Die häufigste Form in Neuroblastomen ist eine Amplifikation von MYCN, in normalen Zellen auf Chromosom 2p, welches entweder als extrachromosomale *Double Minute* Struktur vorliegt oder als HSR in andere Chromosomen integriert (O'Neill et al., 2001). Solche HSRs führen zu erhöhter Expression des Gens und sind meist in späten Krebsstadien zu finden. Dementsprechend ist die Prognose beim Auftreten von HSRs schlecht (Fix et al., 2008).

Die in dieser Arbeit untersuchte Zelllinie Kelly ist eine Neuroblastomlinie mit einer 100- 120 fachen MYCN Sequenz auf 17q (Schwab et al., 1984). Da auch andere Neuroblastomlinien bevorzugt mit Material von 17q interagieren, legt dies nahe, dass diese Region der bevorzugte Integrationsort für MYCN ist (O'Neill et al., 2001). In der Interphase liegt diese Region stark dekondensiert vor und verzweigt sich über große Teile des Zellkerns (Solovei et al., 2000). Da HSA17 in Kelly Zellen durch die Amplifikate in etwa die Größe eines normalen Chromosom 1 besitzt, stellt sich die Frage, ob es dadurch zu Veränderungen in der radialen Positionierung kommt.

2.3.9. Evolutionäre Aspekte einer radialen Chromatinverteilung

Wie bereits angesprochen, stellen die oben beschriebenen nicht- zufälligen radialen Verteilungen des Chromatins ein evolutionär konserviertes und weit verbreitetes Phänomen dar. Es zeigen sich Ähnlichkeiten in den CT- Anordnungen zwischen menschlichen Zellen und Primaten (Tanabe et al., 2005; Neusser et al., 2007), Mäusen (Weierich et al., 2003; Mayer et al., 2005) und Rindern (Koehler et al., 2009). In Letztgenannter Arbeit wurden auch gendichteabhängige Verteilungen in Rinderfibroblasten anhand der Chromosomen 19 (genreich) und 20 (genarm) entdeckt. Während die radialen Positionierungen in frühen Phasen von Präimplantationsembryos gleich waren und eher größenabhängiger Verteilung folgen,

nahmen in späteren Differenzierungsstadien, einhergehend mit der sogenannten *major genome activation*, die Chromosomen unterschiedliche Positionen entsprechend ihrer Gendichte ein (Koehler et al., 2009).

Vor allem finden sich über phylogenetische Grenzen hinweg immer wieder Ähnlichkeiten was Replikationsmuster betrifft. Hierbei wird genreiches Euchromatin in der frühen S-Phase repliziert, fakultatives Heterochromatin in der mittleren S-Phase und Heterochromatin zum Schluss der S-Phase, wobei sich jeweils typische, gut unterscheidbare Muster nach BrdU-Inkorporation ergeben (O'Keefe et al., 1992). Eine der ersten speziesübergreifenden Studien dazu lieferten Sadoni et al. (1999), die in menschlichen, murinen und Hamsterzellen zeigen konnten, dass sich die typische Replikationsmuster stark ähneln mit früh replizierendem Chromatin bevorzugt im Kerninneren und spät replizierendem Chromatin in der Kernperipherie. Auch eine territoriale radiale Anordnung der Chromosomen wurde speziesübergreifend gefunden. Ein sehr ähnliches Bild, was die Replikationsmuster betrifft, zeigten die Untersuchungen von Habermann et al. (2001) an Hühnerzellen. Dies spricht für eine starke evolutionäre Konservierung radialer Verteilungsmuster innerhalb der Vertebraten über den Zeitraum von 300 Millionen Jahren. Zu dieser Zeit vermutet man den letzten gemeinsamen Vorfahren von Säugern und Vögeln. Aber auch der Süßwasserpolypt Hydra zeigt ein Säugern vergleichbares Replikationsmuster (Alexandrova et al., 2003). Ebenso eine Ciliatenart, zeitlich etwa 500- 600 Millionen Jahre getrennt von Säugern, zeigt ähnliche, räumlich und zeitlich getrennte radiale Replikationsmuster mit einer nichtzufälligen Anordnung (Postberg et al., 2005).

Die Kerne von *S. cerevisiae* weisen zwar auf den ersten Blick eine grundsätzlich andere Struktur auf, doch auch hier ist eine räumliche, radiale Trennung von Eu- und Heterochromatin zu beobachten (Saez-Vasquez and Gadal, 2010). Was die Replikationsmuster betrifft, zeigen auch einige Pflanzen dieselbe Organisationsstruktur wie tierische Zellen (Mayr et al., 2003) und es finden sich auch Heterochromatincluster, die bevorzugt in der Peripherie zu finden sind (Pawlowski, 2010).

Zusammengenommen besitzen also viele eukaryotische Spezies Ähnlichkeiten in der radialen Chromatinanordnung.

2.3.10. CT-Positionierungen in postmitotischen und seneszenten Zellen

Auch wenn es bevorzugte Aufenthaltsorte von CTs oder Genen im Kern gibt, sind die Positionen nicht deterministisch festgelegt, sondern probabilistisch. Dabei gibt es

zelltypspezifische, differenzierungsspezifische und vom Zellzyklus abhängige Unterschiede. Ein interessantes Beispiel liefern Stäbchenzellen in der Retina von nachtaktiven Säugern. Während zu Beginn der Entwicklung in Übereinstimmung mit dem üblichen Schema eine Anordnung mit aktiven Bereichen im Kerninneren besteht, ist es in den ausdifferenzierten Zellen umgekehrt zum normalen Schema mit euchromatischen Bereichen in der Peripherie und heterochromatischen Bereichen im Zentrum als spezielle evolutionäre Anpassung (Solovei et al., 2009).

Ein weiterer Bereich, in dem große Änderungen der Chromatinanordnungen auftreten, ist die Seneszenz von Zellen. Dieser Zustand wird nach einer gewissen Anzahl an Zellteilungen erreicht (Hayflick, 1965), bis, vermutlich um akkumulierende Schäden am Genom abzuwenden, Apoptose eingeleitet wird. Die genauen Ursachen für zelluläre Seneszenz und eine damit bedingte begrenzte Teilungsfähigkeit sind nach wie vor unklar, aber es gibt mindestens zwei ernstzunehmende Theorien. Die erste Theorie besagt, dass Verkürzungen der Telomere nach vielen Zellteilungen zur genomischen Instabilität führen und einen Proliferationsstop auslösen (Harley et al., 1990). Die zweite Theorie geht von der Anhäufung von DNA-Schäden durch Radikale aus, die in fehlerhaften Stoffwechselprozessen älterer Zellen entstehen (Harman, 1956).

Einhergehend mit zellulärer Seneszenz gibt es eine Menge an morphologischen Veränderungen des Kerns. Auffällig bei einigen Zelltypen sind beispielsweise ein größerer Kern (Mitsui and Schneider, 1976), meist nur noch ein großer Nukleolus (Bemiller and Lee, 1978) und die Bildung von sog. *Senescence Associated Heterochromatin Foci* (SAHFs) bei fibroblastenartigen Zellen (Narita et al., 2003). Des Weiteren besitzen seneszenten Zellen einen höheren Heterochromatinanteil als proliferierende Zellen (Lezhava, 2001) und die DNA weist regional Hypermethylierungen in vielen Promotorenbereichen auf (Agrelo, 2007). Dies führt zur Stilllegung vieler Gene und Replikationsursprünge (ORIs) und dadurch zu einer abnehmenden Replikationsfähigkeit der Zelle (Agrelo, 2007; Bridger et al., 2007). Deshalb spricht man in diesem Zusammenhang auch von replikativer Seneszenz. In welcher Reihenfolge die beschriebenen Veränderungen eintreten und was genau zu Seneszenz führt, ist Gegenstand von Diskussionen und Forschungen.

Über die chromosomalen Veränderungen bezüglich der Positionierung in seneszenten Zellen gibt es nicht sehr viele Untersuchungen. Mehta und Kollegen beobachteten Relokalisierungen einiger Chromosomen, wenn Fibroblasten in einen nicht-proliferativen seneszenten oder vorübergehend quieszenten (G_0) Status eintreten. Dabei wird aus einer gendichteabhängigen radialen Verteilung eine eher größenmäßig basierte (Mehta et al., 2007). Diese Verteilung

ähnelt der in Zellen von Patienten mit progeroiden Syndromen, bei denen ein vorzeitiges Altern auftritt (Meaburn et al., 2007a). Für die Repositionierungen sind möglicherweise nukleäre Motoren wie Aktin und Myosin verantwortlich, aber auch Laminproteine wie Lamin A und Emerin (Mehta et al., 2008). Inwieweit die auftretenden Veränderungen im Kern Transkription und Regulation beeinflussen, ist noch wenig untersucht. In dieser Arbeit wurde die Position von Genen untersucht, die im Verlauf der einsetzenden Seneszenz hochreguliert wurden.

2.4. Nachbarschaften von CTs

Aufgrund der nicht- zufälligen radialen Anordnung der CTs im Zellkern entsteht die Frage, ob es darüber hinaus nicht- zufällige Nachbarschaftsbeziehungen zwischen CTs oder bestimmten Sequenzen gibt oder nicht.

Ende der 80er Jahre gab es eine Studie, die für einige homologe Chromsomen in neuronalen Zellen Assoziationen finden konnten, z.B. Arnoldus et al. (1989). Diese Beobachtung führte zur Hypothese, dass es gewebe- oder differenzierungsspezifisch nichtzufällige Anordnungen von CTs geben könnte. Solche Assoziationen könnten ein Grund für die Entstehung von häufigen Translokationen zwischen bestimmten Chromosomen und letztlich dadurch resultierend genomischen Instabilitäten und Krebs sein.

Studien, die feste Beziehungen zwischen ganzen CTs zeigen konnten, blieben aber die Ausnahme. Viele andere Autoren fanden im Gegenteil sehr variable Nachbarschaften sowohl zwischen homologen als auch heterologen CTs (Heride et al., 2010). Das Vermessen der Distanzen verschiedener homologer und heterologer chromosomaler Abschnitte in diploiden Fruchtwasserzellen (AFC) zeigte keine Auffälligkeiten für bevorzugte Nachbarschaften und die Distanzen waren sehr variabel (Cremer et al., 2001). Insgesamt kleinere Distanzen, die bei Messungen zwischen kleineren im Vergleich zu großen Chromosomen gefunden wurden, können als Konsequenz eines nicht- zufälligen radialen Chromosomenarrangements erklärt werden. Ähnliche Resultate zeigten auch Studien an verschiedenen Zelltypen vom Huhn. Die Nachbarschaften der Macrochromosomen waren von Zelle zu Zelle unterschiedlich, auch wenn in einigen Fällen Assoziationen der homologen CTs gefunden wurden (Habermann et al., 2001). Großangelegte Vielfarben- FISH- Experimente zeigten im paarweisen Vergleich aller heterologen Chromosomen untereinander zwar einige häufigere Assoziationen, genomweit gesehen war die relative Positionierung untereinander aber stark vom Zufall geprägt (Cornforth et al., 2002). Auch für eine Reihe von Mauszellen konnte gezeigt werden, dass CTs in der Wahl der Nachbarschaften sehr variabel sind. Eine Ausnahme stellt in

Mausmakrophagen das MMU1 dar, das eine homologe Assoziationshäufigkeit von fast 50% zeigte (Mayer et al., 2005). Im Vergleich von Winkeln und Distanzen zwischen homo- und heterologen CTs in quieszenten Fibroblasten und Prometaphasenrosetten konnten Bolzer et al. (2005) weder eine auffällige Häufung von Paarungen noch von bestimmten Nachbarschaften finden. Auch eine Trennung des parentalen Genoms, wie von Nagele et al (1995) behauptet, konnte nicht beobachtet werden. Molekularbiologische und statistische genomweite Untersuchungen zeigten für lymphoblastoide Zellen ebenfalls keine bevorzugten Nachbarschaften. Die Distanz zwischen kleinen, genreichen Chromosomen war aber signifikant kleiner als zwischen anderen Pärchen, was ihrem bevorzugten Aufenthaltsort im Kerninneren geschuldet ist (Lieberman-Aiden et al., 2009).

Ein berühmtes Beispiel für chromosomale Nachbarschaften ist die X- Inaktivierung bei der Maus. In weiblichen embryonalen Stammzellen wurde vor der X-Inaktivierung eine vorübergehende Kolokalisation des *X- inactivation centre* (Xic) und sogar des ganzen CTs beobachtet. In späteren Stadien oder MEF- Zellen, in denen bereits eines der X-Chromosomen inaktiviert ist, findet sich keine häufigere transiente Assoziation der beiden CTs mehr. Die Xic- Loci benötigen möglicherweise räumliche Nähe, um die Inaktivierung eines Chromosoms über nichtkodierende RNAs der Gene Xist, Tsix und Xite sicherzustellen (Bacher et al., 2006; Xu et al., 2006). Eine ähnliche, zeitlich begrenzte Assoziation in der späten S- Phase wurde in menschlichen Zellen für die beiden homologen Sequenzen auf HSA 15q11-13 beschrieben (LaSalle and LaLande, 1996). Diese Region enthält einige Gene, die der parentalen genomischen Prägung unterliegen. Allelspezifische Deletionen in diesen Bereichen sind Ursache für das Angelman- und Prader- Willi- Syndrom. Die Autoren der Studie vermuteten in der Assoziation einen Mechanismus, der den Erhalt der allelspezifischen Methylierungen und des transkriptionellen Status über den Zellzyklus hinweg ermöglicht (LaSalle and Lalande, 1996). Diese räumliche Nähe zwischen den Sequenzen konnte in einer späteren Studie nicht als Folge der Interaktionen zwischen den Sequenzen identifiziert werden, sondern beruht allenfalls auf räumlicher Nähe durch die häufige Lage am Nukleolus als NOR- tragendes Chromosom bzw. einer zentralen Lage im Kern im Allgemeinen (Teller et al., 2007).

Bei den bereits beschriebenen Lebendzellversuchen postulieren zwei Gruppen, dass die globale Anordnung und damit die Nachbarschaften größtenteils auch über die Mitose hinweg erhalten bleiben (Gerlich et al., 2003) oder in der G1 teilweise wiederhergestellt werden (Essers et al., 2005), während andere Gruppen nach der Mitose eine Neuordnung und Bildung von neuen Nachbarschaften im relativen radialen Kontext finden unabhängig von der

Spindelposition (Thomson et al., 2004; Cvackova et al., 2009; Strickfaden et al., 2010). Die noch unveröffentlichten Untersuchungen von Köhler et al. aus unserer Arbeitsgruppe (in prep.) über CT- Verteilungen über mehrere Zellzyklen zeigen nach der ersten mitotischen Teilung noch große Ähnlichkeiten zwischen den beiden Tochterkernen, nach der zweiten, spätestens aber der dritten Teilung ist der Grad an Ähnlichkeiten aber bereits genauso klein wie zwischen unverwandten Zellen. Dies, und die komplexen Bewegungen der Spindel zu Beginn der Prometaphase, sprechen nur für einen geringen Grad an Erhaltung von Nachbarschaften in den aufeinanderfolgenden Generationen zyklischer Zellen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass bestimmte CTs, homolog oder heterolog, in bestimmten Zelltypen oder bestimmten Differenzierungs- oder Proliferationsstadien häufigere (transiente) Nachbarschaften oder im Gegenteil räumliche Trennungen voneinander aufweisen können. Dauerhafte Nachbarschaften in proliferierenden Zellen sind aber aufgrund der komplexen Vorgänge und Bewegungen zu Beginn der Mitose unwahrscheinlich und die CT- Verteilung von bestimmten radialen Parametern wie CT- Größe oder Gendichte abhängig.

2.5. Genpositionierung und Differenzierung

Ebenso wie für CTs gibt es auch bei Genen Hinweise auf eine nicht- zufällige radiale Positionierung im Kern bzw. eine Positionierung in bestimmten Kompartimenten, die für Transkription oder Repression bedeutsam sein kann. Allgemein gilt, dass sich genreiches, aktives Chromatin im Kerninneren befindet, während genarmes, inaktives Chromatin an der Kernperipherie zu finden ist (Kosak et al., 2007; Lanctot et al., 2007; Misteli, 2007). Aber auch innerhalb eines CTs zeigen genreiche Chromatinabschnitte eine Polarität in Richtung Kernzentrum, während genarme Segmente in Richtung Peripherie orientiert sind (Kupper et al., 2007). Die transkriptionelle Aktivität eines Gens korreliert jedoch nicht grundsätzlich mit einer bestimmten Position in Bezug auf sein CT, z.B. der CT- Oberfläche, oder den Kern (Kupper et al., 2007). Letztlich ausschlaggebend für die radiale Position könnte die umgebende Gendichte sein (Mahy et al., 2002b) oder eine Kombinationen aus Faktoren wie Kondensationsgrad der umgebenden Chromatinsequenz, die Lage auf dem Chromosom und transkriptionelle Aktivität der gesamten Region, nicht nur einzelner Gene (Brown et al., 2006).

Für einzelne Gene, insbesondere solche, die an der Differenzierung eines bestimmten Zelltyps beteiligt sind, wurden Schleifenbildungen außerhalb ihrer Territorien beschrieben, z.B. bei verschiedenen *Major Histocompatibility Complex* (MHC) II Loci nach Interferon-

Stimulation (Volpi et al., 2000), beim epidermalen Differenzierungskomplex auf Chromosom 1 (Williams et al., 2002), einer genreichen Region auf HSA11 und der syntenen Region auf MMU 7 (Mahy et al., 2002a) oder auch bereits vor der Aktivierung der Transkription beim β -Globin Gen (Ragoczy et al., 2003). Auch für den Hoxb Cluster auf MMU11 bei ES- Zellen konnten ein zeitlich koordiniertes Looping der einzelnen Gene in Korrelation mit transkriptioneller Aktivierung im Laufe der Differenzierung beobachtet werden (Chambeyron and Bickmore, 2004). Solche Loops aktiver Gene könnten sich in sogenannten „*expression hubs*“ oder „*transcription factories*“ treffen, um gemeinsam Faktoren für Regulation, Transkription und Prozessierung zu teilen (Kosak and Groudine, 2004; Fraser and Bickmore, 2007). Solche *hubs* bestehen vor allem aus Clustern von RNA Polymerase II (RNA PolII) Molekülen. Dies entspricht in etwa den Vorstellungen vom *Long Range Interaction*- Modell (siehe Abb. 2). Eine neue Arbeit von Bickmore und Kollegen zeigt, dass Schleifenbildung beim aktiven Hox- Locus die transkriptionelle Aktivität anderer Loci, die in der Umgebung liegen, nicht beeinflussen muss. Ausserdem konnten die Autoren zeigen, dass aktive Gene meist schon mit *transcription factories* assoziiert sind bevor die Transkription induziert wird und innerhalb und außerhalb von CTs zu finden sind, während inaktive meist innerhalb der CTs liegen. Daraus folgern sie, dass Gene Schleifen bilden, weil sie es können, und nicht, weil sie es müssen, um aktiv zu sein (Morey et al., 2009).

Viele Lageänderungen von CTs, Chromatindomänen oder Genen im Laufe von Differenzierungen lassen sich jedoch nicht auf Schleifenbildung zurückführen, sondern sie verändern ihre Lage graduell über bestimmte Zeiträume. Das neurospezifische Mash1 Gen beispielsweise besitzt in Maus ES- Zellen eine periphere Lage, zeigt keine Expression und wird in der späten S-Phase repliziert. Nach Induktion der Differenzierung in neuronale Zellen ist es nach 8 Tagen im Kerninneren zu finden, transkriptionell stark hochreguliert ($>100x$ im Vergleich zum normalen Wert) und wird früh repliziert (Williams et al., 2006). Auch in der T- Zell Differenzierung zeigen die $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Loci eine signifikant zentralere Lage in ihren jeweiligen ausdifferenzierten Zelltypen $CD4^+$ - Helferzellen und $CD8^+$ - zytotoxische Zellen als in den Lymphozyten- Vorläuferzellen, in denen beide Loci nicht exprimiert werden und in der als repressiv geltenden Peripherie der Zellkerne zu finden sind (Kim et al., 2004). Ein weiteres Beispiel zeigen Takizawa et al. (2008), die den astrozytenspezifischen GFAP-Marker untersuchten. In den meisten Zellen ist nur eine Kopie aktiv, die signifikant zentraler im Kerninneren liegt und häufiger mit Splicing Speckles assoziiert ist als das inaktive Allel. Eine Möglichkeit herauszufinden, wie plastisch die Position von Genen ist und inwieweit davon die transkriptionelle Aktivität betroffen ist, bieten künstlich herbeigeführte

Repositionierungen. Eine Lebendzellstudie in Hamsterzellen konnte beispielsweise zeigen, dass ein induzierbarer, stabil integrierter Locus, der normalerweise in der Peripherie zu finden ist, 1-2 Stunden nach Aktivierung in Richtung Kernzentrum wandert, was mit einer gesteigerten Transkriptionsrate einhergeht (Chuang et al., 2006). Diese Repositionierung geschieht über Aktin und Myosin und ist energieabhängig (Chuang and Belmont, 2007). Solche gerichteten Bewegungen einhergehend mit Expressionsänderung sind jedoch wohl eine Ausnahme.

Im umgekehrten Fall kann aber eine Repositionierung von Loci auch zur Stilllegung führen. So wird eine Lage von Genen in der Nähe oder assoziiert mit zentromerischen oder anderen Heterochromatinclustern mit Inaktivität verknüpft (Review: Cope et al. 2010). Reddy et al. (2008) konnten zeigen, dass ein Immunglobulinlocus stillgelegt wird, nachdem er über ein Fusionsprotein künstlich an die Lamina verlegt wurde. In diesem Fall ist jedoch eine mitotische Teilung erforderlich, nach der das Konstrukt an der neugebildeten Kernhülle haften bleibt. Ein ähnliches System erfordert ebenfalls eine mitotische Teilung, um den Locus an die Kernhülle zu verlagern, nur änderte dies nichts an der transkriptionellen Aktivität (Kumaran and Spector, 2008). Obwohl die Lamina und assoziierte Domänen (LADs) größtenteils als repressiv gelten (Guelen et al., 2008; Kind and van Steensel, 2010), könnte es doch kleine Bereiche geben, die Transkription erlauben (Kumaran et al., 2008), beispielsweise an den Kernporenkomplexen (NPCs; Kalverda et al., 2010). Z. B. beginnt die Expression des β -Globin Locus während der Erythroiden-Differenzierung bereits an der Peripherie und erst im weiteren Verlauf der Reifung wandert der Locus ins Kerninnere (Ragoczy et al., 2006). Dies alles spricht dafür, dass die Lage eines Locus im Kern oder innerhalb eines CTs höchst variabel ist und sich nicht automatisch aus der transkriptionellen Aktivität ergibt. Der genaue Zusammenhang zwischen der Position eines Gens und den Folgen daraus für Regulation und Transkription ist also hochkomplex, individuell unterschiedlich und kann vermutlich nicht auf einen einheitlichen Ablauf reduziert werden.

2.6. Chromatinmobilität

Es gibt zahlreiche Beispiele für chromosomale Schleifenbildung (siehe oben), die dazu dienen könnten, Gene zur Aktivierung in aktive Bereiche zu bringen bzw. in heterochromatische Nähe, um sie stillzulegen. Viele dieser Positionsänderungen erfordern aber mitotische Teilungen über längere Zeiträume im Zuge von Differenzierung (Reddy et al., 2008) oder geschehen langsam und ungerichtet über Diffusion sowohl in Säugerzellen als auch in *Drosophila* und Hefe (Marshall et al., 1997; Bornfleth et al., 1999; Chubb et al., 2002). Die

beobachtete Diffusion von Loci bis zu $0,5\mu\text{m}$ bietet in *S. cerevisiae*, der einen Durchmesser von etwa $1,5\mu\text{m}$ besitzt, eine ausreichende Möglichkeit, um Interaktionspartner zu finden. In Säugerzellen ist durch eine Diffusion mit demselben Radius jedoch nur etwa $1/1000$ des Kernvolumens für Chromatindomänen oder Loci erreichbar (Chubb and Bickmore, 2003). Auch Lebendzellstudien zeigten in Langzeitbeobachtungen von fluoreszenzmarkiertem Chromatin während der Interphase wenige Veränderungen und Chromatinbewegungen (Gerlich et al., 2003; Cvackova et al., 2009; Strickfaden et al., 2010), bis auf ein kurzes Zeitfenster nach der Mitose in der frühen G_1 - Phase (Walter et al., 2003; Thomson et al., 2004). Im Gegensatz dazu wurden auch weiträumige Bewegungen im Zellkern beschrieben, durch die rasche Interaktionen zwischen weit entfernten Partnern ermöglicht werden. Die bereits erwähnten Lebendzellexperimente von Chuang et al. (2006) zeigen eine Wanderung von eGFP markiertem Chromatin nach transkriptioneller Aktivierung von der Peripherie mit einer Geschwindigkeit von bis zu einem Mikrometer/min in Richtung Kernzentrum. Für solche aktiven, gerichteten Bewegungen werden Aktin- und Myosin- abhängige Transportmechanismen diskutiert, die Energie erfordern (Levi et al., 2005; Chuang and Belmont, 2007; Mehta et al., 2008). Nach dem Blockieren von ATPasen oder der Verwendung von Aktin und Myosin- Blockern fanden keine gerichteten Bewegungen der untersuchten Loci mehr statt. Ein weiteres Beispiel für gerichtete Chromatinbewegungen berichteten Hu et al. (2008) für zwei östrogenabhängige Gene auf den Chromosomen HSA2 und HSA21, die nach Induktion auch über weite Strecken kolokalisieren und gemeinsam reguliert werden. In Gegenwart von ATP-, Aktin- und Myosin- Blockern blieben die beobachteten Interaktionen zwischen den beiden Loci aus. Auch der Myc- Locus zeigt eine schnelle Relokalisierung in murinen B- Zellen nach Stimulierung mit Interleukinen. Bereits 5 Minuten nach Zugabe zeigt der Locus eine signifikant höhere Kolokalisation mit RNA- Pol II als Marker für *transcription factories*, bemerkenswerterweise oft mit der *factory*, in der auch IgH exprimiert wird, dem bevorzugten Translokationspartner bei Burkitt- Lymphom (Osborne et al., 2007). Eine Studie von Mehta et al. (2010) berichtet davon, dass auch ganze CTs von schnellen Bewegungen betroffen sein können. In Zellkernen von menschlichen proliferierenden Fibroblasten beispielsweise zeigte HSA 10 schnelle Relokalisierungen innerhalb von 15 Minuten und nahm eine mittlere Position ein, in G_0 - Zellen eine periphere und in seneszenten Zellen eine zentrale Position. Veränderungen der chromosomale Anordnung von proliferierenden zu G_0 - Zellen benötigen nur etwa 15 Minuten nach Zugabe von serumfreiem Medium. Ein Teil der Chromosomenterritorien zeigte jedoch nur kleine oder gar keine Veränderungen in der Anordnung. Auch hier verhinderte die Zugabe von Aktin und

Myosin- Blockern bzw. Unterbrechung der Energiezufuhr eine Relokalisierung (Mehta et al., 2008; Mehta et al., 2010). Die Befunde für solche weiträumigen, gerichteten Bewegungen über FISH- Experimente an fixierten Zellen sind nur schwer in Einklang zu bringen mit den durch viele Lebendzellstudien nahegelegten geringen Chromatinbewegungen in der Interphase. Ein klarer Beweis für schnelle, gerichtete Chromatinbewegungen im Kern steht bislang aus.

2.7. Translokation und DNA- Reparatur

Viele Untersuchungen gibt es zu der Frage, ob räumliche Nähe von Sequenzen oder Chromosomen Unterschiede in den Translokationshäufigkeiten verursachen können. Zu den häufigsten Translokationen gehören die sog. Robertson- Translokationen zwischen den akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22, bei der die langen Arme von zwei Homo- oder Heterologen fusionieren. Dies bringt zwar den Verlust der kurzen Arme ein, aber durch die Sequenzhäufig- und Ähnlichkeiten der auf den p- Armen kodierten rRNA Gene hat dies phänotypisch meist keine Auswirkungen. Diese Art von Translokationen werden vermutlich durch räumliche Nähe begünstigt, da die NOR- tragenden Chromosomen meist um die Nukleoli angeordnet sind (Sullivan et al., 2001). Ein weiteres Beispiel sind Translokationen der Chromosomen 17, 19 und 22, die bevorzugt im Kerninneren liegen, bzw. zwischen großen Chromosomen die bevorzugt in der Peripherie angeordnet sind. Die Chromosomengröße korreliert also mit dem bevorzugten Aufenthaltsort im Kern und daraus resultiert eine Translokationshäufigkeit (Bickmore and Teague (2002) und darin zitierte Referenzen). Weitere Beispiele dafür, dass die Chromatinorganisation höherer Ordnung und damit räumliche Nähe mit klinischen Translokationshäufigkeiten korreliert, liefern die Onkogene Myc und drei BCL- Sequenzen. Entsprechende Translokationen findet man beim Burkitt- bzw. B-Zelllymphom mit verschiedenen Immunglobulinloci (Roix et al., 2003). Gerät ein Onkogen durch Translokation unter den Einfluss von stark aktivierenden Promotoren, wie sie die Immunglobuline besitzen, kann die Proliferation außer Kontrolle geraten und die Entstehung von Lymphomen begünstigen.

Möglich sind auch intrachromosomale Rearrangements durch lokale Nähe. Ein Beispiel dafür sind das RET und H4 Gen, zwei Loci auf Chromosom 10, die 30 Mb linear voneinander entfernt liegen. Nach Strahlenschäden in Thyroizellen interagieren sie häufig durch ihre räumliche Nähe, was zu einer Inversion des HSA 10 und in der Folge zu Schilddrüsenkrebs führen kann (Nikiforova et al., 2000). Weitere Beispiele finden sich in den Reviews von Parada et al. (2004) und Meaburn et al. (2007). Viele der darin aufgezeigten Beispiele

erfordern womöglich aktive Chromatinbewegungen nach DNA-Schäden, um mögliche Translokationspartner zueinander zu bringen. Die Mechanismen, die solche Bewegungen ermöglichen, sind nicht bekannt. Zur Erklärung von Translokationen nach DNA Doppelstrangbrüchen werden zwei Reparaturmodelle herangezogen (Meaburn et al., 2007b; Misteli and Soutoglou, 2009). Im ersten Fall, dem „*breakage first*“ Szenario geschehen Doppelstrangbrüche beispielsweise durch Bestrahlung auf verschiedenen Chromosomen und werden in Clustern repariert, in denen die nötigen Reparaturfaktoren vorhanden sind. Dies wurde sowohl an Hefezellen (Lisby et al., 2003) als auch menschlichen Zellen gezeigt (Aten et al., 2004). Voraussetzung dafür sind eine hohe Mobilität und vermutlich gerichtete Bewegungen von beschädigten Chromatindomänen zu diesen Reparaturfoci (Aten et al., 2004). Studien von Abdel-Halim et al. (2004, 2005, 2006) zeigten nach Röntgen- und UV-Bestrahlung aber auch nach Behandlung mit anderen Stressoren häufigere Paarungen von heterochromatischen Bereichen homologer Chromosomen. Dies könnte homologe Rekombinationsreparatur ermöglichen, die vorwiegend in der S- oder G₂- Phase erfolgt und bei der die intakte homologe Sequenz eines Chromatids als Vorlage für die beschädigte Sequenz benutzt wird (Misteli and Soutoglou, 2009). Weitere Studien haben gezeigt, dass zwischen vielen Translokationspartnern die Entfernungen im Kern relativ hoch sind, siehe Gue et al. (2006), was gewisse Chromatindynamiken voraussetzt und ebenfalls für ein „*breakage first*“ Szenario spricht.

Andere favorisieren das „*contact first*“ Szenario“, bei dem räumliche Nähe bereits vorhanden ist. Wenn dann durch äußere Einflüsse Doppelstrangbrüche auftreten, kann es zu Translokationen kommen: Für die Reparatur der Schäden sind jedoch im Gegensatz zum ersten Modell keine großen Chromatinbewegungen nötig (Misteli and Soutoglou, 2009). Überlappungszonen (*Intermingling*) von CTs im dekondensierten Zustand der Interphase und eine damit positiv korrelierte Translokationshäufigkeit zwischen den Chromosomen schließen aktive Bewegungen zwar nicht aus, eventuell aber könnte die zufällige Nähe von Interaktionspartnern schon ausreichen, um bei Doppelstrangbrüchen Translokationen zu verursachen (Branco and Pombo, 2006). In einem Versuch nach UV- Bestrahlungen konnten Kruhlak et al. (2006) bei der DNA- Reparatur keine großen Bewegungen in mehreren Zelltypen entdecken, vielmehr bildeten sich die Reparaturfoci an den beschädigten Stellen und bis auf örtlich begrenzte Diffusion änderte sich die Chromatinanordnung über einen Beobachtungszeitraum von über 4h wenig. Ähnliche Ergebnisse lieferten Ionen- und Laserbestrahlungen von Zellen und anschließende Langzeitbeobachtungen (Strickfaden, 2010). Auch hier waren keine großen Bewegungen und Restrukturierungen der

Zellkernarchitektur zu erkennen. Zur Reparatur benötigte Faktoren wie 53BP1 werden an die Schadensorte transportiert und akkumulieren dort. Diese und andere Studien sprechen gegen großen Bewegungen des Chromatins in der Interphase sowohl in bestrahlten auch als auch unbestrahlten Zellen (Gerlich et al., 2003; Walter et al., 2003; Cvackova et al., 2009; Strickfaden et al., 2010). In direkte Nachbarschaft könnten Loci jedoch nicht nur durch Brownsche Bewegungen kommen (Chubb and Bickmore, 2003), sondern auch durch komplexe Kernrotationen (Strickfaden et al., 2010). Nach derzeitigem Forschungsstand lässt sich nicht entscheiden, ob die vorhandene Datenlage durch das „*contact first*“ oder „*breakage first*“ Szenario völlig erklärt werden kann.

2.8. Kotranskription und Koregulation durch räumliche Interaktionen

Räumliche Nachbarschaften von Genen könnten für eine Co- Regulation der Expression in *expression hubs* oder *transcription factories* wichtig sein (Branco and Pombo, 2007; Fraser and Bickmore, 2007; Lanctot et al., 2007; Meaburn et al., 2007; Misteli, 2007; Gondor and Ohlsson, 2009; Cope et al., 2010; Cremer and Cremer, 2010; Rouquette et al., 2010; Williams et al., 2010). Dabei unterscheidet man zwischen intra- und interchromosomalen Assoziationen. Verschiedene Strukturen im Kern werden als Stabilisatoren solcher Verbindungen diskutiert.

Gegen solche *expression hubs* sprechen Studien von Brown et al. (2006), die koregulierte Expression und Prozessierung durch intrachromosomale Interaktionen von α - bzw. β - Globin Genen in SC35 Clustern von Erythroblasten zeigten. Des Weiteren neigten die aktiven α - Globin Gene auf verschiedenen Chromosomen zu einer Positionierung in solchen Clustern und waren häufig weit vom CT entfernt, was Schleifenbildungen voraussetzt. Es wurde aber keine erhöhte Anzahl von Kollokationen der FISH- Signale gefunden und die gemessene mittlere Entfernung der Signale zueinander war etwa 10x größer als der Durchmesser von *transcription factories*. Kollokation der Loci muss also keine Voraussetzung sein für Koregulation, SC35- Cluster hingegen könnten aber die räumliche Anordnung und Koregulation aktiver Gene organisieren (Brown et al., 2006). Dem widersprechen Analysen von Schoenfelder et al. (2010), die eine Vielzahl von *cis*- und *trans*- Interaktionen der Globingene Hba und Hbb in *transcription factories* von erythroiden Mauszellen zeigen konnten, aber in den untersuchten Zellen keine *splicing speckles* fanden. Nach dem Einschleusen der homologen menschlichen Loci über Vektoren zeigten vor allem die endo- und transgenen β - Globin Loci Kollokationen und waren fast ausschließlich in RNA Pol II

Foci zu finden, die einen genspezifischen Transkriptionsfaktor enthalten. Dies spricht für eine koregulierte Transkription in spezialisierten *transcription factories* und gegen SC35 Domänen als universalen Organisator für aktive Gene im Kern.

Eine wichtige Rolle kommt wohl auch den *Locus Control Regions* (LCRs) bestimmter Gene zu. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der β -Globin Locus durch Schleifenbildung in die Nähe seiner LCR gelangt und durch diese Interaktion koordinierte Transkription, Aufrechterhaltung der Transkription und Regulation möglich ist (Tolhuis et al., 2002). Des Weiteren fördert die LCR Schleifenbildung, Expression und Bindung an *transcription factories* (Noordermeer et al., 2008). Bei globinartigen und anderen hochexprimierten Genen der Maus in erythroiden und MEF-Zellen wurde eine Kolo-kalisation und koregulierte Transkription in gemeinsamen „*transcription factories*“ gefunden, obwohl diese Gene auf MMU 7 linear zwischen 25 und 40Mb entfernt liegen (Osborne et al., 2004). Ein weiteres Beispiel für inter- und intrachromosomale Interaktion haben Spilianakis et al. (2005) beschrieben. Sie fanden in naiven, murinen CD4⁺ T-Zellen Interaktionen zwischen dem Locus für Interferon- γ auf Chromosom 10 und einem Locus für drei Cytokine auf Chromosom 11. Im weiteren Differenzierungsprozess geht diese interchromosomale Interaktion verloren und zwei verschiedene Zelltypen entstehen, von denen der eine Typ Interferon- γ und der andere Typ Cytokine exprimiert. Dieser Status wird dann durch intrachromosomale Interaktionen über regulatorische Sequenzen wie die LCR aufrechterhalten (Spilianakis et al., 2005; Williams et al., 2010).

Solche dauerhaften oder transienten Interaktionen in *cis* könnten möglicherweise durch Gerüstproteine ermöglicht werden. Beim Cytokinlocus auf MMU11 beispielsweise soll das Protein SATB1 dazu beitragen, dass mehrere Schleifen zwischen den entscheidenden Bereichen des Locus stabilisiert werden und so eine koordinierte Expression der Cytokingene ermöglicht wird (Cai et al., 2006). Eine ähnliche Rolle soll auch das Zinkfinger-Protein CTCF spielen, das Loci auf den Chromosomen 7 und 11 zu gemeinsamen Transkriptionsorten rekrutiert und so interchromosomale gemeinsame Expression ermöglicht (Ling et al., 2006).

Einige der oben vorgestellten Ergebnisse wurden ermöglicht durch die Entwicklung verschiedener neuer Techniken wie der „*Chromosome Conformation Capture*“ Technik 3C (Dekker et al., 2002), „*Circular chromosome conformation capture*“4C (Simonis et al., 2006; Zhao et al., 2006) und entsprechende Weiterentwicklungen wie 5C (*carbon copy chromosome conformation capture*: Dostie and Dekker, 2007) oder HiC (Lieberman-Aiden et al., 2009), z.T. kombiniert mit CHIP-Analysen oder hochauflösenden, parallelen Sequenzierungen, bei denen inter oder intrachromosomale Nachbarschaften oder Interaktionspartner aufgedeckt

werden. Das Prinzip der Technik beruht darauf, dass die Chromatinkonfiguration einer Zellpopulation durch Paraformaldehyd-Fixierung im momentanen Zustand festgehalten wird. Die durch die Fixierung verbundenen DNA-Abschnitte in *cis* und *trans* werden restriktionsverdaut und intramolekular wieder ligiert. Über locusspezifische Primer werden in einer PCR die vermuteten Interaktionspartner getestet, wobei Vorwissen vorhanden sein muss. Bei 4C ist durch einen zusätzlichen Schritt, bei dem die Fragmente zirkularisiert werden, nur noch Wissen über eine Sequenz nötig, der sog. *Bait*-Sequenz. Die Interaktionspartner lassen sich dann über Sequenzierungen ermitteln. Die Weiterentwicklungen wie 5C oder Hi-C beruhen auf Aufreinigung von tatsächlichen Interaktionspartnern, um unspezifische Interaktionen zu eliminieren. Mit Hi-C steht heute ein Verfahren zur Verfügung, mit dem DNA-Interaktionen in *cis* und *trans* genomweit ohne Vorwissen ermittelt werden können.

Interaktionspartner von beispielsweise Transkriptionsfaktoren lassen sich durch ChIP-Analysen und anschließender Sequenzierung herausfinden. Durch Verbesserung der Sequenzierungsmethoden, v.A. der Auflösung und der sinkenden Kosten für eine Analyse, werden immer detailliertere Karten der Interaktionen im Kern geschaffen.

Eine weitere Möglichkeit bietet das DamID- (**D**NA *adenine methyltransferase* **I**Dentification) Verfahren, nachzulesen z.B. Vogel et al. (2007). Damit lassen sich Bindestellen von Transkriptionsfaktoren oder von Chromatinkomponenten genomweit identifizieren und kartieren. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine mit der DNA-Adeninmethyltransferase aus *E.coli*, die spezifisch GATC methyliert, fusioniert und in Zellen eingeschleust. Die Fusionskonstrukte binden *in vivo* an Ziele im Kern, wobei gleichzeitig die Umgebung methyliert wird. In den meisten Eukaryoten werden nur Cytosine methyliert, deswegen lassen sich die Zielbereiche der untersuchten Transkriptionsfaktoren oder Chromatinkomponenten über eine spezifische Methyl-PCR herausfinden. Die vorgestellten Methoden und einige damit erzielte Ergebnisse sind in einem aktuellen Review von van Steensel and Dekker (2010) zusammengefasst.

Im Gegensatz zu mikroskopischen Verfahren werden die genannten molekularbiologischen Methoden an großen Zellzahlen durchgeführt und liefern einen Durchschnittswert für eine Zellpopulation. Im Hinblick auf die Variabilität von Zellen in einer Zellkultur, insbesondere aber im Hinblick auf die komplexe Zusammensetzung von Geweben aus verschiedenen Zelltypen sind Methoden, die die Analyse einzelner Zellen erlauben, unabdingbar. Die in unserem Labor durchgeführten mikroskopischen Verfahren haben den Nachteil, dass in einem Experiment nur bestimmte Strukturen visualisiert werden können. Im Gegensatz zu globalen

molekularbiologischen Verfahren wie Hi-C erlaubt es die Mikroskopie jedoch, Rückschlüsse auf der Ebene der einzelnen Zellen zu ziehen und Aussagen über die Zell- zu Zell- Variabilität zu machen. Vergleiche der Interaktionen in verschiedenen Zelltypen, Geweben und Spezies, Veränderungen in Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen und Einzelzellanalysen, um Variationen von Zelle zu Zelle aufzudecken, werden nötig sein, um sich ein umfassendes Bild von den komplexen Vorgängen im Kern machen zu können.

Im Hinblick auf einige in der Einleitung angesprochene Bereiche wurden für diese Arbeit verschiedene Experimentreihen durchgeführt. Im ersten großen Themenkomplex wurde die radiale Anordnung im Interphasekern untersucht und mit der Anordnung in Metaphaseplatten verglichen. Dazu wurden FISH- Experimente von CT- Pools auf mehreren Zelltypen, die flache Zellkerne besitzen, durchgeführt, um die Möglichkeit einer größenbasierten Anordnung zu prüfen. Auch eine Reihe von Zentromeren und sehr kleinen bzw. vergrößerten DNA-Elementen wurden auf ihre zwei- und dreidimensionale radiale Lage im Kern untersucht. Um zu prüfen ob sich die Chromatinanordnungen nach der Metaphase ändern, wurden die Ähnlichkeiten von Tochterkernen verglichen in Abhängigkeit vom Winkel zwischen den beiden Kernen. Widersprüchliche Publikationen gibt es zu dem Thema, zu welchem Grad Chromatinmuster über die Mitose übertragen werden und inwieweit Nachbarschaften dabei erhalten bleiben oder sich bis zur darauffolgenden Interphase neu gebildet haben. Deswegen wurden Lebendzelleexperimente durchgeführt, um dieser Frage nachzugehen.

Welche Auswirkung transkriptionelle Hochregulation von Genen auf die Chromatinanordnung hat und ob sich dabei spezifische Chromatininteraktionen im Kern bilden oder lösen wurden in zwei unterschiedlichen Experimentreihen untersucht. Dabei sollten in einem Fall die Änderungen innerhalb von mehreren Tagen auftreten, im anderen Fall innerhalb weniger Minuten.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Materialien

Zellen und Zelllinien	Bezug
Amniotic Fluid Cells (AFC)	Michael Speicher, (Graz)
DLD1- Zellen	Christoph Lengauer (Baltimore)
Fibroblasten chinesischer Hamster + HCV	Thierry Voet (Leuven)
HeLa Zellen	Attila Nemeth (Regensburg)
HeLa Gold Zellen	Robert Goldman (Chicago)
Humane Fibroblasten (HFB-0 Horvath)	Irina Solovei (München)
Humane Fibroblasten (+SAC)	Thierry Voet (Leuven)
Humane Lymphozyten	Eigene Herstellung
Human Mammary Epithelial Cells (HMEC)	Thea Tlsty (UCSF)
IMR-90 Zellen	Attila Nemeth (Regensburg)
Kelly- Zellen	Manfred Schwab (Heidelberg)
Maus A9 Zellen (Fibroblasten +HCV)	Thierry Voet (Leuven)
Mausfibroblasten primär (+HCV)	Thierry Voet (Leuven)
MCF7 Zellen	Paul Meltzer (NIH, Bethesda)
RPE1- Zellen	Friederike Eckardt- Schupp (Neuherberg)

Chemikalien	Hersteller
10x NT Puffer	Invitrogen, Darmstadt
10x Puffer (PanCen PCR)	Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig
α - Amanitin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose SeaKem ME	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
β - Estradiol (E8875)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA) für PBS-Lösungen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA) für SSC- Lösungen	MP Biomedicals, Ohio, USA
Cetus-II-Puffer	Roche, Mannheim
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Citratmonohydrat	Merck, Darmstadt
Colcemid 10 μ g/ml	Biochrom AG, Berlin
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco`s MEM Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco`s MEM Medium (farblos)	Invitrogen, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Fetales Kälber Serum (FCS) (= FBS Superior)	Biochrom AG, Berlin
Fetal Calf Serum (FCS) (kohlegefiltert ohne Steroidhormone)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid	Merck, Darmstadt
Gelauftragungspuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Gerbu, Wieblingen
Immersionsöl	Zeiss, Jena; Leica, Wetzlar
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanidoferrat (II)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumhexacyanidoferrat (III)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
MEGM Bullet Kit	Lonza, Basel
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Pepsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepton	Gerbu, Wieblingen
Poly- L- Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt
Stickstoff (flüssig)	Linde, München
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin- EDTA- Lösung 10x	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Calbiochem, San Diego, USA
Vectashield Antifade Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Enzyme	Hersteller
DNA- Polymerase I	Roche, Mannheim
DNase I	Roche, Mannheim
Multiscribe Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Darmstadt
Pepsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNA Guard RNase Inhibitor	GE Healthcare, München
Taq-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig
Trypsin	Biochrom AG, Berlin

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Avidin-Alexa488	1:200	Invitrogen, Darmstadt
Goat- α -Mouse-Cy5	1:100	Dianova, Hamburg
Goat- α -Rabbit-Alexa488	1:200	Invitrogen, Darmstadt
Goat- α -Rabbit-Cy3 F(ab') ₂	1:200	Dianova, Hamburg
Goat- α -Rabbit-TR F(ab') ₂	1:50	Dianova, Hamburg
Goat- α -Rat Alexa 488	1:400	Invitrogen, Darmstadt
Mouse- α -B23	1:500	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mouse- α -Dig-Cy3	1:100	Dianova, Hamburg
Mouse- α -Dig-Cy5	1:100	Dianova, Hamburg
Rabbit- α -Dig	1:500	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rabbit- α -DNP	1:200	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rat- α -BrdU	1:100	Abcam, Cambridge
Sheep- α -Dig-FITC	1:100	Roche, Mannheim
Streptavidin-Alexa488	1:500	Invitrogen, Darmstadt
Streptavidin-Cy3	1:500	Dianova, Hamburg
Streptavidin-Cy5	1:200	Biotrend, Köln

DNA, Nukleotide, Primer, Kits	Hersteller
6 MW-Primer	MWG- Biotech, Ebersberg
Biotin- dUTP	Roche, Mannheim
BrdU	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cy3- dUTP (home labeled)	Cy3: GE Healthcare, München dUTPs: Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cy5- dUTP	Cy5: GE Healthcare, München dUTPs: Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 100mM	Roche, Mannheim
Digoxigenin- dUTP	Roche, Mannheim
DNP- dUTP	NEN Life Science Products, Boston, USA
FITC- dUTP	FITC: Invitrogen, Darmstadt dUTPs: Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fugene HD	Roche, Mannheim
GenomiPhi DNA Amplification Kit	GE Healthcare, München
High Capacity cDNA RT Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
High Pure Plasmid Isolation Kit Cat. No 11 754 777 001	Roche, Mannheim
Lambda Marker	Roche, Mannheim
menschliche Cot-1 DNA	Invitrogen, Darmstadt
Primer α 27, Primer α 30	MWG- Biotech, Ebersberg
Primer für GAPDH, FW +RV	MWG- Biotech, Ebersberg
RNeasy Kit	Quiagen, Hilden
Salmon Sperm DNA	Invitrogen, Darmstadt
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt

TaqMan- Sonden für Gene TFF1, GREB1 und β - Actin	Applied Biosystems, Darmstadt
TexasRed- dUTP	TexasRed: Invitrogen, Darmstadt dUTPs: Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Konstrukte	Bezug
paGFP H4	Roeland W. Dirks; Jeroen Essers
mRFP H2B	Ruth Brack- Werner
mRFP PCNA	Heinrich Leonhardt
mRFP CENPB	Ruth Brack- Werner
eGFP ER	Josef Mautner

Medien, Lösungen	Bestandteile	Genauere Zusammensetzung bzw. Zubereitung
ACG- Mix	je 2 mM je 100 mM dATP, dCTP, dGTP H ₂ O bidest.	10 μ l dATP + 10 μ l dCTP + 10 μ l dGTP 470 μ l H ₂ O bidest.
Agarose- Gel	1% Agarose in TAE-Puffer	2g Agarose in 200 ml TAE-Puffer
Blockierungslösung	4% BSA in 4xSSC/T	10 ml 20% BSA 40 ml 4xSSC/0,2% Tween
DAPI- Färbelösung (0,05 μ g/ml)	DAPI- Stammlösung (500 μ g/ml)	5 μ l DAPI- Stammlösung 50 ml 4xSSC/T
dNTP- Mix	dATP, dGTP, dCTP, dTTP (je 2,5 mM) H ₂ O bidest.	20 μ l dATP + 20 μ l dGTP + 20 μ l dCTP + 20 μ l dTTP + 720 μ l H ₂ O bidest.
dTTP- Lösung 1 mM	dTTP (100 mM) in H ₂ O bidest.	10 μ l 100 mM dTTP 990 μ l H ₂ O bidest.
Dulbecco`s MEM Kompletmedium	Dulbecco`s MEM, Medium, FCS Penicillin/Streptomycin	500 ml Dulbecco`s MEM 50 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin
Ethanol 70%	Ethanol technisch, H ₂ O Bidest.	75 ml Ethanol 175 ml H ₂ O bidest.
Ethanol 90%	Ethanol technisch, H ₂ O Bidest.	25 ml Ethanol 225 ml H ₂ O bidest.
Formamid- Lösung 50% in 2xSSC	Formamid 4x SSC	500 ml Formamid 500 ml 4x SSC
Gelauftragungspuffer	Xylencyanol Bromphenolblau Glycerin	0,25% Xylencyanol 0,25% Bromphenolblau Glycerin
HCl- Lösung 0,1 N	1N HCl, H ₂ O dest.	45 ml H ₂ O dest. 5 ml 1N HCl
Hybridisierungs- Mastermix	20% Dextransulfat in 2xSSC	8 g Dextransulfat

		40 ml 2xSSC
HCl- Lösung 0,1 N	2 N HCl H ₂ O dest.	47,5 ml H ₂ O dest. 2,5 ml 2 N HCl
LB- Medium	NaCl, Pepton, Hefeextrakt, H ₂ O bidest.	10gr. NaCl, 10gr. Pepton 5gr Hefeextrakt 1l H ₂ O bidest.
MOPS Puffer	Mops-Puffer, 10x:	200 mM 3 (N-Morpholino)- Propansulfonsäure (MB Biomedicals, Illkirch, FR) 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA mit 10M NaOH auf pH 7.0 einstellen, lichtgeschützt
PBS-Puffer 1x	für Zellkultur: 20x PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄) H ₂ O bidest.	25 ml 20x PBS + 475 ml, H ₂ O bidest.; autoklavieren
Pepsin-Stocklösung	Pepsin H ₂ O bidest.	1 g Pepsin 10 ml H ₂ O bidest.
Paraformaldehyd- Lösung	4% PFA in 1x PBS	4 g PFA 100 ml 1x PBS
RPMI Kompletmedium	RPMI 1640 Medium FCS Penicillin/Streptomycin	500 ml RPMI 1640 Medium 50 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin
SSC- Puffer 0,1x	20x SSC (>15 mM NaCl, 1,5 mM Na-Citrat), H ₂ O bidest.. Natrium- Azid (0,04%)	5 ml 20x SSC 995 ml H ₂ O bidest. 1 kleine Spatelspitze Natrium- Azid
SSC- Puffer 2x	20x SSC (>300 mM NaCl, 30 mM Na-Citrat) H ₂ O bidest., Natrium- Azid (0,04%)	100 ml 20x SSC 900 ml H ₂ O bidest. 1 kleine Spatelspitze Natrium- Azid
SSC- Puffer 4x / 0,2% Tween	20x SSC (>600 mM NaCl, 60 mM Na-Citrat) H ₂ O bidest., Tween 20 Natrium- Azid (0,04%)	200 ml 20x SSC 800 ml H ₂ O bidest. 2 ml Tween 20 + 1 kleine Spatelspitze Natrium- Azid
Triton-X-100 0,05%	1x PBS 0,5% Triton-X-100	50 ml 0,5% Triton-X-100 450 ml 1x PBS

Mikroskope, Geräte	Beschreibung	Hersteller
Abi Fast 7500 qPCR		Applied Biosystems, Darmstadt
Axiovert 25	Objektive: A Plan 5x / 0,12 Ph0 A Plan 10x / 0,25 Ph1 LD A Plan 20x / 0,3 Ph1 Var1	Zeiss, Jena
Axiophot 2	Objektive: Plan NEOFLUAR 40x oil / 1,3 Plan Apochromat 63x oil / 1,4 Plan NEOFLUAR 100x oil / 1,3 Plan Apochromat 63x oil / 1,4 Ph3 FLUAR 40x oil / 1,3 Ph3 Fluoreszenzfilter: DAPI (BP 365, FT 395, LP 450-490nm) FITC (BP 450-490, FT 510, LP 515-565nm) Cy3 (BP 546, FT 580, LP 590nm) Cy5 (BP 575-625, FT 645, BP 660-710nm) Triple- Filter (TBP 400/495/570, FT 410/505/585, TBP460/530/610) Kamera: Coolview CCD Camera System	Zeiss, Jena
Konfokales Laser-Scanning- Mikroskop Leica SP5 AOBS DMI 6000 CS	Objektiv: Plan- Achromat 63x oil / 1,4 Laser: Ar 100 mW 485, 476, 488, 496, 512 nm HeNe 2 mW 594 nm HeNe 10 mW 633 nm DPSS 10 mW 561 nm Diode 50 mW 405 nm Beam Splitter: Acusto Optical Beam Splitter (AOBS)	Leica, Heidelberg
Ultra Vie Vox Spinning Disc	Laser: Melles Griot 405nm, 50mW Melles Griot 445nm, 40mW Coherent 488nm, 75mW Cobolt 514nm, 25mW Cobolt 561nm, 75mW Melles Griot 640nm, 50mW Mikroskop Stand: Zeiss Observer D1	Perkin Elmer Zeiss, Jena
Autoklav Dampfsterilisator	Varioklav	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim

CO ₂ -Inkubator	BB6220	Heraeus, Hanau
Sterile Werkbank	Herasafe	Heraeus, Hanau
Zentrifugen	Biofuge pico Rotana/S Vacuumconcentrator	Heraeus, Hanau Hettich, Tuttlingen Bachhofer, Reutlingen
Photometer Sonstige Geräte		Pharmacia Biotech
Heizblock	Kühlschrank +4°C	Bunsenbrenner
Gefrierschrank -80°C	Gefrierschrank -20°C	Schüttler
Canon Powershot G5 Digitalkamera mit Aufsatz für Axiovert 25		
Spannungsquellen für Elektrophorese	Elektrophoresekammern	Stickstofftank
Vortexer	Wasserbäder	Spezial Setup für NT

Hilfsmittel	Beschreibung	Hersteller
6-well-Platten		Greiner bio-one, Frickenhausen
Cryo Tubes	Cryo- Konservierung von Zellen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Deckgläser	12x12 mm 15x15 mm, 24x60mm 18x18 mm, 20x20 mm, 22x22mm, 24x24 mm 24x24mm mit Raster	Hecht, Sondheim Menzel-Gläser, Braunschweig Superior Marienfeld, Lauda- Königshofen
Eppendorf-Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Schubert & Weiß, München
Falconröhrchen	15 ml, 50 ml	Falcon / Becton Dickinson, S. Jose, USA
Gewebekulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen
Glaspipetten (serologisch)	1 ml, 2 ml 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht Costar, Corning, USA
Impfösen		
Lebendzellkammern	LabTek 2 Kammern, Glasboden	Nunc, Langenselbold
MicroAmp® Fast Optical 96 Well Reaction Plate	RT qPCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Objekträger		R. Langenbrink, Emmendingen
Petrischalen	10 cm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	weiß gelb und blau	Molecular Bio Products, San Diego, CA, USA Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen für PCR		Molecular Bio Products, San Diego, CA, USA
Sonstige Hilfsmittel		
Fixogum	Parafilm	Uhrmacherpinzette

Nagellack

Software	Hersteller
3DRRD/2DRRD	Johann von Hase
Adobe 3D Reviewer	Adobe
Adobe Reader	Adobe
Amira 5.2.; 5.3	Visage Imaging, Inc.
Adobe Photoshop CS4 11.0	Adobe Systems, Inc.
eADS	Tobias Thormeyer
Image J 1.37c	Public Domain by Wayne Rasband
Leica Application Suite 1.7.0.	Leica Microsystems
MetaVue 6.2r2	Universal Imaging Group
Microsoft Office	Microsoft
Nuclear Nightingale	Boris Joffe
Sigma Stat 3.0	SPSS Inc.
Volocity 5.2	Improvision

BAC Name	Lage	Länge (kb)	Experiment
RP11-438D14	12p,subzentromerisch	146	Radiale Anordnung von SACs
RP11-139J6	2q11.1,subzentromerisch	21	Zentromerassoziation
RP11-108H13	20p11.1,subzentromerisch	86	Zentromerassoziation
RP11-121A05	21q22.11	161	Östrogenstimulation
RP11-35C04	21q22.11	164	Östrogenstimulation
RP11-374L23	21q22.11	176	Östrogenstimulation
RP11-66C21	21q22.11	171	Östrogenstimulation
CTD2533G12	21q22.11, innerhalb TFF1 Gen	194	Östrogenstimulation
RP11-637P02	21q22.11	162	Östrogenstimulation
RP11-53A21	21q22.11	157	Östrogenstimulation
RP11-131P09	21q22.11	155	Östrogenstimulation
RP11-685P02	21q22.11	141	Östrogenstimulation
RP11-268D08	21q22.11	162	Östrogenstimulation
RP11-124A15	2p25.3	179	Östrogenstimulation
RP11-748B05	2p25.3	195	Östrogenstimulation
RP11-4K20	2p25.3	179	Östrogenstimulation
RP11-345J13	2p25.3	171	Östrogenstimulation
RP11-812N02	2p25.3	209	Östrogenstimulation
RP11-884L15	2p25.3, innerhalb GREB1 Gen	108	Östrogenstimulation
RP11-641J22	2p25.3	148	Östrogenstimulation
RP11-5H04	2p25.3	179	Östrogenstimulation
RP11-489A14	2p25.3	143	Östrogenstimulation
RP11-46C6 (PSG)	19q13, nahe PSG Cluster	414	Replikative Seneszenz

RP11-44B13 (AN51)	19q13	179	Replikative Seneszenz
RP11-81M8 (AN23)	19p13	184	Replikative Seneszenz
RP11-828F4 (AN16)	17q21	199	Replikative Seneszenz
RP11-105E14 (1/46)	1q21.1	162	Replikative Seneszenz
RP11-71L20 (1/48)	1q21.3	145	Replikative Seneszenz
RP11-193J5 (1/53)	1q24.1	159	Replikative Seneszenz

3.2. Zellmaterial

3.2.1. Fruchtwasserzellen (Amniotic Fluid Cells AFC)

Es handelt sich um Zellen, die aus Fruchtwasseruntersuchungen gewonnen werden mit einem normalen Karyotyp XY. Sie stammen aus dem Labor von Michael Speicher. Kultiviert werden sie in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicilin/Streptomycin (P/S).

3.2.2. Humane Fibroblasten (HFB)

Es handelt sich um primäre humane Fibroblasten, die über eine Hautbiopsie gewonnen wurden (Klinikum Amsterdam, Niederlande). Der Karyotyp ist normal, diploid und weiblich (XX). Die Zellen stammen aus einer frühen Passage. Die Zellen werden in DMEM mit 20%FCS und 1%P/S kultiviert.

3.2.3. DLD1- Zellen

DLD1 Zellen stammen aus dem Gewebe eines Kolonadenokarzinoms. Namensgeber waren die Initialen von Daniel L. Dexter, der sie in seinem Labor etablierte (Dexter et al., 1979). Die Zellen besitzen bis auf zwei Duplikationen und eine kleine Translokation einen normalen, männlichen Karyotyp und sind diploid (siehe M-FISH Bild von Anna Jauch, Heidelberg). Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden von C. Lengauer (John Hopkins Hospital, Baltimore, MD) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgt in DMEM mit 10 %FCS und 1%P/S.

M-Fish DLD1-Zellen 46XY,dup(2p),der(6)t(6;11),+20

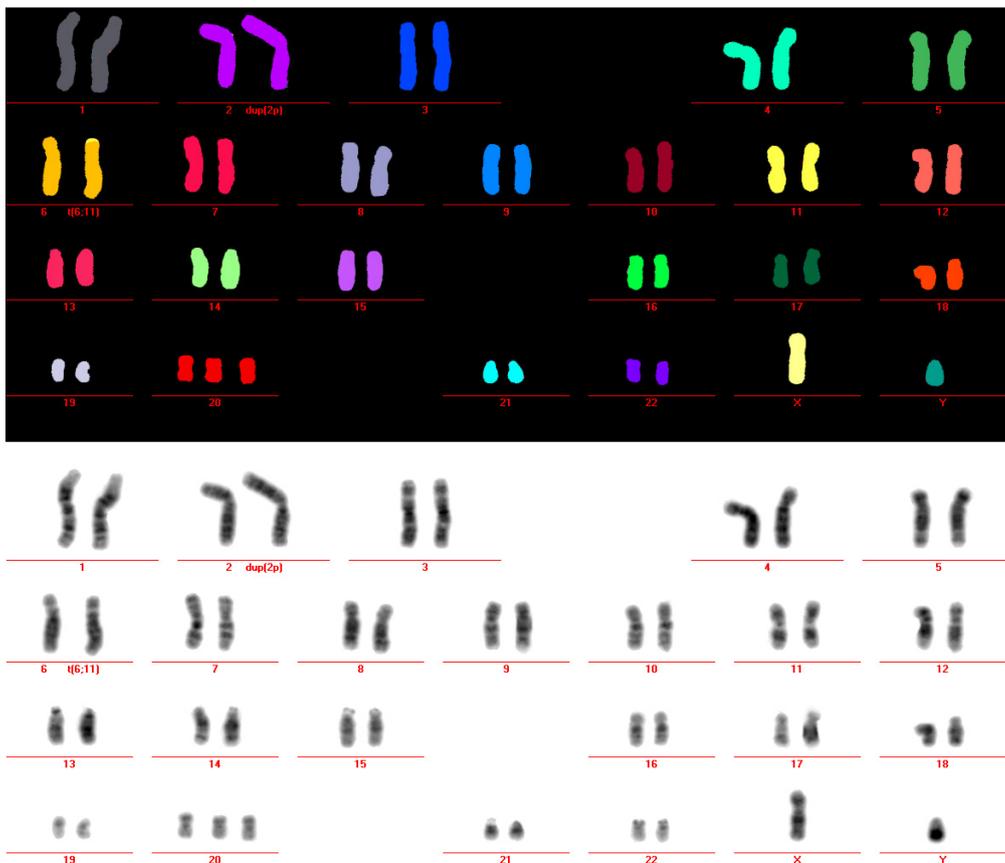


Abb. 3: M-FISH Analyse von DLD1- Zellen.

Durchgeführt von Anna Jauch (Heidelberg). Zu sehen ist eine Duplikation auf HSA2 und eine Translokation zwischen HSA6 und 11. HSA 20 ist dreimal vertreten.

3.2.4. Human Mammary Epithelial Cells (HMEC)

HMEC werden aus primärem Brustgewebe isoliert und sind daher diploid. Sie stammen von Thea Tlsty (UCSF) und sind nicht immortalisiert. Da sie genomisch instabil sind, sollten sie nach dem Auftauen nicht länger als 4- 6 Passagen kultiviert werden. Zur Kultivierung benötigt man den MEGM BulletKit (Lonza; Katalognummer CC-3150) der aus dem Basalmedium und einigen Additiven wie Insulin, Hydrokortison, BPE (*Bovine Pituitary Extract*) und EGF (*Epidermal Growth Factor*) besteht (Romanov et al., 2001). Da in normalem FCS Steroidhormone enthalten sind, darf/soll es nicht zugegeben werden. Die Additive reichen für ein normales Wachstum aus.

3.2.5. HeLa Gold Zellen

Diese Linie stammt aus dem Labor von R. Goldman (Chicago), hat laut M-FISH Analyse von Anna Jauch (Heidelberg) 73 Chromosomen und besitzt folgenden Karyotyp:

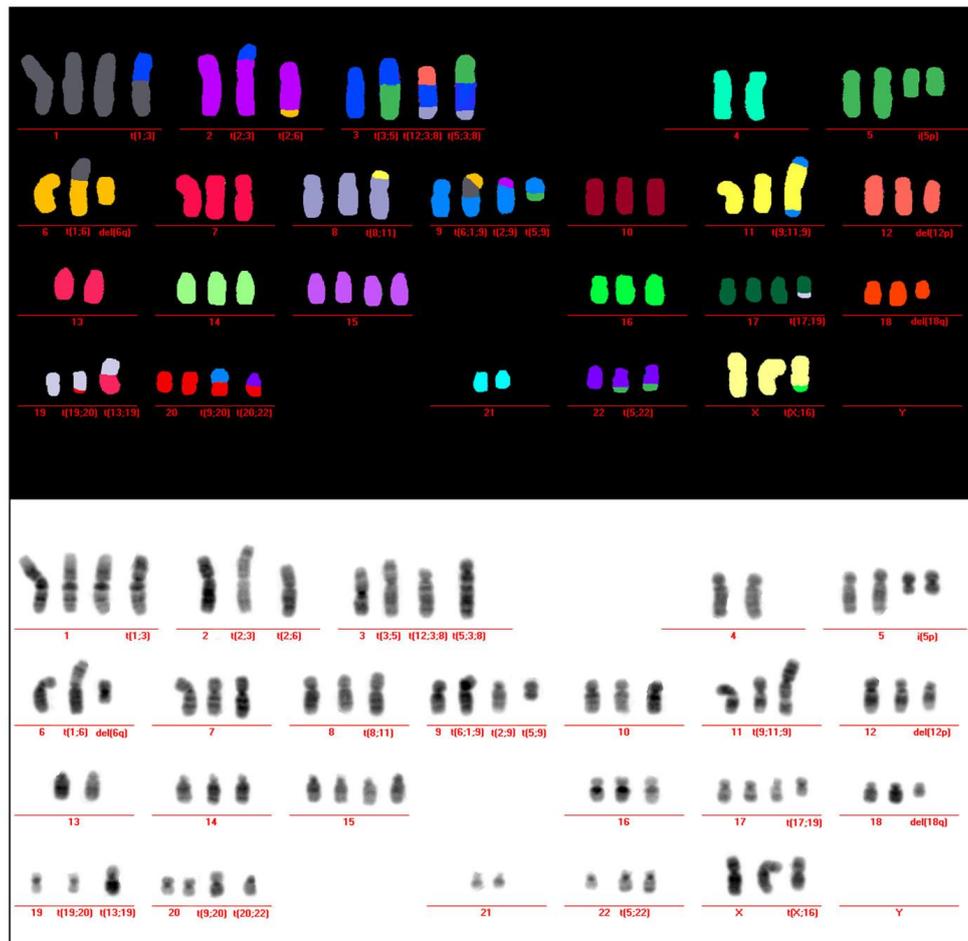


Abb. 4: Karyotyp von HeLa Gold Zellen.

Für die FISH- Experimente (siehe 4.1) wurden Sonden für HSA4 (2 Kopien), HSA7(3 Kopien), HSA 13 ($\frac{1}{4}$ der Zellen 2 Kopien, $\frac{3}{4}$ der Zellen 3 Kopien) und HSA21q (2 Kopien) verwendet, da hier keine Translokationen vorhanden sind.

Im Zuge dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Karyotypisierung nicht mehr aktuell ist und etwa Dreiviertel der Zellen bereits ein drittes HSA 13 besitzt. Die Zellen werden in DMEM mit 10%FCS und 1%P/S kultiviert.

3.2.6. HeLa Zellen

Die Zellen stammen von Attila Nemeth (Regensburg). Der Karyotyp (XX) ist nicht näher bestimmt. Weitere Informationen auf <http://www.lgcstandards-atcc.org/>. Sie wachsen in DMEM mit 10% FCS und 1% P/S.

3.2.7. IMR-90 Zellen

IMR-90 Zellen sind Fibroblasten und stammen aus dem Lungengewebe eines 16 Wochen alten, weiblichen Fötus. Sie sind daher diploid und wohl auch weitgehend genomisch stabil.

Die Gewinnung und Beschreibung der Zellen wurde von (Nichols et al., 1977) durchgeführt. Sie wurden von der Firma ATCC bezogen und von Attila Nemeth (Regensburg) zur Verfügung gestellt. Sie wachsen in DMEM mit 10% FCS und 1% P/S.

3.2.8. HFB-0 Horvath

Es handelt sich um eine frühe Passage von weiblichen, normalen, humanen Fibroblasten. Sie stammen vom LMU Klinikum für pränataldiagnostische Untersuchungen und wurden von Daniele Zink (Singapur) im Labor eingeführt. Sie werden in DMEM mit 20% FCS und P/S kultiviert.

3.2.9. Humane Lymphozyten (HLy)

Humane Lymphozyten werden aus Blutspenden von Freiwilligen isoliert und wachsen in normalem RPMI mit 10% FCS und P/S. Um periphere T- Lymphozyten, die sich in G₀ befinden, zum Wachstum anzuregen, wird noch Phytohämagglutinin zugegeben (100µl/10ml Medium). Aus den Lymphozyten werden 2D Metaphasenpräparate hergestellt.

3.2.10. Humane Fibroblasten mit einem Small Accessory Chromosome (SAC)

Es handelt sich um normale, diploide, humane Fibroblasten, die Zellen enthalten jedoch ein SAC, ein natürlich entstandenes Minichromosom (< 1,8 cM). SACs sind kleine, ringförmige Chromosomen, die zusätzlich zu den 46 normalen menschlichen Chromosomen im Zellkern vorhanden sein können und aus alphoiden Sequenzen und Satellitenrepeats eines Chromosoms bestehen. Die Auswirkungen durch das Vorhandensein von SACs auf den Phänotyp von Trägern sind unklar (Ulmer et al., 1997; Vermeesch et al., 1999). Sie besitzen ein aktives Zentromer, was ihnen mitotische Stabilität verleiht und sind meist mit anderen Zentromeren oder Chromosomen assoziiert. In den hier beschriebenen Zellen bestehen die SACs hauptsächlich aus alphoiden Sequenzen des Zentromers 12. Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgt in DMEM mit 20% FCS und 1% P/S. Die Zellen stammen aus dem Labor von Joris Robert Vermeesch (Leuven).

3.2.11. Fibroblasten des Chinesischen Hamsters mit einem Human Chromosomal Vector (HCV)

Es handelt sich um Fibroblasten des Chinesischen Hamsters, die jeweils zusätzlich einen

zirkulären oder einen linearen Vektor humanen Ursprungs besitzen. Der Vektor ist eine Weiterentwicklung eines SAC (Voet et al., 2001), über 6Mb groß und enthält ca. 4Mb- lange Sequenzen des p-Arms des menschlichen Chromosom 1 (1p21.3- 1p22.1) und alphaide Sequenzen des Zentromers 20 mit einer Größe von über 1Mb. Der Vektor besitzt also wie das SAC ein aktives Zentromer. Es wurden zwei Formen dieser HCVs konstruiert - eine zyklische Variante ohne Telomere und eine lineare mit Telomeren.

Ansonsten ist der Karyotyp der Zellen normal (11, XX bzw. 11, XY). Zumindest was die Anzahl der Chromosomen betrifft, sind die Zellen diploid und stabil, aufgrund einer fehlenden M- FISH Analyse können aber mögliche Translokationen nicht ausgeschlossen werden (siehe Diplomarbeit Liebhart, 2009).

Die beiden Linien E10B1 (mit zirkulärem HCV) und CHL-3-19-19-32 (mit linearem HCV) wurden in DMEM Medium mit 10% FCS, 1%P/S und 200µg/ml Geneticin (G418) als Selektionsmittel kultiviert. Geneticin ist ein Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese hemmt. Zur Verfügung gestellt wurden sie von Thierry Voet (Leuven).

3.2.12. Maus-A9-Zellen mit HCV

Die Zellen enthalten die gleichen Vektoren wie die unter 3.2.11 beschriebenen Hamster-Zellen. Es handelt sich hier ebenfalls um Fibroblasten, die zur C3H-Zelllinie gehören. Der Karyotyp der Maus- A9- Zellen ist jedoch stark rearrangiert (triploid- tetraploid, zahlreiche Translokationen). Während normale Mausechromosomen akrozentrisch sind, besitzen die Chromosomen dieser Zelllinie einen hohen Anteil an meta- und submetazentrischen Chromosomen (Kugoh et al., 1999). Sie stammen ebenfalls aus dem Labor von Thierry Voet. Die Kultivierung erfolgt analog zu den Hamsterzellen in DMEM mit 10% FCS mit 200µg/ml G418 (A9-35 zirkulärer HCV) bzw. 6µg/ml Blastocidin (A9-3-19-19-2 linearer HCV) als Selektionsmittel.

3.2.13. Primäre Mausfibroblasten mit HCV

Primäre Mausfibroblasten stammen aus primärem Gewebe der Maus und sind diploid (40 unveränderte, akrozentrische Chromosomen). Es wurden folgende Linien verwendet: L5-28 mit linearem HCV und F19-35 mit zirkulärem HCV. Da in L5-28 kein HCV nachgewiesen werden konnte, wurde stattdessen mit einer anderen Linie L5-1, die ebenfalls einen linearen HCV besitzt, weiter gearbeitet. Es handelt sich um den gleichen Vektor wie oben beschrieben.

Die Zellen wurden in DMEM Medium mit 20% FCS und 1%P/S kultiviert. Sie wurden ebenfalls von Thierry Voet zur Verfügung gestellt.

3.2.14. Kelly- Zellen

Kelly- Zellen sind Neuroblastomzellen mit einer Amplifikation des MYCN Gens, eines Onkogens, dessen Amplifikation in verstärkter Expression und aggressivem Tumorwachstum resultiert (Schwab et al., 1984; Fix et al., 2008). Die starke Amplifikation ist sichtbar bei den Kelly Zellen in einer sogenannten HSR (*Homogeneously Staining Region*) auf beiden Kopien von HSA17 (siehe Abb. 5), ein verlängerter Chromosomenbereich, der in Bänderungsfärbungen sehr homogen ist. Im Interphase- Kern ist die HSR stark dekondensiert und erstreckt sich über das ganze Kernvolumen (Solovei et al., 2000). Diese HSR besteht aus 100- 120- fach amplifizierten und transkriptionell aktiven MYCN-Genen, die sich auf den q-Armen der beiden Homologen von Chromosom 17 befinden. Diese erreichen so eine Größe vergleichbar mit dem Chromosom 1 (Solovei et al., 2000). Der restliche Karyotyp ist ebenfalls stark rearrangiert. Die Kultivierung dieser adhärent wachsenden Zellen erfolgte in RPMI Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1%P/S. Sie wurden vom M.Schwab Lab (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

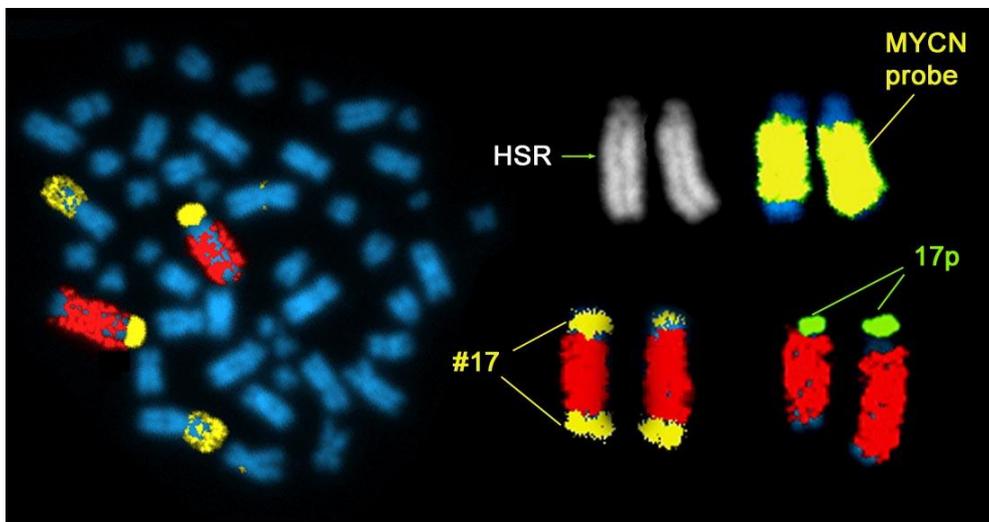


Abb. 5: 2D- FISH Metaphasenpräparat von Kelly- Zellen

Zu sehen sind die angefärbten Bereiche von Chromosom 17 und das amplifizierte MYCN Gen (aus Solovei et al. 2000).

3.2.15. MCF 7- Zellen

MCF7 sind epitheliale Brustkrebszellen und stammen von P. Meltzer (NIH, Bethesda). Der Karyotyp ist hypotriploid mit zahlreichen Umbauten und Translokationen. Eine M-FISH wurde ebenfalls von Anna Jauch durchgeführt.

Diese Zelllinie ist genomisch aber relativ instabil, deshalb ist bei Bedarf nach häufiger Passagierung eine neue Analyse empfehlenswert. Im Zuge dieser Arbeit wurde z.B. festgestellt, dass es drei Kopien von HSA21 gibt und weitere kleine Bereiche dieses Chromosoms auf 3- 4 weiteren Chromosomen transloziert sind. Die Kultivierung erfolgt in DMEM ohne Phenolrot, mit 10% steroidhormonfreiem, kohlegefiltertem FCS und 1%P/S.

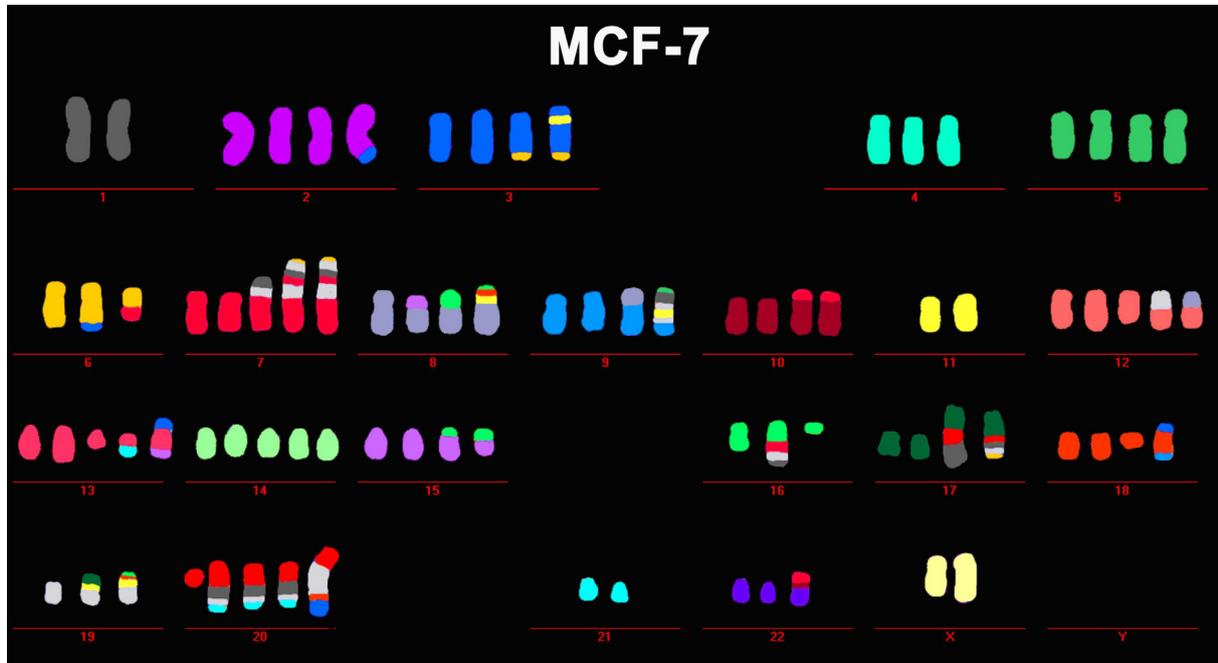


Abb. 6: Karyotyp von MCF 7- Zellen

Die Zellen zeigen einen stark rearrangierten Karyotyp (M-FISH von Anna Jauch).

3.2.16. MCF 7 + paGFP H4 bzw. ER- GFP

Im Zuge dieser Arbeit wurden normale MCF 7 Zellen für Lebendzelleexperimente mit paGFP-H4 oder GFP- ER (*Estrogen Receptor*) und als Gegenfärbung mit mRFP- H2B oder mRFP- PCNA transient transfiziert. Die Kultivierung erfolgt in DMEM ohne Phenolrot, mit 10% steroidhormonfreiem, kohlegefiltertem FCS und 1%P/S. Rechtzeitig vor den Experimenten werden sie in passenden Lebendzellkammern ausgesät und mit phenolrotfreiem DMEM und 250µM Trolox weiterkultiviert.

3.2.17. RPE1- Zellen

Es handelt sich um weibliche immortalisierte (hTERT), tetraploide Retina- Epithelzellen. Sie stammen aus dem Labor von Friederike Eckardt- Schupp (Helmholtz-Zentrum, München). Die Zellen werden in DMEM- F-12 Medium (1:1), 10% FCS und 1%P/S kultiviert. Ein aktuelles M-FISH Bild (Anna Jauch, Heidelberg, April 2009) zeigt folgenden Karyotyp:

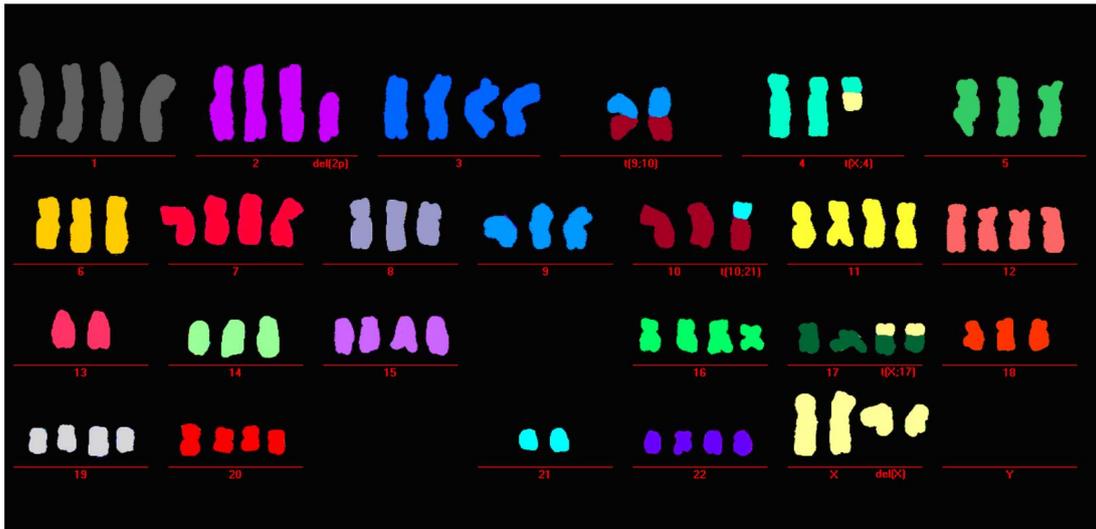


Abb. 7: Karyotyp von RPE1- Zellen

Der Karyotyp der Retina- Epithelzellen ist überwiegend tetraploid (Anna Jauch, Heidelberg). Diese Zellen eignen sich gut für transiente und stabile Transfektionen. In dieser Arbeit wurden stabil transfizierte RPE1- Zellen mit paGFP- H4 und mRFP- H2B bzw. mRFP- PCNA verwendet.

3.3. Zellkultur:

Alle Schritte werden unter der Sterilbank durchgeführt, um Kontamination mit Bakterien oder Pilzsporen zu vermeiden.

3.3.1. Auftauen und Kultivierung von Zellen

Die in einem Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen werden aus dem Stickstofftank geholt und zügig im Wasserbad aufgetaut.

Die erwärmte Zellsuspension wird in der Kulturflasche mit vorgelegtem, erwärmtem Medium vermischt (für 25cm² Kulturflaschen 5ml Medium; für 75cm² Kulturflaschen 10ml Medium) und für mindestens eine Stunde in den Brutschrank gestellt bei 37C° und 5% CO₂, bis sich die Zellen am Flaschenboden angeheftet haben.

Zum Schluss wird das Medium gewechselt, da es noch DMSO enthält, ein Gefrierschutzmittel für die Einlagerung in Stickstoff, das aber bei RT bzw. in Kultur toxisch auf die Zellen wirkt. Lymphozyten wachsen nicht adhärent, sondern in Suspension. Dementsprechend werden die Kulturflaschen aufrecht stehend inkubiert.

3.3.2. Kultivierung und Ausdünnen der Zellen

Die Medien, Trypsin und PBS werden im Wasserbad auf 37C° erwärmt.

Das alte Medium, in dem die Zellen wachsen, wird mit einer sterilen Pipette entfernt und die Zellen gründlich mit PBS gewaschen, um letzte Mediumreste zu entfernen, die mit den darin enthaltenen zweiwertigen Ionen das Trypsin in seiner Wirkung hemmen.

Die Trypsin/EDTA- Lösung wird auf die Zellen gegeben und die Flasche für ca. 5 Min in den Inkubator zurückgestellt, da Trypsin ein Wirkungsoptimum bei 37C° hat. Das Ablösen der Zellen wird unter einem Phasenkontrastmikroskop überprüft und kann durch leichtes Klopfen gegen die Kulturflasche beschleunigt werden.

Durch Zugabe von Medium wird das Trypsin gestoppt und die Zelllösung mit einer Pipette gemischt. Ein Teil der Suspension wird verworfen und durch frisches Medium ersetzt, je nachdem welche Dichte vorher vorhanden war und welche Konfluenz an Zellen im weiteren Verlauf gewünscht ist.

3.3.3. Einfrieren von Zellen

Die Zellen werden, wie oben beschrieben, trypsiniert und in Medium aufgenommen. Die Suspension wird in ein Falcon- Röhrchen überführt und für 5 Min bei 1000rpm zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen und die Zellen in Medium mit 10% DMSO resuspendiert. Jeweils 1,5ml der Suspension werden in Kryoröhrchen abgefüllt, die anschließend sofort in eine Isopropanolbox gestellt werden und mehrere Tage im -80C° Kühlschrank bleiben. Durch das Isopropanol wird die Temperatur gleichmäßig (~1°C/Min) gesenkt und die Überlebensrate der Zellen gesteigert. Zur längerfristigen Lagerung werden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff überführt. Alternativ können die Zellen auch graduell runtergefroren werden bei -20C°, -80C° und N₂ liquid.

3.4. Herstellung von Metaphasepräparaten

3.4.1. In Suspension wachsende Zellen/Isolation der Lymphozyten

Frisches Blut wird in ein Falcon- Röhrchen mit einem Tropfen Heparin- Natrium überführt.

Die Ficoll- Paque Plus Lösung wird auf RT erwärmt und 15ml davon in ein 50ml Falcon-Röhrchen mit Trennscheibe gegeben, anschließend wird es für 30sec bei 3000rpm zentrifugiert.

Das Blut (evtl. mit etwas Medium oder PBS verdünnen) wird vorsichtig auf das Ficoll geschichtet und 15min bei 2000rpm zentrifugiert.

Der sogenannte „buffy-coat“, der Leukozytenfilm in dem hauptsächlich weiße Blutkörperchen und Blutplättchen enthalten sind und der die Trennschicht bildet zwischen Blutplasma und Erythrozyten, wird vorsichtig mit einer Plastikpasteurpipette in ein frisches 15ml Falcon- Röhrchen überführt und auf 10ml mit Medium (z.B. RPMI) aufgefüllt und gemischt.

Das Gemisch wird für 10min bei 1000rpm zentrifugiert, der Überstand durch neues Medium ersetzt und noch mal zentrifugiert. Dies sollte man mehrmals wiederholen, um Ficoll Reste zu entfernen. Zum Schluss werden die Zellen in eine 75 cm² Kulturflasche überführt und mit bis zu 40ml Medium mit 20% FCS versorgt. Um das Wachstum der Leukozyten anzuregen und zu fördern, werden pro 10ml Medium 100µl Phytohämagglutinin zugegeben und die Zellen etwa 72 h vertikal im Brutschrank inkubiert.

Um möglichst viele mitotische Zellen zu erhalten wird kurz vor der Fixierung Colcemid mit einer Konzentration von 80- 120 ng/ml zugegeben, ein Spindelgift, das die Zellen in den mitotischen Anfangsphasen anreichert. Die Inkubation im Brutschrank sollte nicht länger als 45 Min dauern, um eine zu starke Kondensation von Chromosomen zu verhindern.

Die Zellsuspension wird in ein 50ml Falcon überführt und für 10 Min bei 1000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird bis auf wenige ml verworfen und darin resuspendiert. Im Anschluss wird die Zellsuspension mit erwärmter, hypotoner KCl- Lösung (0,56%) tropfenweise auf 20ml aufgefüllt und für 15 Min bei 37C° inkubiert.

3.4.2. Adhärent wachsende Zellen

Die Zellen werden in 75cm² Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert.

Die Zellen werden mit Colcemid behandelt, wobei hier die Inkubation nicht länger als 30 Min dauern sollte. Anschließend werden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert, der Überstand bis auf 2- 3 ml verworfen, die Suspension in ein 50ml Falcon überführt und vorsichtig mit hypotoner KCl- Lösung aufgefüllt. Die Inkubation erfolgt für 20 Min bei 37C°.

Der weitere Verlauf gilt für beide Zelltypen:

1ml des -20C° kalten Fixativs (Methanol/Eisessig 3:1) vorsichtig zu der Suspension zugeben und vorsichtig mischen. Anschließend wird das Gemisch für 10 Min bei 1000rpm zentrifugiert, der Überstand bis auf wenige ml abgenommen und die Zellen resuspendiert.

Die Suspension wird mit eiskaltem Fixativ ganz vorsichtig auf 20 ml aufgefüllt und für mindestens 30Min bei -20C° inkubiert.

Nach der Zentrifugation wird der Überstand bis auf wenige ml abgenommen, die Zellen darin resuspendiert und in ein 15ml Falcon überführt. Die Suspension wird nun erneut mit eiskaltem Fixativ aufgefüllt, bei -20C° für 10Min inkubiert, zentrifugiert usw. Diese Waschschrte müssen bis zu 10x wiederholt werden, bis man eine saubere Zellsuspension erhält (evtl. probeweise auftropfen). Zum Schluss wird noch einmal zentrifugiert und das Pellet in 2- 3ml Fixativ gelöst, je nach gewünschter Verdünnung. In Fixativ gelöste Zellsuspensionen sind bei -20C° mehrere Jahre verwendbar.

3.4.3. Auftropfen von Metaphasepräparaten

Die Methode basiert auf den Methoden von Deng et al. (2003).

Im Wasserbad bei 55C° werden die gereinigten Objektträger erwärmt und einige Sekunden äquilibriert. Mit einer Plastikpasteurpipette wird vorsichtig etwas Flüssigkeit der gekühlten Suspension aufgenommen und pro Objektträger 2 kleine Tropfen aufgetropft. Der Deckel wird dann sofort geschlossen, bis die Flüssigkeit verdampft ist.

Am Mikroskop kann noch mal überprüft werden, ob die Spreitung der mitotischen Zellen in Ordnung ist. Die betropften Objektträger werden über Nacht bei RT gelagert.

Eine schnelle Alterung von Objektträgern kann man auch mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe mit 70%, 90% und 100% erreichen. Die Inkubation erfolgt für jeweils 5min.

Je nach Sauberkeit der Präparate kann es nötig sein, die überschüssigen Peptidreste zu verdauen. Dafür wird 0,01M HCl mit 0.0002 % Pepsin versetzt und auf 37°C erwärmt. Die Inkubationszeit bei 37°C ist vom Zelltyp und der Menge an Zytoplasma abhängig und sollte unter dem Mikroskop überprüft werden.

Um Pepsinreste zu entfernen werden die Objektträger anschließend 3x5 min in PBS gewaschen. Anschließend werden sie in einem Wärmeschrank bei 60°C für 2- 3h gebacken. Nach der anschließenden Dehydrierung in aufsteigender, kalter Ethanolreihe (70%, 90% und 100%, je 5min) werden die Objektträger luftgetrocknet und bis zum Gebrauch in einer Box mit Silicagel- Kügelchen bei -20°C aufbewahrt.

3.5. BAC Sonden

Im Normalfall wird BAC- DNA in E.coli Kulturen geliefert. Um an die DNA zu gelangen und große Mengen davon herzustellen, ist es nötig, die Bakterien in Kultur wachsen zu lassen und dann die BAC- DNA zu extrahieren.

3.5.1. Kultivierung von E.coli und DNA Präparation

Zuerst wird ein LB Medium zur Aufzucht der Bakterien hergestellt. Dazu werden 10gr NaCl, 10gr Pepton und 5gr Hefeextrakt auf 1l bidestilliertes Wasser gegeben und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung mehrmals aufgeköcht. Für längere Haltbarkeit empfiehlt es sich, das Medium zu autoklavieren.

Da man nur einen Klon der angelieferten Bakterien erhalten will, müssen die E.coli vereinzelt werden. Hierzu werden sie auf Agarplatten ausgestrichen. Dafür wird 1,5gr Agar/100ml LB-Medium vermischt und wiederum in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich der Agar gelöst hat. Um das Wachsen andere Mikroorganismen auf den Platten auszuschließen und zu selektionieren, besitzen die gelieferten E.coli Kulturen eine Antibiotikumresistenz. Da die Antibiotika aber hitzeempfindlich sind, werden sie erst zugegeben, wenn das Agar-Mediumgemisch auf ca. 60 Grad abgekühlt ist. Die häufigsten Resistenzen sind Chloramphenicol und Kanamycin. In meinem Fall waren es immer Chloramphenicolresistenzen und die Endkonzentration ist 12,5µg/ml Medium. Pro Petrischälchen mit einem Durchmesser von 10cm werden 10ml LB- Medium verwendet. Das noch warme Medium wird vorsichtig in die Schalen eingefüllt und mit halbgeöffnetem

Deckel ca. 30min abgekühlt. Danach werden sie mit Parafilm verschlossen und umgedreht bis zum Gebrauch bei 4C° gelagert.

Mit einer sterilen Pipettenspitze wird in die E.coli Stechkulturen vorsichtig eingestochen und etwas Flüssigkeit aufgesaugt. Mit einem 3-Ösen-Aufstrich wird die Flüssigkeit auf den Agarplatten verteilt, um einzelne Kolonien zu erhalten. Die Bebrütung der Platte erfolgt bei 37C° und 5%CO₂ über Nacht.

Am nächsten Tag wird eine einzelne Kolonie mit einer sterilen Spitze entnommen und eine sogenannte Flüssigkultur angelegt. Da die BAC- DNA- Präparation mit einem speziellen Kit durchgeführt wurde, ist das Anlegen einer Vorkultur nicht mehr erforderlich. Dazu werden 7ml steriles LB-Medium mit dem benötigten Antibiotikum versetzt und in ein 15 ml Falcon abgefüllt. Mit einer sterilen Pipettenspitze oder einer Impföse wird vorsichtig eine Kolonie entnommen und das Medium im Falcon damit beimpft. Im Schüttler bei 37C° werden die Kulturen über Nacht bebrütet. Das erfolgreiche Wachsen ist durch eine deutliche Trübung des Mediums ersichtlich.

Falls etwas mit der Präparation der DNA nicht funktionieren sollte, ist es wichtig, sogenannte Glycerinstocks anzulegen, mit denen man schnell neue Kulturen des gleichen Klons anlegen kann. Dazu werden 300µl der Übernachtskultur zu einem 50% Glycerin- Wassergemisch gegeben und in Kryoröhrchen 1h auf Eis gelagert, um ein Durchdringen des Gefrierschutzmittels Glycerin in die Bakterien zu ermöglichen. Danach sind die Stocks bei -80C° für viele Jahre verwendbar.

Die Präparation der DNA erfolgt mit Hilfe eines Kits (*High Pure Plasmid Isolation Kit*, Roche). Eine sogenannte Mini- oder Midipräparation auf manuelle Art ist zwar ebenso möglich, aber auf Grund des wesentlich größeren Zeit- und Arbeitsaufwandes nur zu empfehlen, wenn sehr große Mengen an DNA benötigt werden. Der Zeitaufwand für die Präparation mit Kit beträgt ca. eine Stunde und besteht im Wesentlichen aus der Lyse der Bakterien, Ausfällen und Entledigen von Proteinen, RNA und bakterieller DNA und der Purifikation der Plasmid- DNA. Des Weiteren ist es eine sehr günstige und wenig Material verbrauchende Variante. Eine genaue Beschreibung der Abläufe findet sich im Handbuch des Kits oder unter <http://www.roche.com/index.htm>. Die Plasmid DNA wird zum Schluss mit Wasser aus der Säule eluiert und bei -20C° bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Mittels

Gelelektrophorese oder photometrischer Messung kann die Ausbeute an DNA bestimmt werden.

3.6. Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)

Die FISH Methode ist eine mittlerweile sehr etablierte und weit angewendete Methode, um bestimmte Sequenzen der DNA sichtbar zu machen bzw. deren Lokalisation zu bestimmen. Vor allem im diagnostischen Bereich z.B. in der Präimplantationsdiagnostik, Fruchtwasseruntersuchungen, Krebsklassifizierung usw. findet diese Methode Anwendung. Das Prinzip beruht auf dem direkten Markieren mit Fluoreszenzfarbstoffen oder indirekter Markierung über Haptene von spezifischen Sequenzen, die mit der Ziel- DNA hybridisiert und so sichtbar gemacht werden. Möglich ist dies auf 2D Metaphasepräparaten, fixierten Zellen, Embryonen oder Geweben. Im Wesentlichen besteht diese Methode aus der Vorbereitung der Sonden, Vorbereiten der DNA oder Zellpräparate und der Hybridisierung und dem Nachweis der Sonden auf den Präparaten. Eine genaue Beschreibung der Methode findet sich in Cremer et al. (2008).

3.6.1. Vorbereitung der Sonden

Da für FISH- Experimente viel an DNA benötigt wird, ist es nötig, sie zu amplifizieren. Dies geschieht über zwei verschiedene Methoden, die im Folgenden erklärt werden.

3.6.1.1. Amplifikation von DNA- Sonden mittels DOP- PCR

Die Amplifikation von DNA- Sonden erfolgt mit Hilfe von sogenannten *Degenerate Oligonucleotide Primern* (DOP) (Telenius et al., 1992). Diese sind an einigen Stellen degeneriert und enthalten im mittleren Bereich eine zufällige Nukleotidabfolge. Sie gelten als universell, d.h. dass sie theoretisch jede beliebige DNA- Sequenz binden und in einer PCR Reaktion amplifizieren können. Der in dieser Arbeit verwendete Primer heißt 6MW (Biotech GmbH) und seine Sequenz lautet 5`-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G – 3`. Durch die degenerierten Nukleotide in der Mitte der Sequenz ergibt sich statistisch gesehen eine Bindung alle 1kb, was zu einer für FISH geeigneten Fragmentlänge von 500bp-1kb führt.

Für geringe Mengen primärer Ausgangs- DNA wird eine Primäre DOP- PCR durchgeführt, für bereits amplifizierte DNA eine Sekundäre DOP- PCR. Um keine ungewünschten Sequenzen zu amplifizieren, sollten bei allen Arbeiten Handschuhe getragen sowie sterile Röhren und sterile, gestopfte Pipettenspitzen benützt werden.

Die verwendeten Reagenzien setzen sich wie folgt zusammen:

	Endkonzentration	Volumen
Puffer D 5x	1x	10 µl
6MW-Primer (17-20µM)	1.7 µM	5 µl
Detergent W1 (1%)	0.1%	5 µl
dNTP- Mix (5mM)	200 µM	2 µl
DNA	200 µM	1 µl
H₂O		26,5 µl
Taq- Polymerase	2,5U	0,5 µl
		Σ = 50 µl

Aus wirtschaftlichen Gründen empfiehlt es sich jedoch, einen Mastermix für mehrere Reaktionen anzusetzen. Dabei werden die Volumina der ersten vier Komponenten und von Wasser verzehn- oder zwanzigfach. Die DNA und die Taq- Polymerase werden jedoch erst kurz vor der Reaktion zugegeben. In diesem Fall kommen zu 48,5µl vom Mastermix noch 1µl der DNA und 0,5µl von der Taq-Polymerase.

Die Zyklenfolge an der PCR Maschine setzt sich folgendermaßen zusammen:

		Primäre DOP-PCR (8+35 Zyklen)		Sekundäre DOP-PCR (30-35 Zyklen)	
Anfangsdenaturierung		96°	3'00	94°	3'00
Niedrig- Stringenz Zyklen (x8)	Denaturierung	94°	1'00		
	Primeranlagerung	30°	1'30''		
	Extension	72°	2'00		
Hoch Stringenz Zyklen (x35)	Denaturierung	94°	1'00	94°	1'00
	Primeranlagerung	56°	1'00	56°	1'00
	Extension	72°	2'00	72°	2'00
Schlussextension		72°	5'00	72°	5'00
Gesamtdauer der Reaktionen		4h 15'		~ 3h	

3.6.1.2. Whole Genome Amplification (WGA)

Für BAC- Sonden, die mit einem Kit isoliert wurden, empfiehlt sich die Amplifikation mittels einer WGA (GenomiPhi Kit, GE Healthcare nach Dean et al. 2001). Dieses Kit arbeitet mit einer speziellen Phi29 Polymerase und amplifiziert isothermal selbst aus kleinsten Ausgangsmengen (genauere Informationen unter <http://www.gelifesciences.com>). Dabei binden Oligonukleotide an die zirkulären Ausgangssequenzen in einer sogenannten *rolling circle amplification*. Zufällige hexamerische Primer sorgen dann für eine exponentielle Amplifikation, indem sie auch an die neu synthetisierten Stränge binden. Die Genauigkeit der Phi29 Polymerase ist durch eine 3'-5' Exonuklease- Korrekturleseaktivität sehr hoch.

Wurden die Plasmide nicht mit dem Kit extrahiert, enthält die eluierte DNA noch viel genomische, bakterielle DNA. Deswegen muss diese DNA mit sogenannten DOP2- bzw. DOP3- Primern amplifiziert werden, die eine wesentlich bessere Bindung an menschliche als an bakterielle DNA erlauben und so hauptsächlich die Plasmide amplifizieren. Diese Methode wurde jedoch in dieser Arbeit nicht angewendet.

1µl der DNA werden mit 9µl sample buffer vermischt und in einer PCR Maschine für 3min bei 95C° denaturiert. Nach dem Runterkühlen auf 30C° werden noch 9µl reaction buffer und 1µl mit dem Enzymmix dazupipettiert. Nach kurzem Mischen läuft die Reaktion nun für ca. 2,5h in der PCR Maschine. Die Reaktion wird nach dieser Zeit bei 65C° thermisch gestoppt. Als Ergebnis erhält man in etwa 250ng/µl DNA.

3.6.2. Markieren von DNA Sonden

Je nach Ausgangsmaterial gibt es zwei Methoden für das Markieren der DNA: die sogenannte Label- DOP PCR und die Nicktranslation. Für Chromosomenpaints verwendet man in der Regel die Label DOP PCR, für BACs und Zentromersonden die Nicktranslation.

In beiden Fällen werden mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Haptenen gekoppelte dUTPs anstelle des Thymidin in die DNA eingebaut.

3.6.2.1. Label DOP PCR

Eine Label DOP PCR funktioniert ähnlich wie eine normale DOP PCR. Die DNA wird amplifiziert und die markierten Nukleotide in die Amplifikate eingebaut. Auch hier empfiehlt es sich, einen Mastermix herzustellen.

	Start- konzentration	Endkonzentration	Mastermix (10x) in μl	Mastermix (20x) in μl
Cetus II Puffer	10x	1x	50	100
MgCl₂	25mM	2mM	40	80
6MW Primer	20μM	2μM	50	100
AGC- Mix	2mM	100μM	25	50
T	1mM	80μM	40	80
Label- dUTPs (Bio,Dig,DNP)	1mM	20μM	10	20
H₂O			285	570
Σ			500	1000

Benützt man direkt markierte dUTPs (Cy3, FITC, TR, Cy5), wird die doppelte Menge davon eingesetzt. Für einen Reaktionsansatz gibt man zu 48,5 μ l vom Mastermix 1 μ l der mit DOP-PCR amplifizierten DNA und 0,5 μ l Taq- Polymerase. Für einen 100 μ l Ansatz wird die Menge jeweils verdoppelt. Die Reaktion läuft dann in einer PCR Maschine mit folgender Zyklusfolge:

		Label DOP-PCR	
Anfangsdenaturierung		94°	3'00
20 Zyklen	Denaturierung	94°	1'00
	Primeranlagerung	56°	1'00
	Extension	72°	0'30''
Schlussextension		72°	5'00
Dauer		1h 15'	

Durch die kurze Zykluszeit, vor allem die kurze Extensionszeit entstehen relativ kurze Fragmente (ca.500bp-1kb), was für Hybridisierungen ideal ist.

Nach Ende der Reaktion kann das Ergebnis in einer Gelelektrophorese überprüft werden. Dazu werden 2 μ l des Amplifikats mit 3 μ l eines zweifach konzentrierten Laufpuffers

vermischt und auf einem Agarosegel (1%) aufgetragen. Als Vergleich dient ein λ - Marker, der sowohl Auskunft gibt über den DNA- Gehalt als auch über die Fragmentlänge.

3.6.2.2. Nicktranslation (NT)

Die in dieser Arbeit verwendeten BAC- und Zentromersonden wurden allesamt durch eine Nicktranslation markiert. Das Prinzip besteht darin, dass die DNase I in der DNA Einzelstrangbrüche induziert und gleichzeitig die Polymerase I wieder versucht, den Fehler zu beheben und dabei die markierten dUTPs einbaut. Kommt es auf dem komplementären Strang auch zu einem Bruch, entstehen kurze Fragmente der amplifizierten Sequenzen von 200-1000bp, die sich in Zellkerne einschleusen und mit der DNA hybridisieren lassen und sich somit hervorragend für FISH- Experimente eignen.

In einem Ansatz von 50 μ l wird etwa 1 μ g Ausgangs- DNA markiert, d.h. es werden 4 μ l von der GenomiPhi eingesetzt. Da die Enzyme beide temperatursensitiv sind, wird der Reaktionsansatz auf Eis pipettiert. Von direkt markierten dUTPs nimmt man grundsätzlich die doppelte Menge.

DNA 1 μ g	10xNT Puffer	0.1M Mercaptoethanol	dNTP Mix 2mM	markierte dUTPs 1mM	H ₂ O	DNase 1:250	Pol I
X μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	1- 2 μ l	(32-X) μ l	1 μ l	1 μ l

Die Dauer der NT beträgt 90min bei 15C°. Zur Kontrolle der Fragmentlängen werden 5 μ l der Reaktion gegen den λ - Marker auf einem 1% Agarosegel aufgetragen. Das Gros der Fragmente sollte im Bereich von 200-500bp liegen. Ist dies nicht der Fall, empfiehlt sich ein Nachverdau. Dafür werden noch einmal 1- 2 μ l der DNase- Verdünnung dazupipettiert und für 20min bei RT gelagert (bei direkt markierten Sonden im Dunkeln!). Um die DNase zu inaktivieren, werden die Ansätze tiefgefroren oder ein StopMix zugegeben. Dieser enthält einen Farbstoff und EDTA, welches der DNase die zur Funktion nötigen zweiwertigen Ionen entzieht.

3.6.3. Fixieren von Zellen auf Deckgläsern für 3D FISH/ImmunoFISH

Die wesentlichen Abläufe sind in Cremer et al. (2008) aufgeführt.

Adhärenz wachsende Zellen werden wie oben beschrieben in Kultur gehalten. Unter der Sterilbank werden Deckgläser in Ethanol eingelegt und kurz abgeflammt, um sie zu

sterilisieren. Für 6-Well Platten benützt man 24x24mm Deckgläser. Danach werden sie zum Trocknen hochkant in die 6-Well Platten gestellt und anschließend vorsichtig mit einer sterilen Pinzette am Boden abgelegt.

In der Zwischenzeit werden die Zellen in den Kulturflaschen abtrypsiniert und mit Medium in Suspension genommen. Da die Zellen in kürzester Zeit wieder am Boden anheften, sollte rasch gearbeitet werden. Medium wird in die 6-Well Platten vorgelegt und je nach vorhandener und gewünschter Dichte Zellsuspension zugegeben.

Die Zellen werden dann auf den Deckgläsern für mindestens 24h weiterkultiviert, besser aber erst nach zwei Tagen fixiert. Da für die meisten Zellen eine Zellteilungsaktivität ca. alle 24h zu erwarten ist und die Präparate auch nicht zu dicht sein sollten (ideal sind 60- 70% Konfluenz), muss dieser Faktor bei der Aussaat der Zellen eingerechnet werden.

Nach gewünschter Kultivierungszeit auf Deckgläsern wird das Medium abgenommen, 2-3x mit PBS (ohne Natriumazid) gespült und dann für 10 min bei RT mit einer frisch angesetzten Paraformaldehydlösung (PFA, 4% in PBS, pH7) fixiert. Kurz vor Schluss werden einige Tropfen 0,5% Triton X-100 zugegeben, um ein schnelles Austrocknen der Präparate zu verhindern. Anschließend wird die Fixierlösung 3x3min mit 0.01% Triton X-100 in PBS ausgewaschen.

Um die Zellmembranen zu permeabilisieren und so für die Sonden zugänglich zu machen, werden die Zellen mit 0,5% Triton X-100 für mindestens 5min inkubiert. Bei einigen Tumor-Zelllinien kann die Permeabilisierung auch bis zu 15min nötig sein. Hinterher werden die Zellen in 20% Glycerol für mindestens 1h gelagert, um eine vollständiges Durchdringen mit dem Gefrierschutzmittel zu gewährleisten.

Nach dieser Zeit werden die Deckgläser in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, langsam bei RT aufgetaut, kurz in Glycerol gelegt und wieder tiefgefroren. Die geschieht je nach Zelltyp zwischen fünf und siebenmal und soll das Zytoplasma mechanisch aufbrechen. Dann werden die Zellen wieder 3x3min in PBS mit 0,01% Triton X-100 gewaschen.

Um Proteine zu denaturieren und die DNA damit zugänglicher für Sonden zu machen, werden die Deckgläser nun für 5min in 0,1% HCl inkubiert. Zu lange Inkubationszeiten zerstören jedoch die Kernstruktur.

Bei Bedarf geht man nach der HCl Behandlung sofort zur Pepsinierung der Zellen über. Dabei werden Teile des Zytoplasmas wegverdaut, was den Sondenzugang in den Kern und die Hybridisierung erleichtert. Einige maligne Zelllinien wie DLD-1, HeLa oder auch MCF 7-Zellen benötigen unbedingt diesen Schritt. Die Pepsinierung ist aber sehr heikel. Zu lange Inkubation in der Pepsinlösung (0,002% Pepsin in 0,01% HCl bei 37°C) führt zu einem Ablösen der Zellen, zu kurze Inkubation hat keinen Effekt. Ein Aussäen von Zellen auf Deckgläsern, die mit Poly- L- Lysin beschichtet sind, erhöht die Bindekraft der Zellen auf Glas. Auf jeden Fall sollte die Inkubation unter Beobachtung am Mikroskop erfolgen und beim ersten Anzeichen eines Ablösens der Zellen die Pepsinlösung 2x5min mit PBS ausgewaschen werden. Alternativ wird das Pepsin mit MgCl₂ inaktiviert. Danach werden die Zellen mit einer 1% PFA in PBS- Lösung für 10min nachfixiert und dann 3x5min mit PBS gewaschen.

Nach dem Umpuffern und kurzer Inkubation in 2xSSC Puffer werden die Zellen in einer Lösung aus 2xSSC und 50% Formamid bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt. Für ein besseres Hybridisierungsergebnis empfiehlt es sich, die Zellen etwas altern zu lassen und einige Tage mit der Hybridisierung zu warten.

3.6.4. Vorbereiten des Hybridisierungsmix (HM)

Für eine FISH werden je nach Experiment etwa 20-30ng/μl HM (2D FISH) bzw. 40-60ng/μl HM (3D FISH) an markierter DNA eingesetzt. Je nach Größe des Deckglases, Dichte der Zellen, Verwendung von direkten oder indirekten Sonden usw. kann die Menge aber variieren. Um eine bessere Signalausbeute und hochspezifische Signale zu bekommen, wird Cot1- DNA zugegeben, die schneller als die Sonden an hochrepetitive Sequenzen wie SINES oder LINEs bindet und sie so vor unspezifischer Bindung abschirmt.

Die markierte DNA wird zusammen mit der 2- 3fachen Menge an Cot-1 DNA und 2μl *Salmon Sperm*, das als Trägerstoff fungiert und die DNA Menge erhöht, in ein Eppendorfgefäß pipettiert und mit der 2,5fachen Menge des Gesamtvolumens an eiskaltem, 100% technischen Alkohol gefällt. Der Fällprozess wird fortgesetzt für 1h bei -80°C. Danach wird das Gemisch bei 4°C für 20min bei 13000rpm abzentrifugiert. Dabei sammelt sich die ausgefällte DNA in einem Pellet. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge für einige Minuten getrocknet. Die DNA wird mit einer Mischung aus Formamid (FA) und Hybridisierungsmastermix (HMM; 2xSSC; Dextransulfat) bei 38°C

wieder in Lösung gebracht. Das Formamid sorgt für ein schnelleres Aufschmelzen der DNA-Stränge bei niedrigeren Temperaturen, was für die Strukturhaltung der Zellen wichtig ist. Das Mischungsverhältnis FA: HMM beträgt 50:50 bei Chromosomenpaints und 75:25 bei Zentromersonden. Für eine 2D FISH werden etwa 2-3µl an HM eingesetzt, für die 3D-FISH je nach Größe des Deckglases 4-7µl HM.

3.6.5. Denaturierung und Hybridisierung

Bei einer 2D FISH wird der HM direkt auf das Zellareal pipettiert, vorsichtig ein Deckglas daraufgelegt und mit Fixogum abgedichtet. Bei einer 3D FISH wird der HM mittig auf einen sauberen Objektträger pipettiert und das Deckglas mit der Zellseite nach unten auf dem Tropfen HM abgelegt, so dass keine Luftblasen entstehen. Um die Zellen mechanisch nicht zu beschädigen, muss hier besonders vorsichtig gearbeitet werden. Auch hier wird das Deckglas zum Schutz gegen Austrocknung mit Fixogum abgedichtet. Nach ca. 15- 20min ist der Klebstoff getrocknet und die Denaturierung erfolgt für 2min (2D FISH) bzw. zwischen 2,5 und 3min (3D FISH, je nach Zelltyp) bei 76C° auf dem Heizblock. Die Hybridisierung dauert über Nacht (2D) oder 2 Tage (3D) bei 37C° in einer trockenen Kammer im Wasserbad.

3.6.6. Stringenzwaschungen und Detektion der Sonden

Um unspezifische Bindungen zwischen Sonden und Zielsequenz zu lösen, werden Stringenzwaschungen durchgeführt, die das durch unterschiedliche Salzkonzentrationen und Temperaturen bewirken.

Bei einer 2D FISH wird nach der Hybridisierung das Deckglas entfernt und die Waschungen finden in einer Küvette statt. Bei einer 3D FISH wird vorsichtig das Fixogum mit einer Pinzette entfernt und das Deckglas mit der Zellseite nach oben in eine 6-well Platte gelegt. Die erste Waschung erfolgt in 2xSSC bei 37C° für 3x10min. Anschließend wird der Puffer gegen 0,1xSSC ausgetauscht und bei 45-60C° (je nach Sondentyp) für 10min inkubiert.

Der weitere Verlauf ist vom Experimenttyp abhängig. Hat man nur direkt markierte Sonden verwendet, kann nun die Gegenfärbung mit DAPI erfolgen (2µg/µl in 4xSSC). Bei indirekt markierten Sonden ist ein Antikörpernachweis nötig. Um eine Bindung der Antikörper an unspezifische Bindestellen zu vermeiden, werden die fixierten Zellen kurz in 4xSSC bei 37C° äquilibriert und dann für 10min mit einer BSA-Lösung (4% in 4xSSC) bei 37C° inkubiert.

Der Antikörpernachweis kann nun über einen oder mehrere Schritte erfolgen. Mit Biotin markierte Sonden werden meist über einen Antikörper nachgewiesen, an den ein

Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, z.B. Streptavidin- FITC. Andere Haptene werden z.B. über Goat-anti-Digoxigenin und in einem zweiten Nachweis über Rabbit-anti-Goat-Cy3 detektiert. Die Inkubation mit der verdünnten Antikörperlösung (in 4%BSA/4xSSC) dauert 45min bei 37°C° in einer feuchten Kammer. Bei einem sequentiellen Nachweis ist zwischen den einzelnen Lagen ein Waschschriff mit 4xSSC 3x5min nötig, um nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen.

Nach Ende der Detektion wird mit DAPI das Chromatin gegengefärbt, die Zellen und Sonden mit einem Tropfen Vectashield gegen Austrocknen und Ausbleichen geschützt und das Deckglas vorsichtig mit Nagellack fixiert.

3.7. BrdU- Markierung und ImmunoFISH

BrdU ist ein Thymidinanalogon das während der DNA- Replikation von der DNA-Polymerase in die DNA eingebaut werden kann. Diese Methode ist geeignet, um Zellen während der S- Phase zu markieren.

Die S- Phase dauert ca. 9 Stunden und ist in 3-5 Phasen anhand unterschiedlicher Replikationsmuster deutlich zu unterscheiden (O'Keefe et al., 1992). Gibt man BrdU ins Medium, wird es in allen Zellen eingebaut, die sich gerade in der S-Phase befinden. BrdU kann später mit einem Antikörper nachgewiesen werden.

Eine Stunde, bevor man die Zellen fixiert, wird das Medium aus der 6-well Platte bis auf 1,5ml angenommen und 500µl FCS zugegeben. Von der BrdU Stocklösung (50mM) werden 5µl ins Medium gegeben, was einer Endkonzentration von 166µM entspricht. Die Zellen werden nun für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert und dann sofort fixiert. Je kürzer die Inkubationsdauer mit BrdU ist, desto schärfer sind die Grenzen zwischen den einzelnen Stadien der S-Phase erkennbar.

Die Fixierung und Detektion verlaufen wie oben beschrieben. Wird später eine FISH durchgeführt, muss man nach den Stringenzwaschungen auf das PBS-System umpuffern, da der Antikörper gegen BrdU im SSC- Puffer System nicht funktioniert. Der Nachweis erfolgte mit Rat-α-BrdU (1:100) und als sekundärer Antikörper Goat-α-Rat-Alexa488 (1:400).

Wird keine FISH durchgeführt, sondern nur eine Immunfärbung, ist ein Anverdau mit DNase nötig, um die Zugänglichkeit des Antikörpers zur DNA zu gewährleisten. In der vorliegenden Arbeit wurde ein gleichzeitiger Nachweis des Nukleolus mit einem Antikörper gegen B23, ein nukleoläres Protein, durchgeführt, da herausgefunden werden sollte, ob gewisse Zentromersonden eine Assoziation zum Nukleolus aufweisen. Die Zentromersonden waren größtenteils direkt markiert, einige mit Haptenen:

Zentromer #	Markierung	Nachweis
Zentromer 1, heterochromatischer, subzentromerischer Block	Texas Red(TR)	-
Zentromer 2 Subzentromerischer BAC Klon #13 ,	Dig	Rabbit- α -Dig (1:500) Goat- α -Rabbit TR (1:50)
Zentromer 3	TR	-
Zentromer 4	Bio	Streptavidin Cy3 (1:500)
Zentromer 7	Cy3	-
Zentromer 8	Cy3	-
Zentromer 12	Bio	Streptavidin Cy3 (1:500)
Zentromer 15	TR	-
Zentromer 17	Cy3	-
Zentromer 18	Cy3	-
Zentromer 20 Subzentromerischer BAC Klon #8	Dig	Rabbit- α -Dig (1:500) Goat- α -Rabbit TR (1:50)
Zentromer 13/21	TR	-
Zentromer 14/22	TR	-
Zentromer X	Cy3	-
Zentromer Y, heterochromatischer, subzentromerischer Block	Cy3	-
Panzentromer Sonde	Cy3	-

Tabelle 1: Verwendete Zentromersonden, Markierung und Nachweis

Da der Antikörper Goat- α -Rat-Alexa488 auch leicht an die Epitope von Mouse- α -B23 bindet, muss der Antikörpernachweis sequentiell in 4 Schritten nach folgendem Schema erfolgen:

1. Antikörper:	200µl 4% BSA/1xPBS 1µl 1M MgCl ₂ (nur ohne FISH) 2µl DNase (nur ohne FISH) Rat-α-BrdU (1:100)	45min
Waschen:	1xPBS	3 x 5min
2. Antikörper:	200µl 4% BSA/1xPBS + Goat-α-Rat-Alexa488 (1:400)	45min
Waschen:	1xPBS	3 x 5min
3. Antikörper:	200µl 4% BSA/1xPBS + Mouse-α-B23 (1:500)	45min
Waschen:	1xPBS	3 x 5min
4. Antikörper:	200µl 4% BSA/1xPBS + Goat-α-mouse-Cy5 (1:100)	45min
Waschen:	1xPBS	3 x 5min
Gegenfärbung:	200µl PBS +10µl DAPI	5min

3.8. Monitoring

Die Monitoring- Experimente wurden durchgeführt, um Schwesterklone zu identifizieren und die Tochterkerne miteinander zu vergleichen. Die Vorlage für die Art von Experimenten lieferten die Arbeiten von Köhler et al (in prep.). Darin prüft sie die Ähnlichkeiten der Chromatinanordnung von Schwesterklonen und stellt sie den Ähnlichkeiten von 4- und 8-Zell- Klonen und unverwandten Zellen gegenüber. Das Ziel meiner Versuche war, Ähnlichkeiten in der Positionierung der Chromosomen in Zweizellklonen herauszufinden. Diese Ähnlichkeit soll in Relation gesetzt werden zur Richtung, in der die Zellen während der Dekondensationsphase in der frühen G₁ elongieren und dem Winkel, den die längsten Achsen durch die Tochterkerne dabei zueinander bilden.

In diesem Experiment wurden die positionellen Ähnlichkeiten von Klonen in den Zelllinien HeLa Gold, DLD-1 und HMEC untersucht. Dazu werden die Zellen stark verdünnt und vereinzelt auf Deckgläsern mit einem Raster bestehend aus Buchstaben und Zahlen ausgesät, so dass man die Positionen der Zellen wiederfinden kann. Die Zellen werden zum ersten Mal nach dem Absetzen und Festwachsen auf den Deckgläsern (ca. 5h) und dann im 24h Rhythmus unter dem Phasenkontrastmikroskop aufgesucht und das Wachsen mit einer Digitalkamera festgehalten. Nach 2 Tagen wurden die Zellen fixiert, wie oben beschrieben, und eine FISH mit verschiedenen Paints durchgeführt. Die verwendeten Sonden für DLD-1

und HMEC Zellen sind unten aufgeführt. Für HeLa Gold wurden aufgrund des veränderten Karyotyps Chromosomen ausgewählt, die keine Translokationen aufwiesen und eine überschaubare Anzahl an Kopien im Genom haben (siehe Karyogramm HeLa Gold Abb. 4).

Zelllinie	HSA	HSA	HSA	HSA
HMEC	#1 Bio Cy5; Streptavidin Cy5 (1:200)	#7 FITC	#8 Cy3	#17 TR
DLD-1	#1 Bio Cy5; Streptavidin Cy5 (1:200)	#7 FITC	#8 Cy3	#17 TR
HeLa Gold	#4 Bio Cy5; Streptavidin Cy5 (1:200)	#7 FITC	#13 Cy3 2x/3x	#21q TR

Nach der FISH- Detektion wurde anhand der Phasenkontrastbilder ausgewählt, wo sich mögliche Tochterklone befinden. In diesem Fall wurde nur nach Tochterzellen gesucht, also Zellen die sich nur einmal geteilt haben (siehe Abb. 8 Tag 2, blauer und grüner Kreis). In vielen Fällen wurden mögliche Klone durch die Fixierungsschritte und vor Allem durch die Pepsinierung (bei DLD-1 und HeLa Gold) vom Deckglas gelöst. Waren die Klone jedoch an der Position vorhanden, die auf den Fotos angezeigt war, kamen sie in die engere Auswahl. Weitere Indikatoren für Schwesterklone sind räumliche Nähe und ein eventuell noch nicht vollständig getrenntes Zytoplasma. Dadurch dass die Zellen sehr dünn ausgesät wurden, waren Verwechslungen aber kaum möglich. Haben zwei benachbarte Kerne alle Voraussetzungen erfüllt, wurden sie am Konfokalmikroskop gescannt.

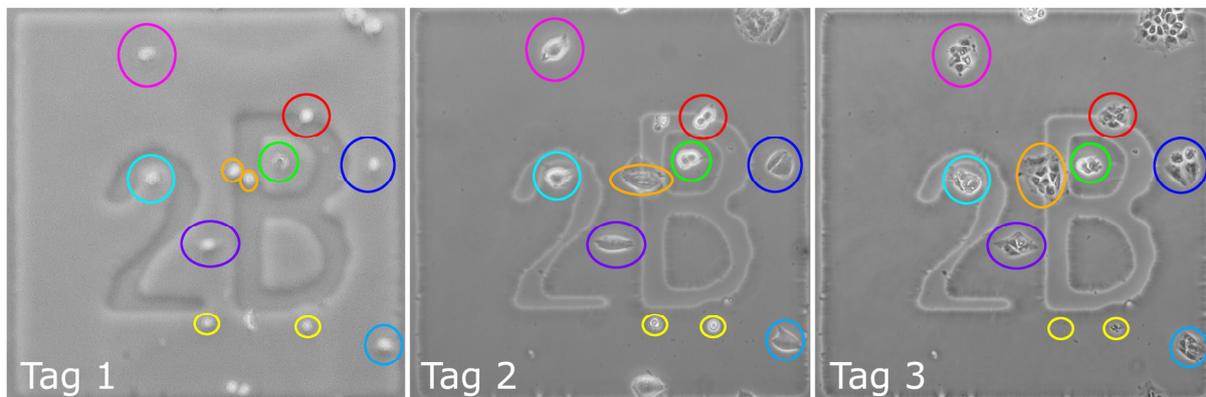


Abb. 8: Monitoring von DLD1- Zellen über 3 Tage.

Monitoring- Experiment von DLD-1 Zellen über drei Tage: Die jeweiligen Klone sind mit farbigen Kreisen markiert. Beispielsweise sieht man im dunkelblauen Kreis den Weg von einer Zelle zum vierzelligen Klon. Im roten Kreis in der Mitte ist gerade eine Mitose zu sehen. Für das eigentliche Experiment wurden die Zellen nach 2 Tagen fixiert, um größtenteils Schwesterklone zu erhalten.

Die Kerne wurden nach dem Scannen für die Auswertung mit den Image J Plugins Gauß-Filter und Stack Normalizer bearbeitet. Für die Paints wurde ein Schwellwert festgelegt und sie damit segmentiert. Mit dem Plugin 3D- Object Counter wurden anschließend die IGCs (*Intensity Gravity Center*) für alle Paints beider Tochterkerne berechnet. In vielen Fällen lagen beide Paints eines Chromosoms nahe beieinander oder überlagerten sich und mussten im ganzen Stapel auseinandergeschnitten werden. Dazu wurden parallel die 3D-

Rekonstruktionen als Vorlage verwendet, um die Verlaufsgrenzen der CTs besser beurteilen zu können. Über Amira 2D- Measure wurden die längsten Achsen durch einen projizierten Kern ermittelt und mit 2D- Angle die Winkel zwischen den beiden Achsen und damit Kernen berechnet. Der größtmögliche Winkel ist dabei 90°.

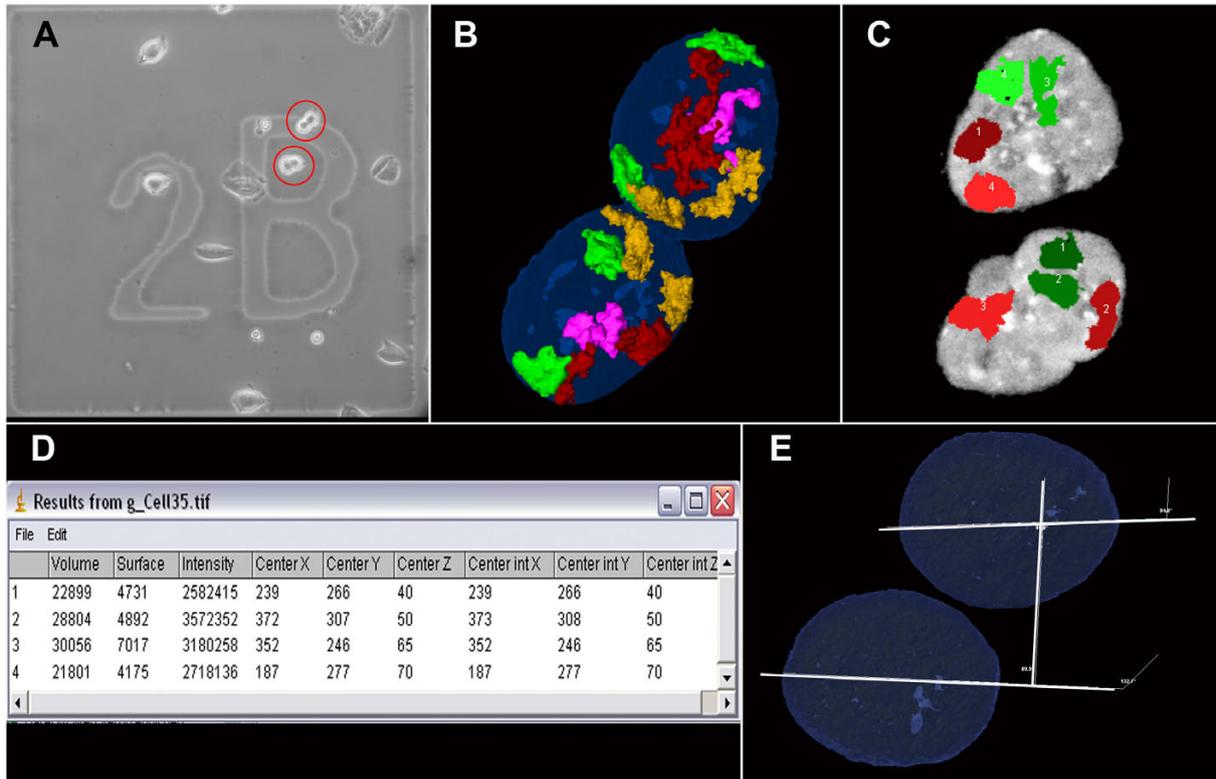


Abb. 9: Arbeitsweise Monitoring

In dieser Abbildung ist der Arbeitsablauf für die Monitoringexperimente abgebildet. (A) zeigt Phasenkontrastbilder von wachsenden Zellen auf einem gerasterten Deckglas. Die roten Kreise zeigen zwei mögliche Klone. In (B) sind 3D Rekonstruktionen von zwei konfokal gescannten Tochterzellen mit jeweils 4 Chromosomenpaints zu sehen. Für die Paints wurden Schwellwerte festgelegt und die Intensitätsschwerpunkte in x, y, z mit 3D Object Counter berechnet (C+D). Zum Schluss wurde noch der Winkel zwischen beiden Tochterkernen ermittelt, der sich durch die jeweils längste Achse ergibt (E).

Mit dem Programm *Nuclear Nightingale* (geschrieben von Boris Joffe) wurden die Unähnlichkeitswerte zwischen den Kernen ermittelt. Dieses Programm benutzt die intensitätsbasierten geometrischen Zentren der segmentierten CTs als Orientierungspunkte und vergleicht sie mit den geometrischen Zentren der CTs eines anderen Kernes. Dabei werden die Kerne übereinander gelegt und solange rotiert und skaliert, bis sie zueinander passen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass aus allen berechneten Distanzen und Winkeln zwischen den Punkten nur ein Wert ausgegeben wird, der auch mit anderen Paaren vergleichbar ist. Dieser Dissimilaritätswert wird als der sog. RMSE- Wert ausgegeben (*Root Mean Square Error*, eine Art Standardabweichung des Medians für diese Art der Berechnung) und gilt für ein Paar Tochterkerne (Köhler et al., in prep.).

Das Ganze beruht auf dem System der rigiden Registrierung, einer mathematischen Methode zur dreidimensionalen Bildgebung, wie sie beispielsweise in Computertomographen oder bei der Strahlentherapie eingesetzt werden.

Die berechneten RMSE- Werte des Programms wurden normalisiert, um das Gewicht von Ausreißern der Streuung zu mindern. Dafür wurde für jeden Zelltyp der Median aus allen RMSE- Werten gebildet (Sigma Stat., *Descriptive Statistics*). Danach subtrahiert man den errechneten Median von den Einzelwerten und teilt durch den Interquartilsabstand. Dies ist der Abstand zwischen dem oberen (75%) und dem unteren (25%) Quartil. Da beide Quartile nicht von Ausreißern beeinflusst werden können, ist der Interquartilsabstand ein äußerst robustes Streuungsmaß. Er zeigt an, in welchem Wertebereich die 50% der Werte liegen, die sich zu gleichen Teilen um den Median als Zentrum der Verteilung anordnen.

Nach der Normalisierung wurden die einzelnen Werte gegen den entsprechenden Winkel zwischen den Töchtern aufgetragen.

3.9. Seneszenzassoziierter β - Galaktosidase Test (SA- β - Gal- Test)

Der β - Gal- Test ist ein normalerweise in der Mikrobiologie verwendeter Ansatz, um die Einschleusung des Reportergens lacZ, dessen Produkt die β - Galaktosidase ist, nachzuweisen. Durch die Hydrolyse von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) und Umwandlung in einen stabilen, blauen Indigofarbstoff wird die erfolgreiche Transformation angezeigt. Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung als Marker für replikative Seneszenz (Dimri et al., 1995). Replikative Seneszenz ist eine Form der Alterung bei Zellen, in der nach einer gewissen Anzahl an Populationsverdopplungen eine fehlerfreie DNA- Replikation und in der Folge Zellteilung nicht mehr möglich ist. Üblicherweise ist eine Färbung und damit der Nachweis der β - Galaktosidase nur bei pH4 möglich, wo lysosomale β - Galaktosidase freigesetzt wird. Der SA- β - Gal- Test gibt jedoch die Möglichkeit, bei pH6 eine Anhäufung des Enzyms anzuzeigen, die durch replikative Seneszenz induziert wird. Dieser Test ist spezifisch und unterscheidet auch zwischen seneszenten und quieszenten Zellen. Die replikative Seneszenz lässt sich ganz leicht durch Inkubation von kultivierten Zellen mit 50 μ M/ml Medium BrdU über einen Zeitraum von 4- 6 Tagen erreichen. Das Protokoll basiert auf den Vorlagen von Bandyopadhyay et al. (2005) und Dimri et al. (1995).

Durchführung:

Außer für X- Gal werden von allen Lösungen Stocklösungen angelegt:

Citrat 40mM/Natriumphosphatpuffer pH6:
0,1M Citrat: 2,1 g Citratmonohydrat auf 100ml ddH ₂ O;
0,2 M Natriumphosphatlösung: 2,84 g Na ₂ HPO ₄ 100ml ddH ₂ O;
36,85ml der 0,1 M Citratlösung werden mit 63,15ml der 0,2M Natriumphosphatlösung gemischt bei pH6. Die Lagerung erfolgt bei RT im Dunkeln.
Fixierlösung:
40ml 1×PBS + 0,8g PFA (=2%) + 1ml Glutaraldehyd (=0,2%); werden vor jeder Fixierung frisch angesetzt.
Kaliumhexacyanidoferrat (II) 100mM
3,68g/100ml ddH ₂ O
Kaliumhexacyanidoferrat (III) 100mM
3,294g/100ml ddH ₂ O
NaCl 5M
29,22g/100ml ddH ₂ O
MgCl ₂ 1M
9,521g/100ml ddH ₂ O

Die SA- β- Gal Färbelösung enthält bei einem Endvolumen von 20ml als Endkonzentration:

40mM Citrat/Natriumphosphatpuffer, pH 6.0 (4ml)
1mg/ml X- Gal in Dimethylformamid (DMF) (1ml)
5mM Kaliumhexacyanidoferrat (II) (1ml)
5mM Kaliumhexacyanidoferrat (III) (1ml)
150mM NaCl (0,6ml)
2mM MgCl ₂ (40µl)
auf 20ml mit ddH ₂ O auffüllen

Diese Lösung wird für jede Färbung frisch angesetzt. Als Kontrolle für die Funktion des X- Gal wird ein zweiter Ansatz angesetzt und mit ein paar Tropfen 0,1M HCl auf einen pH Wert von 4 gebracht.

Die Zellen werden 24h vor der Färbung auf Deckgläsern mit einer Konfluenz von ca. 50% ausgesät. Vor der Fixierung mit einer frisch angesetzten Lösung wird das Medium abgenommen und die Deckgläser mit 1xPBS gewaschen. Die Fixierlösung inkubiert für 5min bei RT.

Nach dem Fixieren werden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen. Auf ein Stück Parafilm wird ein Tropfen der Färbelösung pipettiert (jeweils für pH4 und pH6). Die Deckgläser werden mit der Zellseite nach unten auf den Tropfen abgelegt und bei 37C° im

Wasserbad inkubiert. Auf keinen Fall sollte die Inkubation in einem CO₂ Brutschrank erfolgen, da dies den pH ins Saure verändert.

Nach 2- 4h Färbung sind erste Ergebnisse zu erwarten. Maximale Färbung ist nach ca. 16h erreicht. Längere Inkubation führt jedoch zu falsch positiven Ergebnissen.

Die Färbelösung wird nach dieser Zeit mit PBS abgewaschen und die Anzahl der seneszenten Zellen unter einem Lichtmikroskop ermittelt.

3.10. Stimulierung von Zellen mit Östrogen

Um eventuelle Chromatinrepositionierungen zu überprüfen (siehe Einleitung), wurden Stimulationsexperimente von Zellen mit Östrogen durchgeführt. Östrogen bindet an den Östrogenrezeptor und stimuliert über eine Kaskade die Expression spezifischer Gene. In diesem Fall wurde die Position der Gene GREB1 auf HSA2 und TFF1 auf HSA21 untersucht. Dazu wurden FISH- Experimente, eine RealTime qPCR und Lebendzellversuche durchgeführt.

MCF 7- Zellen werden in normalem DMEM mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert und vor der Fixierung für mindestens 4 Tage auf DMEM ohne Phenolrot mit kohlegefiltertem, hormonfreiem FCS weiterkultiviert. Mindestens zwei Tage vorher werden die Zellen auf Deckgläsern, die mit Poly- L- Lysin beschichtet sind, ausgesät. Am Tag der Fixierung werden die Zellen mit 2,5nM/ml Medium α - Amanitin für 2h behandelt, um die Transkription zu stoppen. Danach werden sie zweimal mit PBS gewaschen und für 2h in hormonfreiem Medium inkubiert. Dann werden die Zellen für 1h mit 100nM/ml Medium β - Estradiol behandelt. Nach diesen Stimulationsschritten werden sie fixiert für die 3D FISH Experimente inklusive vorsichtiger Pepsinierung für etwa 2min.

α - Amanitin: 919g/Mol; Stocklösung: 2 μ g/ml = 2,17 μ M/ml; Für ein ml Medium benötigt man 1,15 μ l von der Stocklösung.

β - Estradiol: 272,4g/Mol; 50mg wurden in 1ml Ethanol 100% gelöst = 184mM/ml bzw. 184 μ M/ μ l. 0,55 μ l werden pro ml Medium eingesetzt.

3.10.1. Extraktion von Gesamt- RNA

Vor der Isolierung der Gesamt- RNA werden die Zellen in einer T75 Flasche bis zu hoher Konfluenz kultiviert und wie oben beschrieben erst mit α - Amanitin und dann mit β - Estradiol

behandelt. Die RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen#74104) extrahiert. Dabei werden die Zellen abtrypsiniert, zentrifugiert und das Pellet lysiert. Nach Waschschritten wird das Lysat auf Säulen aufgetragen, die spezifisch RNA binden. Zum Schluss wird die RNA mit DEPC –Wasser (DEPC= Diethylpyrocarbonat, inaktiviert RNasen) eluiert und man erhält reine RNA. Wichtig ist ein sauberes und steriles Arbeiten, um einen Verdau von RNA durch RNasen zu vermeiden.

Der Gehalt an RNA wird in einem Photometer überprüft. Ideal ist ein Wert von etwa 1µg/µl.

Die Integrität der RNA wird mit einem denaturierenden Formaldehyd- Gel überprüft.

Dazu werden 0,6g Agarose in 43,5ml DEPC Wasser in der Mikrowelle gelöst und dann 5ml 10xMOPS Puffer und 2,5ml 37% Formaldehyd zugegeben. Das Gel wird gegossen und während es abkühlt wird der Laufpuffer (250ml 1xMOPS) vorbereitet.

1µg RNA wird eingesetzt und zusammen mit 1µl 10xMops, 1,7µl Formaldehyd, 5µl Formamid und 1µl Ethidiumbromid für 15min bei 65C° inkubiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wird 1µl konzentrierter Ladepuffer zugegeben, die RNA aufgetragen und das Gel bei 100V und 45mA insgesamt 1h laufengelassen. Nach 20 und 40min wird die Spannungsquelle kurz ausgeschaltet und der Laufpuffer noch mal durchgemischt.

3.10.2. Reverse Transkription

Um den Gehalt spezifischer Transkripte später in einer qPCR feststellen zu können, muss die RNA erst über eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Die reverse Transkription wurde mit dem High Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Dieses Kit enthält einen spezifischen Puffer, einen dNTP Mix und RT Random Primer, die an jeder beliebigen Sequenz binden können. Aus diesen Komponenten wird ein Mastermix hergestellt und 20U/µl RNAGuard RNase Inhibitor (GE Healthcare) hinzugefügt. Zum Schluss wird pro Ansatz 1µl Multiscribe Reverse Transkriptase hinzugefügt und für 10min bei 25C° und dann 2h bei 37C° inkubiert. Zum Schluss werden die Enzyme thermisch inaktiviert. So lassen sich bis zu 2µg RNA in cDNA umschreiben.

3.10.3. Genspezifische PCR

Um zu testen, ob die RT funktioniert hat, wird eine genspezifische PCR durchgeführt. Durch die Arbeit von Alexandra Kölbl waren im Labor die Primer für GAPDH vorhanden, ein

ubiquitäres Protein der Glykolyse. Für die PCR empfiehlt es sich, einen Mastermix anzusetzen:

	Konzentration	Menge	Endkonzentration
dNTPs	10mM	160µl	800µM
Pharmacia PCR Puffer	10x	200µl	1x
PCR Wasser		1340µl	

Für die Reaktion werden 42,5µl vom Mastermix mit jeweils 2,5µl des Forward und Reverse Primers (Endkonzentration jeweils 0,5µM) zusammen mit ca. 100ng cDNA gemischt. Als Kontrolle dient ein Ansatz mit Gesamt- RNA. Zum Schluss wird noch 0,5µl Taq- Polymerase zugegeben und die Reaktion in eine PCR Maschine mit folgender Zyklusfolge gestellt:

		Genspezifische PCR	
Anfangsdenaturierung		94°	3'00''
35 Zyklen	Denaturierung	94°	30''
	Primeranlagerung	61°	30''
	Extension	72°	45''
Schlussexension		72°	5'00

Nach dem Ende der PCR werden 3µl der Reaktion auf 1%iges Agarosegel aufgetragen. Wenn die RT funktioniert hat, erhält man als Ergebnis eine dicke Bande bei 337 bp, bei der Kontrolle sollte nichts zu sehen sein.

3.10.4. TaqMan Sonden

Die TaqMan Sonden für die Gene TFF1 und GREB1 wurden bei Applied Biosystems bestellt, dazu als interne Kontrolle die Sonde von β - Actin. Das Prinzip der TaqMan Sonden beruht auf einem Reporter 5' und einem sog. Quencher 3', die jeweils an den Enden eines Primerpaares liegen. Am Reporter hängt ein Fluoreszenzfarbstoff, der aber durch den Quencher an der Fluoreszenz gehindert wird. Binden die Primer an eine Zielsequenz, werden durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNA Polymerase während der Elongation die Sonden degradiert und die Fluoreszenz des Reporters freigesetzt (siehe Abb. 10). Die PCR Maschine registriert die Fluoreszenz der Zielsequenz über mehrere Zyklen und vergleicht sie mit einem Referenzwert. Auf diese Weise kann anhand der Gesamtfluoreszenz auf die Menge an cDNA in der Probe rückgeschlossen werden.

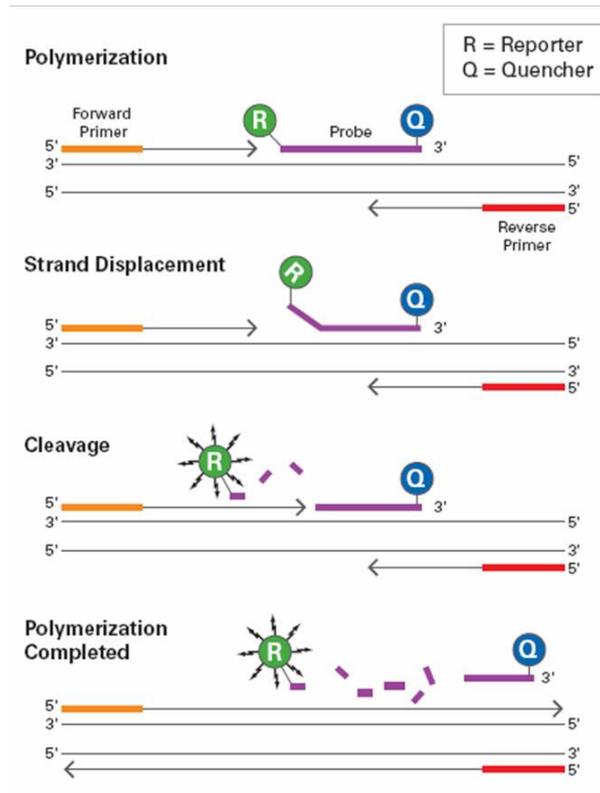


Abb. 10: TaqMan Sonden

Schema der Funktion von TaqMan Sonden (aus *TaqMan® Gene Expression Assay Protocols*, Applied Biosystems)

3.10.5. Validierung der Sonden und qPCR

Um zu sehen, ob die TaqMan Sonden funktionieren, wird ein qPCR Testlauf durchgeführt.

Dazu wird eine Verdünnungsreihe mit cDNA hergestellt in 10er Verdünnungsschritten von 100 ng- 10pg/µl. Um zuverlässige Werte zu bekommen, wird alles in Triplikaten angelegt. Die verdünnte DNA wird mit dem TaqMan Gene Expression Master Mix und 1µl der entsprechenden Sonde auf 20µl Endvolumen gebracht und in Triplikaten auf Fast- optical 96well Platten (Applied Biosystems) pipettiert. Nach Verschluss mit einer adhesiven Folie wird die Platte in einer Plattenzentrifuge für 5min zentrifugiert. Danach wird die PCR Maschine Abi Fast 7500 (Applied Biosystems) mit der Platte beladen und ein Programm für relative Quantifizierung gestartet. Die Maschine registriert die Reporterfluoreszenz und setzt sie in Relation zur Hintergrundfluoreszenz. Kommt die PCR in die logarithmische Phase, wird das Reportersignal signifikant höher als der Hintergrund. Dieser Zeitpunkt bzw. Zyklus wird registriert und als Ct- Wert (*threshold cycle*) bezeichnet. Je höher der cDNA Gehalt in der Probe, desto früher ist die Phase erreicht und umso kleiner ist der Ct- Wert. In der Validierung wird die Effizienz der Sonden gemessen, d.h. man bestimmt, für welche DNA-Menge die Reaktion gleichmäßig verläuft bzw. wie effizient die Sonden in diesem Bereich arbeiten. Nach dem Ende der Reaktion werden die Ct- Werte gegen den Logarithmus der DNA Menge aufgetragen und man erhält eine Validierungskurve nach folgender Formel:

$$y=mx+b$$

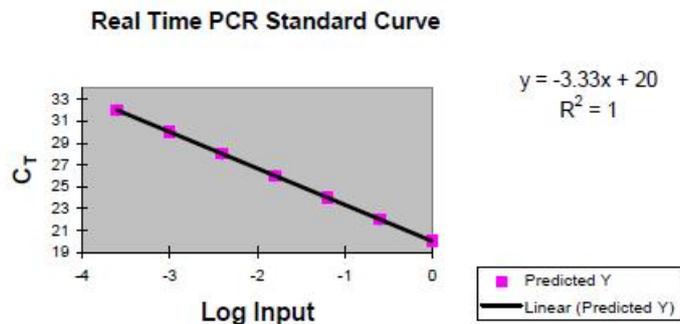


Abb. 11: qPCR Validierungskurve

(Quelle: Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR; Applied Biosystems)

Die Effizienz berechnet sich über die Steigung der Kurve: $E = (10^{-1/\text{Steigung}} - 1) \times 100$.

In diesem Beispiel ist der Kurvenverlauf linear und damit die Reaktion bei jeder Verdünnung gleich effizient, eine Steigung der Kurve von $-3,33x$ entspricht einer Effizienz von 100%. Normalerweise ist aber zumindest in den Außenbereichen bei 10pg bzw. 100ng die Effizienz der Sonden wesentlich geringer. Deswegen werden im Normalfall DNA Mengen im mittleren Bereich verwendet, in meinem Fall war die Messkonzentration bei 1ng cDNA.

3.10.6. RealTime qPCR

Die qPCR verläuft im Wesentlichen ähnlich wie die Validierung, nur dass jetzt mit einer festen DNA Menge gearbeitet wird. Auch hier wird alles in Triplikaten angelegt, in die 96well Platten pipettiert und die qPCR gestartet. Das Programm, mit dem man die PCR Maschine bedient, übernimmt einen Großteil der Evaluation. Für die erhaltenen Werte kann ein Referenzwert angegeben werden und man erhält den ΔCt Wert, d.h. die Expression der beiden Zielgene TFF1 und GREB1 wird mit der Expression des Haushaltsgens β - Actin verglichen und normalisiert. Des Weiteren wird der $\Delta\Delta Ct$ Wert berechnet, der die Expression der Zielgene in einem behandelten Zustand gegenüber einem Normalwert in unbehandeltem Zustand vergleicht und das Ganze in Relation setzt zur standardisierten Expression des Haushaltsgens. Der $\Delta\Delta Ct$ - Wert gibt also die n- fache Expression an, normalisiert auf eine endogene Kontrolle und relativ zu einer Kalibrierung. Der $\Delta\Delta Ct$ - Wert wird über die Evaluationssoftware des PCR- Gerätes errechnet und die n- fache Expression erhält man über $2^{-\Delta\Delta Ct}$.



Abb. 12: PCR- Zyklen qPCR

Screenshot der Fast System SDS Software: Auf der y-Achse ist R_n der normalisierte Wert des Reportersignals, eine Art Standardlinie, berechnet auf der Grundlage der Hintergrundfluoreszenz über die gesamte Laufzeit der PCR- Reaktion. Auf der x-Achse ist die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Man kann ablesen, bei welchem Zyklus die Amplifikation in die log-Phase eintritt und signifikant über den Wert der Hintergrundfluoreszenz (R_n) steigt. Der Schnittpunkt ergibt den Ct- Wert und ist abhängig von der Menge an Ausgangskopien (\sim cDNA- Gehalt).

3.11. (Transiente) Transfektion von Zellen für die Lebendzellmikroskopie

Die Zellen für die Lebendzellmikroskopie werden in speziellen Lebendzellkammern ausgesät, z.B. LabTek Kammern (Nunc), wobei sie nicht zu dicht wachsen sollten. In einem sterilen Eppendorf Gefäß wird pro ml Medium, in dem die Zellen wachsen, 100 μ l steriles Bideest oder Optimem (FCS- freies Spezialmedium für Transfektionen) vorgelegt. Dann werden 2 μ g von der Plasmid DNA dazupipettiert, bei Doppeltransfektionen jeweils 1 μ g. Danach lässt man die Lösung 5min stehen. Die Plasmid DNA wird in einem bestimmten Verhältnis, das von Zelltyp zu Zelltyp spezifisch ist, mit dem Transfektionsmittel gemischt (Fugene HD, Roche). Z.B. bei den MCF 7- Zellen wurde ein Verhältnis von 1:5 gewählt, d.h. man gibt vorsichtig 10 μ l Fugene HD zu der Lösung, ohne den Rand des Gefäßes zu berühren. Nach 25min Inkubation wird das Gemisch vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Dieses Transfektionsmittel beruht auf dem Prinzip der Lipofektion, d.h. die fetthaltigen Bestandteile bilden Mizellen und schließen die DNA in ihrem Inneren ein. Die Mizellen fusionieren bei Kontakt mit der

Zellmembran und geben die DNA ins Innere der Zellen ab. Wenn sich nach der Mitose die Kernmembran neu bildet, befindet sich Plasmid DNA im Kern und kann transkribiert und prozessiert werden.

Ideale Transfektionsergebnisse ergeben sich 1- 2 Tage nach der Transfektion, nach einem Tag sollte aber das Medium gewechselt werden, da die Lipofektionsmittel leicht toxisch wirken können.

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für die Transfektion waren:

paGFP- H4: mit einem CMV Promotor und einem Selektionsmarker für G418 (von Roeland W. Dirks, Universität Leiden und Jeroen Essers, Rotterdam)

mRFP- H2B: SV40 Promotor (von Ruth Brack- Werner, Helmholtz Zentrum München)

mRFP- PCNA: CMV- Promotor (von Heinrich Leonhardt, Biozentrum LMU)

mRFP- CENPB (von Ruth Brack- Werner, Helmholtz Zentrum München)

GFP- ER: Östrogenrezeptor (von Josef Mautner, Helmholtz Zentrum München)

Genaue Plasmidkarten der Konstrukte finden sich in der Doktorarbeit von Hilmar Strickfaden (2010, Appendix F)

Für stabile Zelllinien werden die Zellen einige Tage nach der Transfektion unter ein Fluoreszenzmikroskop gelegt und die Klone, die das Plasmid tragen und eine dementsprechende fluoreszente Färbung aufweisen, auf der Unterseite des Kulturgefäßes markiert. Die Zellen werden vorsichtig antrypsiniert, die markierten Klone gepickt und in Medium mit G418 oder einem anderen vektorspezifischen Selektionsmarker überführt. Da vor allem die Plasmide mit einem CMV Promotor über den Verlauf von einigen Wochen methyliert und stillgelegt werden (Grassi et al., 2003), empfiehlt es sich, regelmäßig ein FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) durchzuführen. Danach hat man im Idealfall eine homogen fluoreszierende stabile Zelllinie.

3.12. Evaluationsprogramme

3.12.1. 3D RRD

3D RRD (3D **R**elative **R**adial **D**istribution) wurde entwickelt von Johann von Hase am Kirchhoff Institut für Physik in Heidelberg. Dieses Programm wurde zur dreidimensionalen Auswertung von Objekten im Zellkern entwickelt, z.B. CTs in Relation zum nukleären Zentrum. Ideal funktioniert das Programm jedoch nur für Kreise bzw. Kugeln. Dazu wird ein Kern in 25 konzentrische Kreise oder Ringe eingeteilt und die Verteilung aller Voxel eines

beliebigen Signals schwelwertabhängig berechnet im Verhältnis zum Radius des Kerns. Auf diese Weise ergibt sich eine prozentuale Signalverteilung von 0% für das Zentrum des Kerns und 100% für die Kernhülle. Eine genaue Beschreibung des Programms findet man in der Doktorarbeit von Kathrin Küpper (2007).

In dieser Arbeit wurde die Auswertung mit diesem Programm auf eine 2D Auswertung beschränkt, da die Interphasezellen sehr flach waren und alle CTs teilweise mit der Kernhülle assoziiert waren. Auch Kerne in der Metaphase, die horizontal in x,z angeordnet und sehr flach sind, wurden auf diese Weise ausgewertet. Mit Amira wurden die Kerne rekonstruiert, Schwellwerte gesetzt und von den Kernen und den CTs Projektionen erstellt. Über Image J wurden störende Hintergrundsignale weggeschnitten und alle Signale auf den Grauwert von 255 gesetzt. Diese Bilder dienen als Berechnungsgrundlage für das Programm 3D RRD. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die zweidimensionale Art der Auswertung mit 3D RRD als 2D RRD bezeichnet.

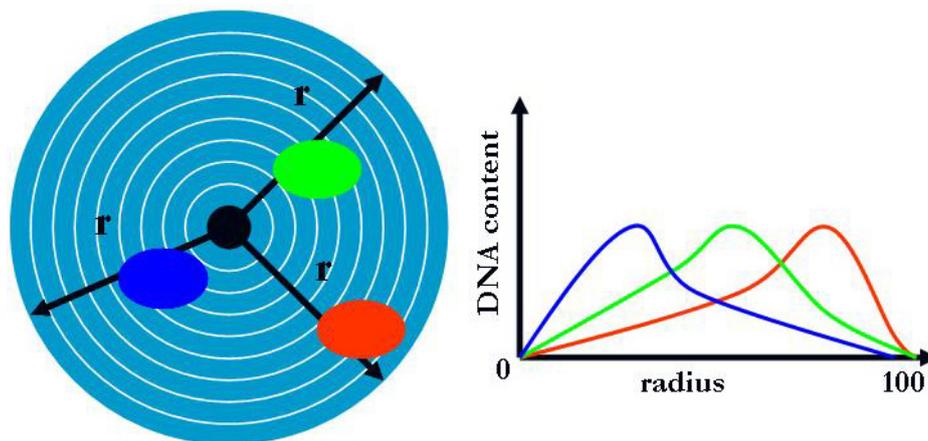


Abb. 13: Funktionsweise von 2D RRD:

Der linke Kreis stellt einen Zellkern mit CTs verschiedener Farbe dar. Das Programm zieht konzentrische Kreise und berechnet die Voxel- oder Pixelverteilung der CTs in Abhängigkeit vom Radius. Die Ergebnisse werden dann wie im Beispiel rechts aufgetragen.

3.12.2. eADS

ADS (*Absolut Distance to Surface*) wurde ebenfalls von Johann von Hase entwickelt und die Weiterentwicklung eADS (*enhanced Absolut Distance to Surface*) von Tobias Thormeyer während seiner Diplomarbeit an der LMU (Thormeyer, 2005). Dieses Programm berechnet unabhängig von der Zellform die Verteilung von segmentierten Signalen im Bezug auf die Kernhülle. Sowohl die Kernhülle als Grenze als auch ein beliebiges Signal werden durch

einen Schwellwert manuell festgelegt. Als Ergebnis erhält man die kürzeste Distanz eines Objektes zur Kernhülle oder einer anderen Referenz. Eine genauere Beschreibung findet sich ebenfalls in Küpper (2007).

Für diese Arbeit wurde das Programm benutzt, um eventuelle Umpositionierungen von BACs in Zellkernen festzustellen bzw. um Distanzänderungen von BACs zum Nukleolus als Referenzstruktur zu ermitteln. Die Bilderstapel wurden mit Image J bearbeitet, Schwellwerte bestimmt und dann in das Programm eingespeist.

3.13. Mikroskopie

3.13.1. Phasenkontrastmikroskopie

Das Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axiovert 25) wird vor allem in der Zellkultur verwendet und dient der Überprüfung des Wachstums der Zellen. Mit seiner Hilfe wird beispielsweise der Zeitpunkt gewählt, bei dem die Zellen die richtige Konfluenz für das Subkultivieren oder das Aussähen auf Deckgläser besitzen. Auch die Trypsinierung und der Pepsinierungsprozess sollte damit überwacht werden. Des Weiteren besitzt dieses Mikroskop die Möglichkeit der Installation einer Digitalkamera (Canon Powershot G5), mit der Aufnahmen der Zellkulturen gemacht werden können. Mit deren Hilfe wurden die Monitoring- Experimente gemacht und die Anzahl der seneszenten Zellen im SA- β - Gal- Test ermittelt.

3.13.2. Epifluoreszenzmikroskopie

Das Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot 2) wird verwendet, um das Emissionslicht von angeregten Fluorochromen zu detektieren. Fluorochrome werden mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und geben spezifisch energieärmeres Licht wieder ab, welches erst durch einen Emissionsfilter läuft und dann von einem Detektor erfasst wird. Aufgrund der Spezifität der einzelnen Fluorochrome für bestimmte Anregungs- und Emissionsspektren ist eine Unterscheidung der einzelnen Farbstoffe möglich. Um eine Überlappung der jeweiligen Spektren zu vermeiden, wird ein sogenannter dichromatischer Strahlenteiler verwendet. Liegt das Licht im sichtbaren Bereich, kann das Präparat im Okular betrachtet werden, für infrarotes Licht (z.B. bei Cy5) wird eine Coolview CCD- Kamera verwendet und Bilder werden durch das Programm *Meta Vue* (Universal Imaging, Downingtown) am Bildschirm visualisiert. Das Epifluoreszenzmikroskop dient in erster Linie zur Überprüfung der angefertigten Metaphasenpräparate, der 3D FISH Experimente und um Übersichtsbilder zu generieren. Das System besitzt Filter im Bereich von 400-900nm mit DAPI, FITC, Cy3/TR und Cy5.

3.13.3. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) ist eine mittlerweile in den Naturwissenschaften weit verbreitete Technik zur Erzeugung von drei oder vierdimensionalen (x,y,z,t) Bildern. Monochromatisches Laserlicht, das durch einen Strahlenteiler wandert, tastet hierbei Punkt für Punkt einer Ebene des Präparats ab und bringt fluoreszierende Farbstoffe zum Leuchten. Das von den Fluorochromen emittierte Licht gelangt durch eine Lochblende (sog. *Pinhole*) in den Detektor (*Photomultiplier*), wo die ankommenden Photonen mehrere Elektronen anregen und so das entstehende Bild verstärken. Emittiertes Licht aus anderen Ebenen oder außerfokales Licht wird unterdrückt bzw. gelangt nicht durch das *Pinhole*. So entstehen zweidimensionale Bilder in xy- Richtung. Durch eine Verschiebung des Objektivs in z- Richtung und eine spätere Überlagerung der Ebenen können so dreidimensionale Bilder von kompletten Zellkernen erstellt werden. Die Auflösungsgrenze liegt in lateraler Richtung bei etwa 200nm und in axialer bei etwa 500nm. Das in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete CSLM hat die Typenbezeichnung Leica TCS SP5 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar). Das Besondere an diesem Mikroskop ist, dass es verschiedene Laser mit verschiedenen Anregungsmaxima hat, die einzeln oder gleichzeitig durch einen akustooptischen Strahlenteiler auf das Präparat gelenkt werden, so dass bis zu 5 Fluorochrome synchron detektiert werden können. Für diese Arbeit wurden alle Bilder an diesem Mikroskop generiert, die später in Auswertungen eingegangen sind. Die zur Verfügung stehenden Laserlinien sind in folgender Tabelle aufgeführt, verwendet wurden aber hauptsächlich die Laser für **DAPI**, **FITC**, **Cy3**, **TR** und **Cy5**:

Parameter	LCS SP2 AOBS	LCS SP5 AOBS
Laserlinien	405nm,458nm,476nm, 488nm,496nm,514nm, 561nm,594nm,633nm	405nm,458nm,476nm, 488nm,496nm,514nm, 561nm,594nm,633nm
Photomultiplier	4x	5x
Objektiv	63x Plan- Apochromat Ölimmersion 1.4	Zeiss 63x Plan- Apochromat Ölimmersion 1.4 lambda blue
Scanmodus	between Lines, between frames	between Lines, between frames
Frame Wiederholungen	variabel, 3-4x	variabel, 3-4x
z- Schnittdicke	variabel, 200-500nm	variabel, 200-500nm
xy- Pixelgröße	50nm, 100nm, 125nm	50nm, 100nm, 125nm
Bildgröße	256x256; 512x512	256x256; 512x512

Da das gesamte Mikroskop über die passende Leica- Software gesteuert wird, kann man hier beim Mikroskopieren die Einstellungen für ein optimales Ergebnis variieren. Liegen beispielsweise die Emissionswellenlängen zweier Fluorochrome nahe beieinander, kann das Lichtspektrum, das der jeweilige Photomultiplier empfängt, auf eine kleinere Bandbreite reduziert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, diese Fluorochrome nacheinander (between frames) aufzunehmen. An den Photomultipliern kann außerdem die Empfindlichkeit verändert werden, so dass man den entstehenden Hintergrund bereits bei diesem Schritt minimieren kann. Auch die Laserstärke lässt sich stufenlos einstellen, wobei man darauf achten sollte, dass man diese so klein wie möglich hält, um ein Ausbleichen der Signale zu verhindern. Des Weiteren lassen sich auf diesem Mikroskop auch Lebendzelleexperimente durchführen, wodurch man 4D Serien (x,y,z,t) generieren kann. Allerdings dauert es sehr lange, bis ein Bilderstapel erzeugt wird, wodurch die Zellen einer hohen Strahlenexposition ausgesetzt werden. Deswegen wurde hauptsächlich ein *Spinning Disc*- Mikroskop für diese Art von Experimenten verwendet.

3.13.4. Lebendzellmikroskopie

Das in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Mikroskop für Lebendzelleexperimente ist das *Spinning Disc* System UltraView Vox von Perkin Elmer. Es handelt sich um ein konfokales Mikroskop mit zwei sogenannten Nipkow-Scheiben. Diese rotieren bei mehreren 1000rpm, sind mit spiralförmig angeordneten Löchern (je 50µm Durchmesser) versehen und rastern das Bild Zeile für Zeile ab. Die Löcher entsprechen vielen *Pinholes* und mit Hilfe von Mikrolinsen wird das Laserlicht präzise zu den Scheiben gelenkt. Emittiertes Licht gelangt auf demselben Weg zurück durch einen Strahlenteiler zum Detektor, dem Chip einer hochsensiblen CCD Kamera (Hamamatsu). Entstehendes Streulicht wird durch die Rotation der Scheibe weitestgehend vermieden. Im Gegensatz zu normaler konfokaler Mikroskopie werden hier viele Punkte gleichzeitig gescannt. Durch die schnelle Rotation erlaubt das System eine hohe *Framerate* bei gleichzeitig kurzer Belichtungszeit und eignet sich deshalb gut für Lebendzelleexperimente. Daraus resultiert eine hohe zeitliche Auflösung, durch die niedrige Strahlendosis wird wenig gebleicht und so die Belastung für die Zellen gering gehalten.

Dieses System hat weiter den Vorteil, dass es über eine Software gesteuert wird, mit der man auch erste Schritte der Bildbearbeitung machen kann. Das Programm Volocity 5.2 (Improvision) steuert das Mikroskop, nimmt Bilder auf, erlaubt Visualisierungen und Auswertungen. Des Weiteren kann man vierdimensionale Serien auf den gewünschten Bildausschnitt zuschneiden um Dateigrößen und Bearbeitungszeit zu minimieren.

Für diese Arbeit wurde vor allem die FRAP- Einheit des Mikroskops benutzt. Dazu wurden RPE-1 Zellen, die stabil bzw. MCF7 Zellen die transient mit paGFP H4 transfiziert waren, mit dem 440nm Laser bei möglichst niedriger Laserstärke und möglichst wenig Wiederholungen die Fluoreszenz der Fusionsproteine punkt- oder streifenförmig aktiviert. Die Zellkerne wurden dann über längere Zeiträume in verschiedenen langen Intervallen aufgenommen und dreidimensionale Bilderstapel angefertigt. Das genaue Vorgehen findet sich in Strickfaden et al. (2010).

3.14. Bildbearbeitung

3.14.1. Adobe Photoshop 7.0, 9.0 CS2, 11.0 CS4

Mit Photoshop wurden vor Allem Übersichtsbilder generiert. Fertige zweidimensionale Bilder werden bearbeitet in der Helligkeit, der Kontrastierung, Signale eingefärbt, die Auflösung und Größe verändert. Auch Graphen wurden von Microsoft Excel importiert und weiterbearbeitet. Zum Schluss werden mehrere Bilder oder Graphen in einem Bild zusammengefasst.

3.14.2. Image J 1.41o

Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) ist ein frei zugängliches und kostenloses Bildbearbeitungsprogramm, das v. A. deswegen eingesetzt wird, weil es gut mit Bilderstapeln umgehen kann, wie sie ein Mikroskop produziert. Des Weiteren können Plugins beliebig angefügt werden und so persönliche Arbeitsabläufe optimiert oder speziell auf eine Fragestellung hin erforderliche Anwendungen entwickelt werden. Einige der hier verwendeten Plugins wurden von Boris Joffe und Joachim Walther (LMU München) im Hause entwickelt.

In dieser Arbeit wurden Rohdaten vom Mikroskop in Image J als Bildsequenzen importiert. Das Plugin Z- Shift Corrector trennt die Sequenz in einzelne Farbkanäle auf und der sogenannte chromatische Shift wird gleichzeitig korrigiert. Dieser entsteht bei der Bildgenerierung am Mikroskop durch den unterschiedlichen Brechungsindex von verschiedenen Wellenlängen. Der chromatische Shift kann durch das Scannen von Beads gleicher Größe ermittelt werden. Das Plugin entfernt dann für jeden Farbkanal spezifisch am Beginn oder Ende des Bilderstapels ein oder zwei Bilder und gleicht so den Shift aus. Im weiteren Verlauf wird für die Bilderstapel eine Gauß- Filterung angewandt, um glattere Strukturen zu erhalten. Um die Signale in den späteren Auswertungen vergleichen zu können, wurden auch die Intensitäten mit dem Plugin Stack Normalizer angeglichen. Störende Hintergrundsignale wurden ebenfalls weggeschnitten und die Schwellwerte spezifisch für

jeden Kanal bestimmt. Hierbei ist vor allem Erfahrung und ein steter Abgleich mit den Rohbildern wichtig, um den Schwellwert nicht zu über- bzw. zu unterschätzen, da dies Auswirkungen auf die Ergebnisse haben kann. Die so bearbeiteten Bilder wurden dann mit anderen Programmen ausgewertet.

Mit einem weiteren Plugin wurden die dreidimensionalen Intensitätsschwerpunkte von Signalen und später die Distanzen berechnet. Mit dem Plugin 3D Object Counter wurden Signale gezählt und ebenfalls die Koordinaten der Schwerpunkte ermittelt.

Bildsequenzen vom Spinning Disc Mikroskop wurden in 8-bit Bilder umgewandelt und die Zeitserien durch das Plugin Stack Splitter in Einzelstapel pro Zeitpunkt aufgeteilt.

Mit der Option z- Projection werden alle Bilder eines Stapels übereinandergelegt und je nach Bedarf nach maximaler oder minimaler Intensität gemittelt.

Mit einem weiteren Plugin von Boris Joffe, genannt SG 3channels, wurden automatisch Montagen, Projektionen und RGB Bilderstapel für bis zu 3 Einzelkanäle generiert, die für die Auszählung nukleolusassoziierter Signale verwendet wurden. Das Plugin SG Amira HX Stamper (Boris Joffe) kloniert die Einstellungen für einen dreidimensional rekonstruierten Zellkern im Programm Amira und überträgt sie auf alle anderen Kerne in diesem Ordner. So können schnell beliebig viele 3D- Rekonstruktion erstellt werden.

3.14.3. Volocity 5.2

Neben den oben erwähnten Eigenschaften als Steuerungsprogramm für das Mikroskop wurde ein Teil der Bildbearbeitung mit diesem Programm gemacht. Die aufgenommenen Sequenzen wurden nach Bedarf zugeschnitten und in unterschiedlichen Formaten exportiert. Des Weiteren erlaubt es (3D)- Visualisierungen am Bildschirm, so dass eine Vorauswahl an geeigneten Zeitserien für die spätere Bildbearbeitung getroffen werden kann.

3.14.4. Amira 4.2, 5.2, 5.3

Amira ist ein Rekonstruktionsprogramm, in dem sich dreidimensionale Ansichten verschiedener Strukturen anfertigen lassen. In ImageJ bearbeitete Bilderstapel wurden unter Berücksichtigung der Voxelgröße importiert und den einzelnen Kanälen verschiedene Farben zugewiesen. Mit verschiedenen Filtern und Segmentierungen ist es möglich, glatte Oberflächen zu erzeugen. Über Bildschirmfotos wurden Bilder von Interphasekernen und mitotischen Zellen, die später im Programm 2D RRD ausgewertet wurden, angefertigt. Auch hier wurde ein Schwellwert festgelegt und über das Bildschirmfoto eine Art zweidimensionaler Projektion des Objektes generiert. Dies war nötig, um auch Metaphasen in x, z Richtung in einer Seitenansicht darstellen zu können. Das Programm besitzt des Weiteren

die Option, kleine Filme über die dargestellten Objekte zu erstellen. Über den Export von VRML (*Virtual Reality Modelling Language*) können wrl- Dateien erzeugt werden, aus denen frei drehbare *virtual reality* Objekte in pdf- Dateien gemacht werden (Ruthensteiner and Hess, 2008).

Für die Monitoring Experimente wurden mit Hilfe von Amira die längsten Achsen durch die Tochterkerne (2D Measure) und die Winkel zwischen den Kernen (2D Angle) bestimmt.

3.15. Statistik

3.15.1. SigmaStat 3.0 SPSS Inc.

Um die Ergebnisse der Evaluationsprogramme richtig einordnen zu können, wurden sie mit SigmaStat statistisch bearbeitet. Für die absoluten Distanzen aus dem eADS Programm wurden die gewichteten Mittelwerte mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test auf signifikante Verteilungsunterschiede untersucht. Die einzelnen Ergebniswerte von 2D RRD wurden über Deskriptive Statistik untersucht, aufsteigend sortiert und die Mediane der Verteilungen im 95% Konfidenzintervall berechnet. Die unterschiedliche Positionierung im Zellkern von CT Pools verschiedener Größe wurde über eine Varianzanalyse bestätigt (RM ANOVA on ranks). Für die Experimente zur Untersuchung einer Lageveränderung von Loci nach transkriptioneller Hochregulation über induzierte replikative Seneszenz wurden die 95% Konfidenzintervalle der über Auszählen von assoziierten Signalen ermittelten Werte berechnet. Dabei wurde folgende Formel verwendet:

$$p \pm z_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Diese einfache Formel entspricht einer Approximation der Binomialverteilung an die Normalverteilung. Diese darf bei einer genügend großen Stichprobengröße angewandt werden, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind: $np > 5$ und $n(1-p) > 5$. Die Intervalle besagen, dass mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% der tatsächliche Wert auch in weiteren Experimenten innerhalb dieses Bereichs liegt.

3.16. Vermeidung einer bewussten oder unbewussten Vorauswahl

Ein wichtiger Punkt ist die Vermeidung einer (unbewussten) Auswahl von Zellkernen, die Merkmale in gewünschter Weise besitzen bzw. die Vermeidung von Kernen mit ungewünschten Merkmalen. Ein richtiges Vorgehen muss vorher klar festgelegt werden.

Die erste mögliche Fehlerquelle für einen *Bias* ist die Aufnahme von Kernen am Mikroskop. Eine erste Auswahl wird anhand des DAPI- Bildes getroffen und die Morphologie des Kerns beurteilt. Hier sollten möglichst typische Vertreter mit zelltypspezifischen Eigenschaften gewählt werden. Soweit sichtbar wurden auch die anderen Kanäle der Epifluoreszenzeinheit am Konfokalmikroskop beispielsweise auf Intensität des Hintergrunds oder Vorhandensein der Signale überprüft. Bei Vielfarben- Experimenten wurden alle Kanäle einzeln nach Anzahl an Signalen, Intensität, Hintergrund und Art des Signals kontrolliert. Waren alle Signale in der richtigen Anzahl und zufriedenstellender Intensität vorhanden, wurde der Kern gewählt und ein Bilderstapel generiert. Erst nach dem Ende des Scanvorgangs wurden die Überlagerungsbilder in einer ersten groben Ansicht durch die Scansoftware begutachtet. Die überwiegende Mehrheit aller aufgenommenen Zellkerne ging später in die jeweilige Auswertung ein. Nur in Ausnahmefällen wurden Kerne z.B. aufgrund unbrauchbarer Signale verworfen. Bei allen Experimenten wurden die Kerne, die aufgenommen wurden, nach bestem Wissen und Gewissen ausgewählt. In vielen Fällen, z.B. bei den Experimenten zur radialen Anordnung in Metaphasezellen, war die Anzahl der Zellen, die alle Kriterien erfüllten, auf einem Präparat so gering, dass praktisch alle gefundenen Zellen aufgenommen wurden. In den Experimenten der Östrogenstimulation von MCF7- Zellen (siehe Kapitel 3.10 und 4.7.2) wurde im Rahmen der FISH- Experimente für die Diplomarbeit von Evelin Radulovic ein Programm verwendet, das beliebige Koordinaten auf einem Präparat vorgibt. Die an diesen Stellen gelegenen Kerne wurden in größerer Anzahl gescannt und erst später bei der Bildbearbeitung auf Brauchbarkeit überprüft (siehe Radulovic 2010). So vermeidet man eine mögliche unbewusste Auswahl spezifischer Kerne beim Mikroskopieren. Das Problem wird allerdings nach hinten verlagert in den Arbeitsablauf der Bildbearbeitung. Hier gibt es viele Möglichkeiten, bewusst oder unbewusst in die eine oder andere Richtung einzuwirken. Beispielsweise können Signale beim Bestimmen des für manche Auswertungsprogramme benötigten Schwellwerts als zu hoch oder zu niedrig bewertet werden. Auch beim Weglöschen des störenden Hintergrunds können Fehler begangen werden, indem z.B. echte Signale weggeschnitten werden oder Hintergrund als Signal gewertet wird. Jeder der in der Bildbearbeitung nötigen Schritte ist ein potentieller Fehlerherd

und kann Ergebnisse beeinflussen. Um während der Auswertung unvoreingenommen zu bleiben, sollte man nie vor der Evaluation Überlagerungsbilder generieren, um die Lage von Signalen im Zellkern oder die Beziehung zu Strukturen vorzeitig herauszufinden. Bei der Schwellwertbestimmung kann man beispielsweise alle Stapel eines Farbkanals von allen Kernen öffnen und nacheinander abarbeiten und erst nachher den nächsten Kanal. Insgesamt gesehen sollten alle Schritte der Bildbearbeitung mit möglichst großer Sorgfalt durchgeführt werden und man sollte unvoreingenommen und ergebnisoffen vorgehen. Eine exakt gleiche Vorgehensweise in der Bearbeitung über alle Experimente hilft, Fehler zu vermeiden.

4. Ergebnisse:

4.1. Die größenabhängige radiale Verteilung von Chromosomenterritorien in Interphasekernen und Metaphasenplatten

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass es eine größenabhängige Verteilung von ganzen Chromosomen bzw. Territorien in Zellen mit einem flachen Zellkern (Bolzer et al., 2005) bzw. eine gendichteabhängige Verteilung von Chromosomen in Zellen mit einem kugeligen Zellkern gibt (Boyle et al., 2001; Cremer et al., 2001). In Bolzer et al. (2005) wurde über M-FISH die größenabhängige Verteilung in sogenannten Prometaphasenrosetten von Fibroblasten untersucht und eine ähnliche Verteilung festgestellt wie in Interphasekernen. Das Ziel der eigenen Versuche war, herauszufinden, ob radiale Verteilungsmuster von Chromosomen auch während der Mitose erhalten bleiben oder ob sie verlorengehen und folglich nach jeder Zellteilung neu gebildet werden müssen. Dazu wurden die Anordnungen von Interphasekernen mit denen in Metaphaseplatten verglichen.

Von anderen Arbeiten ist bekannt, dass Schwesterkerne nach der Mitose große Symmetrien aufweisen, was die Muster der CT- Verteilung angeht. Die Muster sind zwar nicht identisch, aber die relative, radiale Anordnung bleibt sogar auch nach weiteren Teilungen in Cousinzellkernen 1. und 2. Grades noch erhalten (Köhler et al., in prep.). Erklären lässt sich das durch die sog. „fallen rosettes“ Hypothese, nach der die Schwesterkerne nach der Metaphase symmetrisch getrennt werden und ähnliche Tochterkerne entstehen, ohne dass große Änderungen der Chromatinanordnung auftreten (Solovei et al., 2004b). Stimmt diese Hypothese, dann sollte die relative, radiale Lage von CTs in Interphasen und Metaphasenkernen ähnlich sein.

Metaphasen stehen zwar senkrecht zur Wachstumsebene, sind aber ähnlich flach wie die Kerne von Fibroblasten oder anderen Zellen mit flachen Zellkernen. Es wurden fünf Zelltypen mit vorwiegend flachen Zellkernen untersucht: drei diploide, normale Zelllinien (HFB, AFC und HMEC) sowie zwei Tumorzelllinien (DLD-1 und HeLa Gold). Während DLD-1 Zellen nur geringfügige Chromosomenänderungen aufweisen und nahezu diploid sind, sind die Chromosomen in den HeLa Zellen stark rearrangiert mit einer hypertriploiden Chromosomenzahl.

Um zu überprüfen, ob es eine größenmäßige radiale Verteilung von CTs gibt, wurden Pools von Chromosomen ähnlicher Größe gebildet und mittels FISH- Experimenten getestet:

	Große Chromosomen	Mittlere Chromosomen	NOR- tragende Chromosomen	Kleine Chromosomen
Pool 1	HSA 1,2,3			
Pool 2		HSA 7,8,X		
Pool 3			HSA 13,14,15	
Pool 4				HSA 17,18,20

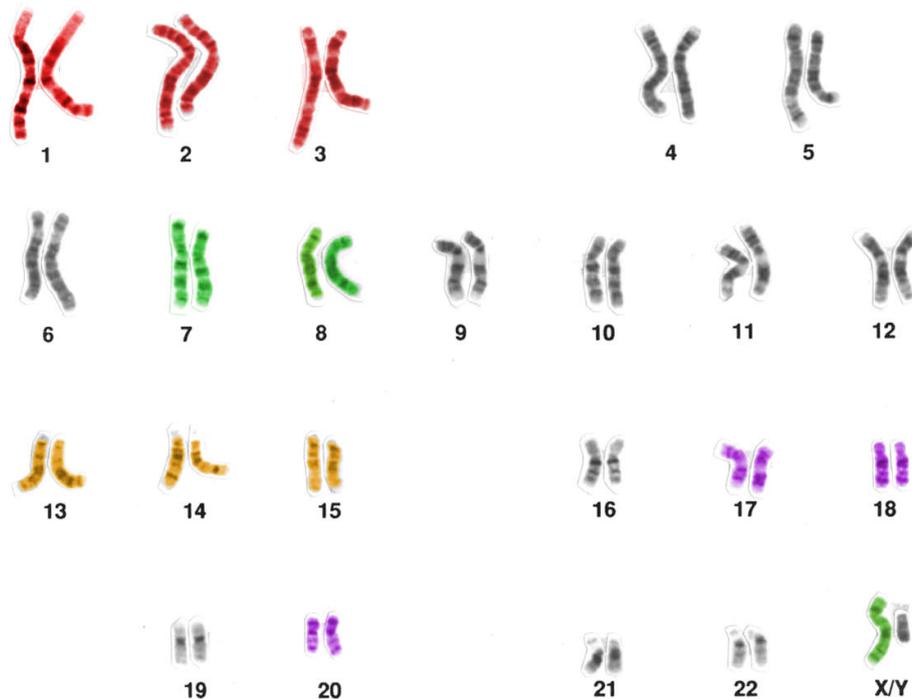


Abb. 14: Diploides Karyogramm mit den verwendeten Sonden:

Die Tabelle zeigt die verwendeten Pools von Chromosomen unterschiedlicher Größe und zeigt gleichzeitig die Farbkodierung, die für alle Experimente, Bilder und Graphen beibehalten wurde. Darunter ist ein männlicher Karyotyp zu sehen (Quelle: www.laborlexikon.de); auch hier sind die Chromosomen entsprechend ihrer Kodierung eingefärbt. Die spezifischen Sonden stammen alle aus dem Cremer Labor und wurden bereits mehrfach verwendet, trotzdem wurden sie poolweise noch einmal in einer 2D FISH getestet (nicht gezeigt).

Nach Überprüfung der Pools und Chromosomenpaints auf Metaphasechromosomen mittels 2D- FISH, wurden sie nacheinander auf fixierte dreidimensionale Zellen von AFC, HFB, DLD-1 und HMEC Zellen hybridisiert. Jeweils 25- 30 Interphasekerne und Metaphaseplatten wurden gescannt und für die Auswertungen benutzt. Für die HeLa Zellen wurden aufgrund des stark rearrangierten Karyotyps nur Chromosomenpaints verwendet, die selten oder gar nicht rearrangiert sind. Dies waren **HSA 4** als großes, **HSA 7** als mittleres, **HSA 13** als NOR- tragendes und **HSA 21q** als kleines Chromosom.

Da die relative radiale Lage von Chromosomenterritorien ermittelt werden sollte und die Interphasenkerne wie die Metaphasenplatten sehr flach sind, konnte auf eine aufwändige 3D Auswertung verzichtet werden. In flachen Zellkernen haben fast alle Chromosomen Kontakt zur Lamina an der inneren Kernhülle und eine dreidimensionale Auswertung würde für alle

Chromosomen einen nahezu identischen Abstand zur Kernhülle ergeben. Deswegen wurden von Interphasekernen und Metaphaseplatten mit dem Programm Amira dreidimensionale Rekonstruktionen erstellt und Projektionen von jedem Farbkanal angefertigt. Die Metaphaseplatten wurden dabei um 90° auf die Seite gedreht, so dass sie für den Betrachter mit ihrem größten Durchmesser in der Betrachtungsebene lagen (siehe Material und Methoden). Die Projektionen der einzelnen Farbkanäle wurden in binäre Bilder umgewandelt und die relative radiale Lage mit dem Programm 2D RRD in zweidimensionaler Weise vermessen (Funktionsweise siehe Material und Methoden). Die Ergebnisse dieser Evaluationen werden in den Abbildungen 15-19 dargestellt:

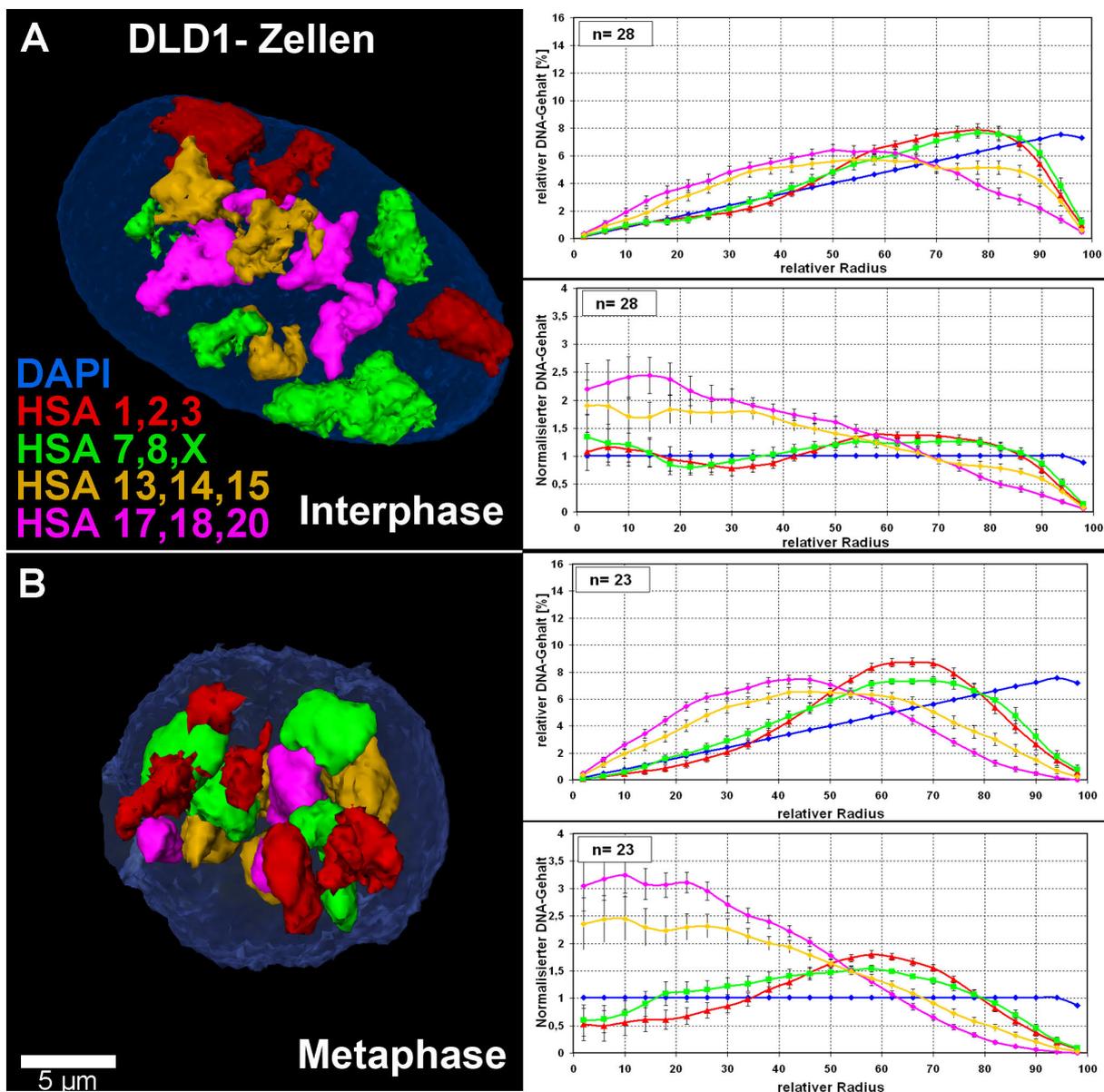


Abb. 15: Ergebnisse DLD1- Zellen

(A) 3D Rekonstruktionen eines DLD-1 Zellkerns in der Interphase und die Konfiguration in der Metaphasenplatte (B). In den Rekonstruktionen wurde das DAPI- gefärbte Chromatin blau dargestellt, die Territorien der großen Chromosomen 1, 2 und 3 rot, die Territorien der Chromosomen 7, 8 und X

grün, die Territorien der NOR- tragenden Chromosomen gelb und die Territorien der kleinen Chromosomen 17, 18 und 20 rosa. Jeweils rechts von den Rekonstruktionen befindet sich die Auswertung von 2D RRD, in der der relative Radius von 0- 100% gegen den relativen DNA- Gehalt aufgetragen ist. Die blaue Linie entspricht der DAPI- Färbung als Referenz und die farbigen Linien entsprechen den Chromosomenpools (Farbcodierung entspricht den CT- Farben). Vor allem für die großen und mittelgroßen Chromosomen (rote und grün Kurven) ist der Kurvenverlauf weit nach rechts hin zu großen Radien verschoben. Dies spricht für eine bevorzugte Lokalisation am Kernrand. Die Kurven für die kleineren Chromosomen (gelbe und rosafarbene Linien) mit ihrer Tendenz nach links zu kleineren Radien sprechen dagegen für eine zentralere Lokalisation. Der jeweilige untere Graph beinhaltet denselben Datensatz, jedoch ist der Signalgehalt auf die Schalengröße normiert. Bevorzugte Lokalisationen von Chromosomen sind so besser sichtbar. Verläufe über der DAPI- Linie als Normwert sprechen für einen hohen Signalgehalt in diesem Bereich, unterhalb der Linie für einen niedrigen Signalanteil. Beide Graphen zeigen, dass große Chromosomen bevorzugt in der Peripherie angeordnet sind, während nukleolusassoziierte und kleine Chromosomen eine zentralere Position einnehmen. Noch deutlicher ist diese größenabhängige Verteilung in Metaphasenkernen (B, unterer Graph) zu sehen. Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

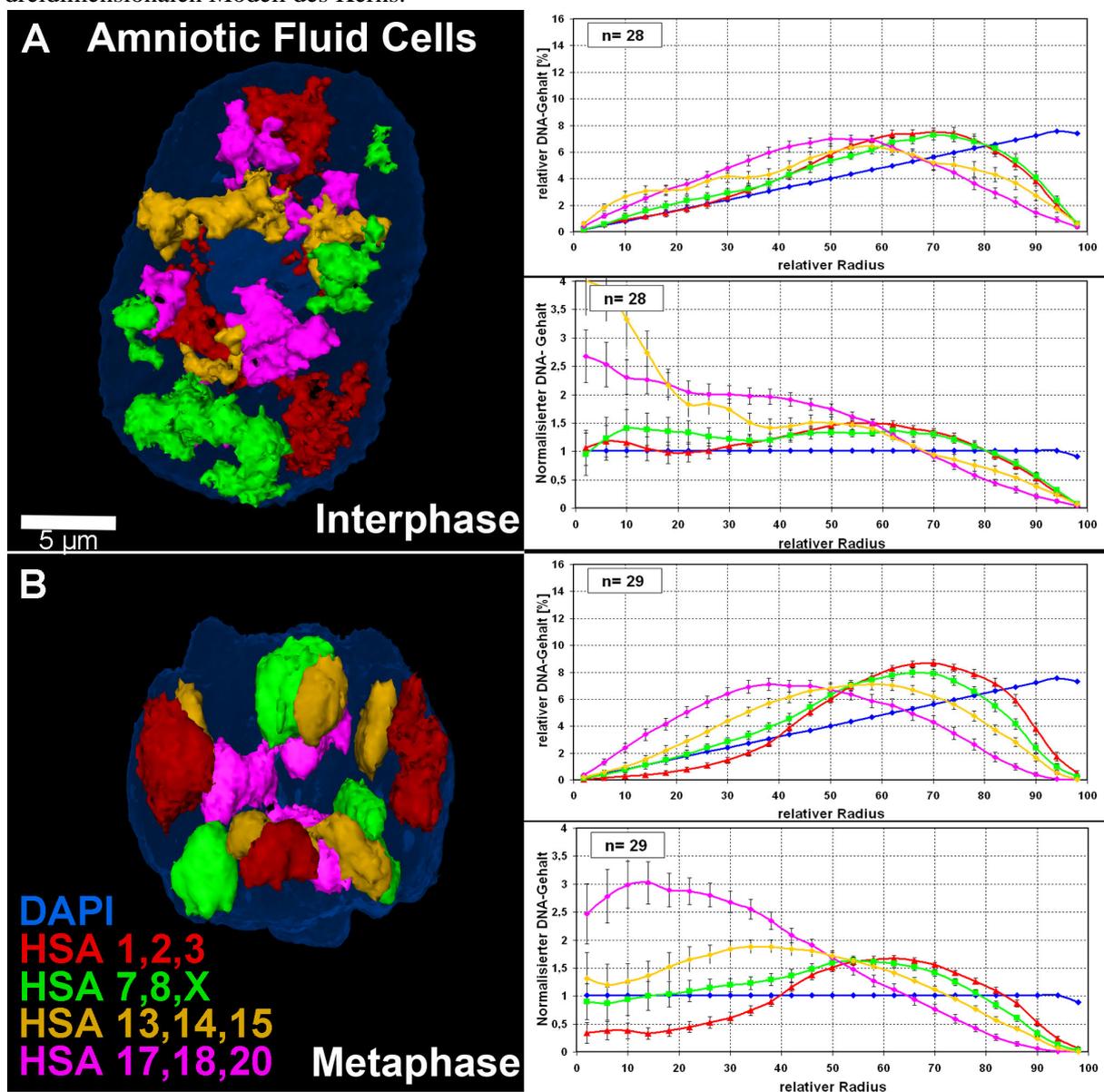


Abb. 16: Ergebnis AFC- Zellen

3D- Rekonstruktionen eines Zellkerns von AFC Zellen in der Interphase (A) oben und in der Metaphase (B) unten. In den Rekonstruktionen ist in blau wieder die DAPI- Färbung zu sehen und die

Pools aus den großen, roten Chromosomen **1, 2** und **3**, den Chromosomen **7, 8** und **X** (grün), den **NOR**- tragenden Chromosomen in gelb und den kleinen Chromosomen (**17, 18** und **20** in rosa). Jeweils rechts befinden sich die Auswertungen mit 2D RRD, in der der relative Radius von 0- 100% gegen den relativen DNA- Gehalt aufgetragen ist. Die blaue Kurve gibt die Verteilung von DAPI- gefärbtem Chromatin als Referenz wider. Die farbigen Kurven entsprechen wie oben der Signalverteilung der Territorien verschiedener Chromosomenpools. Der jeweilige untere Graph stellt den normalisierten Datensatz in Abhängigkeit der Schalengröße dar. Wie bei DLD-1 Zellen (Abb. 15) bestätigen beide Graphen, dass große Chromosomen sowohl in Interphasekernen als auch in Metaphasenplatten bevorzugt in der Peripherie angeordnet sind, während nukleolusassoziierte und kleine Chromosomen eine zentrale Position einnehmen. Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

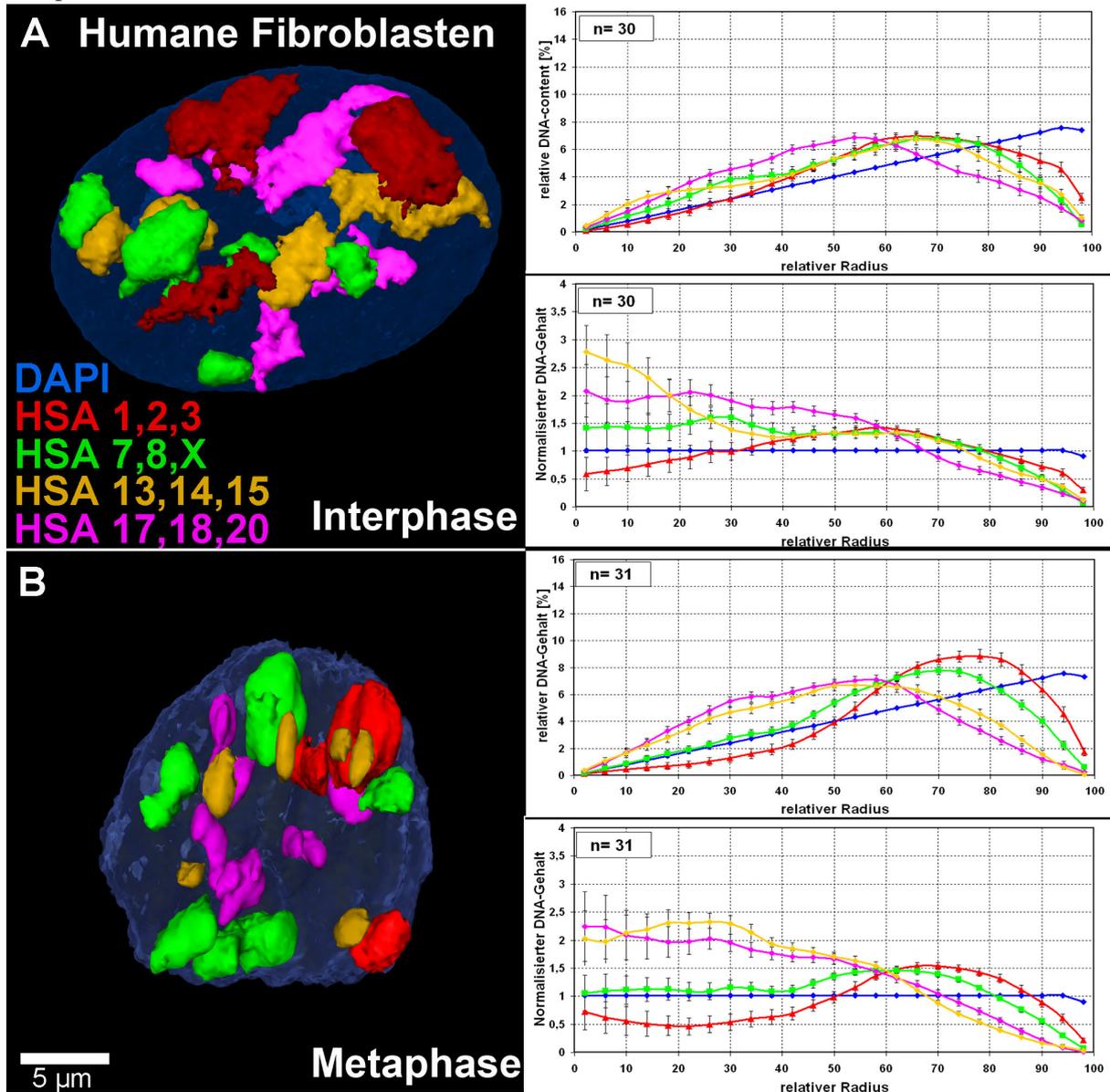


Abb. 17: Ergebnis HFB

Zu sehen ist die gleiche Anordnung wie in den vorangegangenen Bildern bei humanen Fibroblasten in Interphase (A) und Metaphase (B). Auch hier bestätigt sich die Anordnung von großen Chromosomen in der Peripherie, kleinen und nukleolusassoziierten Chromosomen im Zentrum und den mittelgroßen Chromosomen mit einer Position dazwischen. Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

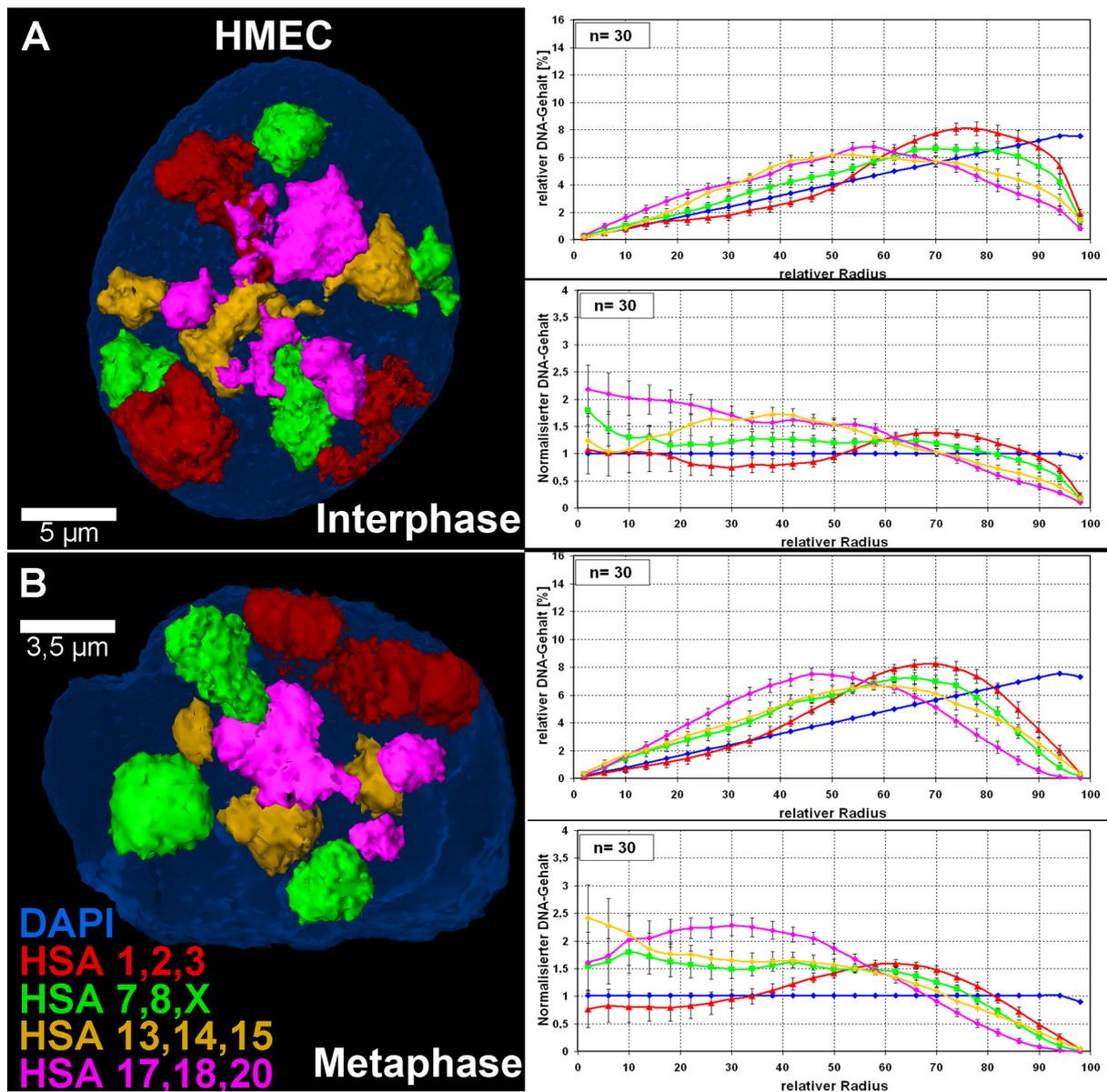


Abb. 18:Ergebnis HMEC

HMEC Zellen in Inter- (A) und Metaphase (B). Ebenfalls bestätigt sich die bevorzugte Lokalisation von großen Chromosomen in der Peripherie, kleinen und nukleolusassoziierten Chromosomen im Zentrum und den mittelgroßen Chromosomen mit einer mittleren Position (zur weiteren Erläuterung siehe die Legende zu Abb. 15).

Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

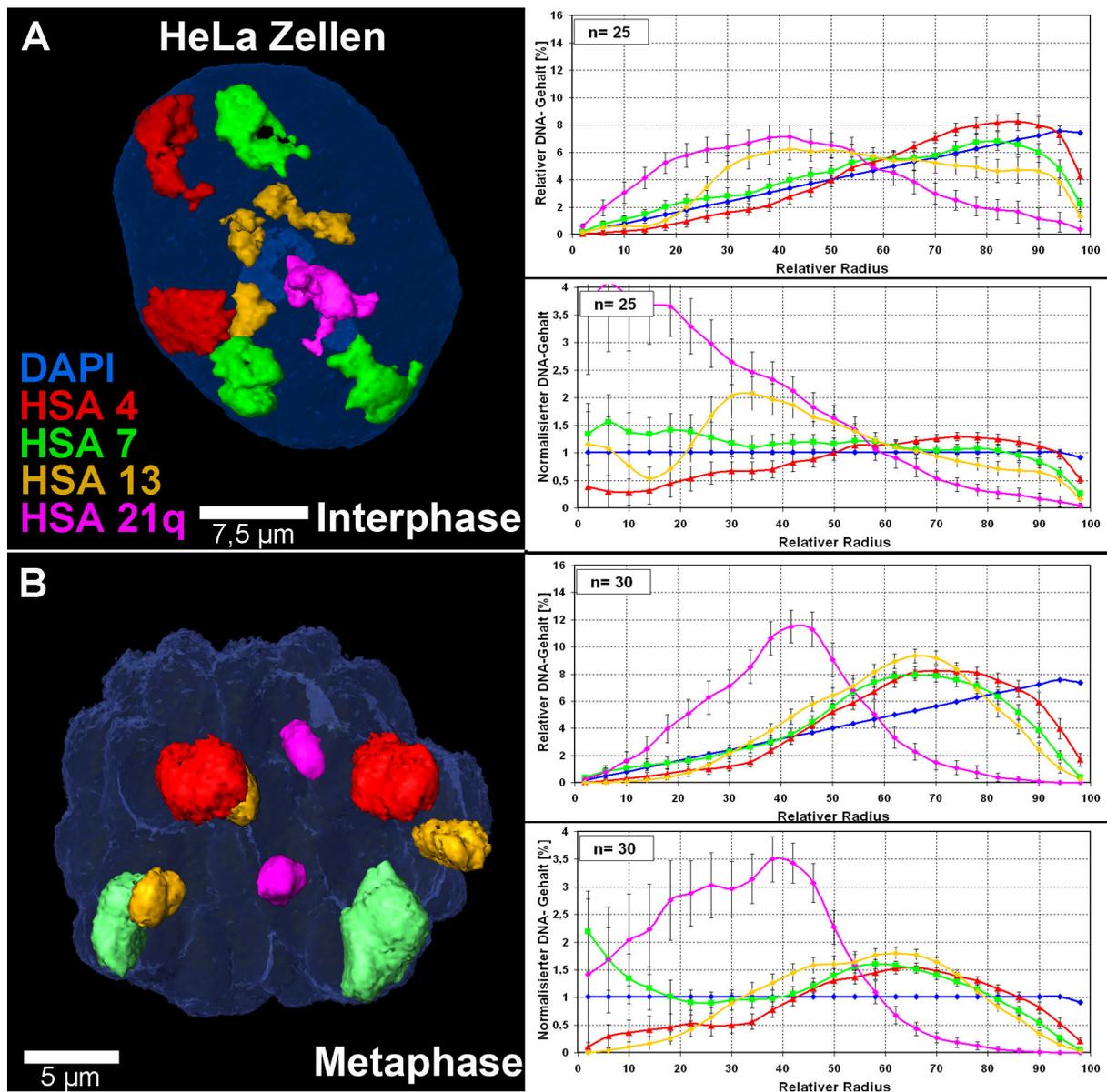


Abb. 19: Ergebnis HeLa- Zellen

Auch in HeLa Zellen ist die gleiche Anordnung der Chromosomen wie in den vorangegangenen Experimenten in Interphasekernen (A) und Metaphasenplatten (B) zu sehen. Aufgrund des rearrangierten Karyotyps wurden nur 4 Chromosomen verwendet, aus jeder der Gruppen eines (HSA 4, 7, 13, 21q). Trotzdem bestätigt sich die Anordnung von großen Chromosomen in der Peripherie, kleinen und nukleolusassoziierten Chromosomen im Zentrum und den mittelgroßen Chromosomen mit einer mediären Position sowohl in Inter- als auch in der Metaphase. Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Um die Ergebnisse der verschiedenen Experimente besser vergleichen zu können, wurden die Mediane für die Lokalisation der einzelnen Pools für Interphase und Metaphasenplatte errechnet und mit denen der anderen Zelllinien verglichen. Für HeLa Zellen wurde ein eigener Graph erstellt, da hier andere Paints verwendet wurden.

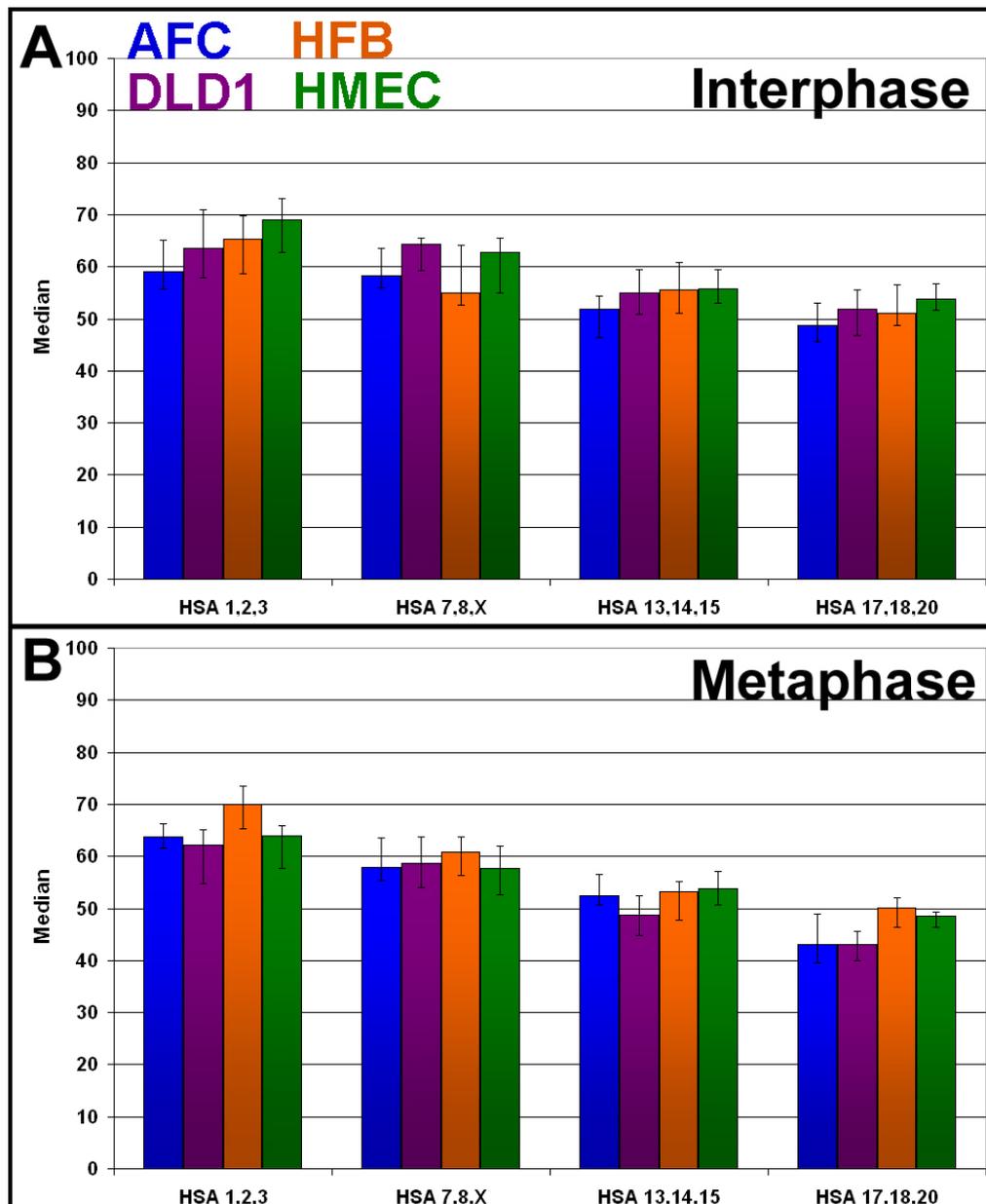


Abb. 20: Mediane zur radialen Anordnung

Zu sehen sind die Mediane für die Lokalisation der CTs in Interphasekernen (A) und Metaphasenplatten (B), die in den vier untersuchten Zelltypen AFC (blau), DLD1 Zellen (lila), humanen Fibroblasten (orange) und HMEC- Zellen (grün) ermittelt wurden. Die Ordinate ist in diesem Fall dem Kernradius gleichzusetzen: 0% entspricht einer Lage im Zentrum und 100% am Kernrand. Ein Medianwert von 60% bedeutet, dass sich 50% der Pixel, die einem bestimmten Chromosomen-Pool zuzuordnen sind, in den ersten 60% des Kernradius befinden, und 50% in den äußeren 40% des Radius. CTs mit einem solchen Medianwert sind also bevorzugt in der Peripherie oder am Kernrand lokalisiert. Insgesamt zeigen die Mediane ein absteigendes Niveau von den großen zu den kleinen Chromosomen. Die asymmetrischen Fehlerbalken geben den Fehler nach unten und nach oben im 95% Konfidenzintervall an.

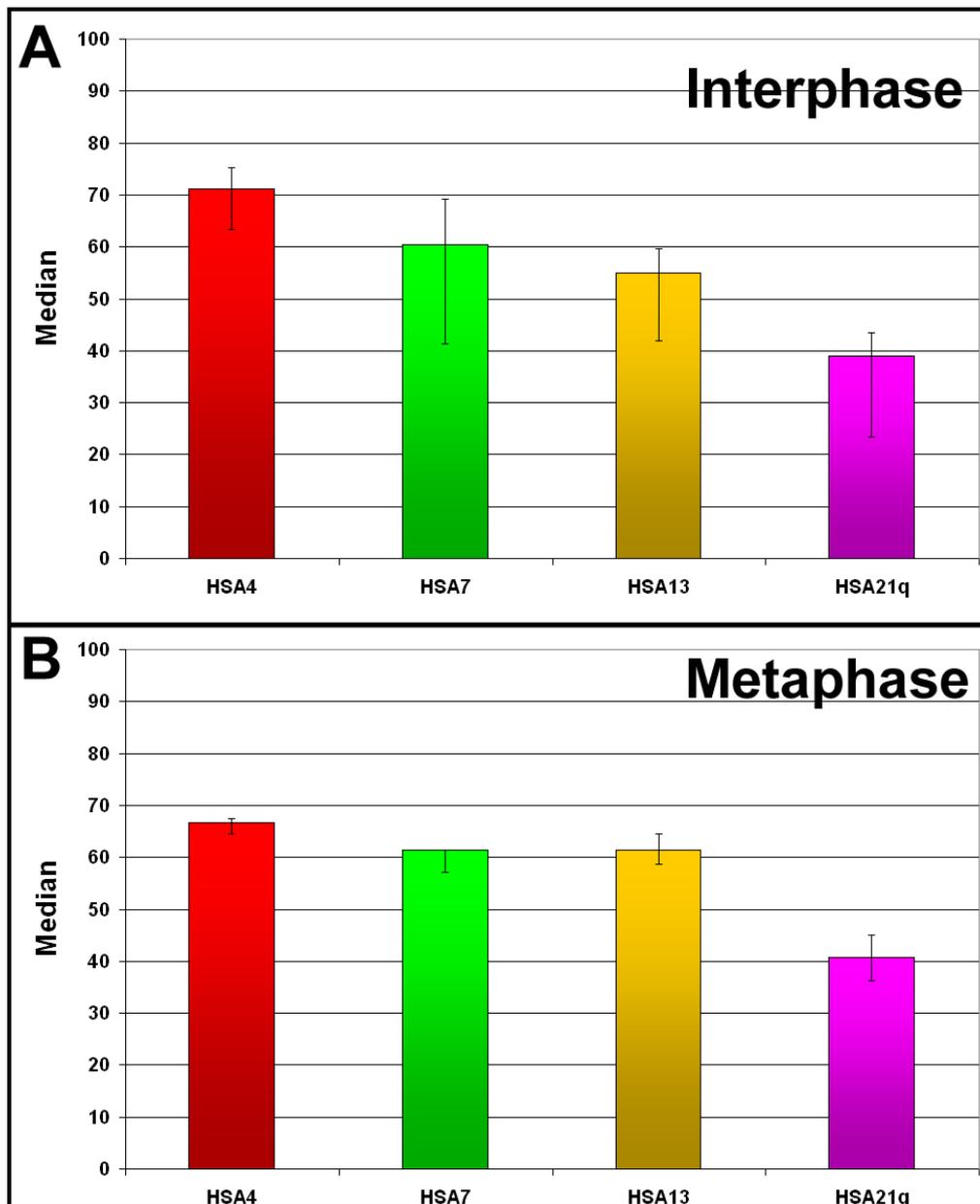


Abb. 21: Mediane HeLa Zellen

Mediane der CT- Verteilung für HeLa Zellen in Interphasekernen (A) und Metaphasenplatten (B). Deutlich zu sehen ist der abnehmende Medianwert bei abnehmender Chromosomengröße. Dieses Resultat spricht für eine bevorzugte Lokalisation im inneren Bereich der Zellkerne. Bei den Metaphasen weisen große und kleine Chromosomen deutlich unterschiedliche bevorzugte Lokalisationen auf, während mittlere und NOR- tragende Chromosomen eine ähnliche Verteilung zeigen. Die asymmetrischen Fehlerbalken geben den Fehler nach unten und nach oben im 95% Konfidenzintervall an.

Eine Varianzanalyse (RM ANOVA on Ranks) bestätigt die Unterschiede zwischen den verschiedenen Pools bezüglich ihrer Lokalisation für die jeweiligen Zelllinien in Inter- und Metaphase:

Visualisierte Chromosomenpools

AFC Interphase	7,8,X	13,14,15	17,18,20
1,2,3			
7,8,X			
13,14,15			
AFC Metaphase	7,8,X	13,14,15	17,18,20
1,2,3			
7,8,X			
13,14,15			
DLD Interphase	7,8,X	13,14,15	17,18,20
1,2,3			
7,8,X			
13,14,15			
DLD Metaphase	7,8,X	13,14,15	17,18,20
1,2,3			
7,8,X			
13,14,15			
HFB Interphase	7,8,X	13,14,15	17,18,20
1,2,3			
7,8,X			
13,14,15			
HFB Metaphase	7,8,X	13,14,15	17,18,20
1,2,3			
7,8,X			
13,14,15			
HMEC Interphase	7,8,X	13,14,15	17,18,20
1,2,3			
7,8,X			
13,14,15			
HMEC Metaphase	7,8,X	13,14,15	17,18,20
1,2,3			
7,8,X			
13,14,15			
HeLa Interphase	7	13	21q
4			
7			
13			
HeLa Metaphase	7	13	21q
4			
7			
13			

Tabelle 2: Signifikanzen der CT Pools in Interphasekernen und Metaphasenplatten

Übersicht über die Signifikanzen der Varianzanalyse (RM ANOVA on Ranks) zwischen den einzelnen Pools. Für jeden Kern wurde die Pixelverteilung der einzelnen Pools ermittelt und der Median berechnet. Über alle Mediane einer Gruppe wurde die Varianz zwischen den verschiedenen Pools ermittelt. Grün hinterlegte Felder bedeuten, dass sich die Pixelverteilungen der einzelnen Gruppen unterscheiden ($P < 0,05$) und Rot dass es keinen signifikanten Unterschied gibt. In allen Fällen sind die Positionierungen der großen und mittleren Chromosomen von den kleinen Chromosomen verschieden.

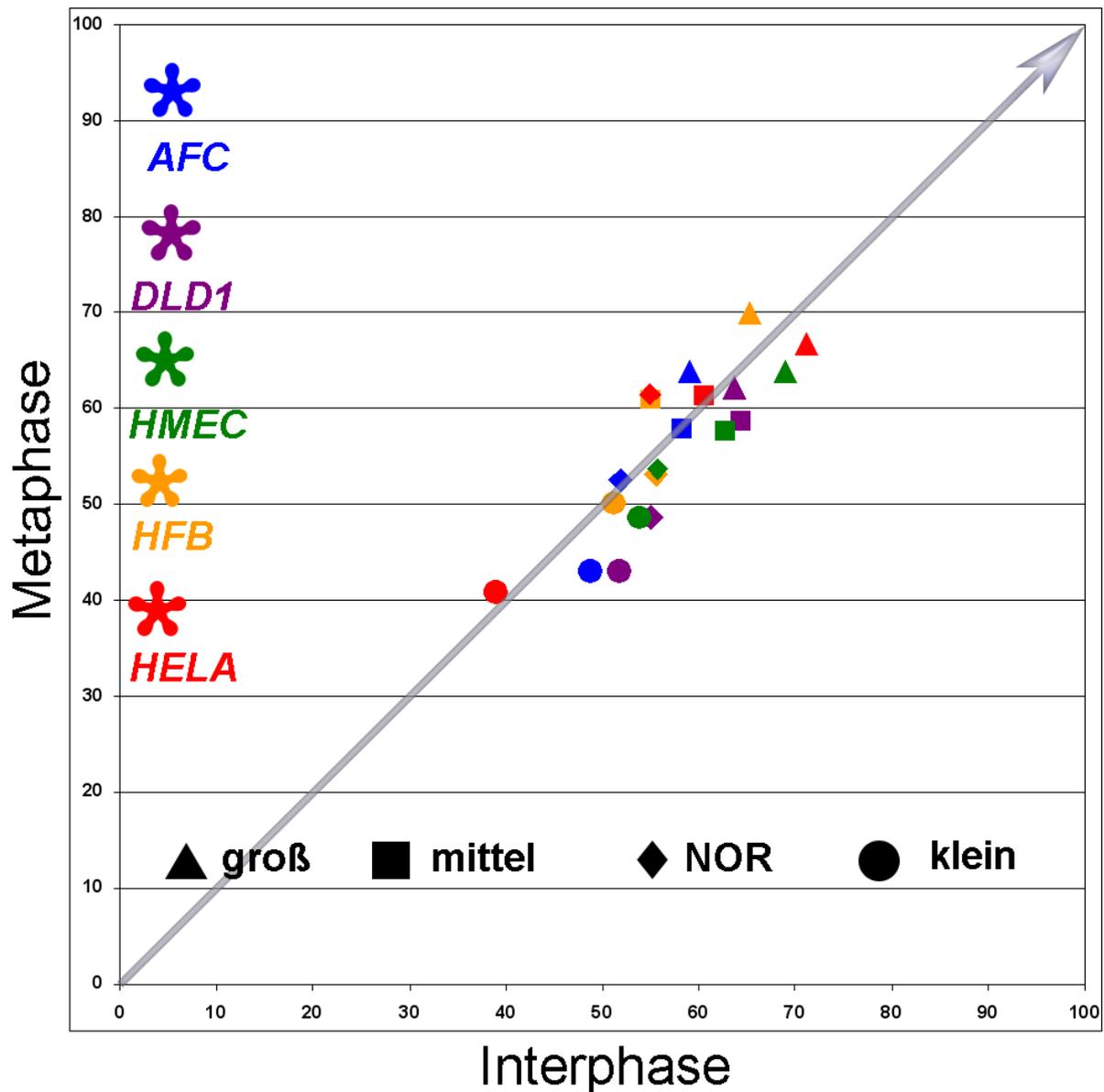


Abb. 22: Medianvergleich Interphase- Metaphase

Hier sind die Mediane von Interphasekernen gegen die Mediane der Metaphasenplatten aufgetragen über alle Zelltypen und alle Pools. Der Pfeil stellt eine Winkelhalbierende dar, um einen Referenzwert zwischen den beiden Stadien angeben zu können. Punkte auf dieser Linie zeigen an, dass die radiale Verteilung in Interphasen und Metaphasen identisch ist. Die experimentell ermittelten Werte weichen nicht sonderlich stark von der Referenzlinie ab und sprechen so für eine ähnliche radiale Verteilung der Chromosomen in Interphasekernen und Metaphaseplatten. Deutlich zu sehen ist, dass die Pools großer und mittlerer Chromosomen stärker peripher angeordnet sind als die Gruppen der NOR-tragenden und kleinen Chromosomen in allen Zelllinien.

Wie Tabelle 2 und Abb. 22 zeigt, gibt es eine deutliche Korrelation zwischen Interphasekernen und Metaphasenplatten. Weitere statistische Tests zeigen einen klaren linearen Zusammenhang zwischen Chromosomengröße und Positionierung im Kern. Legt man eine Trendlinie durch die kombinierten Medianwerte der verschiedenen Pools in Inter- und Metaphase, liefert ein lineares Regressionsmodell für alle fünf Zelllinien jeweils hohe Bestimmtheitsmaße, was dafür spricht, dass es einen linearen Zusammenhang gibt. Für AFC

ist $R^2 = 0,914$, bei DLD-1 Zellen ist $R^2 = 0,9555$, HMEC zeigt ein R^2 von $0,9507$, bei HFB ist $R^2 = 0,8441$ und bei HeLa ist $R^2 = 0,8967$.

Eine Zusammenfassung über die Linearität zeigt folgende Abbildung, bei der alle Mediane über alle Zelllinien gemittelt wurden:

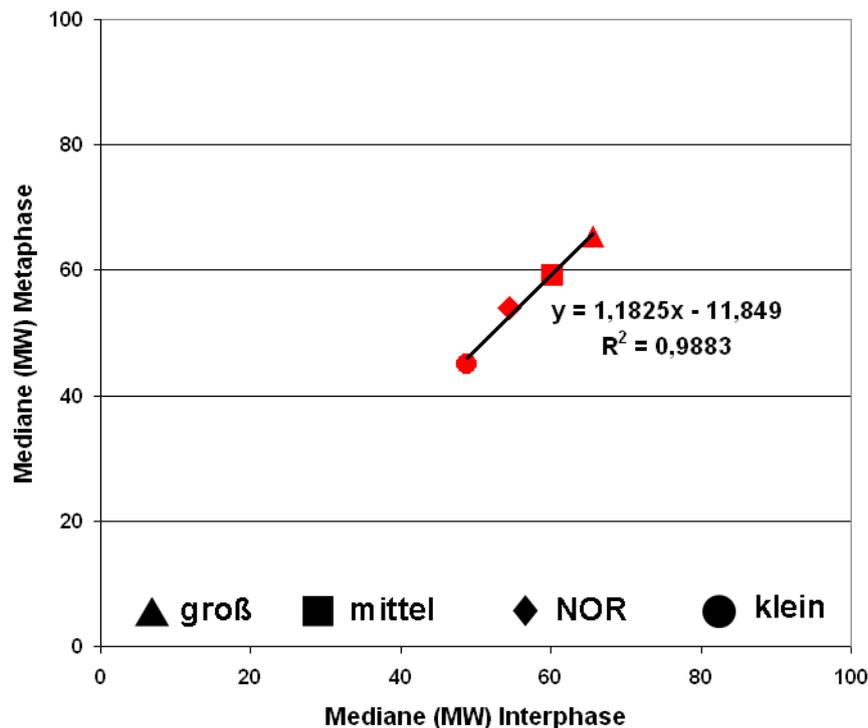


Abb. 23 Regressionsanalyse Interphase- Metaphase

Mittelwerte aller Mediane von den verschiedenen Chromosomenpools über alle fünf Zelltypen in Interphasekernen gegen Metaphaseplatten. Die Trendlinie ist linear und besitzt mit $0,9883$ eine hohe Bestimmtheit.

Zusammenfassung:

Die Experimente zeigen eine klare größenbasierte Verteilung von Chromosomen in Zelltypen mit einem flachen Kern. Diese Verteilung ist nicht nur in Interphasen zu finden, sondern korreliert auch mit der Verteilung in Metaphasenplatten. Statistische Tests belegen eine Korrelation zwischen Chromosomengröße und radialer Verteilung in Interphase und Metaphase.

4.2. Radiale Verteilung von Minichromosomen und eines durch Amplifikation vergrößerten Chromosoms in Interphase und Metaphase

In diesem Kapitel wird die radiale Verteilung von weiteren Chromatinstrukturen untersucht, die natürlich oder artifiziell in bestimmten Zelltypen vorkommen. Die Untersuchungen wurden im Rahmen einer von mir gemeinsam mit meinem Doktorvater Thomas Cremer und Irina Solovei geplanten und von mir durchgehend betreuten Diplomarbeit von Isabel Liebhart

durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bereits in der Diplomarbeit Liebhart (2009) veröffentlicht. Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse findet sich deswegen in der genannten Veröffentlichung, im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden nur Zusammenfassungen und Endergebnisse präsentiert. Die verwendeten Methoden entsprechen im Großen und Ganzen den Methoden in Kapitel 4.1, d.h. die untersuchten Strukturen wurden über FISH- Experimente nachgewiesen und die radialen Positionierungen wurden über Projektionen und 2D RRD ermittelt.

Untersucht wurde die radiale Verteilung von *small accessory chromosomes* (SACs), natürlich vorkommenden Minichromosomen in menschlichen Zellen und von SACs abstammende, genetisch veränderte *human chromosomal vectors* (HCVs), die in Zellen von Maus und Hamster eingeschleust wurden (siehe Einleitung Kapitel 2.3.8 und Material und Methoden 3.2.10 ff.). Diese Minichromosomen oder Vektoren bestehen vor allem aus alphoiden Sequenzen und Satelliten- DNA verschiedener Chromosomen. Im zweiten Teil wurde ein Chromosom auf seine Positionierung untersucht, das durch massive Amplifikation eines Onkogens auf ein Mehrfaches seiner normalen Größe angewachsen ist.

Hier sollte untersucht werden, wie sich die genannten Chromatinstrukturen im Zellkern anordnen und ob es, ähnlich wie bei ganzen Chromosomen, die in Zellen mit flachen Kernen nach Größe im Zellkern verteilt sind, auch hier eine größenabhängige radiale Positionierung gibt. Zusätzlich wurde auch die Positionierung in Metaphaseplatten ermittelt, um zu sehen, inwieweit die relative Position während der Mitose erhalten bleibt.

4.2.1. SACs in humanen Fibroblasten

In einem ersten Experiment wurde die Position von einem SAC ermittelt. Das in diesem Fall untersuchte SAC besteht aus perizentromerischen alphoiden Sequenzen und dem aktiven Zentromer 12. Der Nachweis dieses SACs in humanen Fibroblasten erfolgte über eine Zentromer 12 Sonde. Zusätzlich wurde das FISH Experiment mit einem BAC (BAC 12p, RP11-438D14) durchgeführt, der zentromernah auf Chromosom 12p liegt, jedoch nicht im SAC enthalten ist. Auf diese Weise konnte das SAC- Signal von den beiden natürlich vorkommenden Zentromersignalen von HSA12 unterschieden werden. Der Test der verwendeten Sonden auf Spezifität wurde in 2D FISH Experimenten auf gespreiteten Metaphasen durchgeführt (Liebhart, 2009). Nach der 3D FISH wurden die Bilder wie bereits beschrieben bearbeitet und ausgewertet. Abb. 24 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse:

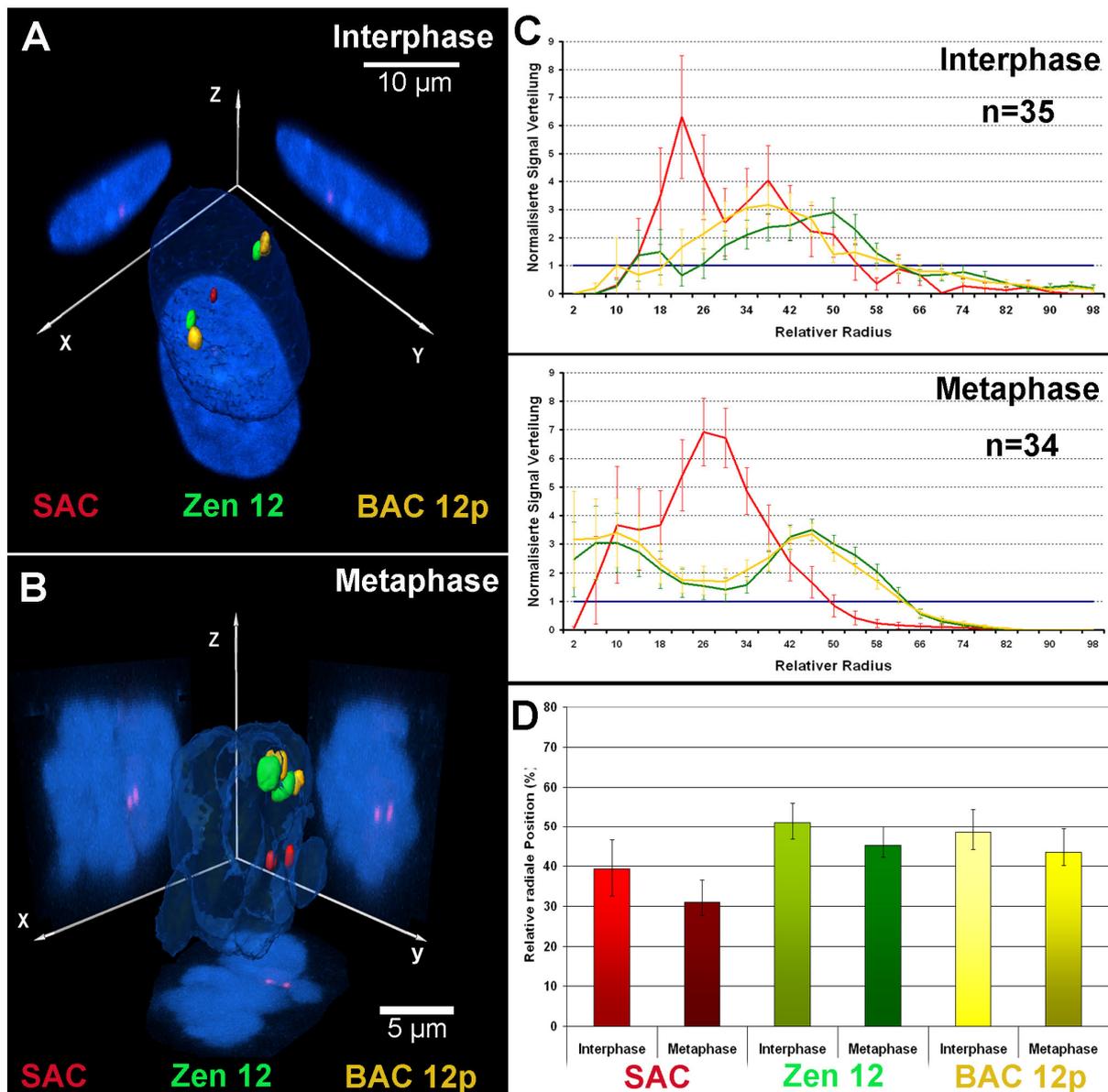


Abb. 24: Ergebnisse Fibroblasten+ SAC

Zu sehen sind 3D Rekonstruktionen von menschlichen Fibroblasten in Interphase (A) und Metaphase (B). Die Gegenfärbung mit DAPI ist in Blau, das Zentromer 12 in Grün sowie der BAC auf Chromosom 12 in Gelb zu sehen. Die SAC- Signale (rot) liegen in Inter- und Metaphase relativ zentral, was auch die Auswertung in (C) zeigt. Hier sind jeweils die normalisierten Werte von Interphase (C, oben; N=35) und Metaphase (C, unten; N=34) dargestellt. In (D) wurde von allen Kernen der Median ermittelt, um die Werte besser vergleichen zu können. Auch hier ist die Ordinate mit dem Kernradius gleichzusetzen und der Median zeigt den favorisierten Aufenthaltsort für die Hälfte aller Signale an. Im Gegensatz zu Zentromer 12 und BAC 12p ergab sich eine bevorzugte Lokalisation des SACs im Kernzentrum in Inter- und Metaphase, deutlicher aber in der Metaphase. Für das Zentromer 12 und den naheliegenden BAC 12p wurden ähnliche Werte errechnet, sie bevorzugen sowohl in Inter- als auch in Metaphase eine mittlere Position. Die Färbungen der Linien und Balken entsprechen den Signalen in (A+B). Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Die Graphen demonstrieren eine klare Präferenz von den kleinen SACs für eine Positionierung nahe dem Zentrum der zweidimensionalen Projektion des Zellkerns. In dreidimensionalen Kernen stellte sich heraus, dass die Hälfte der SAC- Signale mit der

Lamina assoziiert und die andere Hälfte im Kerninneren lokalisiert war. Diese Befunde widersprechen sich nicht, wenn man bedenkt, dass in flachen Kernen ein Signal nahe dem Kerninneren und nahe der Kernhülle sein kann (siehe Diskussion).

Die zentrale Lage der SACs in Projektionen ist in Metaphaseplatten noch ausgeprägter als in Interphasekernen. Der Großteil der Signale befindet sich innerhalb von 25-30% des relativen Radius (Abb. 24 C unten). Im Vergleich zu den SACs nehmen die Zentromersignale 12 und der naheliegende BAC auf Chromosom 12 eine mittlere Position im Zellkern ein, wie man es für Elemente eines mittelgroßen Chromosoms erwarten konnte. Ein paarweiser Vergleich der Medianwerte (RM ANOVA on Ranks) bestätigt eine signifikant zentralere Position des SAC im Vergleich zu den Signalen auf Chromosom 12 ($p < 0,001$). Der BAC und die Zentromersignale zeigen untereinander nur in Interphasekernen einen signifikanten Unterschied in der Positionierung, in Metaphaseplatten gleicht sich die relative Position (siehe Liebhart 2010).

4.2.2. HCVs auf Hamsterfibroblasten

In einem weiteren Experiment wurden HCVs, die modifizierten Varianten von SACs (Voet et al., 2003; Voet et al., 2001) in Zellen des chinesischen Hamsters und Mauszelllinien untersucht. Dabei lagen die Vektoren einmal in linearer und einmal in zirkulärer Form vor.

Die hier untersuchten HCVs tragen unter anderem alphaoide Sequenzen des menschlichen Zentromers 20. Der Nachweis erfolgte in den Hamsterzellen über eine menschliche Panzentromersonde. Nach dem Test der Zellen und der Sonde auf 2D Metaphasen (Liebhart 2009), wurden die 3D FISH Experimente durchgeführt, Zellen in Interphase und Metaphase gescannt und wie üblich ausgewertet. Für die Hamsterzellen zeigt sich folgendes Ergebnis:

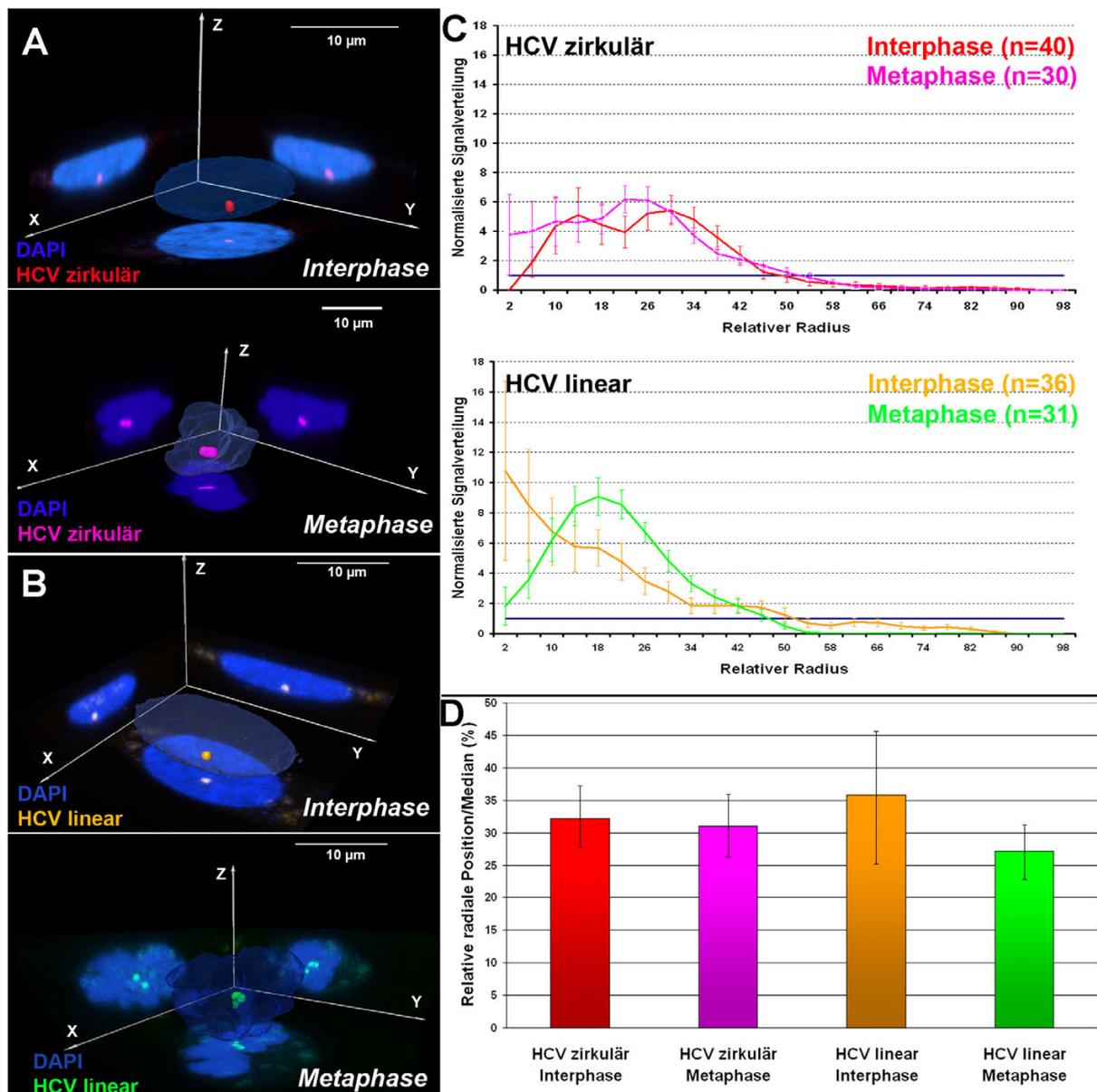


Abb. 25: Ergebnisse Hamsterfibroblasten+ HCV

Zu sehen sind 3D Rekonstruktionen von Fibroblasten des chinesischen Hamsters mit den HCV Signalen, die entweder in einer zirkulären (A) oder linearen (B) Form vorliegen. Die jeweils obere Abbildung zeigt die Zellen in der Interphase, die untere die Metaphase. In (C) sind die normalisierten Werte der 2D RRD Auswertung dargestellt, wobei der obere Graph für Zellen mit dem zirkulären Vektor steht und der untere für Zellen mit dem linearen Vektor. Deutlich zu sehen ist die zentrale Lage der HCVs, unabhängig von Zellzyklusphase und Vektorform. Rot und lila stehen für die zirkulären Vektoren in Interphase und Metaphase, gelb und grün jeweils für das Ergebnis des linearen Vektors in Interphasen und Metaphasen. Die blaue Linie gibt die normalisierte Gegenfärbung an. Kurvenverläufe über der Linie sprechen für eine hohe Signaldichte in diesem Bereich. In (D) sind die errechneten Mediane abgebildet (die Farben entsprechen den Signalen der Kerne und Kurven), die noch einmal deutlich die zentrale Lage der HCVs zeigen. Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf-Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Auch in Hamsterzellen zeigt sich in zweidimensionalen Untersuchungen die zentrale Lage der HCVs, unabhängig von Interphase oder Metaphase bzw. der Form des Vektors. Ein Großteil aller Signale befindet sich im inneren Drittel des Radius. Die Mediane zeigen keinen signifikanten Unterschied bei Zellen mit zirkulärem Vektor zwischen Interphase und

Metaphase, bei Zellen mit dem linearen Vektor ist die zentrale Lage ausgeprägter in der Metaphase und dementsprechend signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$). In den dreidimensionalen Interphasekernen gibt es je nach Vektorform deutliche Unterschiede in der Platzierung. Ein sehr hoher Anteil der zirkulären HCV- Signale sind mit der Kernhülle assoziiert (~85%), für den linearen Vektor zeigt sich keine Präferenz (~50:50).

4.2.3. HCVs in Maus A9- Zellen

Derselbe experimentelle Ansatz wurde nun auf Mauszellen durchgeführt. Der Nachweis in A9- Zellen, einer rearrangierten Fibroblastenlinie, erfolgte ebenfalls mit einer menschlichen Panzentromersonde.

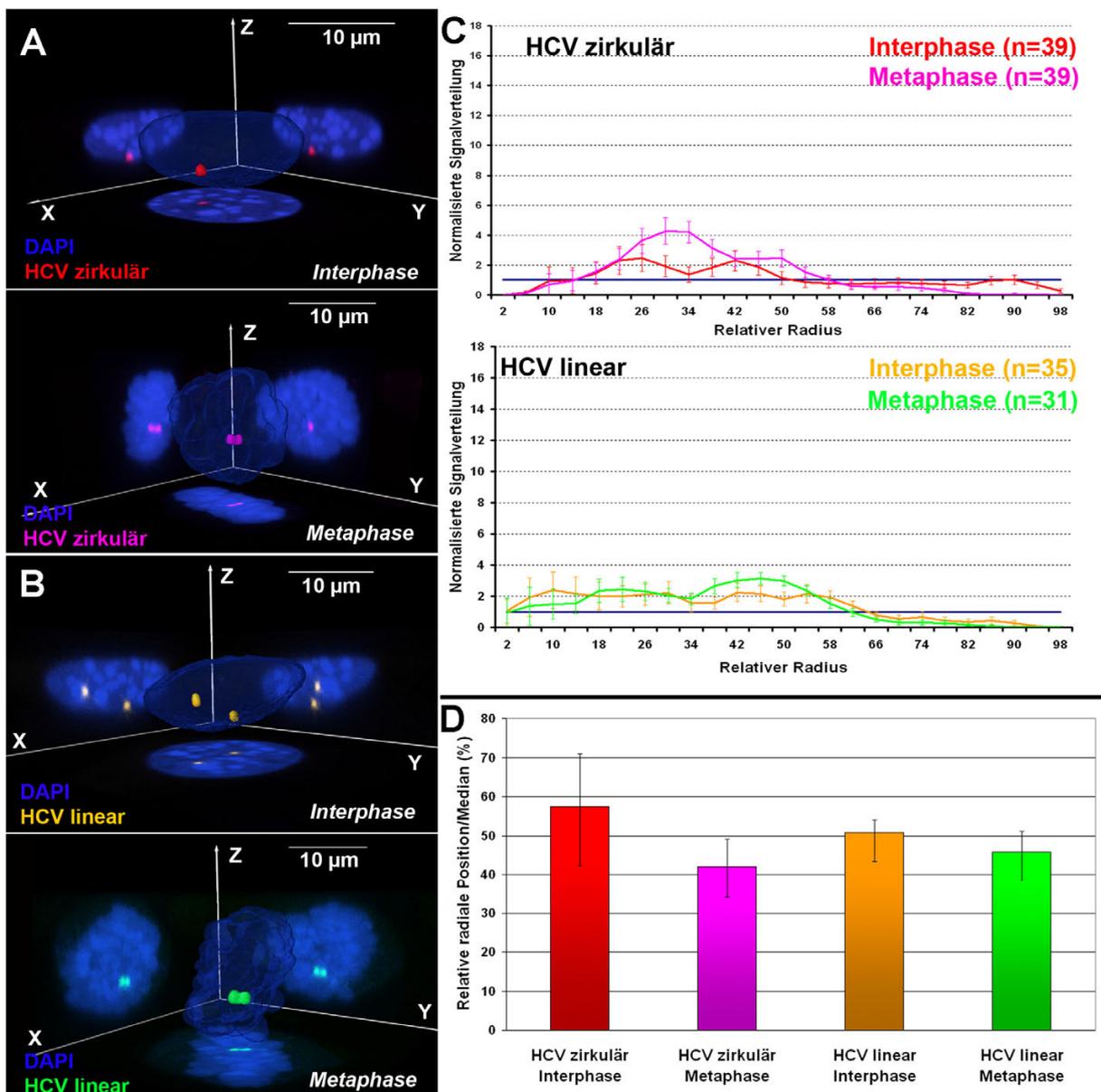


Abb. 26: Ergebnisse MausA9 Zellen+ HCV

3D Rekonstruktionen von Maus A9- Zellen in Interphase und Metaphase mit je einem oder zwei HCV- Signalen, die in zirkulärer (A) oder linearer (B) Form vorliegen. Die zweidimensionale normalisierte Auswertung in (C) zeigt eine bevorzugte Lage der Signale für einen mittleren Bereich zwischen Zentrum und Peripherie. Dies gilt sowohl für den zirkulären (C, oberer Graph) als auch den

linearen Vektor (C, unterer Graph) in den Interphasekernen. Wie auch die Mediane in (D) zeigen, ist in den mitotischen Kernen für beide Vektoren eine zentralere Position gegeben. Beim Doppelklick auf den jeweiligen Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Anders als in den Hamsterzellen, zeigen die Vektoren in den Projektionen der Maus A9-Interphasezellen keine eindeutige Präferenz für das Zentrum von 2D- Projektionen. In Metaphasenplatten mit dem zirkulären Vektor ist im Vergleich mit Interphasekernen eine signifikante radiale Anordnung zu erkennen ($p < 0,001$), beim linearen Vektor zeigt sich keine Signifikanz. Beachtenswert ist in diesem Zusammenhang, dass diese Zelllinie halbsphärische Zellkerne besitzt. Der zirkuläre Vektor ist in dreidimensionalen Zellen zu 71% an der Lamina lokalisiert, der lineare Vektor zeigt keine Präferenz (44%:56%).

4.2.4. HCVs in primären Mausfibroblasten

Da in der Maus A9 Zelllinie keine klare Bevorzugung für Peripherie oder Zentrum zu erkennen war, wurden die beiden Vektoren zusätzlich auf primären Mausfibroblasten getestet. Diese Zellen besitzen flache Kerne, es ist also wieder eine zentrale Lokalisation der Vektoren zu erwarten. Leider konnten auch nach mehrmaligen Versuchen keine Metaphasenplatten auf den Präparaten gefunden werden, deswegen wurden nur Interphasen untersucht.

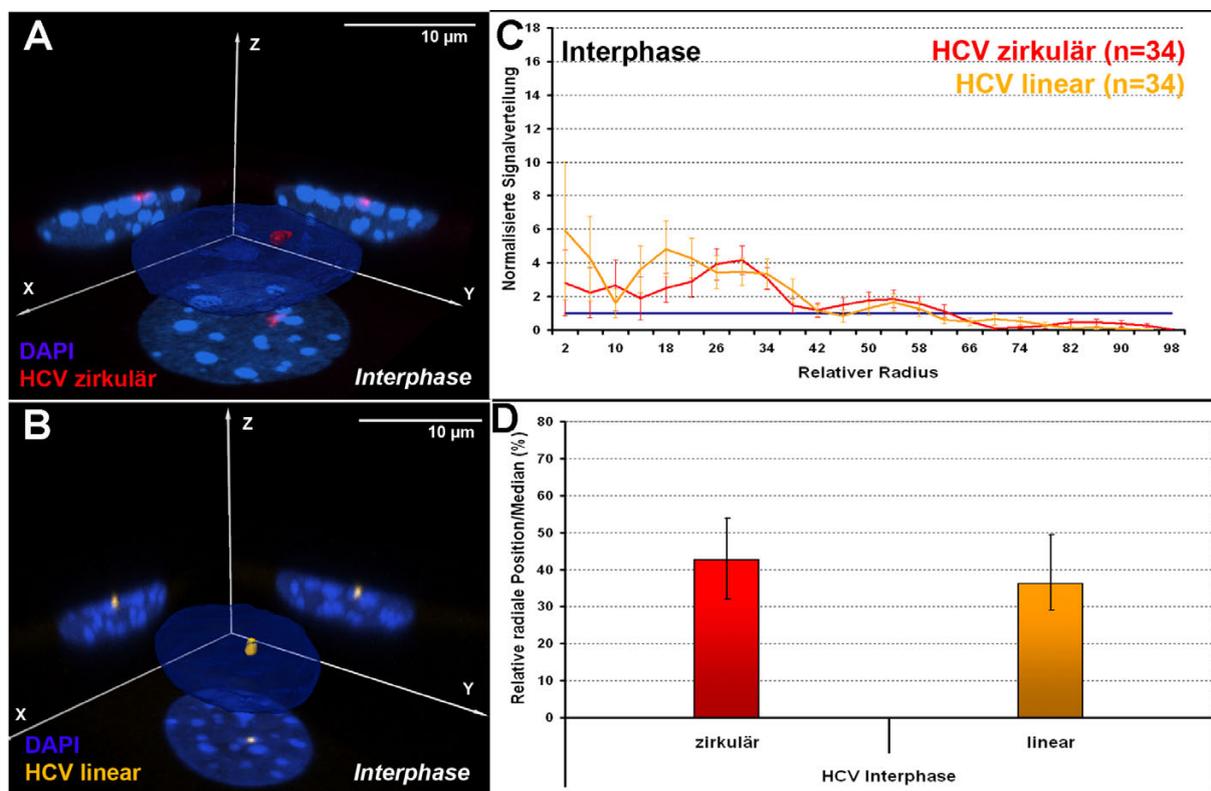


Abb. 27: Ergebnisse Maus primäre Fibroblasten+ HCV

3D Rekonstruktionen von Zellkernen primärer Mausfibroblasten mit den farbig markierten zirkulären (A, rot) und linearen (B, gelb) Vektoren in der Interphase. (C) zeigt die normalisierte Signalverteilung der Vektoren. Ebenso wie in (D) steht rot für den zirkulären und gelb für den linearen Vektor. Beide Kurven und ihre Mediane (D) offenbaren eine klare Lagepräferenz für das Kernzentrum. Beim

Doppelklick auf einen Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

In den flacheren Mausfibroblasten ist wieder eine klare Präferenz des Vektors für das 2D-Kernzentrum erkennbar. In Zellen mit dem linearen Vektor ist dies noch deutlicher zu sehen. Die Kurvenverläufe und Mediane für beide Vektoren sind jedoch ähnlich und nicht signifikant unterschiedlich.

Beide Vektoren zeigen in dreidimensionalen Zellen eine hohe Assoziation mit der Kernhülle, die zirkulären Vektoren sind sogar zu 96% assoziiert, die linearen zu 69%.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass sich in verschiedenen Zelltypen mit flachen Kernen kleine Chromatinstrukturen im zweidimensionalen Kontext sowohl in Interphasekernen als auch Metaphasenplatten bevorzugt nahe dem Kernzentrum aufhalten. Bei den halbsphärisch geformten Zellkernen der Maus-A9 Zellen wurde diese Präferenz in Interphasekernen nicht beobachtet.

4.2.5. HSR in Kelly Zellen

Im Anschluss an die Untersuchung der Verteilung von kleinen Chromatinstrukturen wurde in einem weiteren Experiment die Verteilung eines pathologisch vergrößerten Chromosoms untersucht. Es handelt sich um das Chromosom 17 in Kelly Zellen, einer Neuroblastomzelllinie mit flachen Kernen, die neben zahlreichen Rearrangements des Karyotyps eine HSR (*Homogeneously Staining Region*) aufweist. Sie entstand durch Translokation und Amplifikation des MYCN Gens. Dieses Gen liegt normalerweise auf Chromosom 2, hier lag es transloziert auf Chromosom 17 in 100- 120 Kopien vor. Als Folge erreicht das aberrante Chromosom 17 in etwa eine Größe von Chromosom 1 (siehe Liebhart, 2009 und Solovei et al., 2000).

Von normalen HSA17 Territorien war bereits aus anderen Experimenten bekannt, dass sie bevorzugt nahe am Zentrum von flachen Zellkernen liegen. Die Frage, die jetzt beantwortet werden sollte, war, ob sich das vergrößerte Chromosom 17 mit der HSR wie ein großes Chromosom im Kern verteilt oder wie ein normales HSA 17.

Dazu wurden Sonden der amplifizierten Region auf Kellyzellen hybridisiert (zur Testung der verwendeten Sonden in 2D Metaphasen siehe Liebhart 2009). Als Kontrollen wurden zusätzlich HSA 4 und HSA 18 Territorien als Referenz für ein großes und ein kleines Chromosom verwendet. Wie beschrieben wurden Inter- und Metaphasen gescannt, bearbeitet und die Projektionen ausgewertet.

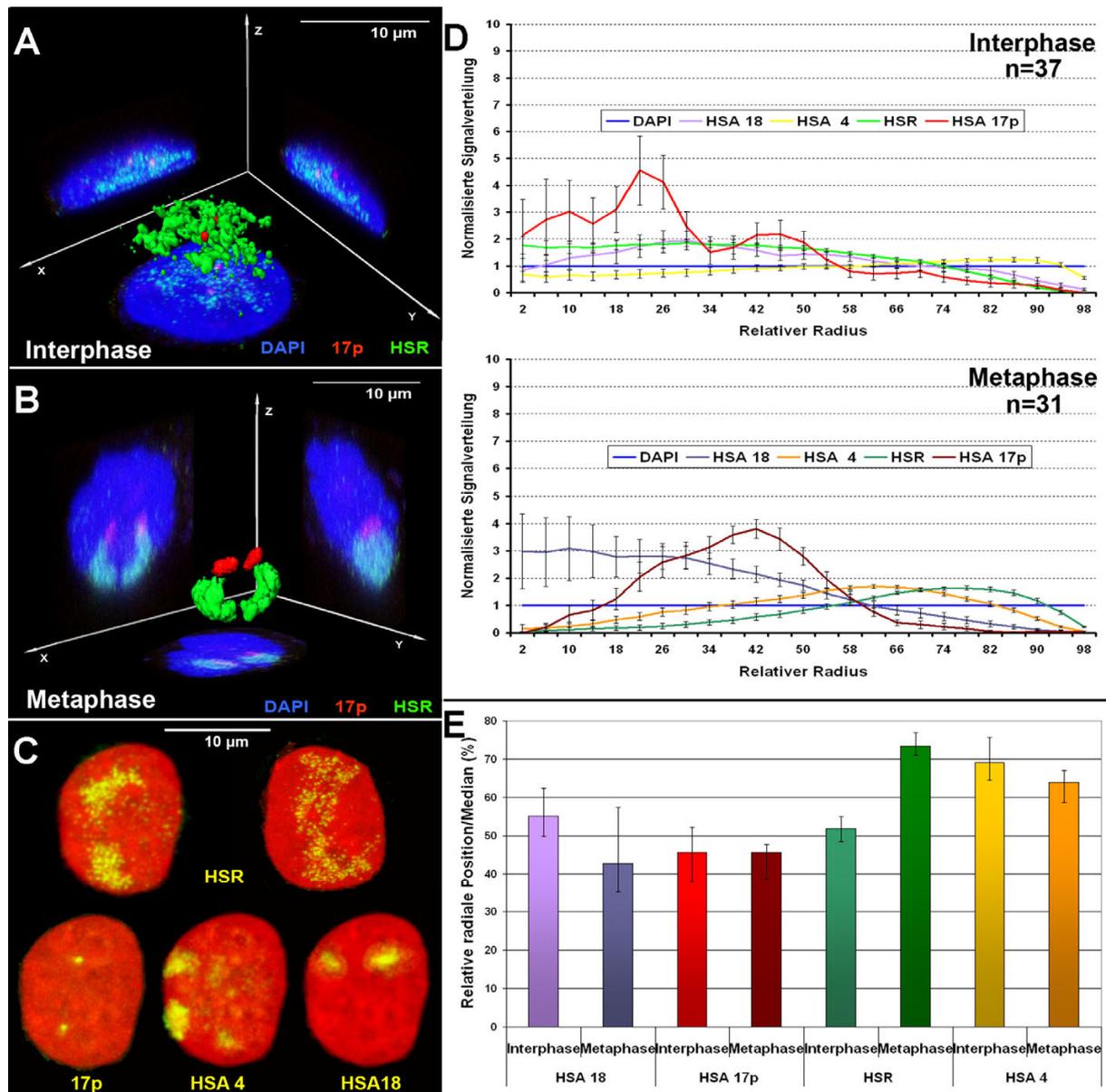


Abb. 28: Ergebnis Kelly Zellen mit HSR

(A) und (B) zeigen 3D Rekonstruktionen und Projektionen von Interphasen und Metaphaseplatten von Kelly Zellen mit einer HSR auf dem q- Arm von Chromosom 17 (grün) und einer spezifischen Sonde für den p-Arm von HSA17 (rot). In (C) zeigen oben 2 Beispiele von z- Projektionen die Verteilung der HSR im Kern. Links sind zwei diskrete HSR Territorien erkennbar, rechts eine den ganzen Kern durchziehende Struktur. Unten sind 17p und als Kontrollen die Territorien von HSA4 und HSA18 als Projektionen dargestellt. (D) stellt die normalisierten Ergebnisse von 2D RRD dar, oben für Interphasekerne und unten für Metaphaseplatten und (E) die entsprechenden Mediane. Beim Doppelklick auf die Kerne in (A) und (B) öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Wie Abb. 28 zeigt, besitzen die HSRs in Interphasen eine stark dekondensierte Struktur. In der Mehrzahl der Zellen sind die beiden HSRs nicht voneinander zu trennen, nur in wenigen Kernen erkennt man separate HSR- Territorien. Die Auswertung mit 2D RRD liefert zwar einen Wert der HSR für eine mittlere Lage im Interphasekern, durch die starke Dekondensation und die nötige Segmentierung der Signale ist eine seriöse Beurteilung der Lage in der Interphase nicht möglich (siehe Diskussion). In Metaphaseplatten nehmen die

kondensierten Chromosomen eine stark periphere Lage ein. Im Gegensatz dazu ist der p- Arm des aberranten HSA 17, in beiden Phasen mehr in Richtung Zentrum verschoben (Abb. 28B). HSA4 und HSA 18 Territorien zeigen die erwarteten größenabhängigen Unterschiede in der Positionierung: HSA 4 zeigt sowohl in Inter- als auch Metaphase eine Lokalisation in der Peripherie, bei HSA 18 ist eine klare Positionierung im Zentrum nur in der Metaphase gegeben. Hier ist anzufügen, dass beide CTs in 2D- Metaphasen kleinere Translokationen aufwiesen. Deswegen können sie nur eingeschränkt als Referenz für normale Chromosomenterritorien verwendet werden. Ein paarweiser Vergleich der Medianwerte lieferte folgende Signifikanzen:

Kelly Interphase	HSR	HSA18	HSA 17p
HSA 4			
HSR			
HSA 18			
Kelly Metaphase	HSR	HSA18	HSA 17p
HSA 4			
HSR			
HSA 18			

Tabelle 3: Signifikanzen Kelly Zellen

Die Tabelle gibt einen Überblick über die signifikanten Unterschiede zwischen den Medianen der einzelnen CTs. Es wurde eine RM ANOVA on Ranks durchgeführt mit einem Konfidenzintervall von 95%. Grüne Felder zeugen von signifikanten Unterschieden ($p < 0,05$), mit roter Farbe sind Felder hinterlegt, wo es keine signifikanten Unterschiede gibt.

Wie man in der Tabelle sehen kann, ist die HSR durch die stark dekondensierte und über den ganzen Kern verteilte Struktur in der Interphase nicht signifikant unterschiedlich verteilt zu den anderen CTs. HSA4 dagegen zeigt im Vergleich zu HSA 18 und 17p eine signifikant zum Kernrand hin verschobene Lage, während sich die radiale Verteilung von HSA 18 und 17p nicht signifikant voneinander unterscheidet. In Metaphaseplatten bietet sich ein anderes Bild: Durch die stark periphere Lage der HSR gibt es keinen signifikanten Unterschied zu HSA 4, dafür aber zu den zentraler gelegenen kleinen CTs. Diese zeigen untereinander wie schon in der Interphase keinen Unterschied in der Verteilung.

Zusammenfassung:

Die untersuchten Minichromosomen, sowohl SACs als auch HCVs, zeigen unabhängig von ihrer zirkulären oder linearen Form eine größenbasierte Verteilung in menschlichen, murinen und Hamsterzelltypen mit einem flachen Kern. In Metaphasenplatten ist die zentrale Positionierung ausgeprägter. Die halbsphärisch geformten Zellkerne von Maus A9- Zellen zeigen diese Verteilung jedoch nicht. Die Verteilung der HSR auf Chromosom 17 in der Interphase ist aufgrund der dekondensierten Struktur nicht zu beurteilen. Im kondensierten Zustand der Metaphase ist der q-Arm mit der Amplifikation stark peripher, während der p-Arm in Richtung Zentrum orientiert ist.

4.3. Radiale Verteilung von Zentromeren großer und kleiner Chromosomen in Inter- und Metaphase

Der Nachweis einer größenabhängigen radialen Verteilung von ganzen Chromosomen in Interphasekernen und Metaphaseplatten führte zu der Frage, ob es ebenfalls eine radiale Verteilung von Zentromeren großer und kleiner Chromosomen gibt. Wenn kleine Chromosomen tendenziell im Kernzentrum liegen, sollte auch das dazugehörige Zentromer zentral angeordnet sein. FISH Experimente an menschlichen Fruchtwasserzellen mit zweidimensionaler Auswertung der flachen Zellkerne zeigten, dass die Zentromere von großen Chromosomen signifikant näher am Kernrand liegen als die Zentromere kleiner Chromosomen (Cremer et al., 2001). Dabei ist zu beachten, dass eine bei einer zweidimensionalen Auswertung beobachtete zentrale Lage von Zentromerregionen kleiner Chromosomen nicht die Möglichkeit ausschließt, dass diese Regionen eine bevorzugte Lage nahe der dreidimensionalen Kernperipherie einnehmen.

Bisher wurde die radiale Verteilung von Zentromeren hauptsächlich in kugelförmigen Zellkernen von Lymphozyten untersucht (Alcobia et al., 2000; Weimer et al., 1992) bzw. mit Hilfe von chromosomenspezifischen Perizentromersonden die relative Lage in Bezug auf das zugehörige CT (Weierich et al., 2003). In diesen Kernen zeigt sich aber eine vorwiegend gendichteabhängige Verteilung von CTs. Dementsprechend fand sich auch keine Korrelation zwischen der Verteilung der Zentromere und der Chromosomengröße. Das Gros an Zentromersignalen liegt in diesen Zellen in der Peripherie der Kerne (Solovei et al., 2004b; Weierich et al., 2003). Mit Hilfe von sog. Panzentromersonden wurde die dreidimensionale Lage von Zentromeren auch in Fibroblasten untersucht. Dabei ergab sich, dass Zentromere zyklusabhängig eine weitgehend periphere Lage einnehmen und die wenigen zentral liegenden Zentromere meist mit dem Nukleolus assoziiert sind (Solovei et al., 2004b).

Für die vorliegende Arbeit wurden Pools von Zentromersonden gebildet, die von CTs unterschiedlicher Größe stammen. Analog zu den weiter oben beschriebenen Experimenten wurden die Zentromere großer Chromosomen (HSA 1, 3), mittelgroßer Chromosomen (HSA 7, 8, X), NOR-tragender (13, 14, 15, 21, 22) und eines kleinen Chromosoms (HSA 18) untersucht. Die Mehrzahl der Sonden wurde von Gabrielle Weißer im Zuge ihrer Diplomarbeit hergestellt und getestet (Weißer, 2005). Es wurde, wie schon in 4.1 beschrieben, 3D Mehrfarben-FISH-Experimente mit den Zentromersonden-Pools durchgeführt, jeweils eine bestimmte Anzahl an Kernen in Inter und Metaphase gescannt und die Projektionen für

die 2D- Auswertung bearbeitet. Die anschließende Evaluation ergab folgende radiale Verteilung:

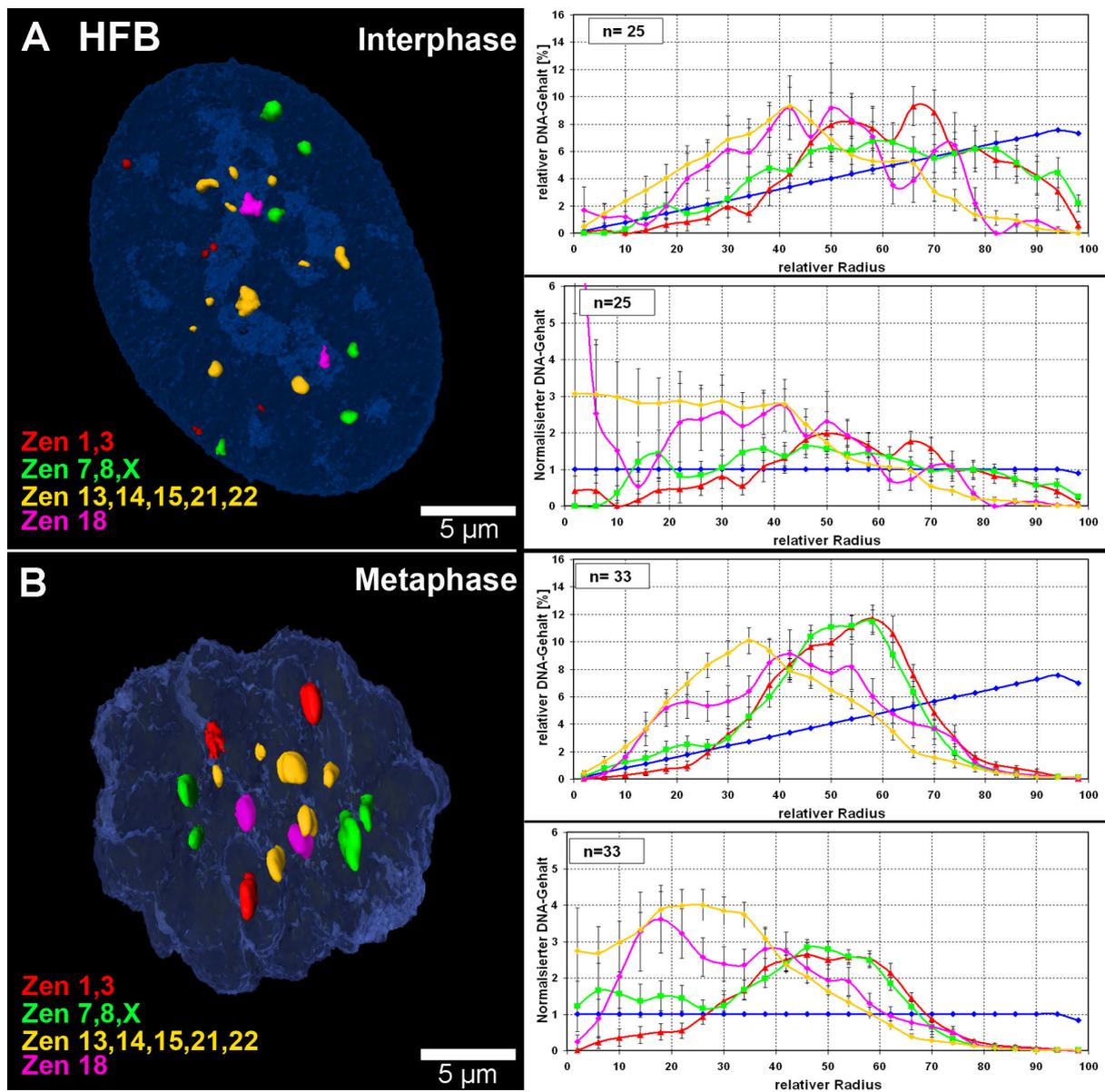


Abb. 29: Ergebnisse radiale Verteilung von Zentromeren in humanen Fibroblasten

Projizierte 3D- Rekonstruktionen von Kernen humaner Fibroblasten in Interphase (A) und Metaphase (B). Rot steht für die Zentromere großer Chromosomen (von HSA 1, 3), grün für Zentromere mittelgroßer Chromosomen (von HSA 7, 8, X), gelb für die Zentromere aller NOR- tragender Chromosomen (von HSA 13, 14, 15, 21, 22) und rosa für das Zentromer von HSA 18 (kleines Chromosom). Rechts sind die radialen Verteilungen der verschiedenen Zentromer- Pools dargestellt. Die farbigen Linien entsprechen den Färbungen der Zentromer-pools. Die jeweils oberen Graphen zeigen eine heterogene Verteilung. In den normalisierten Graphen (jeweils unten) wird deutlich, dass es für Zentromere NOR- tragender Chromosomen und kleiner Chromosomen eine starke Tendenz zu einer zentralen Lage gibt, während Zentromere großer und mittlerer Chromosomen sowohl in Interphasekernen als auch Metaphaseplatten stärker peripher liegen. Deutlich zu sehen ist in den Auswertungen in (B), dass ab etwa 80% des Radius nach außen keine Signale mehr vorhanden sind. Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Auch hier gibt es also eine klare Tendenz zur Anordnung nach Größe im Zellkern mit Zentromeren großer Chromosomen in der Peripherie und Zentromeren kleinerer Chromosomen in Richtung Kernzentrum, ebenso wie bei ganzen CTs (4.1). Wie erwähnt, finden sich in Metaphasen außerhalb von ca. 80% des Radius keine Zentromersignale mehr, da die Zentromere durch die Kräfte der Mikrotubuli im Zentrum angeordnet werden (Fletcher, 1994).

Dieses Phänomen erklärt folgende Bilderserie, die die Anordnung von Zentromeren im Verlauf der Mitose bis zur Metaphase zeigt:

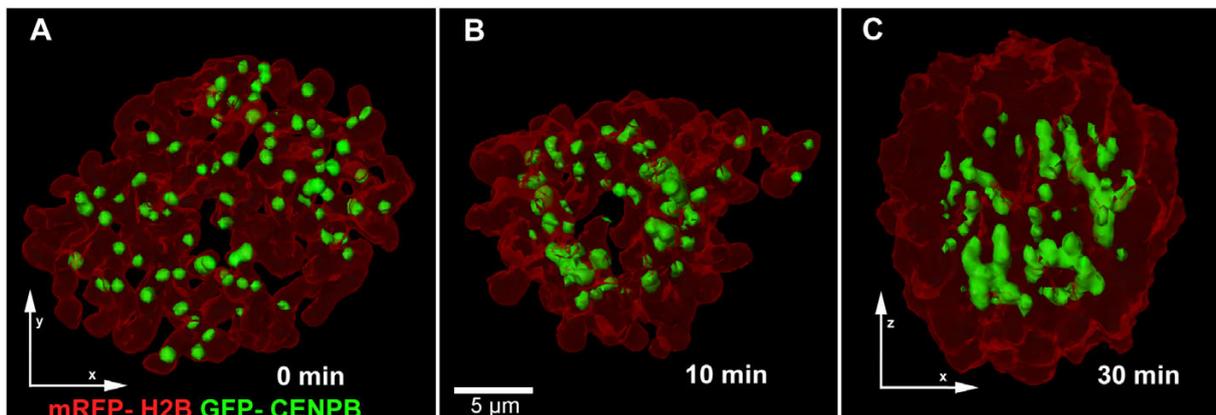


Abb. 30: 3D- Rekonstruktion einer Metaphasenplatte mit Zentromersignalen

3D Rekonstruktionen von Lebendzellaufnahmen eines U2OS- Zellkerns in der Mitose. Die Zelle ist stabil transfiziert mit mRFP- H2B als Gegenfärbung und GFP- CENPB als Zentromermarker (erhalten von Astrid Visser). (A) zeigt den Kern während der Prophase mit den kondensierten Chromosomen. In (B) ist eine Prometaphasenrosette zu sehen. In der Mitte befindet sich ein Loch, durch das die Mikrotubuli verlaufen (nicht gezeigt). Senkrecht zu diesem Loch an den Enden der Mikrotubuli liegen die beiden Zentrosomen (nicht gezeigt). Die Zentromere liegen um dieses Loch herum angeordnet und haben immer Kontakt zu den Mikrotubuli (für weitere Beispiele und eine detailliertere Beschreibung siehe Strickfaden et al. 2010). Im weiteren Verlauf werden die Zentromere durch die Kräfte der Mikrotubuli in die Mitte gezogen (Fletcher, 1994) und füllen das Loch, wodurch die Bildung der Metaphasenplatte abgeschlossen wird (C). Gut zu sehen sind die Zentromere in der Mitte der Projektion und der zentromerfreie Rand. Beim Doppelklick auf die Kerne öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Wie in den Experimenten in 4.1 wurde auch hier der Median berechnet, um über die bevorzugte Lage der Zentromere besser urteilen zu können: Die folgende Abbildung zeigt die Mediane der verschiedenen Gruppen im Vergleich zwischen Inter- und Metaphase:

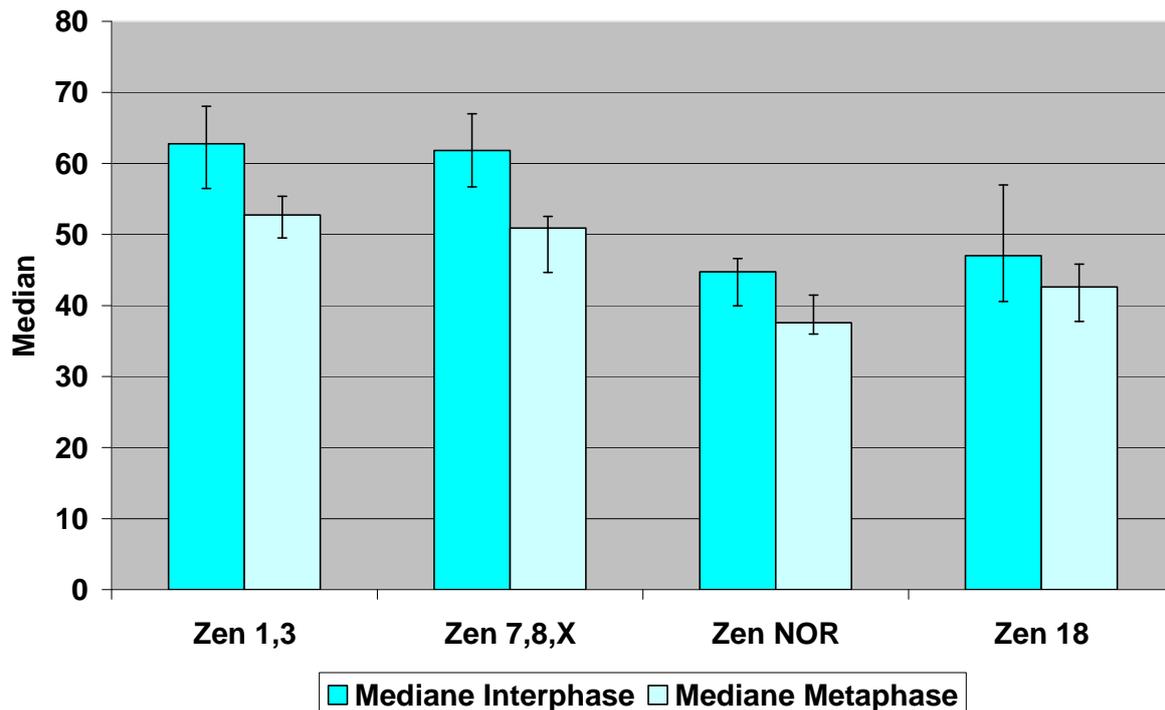


Abb. 31: Mediane der radialen Zentromerverteilung

Der Graph zeigt die Mediane, die über den bevorzugten Aufenthaltsort von Zentromeren in Interphasekernen und Metaphaseplatten Auskunft geben. Der Wert zwischen Zentromeren von großen und mittleren Chromosomen ist sowohl in Interphase als auch in der Metaphase relativ gleich, dafür aber deutlich unterschiedlich zum Wert von Zentromeren von NOR- und kleinen Chromsomen. NOR-tragende, nukleolusassoziierte Zentromere sind tendenziell sogar noch zentraler lokalisiert, als das Zentromer 18. Deutlich zu sehen ist der jeweils um etwa 10% kleinere Medianwert der Zentromerpool in Metaphaseplatten, was sich durch die zentralere Anordnung aller Zentromere und einen zentromerfreien Rand erklären lässt (siehe Abb. 30). Die Fehlerbalken zeigen den Fehler nach unten und oben im 95% Konfidenzintervall.

Eine Varianzanalyse (RM ANOVA on Ranks) bestätigt die Unterschiede zwischen den verschiedenen Pools bezüglich ihrer Lokalisation in Inter- und Metaphase:

HFB Zentromere Interphase	Zen 7,8,X	Zen 13,14,15,21,22	Zen 18
Zen 1,3			
Zen 7,8,X			
Zen 13,14,15,21,22			
HFB Zentromere Metaphase	Zen 7,8,X	Zen 13,14,15,21,22	Zen 18
Zen 1,3			
Zen 7,8,X			
Zen 13,14,15,21,22			

Tabelle 4: Signifikanzen der radialen Zentromerverteilung

Übersicht über die Varianzanalyse (RM ANOVA on Ranks). Für jeden Pool wurde für jeden Kern der Median berechnet und über alle Mediane einer Gruppe die Varianz zwischen den verschiedenen Gruppen ermittelt. Grüne Farbe bedeutet, dass sich die Gruppen signifikant unterscheiden ($P < 0,001$ mit einem Konfidenzintervall von 95%) und Rot dass es keinen signifikanten Unterschied gibt.

Wie die Tabelle zeigt, gibt es keinen nachweisbaren Unterschied in der Lokalisation von großen und mittleren Chromosomen in der Interphase und zwischen NOR- tragenden und kleinen Chromosomen. Überraschenderweise sind in Metaphaseplatten auch die mittleren und

das kleine Zentromer 18 nicht signifikant unterschiedlich lokalisiert. Eine Regressionsanalyse bestätigt einen linearen Zusammenhang zwischen Größe des CTs und der Positionierung des Zentromers im Kern mit einem R^2 von 0,9569.

In einem weiteren kleinen Versuch im Zuge der Diplomarbeit von Isabel Liebhart wurde die Lage der Zentromere 3, 17 und 18 in Interphasekernen und Metaphaseplatten von Kelly Zellen untersucht. Dieser Zelltyp ist, wie oben erwähnt, stark rearrangiert. Während von den Zentromeren 3 und 17 jeweils 2 deutliche Signale zu sehen waren, lieferte das Zentromer 18 mehrere Signale (siehe Liebhart 2009). Einen Überblick über das Experiment zeigt Abb. 32:

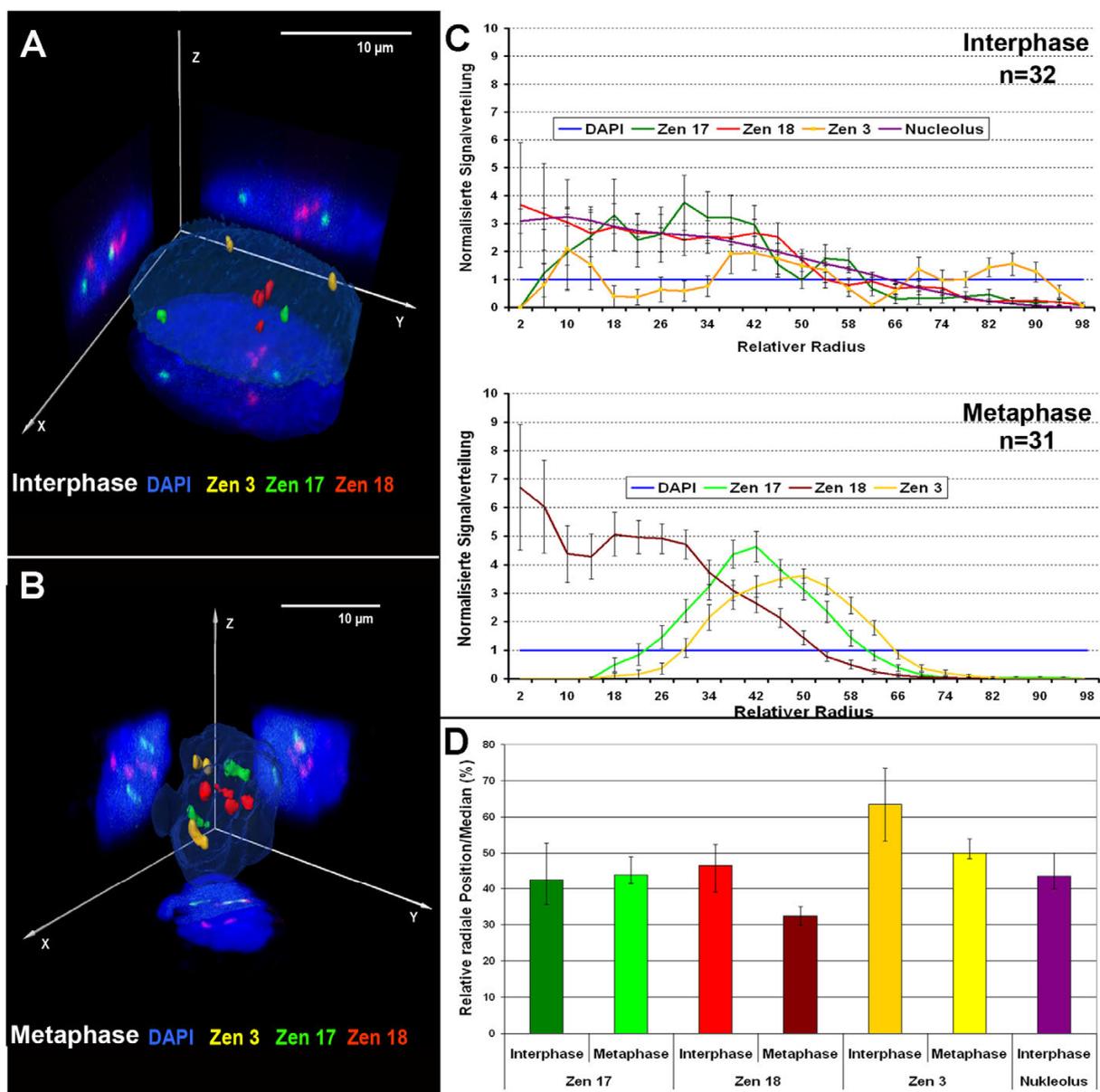


Abb. 32: Radiale Verteilung von Zentromeren in Kelly Zellen (nach Liebhart 2009)

3D- Rekonstruktionen von Interphasekernen (A) und Metaphaseplatten (B) von Kelly Zellen mit den Zentromeren 3 (gelb), 17 (grün) und 18 (rot). Die Farben entsprechen den Kurvenverläufen und Medianen in (C) und (D). (C) Ergebnisse der 2DRRD Auswertung in Interphasekernen (oben) und

Metaphaseplatten (unten). Die resultierenden Mediane sind in (D) zu sehen. Als Referenz für eine zentrale Position im Kern wurde in Interphasen der Nukleolus mitgefärbt, dieser ist im Graph lila eingefärbt. Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Wie Abb. 32 (D) zeigt, sind die Zentromere 17 und 18 relativ zentral gelegen, 18 in der Metaphase sogar deutlich. Während Zentromer 3 zumindest in der Interphase eine periphere Position einnimmt, liegt es in der Metaphase zentraler. Hier ist derselbe Effekt zu sehen, wie oben beschrieben, die Zentromere liegen in den inneren 70- 80% des Radius, was Abb.32C (unten) klar zeigt. In der Interphase gibt es einen signifikanten Unterschied in der Positionierung zwischen Zentromer 3 und den beiden Zentromeren kleiner Chromosomen, in der Metaphase zwischen Zentromer 3 und 18, aber auch zwischen den Zentromeren 17 und 18.

Zusammenfassung:

Die radiale Lage von Zentromeren entspricht im Großen und Ganzen der radialen Verteilung der entsprechenden CTs in Zelltypen mit flachen Kernen. Auch hier zeigt sich eine größenbasierte Verteilung mit den Zentromeren großer Chromosomen in der Peripherie und den Zentromeren kleiner und NOR- tragender Chromosomen im Kernzentrum sowohl bei Fibroblasten als auch bei Kelly- Zellen. Diese Lage ist sowohl in Interphasekernen als auch Metaphaseplatten zu finden, die Lage in der Metaphase ist aber immer zentraler.

4.4. Bevorzugte Assoziationen von Zentromeren an Nukleolus und Lamina in Abhängigkeit der größenabhängigen Lokalisation ihrer CTs

Im Anschluss an die beschriebenen Analysen von Zentromerpools wurde nun die Positionen individueller Zentromere mit chromosomenspezifischen Zentromersonden genauer untersucht, v. A. was die Assoziation mit dem Nukleolus bzw. der Kernperipherie betrifft.

Für Zentromere von kleinen und NOR- Chromosomen, die in Zellen mit flachen Kernen bevorzugt im Zentrum liegen, besteht die Möglichkeit einer bevorzugten Assoziation mit dem perinukleolären Heterochromatin der ebenfalls bevorzugt zentral angeordneten Nukleoli. Für Zentromere großer und mittlerer Chromsomen, die bevorzugt in der Peripherie des Zellkerns liegen könnte die Lamina bevorzugter Anheftungspunkt sein.

Um das herauszufinden, wurden menschliche Fibroblasten (HFB 0,Horvath, XX) kultiviert und vor der Fixierung für 45 Minuten mit BrdU gepulst. Mit einer Kombination aus FISH und Immunfluoreszenzexperiment wurden jeweils zwei verschiedene Zentromere, der Nukleolus

und BrdU angefärbt. Die BrdU- Färbung dient als Marker für Zellen in der S- Phase und es wurden nur Kerne mikroskopiert, die sich in der mittleren bis späten S-Phase befanden.

Da nicht für alle Zentromere spezifische FISH Sonden zur Verfügung standen, wurden auch andere zentromernahe Marker verwendet. Dazu zählen eine Sonde des großen, perizentromerischen Heterochromatinblocks auf 1q12, ein BAC- Klon (RP11-139J6) nahe dem Zentromer von HSA2 sowie der BAC Klon RP11-108H13 nahe dem Zentromer von HSA20. Beim Y- Chromosom gibt es ebenfalls am Zentromer einen heterochromatischen Block, der in Kernen männlicher Fibroblasten untersucht wurde.

Von 40 Kernen wurden konfokale Serienschritte aufgenommen und von allen 3D Rekonstruktionen angefertigt. Die Rekonstruktionen und entsprechende Rohbilddaten wurden verwendet, um visuell die Lage der Zentromere im dreidimensionalen Kern zu bestimmen. Die Einteilungskriterien waren Assoziation mit dem Nukleolus, Assoziation mit der Peripherie bzw. Lamina oder eine Lage dazwischen. Assoziation mit dem Nukleolus wurde so definiert, dass mindestens ein Pixel des Zentromersignals mit der B23- Färbung überlappt. Leider konnte aufgrund der Farbenlimitierung am Mikroskop kein Laminamarker integriert werden, deswegen war die Abschätzung der peripheren Lage bzw. einer Assoziation mit der Lamina schwierig. Als assoziiert mit der Lamina wurden Signale gewertet, die nicht weiter als etwa eine Signalgröße von einer schwellwertbasierten Darstellung der Kernoberfläche entfernt waren.

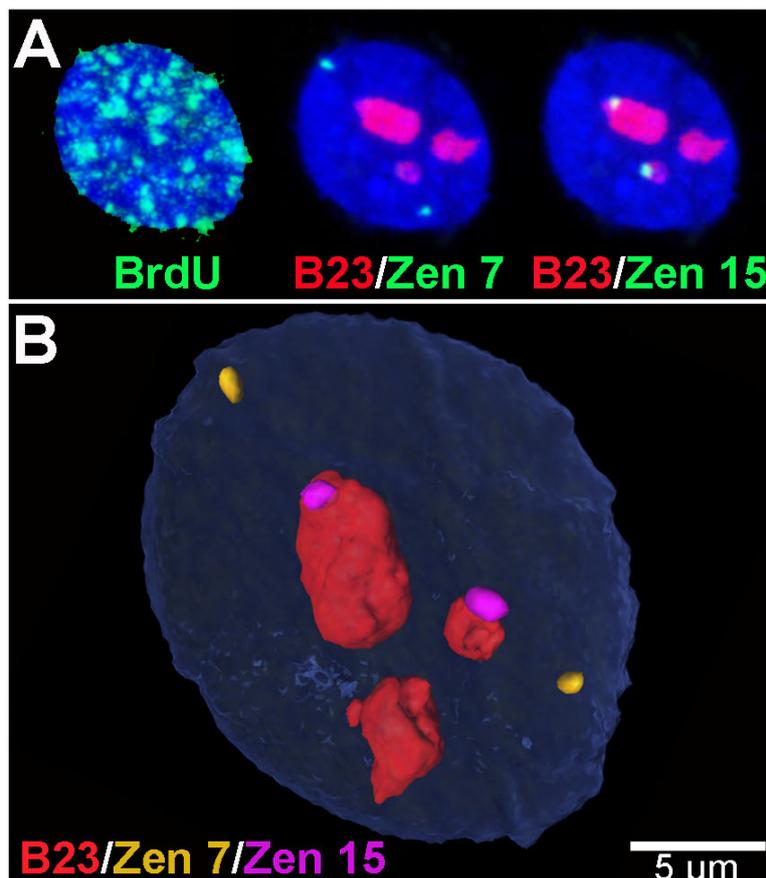


Abb. 33: Beispiel für bevorzugte Assoziationen von Zentromeren

(A) Z-Projektionen eines typischen Fibroblastenkerns in der späten S-Phase mit DAPI (blau) und BrdU (links, grüne Signale). In der Mitte ist die B23 Färbung des Nukleolus in roter Farbe dargestellt, dazu in grün die beiden Zentromere 7, auf der rechten Seite die assoziierten Signale der Zentromere 15. (B) zeigt eine 3D Rekonstruktion des gleichen Kerns mit den B23 Signalen, den assoziierten Signalen von Zentromer 15 und den laminassoziierten Signalen von Zentromer 7. Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die ausgezählten prozentualen Anteile von Assoziationen aller untersuchten Zentromersignale:

	Nukleolus	Peripherie	Nukleoplasma
Zen 1 HBI.	46,25%	35%	18,75%
Zen 2 BAC	23,75%	36,25%	40%
Zen 3	22,5%	50%	27,5%
Zen 4	41,25%	40%	18,75%
Zen 7	38,75%	48,75%	12,5%
Zen 8	43,75%	33,75%	22,5%
Zen X	31,25%	38,75%	30%
Zen 12	46,25%	51,25%	2,5%
Zen 13/21	84,38%	8,13%	7,5%
Zen 14/22	93,13%	4,38%	2,5%
Zen 15	82,5%	12,5%	5%
Zen 17	43,75%	41,25%	15%
Zen 18	71,25%	21,25%	7,5%
Zen 20 BAC	42,5%	47,5%	10%
Zen Y HBI.	60%	28%	12%

Tabelle 5: Prozentuale Anteile von Zentromerassoziationen

Zu sehen sind die prozentualen Anteile von Assoziationen mit dem Nukleolus und der Peripherie bzw. einer Lage der Zentromere im Nukleoplasma nicht assoziiert mit einer der beiden Strukturen. Die Zentromere sind aufsteigend nach der Größe des dazugehörigen CTs angeordnet.

Wie die Tabelle zeigt, weisen vor allem die Zentromere 13, 14, 15, 21 und 22 eine sehr hohe Assoziation mit dem Nukleolus auf. Dies war zu erwarten, da die akrozentrischen Chromsomen auf dem kurzen Armen NOR- Regionen besitzen. Die Zentromere größerer und mittlerer Chromsomen von 1- 12 und X zeigen deutlich niedrigere Assoziationswerte mit dem Nukleolus, dafür liegt ein höherer Anteil außen an der Peripherie bzw. sind weder mit Nukleolus noch Lamina assoziiert. Die Assoziationswerte für diese Zwischenlage sind z.T. sehr hoch, z.B. bei Zentromer 2 und X. Für die Zentromere kleinerer Chromosomen ist das Bild sehr unterschiedlich, die Zentromere 18 und Y zeigen einen hohen Assoziationswert mit dem Nukleolus. Die Zentromere 17 und 20 haben dagegen einen hohen Anteil an der Peripherie, während im Zwischenraum nur wenige Signale zu finden sind.

Um einen Zusammenhang zwischen Größe und Nukleolusassoziation bzw. Peripherieassoziation herzustellen, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Das Ergebnis zeigt folgende Abbildung:

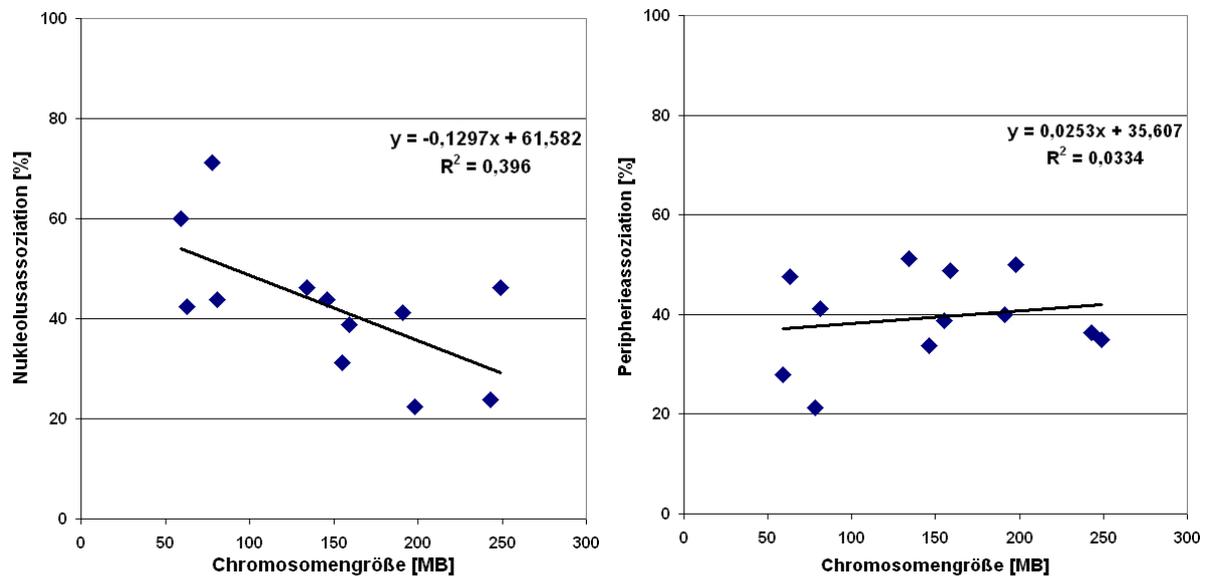


Abb. 34: Regressionsanalyse Zentromerassoziationen

Regressionsanalysen zwischen der Chromosomengröße (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> und <http://genome.ucsc.edu/>) und den prozentualen Assoziationen mit dem Nukleolus (links) oder der Peripherie (rechts). Es lässt sich kein linearer Zusammenhang bilden zwischen Chromosomengröße und bevorzugter Lage der Zentromere an Nukleolus oder Peripherie. Die Werte für die NOR-tragenden Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 scheiden aufgrund der speziellen Situation aus und sind hier nicht eingezeichnet.

Wie die Regressionsanalyse zeigt, gibt es keinen linearen Zusammenhang zwischen Größe des Chromosoms und dem Anteil an Nukleolusassoziationen ($R^2 = 0,396$). Die Daten sprechen auch klar gegen die Annahme einer verstärkten Assoziationen mit der Peripherie bei zunehmender Chromosomengröße ($R^2 = 0,0334$).

Zusammenfassung:

Ein linearer Zusammenhang zwischen einer bevorzugten Assoziation mit dem Nukleolus (für kleine Chromosomen) oder der Zellkernperipherie (für große Chromosomen) der entsprechenden Zentromere ist in menschlichen Fibroblasten nicht erkennbar.

4.5. Ähnlichkeit von Tochterzellklonen

Die Ähnlichkeiten der radialen Anordnung in Interphasekernen und Metaphaseplatten, die in den vorhergehenden Experimenten gefunden wurden, werfen die Frage auf, ob radiale Anordnungen und möglicherweise auch Nachbarschaftsanordnungen von CTs in einem Mutterzellkern in der Interphase über die Mitose hinweg auf die Tochterkerne übertragen

werden? Ähnlichkeiten von Nachbarschaftsanordnungen zwischen Tochterkernen besagen nicht, ob auch eine Ähnlichkeit mit dem Mutterkern besteht oder welche Änderungen im Verlauf einer Zellteilung auftreten. Auslöser der Untersuchungen waren die gegensätzlichen Resultate von Gerlich et al. (2003) und Walter et al. (2003). Gerlich et al. (2003) folgerten aus ihren Resultaten, dass das Ausmaß an Ähnlichkeiten zwischen der Anordnung von CTs im Mutterzellkern und Tochterzellkernen von der Spindelposition während der Prometaphase abhängt. Dennoch sei die Ähnlichkeit der Anordnung in Tochterzellen mit dem Mutterzellkern von der Position der Spindel unabhängig. Daraus schlossen die Autoren, dass ein spezifischer Anaphasemechanismus existiert, der die im Verlauf der Prometaphase entstandenen Änderungen der Nachbarschaften durch eine besondere zeitlich koordinierte Trennung der Schwesterchromatiden wiederherstellt. Im Gegensatz dazu fanden Walter et al. (2003) einen gewissen Erhalt des Musters in die Tochtergeneration nur in etwa einem Drittel der Zellen. Die überwiegende Mehrheit der Zellen zeigte ein rearrangiertes und im Vergleich zum Mutterkern verändertes Muster. Weiterhin konnten sie zeigen, dass die Chromatinanordnung während der Interphase weitgehend stabil bleibt. Die Nachbarschaften ändern sich ab dem Stadium der Metaphase nur mehr geringfügig mit Ausnahme eines kleinen Zeitfensters zu Beginn der G_1 , in dem kleinere Bewegungen und Nachbarschaftsänderungen stattfinden könnten.

Um die unterschiedlichen Resultate weiter aufzuklären, wurden im Rahmen der Dissertation von Daniela Köhler bereits einige Experimente an Zellklonen durchgeführt (Koehler, 2008) und Köhler et al, in prep.). Als kurze Zusammenfassung der Ergebnisse lässt sich sagen, dass die Ähnlichkeit von CT- Anordnungen zwischen Tochterzellkernen am größten ist, aber nach zwei weiteren Zellteilungen verloren geht. Dementsprechend sind die Ähnlichkeiten zwischen „Cousinen“ bereits nach zwei Teilungen nicht größer als zwischen beliebigen Zellen einer Kultur (siehe Schema Abb. 35). Daraus folgt, dass die Muster über die Mitose hinweg nicht oder nur zu einem kleinen Teil erhalten werden.

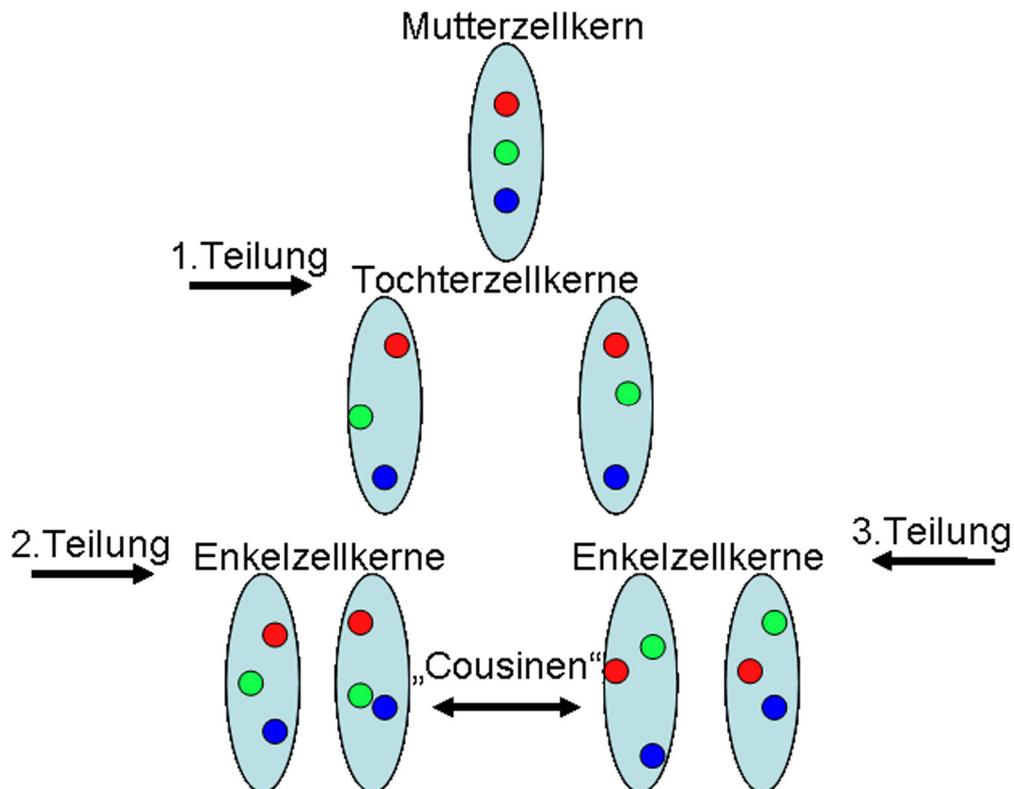


Abb. 35: Ähnlichkeiten zwischen Tochterzellen

Schema zu den Untersuchungen von Ähnlichkeiten zwischen Tochterzellen 1. und 2. Grades nach Köhler et al (in prep.). Dieses Schema verdeutlicht die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Zellen. Oben hat sich eine Zelle geteilt und die entstehenden Zellen sind Schwestern (1. Teilung). Nach einer jeweils weiteren Teilung (2. +3.) können auch die Ähnlichkeiten zwischen den neu resultierenden Schwestern groß sein, die Ähnlichkeiten von Cousins, Verwandten 2. Grades, sind jedoch genauso klein wie zwischen völlig willkürlich gewählten, unverwandten Zellen in einer Population.

In Kombination mit den in vorher in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Resultaten lässt sich zusammenfassen, dass auch nach der Mitose die radiale, größenabhängige Anordnung erhalten bleibt, sich aber die Nachbarschaften und Ähnlichkeiten ändern.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente sollten als Erweiterung der Arbeiten von Daniela Köhler zeigen, ob der Grad an Unähnlichkeit abhängt vom Winkel, den die beiden Tochterkerne nach dem Ende der Mitose zueinander haben. Die Untersuchungen von Walter et al. (2003) haben gezeigt, dass zu Beginn der G_1 -Phase noch Änderungen der Nachbarschaften auftreten können. Wir formulieren die Hypothese, dass diese Änderungen als Folge einer Elongation der sich neubildenden Kerne in unterschiedliche Richtungen auftreten. Die Elongation der Kerne und eventuell auftretende Änderungen hierbei soll folgendes Schema verdeutlichen.

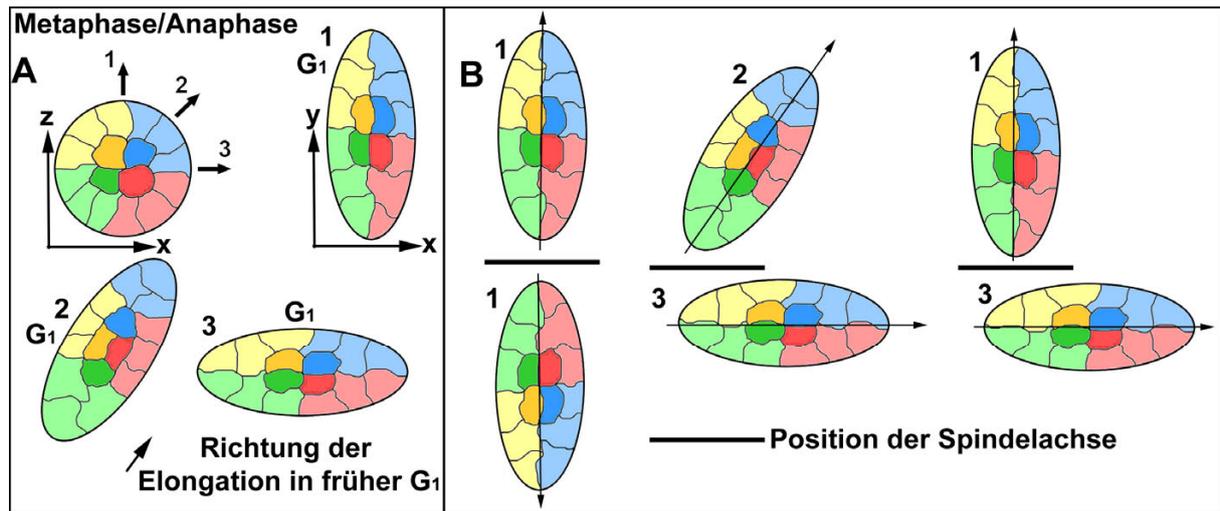


Abb. 36: Elongation in der frühen G₁ und resultierende Winkel

Erklärende Abbildung des Untersuchungsschemas, modifiziert nach Köhler et al (in prep.). (A) zeigt eine Metaphase bzw. Anaphase mit vier farblich markierten Quadranten. Nach der Anaphase kippen die beiden Rosetten von der Senkrechten in Richtung Wachstumsebene um. Am Ende der Telophase bzw. zu Beginn der G₁-Phase beginnen die beiden Tochterkerne zu dekondensieren und in bestimmte Richtungen zu elongieren, um die typische ellipsoide Form von Fibroblasten zu erreichen. Je nach Richtung der Elongation kommt es auch zu (kleinen) Änderungen der Chromatinanordnung (siehe A, Fall 1-3). (B) zeigt verschiedene mögliche Anordnungen in der G₁ Phase. Die eingezeichneten Pfeile sollen die längstmögliche Achse durch den Kernmittelpunkt und damit die Elongationsrichtung verdeutlichen. Im linken Beispiel elongieren beide Kerne in die gleiche Richtung. Der Winkel, den die beiden Achsen durch die Tochterkerne einschließen, ist 0°. Beide Kerne besitzen in diesem Beispiel die gleiche Chromatinanordnung in gespiegelter Form. Im mittleren Beispiel ist der Winkel zwischen den Kernen bei etwa 45°, Ähnlichkeiten sind zwar vorhanden, doch ist die Anordnung der Quadranten unterschiedlich. Im dritten Beispiel rechts schließen die beiden Achsen durch die Kerne einen Winkel von 90° ein. Die Kerne ähneln sich immer noch, aber die Quadranten haben sich gegeneinander verschoben und es sind starke Unterschiede in der Chromatinanordnung zwischen beiden Tochterkernen zu erwarten.

Falls die Hypothese zutrifft, wurde erwartet, dass das Ausmaß der Unterschiede der Anordnung von der relativen Lage der Tochterkerne zueinander abhängt (Abb.36). Wenn die Elongation beider Tochterkerne in dieselbe Richtung erfolgt, sollten die Unterschiede am geringsten sein. In diesem Fall wäre der erwartete Winkel zwischen den Tochterkernen 0. Die ausgeprägtesten Unterschiede wurden bei einem Winkel zwischen den Längsachsen von 90° erwartet. In diesem Fall sollte sich die Elongationsrichtung der beiden Tochterkerne auch am stärksten unterscheiden. Als alternative Hypothese ist denkbar, dass die unterschiedlichen Winkel gar nichts mit einer unterschiedlichen Elongationsrichtung der Tochterkerne zu tun haben, sondern auf unterschiedliche Rotationsbewegungen der Tochterkerne um Achsen senkrecht zur Wachstumsebene zurückzuführen sind. Solche Drehbewegungen wurden bereits von Theodor Boveri (1909) postuliert und vielfach in Lebzellenexperimenten nachgewiesen, z.B. in Strickfaden et al. (2010). Falls die Elongation der Tochterkerne in die gleiche Richtung erfolgt und unterschiedliche Winkel zwischen den Längsachsen erst sekundär als Folge von Drehbewegungen der Kerne auftreten, sollten Anordnungsunterschiede ohne

Beziehung zum gemeinsamen Winkel auftreten. Schließlich ist an die Möglichkeit zu denken, dass Anordnungsunterschiede durch Unterschiede in der Dekondensation und Lageveränderungen von CTs auftreten können, die nichts mit der Elongation der Zellkerne zu tun haben. Auch in diesem Fall sollte das Ausmaß an Unähnlichkeiten zwischen Tochterkernen nicht vom Winkel zwischen den Längsachsen abhängen.

Um Änderungen in der Chromatinanordnung zwischen Tochterzellen in Abhängigkeit der (verschiedenen) Elongationsrichtungen zu quantifizieren, wurden Zellen von drei verschiedenen Zelltypen (HeLa Gold, DLD- 1 und HMEC) auf gerasterten Deckgläsern ausgesät, über mehrere Tage am Phasenkontrastmikroskop beobachtet und mit der Kamera das Wachstum dokumentiert. Anschließend wurden sie fixiert und eine FISH mit jeweils vier Chromosomenpaints durchgeführt. Für DLD- 1 und HMEC waren das HSA 1, HSA 7, HSA 8 und HSA 17. In den stark rearrangierten HeLa Gold Zellen wurden HSA 4, HSA 7, HSA 13 und HSA 21q nachgewiesen.

Die Zellpräparate wurden am Konfokalmikroskop auf Tochterkerne untersucht. Die Indizien dafür sind räumliche Nähe und ein möglichst noch unvollständig getrenntes Zytoplasma. Die Bestätigung dafür, dass es sich auch wirklich um Tochterkerne handelt, liefern die angefertigten Phasenkontrastbilder, auf denen das Wachstum dokumentiert ist. Um mögliche Verfälschungen der Ergebnisse aufgrund von Zellbewegungen und daraus resultierenden Kern- und Chromatinbewegungen auszuschließen, wurden nur Tochterkerne ausgewählt, bei denen oben genannte Kriterien zutreffen und sich folglich gerade erst getrennt haben.

Jeweils 50 Pärchen wurden dann gescannt und für die Auswertung bearbeitet (siehe Material und Methoden). Von den segmentierten CTs wurden die Intensitätsschwerpunkte errechnet und der Winkel zwischen den Längsachsen von Tochterkernpaaren anhand der DAPI-Projektionen ermittelt. Von allen Pärchen wurde anhand der Koordinaten der Intensitätsschwerpunkte verschiedener CTs über die rigide Registrierungsmethode (Programm: *Nuclear Nightingale*) ein Dissimilaritätswert berechnet. Die Berechnung ist von der Kernform unabhängig (siehe Kapitel 3.8). Die errechneten Werte aller Kernpaare wurden normalisiert, um sie miteinander vergleichbar zu machen und gegen den Winkel aufgetragen, den die Längsachsen der Tochterkerne einschließen:

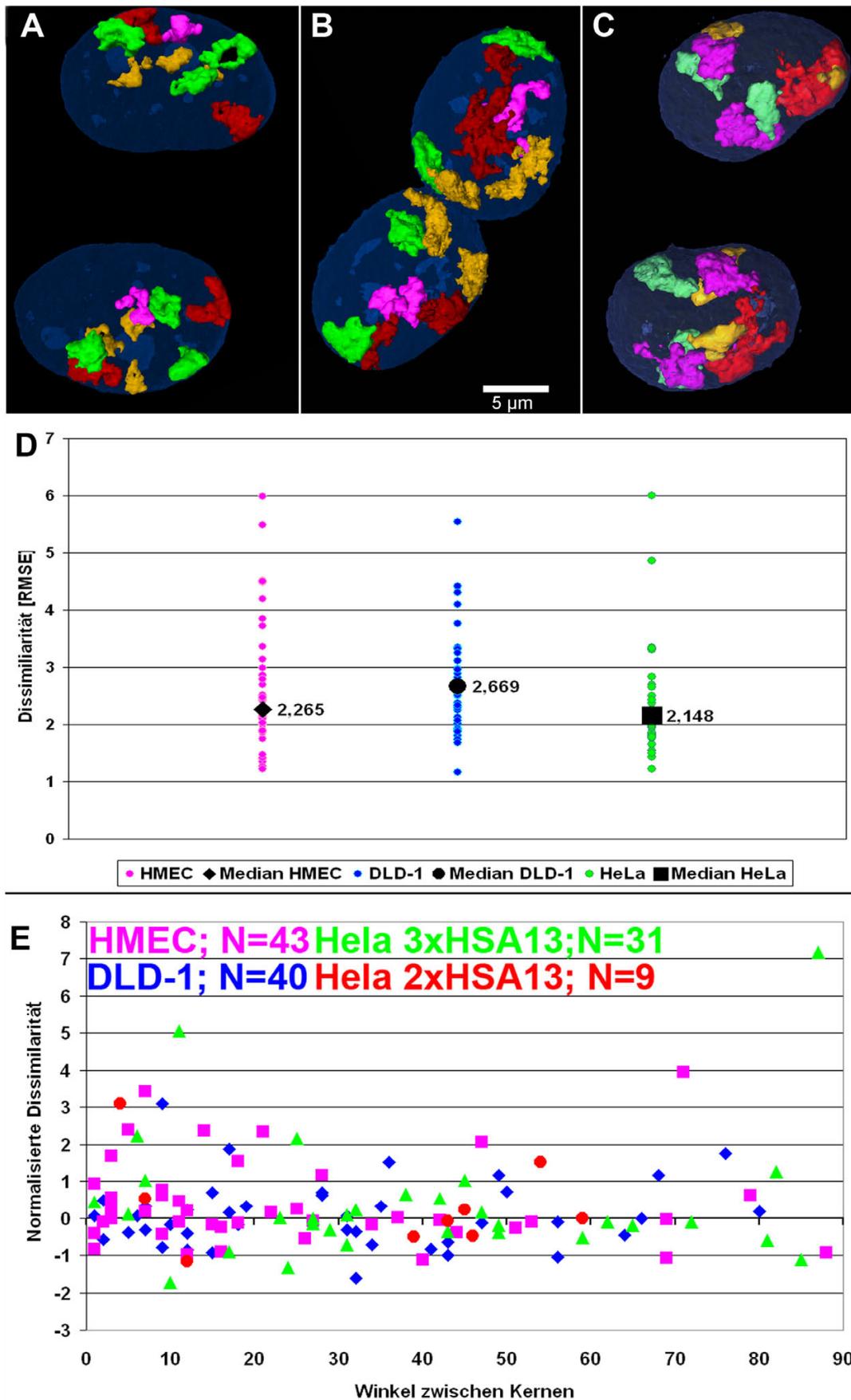


Abb. 37: Ergebnisse Monitoring- Experimente

Die obere Reihe zeigt Projektionen typischer Beispiele für Kerne von HeLa Zellen (A; HSA4 rot, HSA7 grün, HSA13 gelb und HSA 21q pink), HMEC (B; HSA1 rot, HSA7 grün, HSA8 gelb und HSA17 pink) und DLD- 1 Zellen (C; CTs siehe HMEC). (D) zeigt das Ergebnis der Auswertung mit

Nuclear Nightingale, das die Dissimilaritäten der Tochterkerne berechnet und als RMSE- Werte (*Root Mean Square Error*, siehe Material und Methoden) ausgibt. Das jeweilige schwarze Symbol entspricht dem Median aller ausgewerteten Kernpaare eines Zelltyps und die farbigen Punkte zeigen die Streuung der einzelnen Paare. In (E) sind die normalisierten Werte gegen den Winkel der Tochterkerne aufgetragen. Die Farbcodierung zeigt, welcher Wert von welchem Zelltyp stammt. Jeder Punkt entspricht einem Tochterpärchen. Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Die 3 Beispiele in Abb.37A-C zeigen typische Ergebnisse der FISH- Experimente. In Abb. 37A haben sich die HeLa- Zellen spiegelsymmetrisch getrennt (siehe *fallen rosettes*-Hypothese, Solovei et al. 2004b) und liegen fast parallel zueinander. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, dass etwa ein Viertel der Zellen 2 Kopien von HSA 13 besitzt, wie es im Karyotyp angegeben ist (siehe 3.2.5). Die überwiegende Mehrheit hat jedoch 3 Kopien (Abb. 37A, gelbe CTs). (B) zeigt ein Beispiel für Spiegelsymmetrie in HMEC-Zellen, während die DLD-1 Tochterkerne im Beispiel (C) schiebesymmetrisch sind. Die Art der Symmetrie beeinflusst jedoch die Ergebnisse nicht, da die Kerne durch Drehung, Verschiebung oder Spiegelung so übereinander gelegt werden, dass sowohl eine Schiebesymmetrie als auch eine Spiegelsymmetrie bei der Berechnung der Ähnlichkeit der Anordnung berücksichtigt werden und außerdem nur die Intensitätsschwerpunkte der CTs als Berechnungsgrundlage dienen.

Die Dissimilaritätswerte in (D) zeigen das Ergebnis der Auswertungen mit dem Programm *Nuclear Nightingale*. Für jeden Zelltyp wurde der Median der RMSE- Werte berechnet und die Einzelwerte als *Dotplot* hinzugefügt.

Ein RMSE- Wert von Null entspricht perfekter Symmetrie und bei Werten von zwei bis drei ist immer noch eine hohe Ähnlichkeit vorhanden. Der Median der RMSE- Werte aller 3 Zelltypen liegt deutlich unter dem Median, der von Daniela Köhler für HeLa Schwesterklone ermittelt wurde (Köhler et al. in prep. und Koehler Dissertation 2008, Fig. S2). Daraus ist zu entnehmen, dass die hier gefundenen Ähnlichkeiten höher sind als in der früheren Untersuchung.

Die Ergebnisse dieser Evaluation (Abb. 37E) zeigen, dass es keinen Zusammenhang zwischen Winkelgröße zwischen den Tochterkernen und der Dissimilarität gibt. Bei einem Zusammenhang müsste die Unähnlichkeit mit steigendem Winkel zunehmen. Dies ist jedoch nicht der Fall und die Werte bewegen sich größtenteils um den Nullpunkt, der dem Median gleichsteht und für große Ähnlichkeiten der Pärchen spricht. Ausreißer mit großen Unähnlichkeitswerten finden sich sowohl für große als auch kleine Winkel. Die Graphik zeigt auch, dass die Anzahl der Kopien von HSA13 in HeLa Zellen (rote und grüne Punkte) keinen Einfluss auf das Ergebnis hat. Abb. 38 zeigt zum Abschluss beispielhaft ein Tochterkernpaar

mit einer besonders ausgeprägten Ähnlichkeit bei großem Winkel und ein Paar mit auffallender Unähnlichkeit bei kleinem Winkel:

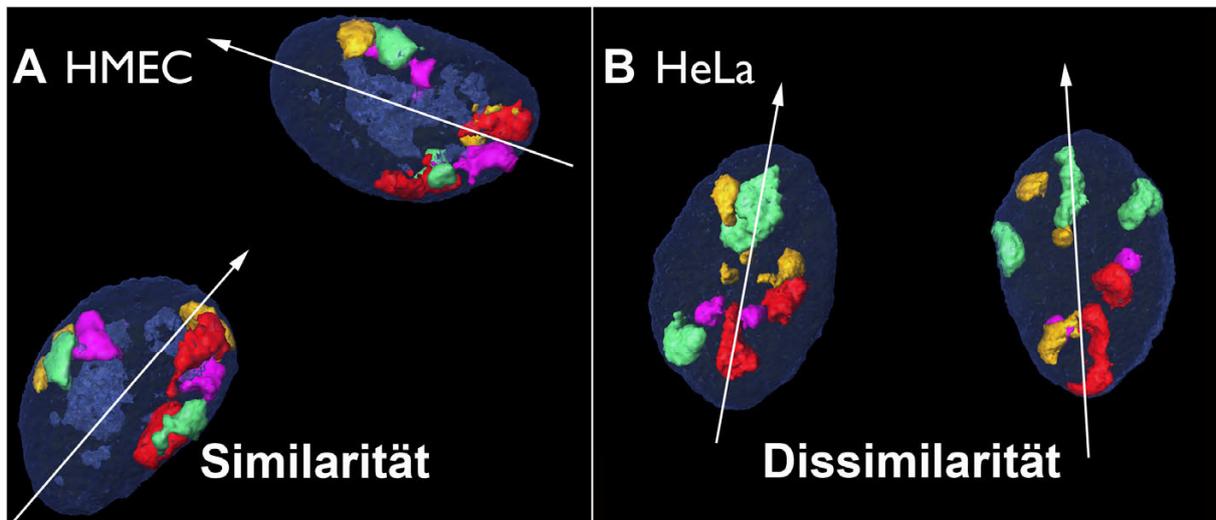


Abb. 38: Beispielkerne Monitoring

(A) zeigt ein Tochterpaar von HMEC- Zellen, das einen sehr niedrigen Dissimilaritätswert besitzt (RMSE= 1,26583), der Winkel zwischen den Achsen beträgt jedoch 69°. Im Gegensatz dazu ist der Winkel zwischen den HeLa- Kernen in (B) mit 11° ziemlich klein, der Dissimilaritätswert von 4,85883 ist jedoch einer der höchsten, der gemessen wurde. Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Zusammenfassung:

Die Schlussfolgerung aus diesen Experimenten ist, dass es keinen Zusammenhang gibt zwischen der Größe des Winkels zwischen Tochterkernen und der Ähnlichkeit oder Unähnlichkeit der Zellkernpaare. Dies widerspricht der Hypothese, dass Unähnlichkeiten vorrangige Folge einer unterschiedlichen Elongationsrichtung der Tochterkerne in der frühen G₁- Phase sind. Das Ergebnis ist jedoch vereinbar mit der Alternativhypothese, nach der die Winkelunterschiede Ausdruck unterschiedlicher Rotationsbewegungen von Tochterkernen und/oder Folge unterschiedlicher Positionsveränderungen von CTs in den Tochterkernen der frühen G₁- Phase sind.

4.6. Radiale Anordnungen in Lebendzellversuchen

Die vorhergehenden Experimente haben gezeigt:

1. Die radiale Anordnung von Chromosomen in Interphase und Mitose ist ähnlich und korreliert mit der Größe von CTs.
2. Auch andere DNA Elemente (SACs, HCVs, HSR, Zentromere) ordnen sich entsprechend ihrer Größe an.
3. Tochterzellen zeigen einen hohen Grad an Ähnlichkeiten im Hinblick auf die radiale Anordnung und die Nachbarschaften.

Die Zuverlässigkeit dieser Schlussfolgerungen sollte nun in Lebendzellexperimenten untersucht werden.

Ein erstes Experiment sollte zeigen, dass durch die Mitose hindurch die relative radiale Anordnung von Chromatin erhalten bleibt, sich jedoch die Nachbarschaften ändern. Dies würde bedeuten, dass sich die Nachbarschaften in den Tochterzellen von den Nachbarschaften in den Mutterkernen unterscheiden und diese Muster nicht über die Mitose erhalten bleiben. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Hilmar Strickfaden und Daniela Köhler durchgeführt.

RPE-1 Zellen, die stabil mit mRFP- H2B und paGFP- H4 transfiziert sind, wurden in Lebendzellkammern ausgesät. Über die FRAP- Einheit des Spinning Disc Mikroskops wurden an der Peripherie von Zellkernen in der G₂- oder frühen Prophase kleine Bereiche photoaktiviert. Die Kerne wurden entweder durchgehend in 20min Intervallen beobachtet oder ein Bild aufgenommen und erst nach ca. 24h wieder aufgesucht. Einige der Kerne hatten die Mitose durchlaufen und es fanden sich jeweils 2 Tochterkerne in der frühen G₁- Phase. Die generierten dreidimensionalen Bilder von Mutter- und Tochterkernen wurden für eADS Auswertungen aufbereitet, um quantitativ die Lage der photoaktivierten Bereiche in 3D zu erfassen. Abb. 39 zeigt die Ergebnisse der Auswertungen:

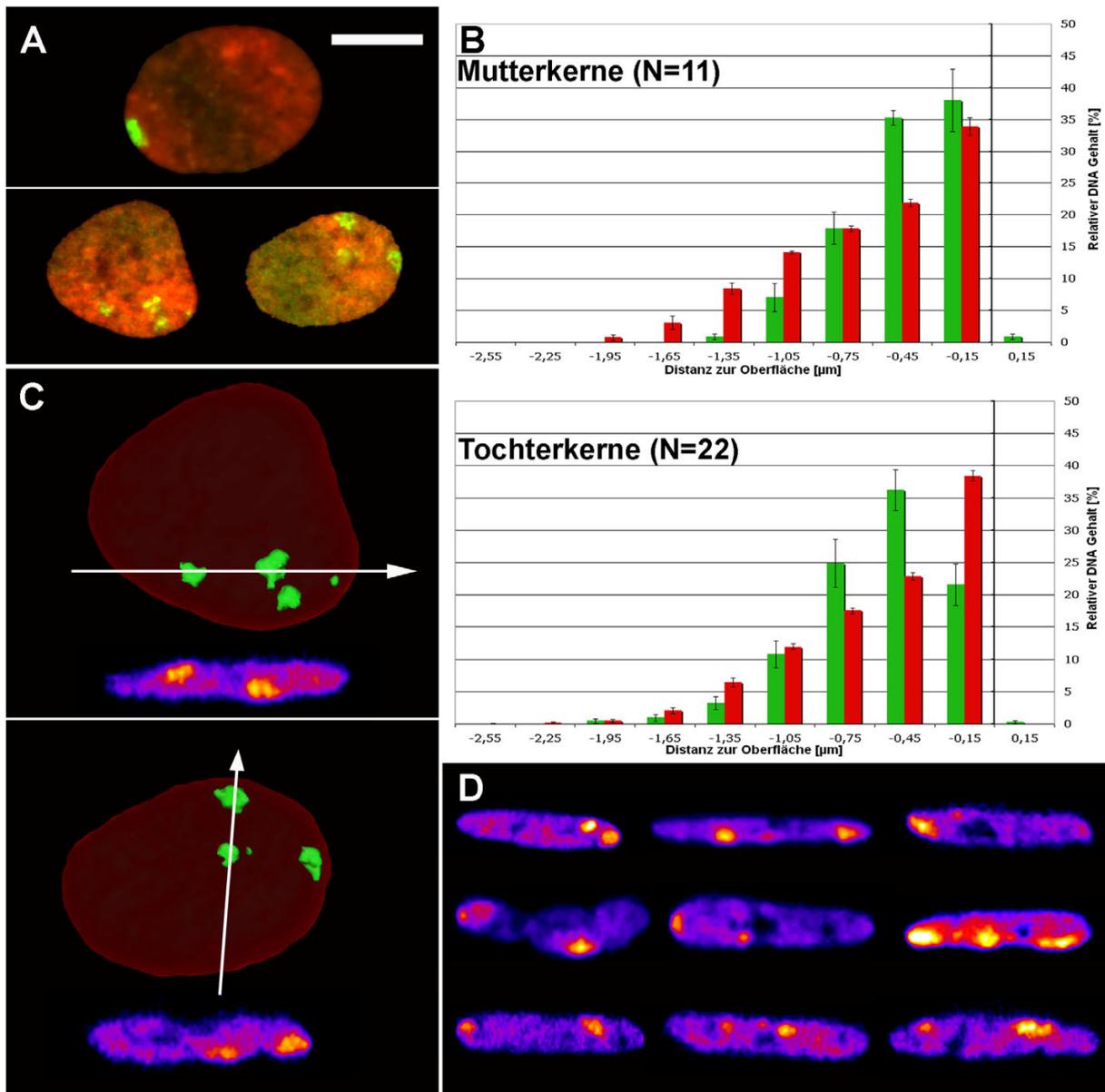


Abb. 39: Radiale Verteilung in Lebendzellversuchen

(A) Z- Projektionen von RPE- 1 Zellen mit mRFP- H2B und photoaktivierten kleinen Bereichen in der Peripherie von Mutterkernen (oben, Balken = 10 μm) und Tochterzellkernen (unten). (B) Ergebnisse der eADS Auswertungen für die Mutterkerne (oben) und die jeweiligen Tochterkerne. Auf der y-Achse ist der 3D- Abstand zur Kernoberfläche angegeben. Die grünen Balken entsprechen der Verteilung aller Signalvoxel der photoaktivierten Bereiche, die roten Balken entsprechen der Chromatinverteilung von mRFP- H2B als Kontrolle. (C) zeigt 3D Rekonstruktionen der beiden Tochterkerne in (A). Der Pfeil entspricht der Schnittrichtung für die jeweiligen darunterliegenden Seitenansichten in x,z oder y,z. Die Falschfarbenbilder zeigen die photoaktivierten Bereiche in gelblich- weißen Farben. (D) zeigt weitere Beispiele von Seitenansichten von Tochterzellkernen mit den photoaktivierten Bereichen an der Kernhülle nach Fluoreszenzaktivierung von Chromatin am Kernrand der Mutterkerne.

Die eADS Auswertung in Abb.39B zeigt einen leichten Unterschied in der radialen Positionierung der photoaktivierten Bereiche zwischen Mutterkernen und Tochterzellkernen ($p=0,045$). Die Positionierung ist zwar in beiden Gruppen randständig, jedoch ist eine leichte Tendenz in Richtung des inneren Kernbereichs bei den Tochterkernen zu beobachten. Blickt

man jedoch auf die 3D- Seitenansichten in (C) und (D), sieht man immer noch die Randständigkeit des photoaktivierten Chromatins. Diese Bereiche liegen nicht unbedingt am Kernrand einer zweidimensionalen Projektion, aber in der 3D Ansicht zeigt sich in allen Fällen eine Assoziation mit der oberen oder unteren Kernhülle. Trotzdem sind Teile der aktivierten Bereiche in Richtung des dreidimensionalen Kerninneren verschoben.

Die Lebendzelleexperimente zeigen in allen Fällen, dass aktivierte Areale im Mutterkern während der Prometaphase auseinanderfallen. Das heißt die in diesem Kernareal gemeinsam photoaktivierten Anteile verschiedener Chromosomenterritorien gehen neue Nachbarschaftsbeziehungen ein. Die Tochterkerne zeigen ein anderes, untereinander jedoch relativ ähnliches Muster. Dieses Phänomen war bereits aus früheren Publikationen bekannt (Cvackova et al., 2009; Walter et al., 2003 Köhler et al., in prep.), genauer untersucht und quantifiziert in Lebendzellversuchen wurde es für die Arbeit Strickfaden et al. (2010), an der ich als Zweitautor beteiligt war.

Insgesamt wurden von Hilmar Strickfaden und mir mehr als 130 RPE-1 Zellen in Lebendzelleexperimenten untersucht, z.T. in 4D (x,y,z,t), z.T. wurde auch nur am Anfang und am Ende des Experiments ein Bilderstapel oder ein mittlerer konfokaler Schnitt angefertigt. Neben zahlreichen Kernen mit einer Randaktivierung analog zu den oben beschriebenen Experimenten in 4D wurden auch Chromatinbereiche in der Mitte der Kerne oder komplexe Muster aktiviert. In allen untersuchten Fällen gab es massive Veränderungen der Nachbarschaftsbeziehungen des photoaktivierten Chromatinmusters während der Prometaphase (z.B. Abb.40A) und die in den Tochterkernen gefundenen Muster unterschieden sich erheblich von denen in den Mutterkernen. Die radiale Anordnung bleibt zwar ähnlich (Abb. 39C und D), aber die Nachbarschaften ändern sich. Folgende Abbildung zeigt in hoher zeitlicher Auflösung die Veränderungen der Nachbarschaften zu Beginn der Prometaphase und die Stabilität der Anordnung ab diesem Zeitpunkt:

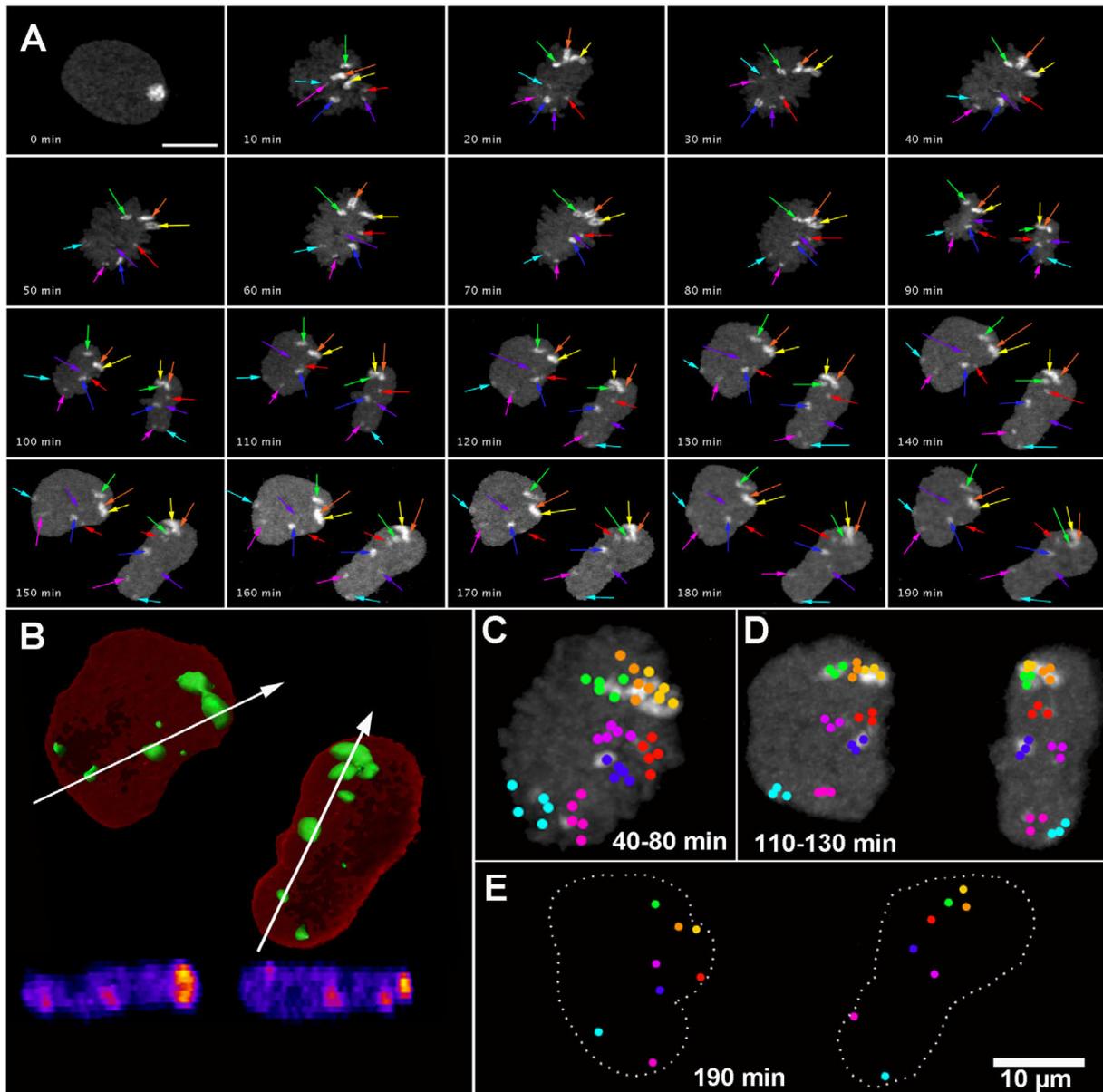


Abb. 40: Musterzerstörung während der Prometaphase

(A) Lebendzellbeobachtung eines Kerns einer RPE-1 Zelle mit randständig photoaktiviertem Chromatin von der Prophase bis zur G_1 -Phase. Die farbige markierten Pfeile zeigen die Lage der einzelnen aktivierten Chromatindomänen. (B) 3D Rekonstruktionen der beiden Tochterzellkerne 150 min nach Experimentbeginn und darunter die jeweiligen Seitenansichten mit dem peripherieassoziierten Chromatin. (C) Projektionen mehrerer Zeitpunkte in der Prometaphase bis Metaphase überlagert. Die farbigen Tupfer markieren die Lage der aktivierten Domänen und entsprechen den farbigen Pfeilen in (A). (D) Überlagerung mehrere Zeitpunkte zu Beginn der G_1 -Phase. (E) Die beiden Tochterzellen mit den markierten Domänen in der frühen G_1 -Phase weisen trotz unterschiedlicher Kernform gewisse Ähnlichkeiten auf.

Wie die Abb. 40A zeigt, „zerfällt“ gleich am Anfang der Prometaphase das aktivierte Chromatinmuster, d.h. es kommt zu starken Bewegungen, bei denen die gemeinsam aktivierten Chromosomen auseinanderweichen ($T=10\text{min}$). Im weiteren Verlauf der Prometaphase, nach Bildung der Metaphasenplatte ($T=80\text{min}$) und bis zur Anaphase ($T=90\text{min}$) finden nur geringfügige Bewegungen der Chromatindomänen statt und die

Anordnung wird nicht wesentlich verändert sogar bis in die G₁- Phase (ab T=110min) hinein. Trotz der einsetzenden Dekondensation der Chromatindomänen nach Ende der Telophase bleibt die relative Lage der aktivierten Domänen erhalten- auch untereinander- was die Punktprojektionen und Pfeile in (A) und (C) verdeutlichen. Ebenfalls zeigt sich hier die Ähnlichkeit der Tochterzellen, trotz der leicht unterschiedlichen Kernform. Die 3D- Daten dieser Serie enthüllen ein Fallen der Anaphasen voneinander weg. Daraus resultiert ein spiegelsymmetrisches Muster, was in Abb.41 verdeutlicht wird:

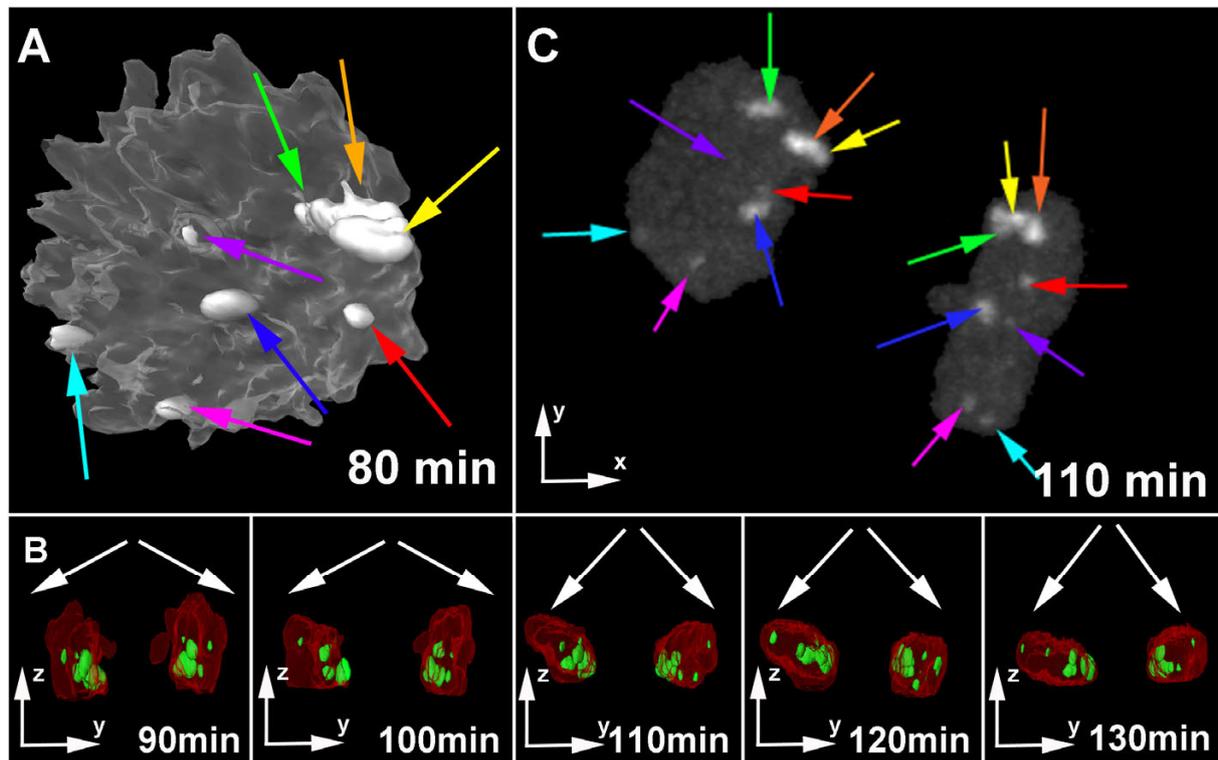


Abb. 41: Änderung der Chromatinanordnung ab der Metaphase

3D Rekonstruktionen eines RPE-1 Zellkerns mit farbig markierten Domänen in der Metaphase (A), während der Anaphase (B) und ein Lebendzellbild in der frühen G₁- Phase (C). (A) Seitenansicht der Metaphasenplatte der oben beschriebenen Zelle mit den photoaktivierten, farbig markierten Chromatindomänen. (B) Verschiedene Zeitpunkte der Anaphase derselben Zelle. Ursprünglich haben die Anaphaserosetten dieselbe Orientierung wie Metaphaseplatten und stehen senkrecht zur Wachstumsebene. Dadurch dass die Anaphaseplatten in entgegengesetzte Richtungen fallen ergibt sich eine spiegelsymmetrische Anordnung der Domänen. (C) zeigt ein paar Zeitpunkte später die beiden Tochterkern in der frühen G₁, wieder mit den farbig markierten Chromatindomänen.

Wie Abb.41 noch einmal verdeutlicht, trennen sich die aktivierten Chromatindomänen sehr früh in der Mitose im Übergang zur Prometaphase. Ab diesem Zeitpunkt, auch wenn die Metaphasenplatte sich noch bewegt und dreht, sind die relativen Positionen der aktivierten Bereiche festgelegt und ändern sich nicht mehr stark bis zur Interphase. Die Metaphasenplatte wird zu Beginn der Anaphase durch den Spindelapparat auseinandergezogen, in diesem konkreten Beispiel fallen die beiden Tochterkerne voneinander weg, was in einem spiegelsymmetrischen Muster in den Tochterkernen resultiert. Vergleicht man die Positionen

der einzelnen Domänen in der Metaphasenplatte in (A) mit den Positionen der Domänen im linken Tochterkern in (C) wird deutlich, dass es nur minimale Unterschiede in der radialen Anordnung gibt. Auch die relativen Positionen der Domänen untereinander und die Abstände ändern sich kaum.

Zusammenfassung:

Die Lebendzelleexperimente bestätigen weitgehend die FISH- Experimente. Muster, d.h. Nachbarschaften bleiben über die Mitose nicht erhalten, aber die Chromatindomänen nehmen nach der Mitose eine ähnliche radiale Verteilung ein und Tochterkerne sind untereinander ebenfalls meist ähnlich. Die Änderungen der Nachbarschaften geschehen während der frühen Prometaphase, ab diesem Zeitpunkt gibt es keine großen Veränderungen mehr. Dies bedeutet, dass die Anordnung von der Metaphasenplatte auf die Tochterkerne ohne große Änderungen übertragen wird. Zusammengefasst bestätigen diese Versuche alle vorher durch FISH Experimente an fixierten Zellen gemachten Beobachtungen zur radialen Anordnung.

4.7. Positionsänderungen von Genloci nach Stimulation der Transkription

4.7.1. Auswirkungen von replikativer Seneszenz auf die Lokalisierung von nukleolusassoziierten Chromatindomänen

4.7.1.1. Der PSG- Cluster in HeLa Zellen

Hintergrund dieses Teilprojektes waren Untersuchungen von Attila Nemeth (Universität Regensburg) zu NADs (*Nucleolus Associated Domains*). Nemeth und Mitarbeiter haben genomweit Chromatinregionen identifiziert und genauer untersucht, die mit dem Nukleolus assoziiert sind. Der perinukleoläre Bereich, in dem NADs liegen, ist vornehmlich heterochromatisch geprägt und gilt als transkriptionell eher inaktiv (Nemeth et al., 2010). Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine NAD Region auf Chromosom 19 (19q13.2) ausgewählt, in der der PSG- Gencluster (*Pregnancy Specific Glycoproteins*) liegt. Diese Gruppe von Genen wird nicht nur im Plazentagewebe während der Schwangerschaft aktiviert bzw. hochreguliert, sondern auch wenn Zellen in Kultur seneszent werden oder replikative Seneszenz induziert wird (Endoh et al., 2009). Das Teilprojekt sollte die Frage beantworten, ob bei der Hochregulation der Gene während des Alterungsprozesses eine Repositionierung des PSG- Clusters weg vom Nukleolus in einen transkriptionell kompetenten Bereich stattfindet oder ob die Aktivierung auch direkt im heterochromatischen Bereich um den Nukleolus erfolgen kann.

Dazu wurden HeLa Zellen für 4 Tage mit 50 μ M BrdU behandelt, um replikative Seneszenz zu induzieren (Michishita et al., 1999) und den normalerweise stillgelegten PSG- Cluster transkriptionell zu aktivieren (Endoh et al., 2009; Suzuki et al., 2002). Nach dieser Zeit wurde in einer früheren Studie die größte Hochregulierung der PSG- Gene festgestellt (Endoh et al., 2009). Die erfolgreich induzierte replikative Seneszenz wurde mit dem SA- β - Gal- Test nachgewiesen (Bandyopadhyay et al., 2005; Dimri et al., 1995). Dieser zeigt spezifisch eine Blaufärbung von seneszenten Zellen bei pH6, wenn sie zuvor mit 2% Paraformaldehyd (PFA) und 0,2% Glutaraldehyd (GA) fixiert werden. Da es vorteilhaft gewesen wäre, 3D FISH Experimente mit dem Nachweis der replikativen Seneszenz auf dem Einzelzellniveau zu verbinden, wurde getestet, ob ein positiver SA- β - Gal- Test auch ohne Glutaraldehydfixierung möglich ist. Diese ist nämlich für FISH Experimente ungeeignet, da die Sonden nicht genügend in das Chromatin eindringen können. Deswegen wurden parallel zur vorgeschriebenen Fixierung auch Fixierungen mit 2%, 3% und 4% PFA ohne Glutaraldehyd durchgeführt und der Seneszenztest anschließend durchgeführt. Es zeigte sich aber keine Färbung bei pH6. Der Nachweis der lysosomalen Galaktisidase, die bei pH4 alle Zellen anfärbt und deswegen als Positivkontrolle benützt wird, verlief jedoch in allen Experimenten zu 100% positiv (Daten nicht gezeigt). Deswegen wurden für die späteren 3D FISH- Experimente BrdU- induzierte Zellen parallel nur mit 4%PFA fixiert und die weiteren Behandlungen wie Permeabilisierung etc. durchgeführt.

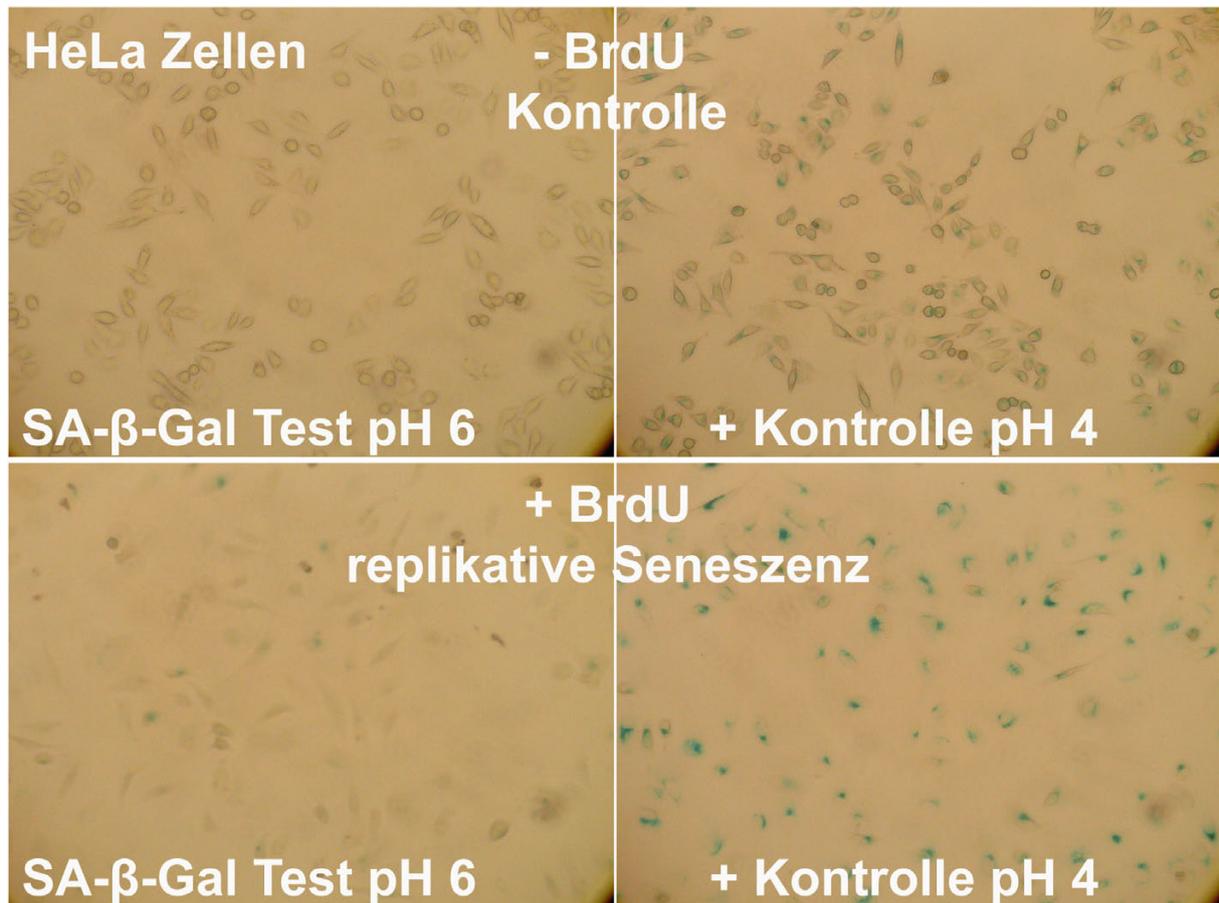


Abb. 42: SA- β- Gal Test bei HeLa Zellen

Die Zellen wurden zuvor spezifisch für diesen Test mit 2% PFA und 0,2% Glutaraldehyd fixiert: Bei pH 4 als Positivkontrolle sind alle Zellen blau gefärbt unabhängig von der BrdU Inkubation (rechte Spalte). Bei pH6 sind einige der induziert seneszenten Zellen blau gefärbt (unten links), ohne BrdU Inkubation finden sich bei pH6 keine blauen und damit seneszenten Zellen (oben links).

Nachdem die richtige Funktion des SA- β- Gal Tests überprüft und eine erfolgreiche Seneszenzinduktion mit BrdU festgestellt wurde (Abb. 42 links unten), wurden passende BAC Klone ausgewählt, um eventuelle Lageveränderungen nach Induktion replikativer Seneszenz feststellen zu können.

Aus den Vorarbeiten von Nemeth et al. (2010) wurde ein BAC Klon als FISH- Sonde ausgewählt, der nahe am PSG- Cluster und in derselben NAD wie der Cluster liegt. Zusätzlich wurde eine BAC Klon (AN51) als Positivkontrolle verwendet, der signifikant häufig mit dem Nukleolus assoziiert ist. Der BAC liegt ebenfalls in einer NAD etwa 6,5Mb upstream vom PSG- Cluster. Dort sind aber soweit bekannt keine seneszenzassoziierten Gene gelegen, sondern die Sequenzen für 27 Zinkfingerproteingene (27ZNF). Ein BAC (AN23), der als Negativkontrolle verwendet wurde, liegt telomernah im Bereich des Gens REXO1 auf dem anderen Arm des HSA19 und ist in keiner NAD lokalisiert. Von diesem BAC ist bekannt, dass er signifikant selten mit dem Nukleolus assoziiert ist (Nemeth et al., 2010).

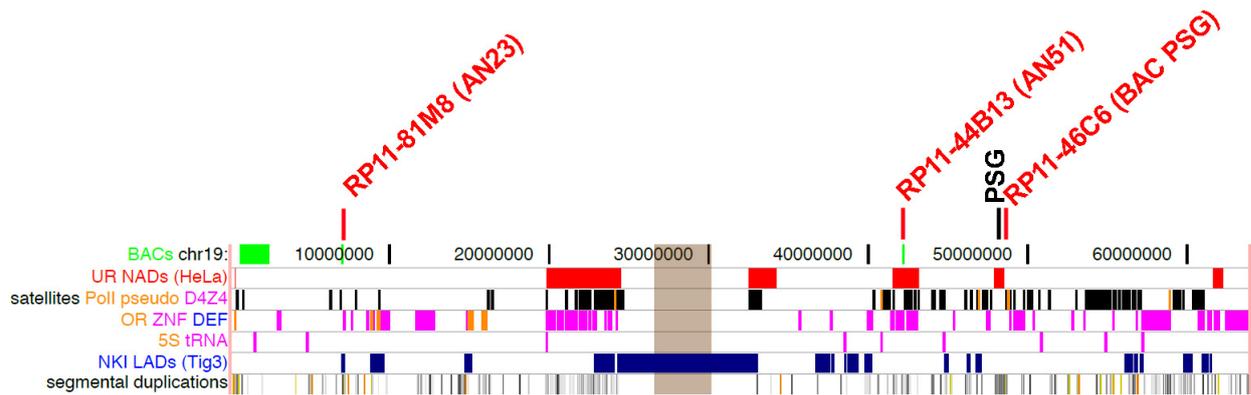


Abb. 43: Lage der BAC- Klone auf Chromosom 19

Modifiziert nach Nemeth et al. (2010). Die Darstellung zeigt das Chromosom 19 in linearer Abfolge und einige auf ihm liegende funktionelle Bereiche, die sich auf Experimente mit HeLa Zellen beziehen. Die für diese Arbeit interessanten Bereiche sind die NADs (rot). Die ausgewählten BACs und ihre Lage sind in roter Schrift zu sehen sowie die Lokalisation des PSG Clusters.

Die BAC Klone AN51 (Positivkontrolle) und AN23 (Negativkontrolle) wurden von Attila Nemeth amplifiziert, markiert und auf HeLa 2D Metaphasenpräparaten getestet (Nemeth et al.2010). Abb.44 zeigt eine Übersicht über die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Tests aller BACs auf 2D Metaphasenpräparaten von HeLa Zellen:

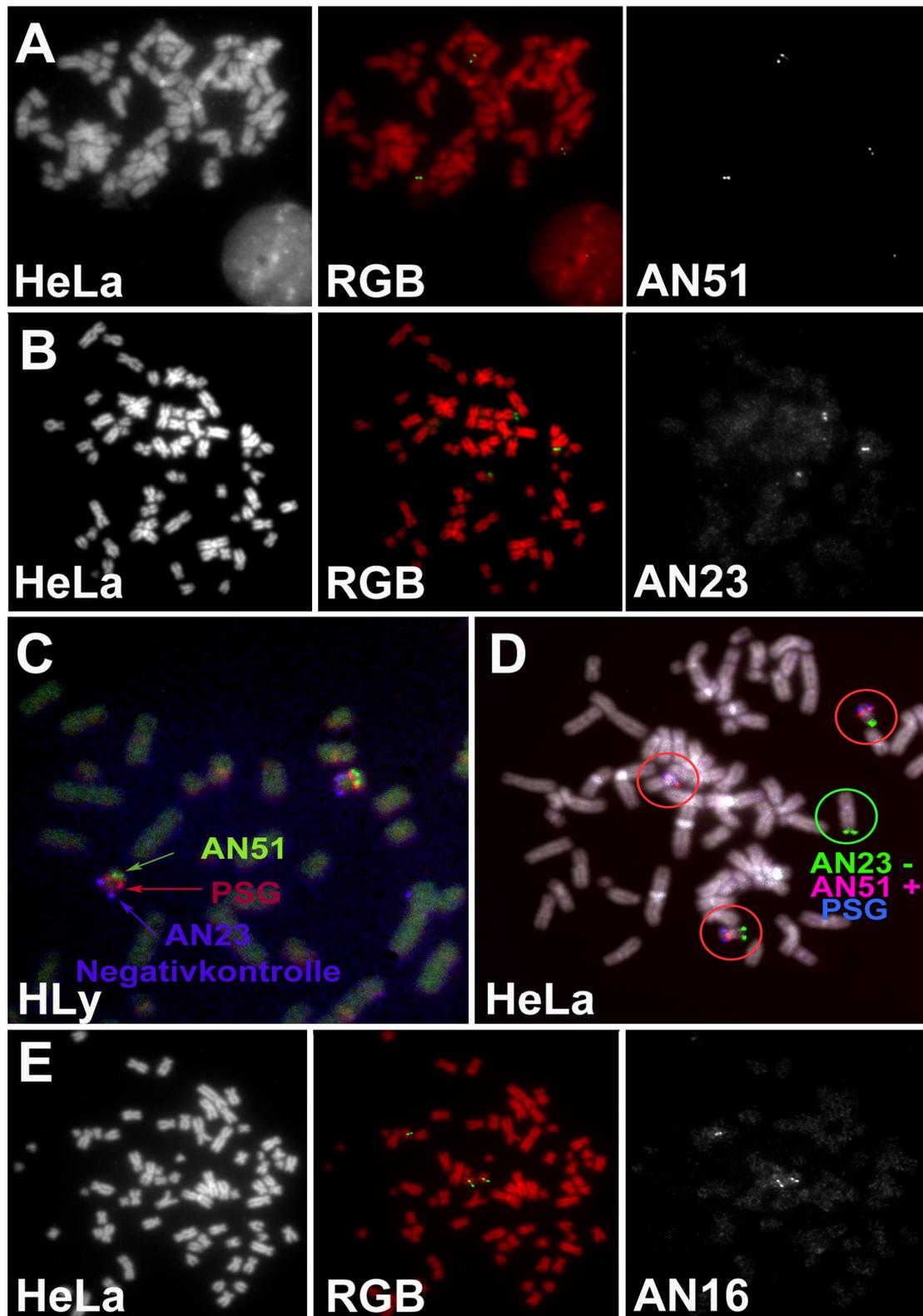


Abb. 44: Test der BAC- Sonden auf Chromosom 19

2D FISH Ergebnis: (A) zeigt den Test der Positivkontrolle AN51 und (B) den der Negativkontrolle AN23. In (C) ist der Test aller 3 verwendeten BACs zu sehen auf HSA19 von humanen Lymphozyten (PSG rot, AN51 grün und AN23 blaue Signale), daneben in (D) auf HeLa Zellen (AN51 rot, AN23 grün und PSG blaue Signale). Die verwendete HeLa Linie besitzt also drei HSA19, wobei eines der AN23 Signale auf einem anderen Chromosom lokalisiert ist. Hier hat wohl eine Translokation stattgefunden. In (E) ist der Test der Negativkontrolle AN16 auf Chromosom 17q dargestellt, die im zweiten Teil der Experimente anstatt AN23 verwendet wurde.

Im Verlauf der 3D FISH Experimente an replikativ kompetenten und replikativ seneszenten Zellen stellte sich heraus, dass AN23, obwohl es in 2D Experimenten vielversprechend aussah, nur sehr schwache Signale im Zellkern liefert. Außerdem ist eine Kopie von AN23 auf ein anderes Chromosom transloziert (siehe Abb. 44 D). Deswegen wurde im späteren Verlauf der Experimente eine andere Negativkontrolle (AN16) verwendet. Dieser BAC AN16, ist benachbart zum UBF- Gen (*Upstream Binding Factor*) und wie AN23 in keinem NAD lokalisiert. Eine Zusammenfassung der verwendeten BACs und ihrer Lage im Genom zeigt folgende Übersicht:

PSG Lokus	Positivkontrolle	Negativkontrolle	Negativkontrolle 2
RP11-46C6 (PSG)	RP11-44B13 (AN51)	RP11-81M8 (AN23)	RP11-828F4 (AN16)
Chromosom:HSA19	Chromosom:HSA19	Chromosom:HSA19	Chromosom: HSA17
Start: 48622385	Start: 42039646	Start: 510525	Start:42382700
Ende: 49036940	Ende: 42219531	Ende: 235139	End:42581889
Bande: 19q13.31	Bande: 19q13.12	Bande: 19p13.3	Band:17q21.31
Gen: Nähe PSG	Gene: 27 ZNF	Gen: REXO1	Gen: UBF
NAD	NAD	Nicht NAD	Nicht NAD

Nach dem erfolgreichen Test der verwendeten Sonden auf Metaphasen wurden 3D FISH Experimente durchgeführt auf HeLa Zellen, die 4 Tage mit 50µM BrdU inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen fixiert. Von beiden Präparaten wurden jeweils 40 Zellkerne am Mikroskop aufgenommen und die Bilder davon anschließend für die Auswertung bearbeitet.

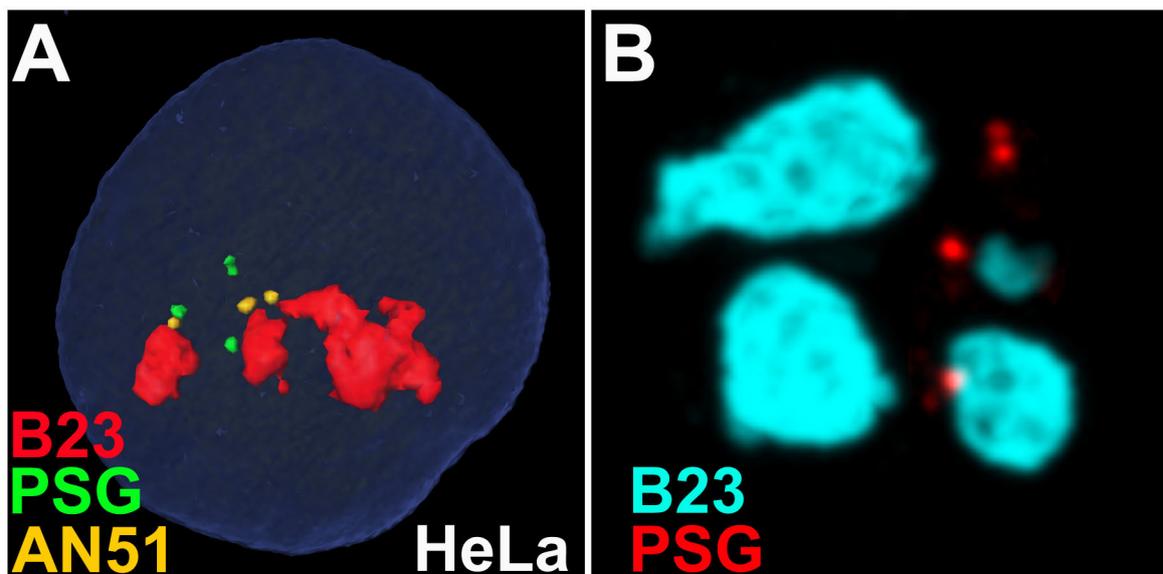


Abb. 45: 3D Rekonstruktion von HeLa Kern mit BACs

(A) 3D Rekonstruktion einer HeLa Zelle mit Amira: Der Kern ist mit DAPI gegengefärbt und es sind jeweils drei PSG Signale (grün) und drei Signale für die Positivkontrolle AN51 (gelb) zu sehen. Der Nucleolus wurde über eine IF nachgewiesen (B23/Nucleophosminfärbung in rot). Die

Negativkontrolle AN23 zeigte in 3D schlechte Signale und ist deshalb auf diesem Bild nicht dargestellt. (B) Maximalprojektion eines Bilderstapels mit 3 roten PSG Signalen und türkisen B23 Signalen in HeLa Zellen nach 4 Tagen BrdU Inkubation. In diesem Fall ist nur ein BAC- Signal mit dem Nukleolus assoziiert, eines befindet sich mehrere μm weit weg, eines liegt in der Nähe eines Nukleolus, ist aber nicht assoziiert. Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Um die prozentualen Anteile an Nukleolusassoziationen zu ermitteln, wurde bei den Originalbilderstapeln zuerst der chromatische Shift korrigiert, eine Gaußfilterung durchgeführt (Radius =1) und alle Farbkanäle auf Grauwerte von 0-255 normalisiert. Um ein möglichst objektives Ergebnis über die ganze Experimentkette zu erhalten, war das Vorgehen durchgehend gleich. Für jeden BAC- Kanal wurden einzeln RGB- Stapel mit jeweils dem Nukleolus angefertigt (ImageJ Plugin sg3channels von Boris Joffe). Die Stapel wurden extrem vergrößert und anhand der Pixelverteilung per Augenmaß festgelegt, ob das Signal mit dem Nukleolus assoziiert ist oder nicht. Kriterium war, dass mindestens ein Voxel des BAC- Signals mit der B23- Färbung überlagert ist. In diesem Fall ist anzunehmen, dass das beobachtete Signal auch mit dem perinukleolären Heterochromatin assoziiert ist. In unsicheren Grenzfällen wurde, um einen experimentellen systematischen Fehler auszuschließen, abwechselnd assoziiert und nicht assoziiert gewertet. Dieses Vorgehen wurde dann für alle Kerne eines Experiments mit allen BACs durchgeführt und der Anteil an Assoziationen ermittelt (Tabelle 6 + Abb.46):

	PSG Assoziation	AN51 Assoziation	AN23 Assoziation
+BrdU 4 Tage (N=40)	20 von 120 Signalen=16,5% (95% KI:±6,8%)	38/120 = 31,6% (95% KI:±8,4%)	22/120 = 18,3% (95% KI:±7%)
-BrdU (N=40)	18/120 Signalen = 14,8% (95% KI: ±6,4%)	62/121 = 51,2% (95% KI:±9%)	13/120 = 10,8% (95% KI:±5,6%)

Tabelle 6: Assoziation mit dem Nukleolus nach 4 Tagen BrdU- Inkubation in HeLa Zellen

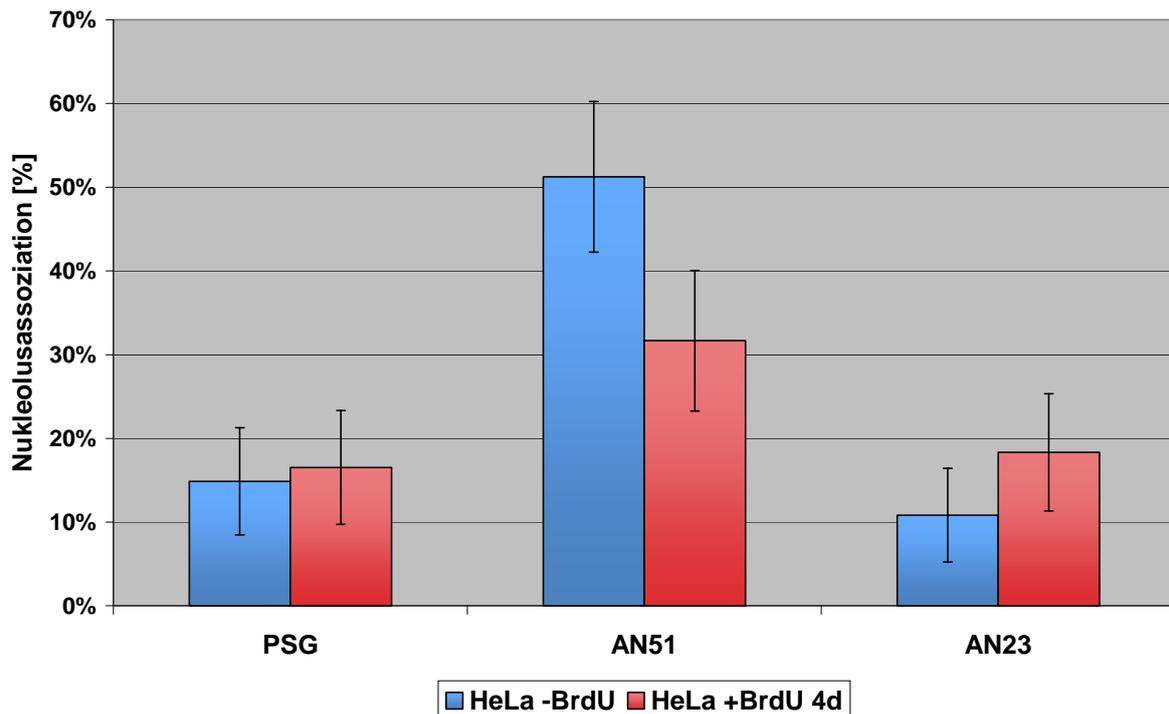


Abb. 46: Assoziation mit dem Nukleolus nach 4 Tagen BrdU- Inkubation in HeLa Zellen

Tabelle 6 und die Abbildung zeigen den prozentualen Anteil an Assoziationen der jeweiligen BAC-Signalen mit dem Nukleolus und einer daraus resultierenden Lage im perinukleolären Heterochromatin (N=40). Der BAC nahe des PSG Clusters zeigt keine Veränderungen mit und ohne BrdU- Stimulation, die Kontrollen jedoch eine starke (AN51) bzw. eine leichte (AN23). Bei AN51 ist der Anteil der assoziierten BAC- Signale ohne BrdU Inkubation um 20% größer als nach der Stimulation. Die Fehlerbalken entsprechen dem 95%Konfidenzintervall (Erklärung siehe 3.15).

Für den PSG BAC zeigte sich also keine Assoziationsänderung nach der Stimulation, dafür war der Anteil an AN51 Signalen ohne Stimulation in replikativ kompetenten Zellen um etwa 20% höher als in replikativ seneszenten Zellen. Auch die Negativkontrolle AN23 zeigte eine Veränderung, diesmal war in replikativ seneszenten Zellen der Anteil an assoziierten BACs aber höher als in Kontrollzellen. Um die Veränderungen zu quantifizieren, wurden die Abstände der Signale zum Nukleolus mit Hilfe des Programms eADS vermessen. Die Lage der Signale der Negativkontrolle AN23 im Verhältnis zum Nukleolus konnte anhand der Rohdatenbilder ermittelt werden. Für die quantitative Vermessung mit eADS wurden sie jedoch aufgrund unbrauchbarer Signale nicht berücksichtigt, da eine Segmentierung der Signale nicht durchgeführt werden konnte. Nach der Vermessung wurden die Signale von der Lage her in 4 Kategorien eingeteilt. Kategorie A (Assoziiert) erfasste alle Voxel von Signalen, die innerhalb von Nukleoli oder bis zu 600nm davon entfernt liegen. Kategorie N (Nähe) umfasste Voxel in einer Distanz von >600nm bis 1µm entfernt von der Nukleolusoberfläche. In Kategorie M (mittlere Entfernung) sind Signale in einer Distanz zwischen 1,2µm bis 1,8µm vereinigt. In Kategorie W (weite Entfernung) sind alle Signale mit Abständen von >2µm erfasst.

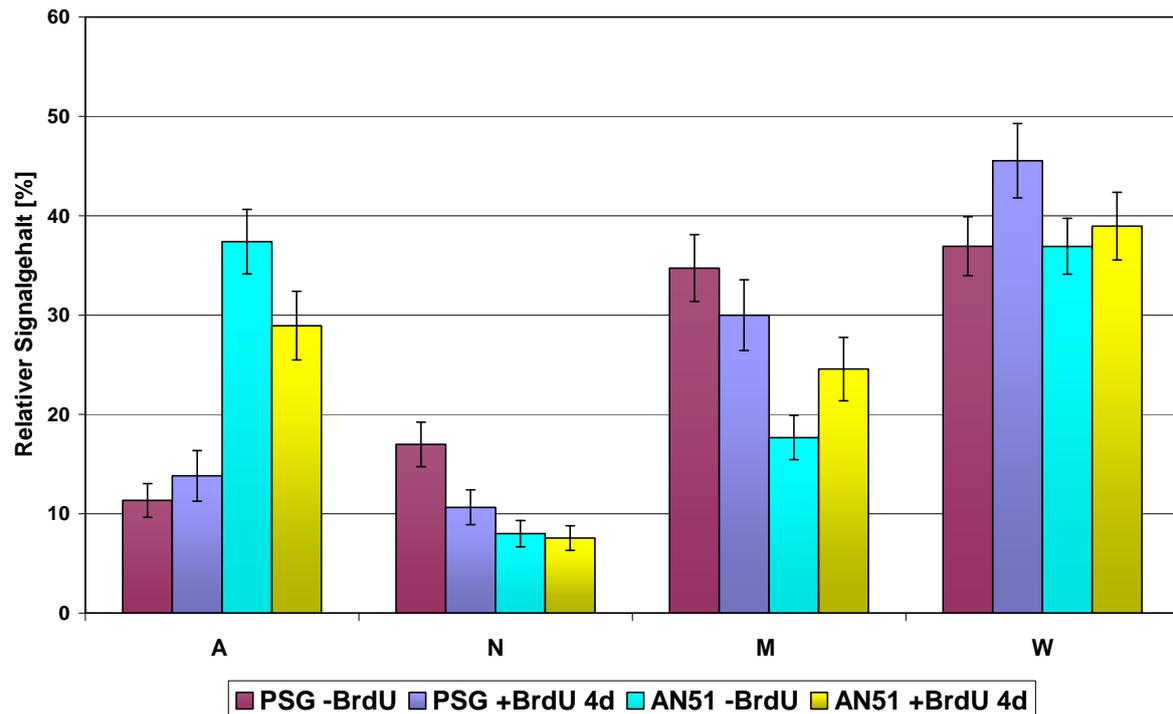


Abb. 47: Abstände zum Nukleolus nach 4 Tagen BrdU- Inkubation in HeLa Zellen

Die Signale wurden in vier Kategorien aufgeteilt und jede der Kategorien zeigt den relativen, prozentualen Anteil am Gesamtsignalgehalt an. Assoziiert (A) sind alle mit dem Nukleolus kolokalisierenden oder bis zu 600nm davon entfernten Voxel: N (Nähe) umfasst Voxel mit einem Abstand von 600nm bis 1 μ m. In der dritten Kategorie M (=mittlere Entfernung) sind die Signale von 1,2 μ m bis 1,8 μ m erfasst und in der vierten Kategorie (W) befinden sich alle Signale mit Abstand >2 μ m. Deutlich zu sehen ist, dass die Positivkontrolle AN51 ohne Inkubation mit BrdU einen hohen Anteil sowohl in Kategorie A als auch in Kategorie W aufweist, während der PSG BAC in seneszenten Zellen einen sehr hohen Anteil in den mittleren und weiten Kategorien M und W hat.

Nachdem für den PSG Cluster auch über diese Auswertungsmethode nur minimale Veränderungen in der Kategorie A zwischen replikativ kompetenten und replikativ seneszenten Zellen festgestellt wurden, wurde das experimentelle Design nochmals überprüft. Wie oben erwähnt, wurde nach 4 Tagen BrdU- Stimulierung die höchste transkriptionelle Veränderung beobachtet (Endoh et al., 2009), der Anteil an replikativ seneszenten Zellen in den vorliegenden Experimenten lag jedoch bei unter 50% (visuelle Beobachtung). Da aufgrund der Wahrscheinlichkeiten vermutlich auch zahlreiche replikativ kompetente Zellen in die Auswertung einfließen, wurde die Inkubationsphase mit BrdU auf insgesamt 6 Tage verlängert und noch einmal ein SA - β - Gal Test durchgeführt. Als Vergleich wurde ein Teil der Zellen bereits nach 4 Tagen Inkubation mit BrdU diesem Seneszenztest unterzogen:

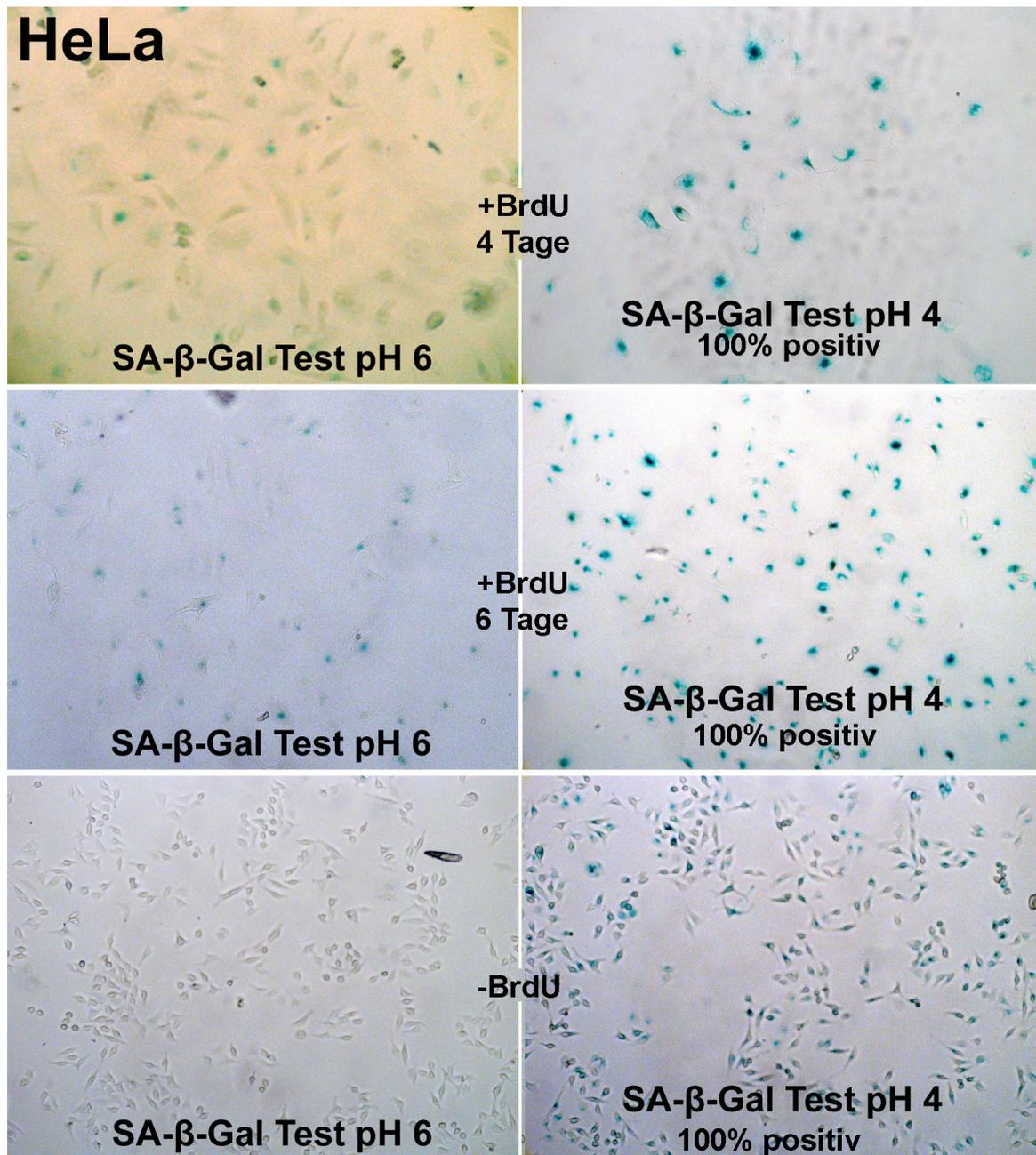


Abb. 48: SA- β- Gal Test in HeLa Zellen nach 4 und 6 Tagen BrdU- Inkubation

Die Zellen wurden mit 2%PFA und 0,2% Glutaraldehyd (GA) fixiert. Links ist der spezifische Seneszenztest bei pH6 dargestellt, rechts der Nachweis der lysosomalen Galaktisodase als Positivkontrolle bei pH4. Inkubation mit BrdU für 4 Tage (oben) färbt weniger als die Hälfte der Zellen blau, nach 6 Tage (Mitte) sind etwa 90% der Zellen seneszent und ohne BrdU (unten) sind keine Blaufärbungen sichtbar.

Die Abbildung zeigt, dass die Seneszenzinduktion nach 6 Tagen Inkubation mit BrdU deutlich mehr blaugefärbte und damit replikativ seneszente Zellen liefert als nach 4 Tagen Inkubation. Eine genaue Abschätzung der prozentualen Anteile ist jedoch schwierig, da die Färbungen sehr heterogen sind. Deswegen wurde zusätzlich in einem immunocytochemischen Ansatz die replikative Kompetenz der Zellen über den Proliferationsmarker KI-67 untersucht, um es genauer zu quantifizieren. Dieser zeigt bei zyklierenden Zellen nach einer

Antikörperfärbung während des ganzen Zellzyklus Signale vorwiegend im Nukleolus. Zellen, die den Zellzyklus verlassen haben wie quieszente oder seneszente Zellen, zeigen keine Färbung (Solovei, 2005). In Tumorzellen wie HeLa sollte jedoch der Anteil an quieszenten Zellen vernachlässigbar sein. Dazu wurden die Zellen nach dem SA- β - Gal Test mehrmals gewaschen und eine Antikörperfärbung gegen KI-67 durchgeführt.

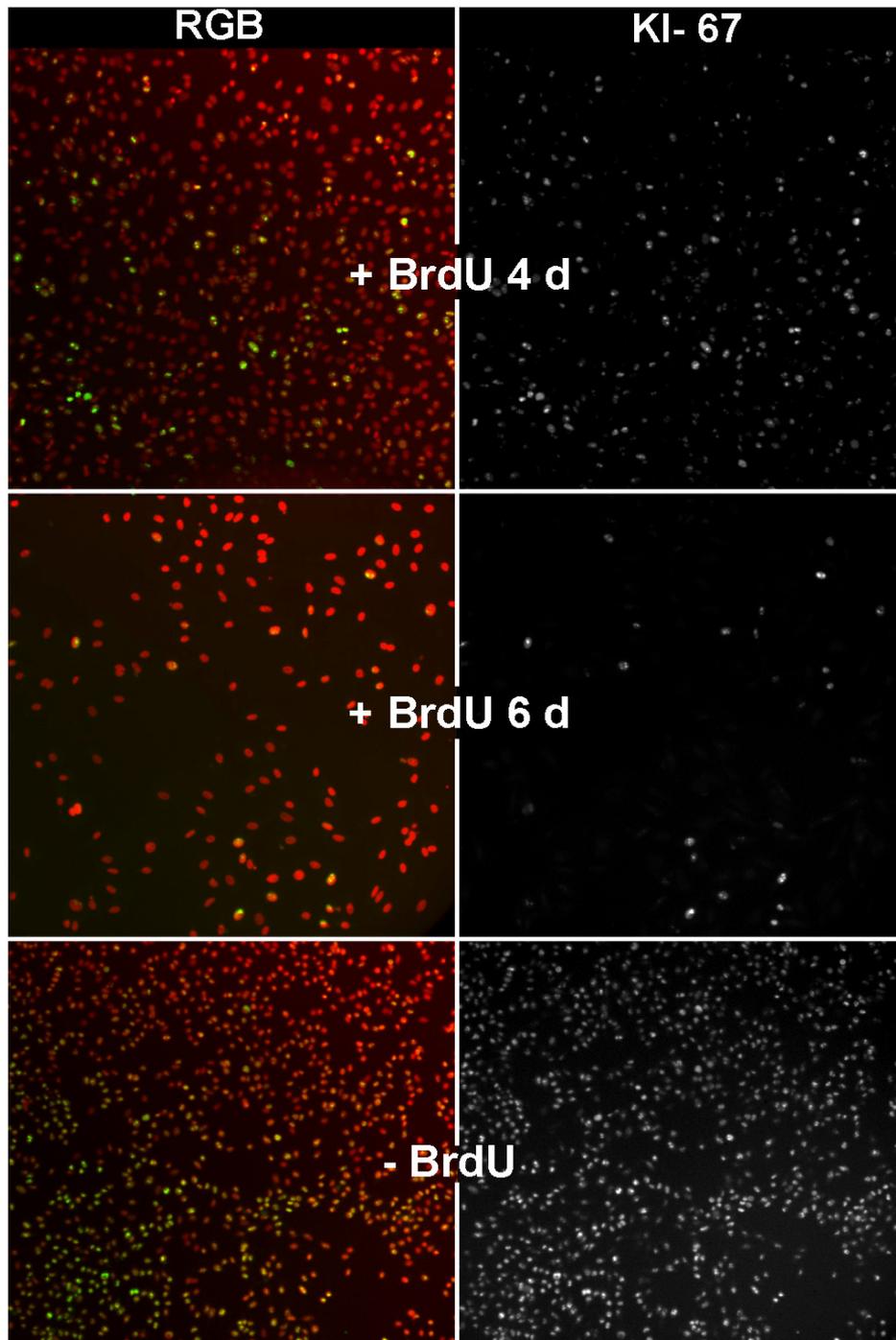


Abb. 49: KI-67 Färbung von HeLa- Zellen

Zu sehen sind Epifluoreszenzbilder von HeLa Zellen, die 4 oder 6 Tage lang mit BrdU inkubiert wurden. Links sind jeweils die RGB Bilder aus DAPI und KI-67 Signalen, rechts nur KI-67- FITC Signale. Nach 4 Tagen BrdU Inkubation zeigen in etwa die Hälfte der Zellkerne ein KI-67 Signal, nach 6 Tagen Inkubation nur noch vereinzelte Zellen. Bei der Negativkontrolle im unteren Panel mit uninduzierten, proliferierenden Zellen zeigen fast alle Kerne KI-67 Signale.

Wie die Abbildung zeigt, ist der Anteil an seneszenten Zellen nach 6 Tagen Inkubation mit BrdU wesentlich höher als nach 4 Tagen. Für eine Quantifizierung wurden mehrere Felder auf dem Deckglas zufällig ausgewählt und nach Anzahl der positiven und damit proliferierenden Zellen ausgezählt.

Tage mit BrdU Inkubation	Anzahl ausgezählter Felder	Prozent KI-67+
4d	3	44,2% +/- 3,5%
6d	3	12,6% +/- 4,5%
6d+/6d-	3	15,3% +/- 1,6%
-BrdU	5	93,2% +/- 0,9%

Tabelle 7: Anzahl von seneszenten Zellen mittels KI-67 Färbung

Die Tabelle zeigt, dass der Anteil KI-67 positiver Zellen nach 6 Tagen Inkubation mit BrdU gegenüber dem Wert nach 4 Tagen deutlich abgenommen hat. Nach 4 Tagen ist nur etwa die Hälfte der Zellen seneszent, nach 6 Tagen haben fast 90% der Zellen replikative Seneszenz erreicht. Ein Experiment, bei dem die Zellen 6 Tage mit und anschließend 6 Tage ohne BrdU inkubiert wurden, liefert ähnliche Ergebnisse wie 6 Tage Inkubation mit BrdU und zeigt somit, dass induzierte replikative Seneszenz nicht reversibel ist.

Da der Anteil an seneszenten Zellen nach 4 Tagen Inkubation nur bei gut 50% lag und kein Marker für Proliferation bzw. Seneszenz aufgrund der Farbenlimitierung am Mikroskop zusätzlich ins Experiment integriert werden konnte, wurde nun im weiteren Verlauf 2 Tage länger mit BrdU inkubiert und neue FISH Experimente durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde aus den oben beschriebenen Gründen nun der BAC AN16 statt AN23 verwendet. Wiederum wurden 40 zufällig ausgewählte Kerne gescannt, Bilder bearbeitet und wie oben beschrieben ausgewertet. Des Weiteren wurden Zellen 6 Tage mit BrdU inkubiert und dann 6 Tage in normalem Medium weiterkultiviert, um zu sehen, ob es hier eventuell zu Repositionierungen kommt. Folgende Tabelle und die anschließende Graphik zeigen den Anteil an assoziierten Signalen mit dem Nukleolus:

	PSG Assoziation	AN51 Assoziation	AN16 Assoziation
+BrdU 6 Tage (N=40)	32 von 120 Signalen = 26,6% (95% KI:±8%)	62/120 = 51,6% (95% KI:±9%)	14/120 = 11,6% (95% KI:±5,8%)
- BrdU (N=40)	22/120 = 18,3% (95% KI:±7%)	40/120 = 33% (95% KI:±8,5%)	18/120 = 15% (95% KI:±6,4%)
+6 Tage/- 6 Tage (N=29)	17/87 = 19,5% (95% KI:±7,3%)	24/87 = 27,6% (95% KI:±8,1%)	6/87 = 6,9% (95% KI:±4,5%)

Tabelle 8: Assoziation mit dem Nukleolus nach 6 Tagen BrdU- Inkubation in HeLa Zellen

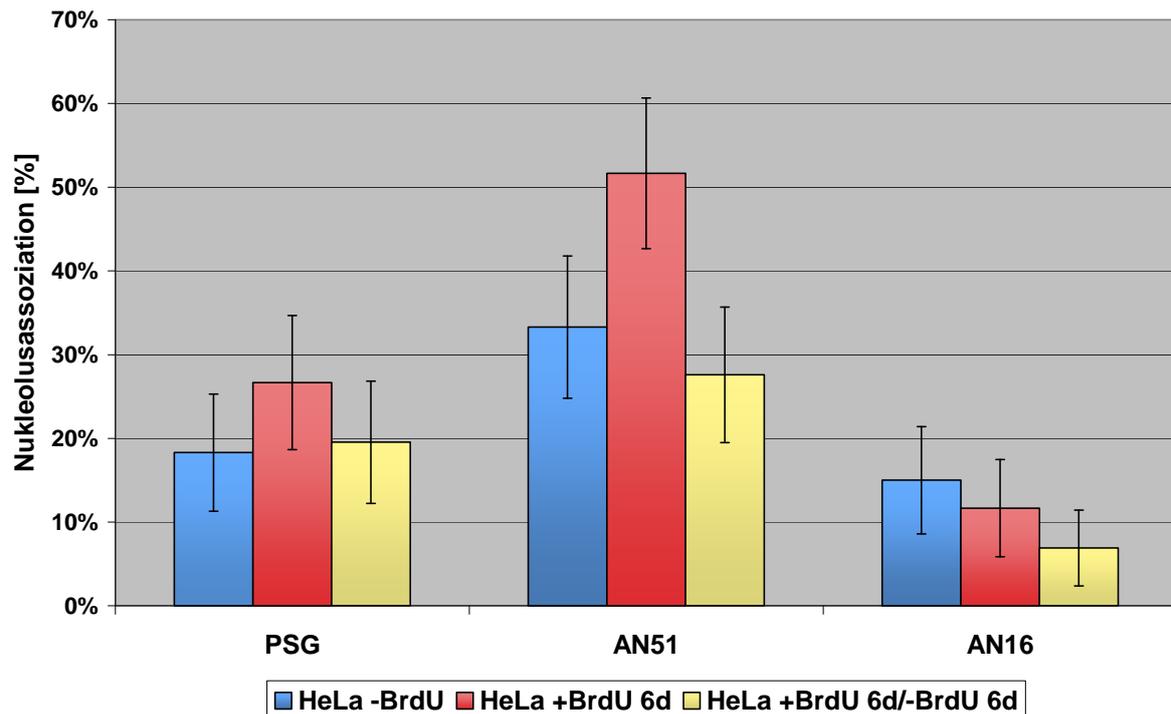


Abb. 50: Assoziation mit dem Nukleolus nach 6 Tagen BrdU- Inkubation in HeLa Zellen

Der Graph und die Tabelle 8 zeigen die prozentuale Assoziation von BAC- Signalen mit dem Nukleolus und einer daraus resultierenden Lage im perinukleolären Heterochromatin (N=40). Nach 6 Tagen Inkubation (roter Balken) finden sich die größten Assoziationswerte für PSG und AN51, während die insgesamt 12- tägige Inkubation mit und ohne BrdU zu jeweils ähnlichen Werten führt wie bei uninduzierten Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen dem 95% Konfidenzintervall.

Um auch diese Ergebnisse quantitativ zu erfassen, wurden die Abstände der Signale vom Nukleolus mit eADS vermessen. Die beiden Nullexperimente, die ohne BrdU Inkubation durchgeführt wurden, einmal als Kontrolle für 4 Tage Inkubation, einmal als Kontrolle für 6 Tage Inkubation, sind zusammengefasst und der Mittelwert aus 80 Kernen dargestellt. Zur besseren Übersicht sind die Abstände für jeden BAC in einem eigenen Plot dargestellt (Abb.51-53):

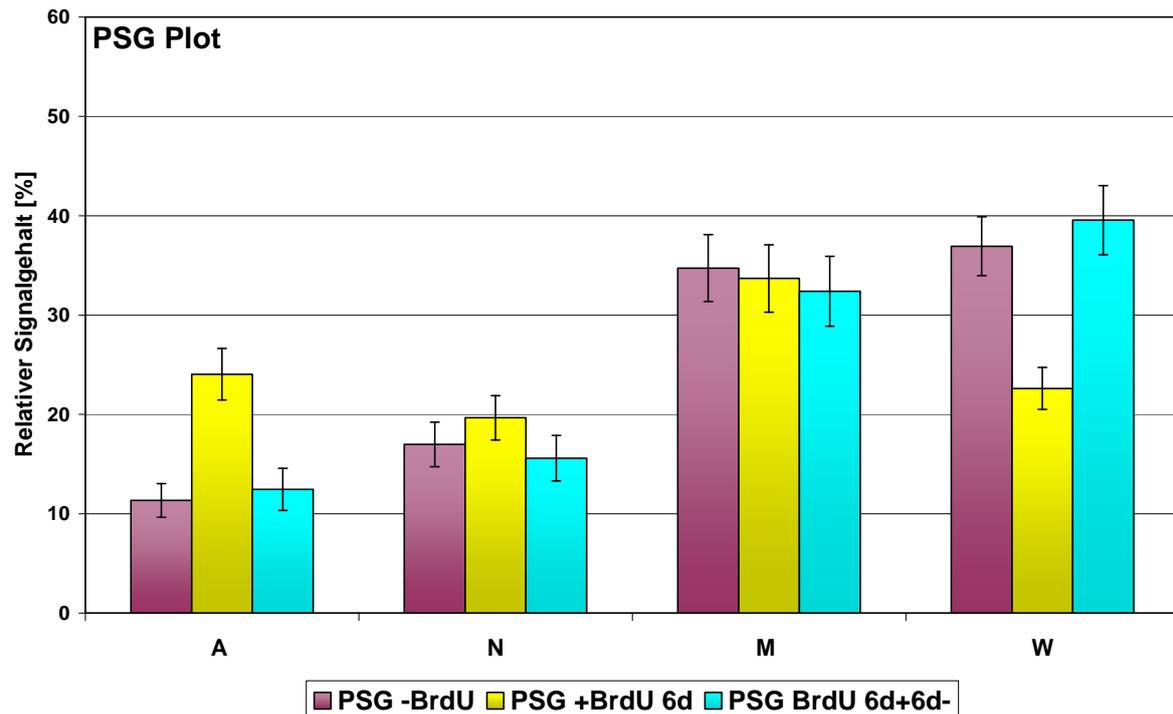


Abb. 51: Abstände von PSG zum Nukleolus nach 6 Tagen BrdU- Inkubation in HeLa Zellen

Der Graph zeigt die Zusammenfassung des PSG BACs über alle Experimente. Im Vergleich zu uninduzierten Zellen ist bei seneszenten Zellen ein höherer Anteil assoziiert (A) und dafür weniger in der Kategorie W ($>2\mu\text{m}$). Im Allgemeinen ist in seneszenten Zellen eine Tendenz der Signalverteilung zum Nukleolus hin erkennbar, wobei die mittleren beiden Kategorien wenig Änderung aufweisen. Nach 6 Tagen mit und 6 Tagen ohne BrdU ist der Großteil der Signale weiter als $1,2\mu\text{m}$ vom Nukleolus entfernt (Kategorie M + W).

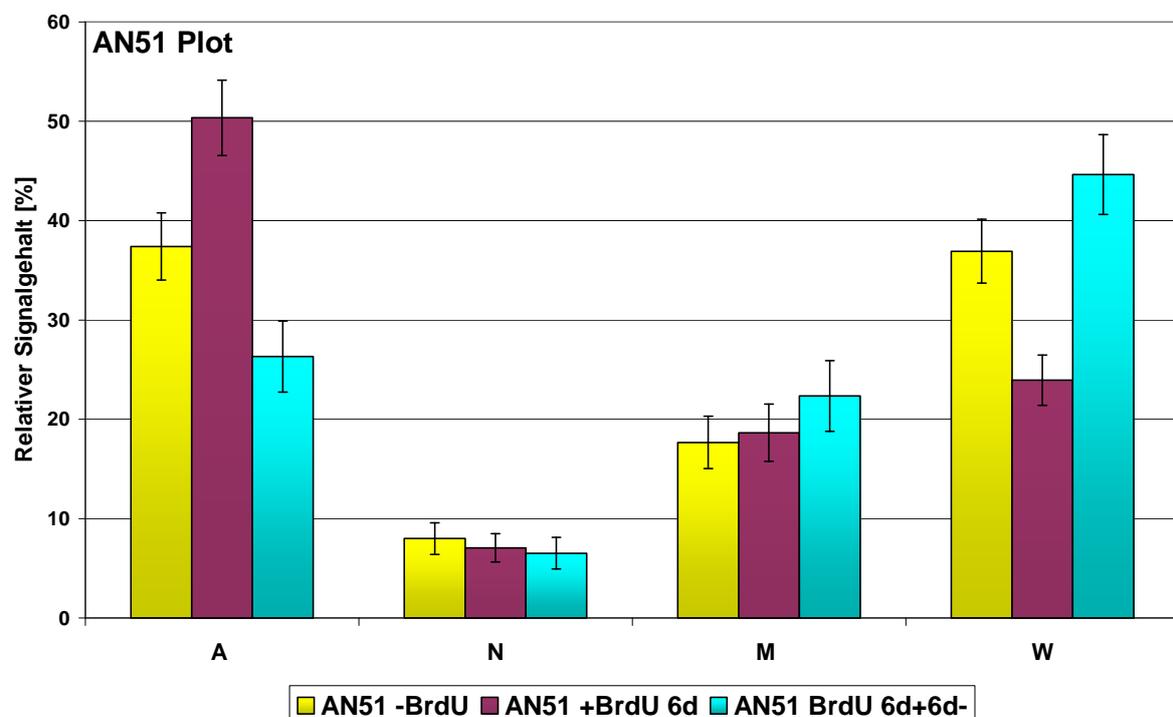


Abb. 52: Abstände von AN51 zum Nukleolus nach 6 Tagen BrdU- Inkubation in HeLa Zellen

Der Graph zeigt die Signalhäufigkeiten für die vier verschiedenen Kategorien für den BAC AN51 über den gesamten Experimentverlauf. 50% der Signale finden sich nach 6 Tagen BrdU Inkubation in der

Assoziationskategorie A und nur wenige in der Kategorie N. Für uninduzierte Zellen ist der Anteil an Assoziationen und der Anteil in der Kategorie W gleich und nur wenige Signale in den nahen und mittleren Entfernungen zu finden. 6 Tage mit und 6 Tage ohne BrdU inkubierte Zellen zeigen einen deutlich niedrigeren Anteil von assoziierten Signalen, dafür einen höheren Anteil in der Kategorie W (>2µm entfernt) im Vergleich zu 6 Tage inkubierten Zellen.

Für die Negativkontrolle AN16 gibt es nur ein Kontrollexperiment und die Anzahl der ausgewerteten Kerne beträgt 40.

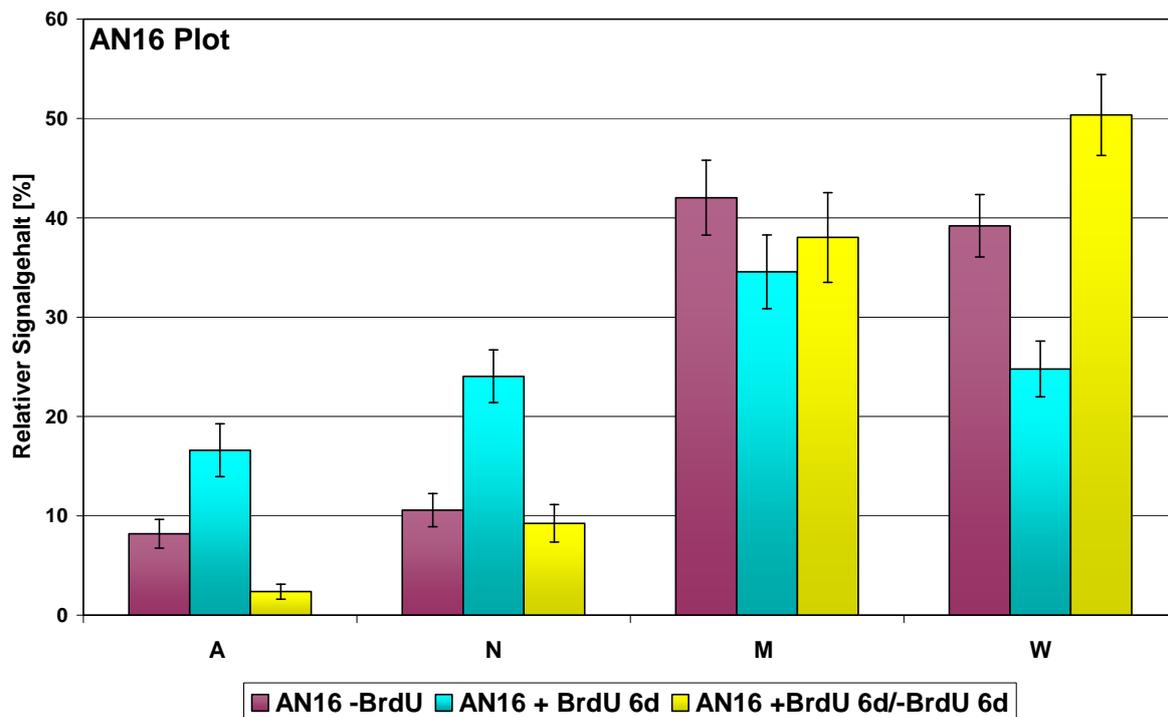


Abb. 53: Abstände von AN16 zum Nukleolus nach 6 Tagen BrdU- Inkubation in HeLa Zellen
Dargestellt ist die Signalverteilung für die Negativkontrolle AN16 ermittelt durch eADS. Nach 6 Tagen Inkubation ist ein höherer Signalgehalt assoziiert oder in der Nähe des Nukleolus als in uninduzierten Zellen. Nach 6 Tagen Inkubation mit und 6 Tagen ohne BrdU sind fast 90% der Signale 1,2µm oder mehr vom Nukleolus entfernt (Kategorien M + W).

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild der Signalverteilung: Sowohl PSG als auch AN51 haben nach Induktion replikativer Seneszenz einen höheren Anteil an Assoziationen mit dem Nukleolus, während der Anteil an weit entfernten Signalen (>2µm) jeweils abnimmt und die mittleren Kategorien N +M in etwa unverändert bleiben. Dies gilt auch für die Negativkontrolle AN16, wobei hier der Anteil an assoziierten Signalen in replikativ seneszenten Zellen kleiner wird, gleichzeitig aber über eADS ermittelte Signale in der Assoziationskategorie A zunehmen und tendenziell eine Bewegung zum Nukleolus hin vermuten lassen. Nach insgesamt 12- tägiger Kultivierung mit und ohne BrdU zeigt sich für alle drei BACs eine tendenzielle Wegbewegung vom Nukleolus.

Um zu sehen, ob sich durch die erfassten Bewegungen die Distanzen zwischen dem PSG-BAC und dem BAC AN51 nach induzierter Seneszenz ändern, wurden diese ebenfalls mit eADS vermessen. Die lineare Distanz auf dem Chromosom beträgt etwa 6,5Mb.

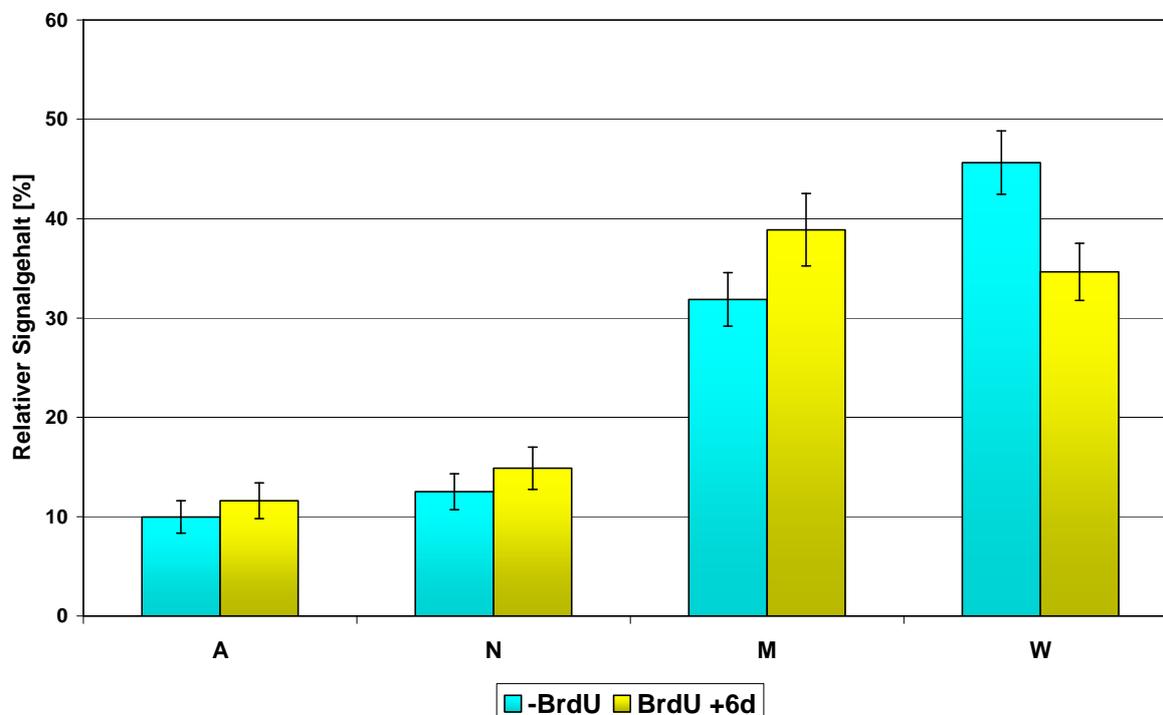


Abb. 54: Kategorisierte Abstände zwischen PSG und AN51 Signalen nach 6 Tagen BrdU-Inkubation in HeLa Zellen

Die Distanzen zwischen den BAC- Signalen von PSG und AN51 aufgeteilt in die 4 Kategorien Assoziiert, Nähe, Mittlere Entfernung und Weite Entfernung ($>2\mu\text{m}$). Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Distanzverteilungen (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test).

Die Abbildung zeigt relativ gleiche Abstände in den für Assoziationen interessanten beiden Kategorien A und N zwischen den BAC Signalen von PSG und AN51 in normal proliferierenden und seneszenten Zellen.

4.7.1.2. Der PSG- Cluster in IMR90 Zellen

Um herauszufinden, ob die gefundenen Beziehungen auch für normale, diploide Zellen gelten, wurde diese BAC- Kombination auch auf IMR-90 Fibroblasten getestet. Die Zellen wurden aber nicht mittels BrdU- Inkubation in replikative Seneszenz versetzt, sondern es wurden eine frühe (p13) und eine späte (p33) Passage verwendet. Die Zellen wurden wenige Tage nach dem Auftauen auf Deckgläser ausgesät und fixiert, einmal für die 3D FISH und parallel mit 2%PFA und 0,2% GA für den SA- β - Gal- Test. Abb.55 zeigt das Ergebnis des Tests:

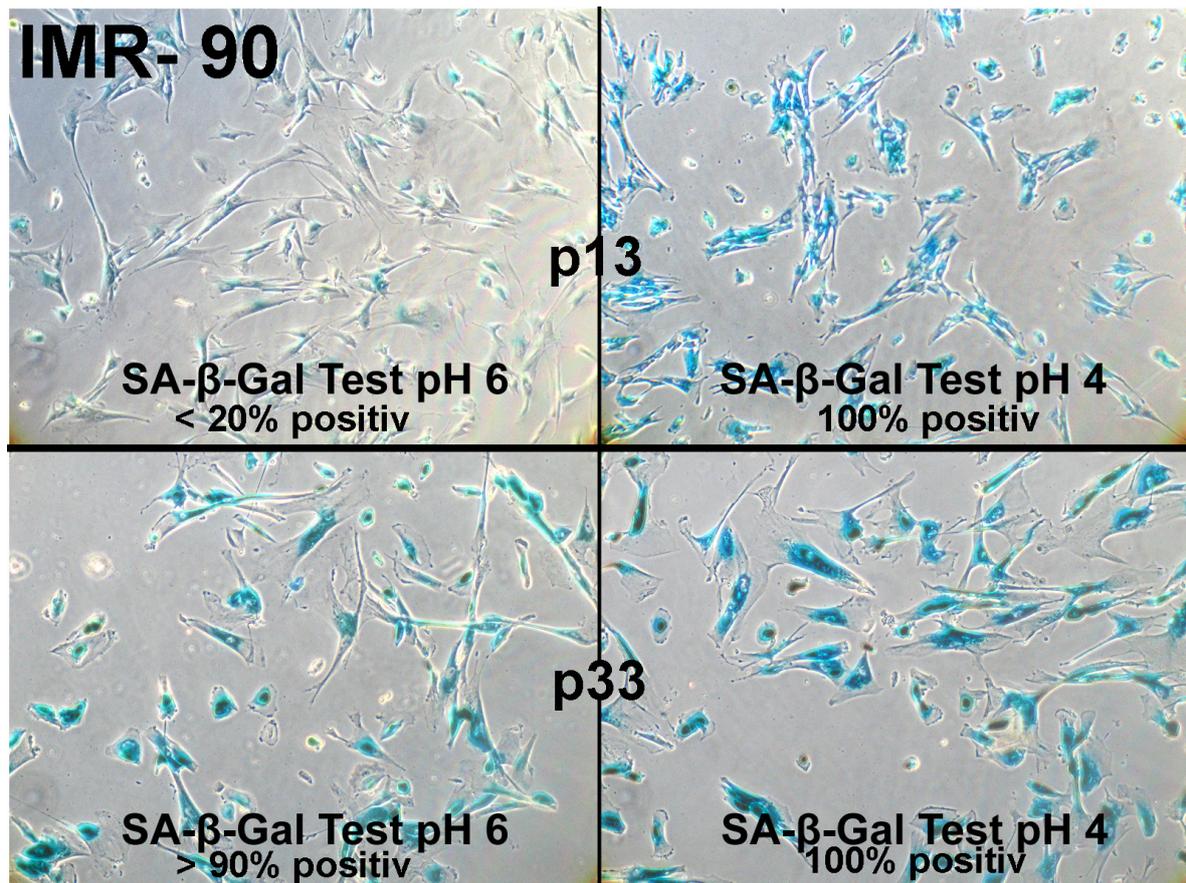


Abb. 55: SA- β- Gal Test in IMR90-Zellen in einer frühen und späten Passage

Die Zusammenstellung zeigt IMR-90 Zellen nach dem SA- β- Gal- Test. Oben sind die Bilder einer frühen Passage (p13), links seneszente Zellen bei pH6 und rechts die Funktionskontrolle des Tests bei pH4. Unten sind Zellen einer späten Passage (p33) gezeigt. Links ist ein hoher Anteil an seneszenten Zellen bei pH6 zu sehen, rechts wiederum bei pH4 sind alle Zellen blau gefärbt. Die prozentualen Angaben über Seneszenz beruhen auf visueller Schätzung nach Durchsicht mehrerer Areale.

Danach wurden die BACs für PSG, AN51 und AN16 auf die Zellen der unterschiedlichen Passagen hybridisiert. Da die IMR-90 Zellen wie viele diploide fibroblastenartige Zellen sogenannte seneszenzassoziierte Heterochromatinfoci (SAHFs) zeigen, konnte beim Scannen klar zwischen seneszenten und zyklierenden Kernen unterschieden werden. In der frühen Passage ist nur ein kleiner Anteil an seneszenten Zellen mit SAHFs vorhanden, in der späten Passage beträgt der Anteil etwa 60-70% (visuelle Schätzung).

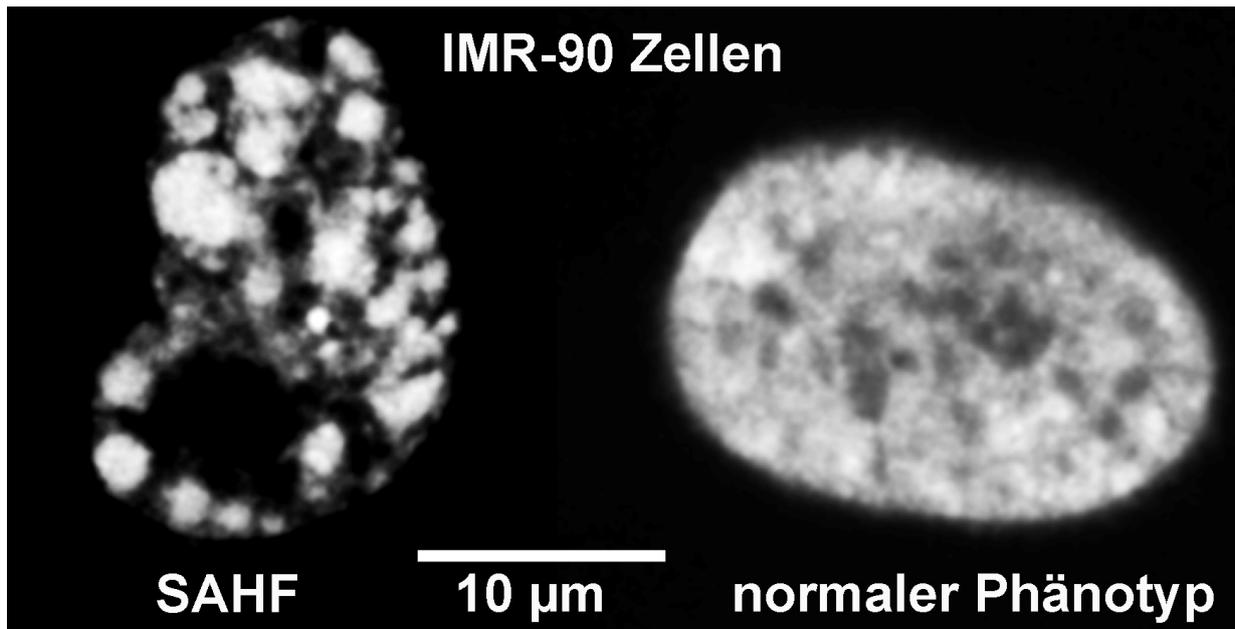


Abb. 56: SAHF in IMR90-Zellen

Zwei mittlere konfokale Schnitte von IMR-90 Interphasekernen mit DAPI- Färbung von seneszenten Zellen mit SAHFs (links, p33) bzw. normal zyklierenden Zellen (rechts, p13).

Es wurden 40 Kerne gescannt und der Anteil an Assoziationen mit dem Nukleolus ermittelt (Tabelle 9 + Abb. 57):

	PSG Assoziation	AN51 Assoziation	AN16 Assoziation
p13 (früh) (N=40)	16 von 80 Signalen = 20% (95% KI: $\pm 8,8\%$)	21/80 = 26,25% (95% KI: $\pm 9,8\%$)	14/80 = 17,5% (95% KI: $\pm 8,5\%$)
p33 (spät) (N=40)	24/82 = 29,3% (95% KI: $\pm 10,1\%$)	28/82 = 34,1% (95% KI: $\pm 10,5\%$)	24/93 = 25,8% (95% KI: $\pm 9,1\%$)

Tabelle 9: Assoziation mit dem Nukleolus in IMR90-Zellen einer frühen und späten Passage

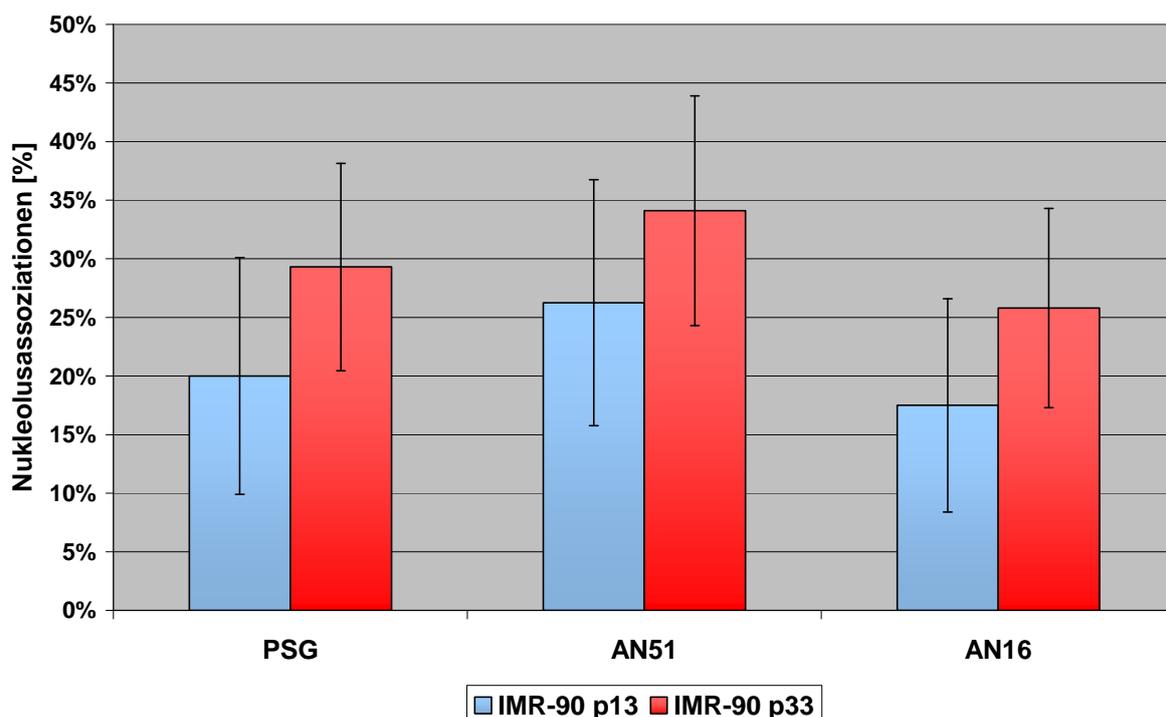


Abb. 57: Assoziation mit dem Nukleolus in IMR90-Zellen einer frühen und späten Passage

Tabelle 9 und die Abbildung zeigen den prozentualen Anteil an Nukleolusassoziationen der drei BACs in IMR-90 Zellen einer frühen und späten Passage. Der Anteil ist jeweils um etwa 10% größer in den seneszenten Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen dem 95% Konfidenzintervall.

Ebenso wurden die Distanzverteilungen der BACs zum Nukleolus vermessen. Die Verteilung sieht folgendermaßen aus (Abb.58):

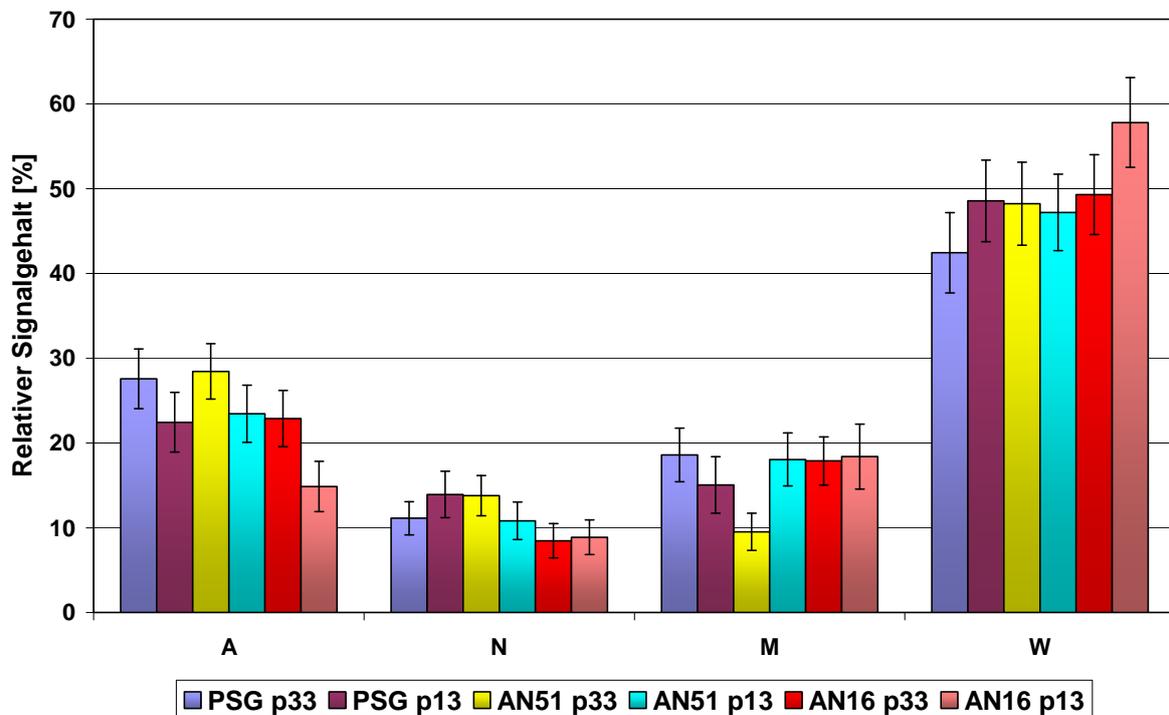


Abb. 58: Abstände der BACs zum Nukleolus in IMR90-Zellen einer frühen und späten Passage
 Der Graph zeigt die Signalverteilungen für die 3 BACs auf IMR-90 Zellen einer frühen und einer späten Passage (p13 und p33), aufgespalten nach den 4 oben beschriebenen Kategorien und über die eADS- Software ermittelt. Allgemein ist der Unterschied zwischen der frühen und späten Passage nicht ausgeprägt, das Gros an Signalen befindet sich mehr als 2µm entfernt vom Nukleolus. Etwa ein Viertel der PSG und AN51 Signale zeigt assoziativen Charakter. Die Negativkontrolle AN16 zeigt nur sehr wenig Assoziation mit dem Nukleolus.

Wie die Abbildung zeigt, lassen sich die Bewegungen der Loci, wie sie sich aus den unterschiedlichen Assoziationszahlen der Experimente bzw. den Abständen zum Nukleolus in HeLa Zellen ableiten lassen, nicht auf die diploiden IMR-90 Zellen übertragen. Die Anzahl an assoziierten Signalen in seneszenten Zellen ist zwar für alle BACs höher, die Distanzen zum Nukleolus sind aber nicht signifikant unterschiedlich zu den proliferierenden Zellen.

4.7.1.3. Weitere NAD- Regionen in IMR90 Zellen

um zu sehen, ob die Veränderungen auf Grund von Seneszenz, die in HeLa Zellen gefunden wurden, auch für andere NADs gelten, wurden drei BACs auf dem Chromosom 1 ausgewählt. Sie stammen aus dem Labor von Thomas Ried (NIH, Bethesda) und wurden schon in früheren Experimenten in diesem Labor benutzt (Biener, 2005). Zwei BACs liegen in zwei

benachbarten NADs (BAC 1/46 und 1/48) und ein BAC (1/53) ist nicht innerhalb einer NAD lokalisiert:

RP11-105E14 (1/46) NAD	RP11-71L20 (1/48) NAD	RP11-193J5 (1/53)
Start: 145474158	Start:151280353	Start:166040131
Ende: 145636051	Ende:151425332	Ende:166199501
Länge: 161894	Länge:144980	Länge:159371
Bande: 1q21.1	Bande:1q21.3	Bande:1q24.1
Gen: ITGA10	Gen: SELENBP1	Gen: FAM78B

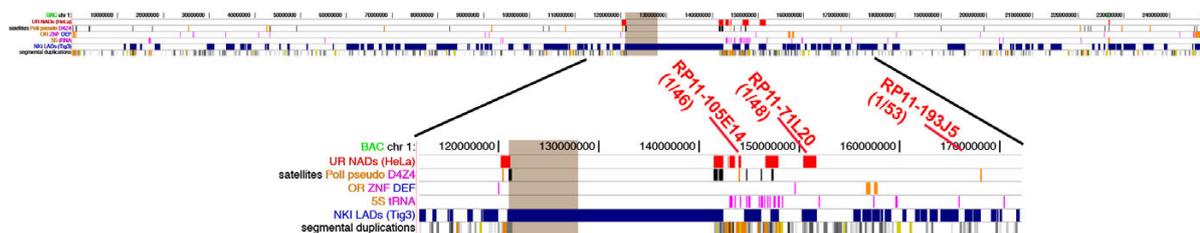


Abb. 59: Lage der BACs auf HSA 1

Der Bereich, in dem die NADs und die verwendeten BACs (rot) liegen. Modifiziert nach (Nemeth et al., 2010).

Die BACS wurden in einem 2D- FISH Experiment auf HLY Metaphasenpräparaten getestet:

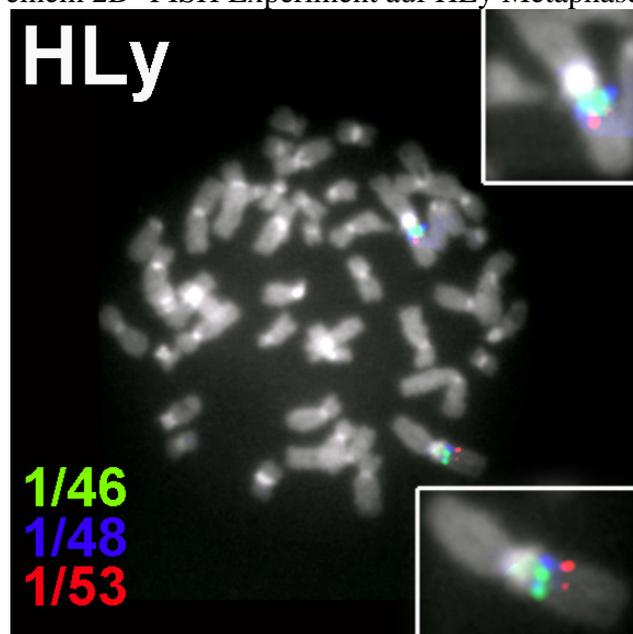


Abb. 60: Test der BACs von HSA1 auf HLY- Metaphasenpräparaten

Epifluoreszenzbild einer 2D FISH auf HLY Metaphasen mit den BACs 1/46 FITC (grün), 1/48 Cy3 (blau) und 1/53 TR (rot).

Anschließend wurden sie in einer 3D FISH auf IMR-90 Zellen mit früher und später Passage hybridisiert. Tabelle 10 und Abb. 61 zeigen die Assoziationszahlen der BACs mit dem Nukleolus in jeweils 40 gescannten Kernen:

	1/46 NAD	1/48 NAD	1/53 nicht NAD
p13 (früh) (N=40)	10 von 80 Signalen = 12,5% (95% KI: $\pm 7,4\%$)	13/80 = 16,25% (95% KI: $\pm 8,3\%$)	11/80 = 13,75% (95% KI: $\pm 7,7\%$)
p33 (spät) (N=40)	11/85 = 12,9% (95% KI: $\pm 7,5\%$)	9/85 = 10,6% (95% KI: $\pm 6,7\%$)	5/85 = 5,9% (95% KI: $\pm 5,1\%$)

Tabelle 10: Assoziation der BACs von HSA1 mit dem Nukleolus in IMR90-Zellen einer frühen und späten Passage

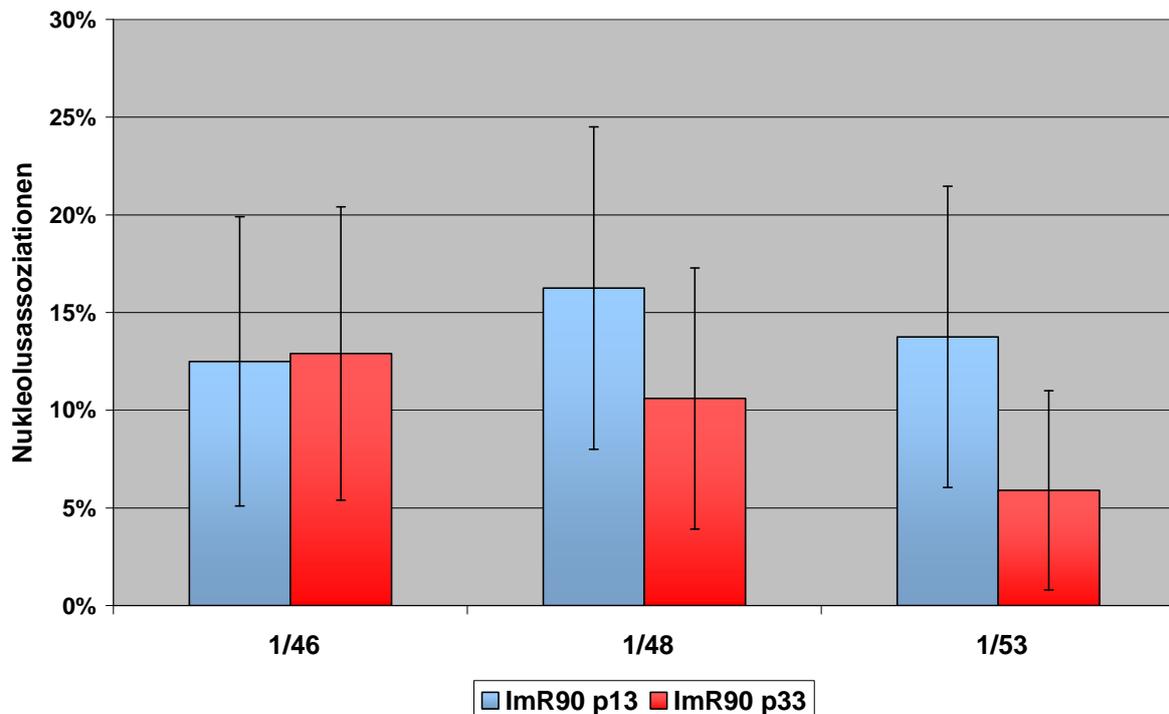


Abb. 61: Assoziation der BACs von HSA1 mit dem Nukleolus in IMR90-Zellen einer frühen und späten Passage

Die Tabelle 10 und die Graphik zeigen den Anteil der BAC Signale auf Chromosom 1, die mit dem Nukleolus assoziiert sind, in IMR-90 Zellen. Während es bei 1/46, dem BAC in einer NAD, keine Veränderungen gibt, zeigt der NAD- BAC 1/48 in seneszenten Zellen etwas weniger Assoziation und die Negativkontrolle nur noch sehr wenig. Die Fehlerbalken entsprechen dem 95% Konfidenzintervall.

Abb. 62 zeigt die vermessenen Distanzen der Signale zum Nukleolus:

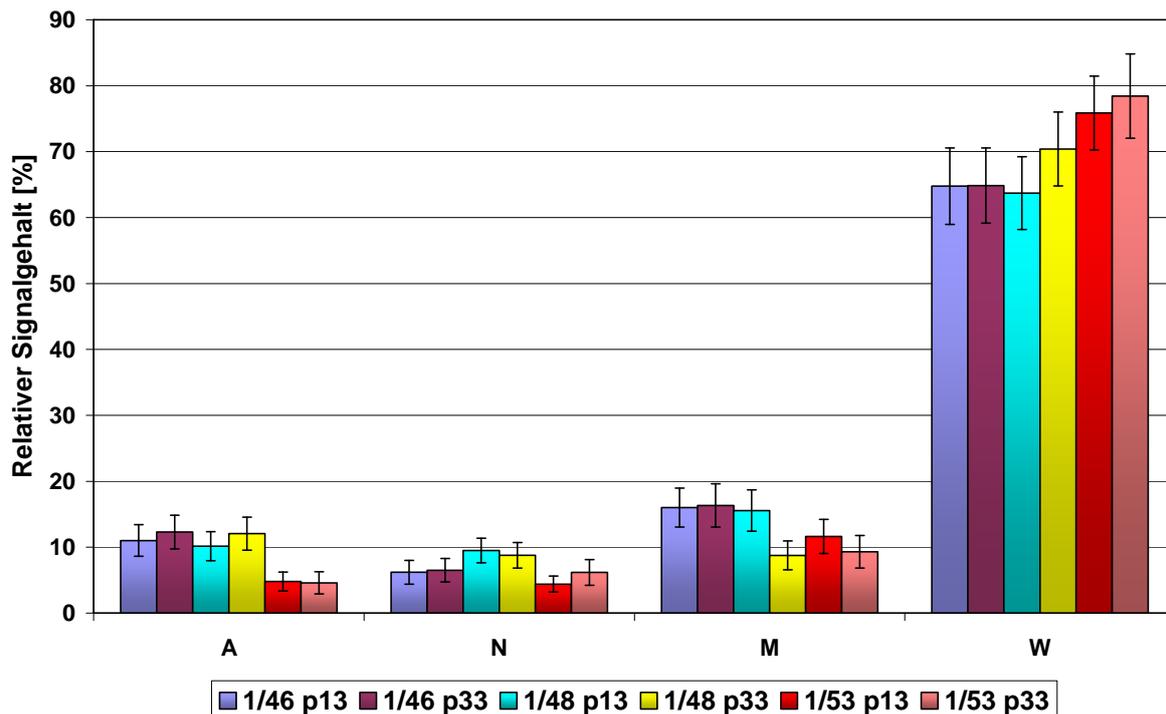


Abb. 62: Abstände der BACs auf HSA1 zum Nukleolus in IMR90-Zellen einer frühen und späten Passage

Die Signalverteilung in IMR-90 Zellen in früher (p13) und später (p33) Passage von den BACs 1/46 (NAD), 1/48 (Nachbar NAD) und 1/53 (Nicht NAD). Zwischen ~65 und knapp 80% der Signale sind weiter als 2µm vom Nukleolus entfernt und der Anteil an assoziierten Signalen beträgt etwa 5-10%.

Für die Versuche an diploiden Zellen gilt, dass sich die Ergebnisse von den HeLa Zellen nicht bestätigen lassen. Weder das PSG- System noch neue BACs zeigen deutliche Positionsänderungen der NAD- assoziierten Signale beim Vergleich von seneszenten und proliferierenden Zellen.

Zusammenfassung:

Bei HeLa Zellen wurden Veränderungen in der Lokalisation der BACs auf HSA19 bzw. der Abstände zum Nukleolus in seneszenten und proliferierenden Zellen nachgewiesen. Eine Repositionierung des PSG- Clusters weg vom Nukleolus in transkriptionell aktive Bereiche in seneszenten Zellen wurde nicht beobachtet, tendenziell nahm der Assoziationscharakter sogar zu. Dies gilt auch für seneszente IMR-90 Zellen. Andere NAD- assoziierte BACs auf Chromosom 1 zeigen keinen Unterschied zwischen seneszenten und proliferierenden Zellen und insgesamt nur sehr wenig Assoziationscharakter.

4.7.2. Östrogenstimulation von MCF 7 Zellen

Nachdem im vorherigen Kapitel längerfristige Reorganisationen (replikative Seneszenz) im Kern untersucht wurden, sollte nun eine in der Literatur beschriebene schnelle Veränderung in der Position bestimmter Chromosomenterritorien genauer untersucht werden.

Die Vorlage dazu lieferte eine Veröffentlichungen von Hu et al. (2008). Die Autoren behaupten, dass nach Stimulation von MCF 7 Zellen mit Östrogen zwei durch den Östrogenrezeptor induzierte Genloci auf zwei unterschiedlichen Chromosomen aufeinander zuwandern und kotranskribiert werden. Diese Effekte sollen in relativ kurzen Zeiträumen nach der Stimulation bereits ab etwa 15- 30 Minuten nachweisbar sein. Nach einer Stunde sollen etwa 60% der durch FISH nachgewiesenen BAC- Signale auf Chromosom 2 (GREB-1 Gen) und Chromosom 21 (TFF1 Gen) kolokalisieren. Stimmen diese Behauptungen, würde das eine massive Reorganisation des Chromatins im Zellkern erfordern.

In dieser Doktorarbeit wurde deswegen versucht, diesen Effekt in Lebendzellversuchen zu bestätigen. Dazu wurden Brustkrebszellen der Linie MCF 7, die in hormonfreiem Medium kultiviert wurden, transient mit paGFP- H4 und wahlweise mRFP- PCNA oder mRFP- H2B transfiziert. Nach 2 Tagen wurden, wie in Kap. 4.6 beschrieben, mit Hilfe der FRAP- Einheit am Spinning Disc Mikroskop in den Zellkernen dieser Zelllinie Streifenmuster aus paGFP Fluoreszenz photoaktiviert und von allen Kernen Bilderstapel angefertigt. Sofort danach wurden die Zellen durch Zugabe von 100nM Östrogen (17 β -estradiol; E2) stimuliert und 4D Beobachtungen zum Verhalten des Streifenmusters durchgeführt. Die von Hu et al. (2008) aus 3D FISH- Analysen indirekt gefolgerten Wanderungen der Territorien von HSA2 und HSA21 würden Positionsveränderungen weiterer Territorien erzwingen, die zwischen HSA2 und HSA21 Territorien liegen. Bei einer solchen Reorganisation sollten die Streifenmuster deformiert werden. Um die Funktionalität der Stimulation zu überprüfen, wurden in einem zweiten Ansatz Zellen transient mit dem GFP- markierten Östrogenrezeptor (ER) transfiziert und die Kinetik der Translokation des ER vom Zytoplasma in den Kern dokumentiert. Des Weiteren wurde eine RT qPCR durchgeführt, um die Hochregulation der beiden östrogenabhängigen Gene zu dokumentieren.

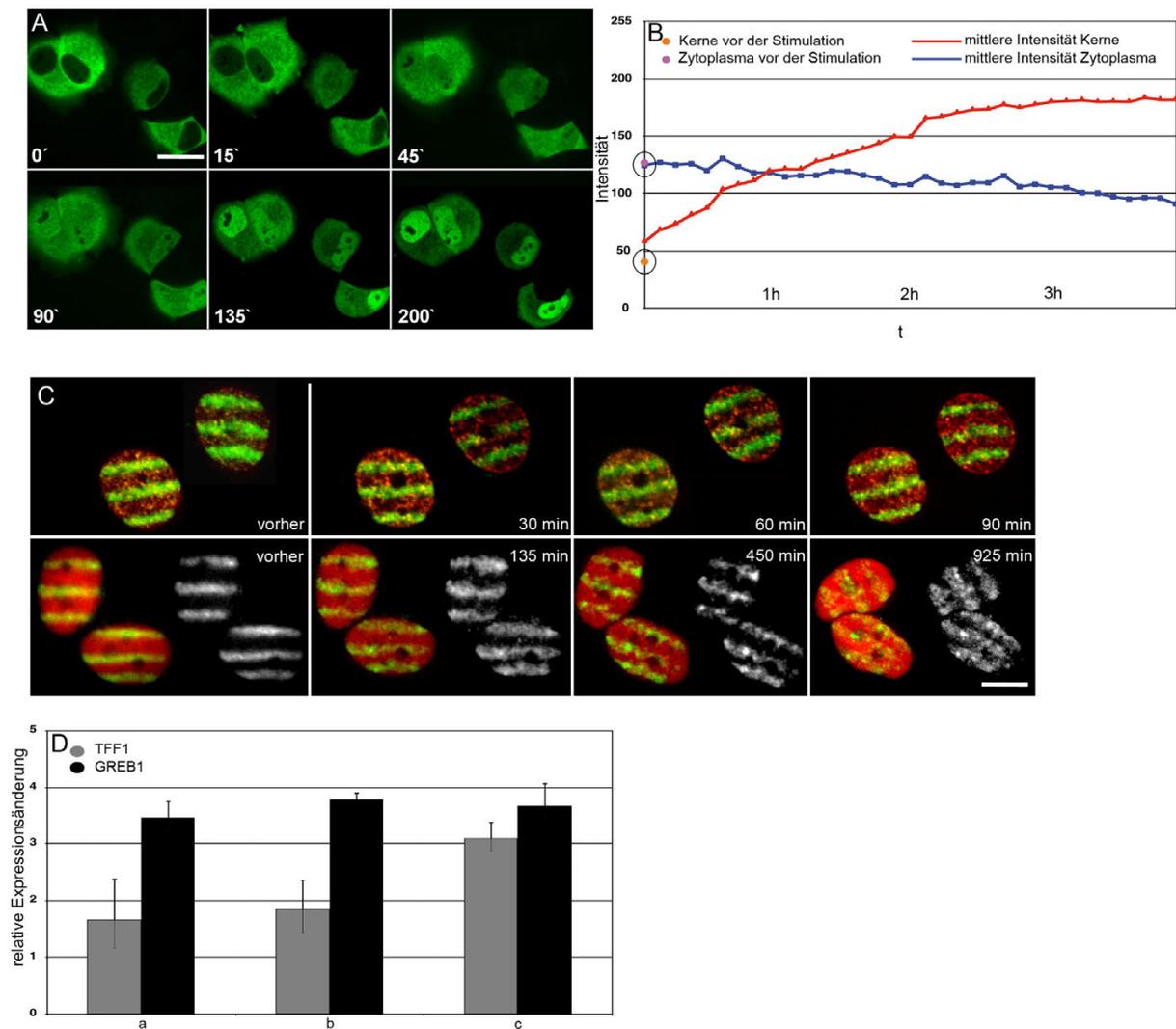


Abb. 63: Östrogenstimulation von MCF 7 Zellen

(A) Zeitserie von MCF-7 Zellen, die transient mit einem GFP- markiertem Östrogen Rezeptor (ER) transfiziert wurden. Links oben sind Zellen vor der Stimulation mit 100 nM 17 β -estradiol zu sehen (Zeitpunkt 0'). Die folgenden Bilder zeigen sinkende Intensitäten im Zytoplasma und steigende Intensitäten im Kern nach der Stimulation. (Balken = 20 μ m) (B) Durchschnittsintensitäten von insgesamt 11 Kernen über die Zeit aufgetragen nach Stimulation mit 100nM Östrogen. Der orange Punkt zeigt die mittlere Intensität der Kerne vor der Stimulation mit Östrogen, der lila Punkt die mittlere Intensität des Zytoplasmas. Im zeitlichen Verlauf nimmt die Intensität im Zytoplasma ab (blaue Linie) und die der Kerne stark zu (rote Linie). (C) Lebendzellversuche mit MCF 7 Zellen, die transient mit H4- photoaktivierbarem GFP sowie mRFP- PCNA (oben) oder mRFP- H2B (unten) transfiziert sind. In den Kernen wurden Streifenmuster von paGFP photoaktiviert. Anschließend wurde 100 nM Östrogen zugegeben und die Beobachtung der Zellen über längere Zeiträume weiterverfolgt. In der oberen Reihe beträgt die zeitliche Auflösung 5 Minuten und die Zellen wurden für 90min mikroskopiert (N=30). Die untere Reihe zeigt ein typisches Langzeitexperiment mit einem Beobachtungsfenster von 925min (~15,5h, N=11; Balken = 10 μ m)). (D) Ergebnisse der RT qPCR mit der relativen Expressionsänderung der beiden Gene TFF1 (graue Säulen) und GREB-1 (schwarze Säulen). Gesamt- RNA wurde nach 3h (a), 6h (b) und 24h Stimulation (c) mit 100 nM Östrogen extrahiert. Die Werte für die Expression von TFF1 und GREB1 sind normalisiert zu unstimulierten Zellen und entsprechen dem Transkriptionsstatus im Vergleich zur Expression der endogenen Kontrolle Actin- β ($\Delta\Delta C_t$).

Wie Abb. 63A und B zeigen, funktioniert die Stimulation mit Östrogen. Der eGFP- markierte Östrogenrezeptor verlagert mit der Zeit seinen Aufenthaltsort vom Zytoplasma in den Kern.

Deutlich machen das die gemessenen Intensitäten über 11 Kerne. In einem definierten Bereich wurden die Durchschnittsintensitäten jeweils im Kern und im Zytoplasma gemessen und diese Werte gemittelt. Sofort nach der Zugabe des Östrogens steigt die Intensität im Kern an und hat nach etwa einer Stunde das Niveau im Zytoplasma erreicht. Nach etwa zwei Stunden pendelt sich der Intensitätswert in den Kernen auf hohem Niveau ein. Nachdem sichergestellt war, dass das Östrogen seine Wirkung zeigt, wurden in den Zellkernen von doppelt transfizierten Zellen Streifenmuster photoaktivierter paGFP Fluoreszenz erzeugt und die Zellen danach mit Östrogen behandelt. In zwei verschiedenen Experimenten wurden 30 Zellen mit zusätzlicher Darstellung von mRFP markiertem H2B für 90 Minuten und weitere 11 Zellen mit zusätzlicher Darstellung von mRFP PCNA für 925 Minuten (>15h) weiterverfolgt. Sowohl in den Kurzzeit- als Langzeitbeobachtungen wurde bei keiner dieser Zellen eine erhebliche Änderung oder gar Zerstörung des Streifenmusters beobachtet. Auch in den Langzeitbeobachtungen wurde lediglich eine leichte Verbreiterung der Streifen beobachtet, genau so wie in unstimulierten, langzeitbeobachteten Kontrollzellen (N=14). Diese Verbreiterung ist Folge von lokal begrenzten Bewegungen fluoreszenzmarkierter Chromatindomänen in den Streifen.

Um die transkriptionellen Veränderungen zu quantifizieren, wurde eine RT- qPCR durchgeführt (Abb. 63D). Nach 3 Stunden Östrogenstimulation zeigte GREB-1 eine Erhöhung der Transkription, nach 6 Stunden waren die Ergebnisse ähnlich wie nach 3 Stunden. Erst nach 24 Stunden Stimulation mit 100nM Östrogen stieg auch die TFF1 Expression stärker an. Mit Werten von ~3x (TFF1) und ~3,5x (GREB-1) relativer Änderung gegenüber den unstimulierten Zellen liegt dieser Anstieg weit unter dem Niveau der von Hu et al (2008) beobachteten Expressionsänderung.

Nachdem Lebendzellversuche keinen Hinweis ergeben haben, dass es zu induktionsbedingten Änderungen der Chromatinanordnung im Kern kommt, wurde die Topographie der beiden Loci auch mit FISH Experimenten untersucht. Die Experimente wurden von Evelin Radulovic durchgeführt, die in ihrer von mir betreuten Diplomarbeit stimulierte MCF 7 Zellen mit FISH-Sonden für die beiden Genloci auf mögliche Kollokalisierungen oder sonstige Veränderungen untersuchte. Dazu wurden BACs benutzt, die die beiden Genloci markieren. Zusätzlich wurden BAC- Pools erstellt, die jeweils etwa 1Mb 3' und 5' der beiden Gene TFF1 auf Chromosom 21q und GREB1 auf Chromosom 2p umfassen, um zu sehen ob sich nach Östrogenstimulation eventuell Chromatinschleifen bilden, die von HSA2 und HSA21 Territorien ausgehen. Nach dem Testen der BACs (siehe Radulovic 2010) wurden von Evelin Radulovic 3D FISH Experimente durchgeführt an Zellen im stimulierten und unstimulierten

Zustand, sowohl mit den jeweiligen BAC- Pools als auch mit CTs. Die Koordinaten zur Wahl der Zellkerne für die 3D Mikroskopie wurden von einem Zufallsgenerator bestimmt. Damit wurde ein *Bias* durch eine nicht- zufällige Auswahl der analysierten Zellkerne ausgeschlossen. Nach dem Scannen der Zellkerne wurden die radialen Verteilungen der BACs, Pools und CTs im Kern analysiert, die Anzahl der Kolo-kalisation ermittelt und die Abstände zwischen den beiden Genloci vermessen. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse präsentiert Abb. 64. Details der Analysen finden sich in der Diplomarbeit von Evelin Radulovic (2010):

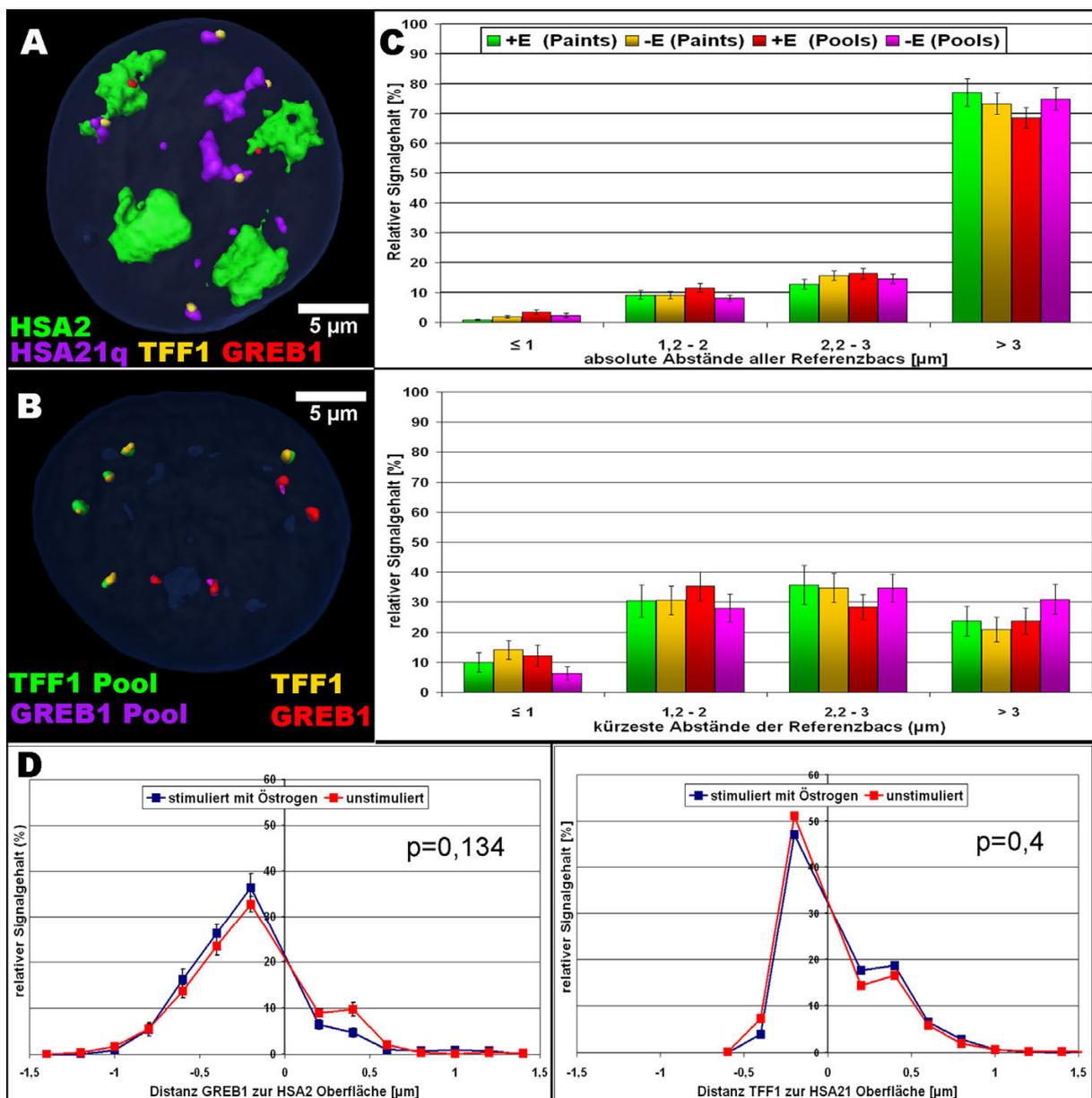


Abb. 64: FISH- Experimente auf MCF 7- Zellen nach Stimulation mit Östrogen

(A) zeigt eine Rekonstruktion einer typischen mit Östrogen stimulierten MCF7- Zelle (+E). Gezeigt sind die beiden Referenzbacs TFF1 und GREB1 mit den zugehörigen CTs. In (B) sind die beiden BACs mit den erstellten jeweiligen BAC Pools dargestellt. Beim Doppelklick auf den Kern öffnet sich eine pdf- Datei mit einem frei drehbaren dreidimensionalen Modell des Kerns.

Die Ergebnisse der Distanzmessungen sind unter (C) zu finden. Dabei stellt die obere Grafik die Distanzen aller GREB1 zu den TFF1 BACs dar, die untere Grafik zeigt nur jeweils das Pärchen,

dem kürzesten Abstand zueinander. Die beiden Graphen in (D) zeigen die Verteilung der Loci innerhalb ihrer CTs.

Wie die Abbildung zeigt, besitzt die verwendete MCF 7 Linie einen stark rearrangierten Karyotyp. In 2D Metaphasen wurden vier HSA2 Signale und drei klare und mehrere diffuse HSA21q Signale beobachtet. Die Anzahl der BAC Signale war für GREB1 ebenfalls vier, für TFF1 jedoch 7-8 Signale (Radulovic, 2010). In 3D FISH Aufnahmen waren nur mehr 5-6 TFF1 Signale zu erkennen. Über Montagen und Amirarekonstruktionen wurden von beiden Experimenten (1. mit Paints, 2. mit BAC Pools) 71 stimulierte und 77 unstimulierte Kerne auf mögliche Kollokalisierungen der beiden Loci untersucht. Dabei wurde bei einem stimulierten Kern nur eine einzige Kollokalisierung zwischen zwei BACs gefunden.

Um zu sehen, ob die Loci eventuell aufeinander zuwandern, ohne zu koloalisieren, wurden die Abstände zwischen den BAC- Signalen vermessen. Wie in Abb. 64C zu sehen ist, gibt es keinen Unterschied in den Distanzen zwischen stimulierten (+E) und unstimulierten (-E) Zellen (oberer Graph). Mehr als 70% der Signale liegen weiter als 3µm voneinander entfernt. Über 3D- Rekonstruktionen mit der Software Amira wurde in allen Zellkernen das Signalpaar von GREB1 und TFF1 ausgewählt, das den kürzesten Abstand zueinander besitzt (unterer Graph). Auch hier liegen nur rund 10% aller Signale im Bereich unter 1µm, der für eventuelle Kollokalisierungen in Frage kommt. Die einzelnen Signalwerte sind alle nicht signifikant unterschiedlich.

In weiteren Untersuchungen wurden die Distanzen der jeweiligen BAC Pool Signale zueinander vermessen, um zu sehen, ob die Region um die beiden Loci expandiert und Schleifen bildet (nicht gezeigt). Auch hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen. Zusätzlich wurde die Lage der BAC Signale im Bezug auf das jeweilige CT vermessen. Wie Abb. 64D veranschaulicht, liegen beide Loci an der Oberfläche der CTs, einige Signale finden sich auch außerhalb. Wieder ist die Signalverteilung zwischen induzierten Zellen und den Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich. Eine visuelle Analyse (zu finden in Radulovic 2010) zeigte zwar in mehr als 57% der Kerne Interaktionen zwischen den CTs, der Anteil ist aber in unstimulierten Zellen mit 53% nur unwesentlich geringer. Zum Schluss wurde noch die Lage der Signale im Kern vermessen (nicht gezeigt). Die GREB1 und TFF1 Signale zeigen wiederum keinen signifikanten Unterschied bezüglich ihrer Lokalisation in östrogeninduzierten und unstimulierten Zellen, ebenso ihre jeweiligen Pools. Auch die Lage der CTs im Kern ändert sich nicht nach Östrogenzugabe, es gibt aber einen signifikanten Unterschied in der radialen Verteilung zwischen HSA2 und HSA21q. Entsprechend ihrer Größe befinden sich die HSA2

Signale signifikant stärker peripher als die eher zentral und am Nukleolus gelegenen HSA21q Territorien in den überwiegend flachen MCF7 Zellkernen.

Zusammenfassung:

Die Experimente zeigen keinerlei Hinweis auf irgendwelche räumlichen Interaktionen spezifischer Loci nach Östrogeninduktion in MCF 7 Zellen. Weder Lebendzelleexperimente noch 3D- FISH Analysen zeigen Wanderbewegungen der Genloci oder Kolokalisationen. Transkriptionsanalysen zeugen jedoch von einem moderaten Expressionsanstieg nach Stimulation. Dies spricht dafür, dass Kolokalisation oder Koregulation keine Voraussetzung für eine Änderung der transkriptionellen Aktivität ist.

5. Diskussion

Eine fundamentale Frage in der Erforschung der Zellkernarchitektur ist, welche Parameter die Positionen von Chromosomen im Kern bestimmen. Ein Parameter, der für die Anordnung der CTs wesentlich ist, könnte in einer geometrischen Beschränkung liegen, die aus der Gestalt von Zellkernen resultiert. Hier hat sich nämlich gezeigt, dass die radiale Anordnung des Chromatins in kugeligen und flachen Zellkernen unterschiedlich ist. Daraus ergibt sich die Frage, ob zelltypspezifische Anordnungen nach jeder Mitose neu gebildet werden müssen oder ob sie wenigstens zu einem gewissen Teil durch die Mitose hindurch erhalten werden. Als Modellsituation in dieser Frage wurden die radialen Verteilungen von Chromosomenterritorien unterschiedlicher Größe in Zellen mit einem flachen Kern mit der Verteilung in dreidimensionalen Metaphasenplatten verglichen. Dabei wurde eine starke Korrelation in der Positionierung der Chromosomen in beiden Stadien gefunden als Folge der Anordnung durch die Mikrotubuli in der Metaphase und der symmetrischen Weitergabe der Anordnung in die nächste Generation (Diskussion dazu siehe 5.1 und 5.2). Diese Untersuchungen wurden auf kleine SACs, HCVs und eine amplifizierte HSR- Region auf Chromosom 17 ausgeweitet (5.3 und 5.4). Nach dem Befund einer größenbasierten radialen Anordnung im Kern sowohl in der Interphase als auch in der Metaphase wurden daraufhin die Zentromere verschiedener Chromosomen hinsichtlich einer radialen Verteilung (5.5) und einer daraus resultierenden möglichen bevorzugten Assoziation mit dem Nukleolus oder mit der Lamina untersucht (5.6). In den Monitoring- Experimenten wurden die Ähnlichkeiten zwischen Tochterkernen nach der Mitose ermittelt und ob diese Ähnlichkeit abhängig ist vom Winkel, den die beiden Kerne zueinander bilden (5.7). Auch mittels Lebendzelleexperimenten wurden Ähnlichkeiten zwischen den Tochterkernen bestätigt und untersucht, in welchem Grad die Chromatinanordnung von der Interphase über die Mitose auf die Tochterkerne übertragen wird (5.8).

Ein von zahlreichen Arbeitsgruppen untersuchtes Problem betrifft die Transkription von Genen und mögliche räumliche Interaktionen von Genen untereinander bzw. mit regulatorischen Sequenzen. Solche Interaktionen können in *cis* (Abschnitte innerhalb eines CTs) oder in *trans* (Abschnitte auf verschiedenen CTs) erfolgen. Vor allem Interaktionen in *trans* erfordern möglicherweise weiträumige Umlagerungen von CTs und daraus resultierend Chromatinbewegungen im Zellkern. Deswegen wurden anhand von zwei Beispielen die kurz- und langfristigen Auswirkungen der Hochregulation von Genen auf die Chromatinanordnung im Kern untersucht (5.9).

5.1. Methodische Aspekte von FISH- Experimenten auf dreidimensionalen Metaphasen

Im Gegensatz zu 3D- FISH- Untersuchungen an Interphasekernen (Cremer et al., 2008) fehlen etablierte Protokolle für die dreidimensionalen Untersuchungen in der Metaphase. So musste das standardisierte 3D- FISH Protokoll für die verschiedenen Zelltypen und Stadien angepasst werden.

Wenn Zellen in die Mitose gehen, runden sie sich ab und verlieren Kontakt zum Substrat. Die für eine effiziente Hybridisierung nötige HCl Behandlungen und vor allem die für manche Zelltypen nötige Pepsinierung (für DLD1 und HeLa) führen jedoch zu häufigem Ablösen der mitotischen Zellen. So musste möglichst schonend pepsiniert werden, um zwar den Sondenzugang zu kompakten Mitosechromosomen zu ermöglichen, ohne jedoch alle mitotischen Zellen zu verlieren. Die Entwicklung eines einheitlichen Standardprotokolls für eine erfolgreiche Pepsinierung der Zellen war nicht möglich, da dies von vielen Parametern abhängt wie der Aussentemperatur, der Zelldichte und vor allem dem Zelltyp. In allen Versuchen mit den hier verwendeten fünf Zelltypen war die Anzahl der mitotischen Zellen gering, dementsprechend war die Anzahl der Zellen in der Metaphase noch niedriger. Der Zeitraum der Metaphase, in dem die Platte senkrecht zur Wachstumsebene steht, ist nämlich relativ kurz.

Da in den flachen Interphasekernen dieser Zelltypen alle CTs Kontakt mit der Kernoberfläche besitzen, wurde auf eine dreidimensionale Analyse verzichtet. Deswegen wurden nur mit Amira erstellte Projektionen der Kerne und CTs benutzt, um radiale Verteilungen zu untersuchen. Die Metaphasenplatten in x,z wurden mit Amira gedreht, bis sie die gleiche Orientierung haben wie die Interphasenkerne und erst dann Projektionen erstellt. Optimal für eine Auswertung mit 2D RRD sind runde Kerne, da dieses Programm von einem ermittelten Kernmittelpunkt aus konzentrische Kreise zieht, den Kern in Schalen gleichen Durchmessers einteilt und so eine radiale Verteilung der Signale ermittelt. Deswegen sind die Projektionen von Metaphasen durch ihre runde Form auch sehr gut geeignet für die Auswertung mit 2D RRD. Die Verwendung von Projektionen stark elliptischer Interphasenkerne führt aus demselben Grund jedoch zu leichten Unschärfen bei dieser Art der Auswertung. Die Verwendung solcher Kerne ließ sich aber nicht vermeiden, da fast alle Zellen mit einem flachen Kern eine leicht elliptische Form aufweisen.

Die FISH- Experimente wurden des Weiteren mit Interphasenzellen ohne Berücksichtigung der Zellzyklusphase durchgeführt. Viele diploide Zellen liegen bedingt durch die

Kulturbedingungen zudem in der G₀- Phase vor. Die Integration eines Zellzyklusmarkers wie z.B. Ki67 war auf Grund der Farbenlimitierung am Mikroskop jedoch nicht möglich. Man kann davon ausgehen, dass alle Phasen in den Experimenten vorhanden sind und die Resultate entsprechen daher einem Durchschnittswert über die Interphase. Es gibt jedoch einige Studien über die variable Anordnung der Chromosomen je nach Zellzyklusphase. Eine unterschiedliche Anordnung der Chromosomen 18 und 19 in quieszenten oder proliferierenden Fibroblasten mit einer großemäßig verteilten Anordnung in G₀ und einer gendichteabhängigen Anordnung wurde in proliferierenden Zellen beschrieben (Bridger et al., 2000). Wie in meinem Fall basieren die Ergebnisse der Studie auf zweidimensionalen Auswertungen, jedoch wurden deren Zellen hypoton behandelt und mit Methanol- Eisessig fixiert, wodurch die Zellkerne künstlich abgeflacht werden. Im Gegensatz hierzu handelt es sich in meinem Fall um zweidimensionale Projektionen von dreidimensional konservierten Kernen. Eine durchgeführte Studie an dreidimensionalen Kernen von Cremer et al. (2001) konnte die Ergebnisse von Bridger und Kollegen an quieszenten Zellen bestätigen. Mehta et al. (2010) fanden eine schnelle Umlagerung einiger Chromosomenterritorien innerhalb weniger Minuten nach der Überführung von Fibroblasten in serumfreies Medium. Es scheint also durchaus Unterschiede zu geben in der chromosomalen Anordnung zwischen ruhenden und proliferierenden Zellen. Um eine hohe Anzahl von proliferierenden Zellen zu erreichen, wurde bei der Aussaat von Zellen darauf geachtet, dass sie nicht zu dicht wachsen aber auch nicht zu stark vereinzelt sind.

Innerhalb der Zellzyklusphasen proliferierender Zellen scheinen die Schwankungen der Chromatinanordnung jedoch nicht sehr ausgeprägt zu sein. Zwar ändert sich beispielsweise die Anzahl der Kinetochorsignale, die in der Peripherie oder am Nukleolus lokalisiert sind im Laufe des Zellzyklus, was auch eine Umlagerung von Chromosomen zur Folge oder als Ursache haben könnte (Solovei et al., 2004b), viele Arbeiten zeigten jedoch in Lebendzellversuchen, dass es in der Interphase zu keinen großskaligen Veränderungen der Chromatinanordnung kommt. Dies zeigten Gerlich et al. (2003) an NRK- Zellen mittels Photobleaching genauso wie Walter et al. (2003) an HeLa Zellen. Dabei wurden Chromatinbereiche geblichen und über den Zellzyklus verfolgt, wobei während der Interphase keine Bewegungen des Chromatins sichtbar waren bis auf Diffusionsprozesse. Mit photokonvertierbaren Histon- Markern wurden ebenfalls keine großen Veränderungen der Chromatinanordnung in der Interphase von HEP-G2 Zellen festgestellt (Cvackova et al., 2009), ebenso bei Strickfaden et al. (2010) an RPE-1 Zellen mit photoaktivierbarem Chromatin. Dies spricht dafür, dass sich keine größeren Veränderung in der Positionierung

von CTs ergeben, bedingt durch die unterschiedlichen Stadien der Interphase, die in der hier durchgeführten Arbeit vermutlich bei der Aufnahme von Zellen erfasst wurden.

5.2. Korrelation einer größenbasierten Verteilung in Interphase und Metaphase

Die Auswertungen der Kerne nach den FISH- Experimenten mit 2D RRD offenbaren in allen fünf untersuchten Zelltypen (DLD1, AFC, HFB, HMEC und HeLa) mit flachen Zellkernen eine größenorientierte radiale Verteilung sowohl in der Interphase als auch in der Metaphase. Wie die Abb. 15- 19 zeigen, liegen dabei die CTs großer Chromosomen überwiegend am Kernrand der 2D- Projektion, mittelgroße Chromosomen nehmen eine mittlere Position ein, während kleine und NOR- tragende Chromosomen zentral angeordnet sind. Zwischen den relativen Positionen der CTs in Interphasekernen und der Metaphaseplatten herrscht eine große Korrelation (Diskussion siehe unten).

Dabei wurden nicht einzelne Chromosomen untersucht, sondern Pools von Chromosomen ähnlicher Größe. Diese Verteilung entspricht, zumindest was die Interphase betrifft, einigen früheren Publikationen, die ebenfalls eine größenabhängige radiale Anordnung in Zelltypen mit flachen Zellkernen fanden (Sun et al., 2000; Cremer and Cremer, 2001; Bolzer et al., 2005; Zeitz et al., 2009). Die Arbeiten von Bolzer und Kollegen wurde an Fibroblasten sowohl in G_0 als auch während der Interphase und an Prometaphasenrosetten durchgeführt. Ein Teil der Ergebnisse dieser Publikation lässt sich in folgender Abbildung zusammenfassen:

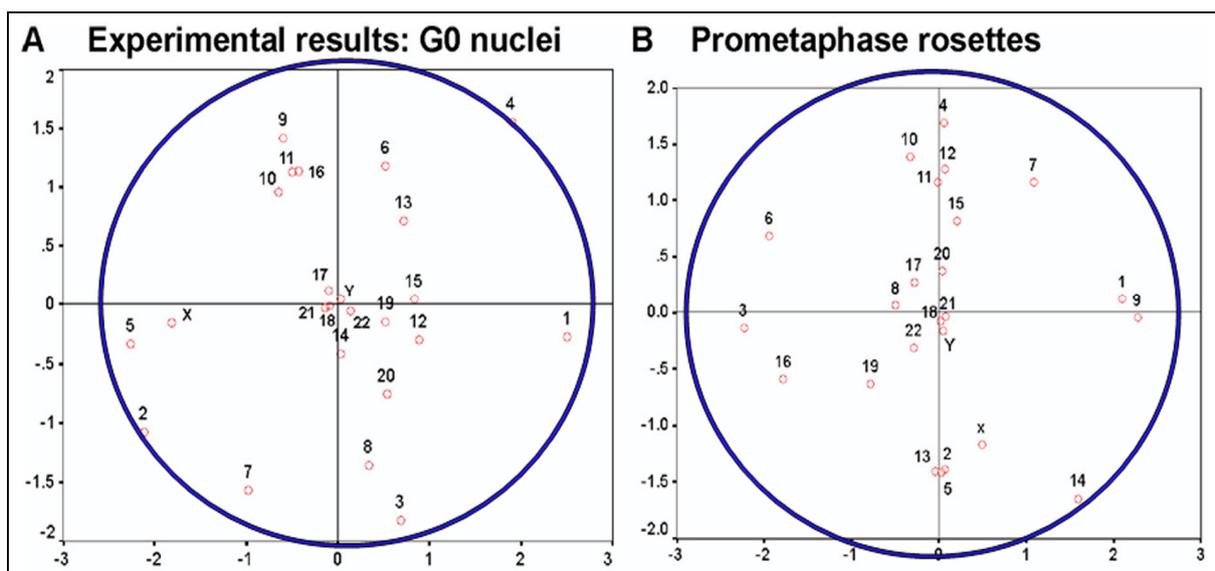


Abb. 65: Ergebnisplot Fibroblasten G_0 und Prometaphasenrosetten

Hier sind Teile der Abbildung 4 aus Bolzer et al. (2005) dargestellt und modifiziert. Es handelt sich um einen multidimensional skalierten Plot, der die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der CTs in Fibroblasten in G_0 (A) und Prometaphasenrosetten (B) wiedergibt. Die blauen Kreise sollen

schematisch den Kernrand der Interphasenkerne bzw. den Umriss von Prometaphasenrosetten darstellen.

Wie die Abbildung darstellt, zeigen die Kerne sowohl in G_0 als auch in den mitotischen Prometaphasenrosetten ebenfalls eine überwiegend größenmäßige Verteilung von CTs. Die Verteilung in den G_0 Kernen in (A) entspricht den Resultaten der vorliegenden Doktorarbeit: die großen Chromosomen liegen stark peripher, mittelgroße nehmen eine mittlere Position ein und kleine und NOR- tragende Chromosomen liegen zentral. Einzelne Chromosomen, wie z.B. HSA13 und 14 in den Prometaphasenrosetten in (B) liegen allerdings relativ weit außen für eine rein größenmäßige Verteilung und weichen daher von den hier präsentierten Ergebnissen ab. Im Gegensatz zur stabilen Anordnung von Chromosomen in Metaphasenplatten finden während der Prometaphase erhebliche Veränderungen der Nachbarschaftsanordnungen statt (Strickfaden 2010). Erst in der späten Prometaphase, wenn das für Rosetten typische „Loch“ in der Chromatinstruktur geschlossen ist und sich die flache Struktur in x,y zu einer flachen Struktur in x, z aufstellt, sind die Positionen des Chromatins relativ stabil -auch über Stunden- wie Lebendzellaufnahmen mit photoaktiviertem Chromatin zeigen konnten (Strickfaden et al., 2010). Deswegen sind Metaphasenplatten, wie sie in der vorliegenden Arbeit ausgewertet wurden, besser geeignet als Prometaphasenrosetten, um Aussagen über radiale Verteilungen treffen zu können.

Einige Arbeiten zeigen ein Zusammenspiel von Gendichte und Größe als Kriterien für radiales Arrangement. So zeigte Bolzer et al. (2005), dass trotz größenmäßiger Verteilung in Zellen mit flachen Kernen einzelne Chromosomen auch eine gendichteabhängige Komponente zeigen. So lagen die Territorien der Chromosomen 18 und 19 zwar beide relativ zentral, eine Untersuchung der gendichten Alu-Regionen zeigt aber eine intrachromosomale Polarität mit den Alu- Bereichen in Richtung Zentrum und den Alu- armen Regionen in Richtung Peripherie. Dementsprechend haben die gen- und Alu- reichen Chromosom 19 Territorien wenig Kontakt zur Kernhülle, während genarme HSA 18 Territorien stärker mit der oberen oder unteren Kernhülle assoziiert sind (unveröffentlichte Beobachtungen). Diese intrachromosomale Polarität von Chromosomen wurde von Kupper et al. (2007) für humane Lymphozyten und Fibroblasten bestätigt. Die regionale Gendichte erwies sich in dieser Untersuchung als ausschlaggebendes Kriterium für die Positionierung von Chromatindomänen.

Im Widerspruch stehen die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit jedoch zu Studien, die sowohl in Zellen mit kugeligen als auch flachen Kernen eine gendichteabhängige Verteilung finden. Croft et al. (1999) haben die Positionen der Chromosomen 18 und 19 in

unterschiedlichen Zelltypen mit kugeligen und flachen Kernen untersucht und das genarme HSA 18 immer peripherer gefunden als das genreiche HSA 19. Die Schlussfolgerung dieser Arbeit mit einer generell gendichte-basierten Verteilung beruht allerdings nur auf den Daten von zwei untersuchten Chromosomen. Auch Boyle et al. (2001) fanden eine gendichte-abhängige Verteilung mehrerer Chromosomen in Fibroblasten. Dies konnte jedoch von Cremer et al. (2001) in dreidimensionalen Analysen widerlegt werden, die in Zellen mit flachen Kernen eine größenbasierte Anordnung fanden. Jedoch konnte die unterschiedliche Position der beiden Chromosomen 18 und 19 bestätigt werden, was ähnlich wie bei Bolzer et al. (2005) ebenfalls eine gendichte-abhängige Komponente für radiale Positionierung impliziert (Cremer et al., 2003). Einen Einfluss beider Prinzipien bestätigen Mora et al. (2006) in einem Vergleich von menschlichen mit Primatenfibroblasten, die für mehrere homologe Chromosomen ähnliche Positionen in den verschiedenen Spezies fanden. Dabei war der Einfluss der Chromosomengröße auf die radiale Positionierung zwar größer, aber auch die Gendichte beeinflusst die Verteilung im Kern. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Heride et al. (2010) an epithelialen Tumorzellen wurde Ähnliches gefunden: Der Einfluss der Größe ist gravierender als der der Gendichte, aber am besten beschreibt die radiale Positionierung von Chromosomen ein Quotient aus Gendichte und Chromosomengröße. Die momentane Lehrmeinung ist also, dass für Zelltypen mit flachen Kernen eine überwiegend größenbasierte Verteilung gilt, aber auch die Gendichte einen Einfluss auf die radiale Positionierung hat und vor allem auf subchromosomaler Ebene wirkt.

Eine Sonderstellung nehmen die NOR-tragenden Chromosomen ein. Kalmarova et al. (2007) beispielsweise konnten zeigen, dass die Chromosomen 14 und 15 in Tochterzellen eine teilweise über die Mitose konservierte Position einnehmen in Bezug auf die Nukleoli, auch bei einer unterschiedlichen Anzahl von Nukleoli in den Zellen. Und Nukleoli liegen meist zentral. Aber auch die bevorzugte Assoziation bestimmter Sequenzen, beispielsweise der von 5S rDNA auf HSA 1q, mit dem Nukleolus (Comings, 1980) könnte die Lage der Chromosomen insgesamt beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nur die Größe von Chromosomen als entscheidender Parameter gefunden. Möglicherweise ist die Bildung von Pools von Chromosomen ähnlicher Größe ein Grund dafür und kleine unterschiedliche Verteilungen, die auf einen Einfluss der Gendichte oder anderer Parameter hinweisen, werden rausgemittelt. Allerdings ist das Ergebnis in allen fünf Zelltypen sehr ähnlich, was die gebildeten Mediane in Abb. 20 und Abb. 21 zeigen: Mit abnehmender Größe der Chromosomen nimmt die Zentralität der Lage zu. Außerdem gibt es in allen untersuchten Zelltypen einen signifikanten Unterschied in der

Position von großen zu kleinen und NOR- tragenden Chromosomen sowohl in der Interphase als auch Metaphase.

Das eigentliche Ergebnis dieser Untersuchungen ist die übereinstimmende radiale Positionierung von Chromosomen in Interphasekernen und Metaphaseplatten. Wie die gegeneinander aufgetragenen Mediane in Abb. 22 zeigen, sind die Gruppen von Chromosomen in beiden Stadien relativ gleich positioniert und liegen um die Winkelhalbierende verteilt. Die Tatsache, dass aber die Pools verschiedener Größen aller Linien gruppiert liegen, spricht für eine nichtzufällige radiale Verteilung. Auch die hohen Bestimmtheitswerte der Korrelationsanalyse für jede Zelllinie und gemittelt über alle Linien sprechen für eine größenmäßige und zelltypunabhängige Verteilung (siehe Abb. 23).

Eine solche Verteilung in dreidimensionalen Metaphasen wurde zuerst von Mosgoller et al. (1991) und dann von Leitch et al. (1994) gezeigt, die serielle Schnitte elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Fibroblasten untersuchten. Dass die radiale Anordnung in der Mitose und der Interphase übereinstimmen, lässt sich durch die sogenannte *fallen rosettes*-Hypothese erklären (Habermann et al., 2001; Solovei et al., 2004b). Diese besagt, dass die Interphase die Anordnung der Mitose widerspiegelt, weil die beiden Anaphasenrosetten umfallen, ohne dass große Änderungen der Chromatinanordnung auftreten. Manders et al. (2003) konnten im Jahr davor ebenfalls zeigen, dass sich die Chromatinanordnung von der späten Anaphase bis zur G₁ nur wenig verändert, lediglich dekondensiert das Chromatin zu Beginn der Interphase in einer radialen Art und Weise. Aber auch frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass sich die zentrale Lage von NOR- tragenden Chromosomen über den ganzen Zellzyklus und insbesondere in der Mitose nicht verändert (Klein et al., 1998). In Lebendzellstudien fanden jedoch Gerlich et al. (2003), dass nach Bleich- Experimenten einer Hälfte von Interphasekernen mit fluoreszent markierten Histonen in der darauffolgenden Metaphasenplatte zwei verschiedene Typen auftreten. Ein Teil der Zellen zeigt ein zusammenhängend- fluoreszierendes Chromatinmuster, der andere Teil ein verstreut fluoreszierendes, je nach Lage der Spindelachse zur gebleichten Fläche. In beiden Fällen war jedoch in der folgenden Interphase bei den Tochterkernen das Muster des vorhergehenden Mutterkerns weitgehend wiederhergestellt. Daraus folgern die Autoren, dass während der Ana- und Telophase die verstreut fluoreszierenden Chromatincluster durch einen Anaphasemechanismus wieder in einem zusammenhängenden Cluster vereinigt werden. Diese Restaurierung des ursprünglichen Anordnungsmusters der Mutterkerne soll durch unterschiedlich schnell segregierende Chromosomen erreicht werden. Walter et al. (2003) konnten diese Hypothese jedoch nicht bestätigen. Sie fanden neben den verstreuten Mustern

in der Metaphase auch in vielen Tochterkernen verstreute Muster, d.h. die während der Prometaphase veränderten Muster des Mutterkerns wurden in der Anaphase nicht wiederhergestellt. Die Anordnung in der Metaphase wird jedoch weitgehend in die folgende Interphase übertragen. Zu Beginn der G₁ kann es aber noch zu kleinen Änderungen der Anordnung kommen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Thomson et al. (2004). Auch diese Autoren fanden Ähnlichkeiten von der Position eines fluoreszierenden Locus in der Metaphasenplatte und seiner Position in den Tochterkernen. Ebenso beobachteten sie eine erhöhte Mobilität des Chromatins in der frühen G₁. Thomson et al. interpretieren diese erhöhte Mobilität als de novo Wiederherstellung der radialen Ordnung, die während der Mitose verloren gegangen ist. Die Widersprüche endgültig auflösen konnten Strickfaden et al. (2010), die nach Bleichen in Interphasekernen und nachfolgender Mitose abhängig von der Lage der Spindel zusammenhängende oder verstreute Chromatinmuster in den Tochterkernen fanden, wobei sich aber unabhängig von der Lage der Spindel immer die Nachbarschaften ändern. Ab der Metaphase ändert sich jedoch die Anordnung nicht mehr sehr stark und wird weitgehend unverändert auf die Tochterzellen übertragen. Ausserdem bestätigt es die 100 Jahre alte Theorie von Boveri, dass die Anordnungen und Nachbarschaften, die in der Metaphasenplatte bestehen, über die Anaphase und Telophase erhalten bleiben und auf die Tochterzellen übertragen werden. Wie die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Lebendzelleexperimente in Kapitel 4.6 zeigen, ändern sich zwar die Nachbarschaften über die Mitose, die relative radiale Anordnung bleibt jedoch durch den ganzen Zellzyklus erhalten. Bereits ab der späten Prometaphase sind die Positionen des Chromatins festgelegt und ändern sich nur geringfügig bis zur nächsten G₁. Dies alles erklärt, wieso die Anordnung der CTs verschiedener Größen in den FISH- Experimenten in Interphasekernen und Metaphaseplatten sehr ähnlich ist.

5.3. Auch Minichromosomen und eine HSR zeigen eine größenabhängige Verteilung

5.3.1. Die Lage von Minichromosomen aus zweidimensionaler Sicht

In weiteren Versuchen wurden nun kleine, natürlich vorkommende Minichromosomen, daraus generierte HCVs und eine amplifizierte HSR Region auf Chromosom 17 auf ihre radialen Positionierungen untersucht.

Ziel der Untersuchungen war, herauszufinden, ob sich die kleinen Minichromosomen entsprechend ihrer Größe zentral anordnen. Wie die Ergebnisse in Kapitel 4.2 über die radiale Positionierung von SACs und HCVs zeigen, nehmen die kleinen DNA-Elemente entsprechend ihrer Größe eine weitgehend zentrale Position ein sowohl in Interphase als auch Metaphase (siehe Abb. 24 bis Abb. 27). Besonders ausgeprägt ist dies bei den SACs in menschlichen Fibroblasten. Die aus den SACs entwickelten HCVs in zirkulärer und linearer Form (Voet et al., 2003; Voet et al., 2001) in Hamsterfibroblasten und Mauslinien zeigen die gleiche Tendenz. Lediglich in den Maus A9-Zellen, einer rearrangierten Fibroblastenlinie, zeigen die Vektoren zumindest in Interphasen keine Präferenz fürs Zentrum, sondern eine eher mittlere Position. Bei genauerer Analyse wurde festgestellt, dass die Kerne dieser Linie halbsphärisch sind, weshalb hier eine vorwiegend gendichteabhängige Verteilung greifen könnte, wie es für sphärische Kerne als Ordnungsprinzip anerkannt wird (Cremer et al., 2003; Weierich et al., 2003). Die Vektoren enthalten neben dem Zentromer 20 eine etwa 4Mb umspannende Region von HSA 1p (1p21.3- 1p22.1), die in diesem Bereich eine mittlere Gendichte aufweist (etwa 8-10 Gene/Mb). Die Position des Vektors in der Interphase dieser Zelllinie passt insgesamt weder zu einer größenabhängigen noch zu einer gendichteabhängigen Verteilung. Auch die Daten anderer Gruppen zeigen ein widersprüchliches Bild. Sengupta et al. (2008), die diese Mauszelllinie ebenfalls untersuchten, haben dabei die Positionen von eingeschleusten ganzen menschlichen Chromosomen vermessen und eine gendichteabhängige Verteilung gefunden. Meaburn et al. (2008) dagegen fanden in einer weiteren Studie, bei der menschliche Chromosomen in diese Linie integriert wurden, in einem 2D-FISH Ansatz weder größen- noch gendichteabhängige Verteilungen. Die Chromosomen nahmen Positionen ein, die der Lage der syntenen Mausechromosomen entsprachen. Was also für diese Zelllinie als Ordnungsprinzip im Kern gilt, bleibt auch durch die Literatur ungeklärt.

In den Metaphasen der Maus A9 Zellen der vorliegenden Arbeit ist jedoch wieder eine ausgeprägtere Zentralität der Vektoren gegeben. Dieses Phänomen lässt sich jedoch auch in allen anderen Experimenten feststellen und die Position in den Metaphasen ist immer zentraler als in Interphasekernen. Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 66 alle Mediane der ermittelten Positionen in einer Zusammenfassung:

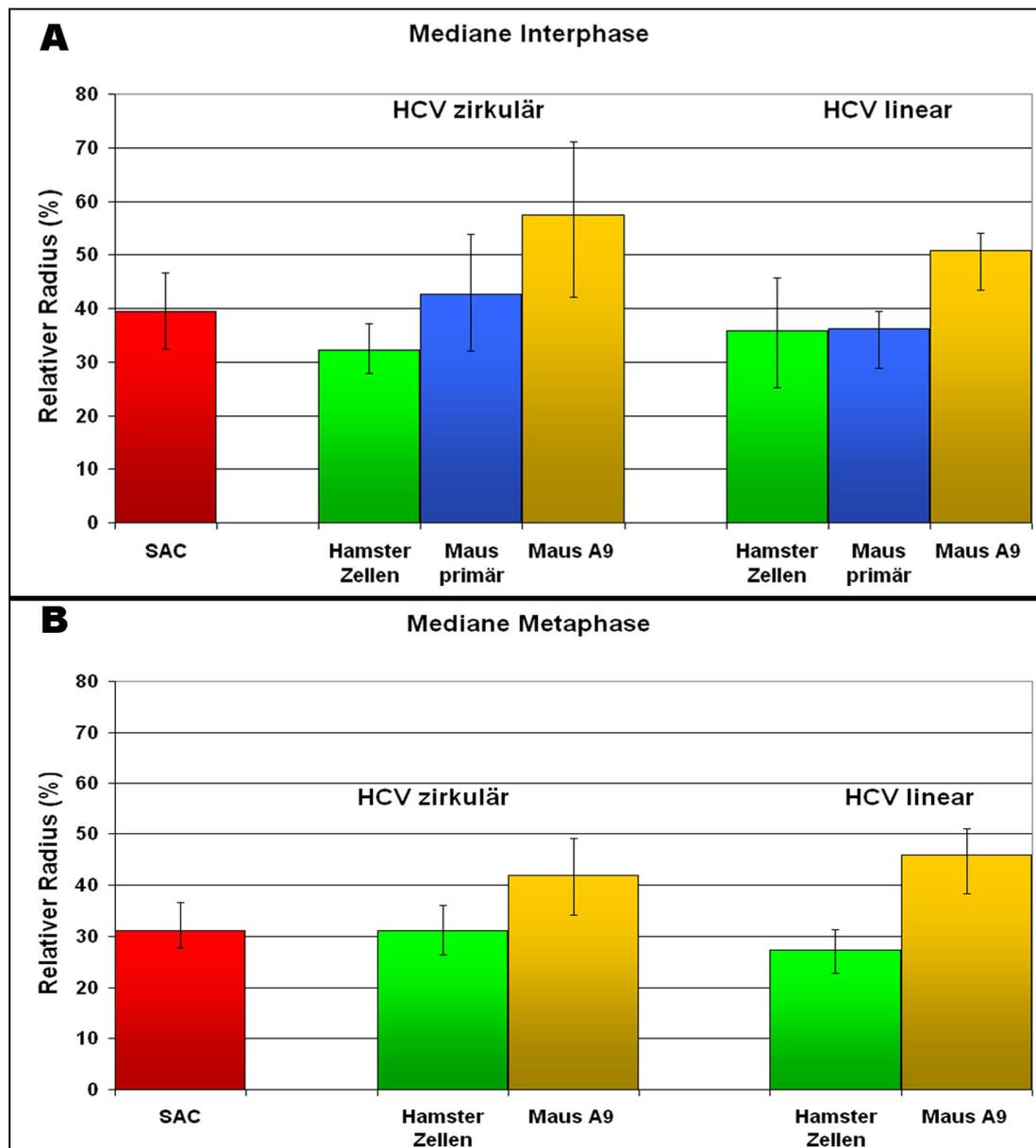


Abb. 66: Ermittelte Mediane von SACs und HCVs in Interphase und Metaphase

Die Abbildung zeigt eine Zusammenfassung aller ermittelten Mediane über der Lage von SACs und HCVs in der Interphase (A) und Metaphase (B) verschiedener Zelltypen. Dabei entspricht die y-Achse gleichzeitig dem relativen Radius, wobei 0 eine zentrale und 100 eine Lage am Kernrand beschreibt. Die Werte sprechen für eine stets zentralere Lage in der Metaphase. Ebenso zeigen sich zelltypspezifische Unterschiede in der Positionierung. Der Unterschied zwischen den Werten von zirkulären und linearen HCVs in den jeweiligen Zelltypen ist nicht stark ausgeprägt und auch nicht signifikant.

Die ausgeprägte Zentralität in Metaphasen hängt vermutlich mit dem Besitz eines Zentromers zusammen. Alle untersuchten chromosomalen Elemente besitzen ein aktives Zentromer (menschliches Zentromer 12 beim SAC; menschliches Zentromer 20 in den zirkulären und linearen Vektoren) und werden durch die Kräfte der Mikrotubuli in der Metaphase in einer Art „Rabl- Orientierung“ mit den Zentromeren im Zentrum einer zweidimensionalen Projektion angeordnet (Fletcher, 1994). Passend zu diesen Beobachtungen ist das Verhalten anderer kleiner DNA- Elemente. So zeigen azentrische *double minute-* (DM) Chromosomen

eine periphere Orientierung in Metaphasenplatten und G_1 (Levan and Levan, 1978; Itoh and Shimizu, 1998). Mikrochromosomen hingegen, die ein Zentromer enthielten, lagen in beiden Phasen zentral (Jakobsson et al., 1989). Die Lokalisation scheint sich also daraus zu ergeben, ob ein Element ein aktives Zentromer besitzt oder nicht. Dies bestätigten Tsuduki et al. (2006), die in Lebendzellversuchen ein *Human Artificial Chromosome* (HAC) mit einem GFP- LacO System markierten und so zeigen konnten, dass dieses HAC mit einem aktiven Zentromer in der Metaphasenplatte eine zentrale Position einnimmt, während der Anaphase und Telophase gleich schnell segregiert wie normale Chromosomen und sich auch ansonsten verhält wie ein normales Chromosom.

Sun et al. (2000), die als erste eine größenbasierte Verteilung von Chromosomen fanden, postulieren ein *mitotic preset* Model: Die Anordnung in der Mitose ist die Voraussetzung für die Anordnung in der Interphase und ergibt sich durch die zentrale Lage der Zentromere. Wie folgendes Bild zeigt, ist die größenabhängige Verteilung in Zellen mit flachen Kernen bereits in der Metaphase festgelegt:

Mitotic Preset Model



Abb. 67: Mitotic preset Model aus Sun et al (2000)

Die Graphik zeigt einige Chromosomen in der Metaphase mit einer Rabl- Polfeld- Konfiguration, bei der die Zentromere zentral liegen. Dadurch nehmen allein auf Grund der Größe kleinere Chromosomen einen zentralen Platz ein, größere Chromosomen liegen insgesamt peripherer. Diese Anordnung wird über die Anaphase und Telophase ohne größere Umstrukturierungen in die G_1 übertragen, was zu einer ebenfalls größenmäßigen Verteilung in der Interphase führt.

Durch Lebendzellbeobachtungen konnte gezeigt werden, dass sich, zumindest in Zellen mit relativ flachen Kernen, die Anordnung in der Metaphasenplatte bis zur Anordnung in den frühen G_1 Zellkernen nur wenig ändert (Strickfaden et al., 2010). Dies erklärt den Weiterbestand der deutlichen Zentralität der Vektoren und SACs in der Interphase. Durch den Dekondensationsprozess der Chromosomen und die Elongation der Kerne von rundlichen Anaphaserosetten zu ellipsoiden Interphasekernen zu Beginn der G_1 kann es aber noch zu geringen Positionsänderungen kommen (Walter et al., 2003; Thomson et al., 2004). Die ausgeprägte Zentralität kann daher etwas verloren gehen.

Zusammengenommen stimmen die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen gut mit einer größenbasierten Anordnung der Chromosomenterritorien in Zellen mit flachen Kernen überein. Sie bestätigen zudem das *mitotic preset* Modell (Sun et al., 2000) und die *falling rosettes* Hypothese (Solovei et al., 2004b). Dadurch kommt es zu einer starken Korrelation in den Positionen der untersuchten Objekte zwischen Interphase und Mitose (Abb.68):

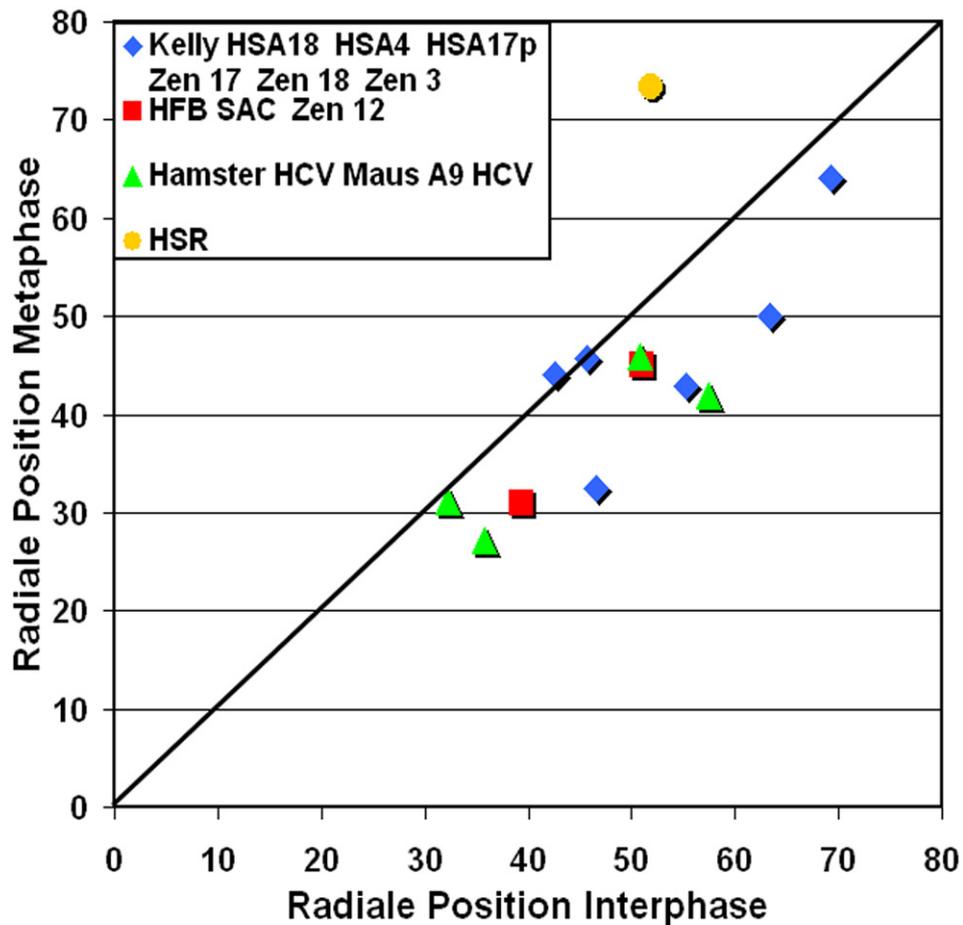


Abb. 68: Korrelation zwischen Interphase und Metaphase

Die Abbildung zeigt alle Medianwerte von SACs, HCVs, der HSR und den verwendeten Kontrollpoints und Zentromersonden. Die Lage der HSR und der Kontrollen wird weiter unten separat diskutiert. Als Vergleich zwischen den Werten in Interphase und Metaphase ist die Winkelhalbierende angegeben.

Abb.68 verdeutlicht erneut eine starke Korrelation der Lage von Chromosomenterritorien zwischen Interphasekernen und Metaphaseplatten. Die gegeneinander aufgetragenen Werte für die Vektoren und das SAC samt Zentromer 12 als Kontrolle liegen deutlich unterhalb der Winkelhalbierenden, was für eine ausgeprägtere Zentralität in der Metaphase spricht.

5.3.2. Minichromosomen sind in dreidimensionalen Kernen häufig mit der Lamina assoziiert

In einem weiteren Punkt wurde die Lage der Vektoren im dreidimensionalen Raum genauer untersucht. Bei Durchsicht der Serienschnitte von Zellkernen fiel auf, dass viele der SACs oder Vektoren eine zentrale Lage in zweidimensionalen Interphasekernen besitzen. Die dreidimensionale Analyse zeigte jedoch, dass die Strukturen häufig mit der oberen oder unteren Kernhülle assoziiert sind. Folgende Abbildung zeigt eine Zusammenfassung über die Lage der Vektoren im dreidimensionalen Raum:

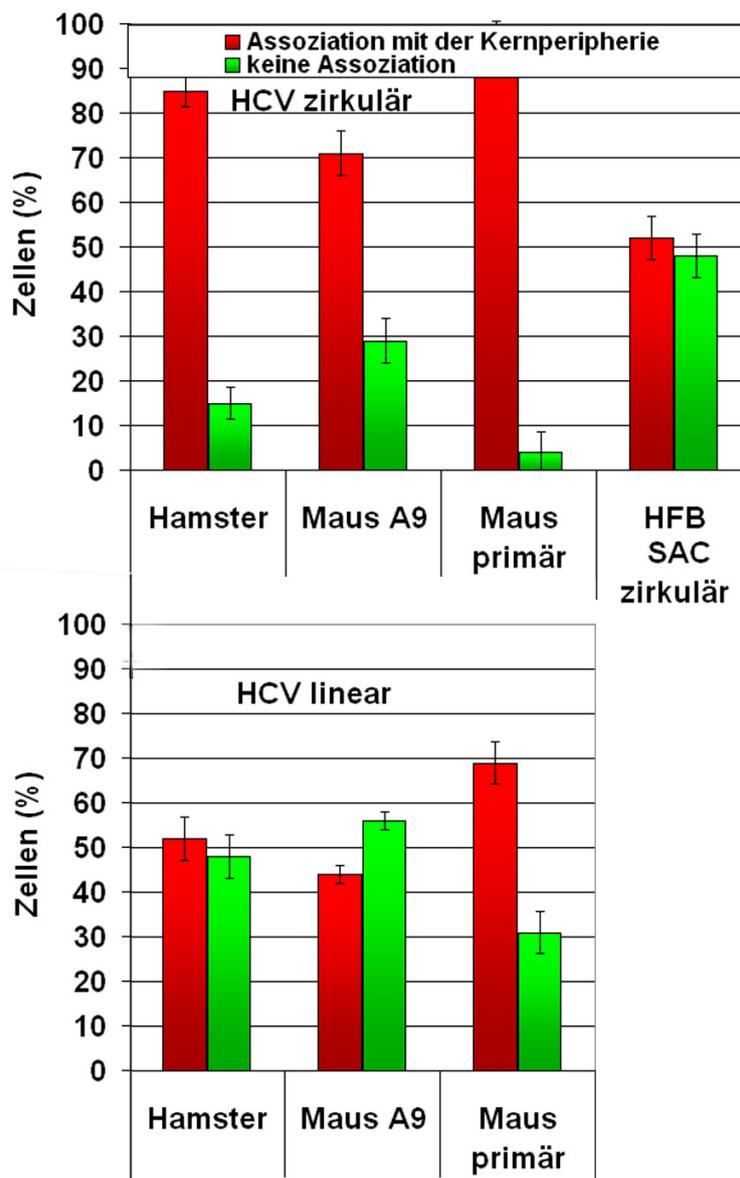


Abb. 69: Assoziation der Vektoren mit der Kernperipherie

Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile von Assoziationen mit der Kernperipherie in der Interphase dreidimensionaler Kerne. Dabei zeigen vor Allem die zirkulären HCVs eine starke Assoziation.

Wie die Abbildung 69 zeigt, liegen die zirkulären Vektoren in dreidimensionalen Kernen zu einem sehr hohen Anteil an der Kernperipherie (~70-95%). Da die Kernperipherie transkriptionell weitgehend inaktiv und mit geringer Gendichte assoziiert ist (Guelen et al., 2008), widerspricht dies einer gendichteabhängigen Verteilung der linearen und zirkulären Vektoren (mittlere Gendichte mit etwa 8-10 Gene/Mb). Trotz der vorwiegend laminassoziierten Lage vor Allem der zirkulären Vektoren, sind sie transkriptionell nämlich nicht inaktiv. Expressionsstudien eines vektoreigenen Gens in verschiedenen Geweben der Maus haben gezeigt, dass das Genprodukt direkt proportional zur Anzahl der Vektoren in diesen Zellen ist (Voet et al., 2003).

Die Unterschiede in der Assoziationshäufigkeit zwischen den beiden Vektorenarten sind nicht klar. Eventuell könnte der Besitz von Telomeren bei den linearen Vektoren ein Grund dafür sein. Eine Untersuchung von Weierich et al. (2003) über die Lage von Zentromeren und Telomeren in menschlichen und murinen Lymphozyten hat gezeigt, dass die Zentromere in Zellen beider Spezies vor allem in Clustern an der Kernperipherie lagen. Dies könnte eine Erklärung für die hohe Assoziationsrate der zirkulären Vektoren mit der Kernhülle sein, die nur ein Zentromer besitzen. Die Werte passen auch zu den Ergebnissen von Solovei et al. (2004b), die in Zellen mit flachen Kernen ebenfalls eine hohe Rate von Zentromersignalen in der Peripherie fanden (~70-95%). Telomere, die in menschlichen Zellen auch häufig im Zentrum beobachtet wurden, waren in murinen Zellen fast ausschließlich in der Peripherie lokalisiert (Weierich et al., 2003). Die vorliegenden Daten in Abb. 69 zeigen eine Mittelposition der menschlichen linearen Vektoren mit den Telomeren in den murinen und Hamsterzellen. Möglicherweise beeinflussen die Zentromere und Telomere hier die Position. Eine Studie von Chuang et al. (2004) an verschiedenen menschlichen und murinen Zelllinien mit sphärischen und flachen Kernen zeigte eine unterschiedliche Verteilung von Telomeren in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase. Dabei waren die Telomere immer über den ganzen Kern gleichmäßig verteilt. Auch diese Beobachtung passt gut zu den hier deutlich niedrigeren beobachteten Assoziationswerten mit der Kernperipherie bei linearen Vektoren.

Im Gegensatz zu den linearen Vektoren ist das zirkuläre SAC jedoch ebenfalls nur zur Hälfte mit der Lamina assoziiert. Die Gendichte und genaue Zusammensetzung des SACs ist nicht bekannt, es besteht aber hauptsächlich aus alphoiden und anderen Satelliten (Vermeesch et al., 1999) und ist deswegen vermutlich sehr genarm. Bei einer rein gendichteabhängigen Verteilung hätte man erwartet, dass der Prozentsatz an assoziierten Signalen mit der Kernhülle wesentlich höher ist. Da eine hohe Sequenzähnlichkeit in den zentromerischen und perizentromerischen Bereichen besteht, ist es möglich, dass es sich ähnlich positioniert wie

das endogene Zentromer 12, das für diese Arbeit in einem anderen Zusammenhang untersucht wurde (siehe 4.4). Dabei war der Anteil von peripherieassoziierten Zentromeren bei ~51% und von nukleolusassoziierten Zentromeren oder intern liegenden bei insgesamt ~49% (siehe Tabelle 5). Dies stimmt sehr gut mit den oben ermittelten Werten überein.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Position der SACs und Vektoren aus zweidimensionaler Sicht einer größenabhängigen Verteilung entspricht, bedingt durch die zentrale Lage der Zentromere in der Metaphase. Im dreidimensionalen Kontext kann eventuell die unterschiedliche Konformation der Vektoren und das Vorhandensein oder Fehlen von Telomeren eine Positionierung im Kerninneren oder an der Lamina beeinflussen.

5.4. Die radiale Lage der HSR in der Interphase wird von transkriptioneller Aktivität bestimmt

In einem weiteren Versuch wurde die radiale Lage einer HSR (*Homogeneously Staining Region*) untersucht. Durch die Translokation des MYCN Gens auf Chromosom 17 und einer massiven Amplifikation (~100-120x) ist Chromosom 17 in der Neuroblastomlinie Kelly auf eine Größe von etwa Chromosom 1 angewachsen, abgeschätzt an 2D Metaphasenchromosomen (Solovei et al., 2000). Dabei besitzen die Amplikons eine Größe bis zu 800kb.

Da normale HSA17 Territorien aufgrund der relativ geringen Größe dieses Chromosoms und einer größenbasierten Verteilung in Zellen mit flachen Kernen normalerweise eine eher zentrale Position einnehmen, wurde nun untersucht, ob sich an der Verteilung des aberranten Territoriums mit der HSR etwas ändert. Tatsächlich nimmt die HSR Region auf Chromosom 17 in der Interphase eine mittlere Position und in Metaphasen eine sehr periphere Position ein (siehe Abb. 28). Dies entspricht einer größenabhängigen Position zumindest in der Metaphase, wie es für Zellen mit flachen Kernen proklamiert wird (Bolzer et al., 2005) und auch in den oben beschriebenen Experimenten gefunden wurde. Passend dazu nehmen die verwendeten Kontrollen wie das große HSA 4 ebenfalls eine periphere Position ein bzw. das kleine HSA 18 und der kurze Arm von HSA 17 (17p) entsprechend ihrer Größe eine zentrale Position. In der Interphase hingegen ist die Position der HSR schwierig zu beurteilen. Wie bereits erwähnt, ist die HSR in den meisten Fällen über einen großen Teil des Kernvolumens verteilt und bildet dabei z.T. auch dünne Chromatinfasern und kleine Chromatindomänen aus. Derartige Signale können bei der für die Evaluation nötigen Segmentierung teilweise verloren gehen. Die diffusen Signale liefern zwar einen Median für die HSR im mittleren Bereich, eine

seriöse Beurteilung über die Lage im Kern ist so jedoch nicht möglich. Die geringe Gendichte im Bereich des MYCN- Gens von etwa 3 Genen/Mb lässt auch keinen Rückschluss auf eine gendichteabhängige Verteilung zu. Die Position der HSR in der Interphase könnte von der transkriptionellen Aktivität des MYCN- Gens abhängig sein. So sind die meisten Amplikons hochaktiv und Expressionsanalysen haben gezeigt, dass der Grad an Überexpression von MYCN bei Kellyzellen in etwa der Menge an Amplikons entspricht (Schwab et al., 1984). Stock et al. (2008) konnten zeigen, dass in Neuroblastomzellen nicht nur MYCN überexprimiert wird, sondern auch Gene, die in der Region um den MYCN Locus auf Chromosom 2p24 liegen. Dies widerspricht der Vorstellung von Kupper et al. (2007), die die lokale Gendichte als den entscheidenden Faktor für Positionierung fanden und nicht Replikationszeitpunkt oder die Transkriptionsrate.

Die Lage der Kontrollen in der Interphase ist ebenfalls nicht einfach zu beurteilen, da dieser Zelltyp massive chromosomale Rearrangements aufweist (Solovei et al., 2000). So gibt es beispielsweise nur eine komplette Kopie von HSA 18 und 1- 2 kleine Translokationen auf anderen Chromosomen, selbiges gilt für HSA 4 (Liebhart, 2009). 17p liegt im Vergleich zur Position in der Metaphase unverändert relativ zentral, ebenso HSA 4 peripher. HSA 18 liegt jedoch in der Interphase deutlich peripherer als in der Metaphase, was eine Abhängigkeit von der Gendichte bedeuten könnte, wie es für das genarme HSA 18 schon oft gezeigt wurde (Croft et al., 1999; Boyle et al., 2001; Cremer et al., 2001). Dies würde für ein Zusammenspiel von Gendichte und Chromosomengröße als Parameter für radiale Anordnung in den Kellyzellen sprechen, wie es auch für andere Zelltypen schon gezeigt wurde (Bolzer et al., 2005; Kupper et al., 2007; Heride et al., 2010). Dazu passt, dass etwa ein Viertel der Kelly- Zellen halbsphärische Kerne besitzt, was zu Mischformen der CT- Anordnungen in Abhängigkeit von Gendichte oder Chromosomengröße führen könnte. Eine vergleichende Untersuchung von flachen und runden Kernen wurde jedoch nicht durchgeführt. Weitere Diskussionspunkte dazu finden sich in Liebhart (2009).

5.5. Die zweidimensionale Position von Zentromeren entspricht der größenabhängigen Position ihrer Chromosomen

Neben der Lage von ganzen Chromosomen und kleinen oder amplifizierten DNA- Elementen wurde auch die zweidimensionale Lage von Zentromeren in Projektionen von Inter- und Metaphasen humaner Fibroblasten untersucht (siehe 4.3). Ähnlich wie bei den ganzen Chromosomen wurden Pools von Zentromeren gebildet, deren Chromosomen in etwa die

gleiche Größe haben bzw. funktionell gleich sind (NOR- tragende). Da alpheoide Satelliten von der Sequenz her sehr ähnlich sind, konnten aufgrund der limitierten Sondenspezifität beispielsweise von den Zentromeren kleiner Chromosomen nur HSA 18 untersucht werden. Andere, testweise eingesetzte Sonden, zeigten Kreuzreaktionen. Wie die mittels 2D RRD durchgeführte Auswertung der radialen Lage von Zentromere zeigt (siehe Abb. 29), nehmen auch hier die Zentromere überwiegend eine Lage ein, die der größenbasierten Verteilung ihrer Chromosomen entspricht. Bestätigt wird dies durch die Mediane (Abb. 31). Außerdem gibt es einen klaren linearen Zusammenhang zwischen den Positionen der Zentromere in Interphase und Metaphase ($R^2=0,9569$) und damit auch der Größe und Position. Eine Korrelation zwischen der Größe von Chromosomen und ihrer radialen Anordnung in Metaphaseplatten von Fibroblasten wurde auch schon von Mosgoller et al. (1991) und Leitch et al. (1994) anhand von Rekonstruktionen elektronenmikroskopischer Bilder gefunden. Ähnliche Resultate liefert die hier durchgeführte Analyse der Positionen von drei Zentromeren in Kelly- Zellen (Abb. 32). In beiden Untersuchungen waren die Positionen der Zentromere in der Metaphase sehr zentral, eine Folge der Anordnung durch die Mikrotubuli (Fletcher, 1994; Solovei et al., 2004b). Der Befund, dass die in flachen Zellkernen zu beobachtende radiale Anordnung nach Größe der Chromosomen auch in Metaphasenplatten erhalten ist, spricht dafür, dass das durch die Lage der Spindeln verursachte „Loch“ in einigen Prometaphasenrosetten (siehe Bolzer et al. 2005) im späteren Verlauf mit Chromosomen kleiner und akrozentrischer Chromosomen aufgefüllt wird. Dieses Loch ist jedoch nicht leer, sondern mit Mikrotubulibündeln gefüllt. Möglicherweise passen nur die kleineren Chromosomen dazwischen und die größeren Chromosomen ordnen sich außen herum an zur fertigen Metaphasenplatte.

Wie auch für ganze Chromosomen und vom *mitotic preset*- Modell vorausgesagt (Sun et al., 2000), wird diese Anordnung in die Interphase weitergegeben (*fallen rosettes*: Habermann et al. 2001 und Solovei et al. 2004b). Ähnlich wie bei den ganzen Chromosomen ist die Lage in der Interphase von Zentromeren großer Chromosomen meist deutlich peripherer bzw. von Zentromeren kleiner und akrozentrischer Chromosomen weniger zentral als in der Metaphase. Dies könnte teilweise eine Folge der Elongationsprozesse von runden Anaphasenrosetten zu elliptischen Interphasekernen sein. Daneben könnte die erhöhte Mobilität des Chromatins in der frühen G₁-Phase eine Rolle für die definitive Anordnung der Chromosomen im Interphasekern spielen (Walter et al., 2003). Auch die Ausbildung der Nukleoli nach der Mitose und die damit einhergehende Verdrängung des Chromatins aus dem zentralen Bereich des Zellkerns könnten dazu beitragen, die Positionen von Zentromeren zu beeinflussen.

5.6. Die dreidimensionale Lage von Zentromeren lässt sich nicht von der Größe der Chromosomen ableiten

Neben der radialen zweidimensionalen Lage von Zentromeren wurde auch ein Aspekt ihrer Lage im dreidimensionalen Raum erfasst. Dazu wurden verschiedene Zentromere auf eine Assoziation mit dem Nukleolus oder der Peripherie untersucht oder auf eine unassoziierte Lage im Nukleoplasma. Nukleolus und Peripherie bzw. Lamina gelten nämlich als bevorzugte Aufenthaltsorte von Zentromeren (Carvalho et al., 2001; Weierich et al., 2003; Solovei et al., 2004b). Als Nukleolusmarker wurde B23 oder Nukleophosmin verwendet. Die Lage in der Kernperipherie wurde durch die segmentierte DAPI-Färbung ermittelt, da aufgrund der Farbenlimitierung am konfokalen Laser Scanning Mikroskop kein Laminmarker verwendet werden konnte. Insgesamt wurde die Lage von 13 Zentromeren, zwei zentromernahen BACs und zwei perizentromerischen, heterochromatischen Blocks in humanen Fibroblastenkernen der mittleren bis späten S-Phase getestet. Damit sollte eine Theorie überprüft werden, wonach die Zentromere kleiner und NOR-tragender Chromosomen durch ihre zentrale Lage bevorzugt mit dem Nukleolus assoziiert sind bzw. die der größeren, peripher gelegenen Chromosomen bevorzugt mit der Lamina. Die Ergebnisse in Tabelle 5 stellen die prozentualen Anteile von Assoziationen der Zentromere mit dem Nukleolus oder der Peripherie dar bzw. einer Lage im Nukleoplasma. Die NOR-tragenden Chromosomen zeigen eine sehr hohe Assoziationsrate mit dem Nukleolus (>80%). Dies war zu erwarten, da die NOR-Regionen auf den akrozentrischen Armen an der Nukleolusbildung beteiligt sind. In Übereinstimmung hierzu zeigen Studien von Smirnov et al. (2006), dass in HeLa und in fibroblastenartigen LEP-Zellen etwa 70-80% der NOR-Regionen kompetent, also aktiv sind. Aber auch inaktive NOR-Regionen können mit Nukleoli fusioniert sein, wie Hybridexperimente mit menschlichen akrozentrischen Chromosomen in Mensch-Maus-Hybridzellen gezeigt haben (Sullivan et al., 2001).

Die Ergebnisse für die anderen Zentromere zeigen jedoch kein einheitliches Bild. Während z.B. Zentromer 2 und 18 entsprechend der Größe ihrer Chromosomen wie erwartet mit einem niedrigen bzw. mit einem hohen Anteil am Nukleolus assoziiert sind, gibt es für die meisten anderen Zentromere keine erkennbare Tendenz für eine bevorzugte Assoziation mit Kernhülle oder Nukleoli. Dementsprechend zeigt die Korrelationsanalyse keinen Zusammenhang zwischen Größe der Chromosomen und Assoziation mit dem Nukleolus bzw. der Peripherie ($R^2 = 0,396$ bzw. $0,0334$).

Um zu sehen, wie hoch insgesamt der Anteil von Zentromeren am Nukleolus oder an der Peripherie ist, wurde in einem weiteren Versuch eine Panzentromersonde eingesetzt. Als durchschnittliche Anzahl von Zentromersignalen wurden in der späten S-Phase durchschnittlich 32 (ermittelt über Image J Plugin Object Counter) bzw. 37 Signale (ermittelt über Amira, visuelle Auswertung) (N=13) gefunden. Davon waren anteilig etwa 38% der Signale mit dem Nukleolus assoziiert, ~42% mit der Peripherie und knapp 20% lagen im Zwischenbereich. Der Befund, dass die Anzahl der Signale kleiner als die Zahl der Zentromere ist (46 in diploiden Fibroblastenkernen) kann durch Clusterbildung erklärt werden, die vor allem im Nukleolusbereich stark ausgeprägt ist und damit eine Abgrenzung einzelner Zentromersignale unmöglich macht. In einem früheren Versuch fanden Solovei et al. (2004b) durchschnittlich etwa 39 Kinetochorsignale in Fibroblasten, der Anteil an nukleolusassoziierten Signalen betrug in deren Untersuchung allerdings nur etwa 25%.

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten FISH- Experimenten war der Anteil von Signalen am Nukleolus wesentlich höher. Bildet man einen Mittelwert der prozentualen Anteile an Assoziationen mit dem Nukleolus (siehe Tabelle 5), ergibt sich aus den 17 einzeln untersuchten Zentromersonden ein Durchschnittswert von 51,4%. An der Peripherie liegen etwa ein Drittel und 15% im Zwischenbereich. Die hier durchgeführte differenziertere Auswertung mit den spezifischen Einzelsignalen führte also zu einem höheren Assoziationswert mit dem Nukleolus als auf Kinetochor- (Solovei et al., 2004) oder Panzentromerniveau (eigene Ergebnisse). Möglicherweise wurden viele Signale bei Panzentromer- oder Kinetochorfärbungen durch Clusterbildung am Nukleolus übersehen, so dass ein niedrigerer Assoziationswert ermittelt wird.

Eine Studie von Carvalho et al. (2001) an sphärischen, humanen lymphoiden Zellen zeigte ebenfalls keine Korrelation zwischen der Chromosomengröße und einer bevorzugten Assoziation mit Nukleolus oder Lamina. Übereinstimmend mit Weierich et al. (2003) befand sich die Mehrheit der Zentromere in Clustern in der Peripherie der Zellkerne. Die Autoren fanden jedoch einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation von Zentromeren und dem Heterochromatingehalt, wie Satelliten DNA etc, der das Zentromer umgibt bzw. der heterochromatischen Zusammensetzung des ganzen Chromosoms. Je höher dieser Gehalt, desto häufiger erfolgt eine Assoziation mit der Peripherie (Carvalho et al., 2001).

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen mit einem flachen Kern scheinen andere Regeln zu gelten als für kugelige Kerne. Im Gegensatz zu den Veröffentlichungen von Solovei et al. (2004b) und Gilchrist et al. (2004) ist der prozentuale Anteil an nukleolärer Assoziation von Zentromeren in der vorliegenden Arbeit viel höher. Eine Untersuchung der

perinukleolären DNA mit FISH und Sequenzierungsmethoden hat ergeben, dass fast alle Chromosomen am oder in der Nähe des Zentromers eine sog. NAD (*Nucleolus- Associated chromatin Domain*) besitzen (Nemeth et al. 2010, Figur 2A), also eine häufige potentielle Assoziation der Bereiche mit dem Nukleolus besteht. Lebendzellversuche mit photokonvertierbarem H4-Dendra2 auf HEP G2 Zellen (Cvackova et al., 2009) bzw. photoaktivierbarem GFP- H2B auf HeLa Zellen (van Koningsbruggen et al., 2010) haben gezeigt, dass nach Markierung der perinukleolären Region in den Mutterkernen nach der Mitose ein Großteil des angefärbten Chromatins an den Nukleoli der Tochterzellen verbleibt, jedoch auch ein gewisser Teil an der Peripherie bzw. an der Lamina zu finden ist. So finden van Koningsbruggen et al. (2010) nach Sequenzierung des perinukleolären Chromatins (= NADs) auch eine Überlappung mit laminassoziierten Regionen (LADs), die ursprünglich als ausschließlich mit der Lamina assoziiert galten (Guelen et al., 2008). LADs bzw. ihre Grenzbereiche besitzen spezifische Sequenzen, die ihre Lage an der Lamina markieren und vermutlich auch spezifische Rezeptoren, die mit Lamina- Proteinen interagieren und sie so an der Kernhülle verankern. Unterschiede in der zelltypischen Verteilung solcher Rezeptoren könnten zu unterschiedlichen radialen Anordnungen des Chromatins beitragen. Durch die spezifische Verankerung von Chromatin an der Lamina würde Chromatin ohne solche Rezeptoren in das Zellkerninnere verschoben.

Beide Bereiche, die perinukleoläre Region und die Lamina gelten wie bereits erwähnt als bevorzugte Aufenthaltsorte des (perizentromerischen) Heterochromatins. So könnte möglicherweise nach der Mitose eine Neuverteilung des Heterochromatins stattfinden, was bedingt durch die Dekondensations- und Elongationsprozesse zu zufälligen Verteilungen führt. Analog dazu könnte es also auch sein, dass bedingt durch das *mitotic preset-* Modell zwar die zweidimensionale Lage der Chromosomen mehr oder weniger vorgegeben ist, sich jedoch die Ankerpunkte der Zentromere von Zellzyklus zu Zellzyklus ändern können und mehr oder weniger zufällig sind. Die unterschiedlichen Verteilungswerte an Nukleolus und Lamina könnten also zum einen zelltypspezifisch aber auch von Zelle zu Zelle unterschiedlich sein.

Widersprüche ergeben sich durch die vielen Lebendzelluntersuchungen, die keine großen Chromatinbewegungen über die Interphase finden (Gerlich et al., 2003; Walter et al., 2003; Cvackova et al., 2009; Strickfaden et al., 2010) und den Berichten über unterschiedliche Assoziationszahlen von Zentromeren während des Zellzyklus (Ferguson and Ward, 1992; Solovei et al., 2004b). Die folgende Illustration zeigt, dass für unterschiedliche Assoziationszahlen in Zellen mit flachen Kernen eventuell keine großen Bewegungen nötig

sind. Dementsprechend könnten hier lokal begrenzte Brownsche Bewegungen (Chuang and Belmont, 2007) Veränderungen der Assoziationszahlen während des Zellzyklus erklären.

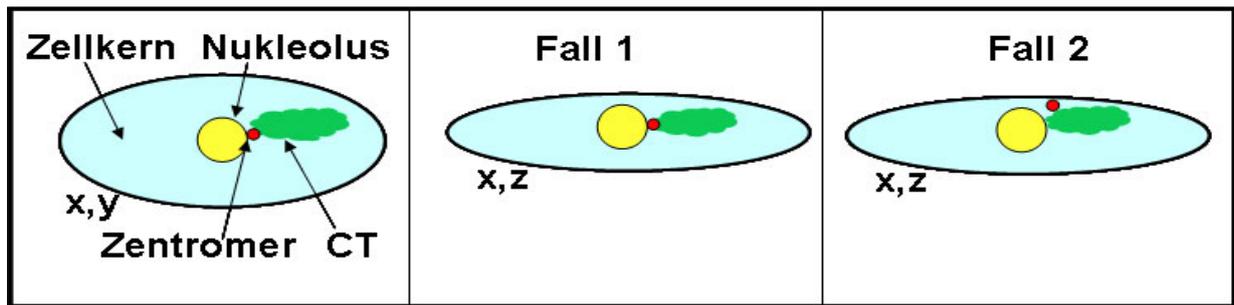


Abb. 70: Schema der Verteilung von Zentromeren

Die Abbildung zeigt im linken Bild eine Projektion eines Zellkerns mit einem CT, dessen Zentromer am Nukleolus assoziiert scheint. Fall 1 zeigt in einer Seitenansicht, dass das Zentromer tatsächlich mit dem Nukleolus assoziiert ist. In Fall 2 besitzt das CT die gleiche Position, das Zentromer ist jedoch mit der Lamina assoziiert. Dabei ändert sich in der zweidimensionalen Projektion die Position des Zentromers nicht, im dreidimensionalen Kontext nur geringfügig. Diese leichte Änderung ist über den Verlauf von Stunden durch Diffusion denkbar, ohne dass sich die Chromatinanordnung grundlegend verändert. Die ursprüngliche Assoziation der Zentromere mit Lamina oder Nukleolus könnte bedingt durch die Dekondensationsprozesse zu Beginn der G₁-Phase zufällig erfolgen.

Änderungen der Assoziationen von Zentromeren erfolgen auch während der Differenzierung, wie Versuche von Martou and De Boni (2000) und Solovei et al. (2004a) am Beispiel von Purkinje- Zellen gezeigt haben. Passend dazu verändert sich auch die Zusammensetzung der Lamin- assoziierten Domänen im Laufe der Differenzierung (Peric-Hupkes et al., 2010).

Als Kriterium nicht auszuschließen sind sequenzielle Besonderheiten der perizentromerischen Regionen oder ganzer Chromosomen, die eine bevorzugte Assoziation am Nukleolus oder der Peripherie bedingen oder wahrscheinlicher machen. So liegt z.B. die Sequenz für 5S rRNA auf Chromosom 1q42, das ganze Y-Chromosom und das inaktive X bzw. die Region Xq11.1 bevorzugt am Nukleolus (Nemeth et al., 2010; van Koningsbruggen et al., 2010) und könnte so auch die Lage des jeweiligen Zentromers beeinflussen.

5.7. Der Winkel zwischen Tochterkernen erlaubt keinen Rückschluss auf die Ähnlichkeit der CT-Anordnungen

Da sich die radialen Positionen der Chromosomen in Interphase und Metaphasenplatte gleichen, wurde weiter untersucht, wie groß die Ähnlichkeit zwischen Tochterzellen ist und ob diese Ähnlichkeit abhängt vom Winkel, den die Tochterkerne in der Interphase zueinander bilden (siehe Abschnitt 4.5). Die *fallen rosettes*- Hypothese (Solovei et al., 2004b) besagt ja, dass die Anordnung der Metaphasenplatte in die folgende Interphase übertragen wird, ohne dass es zu größeren Relokalisationen der Chromosomenanordnung kommt. Dementsprechend

sollten Symmetrien in der Anordnung der Chromosomen in beiden Tochterkernen vorhanden sein.

Wie die Ergebnisse zeigen, ist die durchschnittliche Ähnlichkeit zwischen den Tochterkernen in den verschiedenen Zelltypen sehr hoch bzw. der Dissimilaritätswert sehr niedrig (siehe Abb. 37). Dabei gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zelltypen. Die Mediane sind sogar noch deutlich niedriger, als in den Versuchen der von Daniela Köhler in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Doktorarbeit (Koehler 2008, Manuskript Fig. S2). In dieser Arbeit wurde bei 2-Zell Klonen von HeLa Zellen ein mittlerer Dissimilaritätswert von etwa 3 gefunden. Die durchschnittlich höhere Symmetrie in den Tochterzellen der vorliegenden Arbeit (zwischen 2,15 und 2,7) lässt sich dadurch erklären, dass die Zellen bereits kurz nach der ersten Teilung fixiert wurden. Ein Großteil der untersuchten Zellpaare besaß sogar noch ein zusammenhängendes Zytoplasma. In der Köhler- Arbeit wurden die Zellen erst nach mindestens 3 Zellteilungen (8- Zell- Klone) fixiert. Es ist also anzunehmen, dass durch die längere Wachstumsphase und durch mehrere durchlaufene Mitosen aber auch durch Zellbewegungen oder Kernrotationen eine größere Unähnlichkeit zwischen den Kernpaaren entsteht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Vermutungen von Sun et al. (2000), die im *mitotic preset*- Modell (Abb. 67) die Anordnung der Metaphase als Voraussetzung für die Interphasenanordnung ansehen. Des Weiteren bestätigt es die *fallen rosettes*- Hypothese, dass die Anordnung der Metaphase symmetrisch auf die Tochterkerne übertragen wird. Einige Kerne zeigen jedoch einen sehr hohen Dissimilaritätswert, was gegen den von Gerlich et al. (2003) propagierten Anaphasemechanismus spricht. Dieser besagt, dass durch unterschiedlich schnell segregierende Chromosomen in der Anaphase Veränderungen der Nachbarschaften von Chromosomen, die durch die Prometaphase erzeugt werden, rückgängig gemacht werden können und so die chromosomale Anordnung des Mutterkerns in hohem Maß auf die Tochterzellen vererbt wird. Schon die Ergebnisse von Walter et al. (2003) zeigten in Lebendzellversuchen oft eine große Symmetrie in den Tochterzellen, die von der Anordnung im Mutterzellkern stark abweicht. Mittels 3D FISH- Experimenten von 4- Zell Klonen fanden die Autoren jedoch keine Symmetrie mehr zwischen verwandten Zellen 2. Grades („Cousinen“). Dies konnten Köhler et al. (in prep.) bestätigen und genauer quantifizieren. Die Unähnlichkeitswerte zwischen Cousins sind genau so groß wie zwischen komplett unverwandten Zellen in einer Zellpopulation. Die drastischen Veränderungen der Nachbarschaftsbeziehungen zwischen Mutterkern und Tochterkernen sind von der Lage der Spindel jedoch unabhängig, wie Lebendzelleexperimente von Strickfaden et al. (2010, Fig6 G-

I) bewiesen haben. Die einzige Ausnahme, in der auch nach zwei Teilungen eine starke Ähnlichkeit zwischen den Kernen zu erwarten ist, ist eine Lage der Spindel senkrecht zum Kern, was aber nur selten vorkommt (in HeLa Zellen ~ 15% der beobachteten Zellen; Köhler et al in prep). Um auch über mehrere Teilungen hinweg die Anordnung stabil zu halten, sollte die Spindel aber immer senkrecht liegen, die Position der Spindel ist jedoch beliebig (Chaly and Brown, 1988). Dies spricht auch gegen die Behauptung fester Nachbarschaften von homo- oder heterologen Chromosomen, die in früheren Arbeiten propagiert wurden (Nagele et al., 1995; Nagele et al., 1998; Nagele et al., 1999). Dazu ist die in der Prometaphase entstehende Neuordnung der Nachbarschaftsbeziehungen von Chromosomen zu groß und es bedürfte stabiler Verbindungen zwischen Chromosomen, um diese Veränderungen wenigstens für bestimmte homo- oder heterologe Chromosomenpaare zu verhindern. Unabhängig von den chromosomalen Neuordnungen der Nachbarschaften ist die Anordnung ab der Metaphase fixiert und es treten nur kleinere Änderungen zu Beginn der G₁- Phase auf (siehe Abb. 40, Abb. 41), was zu einem ähnlichen Arrangement in den Tochterzellen führt (Manders et al., 2003; Walter et al., 2003; Cvackova et al., 2009; Strickfaden et al., 2010).

Die zweite Frage, die in diesem Zusammenhang untersucht wurde, betraf die Hypothese, dass der Grad an Unähnlichkeit vom Winkel zwischen den Tochterkernen abhängen könnte. Wie das Modell in Abb. 36 zeigt, könnte beim *fallen rosettes* Modell die unterschiedliche Elongationsrichtung der nun entstehenden Tochterkerne nach dem Umfallen der senkrecht zur Wachstumsebene stehenden Anaphaserosetten zu größeren Dissimilaritäten führen. Dadurch würden unterschiedliche Winkel zwischen den Längsachsen der beiden Tochterzellkerne entstehen. Betrachtet man die normalisierten Dissimilaritätswerte aufgetragen gegen den Winkel, den beide Tochterkerne zueinander bilden, wird deutlich, dass Ähnlichkeit oder Unähnlichkeit der Tochterzellen nicht von diesen Winkeln abhängt (siehe Abb. 37). Es gibt sowohl Beispiele für große Unähnlichkeiten bei einem kleinen Winkel als auch sehr ähnliche Zellen mit einem großen Winkel zueinander (Abb. 38).

Da Rotationsbewegungen von Zellkernen um eine Achse senkrecht zur Wachstumsebene der Zelle häufig vorkommen (Strickfaden et al., 2010), darf vermutet werden, dass die unterschiedlichen Winkel zwischen den Tochterzellkernen auf solche Rotationsbewegungen zurückzuführen sind. Unter dieser Annahme folgt, dass die zum Zeitpunkt der Fixierung aufgetretenen Winkel keinen Rückschluss auf die Elongationsrichtung der Kerne zu Beginn der G₁ erlauben. Welche Faktoren für die Entstehung von Unähnlichkeiten zwischen Tochterkernen eine Rolle spielen, ist unklar. Die Hypothese, dass unterschiedliche Elongationsrichtungen bei der Entstehung der Hauptachse flach elliptischer Zellkerne dafür

verantwortlich sind, lässt sich nicht beweisen, erscheint jedoch nach wie vor vernünftig. Möglicherweise ist auch die unterschiedliche Geschwindigkeit der Dekondensationsprozesse verschiedener Chromosomen ein Faktor (Muller et al., 2010). Aber auch relativ häufig vorkommende Unterschiede in der Anzahl von Nukleoli in den Tochterzellen kann die Anordnung beeinflussen (Kalmarova et al., 2007). Beeinflusst werden kann die chromosomale Anordnung auch durch eine hohe Zelldichte. Teilt sich eine in dichter Kultur wachsende Zelle, müssen sich die entstehenden Tochterzellen erst einen Platz suchen, was zu massiven Bewegungen und Formänderung der Kerne führen kann (siehe Movies **1** + **2**; beim Doppelklick auf die Zahl öffnet sich der Film). Diese Filme zeigen Anaphaserosetten, die nicht einfach in Richtung Wachstumsebene umfallen, sondern von der Senkrechten aus kollabieren und erst dann elongieren. Gerade in einem solchen Fall ist eine besonders ausgeprägte Unähnlichkeit zu erwarten. Inwieweit solche in vitro Untersuchungen aber mit der Realität im Zellverband zu tun haben, kann nicht beurteilt werden.

Ein weiterer Faktor, der die Ähnlichkeit beeinflussen könnte, sind mehrere Elongationsrichtungen. Elongiert ein Kern in zwei oder drei verschiedene und nicht gleichmäßig in alle Richtungen, sind auch Änderungen der chromosomalen Anordnung zu erwarten, da der zweite Tochterkern nicht zwangsläufig die gleichen Richtungen einschlagen muss. Auch die Verteilung der Zentromere könnte eine Rolle spielen. Laut Untersuchungen von Solovei et al. (2004b), sind die Zentromere durch die Zugkräfte der Mikrotubuli in der Anaphase auch in den späteren Phasen wie Telophase und der frühen G₁ asymmetrisch verteilt und liegen meist an der sich neubildenden oberen oder unteren Kernhülle. Wie die Verteilung der Zentromere gezeigt hat (siehe oben), werden einige an der Lamina befestigt werden, einige sich um die neubildenden Nukleoli anordnen und einige auch ins Kerninnere wandern. Es ist nicht anzunehmen, dass diese Wanderprozesse und Befestigungen der Zentromere in beiden Tochterzellen synchron und gleichmäßig verlaufen. Dadurch könnte auch die Position der zugehörigen Chromosomen in der frühen G₁-Phase beeinflusst werden. Schön zu sehen ist in einigen Beispielen, dass die Anaphaserosetten entweder in die gleiche Richtung oder voneinander weg fallen können, was zu einer schiebe- oder spiegelsymmetrischen Anordnung führen kann (siehe Movie **3**, beim Doppelklick auf die Zahl öffnet sich der Film). In diesem Beispiel fallen die Anaphasen in die gleiche Richtung, es sollte also ein schiebesymmetrisches Arrangement zu finden sein. Ein anderes Beispiel zeigt zwei Kerne in der Telophase, die voneinander wegfallen und folglich eine Spiegelsymmetrie besitzen (siehe Movie **4**, beim Doppelklick auf die Zahl öffnet sich der Film). Dies ist an der Einbuchtung an der Unterseite der Kerne zu sehen, die durch die Zugkraft der Mikrotubuli in

der Anaphase entstehen (asymmetrische Verteilung). Des Weiteren kann man sehen, dass die meisten Zentromere (CENP B in grün) immer noch sehr zentral und um die Einbuchtung verteilt liegen, also die Zentromere noch nicht ihre endgültige Position erreicht haben, was erst in der frühen G₁ erfolgt. Gut zu sehen ist, dass trotz Spiegelsymmetrie zwischen den Kernen sich bereits in diesem Stadium die Kinetochormuster unterscheiden, ein Zeichen für zufällige Anordnung bzw. Befestigung an Nukleoli oder Lamina.

In Lebendzellversuchen wurde der Anteil an den beiden Symmetrien untersucht. In HeLa Zellen, die mit gfp- H2B stabil transfiziert sind, ist der Anteil von Schiebe- und Spiegelsymmetrie in etwa gleich (12x Schiebe-, 11x Spiegelsymmetrie; N=23). In U2OS Zellen, transfiziert mit mrfp- H2B und gfp- CENPB sind nur acht von 23 Zellpaaren spiegelsymmetrisch, etwa 2/3 sind schiebesymmetrisch. Die Art der Symmetrie wirkt sich jedoch nicht auf die Auswertung aus (siehe Material und Methoden).

5.8. Die Mitose verändert die Nachbarschaften von Chromatin, die relative radiale Lage bleibt jedoch erhalten

In Lebendzellversuchen an der Zelllinie RPE-1 wurde untersucht, wann die Änderungen der chromosomalen Nachbarschaften auftreten und inwieweit radiale Anordnungen erhalten bleiben (Abschnitt 4.6). Dazu wurden Randbereiche von Zellkernen in der G₂-Phase photoaktiviert und nach der Mitose die Verteilung in den Tochterkernen untersucht. Wie Abb. 39 beispielhaft zeigt, finden sich in den Tochterkernen immer mehrere kleine aktivierte und z.T. auch relativ weit voneinander entfernte Chromatinflecken, während in den Mutterkernen ein zusammenhängendes Areal photoaktiviert wurde. Dies bestätigt die Ergebnisse von Walter et al. (2003), Cvackova et al. (2009) und Strickfaden et al. (2010). Die Auswertungen mit eADS belegen, dass die aktivierten Chromatindomänen in den Tochterkernen etwas innerer liegen als in den entsprechenden Mutterkernen. Legt man jedoch Achsen durch die aktivierten Domänen und dreht die Kerne in eine Seitenansicht (x,z: Abb. 39: C,D), zeigt sich deutlich, dass diese Domänen immer noch zu einem Großteil mit der Peripherie oder Lamina assoziiert sind. Das heißt, dass sich die Anordnung einer zweidimensionalen Projektion ändern kann, im dreidimensionalen Kontext aber weitgehend erhalten bleibt. Da nur Chromatindomänen am Kernrand von Mutterkernen photoaktiviert wurden, kann man davon ausgehen, dass vorwiegend heterochromatische Bereiche (eventuell, wie bei anderen Zellen mit flachen Kernen, großer Chromosomenterritorien) betroffen waren. Diese nehmen nach einer Zellteilung wieder Kontakt mit der Lamina auf. Diese Zelllinie ist sehr flach (RPE1,

siehe Strickfaden et al., 2010 und Material und Methoden) was dazu beitragen könnte, dass zu Beginn der G₁ eine zufällige Verteilung des Heterochromatins an der Lamina stattfindet im relativen radialen Kontext, wie es auch für die Verteilung der Zentromere zu Beginn der G₁-Phase zutreffen könnte (siehe 5.6). Es wäre auch vorstellbar, dass, umgekehrt zu den Untersuchungen von van Koningsbruggen et al. (2010) über die Zusammensetzung der perinukleolären Region, nach Aktivierung von Randgebieten und einer durchlaufenen Zellteilung die potentiell heterochromatischen Bereiche an Nukleoli zu finden sind.

Die Neuordnungen der Nachbarschaften finden in der Prometaphase statt, wie Abb. 40A zeigt. Nach der Entstehung der Metaphasenplatte ändert sich jedoch die Anordnung nur noch minimal. Sie wird auf die Tochterzellen übertragen und bleibt stabil bis in die G₁-Phase der resultierenden Tochterzellen (Abb. 40C,D,E; Abb. 41). Das dargestellte Beispiel zeigt auch bereits die Ähnlichkeiten der Anordnung zwischen der späten Prometaphase und der Anordnung in den Tochterzellkernen. Die Anaphaserosetten fallen in diesem Beispiel voneinander weg und zeigen dementsprechend ein spiegelsymmetrisches Muster. Leichte positionelle Änderungen ergeben sich vermutlich aus der unterschiedlichen Kernform. Zusammen mit den Ergebnissen von Strickfaden et al. (2010) bestätigen sich alle vier Thesen von Boveri:

- (1) Chromosomen nehmen unterschiedliche Territorien (CTs) im Zellkern ein.
- (2) Die CT Ordnung und Nachbarschaften werden während der Interphase stabil aufrechterhalten.
- (3) Wechsel von chromosomalen Nachbarschaften geschehen während der Mitose, genauer gesagt während der Prometaphase, wenn die Chromosomen an der Spindel befestigt werden und sich Richtung Metaphasenplatte bewegen. Daraus folgt, dass sich die chromosomale Anordnung deutlich unterscheiden kann von einem Zellzyklus zum nächsten.
- (4) Die Anordnungen und Nachbarschaften, die sich in der Metaphasenplatte bilden, werden über die Ana- und Telophase in den zwei getrennten Chromatidensets erhalten. Daraus resultieren ausgeprägte Symmetrien der CT- Anordnungen in den neugebildeten Tochterkernen.

Ergänzend zu diesen Thesen zeigen die vorgenannten Experimente, dass zumindest Zellen mit einem flachen Kern eine größenabhängige Verteilung gilt, die analog zu Boveri's These Nr.4 bereits in der Metaphaseplatte oder auch etwas früher festgelegt ist. Auch kleinere DNA-Elemente wie sSMCs, die hochamplifizierte HSR- Region in der Metaphase oder Zentromere zeigen überwiegend diese relative radiale Verteilung. Anhand der HSR zeigt sich aber auch,

dass noch andere Parameter außer der physikalischen Größe eines Elements eine Rolle spielen können, wie z.B. die transkriptionelle Aktivität. Die Position von Zentromeren bezüglich ihrer bevorzugten Assoziation könnte zelltypspezifisch oder von stochastischen Einflüssen zu Beginn der G₁- Phase geprägt sein. Es konnten in der vorliegenden Arbeit außerdem das *mitotic preset*- Modell (Sun et al., 2000) und die *fallen rosettes*- Hypothese (Habermann et al., 2001; Solovei et al., 2004b) bestätigt und andere Arbeiten (Gerlich et al., 2003; Essers et al., 2005) widerlegt werden.

5.9. Auswirkungen von Transkriptionsänderungen auf die Anordnung im Kern

5.9.1. Trotz Hochregulation verändert der PSG- Cluster seine perinukleoläre Position nicht

In zwei weiteren Experimentreihen sollten die Auswirkungen von transkriptioneller Aktivität auf lang- oder kurzfristige Repositionierungen von Loci oder Interaktionen von Loci untersucht werden.

Im ersten Experiment wurde der PSG- (*Pregnancy Specific Glycoproteins*) Locus untersucht. Die Funktion der 11 zu diesem Cluster gehörenden Gene ist nicht vollständig geklärt, sie helfen aber wohl bei der Erhaltung der Schwangerschaft und sind daran beteiligt, die Abstoßung eines allotypischen Fötus zu verhindern. Des Weiteren werden schwere Missbildungen oder Retardierungen mit Unregelmäßigkeiten in der Expression dieser Gene assoziiert (Wurz et al., 1981; MacDonald et al., 1983; Tamsen et al., 1983). Erstaunlicherweise wird diese Gruppe von Genen nicht nur in der Schwangerschaft aktiv bzw. hochreguliert, sondern auch wenn die Zelle altert (Endoh et al., 2009). Genomweit gesehen werden aber auch viele andere Gene in der Entwicklung zur Seneszenz hoch- oder runterreguliert (Minagawa et al., 2004).

Interessanterweise liegen die PSG- Gene in einer nukleolusassoziierten Domäne (NAD) (Nemeth et al., 2010), sind also häufig nukleolusassoziiert und befinden sich damit an einem transkriptionell repressiven Ort (Nemeth et al., 2010; van Koningsbruggen et al., 2010). Mit Hilfe der induzierten replikativen Seneszenz sollten eventuelle Relokalisationen untersucht werden, die eine Verlagerung in transkriptionell kompetente Bereiche vermuten lassen. Die erfolgreiche Induktion von replikativer Seneszenz durch Inkubation der Zellen mit BrdU wurde mit dem SA- β - Gal- Test (Dimri et al., 1995; Bandyopadhyay et al., 2005) nachgewiesen. So sollte ein Testsystem etabliert werden, mit dem man überprüfen kann, ob

Veränderungen in der Chromatinanordnung im Kern über Änderung der transkriptionellen Aktivität induzierbar sind.

Nach 4 Tagen Induktion waren etwa die Hälfte der Zellen seneszent, nach 6 Tagen knapp 70% (Abb. 48). Die Färbungen des SA- β -Gal- Tests waren jedoch nicht in allen Fällen eindeutig, deswegen wurde zusätzlich eine KI-67 Immunfärbung durchgeführt, um zwischen zyklierenden Zellen und Zellen, die den Zyklus verlassen haben, zu unterscheiden (Abb. 49). Bei diesem Test waren nach 4 Tagen etwa 50% der Zellen KI-67 negativ, nach 6 Tagen etwa 90%. Die Anteile an seneszenten Zellen passen zu den Ergebnissen von Michishita et al. (1999). Darin war bis zu 4 Tagen nach BrdU- Behandlung lineares Wachstum zu finden, ab Tag 4 hörte jedoch das Wachstum von HeLa Zellen größtenteils auf und die Zellen gingen in ein seneszendes Stadium über. In den eigenen Experimenten wurde die Lage der Loci auch nach 4 Tagen untersucht, da hier die höchste transkriptionelle Aktivität der 11 PSG- Gene nach BrdU- Inkubation gemessen wurde (Endoh et al., 2009). Da in der genannten Publikation die Transkriptionswerte nach mehr als 4 Tagen nicht gemessen wurden, ist nicht klar, ob die Aktivität nicht höher hätte ausfallen können.

Die Assoziationen der PSG- Gene mit dem Nukleolus zeigen kein einheitliches Bild. Der PSG Cluster zeigte nach 4 Tagen keine Veränderung, nach 6 Tagen entgegen der Erwartung jedoch eine deutlich höhere Assoziationsrate, was sich auch in den vermessenen Distanzen zum Nukleolus bemerkbar macht. Nach 6 Tagen mit BrdU und anschließendem Weiterkultivierung für 6 Tage ohne BrdU zeigten sich Werte ähnlich denen uninduzierter Zellen.

Über den transkriptionellen Status der Region, in der der BAC der Positivkontrolle AN51 liegt, ist nicht viel bekannt. Dort sind 27 Zinkfinger Gene mit einer Krab- Domäne lokalisiert, die meist eine repressive Funktion haben. Die Transkription einiger Gene aus diesem Cluster ist meist sehr gering und außerdem von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich (Quelle: <http://genome.ucsc.edu/>). Die hier untersuchte Region zeigt große Schwankungen in den Assoziationszahlen zum Nukleolus. Nach 4 Tagen ist eine deutliche Bewegung vom Nukleolus weg erkennbar, nach 6 Tagen wieder darauf zu und nach 6d+/6d- BrdU wieder weg. Die unterschiedlichen Werte in den uninduzierten Kontrollen (einmal ~50%, einmal ~35%) könnten auf interexperimentelle Schwankungen zurückzuführen sein. Wie die Ergebnisse von van Koningsbruggen et al. (2010) gezeigt haben, können perinukleoläre, heterochromatische Bereiche nach der Zellteilung auch in der heterochromatischen Peripherie der Zellkerne zu finden sein. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Verteilung der Zentromersignale zeigt, dass es diesbezüglich keine feste Regel gibt (siehe oben). Es könnte

also auch hier sein, dass die Schwankungen an Assoziationen bei den Kontrollen auf zufällige Unterschiede in der Verteilung des Heterochromatins zurückzuführen sind.

Aber auch die Zellzyklusphase könnte hier eine Rolle spielen, da typischerweise je nach Phase mehrere oder einer, große oder kleine Nukleoli zu finden sind (Solovei, 2005). Auch dies könnte also die Verteilung der NADs und damit der BACs beeinflussen. Leider konnten jedoch aufgrund technischer Limitierung am Konfokalmikroskop keine weiteren Marker für die Zellzyklusphase oder Lamin integriert werden. Für zukünftige Experimente sollten solche Faktoren jedoch berücksichtigt werden.

Die Negativkontrolle AN16 ergab überraschenderweise, dass der geringe Anteil an visuell ermittelten Assoziationen nach Induktion noch kleiner wird. Die Distanzmessungen mit eADS legten jedoch eine Bewegung zum Nukleolus hin nahe und nach 6 Tagen mit und 6 Tagen ohne BrdU wieder eine deutlich Wegbewegung vom Nukleolus ($p < 0,001$).

Insgesamt gesehen zeigt sich also eine gewisse Dynamik der untersuchten Loci, was die Assoziation mit und die Distanzen zum Nukleolus betrifft. Ausgeschlossen werden kann die Hypothese, dass sich der PSG Locus nach Induktion und transkriptioneller Aktivierung wegbewegt vom Nukleolus, um in einen für Transkription günstigeren euchromatischen Bereich zu gelangen. Entgegen der Erwartung wurde sogar eine kleine Lageverschiebung hin zum Nukleolus beobachtet. Ein Ausloopen, wie es für andere Gene gezeigt wurde (Chambeyron and Bickmore, 2004), ist also für transkriptionelle Aktivierung nicht nötig. Dies bestätigt Folgerungen von Morey et al. (2009), die zeigen konnten, dass Gene um aktiv zu sein Schleifen bilden können, aber nicht müssen. Zwar ist die perinukleoläre Region transkriptionell wenig aktiv und weitgehend RNA Pol II frei (Nemeth et al., 2010), hochauflösende Aufnahmen zeigen jedoch einzelne Pol II Signale auch in der perinukleolären Region (Markaki et al., 2011). Demnach scheint also auch in dieser Region Transkription möglich zu sein. Auch hier bietet sich ein Vergleich mit der Kernperipherie an. Zumindest im Bereich der Kernporen ist moderate transkriptionelle Aktivität zu finden. Diese Bereiche und die LADs sind demnach unterschiedliche Mikrohabitate (Review: Kind and van Steensel, 2010). Analog dazu könnte es auch in der perinukleolären Region funktionell distinkte Bereiche geben, die Transkription ermöglichen (Nemeth et al., 2010).

Experimentell induzierte aber auch natürliche replikative Seneszenz geht mit einer Vielzahl von transkriptionellen Veränderungen einher. Dabei werden viele Gene aktiviert und hochreguliert, andererseits werden aber auch viele Gene stillgelegt (Minagawa et al., 2004). Zudem gibt es eine verstärkte Heterchromatinisierung, was sich beispielsweise in einer

deutlichen Zunahme typischer Heterochromatinmarker wie H3K9-Me₃ und HP1 äußert (Review: Adams, 2007).

Inwieweit die hier gefundene Dynamik der Loci von lokalen chromosomalen Restrukturierungen, einer Zunahme des Heterochromatins, Chromosomenumlagerungen oder veränderter Expression abhängt, kann nicht geklärt werden. Chromatinbewegungen werden im Allgemeinen mit sogenannten nukleären Motoren wie nukleärem Aktin und Myosin in Verbindung gebracht (Mehta et al., 2008), da entsprechende Inhibitoren solche Bewegungen am Beispiel einzelner Loci (Hu et al., 2008) aber auch ganzer Chromosomenterritorien (Mehta et al., 2010) blockieren. Dabei propagieren beide vorgenannte Publikationen schnelle Bewegungen im Bereich von 15- 30 Minuten. Die langen Zeiträume, in der die Änderungen z.B. von AN51 in der vorliegenden Arbeit auftraten, setzen jedoch nicht notwendig gerichtete Bewegungen voraus, sondern könnten passiv durch die Veränderung der Kernmorphologie entstehen. Im Gegensatz zu normal proliferierenden Zellen flachen die Kerne in seneszenten Zellen stark ab und werden größer. Fibroblasten verlieren ihre Bipolarität und auch die Zahl der Nukleoli ändert sich zu einem großen anstatt mehrerer kleiner (Bemiller and Lee, 1978; Mehta et al., 2007; Reddel, 2010). Gerade eine veränderte Nukleolusmorphologie könnte zu den beobachteten Veränderungen der Loci- Assoziationen beitragen.

Die größte Umstrukturierung in seneszenten Zellen zeigen jedoch viele diploide, adhärente Zelltypen durch die Bildung von *Senescence Associated HeterochromatinFoci* (SAHFs) (siehe Abb. 56 und Narita et al., 2003). Dies sind stark kondensierte Chromatindomänen in Interphasen und jede dieser Domänen stellt ein CT dar (Funayama et al., 2006; Zhang et al., 2007). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten diploiden IMR-90 Zellen gehören zu den Fibroblasten und bilden im seneszenten Zustand ebenfalls SAHFs aus. Dabei wurden eine frühe und eine späte Passage untersucht, in der späten Passage waren etwa 70% der Zellen seneszent und zeigten SAHFs. Expressionsstudien haben gezeigt, dass die PSG- Gene auch in fibroblastenartigen Zellen hochreguliert werden, wenn die Zellen das Stadium replikativer Seneszenz erreicht haben (Endoh et al., 2009). Interessanterweise zeigen die untersuchten PSG, AN51 und AN16 Loci in den seneszenten IMR-90 Zellen gleichsam eine höhere Assoziationsrate zum Nukleolus von etwa 10% im Vergleich zu proliferierenden Zellen. Auch hier nimmt die Verbindung zwischen dem PSG- Cluster und dem Nukleolus eher zu, was ebenfalls gegen eine Verlagerung in transkriptionell kompetente Bereiche spricht.

Eine visuelle Betrachtung der untersuchten seneszenten Kerne und der Lage der BAC Signale ergab, dass alle BAC- Signale außerhalb oder am Rand dieser SAHFs liegen. Innerhalb dieser Cluster findet keine Transkription statt und epigenetische Marker für Euchromatin, Pol II

Signale und naszente RNA liegen ebenfalls am Rand solcher SAHFs (Narita et al., 2003; Funayama et al., 2006; Funayama and Ishikawa, 2007; Zhang et al., 2007). Die Randlage an den SAHFs entspricht also der Erwartung eines aktiven PSG- Clusters. Ein phänotypisch und strukturell ähnliches, ansonsten aber zur SAHF- Bildung und der Seneszenz unterschiedliches Phänomen, wurde bei der *Chaetocin Induced Chromatin Codensation* (CICC) beobachtet. Auch hier liegen aktive Bereiche ebenfalls am Rande dieser Chromatincluster (Illner et al., 2010).

Weitere untersuchte NAD- Regionen auf Chromosom 1q21 im IMR-90 Zellen, von denen keine Transkriptionsdaten der darin liegenden Gene vorliegen, zeigten leichte Änderungen in den Assoziationszahlen zum Nukleolus, eADS Berechnungen ergaben jedoch keine messbaren Distanzänderungen. Der Anteil an Assoziationen mit dem Nukleolus ist insgesamt sehr gering. Dieser Befund war erstaunlich, da die BACs nahe dem perizentromerischen Heterochromatinblock liegen, der typischerweise eine starke Assoziation mit dem perinukleolären Bereich aufweist.

In einigen Kernen seneszenten Zellen wurden mehr als je 2 BAC- Signale gefunden. Es könnte also zu segmentellen Duplikationen gekommen sein. Da der irreversible Wachstumsstopp bei der zellulären Seneszenz aber als Tumorsuppressormechanismus diskutiert wird (Funayama and Ishikawa, 2007; Reddel, 2010), haben solche Veränderungen im Genom eventuell keine Auswirkungen mehr.

5.9.2. Die Stimulation mit Östrogen liefert keine Hinweise auf die Reorganisationen im Kern

In einer weiteren Experimentreihe wurden kurzfristige Reorganisationen im Kern untersucht. Ausgangspunkt waren zwei Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe von Michael Rosenfeld (Nunez et al., 2008, Studie zurückgezogen und Hu et al., 2008). Darin beschreiben die Autoren nach Östrogenstimulation aktive Bewegungen der zwei östrogenabhängigen Genloci GREB1 und TFF1 einschließlich der zugehörigen CTs aufeinander zu. Dieser Effekt tritt innerhalb von etwa 1h nach Induktion auf und erfordert nukleäres Aktin und Myosin. Durch die Kolokalisation in etwa 60% der Zellen sollen die beiden Gene ko- und hochreguliert werden. Dieser Effekt wurde sowohl bei Brustkrebszellen der Linie MCF 7 als auch bei diploiden Brustepithelzellen (HMEC) beobachtet.

Um diese Behauptungen zu überprüfen, wurde eine Reihe an Experimenten durchgeführt. Da solche Bewegungen von Loci im Kern eine massive Reorganisation erfordern sollten, wurden zuerst Lebendzelleexperimente an MCF 7- Zellen, die paGFP H4 exprimierten, durchgeführt

(siehe Abb. 63). Nach der Photoaktivierung von paGFP in Streifenmustern sollten größere Umstrukturierungen in stimulierten Zellen durch eine Zerstörung des Musters sichtbar gemacht werden (Strickfaden et al., 2010). Trotz der funktionierenden Stimulation mit Östrogen, die durch die Verlagerung des Östrogenrezeptors in den Kern nachgewiesen wurde, konnte in keinem einzigen Fall eine Zerstörung des Streifenmusters gefunden werden. Dies gilt für Kurz- und Langzeitbeobachtungen, lediglich eine langsame Verbreiterung der Streifen wurde beobachtet, ebenso wie in unstimulierten Kontrollzellen. Diese Verbreiterung ist Folge lokal begrenzter Bewegungen von Chromatindomänen. Das Ausbleiben großräumiger Veränderungen spricht gegen größere gerichtete Bewegungen und für normale, Brownsche Diffusion, wie es für verschiedene Zelltypen mehrerer Spezies gezeigt wurde (Marshall et al., 1997; Bornfleth et al., 1999; Edelman et al., 2001). Gerichtete Bewegungen, vor allem von ganzen Chromosomen wie bei Hu et al. (2008), sollten jedoch das Muster zerstören. Es gibt aber auch Berichte von gerichteten Bewegungen kleinerer Chromatindomänen (Levi et al., 2005; Chuang et al., 2006; Chuang and Belmont, 2007). Solche Bewegungen könnten eventuell mit den Möglichkeiten des Spinning Disc Mikroskops nicht aufgelöst werden.

Um die Topographie der beiden Loci GREB1 und TFF1 genauer zu untersuchen, wurden auch FISH- Experimente durchgeführt (Abb. 64). Auffällig bei den MCF 7 Zellkernen ist zuerst das massive Rearrangement des Karyotyps mit etwa 4 GREB1 und 7- 8 TFF1 Signalen. Dies steht im klaren Gegensatz zu den Veröffentlichungen von Hu et al. (2008), die angebliche MCF 7 Zellkerne immer nur mit einer diploiden Signalanzahl zeigten. Auch Kocanova et al. (2010) fanden in einer sehr ähnlich angelegten Studie an MCF7 Zellen wesentlich mehr Signale. Wie die Ergebnisse der qPCR zeigen (Kocanova et al., 2010 und eigene Ergebnisse Abb. 63), werden die beiden Gene nach Östrogenstimulation hochreguliert, jedoch wesentlich geringer und in größeren Zeiträumen als bei Hu et al. (2008). Trotz der Expressionsänderung zeigt sich hier in insgesamt 146 untersuchten Kernen, davon etwa die Hälfte der untersuchten Zellen mit Östrogen stimuliert, nur in einem einzigen Fall eine Kolokalisation der beiden BAC- Signale. Auch die Abstände zwischen den Signalen veränderten sich nach Stimulation nicht und waren sowohl in induzierten als auch unbehandelten Zellen relativ groß. Nur ein geringer Prozentsatz (zwischen ~1,5 und 3%) der Signale befinden sich weniger als 1µm voneinander entfernt, eine Entfernung, die überhaupt für Kolokalisationen in Frage kommt. Obwohl in mehr als 50% der stimulierten aber auch in den Kontrollzellen Interaktionen zwischen den CTs vorkommen und die Signale fast immer an der Oberfläche der CTs liegen, finden sich in FISH Experimenten mit BAC- Pools um die beiden Loci keine Chromatinschleifen. Dies entspricht den Vorstellungen von Morey et al.

(2009), denen zufolge aktive Gene keine Schleifen bilden müssen, auch wenn solche Schleifenbildungen gelegentlich beobachtet wurden.

Auch die radiale Lage sowohl der CTs als auch der BAC Signale änderte sich nach der Induktion mit Östrogen nicht. Eine Kolo-kalisation der beiden Loci ist demnach keine notwendige Voraussetzung für deren Regulation und Expression. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Kocanova et al. (2010) überein und widersprechen massiv den Resultaten von Hu et al. (2008). Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten jedoch auf Unterschiede der verwendeten MCF 7 Zelllinien oder der Zellkultur in den verschiedenen Laboratorien zurückzuführen sein (Belmont, 2010). Der Untertitel des vorgenannten Artikels „*Estrogen fueled nuclear kiss- Did it move for you?*“ lässt jedoch auch den Schluss zu, dass Manipulationen, sogenannte „*fabricated data*“, vorliegen könnten.

Es gibt viele Berichte über intra- und interchromosomale Interaktionen zwischen Chromatinabschnitten (Reviews: Cavalli, 2007; Chuang and Belmont, 2007; Fraser and Bickmore, 2007; Lanctot et al., 2007; Fedorova and Zink, 2009; Gondor and Ohlsson, 2009; Cope et al., 2010; van Steensel and Dekker, 2010; Williams et al., 2010; siehe auch Einleitung). In den meisten Fällen handelt es sich um Interaktionen, intra- oder interchromosomal, die im Laufe von Differenzierungsprozessen entstehen, z.B. bei Spilianakis et al. (2005) bei T-Zellen, Noordermeer et al. (2008) beim β - globin Locus, Lomvardas et al. (2006) bei Geruchsrezeptoren oder bei der V(D)J Rekombination (Bolland et al., 2009). Meist dienen solche Interaktionen dazu, eine bestimmte Entwicklungsrichtung der entsprechenden Zellen oder transkriptionelle Aktivität im zelltypspezifischen Kontext aufrechtzuerhalten. Die beteiligten Regionen intrachromosomaler Verbindungen besitzen oft viele Interaktionspartner, z.B. Enhancer- oder Promotorsequenzen die z.T. viele Megabasen auseinander liegen, was eine komplizierte Faltung des Chromatins voraussetzt (van Steensel and Dekker, 2010). Dabei entsteht die Interaktion aber meist über mehrere Tage, also über mehrere Zellteilungen hinweg. Aber auch Berichte über Repositionierungen von Genen, wie bei Chambeyron and Bickmore (2004), Finlan et al. (2008), Kumaran et al. (2008) und Reddy et al. (2008), die zu gesteigerter Expression, Deaktivierung, Aktivierung oder keiner Änderung der Aktivität führen, geschehen nicht im Minutenbereich, sondern benötigen mindestens eine mitotische Teilung. Als Stabilisatoren der Interaktionen in *cis*, also intrachromosomal, wirken beispielsweise die *Locus Control Regions* (LCR) vom β - globin Locus (Noordermeer et al., 2008) oder von Cytokinloci (Spilianakis et al., 2005) oder auch bestimmte Gerüstproteine wie CTCF und SATB1, die Verbindungen aufrecht erhalten können

(Review: Misteli, 2010). Aber auch sequentielle Ähnlichkeiten und räumliche Nähe, z.B. der NOR- tragenden Chromosomen oder der Sattelitensequenzen in Clustern von Zentromeren könnten indirekt zu (häufigeren) Assoziation führen (Cope et al., 2010). Nicht zuletzt konstitutives Heterochromatin oder transkriptionell inaktive Bereiche wie fakultatives Heterochromatin könnten durch ihre Lage in der perinukleolären Region (Nemeth et al., 2010) oder an der Lamina (Kind and van Steensel, 2010) zu Interaktionen beitragen. Als Bestätigung gibt es häufigere Assoziationen von aktiven mit aktiven Chromatindomänen bzw. inaktiven mit inaktiven Domänen und eine dementsprechenden Faltung des Chromatins, wie hochauflösende *Chromosome Conformation Capture* (HI-C) Studien zeigten (Lieberman-Aiden et al., 2009). Eine transiente Interaktion von transkribierten Sequenzen findet sich auch in sog. *transcription factories*, einer Ansammlung von RNA Pol II Foci. In Assoziation mit *transcription factories* belegen viele Studien die z. T. transiente Interaktion von Sequenzen (Review: Cope et al., 2010) oder sogar schnelle, gerichtete Bewegungen von Loci (Osborne et al., 2007). Schoenfelder et al. (2010) beschreiben eine Vielzahl von spezifischen Interaktionen, die Globingene in spezialisierten *transcription factories* eingehen.

Nach Brown et al. (2006) könnten auch SC35 Cluster oder Splicing Speckles zu räumlichen Interaktionen beitragen. Solche koregulierten Prozesse müssen jedoch nicht notwendigerweise auf gerichtete Bewegungen zurückzuführen sein, sondern könnten durch eine Kombination von transkriptionellem Status, Diffusion und Interaktionen mit spezifischen Proteinkomplexen hervorgerufen werden.

Ähnlich wie in der Untersuchung von Brown et al. (2006), in der keine Kolokalisationen gefunden wurden, ist auch der prozentuale Anteil von Zellen, in denen *gene kissing*-Phänomene bisher gefunden wurde, meist niedrig und liegt bei ~10- 20% (van Steensel and Dekker, 2010). Beispielsweise stieg die Kolokalisationsrate von MYC und IGH nach 15-minütiger Induktion von B- Zellen von ~6% auf 18% (Osborne et al., 2007). Die überwiegende Mehrheit der Zellen zeigte dieses Phänomen also nicht. Spezifische Interaktionen durch gerichtete Bewegungen zwischen Gen- Loci auf verschiedenen CTs sind demnach wohl eher die Ausnahme. Eine Möglichkeit, wie Sequenzen passiv in räumliche Nähe kommen könnten, bieten komplexe Kernrotationen (Strickfaden et al., 2010). Zurzeit ist allerdings unklar, unter welchen Umständen dieses seltene Phänomen auftritt. Viele Lebendzellstudien belegen nämlich die stabile Aufrechterhaltung der Anordnung während der Interphase (Gerlich et al., 2003; Walter et al., 2003; Cvackova et al., 2009; Strickfaden et al., 2010), was gegen gerichtete Bewegungen im Kern spricht. Auch induzierte Strahlenschäden von Chromatin führen zu keinen großen beobachtbaren Chromatinbewegungen im Kern, etwa

um bei einem DNA Doppelstrangbruch eine intakte homologe Region heranzuführen, sondern die Reparaturfaktoren akkumulieren an der Schadstelle (Kruhlak et al., 2006; Misteli and Soutoglou, 2009; Strickfaden, 2010). In Stammzellen und undifferenzierten Zellen von Maus und *Drosophila* ist das Chromatin jedoch noch sehr mobil und die Mobilität nimmt erst im Laufe der Differenzierung ab (Meshorer et al., 2006; Bhattacharya et al., 2009).

Durch eine Vielzahl an Strukturen im Kern wie Nukleoli, Lamina, *transcription factories*, SC35- Speckles und weiteren Kernkörperchen (*nuclear bodies*) oder durch funktionelle Ähnlichkeiten des Chromatins und dem transkriptionellen Status sind weiträumige gerichtete Bewegungen vielleicht auch gar nicht nötig. Stattdessen können sich Interaktionen zwischen Sequenzen oder ganzen Chromosomen in einem selbstorganisierenden passiven Prozess entwickeln (Misteli and Soutoglou, 2009). Auch die größenabhängige Verteilung von Chromosomen in Zellen (siehe oben) mit einem flachen Kern oder eine eher gendichteabhängige Anordnung in kugeligen Kernen können zu solchen Prozessen beitragen. Passend dazu fanden einige Arbeitsgruppen eine starke Korrelation der gefundenen Translokationshäufigkeiten mit räumlicher Nähe zwischen Chromosomenterritorien (Bickmore and Teague, 2002) oder DNA- Sequenzen (Roix et al., 2003). Es ist nach der derzeitigen Datenlage aber nicht auszuschließen, dass Interaktionen während der Interphase zu einem gewissen Grad die Anordnung während der Prophase beeinflussen und trotz aller stochastischen Einflüsse der Mitose weitervererbt werden (Kosak et al., 2007). Die Verteilungen der Zentromere (siehe 4.4) oder die Ähnlichkeiten von Tochterzellen (siehe 4.5) und die Lage von peripher markierten Domänen nach der Zellteilung (siehe 4.6) zeigen jedenfalls, dass die Positionen von Loci oder Chromosomen nicht determiniert und statisch sind. Auch die Verteilung der NADs (Nemeth et al., 2010; van Koningsbruggen et al., 2010) und unterschiedliche Dekondensationsraten von Schwesterchromatiden (Muller et al., 2010) sprechen für eine zu einem gewissen Grad zufälligen Anordnung mancher Komponenten. Dennoch existieren innerhalb dieser zufälligen Anordnung zelltypspezifische Motive. (M)Eine Modellvorstellung ist, dass nach der Mitose in der frühen G₁-Phase aktive Sequenzen mit bestimmten Strukturen wie *transcription factories*, SC35- Speckles oder anderen Kernstrukturen interagieren und dekondensieren, während inaktive Bereiche an den Nukleoli oder der Lamina befestigt werden und eher kondensiert bleiben. Durch die unterschiedlichen Kondensationsraten und räumlichen Beziehungen mit anderen Chromatindomänen oder Chromosomen könnten so zellspezifische Anordnungen entstehen. Auch die Entstehung von Schleifen mit aktiven Genloci könnte so erklärt werden.

Die Entwicklung der *Chromosome Conformation Capture* Technik (Dekker et al., 2002) und die Weiterentwicklungen dieser Technik haben neue Antworten zu den räumlichen Beziehungen des Chromatins im Kern gegeben. Aber auch die Mikroskopie hat sich in den letzten Jahren enorm weiterentwickelt. Neue fluoreszenzoptische Verfahren ermöglichen eine Auflösung unterhalb des Abbe-Limits der klassischen Lichtmikroskopie. Mit solchen Verfahren können mittlerweile Strukturen im Nanometerbereich dargestellt werden (Review: Schermelleh et al., 2010). Auch die Kombination aus hochauflösender Licht- und Elektronenmikroskopie, die sogenannte korrelative Mikroskopie (Rouquette et al., 2010) kann detailliertere Einblicke in das Zusammenspiel von Strukturen im Kern geben. Die Herausforderung der Zukunft ist es, molekularbiologische und mikroskopische Techniken zusammenzubringen, um das hochkomplexe räumliche und zeitliche Zusammenspiel von Chromatin und anderen Kernstrukturen aufzulösen.

6. Ausblick

Diese Arbeit zeigt, dass trotz massiver Veränderungen der Nachbarschaftsbeziehungen von Chromosomen im Verlauf der Mitose ihre radiale Anordnung jedenfalls in Zellen mit flachen Kernen erhalten bleibt. Des Weiteren zeigten sich an zwei Beispielen die Auswirkungen von transkriptioneller Aktivierung auf die Zellkernarchitektur. Hier soll noch ein Ausblick auf weitere Untersuchungen gegeben werden, die sich aus den hier beschriebenen Ergebnissen ergeben.

Die Untersuchungen zur größenabhängigen Verteilung wurden in Zellen mit einem flachen Kern durchgeführt. Für Zellen mit einem kugeligen Kern ist die Verteilung jedoch von der Gendichte abhängig. In Folgeexperimenten sollten auch Zellen mit kugeligen Kernen wie z.B. Lymphozyten auf den Zusammenhang zwischen Metaphaseanordnung und der Verteilung in der Interphase untersucht werden. Neben 3D- FISH Experimenten wäre es wünschenswert, auch hier Lymphozyten mit pa-GFP H4 zu transfizieren, um Chromatinbewegungen von der Interphase zur Mitose und weiter in die folgende Interphase hinein zu untersuchen.

Für weitere Untersuchungen der Zentromerassoziationen an Nukleolus oder Lamina sollte ein fluoreszenzmarkiertes Lamin integriert werden. Die Verteilung der Zentromere und ihre Assoziationen sollten außerdem in anderen diploiden Zelltypen und anderen Spezies untersucht werden. Bis heute ist die Rolle des perizentromerischen Heterochromatins und seiner Assoziationen bei der Zellkernorganisation nicht klar. Durch Verwendung von Lebendzellmarkern für Nukleoli (Martin et al., 2007) in CENPB- GFP exprimierenden Zellen könnte die Wiederherstellung der Topographie der Zentromere mit den Nukleoli nach der Mitose am zeitlich hochauflösenden Spinning Disc Mikroskop visualisiert werden. In den extrem flachen photoaktivierbaren Kernen der RPE1 Zellen könnte außerdem die perinukleoläre Region durch die Verwendung des Nukleolusmarkers präziser photoaktiviert werden als bei van Koningsbruggen et al. (2010). Dadurch ließe sich nachweisen, ob tatsächlich nach der Mitose Teile des perinukleolären Heterochromatins des Mutterkerns an der Kernhülle der Tochterkerne zu finden sind. Auf diese Weise könnten auch die Bewegungen in der frühen G₁- Phase genauer bestimmt und damit die Verteilung des Heterochromatins beobachtet werden.

Die HSR auf Chromosom 17 der Kellyzellen ist in den Interphasenzellen stark dekondensiert und verteilt sich über den ganzen Kern. In der Erstbeschreibung wurde postuliert, dass sich diese Bereiche im Interchromatinkompartiment befinden (Solovei et al., 2000). Mit Hilfe des OMX- Mikroskops könnte diese Struktur besser aufgelöst werden. Eventuell könnten auch Interaktionen mit RNA- Pol II und Splicing Speckles untersucht werden. Um das

Interchromatinkompartiment sichtbar zu machen, könnten die Zellen hyperkondensiert werden (Albiez et al., 2006).

Im Fall der induzierten replikativen Seneszenz sollten noch weitere Genloci untersucht werden, von denen Transkriptionsdaten zeigen, dass sich die transkriptionelle Aktivität während der Seneszenz stark verändert. Hier könnte man die Lokalisation in Bezug auf die Lamina und den Nukleolus untersuchen. Dies könnte helfen, die Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zwischen der Lamina und den Nukleoli als Orten der Heterochromatinassoziationen zu beleuchten. Des Weiteren gibt es auch andere Faktoren, die Seneszenz auslösen können, z.B. Onkogene. Deswegen könnten die untersuchten Loci in onkogeninduzierten seneszenten Zellen überprüft werden, ob es Unterschiede gibt in der Anordnung in Abhängigkeit vom Auslöser der Seneszenz.

Eine neue Studie von Berchtold et al. (2011) zeigt, dass Monolayer- Zellen eine grundlegend andere Chromatinorganisation als ihre natürlichen Vertreter in Geweben besitzen. Zum Beispiel besitzen die Zellen in Geweben kein oder nur sehr wenig perinukleoläres Heterochromatin. Dementsprechend wäre es wichtig, mit induzierbaren Systemen die Lokalisation von perinukleolären Loci der Monolayer- Zellen in den jeweiligen Zelltypen in natürlichen Geweben zu untersuchen. Die Untersuchung der Zellkernorganisation in kultivierten Zellen ist zwar methodisch wesentlich einfacher, das eigentliche Interesse wird aber langfristig auf Zellen im Gewebeverband liegen. In diesem Zusammenhang wäre auch an Untersuchungen der Zellkernorganisation in 3D- Zellkulturen zu denken.

7. Referenzen

- Abdel-Halim, H.I., Imam, S.A., Badr, F.M., Natarajan, A.T., Mullenders, L.H., and Boei, J.J. (2004). Ionizing radiation-induced instant pairing of heterochromatin of homologous chromosomes in human cells. *Cytogenet Genome Res* *104*, 193-199.
- Abdel-Halim, H.I., Mullenders, L.H., and Boei, J.J. (2006). Pairing of heterochromatin in response to cellular stress. *Exp Cell Res* *312*, 1961-1969.
- Abdel-Halim, H.I., Natarajan, A.T., Mullenders, L.H., and Boei, J.J. (2005). Mitomycin C-induced pairing of heterochromatin reflects initiation of DNA repair and chromatid exchange formation. *J Cell Sci* *118*, 1757-1767.
- Adams, P.D. (2007). Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. *Gene* *397*, 84-93.
- Agrelo, R. (2007). A new molecular model of cellular aging based on Werner syndrome. *Med Hypotheses* *68*, 770-780.
- Alberts, B.J., A; Walter, P; Lewis, J (2008). *Molecular Biology of the Cell*, 5th edn (Taylor & Francis).
- Albiez, H., Cremer, M., Tiberi, C., Vecchio, L., Schermelleh, L., Dittrich, S., Kupper, K., Joffe, B., Thormeyer, T., von Hase, J., *et al.* (2006). Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome Res* *14*, 707-733.
- Alexandrova, O., Solovei, I., Cremer, T., and David, C.N. (2003). Replication labeling patterns and chromosome territories typical of mammalian nuclei are conserved in the early metazoan Hydra. *Chromosoma* *112*, 190-200.
- Allison, D.C., and Nestor, A.L. (1999). Evidence for a relatively random array of human chromosomes on the mitotic ring. *J Cell Biol* *145*, 1-14.
- Arnoldus, E.P., Peters, A.C., Bots, G.T., Raap, A.K., and van der Ploeg, M. (1989). Somatic pairing of chromosome 1 centromeres in interphase nuclei of human cerebellum. *Hum Genet* *83*, 231-234.
- Bandyopadhyay, D., Gatza, C., Donehower, L.A., and Medrano, E.E. (2005). Analysis of cellular senescence in culture in vivo: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 18*, Unit 18 19.
- Belmont, A.S. (2010). Estrogen fueled, nuclear kiss: Did it move for you? *Nucleus* *1*, 440-443.
- Bemiller, P.M., and Lee, L.H. (1978). Nucleolar changes in senescing WI-38 cells. *Mech Ageing Dev* *8*, 417-427.
- Berchtold, D., Fesser, S., Bachmann, G., Kaiser, A., Eilert, J.C., Frohns, F., Sadoni, N., Muck, J., Kremmer, E., Eick, D., *et al.* (2011). Nuclei of chicken neurons in tissues and three-dimensional cell cultures are organized into distinct radial zones. *Chromosome Res*.
- Berezney, R., Dubey, D.D., and Huberman, J.A. (2000). Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma* *108*, 471-484.
- Bhattacharya, D., Talwar, S., Mazumder, A., and Shivashankar, G.V. (2009). Spatio-temporal plasticity in chromatin organization in mouse cell differentiation and during *Drosophila* embryogenesis. *Biophys J* *96*, 3832-3839.
- Bickmore, W.A., and Teague, P. (2002). Influences of chromosome size, gene density and nuclear position on the frequency of constitutional translocations in the human population. *Chromosome Res* *10*, 707-715.
- Biener, D. (2005). Die räumliche Anordnung subchromosomaler Bereiche mit unterschiedlicher Gendichte im Interphasezellkern. In Fakultät für Medizin (München, LMU).

- Blobel, G. (1985). Gene gating: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8527-8529.
- Bolland, D.J., Wood, A.L., and Corcoran, A.E. (2009). Large-scale chromatin remodeling at the immunoglobulin heavy chain locus: a paradigm for multigene regulation. *Adv Exp Med Biol* 650, 59-72.
- Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Muller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M.R., *et al.* (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* 3, e157.
- Bornfleth, H., Edelmann, P., Zink, D., Cremer, T., and Cremer, C. (1999). Quantitative motion analysis of subchromosomal foci in living cells using four-dimensional microscopy. *Biophys J* 77, 2871-2886.
- Boveri, T. (1909). Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch Zellforsch* 3, 181-268.
- Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J.M., Mahy, N.L., Ellis, J.A., and Bickmore, W.A. (2001). The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet* 10, 211-219.
- Branco, M.R., and Pombo, A. (2006). Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol* 4, e138.
- Branco, M.R., and Pombo, A. (2007). Chromosome organization: new facts, new models. *Trends Cell Biol* 17, 127-134.
- Bridger, J.M., Boyle, S., Kill, I.R., and Bickmore, W.A. (2000). Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Curr Biol* 10, 149-152.
- Brown, J.M., Leach, J., Reittie, J.E., Atzberger, A., Lee-Prudhoe, J., Wood, W.G., Higgs, D.R., Iborra, F.J., and Buckle, V.J. (2006). Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active. *J Cell Biol* 172, 177-187.
- Carvalho, C., Pereira, H.M., Ferreira, J., Pina, C., Mendonca, D., Rosa, A.C., and Carmo-Fonseca, M. (2001). Chromosomal G-dark bands determine the spatial organization of centromeric heterochromatin in the nucleus. *Mol Biol Cell* 12, 3563-3572.
- Cavalli, G. (2007). Chromosome kissing. *Curr Opin Genet Dev* 17, 443-450.
- Chaly, N., and Brown, D.L. (1988). The prometaphase configuration and chromosome order in early mitosis. *J Cell Sci* 91 (Pt 3), 325-335.
- Chambeyron, S., and Bickmore, W.A. (2004). Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the *HoxB* locus upon induction of transcription. *Genes Dev* 18, 1119-1130.
- Chuang, C.H., and Belmont, A.S. (2007). Moving chromatin within the interphase nucleus-controlled transitions? *Semin Cell Dev Biol* 18, 698-706.
- Chuang, C.H., Carpenter, A.E., Fuchsova, B., Johnson, T., de Lanerolle, P., and Belmont, A.S. (2006). Long-range directional movement of an interphase chromosome site. *Curr Biol* 16, 825-831.
- Chubb, J.R., and Bickmore, W.A. (2003). Considering nuclear compartmentalization in the light of nuclear dynamics. *Cell* 112, 403-406.
- Chubb, J.R., Boyle, S., Perry, P., and Bickmore, W.A. (2002). Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Curr Biol* 12, 439-445.
- Colombo, E., Marine, J.C., Danovi, D., Falini, B., and Pelicci, P.G. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4, 529-533.
- Comings, D.E. (1980). Arrangement of chromatin in the nucleus. *Hum Genet* 53, 131-143.
- Cope, N.F., Fraser, P., and Eskiw, C.H. (2010). The yin and yang of chromatin spatial organization. *Genome Biol* 11, 204.
- Cornforth, M.N., Greulich-Bode, K.M., Loucas, B.D., Arsuaga, J., Vazquez, M., Sachs, R.K., Bruckner, M., Molls, M., Hahnfeldt, P., Hlatky, L., *et al.* (2002).

- Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells. *J Cell Biol* 159, 237-244.
- Cremer, M., Grasser, F., Lanctot, C., Muller, S., Neusser, M., Zinner, R., Solovei, I., and Cremer, T. (2008). Multicolor 3D Fluorescence In Situ Hybridization for Imaging Interphase Chromosomes. *Methods Mol Biol* 463, 205-239.
- Cremer, M., von Hase, J., Volm, T., Brero, A., Kreth, G., Walter, J., Fischer, C., Solovei, I., Cremer, C., and Cremer, T. (2001). Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res* 9, 541-567.
- Cremer, T., and Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2, 292-301.
- Cremer, T., and Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003889.
- Cremer, T., and Zakhartchenko, V. (2011). Nuclear architecture in developmental biology and cell specialisation. *Reprod Fertil Dev* 23, 94-106.
- Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P., and Bickmore, W.A. (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* 145, 1119-1131.
- Cvackova, Z., Masata, M., Stanek, D., Fidlerova, H., and Raska, I. (2009). Chromatin position in human HepG2 cells: although being non-random, significantly changed in daughter cells. *J Struct Biol* 165, 107-117.
- Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L., and Lasken, R.S. (2001). Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* 11, 1095-1099.
- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., and Kleckner, N. (2002). Capturing chromosome conformation. *Science* 295, 1306-1311.
- Deng, W., Tsao, S.W., Lucas, J.N., Leung, C.S., and Cheung, A.L. (2003). A new method for improving metaphase chromosome spreading. *Cytometry A* 51, 46-51.
- Dexter, D.L., Barbosa, J.A., and Calabresi, P. (1979). N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 39, 1020-1025.
- Dietzel, S., Jauch, A., Kienle, D., Qu, G., Holtgreve-Grez, H., Eils, R., Munkel, C., Bittner, M., Meltzer, P.S., Trent, J.M., *et al.* (1998). Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei. *Chromosome Res* 6, 25-33.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., *et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-9367.
- Dostie, J., and Dekker, J. (2007). Mapping networks of physical interactions between genomic elements using 5C technology. *Nat Protoc* 2, 988-1002.
- Edelmann, P., Bornfleth, H., Zink, D., Cremer, T., and Cremer, C. (2001). Morphology and dynamics of chromosome territories in living cells. *Biochim Biophys Acta* 1551, M29-39.
- Endoh, M., Kobayashi, Y., Yamakami, Y., Yonekura, R., Fujii, M., and Ayusawa, D. (2009). Coordinate expression of the human pregnancy-specific glycoprotein gene family during induced and replicative senescence. *Biogerontology* 10, 213-221.
- Essers, J., van Cappellen, W.A., Theil, A.F., van Drunen, E., Jaspers, N.G., Hoeijmakers, J.H., Wyman, C., Vermeulen, W., and Kanaar, R. (2005). Dynamics of relative chromosome position during the cell cycle. *Mol Biol Cell* 16, 769-775.
- Fedorova, E., and Zink, D. (2009). Nuclear genome organization: common themes and individual patterns. *Curr Opin Genet Dev* 19, 166-171.

- Ferguson, M., and Ward, D.C. (1992). Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei. *Chromosoma* 101, 557-565.
- Ferreira, J., and Carmo-Fonseca, M. (1997). Genome replication in early mouse embryos follows a defined temporal and spatial order. *J Cell Sci* 110 (Pt 7), 889-897.
- Finlan, L.E., Sproul, D., Thomson, I., Boyle, S., Kerr, E., Perry, P., Ylstra, B., Chubb, J.R., and Bickmore, W.A. (2008). Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet* 4, e1000039.
- Fix, A., Lucchesi, C., Ribeiro, A., Lequin, D., Pierron, G., Schleiermacher, G., Delattre, O., and Janoueix-Lerosey, I. (2008). Characterization of amplicons in neuroblastoma: high-resolution mapping using DNA microarrays, relationship with outcome, and identification of overexpressed genes. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 819-834.
- Fletcher, H.L. (1994). The radial positions of metaphase chromosomes may be a consequence of the relative strength of their interaction with the spindle and their size. *Chromosome Res* 2, 21-24.
- Fraser, P., and Bickmore, W. (2007). Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447, 413-417.
- Funayama, R., and Ishikawa, F. (2007). Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* 116, 431-440.
- Funayama, R., Saito, M., Tanobe, H., and Ishikawa, F. (2006). Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol* 175, 869-880.
- Gerlich, D., Beaudouin, J., Kalbfuss, B., Daigle, N., Eils, R., and Ellenberg, J. (2003). Global chromosome positions are transmitted through mitosis in mammalian cells. *Cell* 112, 751-764.
- Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N.P., and Bickmore, W.A. (2004). Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* 118, 555-566.
- Gilchrist, S., Gilbert, N., Perry, P., and Bickmore, W.A. (2004). Nuclear organization of centromeric domains is not perturbed by inhibition of histone deacetylases. *Chromosome Res* 12, 505-516.
- Gondor, A., and Ohlsson, R. (2009). Chromosome crosstalk in three dimensions. *Nature* 461, 212-217.
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W., *et al.* (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 453, 948-951.
- Habermann, F.A., Cremer, M., Walter, J., Kreth, G., von Hase, J., Bauer, K., Wienberg, J., Cremer, C., Cremer, T., and Solovei, I. (2001). Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells. *Chromosome Res* 9, 569-584.
- Handwerger, K.E., and Gall, J.G. (2006). Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol* 16, 19-26.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300.
- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37, 614-636.
- Heride, C., Ricoul, M., Kieu, K., von Hase, J., Guillemot, V., Cremer, C., Dubrana, K., and Sabatier, L. (2010). Distance between homologous chromosomes results from chromosome positioning constraints. *J Cell Sci* 123, 4063-4075.
- Hu, Q., Kwon, Y.S., Nunez, E., Cardamone, M.D., Hutt, K.R., Ohgi, K.A., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., *et al.* (2008). Enhancing

- nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 19199-19204.
- Illner, D., Zinner, R., Handtke, V., Rouquette, J., Strickfaden, H., Lanctot, C., Conrad, M., Seiler, A., Imhof, A., Cremer, T., *et al.* (2010). Remodeling of nuclear architecture by the thiodioxopiperazine metabolite chaetocin. *Exp Cell Res* *316*, 1662-1680.
- Itoh, N., and Shimizu, N. (1998). DNA replication-dependent intranuclear relocation of double minute chromatin. *J Cell Sci* *111* (Pt 22), 3275-3285.
- Jakobsson, A.H., Wettergren, Y., and Haaf, T. (1989). Chromatin bodies in multidrug resistant hybrid cells have centromeres and originate from homogeneously staining regions. *Anticancer Res* *9*, 267-271.
- Jaunin, F., Visser, A.E., Cmarko, D., Aten, J.A., and Fakan, S. (2000). Fine structural in situ analysis of nascent DNA movement following DNA replication. *Exp Cell Res* *260*, 313-323.
- Kalmarova, M., Smirnov, E., Masata, M., Koberna, K., Ligasova, A., Popov, A., and Raska, I. (2007). Positioning of NORs and NOR-bearing chromosomes in relation to nucleoli. *J Struct Biol* *160*, 49-56.
- Kalverda, B., Pickersgill, H., Shloma, V.V., and Fornerod, M. (2010). Nucleoporins directly stimulate expression of developmental and cell-cycle genes inside the nucleoplasm. *Cell* *140*, 360-371.
- Kim, S.H., McQueen, P.G., Lichtman, M.K., Shevach, E.M., Parada, L.A., and Misteli, T. (2004). Spatial genome organization during T-cell differentiation. *Cytogenet Genome Res* *105*, 292-301.
- Kind, J., and van Steensel, B. (2010). Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation. *Curr Opin Cell Biol* *22*, 320-325.
- Klein, C., Cheutin, T., O'Donohue, M.F., Rothblum, L., Kaplan, H., Beorchia, A., Lucas, L., Heliot, L., and Ploton, D. (1998). The three-dimensional study of chromosomes and upstream binding factor-immunolabeled nucleolar organizer regions demonstrates their nonrandom spatial arrangement during mitosis. *Mol Biol Cell* *9*, 3147-3159.
- Kocanova, S., Kerr, E.A., Rafique, S., Boyle, S., Katz, E., Caze-Subra, S., Bickmore, W.A., and Bystricky, K. (2010). Activation of estrogen-responsive genes does not require their nuclear co-localization. *PLoS Genet* *6*, e1000922.
- Koehler, D. (2008). Cloning in Cattle: Nuclear architecture and epigenetic status of chromatin during reprogramming of donor cell nuclei. In Fakultät für Biologie (München, LMU).
- Koehler, D., Zakhartchenko, V., Froenicke, L., Stone, G., Stanyon, R., Wolf, E., Cremer, T., and Brero, A. (2009). Changes of higher order chromatin arrangements during major genome activation in bovine preimplantation embryos. *Exp Cell Res* *315*, 2053-2063.
- Kosak, S.T., and Groudine, M. (2004). Form follows function: The genomic organization of cellular differentiation. *Genes Dev* *18*, 1371-1384.
- Kosak, S.T., Scalzo, D., Alworth, S.V., Li, F., Palmer, S., Enver, T., Lee, J.S., and Groudine, M. (2007). Coordinate gene regulation during hematopoiesis is related to genomic organization. *PLoS Biol* *5*, e309.
- Kruhlak, M.J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Muller, W.G., McNally, J.G., Bazett-Jones, D.P., and Nussenzweig, A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* *172*, 823-834.
- Kugoh, H., Mitsuya, K., Meguro, M., Shigenami, K., Schulz, T.C., and Oshimura, M. (1999). Mouse A9 cells containing single human chromosomes for analysis of genomic imprinting. *DNA Res* *6*, 165-172.
- Kumaran, R.I., and Spector, D.L. (2008). A genetic locus targeted to the nuclear periphery in living cells maintains its transcriptional competence. *J Cell Biol* *180*, 51-65.

- Kumaran, R.I., Thakar, R., and Spector, D.L. (2008). Chromatin dynamics and gene positioning. *Cell* 132, 929-934.
- Küpper, K. (2007). 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. In Inst für Anthropologie und Humangenetik (München, LMU).
- Kupper, K., Kolbl, A., Biener, D., Dittrich, S., von Hase, J., Thormeyer, T., Fiegler, H., Carter, N.P., Speicher, M.R., Cremer, T., *et al.* (2007). Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma* 116, 285-306.
- Lamond, A.I., and Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 605-612.
- Lanctot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G., and Cremer, T. (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* 8, 104-115.
- LaSalle, J.M., and Lalande, M. (1996). Homologous association of oppositely imprinted chromosomal domains. *Science* 272, 725-728.
- Leitch, A.R., Brown, J.K., Mosgoller, W., Schwarzacher, T., and Heslop-Harrison, J.S. (1994). The spatial localization of homologous chromosomes in human fibroblasts at mitosis. *Hum Genet* 93, 275-280.
- Levan, A., and Levan, G. (1978). Have double minutes functioning centromeres? *Hereditas* 88, 81-92.
- Levi, V., Ruan, Q., Plutz, M., Belmont, A.S., and Gratton, E. (2005). Chromatin dynamics in interphase cells revealed by tracking in a two-photon excitation microscope. *Biophys J* 89, 4275-4285.
- Lezhava, T. (2001). Chromosome and aging: genetic conception of aging. *Biogerontology* 2, 253-260.
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragozy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., *et al.* (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289-293.
- Liebhart, I. (2009). Radiale Verteilung von Minichromosomen und eines durch Amplifikation vergrößerten Chromosoms in Interphasen und Metaphasen. In Inst für Anthropologie und Humangenetik (München, LMU).
- Lomvardas, S., Barnea, G., Pisapia, D.J., Mendelsohn, M., Kirkland, J., and Axel, R. (2006). Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell* 126, 403-413.
- MacDonald, D.J., Scott, J.M., Gemmell, R.S., and Mack, D.S. (1983). A prospective study of three biochemical fetoplacental tests: serum human placental lactogen, pregnancy-specific beta 1-glycoprotein, and urinary estrogens, and their relationship to placental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol* 147, 430-436.
- Mahy, N.L., Perry, P.E., and Bickmore, W.A. (2002a). Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. *J Cell Biol* 159, 753-763.
- Mahy, N.L., Perry, P.E., Gilchrist, S., Baldock, R.A., and Bickmore, W.A. (2002b). Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. *J Cell Biol* 157, 579-589.
- Manders, E.M., Visser, A.E., Koppen, A., de Leeuw, W.C., van Liere, R., Brakenhoff, G.J., and van Driel, R. (2003). Four-dimensional imaging of chromatin dynamics during the assembly of the interphase nucleus. *Chromosome Res* 11, 537-547.

- Manuelidis, L. (1985). Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Hum Genet* *71*, 288-293.
- Markaki, Y., Gunkel, M., Schermelleh, L., Beichmanis, S., Neumann, J., Heidemann, M., Leonhardt, H., Eick, D., Cremer, C., and Cremer, T. (2011). Functional Nuclear Organization of Transcription and DNA Replication: A Topographical Marriage between Chromatin Domains and the Interchromatin Compartment. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.
- Marshall, W.F., Straight, A., Marko, J.F., Swedlow, J., Dernburg, A., Belmont, A., Murray, A.W., Agard, D.A., and Sedat, J.W. (1997). Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells. *Curr Biol* *7*, 930-939.
- Martin, R.M., Tunnemann, G., Leonhardt, H., and Cardoso, M.C. (2007). Nucleolar marker for living cells. *Histochem Cell Biol* *127*, 243-251.
- Martou, G., and De Boni, U. (2000). Nuclear topology of murine, cerebellar Purkinje neurons: changes as a function of development. *Exp Cell Res* *256*, 131-139.
- Mayer, R., Brero, A., von Hase, J., Schroeder, T., Cremer, T., and Dietzel, S. (2005). Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse. *BMC Cell Biol* *6*, 44.
- Mayr, C., Jasencakova, Z., Meister, A., Schubert, I., and Zink, D. (2003). Comparative analysis of the functional genome architecture of animal and plant cell nuclei. *Chromosome Res* *11*, 471-484.
- Meaburn, K.J., Misteli, T., and Soutoglou, E. (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* *17*, 80-90.
- Meaburn, K.J., Newbold, R.F., and Bridger, J.M. (2008). Positioning of human chromosomes in murine cell hybrids according to synteny. *Chromosoma* *117*, 579-591.
- Mehta, I.S., Amira, M., Harvey, A.J., and Bridger, J.M. (2010). Rapid chromosome territory relocation by nuclear motor activity in response to serum removal in primary human fibroblasts. *Genome Biol* *11*, R5.
- Mehta, I.S., Elcock, L.S., Amira, M., Kill, I.R., and Bridger, J.M. (2008). Nuclear motors and nuclear structures containing A-type lamins and emerin: is there a functional link? *Biochem Soc Trans* *36*, 1384-1388.
- Mehta, I.S., Figgitt, M., Clements, C.S., Kill, I.R., and Bridger, J.M. (2007). Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells. *Ann N Y Acad Sci* *1100*, 250-263.
- Meshorer, E., Yellajoshula, D., George, E., Scambler, P.J., Brown, D.T., and Misteli, T. (2006). Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell* *10*, 105-116.
- Michishita, E., Nakabayashi, K., Suzuki, T., Kaul, S.C., Ogino, H., Fujii, M., Mitsui, Y., and Ayusawa, D. (1999). 5-Bromodeoxyuridine induces senescence-like phenomena in mammalian cells regardless of cell type or species. *J Biochem* *126*, 1052-1059.
- Minagawa, S., Nakabayashi, K., Fujii, M., Scherer, S.W., and Ayusawa, D. (2004). Functional and chromosomal clustering of genes responsive to 5-bromodeoxyuridine in human cells. *Exp Gerontol* *39*, 1069-1078.
- Misteli, T. (2007). Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* *128*, 787-800.
- Misteli, T. (2008). Cell biology: Nuclear order out of chaos. *Nature* *456*, 333-334.
- Misteli, T. (2010). Higher-order genome organization in human disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a000794.
- Misteli, T., and Soutoglou, E. (2009). The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 243-254.

- Mitsui, Y., and Schneider, E.L. (1976). Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures. *Exp Cell Res* 100, 147-152.
- Mora, L., Sanchez, I., Garcia, M., and Ponsa, M. (2006). Chromosome territory positioning of conserved homologous chromosomes in different primate species. *Chromosoma* 115, 367-375.
- Morey, C., Kress, C., and Bickmore, W.A. (2009). Lack of bystander activation shows that localization exterior to chromosome territories is not sufficient to up-regulate gene expression. *Genome Res* 19, 1184-1194.
- Mosgoller, W., Leitch, A.R., Brown, J.K., and Heslop-Harrison, J.S. (1991). Chromosome arrangements in human fibroblasts at mitosis. *Hum Genet* 88, 27-33.
- Muller, I., Boyle, S., Singer, R.H., Bickmore, W.A., and Chubb, J.R. (2010). Stable morphology, but dynamic internal reorganisation, of interphase human chromosomes in living cells. *PLoS One* 5, e11560.
- Nagele, R., Freeman, T., McMorro, L., and Lee, H.Y. (1995). Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order. *Science* 270, 1831-1835.
- Nagele, R.G., Freeman, T., Fazekas, J., Lee, K.M., Thomson, Z., and Lee, H.Y. (1998). Chromosome spatial order in human cells: evidence for early origin and faithful propagation. *Chromosoma* 107, 330-338.
- Nagele, R.G., Freeman, T., McMorro, L., Thomson, Z., Kitson-Wind, K., and Lee, H. (1999). Chromosomes exhibit preferential positioning in nuclei of quiescent human cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 4), 525-535.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.
- Nemeth, A., Conesa, A., Santoyo-Lopez, J., Medina, I., Montaner, D., Peterfia, B., Solovei, I., Cremer, T., Dopazo, J., and Langst, G. (2010). Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS Genet* 6, e1000889.
- Neusser, M., Schubel, V., Koch, A., Cremer, T., and Muller, S. (2007). Evolutionarily conserved, cell type and species-specific higher order chromatin arrangements in interphase nuclei of primates. *Chromosoma* 116, 307-320.
- Nichols, W.W., Murphy, D.G., Cristofalo, V.J., Toji, L.H., Greene, A.E., and Dwight, S.A. (1977). Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* 196, 60-63.
- Noordermeer, D., Branco, M.R., Splinter, E., Klous, P., van Ijcken, W., Swagemakers, S., Koutsourakis, M., van der Spek, P., Pombo, A., and de Laat, W. (2008). Transcription and chromatin organization of a housekeeping gene cluster containing an integrated beta-globin locus control region. *PLoS Genet* 4, e1000016.
- Nunez, E., Kwon, Y.S., Hutt, K.R., Hu, Q., Cardamone, M.D., Ohgi, K.A., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., *et al.* (2008). Nuclear receptor-enhanced transcription requires motor- and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Cell* 132, 996-1010.
- O'Keefe, R.T., Henderson, S.C., and Spector, D.L. (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, 1095-1110.
- O'Neill, S., Ekstrom, L., Lastowska, M., Roberts, P., Brodeur, G.M., Kees, U.R., Schwab, M., and Bown, N. (2001). MYCN amplification and 17q in neuroblastoma: evidence for structural association. *Genes Chromosomes Cancer* 30, 87-90.
- Osborne, C.S., Chakalova, L., Mitchell, J.A., Horton, A., Wood, A.L., Bolland, D.J., Corcoran, A.E., and Fraser, P. (2007). Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol* 5, e192.

- Parada, L.A., Sotiriou, S., and Misteli, T. (2004). Spatial genome organization. *Exp Cell Res* 296, 64-70.
- Pawlowski, W.P. (2010). Chromosome organization and dynamics in plants. *Curr Opin Plant Biol*.
- Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S.W., Solovei, I., Brugman, W., Graf, S., Flicek, P., Kerkhoven, R.M., van Lohuizen, M., *et al.* (2010). Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Mol Cell* 38, 603-613.
- Postberg, J., Alexandrova, O., Cremer, T., and Lipps, H.J. (2005). Exploiting nuclear duality of ciliates to analyse topological requirements for DNA replication and transcription. *J Cell Sci* 118, 3973-3983.
- Rabl, C. (1885). Über Zelltheilung. In *Morphologisches Jahrbuch* (C. Gegenbaur), pp. 214-330.
- Radulovic, E. (2010). Untersuchung auf Veränderung der Östrogeninduzierbaren Gene TFF1 und GREB1. In Fakultät für Biologie (München, LMU).
- Ragoczy, T., Bender, M.A., Telling, A., Byron, R., and Groudine, M. (2006). The locus control region is required for association of the murine beta-globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation. *Genes Dev* 20, 1447-1457.
- Ragoczy, T., Telling, A., Sawado, T., Groudine, M., and Kosak, S.T. (2003). A genetic analysis of chromosome territory looping: diverse roles for distal regulatory elements. *Chromosome Res* 11, 513-525.
- Reddel, R.R. (2010). Senescence: an antiviral defense that is tumor suppressive? *Carcinogenesis* 31, 19-26.
- Reddy, K.L., Zullo, J.M., Bertolino, E., and Singh, H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 452, 243-247.
- Roix, J.J., McQueen, P.G., Munson, P.J., Parada, L.A., and Misteli, T. (2003). Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet* 34, 287-291.
- Romanov, S.R., Kozakiewicz, B.K., Holst, C.R., Stampfer, M.R., Haupt, L.M., and Tlsty, T.D. (2001). Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* 409, 633-637.
- Rouquette, J., Cremer, C., Cremer, T., and Fakan, S. (2010). Functional Nuclear Architecture Studied by Microscopy: Present and Future. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, W.J. Kwang, ed. (Academic Press), pp. 1-90.
- Rouquette, J., Genoud, C., Vazquez-Nin, G.H., Kraus, B., Cremer, T., and Fakan, S. (2009). Revealing the high-resolution three-dimensional network of chromatin and interchromatin space: a novel electron-microscopic approach to reconstructing nuclear architecture. *Chromosome Res* 17, 801-810.
- Ruthensteiner, B., and Hess, M. (2008). Embedding 3D models of biological specimens in PDF publications. *Microsc Res Tech* 71, 778-786.
- Sadoni, N., and Zink, D. (2004). Nascent RNA synthesis in the context of chromatin architecture. *Chromosome Res* 12, 439-451.
- Saez-Vasquez, J., and Gadai, O. (2010). Genome organization and function: a view from yeast and Arabidopsis. *Mol Plant* 3, 678-690.
- Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010). A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 190, 165-175.
- Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., *et al.* (2010). Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat Genet* 42, 53-61.

- Schwab, M., Ellison, J., Busch, M., Rosenau, W., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1984). Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 4940-4944.
- Sengupta, K., Camps, J., Mathews, P., Barenboim-Stapleton, L., Nguyen, Q.T., Difilippantonio, M.J., and Ried, T. (2008). Position of human chromosomes is conserved in mouse nuclei indicating a species-independent mechanism for maintaining genome organization. *Chromosoma* *117*, 499-509.
- Shimizu, N. (2009). Extrachromosomal double minutes and chromosomal homogeneously staining regions as probes for chromosome research. *Cytogenet Genome Res* *124*, 312-326.
- Smirnov, E., Kalmarova, M., Koberna, K., Zemanova, Z., Malinsky, J., Masata, M., Cvackova, Z., Michalova, K., and Raska, I. (2006). NORs and their transcription competence during the cell cycle. *Folia Biol (Praha)* *52*, 59-70.
- Solimando, L., Luijsterburg, M.S., Vecchio, L., Vermeulen, W., van Driel, R., and Fakan, S. (2009). Spatial organization of nucleotide excision repair proteins after UV-induced DNA damage in the human cell nucleus. *J Cell Sci* *122*, 83-91.
- Solovei, I., Grandi, N., Knoth, R., Volk, B., and Cremer, T. (2004a). Positional changes of pericentromeric heterochromatin and nucleoli in postmitotic Purkinje cells during murine cerebellum development. *Cytogenetic and Genome Research* *105*, 302-310.
- Solovei, I., Kienle, D., Little, G., Eils, R., Savelyeva, L., Schwab, M., Jager, W., Cremer, C., and Cremer, T. (2000). Topology of double minutes (dmns) and homogeneously staining regions (HSRs) in nuclei of human neuroblastoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* *29*, 297-308.
- Solovei, I., Kreysing, M., Lanctot, C., Kosem, S., Peichl, L., Cremer, T., Guck, J., and Joffe, B. (2009). Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* *137*, 356-368.
- Solovei, I., Schermelleh, L., During, K., Engelhardt, A., Stein, S., Cremer, C., and Cremer, T. (2004b). Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. *Chromosoma* *112*, 410-423.
- Solovei, I., Schermelleh, L., Albiez, H., Cremer, T. (2005). Detection of Cell Cycle Stages In Situ in Growing Cell Populations. In *Cell Biology- A Laboratory Handbook*, J.E. Celis, ed. (Burlington, Elsevier Academic Press), pp. 291-299.
- Spilianakis, C.G., Lalioti, M.D., Town, T., Lee, G.R., and Flavell, R.A. (2005). Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* *435*, 637-645.
- Strickfaden, H. (2010). Nuclear architecture explored by live-cell fluorescence microscopy using laser and ion microbeam irradiation. In *Department II (Martinsried, LMU München)*.
- Strickfaden, H., Zunhammer, A., van Koningsbruggen, S., Kohler, D., and Cremer, T. (2010). 4D chromatin dynamics in cycling cells: Theodor Boveri's hypotheses revisited. *Nucleus* *1*, 284-297.
- Sullivan, G.J., Bridger, J.M., Cuthbert, A.P., Newbold, R.F., Bickmore, W.A., and McStay, B. (2001). Human acrocentric chromosomes with transcriptionally silent nucleolar organizer regions associate with nucleoli. *EMBO J* *20*, 2867-2874.
- Sun, H.B., Shen, J., and Yokota, H. (2000). Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys J* *79*, 184-190.
- Takizawa, T., Gudla, P.R., Guo, L., Lockett, S., and Misteli, T. (2008). Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP. *Genes Dev* *22*, 489-498.
- Tamsen, L., Axelsson, O., and Johansson, S.G. (1983). Serum levels of pregnancy-specific beta 1-glycoprotein (SP1) in women with pregnancies at risk. *Gynecol Obstet Invest* *16*, 253-260.

- Tanabe, H., Kupper, K., Ishida, T., Neusser, M., and Mizusawa, H. (2005). Inter- and intra-specific gene-density-correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. *Cytogenet Genome Res* *108*, 255-261.
- Tanabe, H., Muller, S., Neusser, M., von Hase, J., Calcagno, E., Cremer, M., Solovei, I., Cremer, C., and Cremer, T. (2002). Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 4424-4429.
- Telenius, H., Carter, N.P., Bebb, C.E., Nordenskjold, M., Ponder, B.A., and Tunnacliffe, A. (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* *13*, 718-725.
- Teller, K., Solovei, I., Buiting, K., Horsthemke, B., and Cremer, T. (2007). Maintenance of imprinting and nuclear architecture in cycling cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 14970-14975.
- Thiry, M. (1995). The interchromatin granules. *Histol Histopathol* *10*, 1035-1045.
- Thomson, I., Gilchrist, S., Bickmore, W.A., and Chubb, J.R. (2004). The radial positioning of chromatin is not inherited through mitosis but is established de novo in early G1. *Curr Biol* *14*, 166-172.
- Thormeyer, T. (2005). Untersuchungen zur Lokalisation der nukleären Matrix in Zellkernen nach induzierter Chromatinkondensation. In Inst für Anthropologie und Humangenetik (München, LMU).
- Tolhuis, B., Palstra, R.J., Splinter, E., Grosveld, F., and de Laat, W. (2002). Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell* *10*, 1453-1465.
- Tsuduki, T., Nakano, M., Yasuoka, N., Yamazaki, S., Okada, T., Okamoto, Y., and Masumoto, H. (2006). An artificially constructed de novo human chromosome behaves almost identically to its natural counterpart during metaphase and anaphase in living cells. *Mol Cell Biol* *26*, 7682-7695.
- van Koningsbruggen, S., Gierlinski, M., Schofield, P., Martin, D., Barton, G.J., Ariyurek, Y., den Dunnen, J.T., and Lamond, A.I. (2010). High-resolution whole-genome sequencing reveals that specific chromatin domains from most human chromosomes associate with nucleoli. *Mol Biol Cell* *21*, 3735-3748.
- van Steensel, B., and Dekker, J. (2010). Genomics tools for unraveling chromosome architecture. *Nat Biotechnol* *28*, 1089-1095.
- Vermeesch, J.R., Duhamel, H., Petit, P., Falzetti, D., Fryns, J.P., and Marynen, P. (1999). Multiple small accessory marker chromosomes from different centromeric origin in a moderately mentally retarded male. *Hum Genet* *105*, 611-618.
- Visser, A.E., Jaunin, F., Fakan, S., and Aten, J.A. (2000). High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J Cell Sci* *113* (Pt 14), 2585-2593.
- Voet, T., Schoenmakers, E., Carpentier, S., Labaere, C., and Marynen, P. (2003). Controlled transgene dosage and PAC-mediated transgenesis in mice using a chromosomal vector. *Genomics* *82*, 596-605.
- Voet, T., Vermeesch, J., Carens, A., Durr, J., Labaere, C., Duhamel, H., David, G., and Marynen, P. (2001). Efficient male and female germline transmission of a human chromosomal vector in mice. *Genome Res* *11*, 124-136.
- Vogel, M.J., Peric-Hupkes, D., and van Steensel, B. (2007). Detection of in vivo protein-DNA interactions using DamID in mammalian cells. *Nat Protoc* *2*, 1467-1478.
- Volpi, E.V., Chevret, E., Jones, T., Vatcheva, R., Williamson, J., Beck, S., Campbell, R.D., Goldsworthy, M., Powis, S.H., Ragoussis, J., *et al.* (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), 1565-1576.

- Walter, J., Schermelleh, L., Cremer, M., Tashiro, S., and Cremer, T. (2003). Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages. *J Cell Biol* 160, 685-697.
- Weierich, C., Brero, A., Stein, S., von Hase, J., Cremer, C., Cremer, T., and Solovei, I. (2003). Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. *Chromosome Res* 11, 485-502.
- Weißer, G. (2005). Räumliche Verteilung von Zentromeren in Zellkernen differenzierter humaner Gewebe. In Fakultät für Biologie (Tübingen, Eberhard Karls Universität).
- Williams, A., Spilianakis, C.G., and Flavell, R.A. (2010). Interchromosomal association and gene regulation in trans. *Trends Genet* 26, 188-197.
- Wsierska-Gadek, J., and Horvath, M. (2003). How the nucleolar sequestration of p53 protein or its interplayers contributes to its (re)-activation. *Ann N Y Acad Sci* 1010, 266-272.
- Wurz, H., Geiger, W., Kunzig, H.J., Jabs-Lehmann, A., Bohn, H., and Luben, G. (1981). Radioimmunoassay of SP1 (pregnancy-specific beta1-glycoprotein) in maternal blood and in amniotic fluid normal and pathologic pregnancies. *J Perinat Med* 9, 67-78.
- Zeitz, M.J., Mukherjee, L., Bhattacharya, S., Xu, J., and Berezney, R. (2009). A probabilistic model for the arrangement of a subset of human chromosome territories in WI38 human fibroblasts. *J Cell Physiol* 221, 120-129.
- Zhang, R., Chen, W., and Adams, P.D. (2007). Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* 27, 2343-2358.
- Zirbel, R.M., Mathieu, U.R., Kurz, A., Cremer, T., and Lichter, P. (1993). Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res* 1, 93-106.
- Zorn, C., Cremer, C., Cremer, T., and Zimmer, J. (1979). Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. *Exp Cell Res* 124, 111-119.

8. Abkürzungen

2D zweidimensional (x,y)	ICN InterChromatin Network
3D dreidimensional (x,y,z)	IF Immunfluoreszenz
4D vierdimensional (x,y,z,t)	IGC Intensity Gravity Center
3D RRD 3D Relative Radial Distribution	kb Kilobase
AFC Amniotic Fluid Cells	LADs Lamin Associated Domains
BAC Bacterial Artificial Chromosome	LCR Locus Control Region
Bio Biotin	LINE Long Interspersed Elements
BrdU 5-Brom-2-desoxyuridin	LRI Long Range Interaction
BSA Bovines Serum Albumin	Mb Megabase
CENPB Centromere Protein B	MCF-7 Michigan Cancer Foundation - 7
CFP Cyan Fluorescent Protein	MHC Major Histocompatibility Complex
CT Chromosomen Territorium	MMU Mus Musculus Chromosom
Ct- Wert Threshold Cycle	MOPS 3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol	mRFP monomeric Red Fluorescent Protein
DEPC Diethylpyrocarbonat	NADs Nucleolus Associated Domains
DIG Digoxigenin	NOR Nukleolusorganisorregion
DMEM Dulbecco`s MEM Medium	NPC Nuclear Pore Complex, Kernporenkomplex
DMSO Dimethylsulfoxid	NT Nicktranslation
DOP Degenerate Oligonucleotide Primed	PBS Phosphate Buffered Saline
dUTP 2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate	PCR Polymerase Chain Reaction
eADS enhanced Absolut Distance to Surface	PFA Paraformaldehyd
EDTA Ethylendiamintetraacetat	PML- Bodies ProMyelocytic Leukemia
ER estrogen receptor Östrogenrezeptor	PNB Pre- Nucleolar Body
ES Embryonale Stammzellen	PR Perichromatin Region
FA Formamid	PSG Pregnancy Specific Glycoproteins
FACS Fluorescence Activated Cell Sorting	rm ANOVA repeated measure ANalysis Of VAriance
FCS Fetal Calf Serum	RMSE Root Mean Square Error
FISH Fluoreszenz In Situ Hybridisierung	RPE1 Retinal Pigment Epithelial 1 Zellen
FITC Fluoresceinisothiocyanat	rpm revolutions per minute
GA Glutaraldehyd	RPMI-1640 Roswell Park Memorial Institute
GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	RT Raumtemperatur
GFP Green Fluorescent Protein	RT qPCR RealTime quantitative PCR
GREB1 Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1	SA- β - Gal- Test Seneszenzassoziierter β - Galaktosidase Test
HAC Human Artificial Chromosome	SAC Small Accessory Chromosome
HCV Human Chromosomal Vector	SAHFs Senescence Associated HeterochromatinFoci
HFB humane Fibroblasten	SINE Short Interspersed Elements
HM Hybridisierungsmix	snRNPs small nuclear RiboNucleoProteins
HMEC Human Mammary Epithelial Cells	SSC Saline Sodium Citrate
HMM Hybrdisierungsmastermix	sSMC small Supernumerary Marker Chromosome
hnRNPs heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins	TFF1 TreFoil Factor 1
hTERT human Telomerase Reverse Transkriptase	TR Texas Red
HSA Homo sapiens Autosom	UBF Upstream Binding Factor
HSR Homogeneously Staining Region	UV ultraviolett
IC Interchromatin Compartment	WGA Whole Genome Amplification
ICD Interchromosomal Domain	X-Gal 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
	YFP Yellow Fluorescent Protein

9. Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: ÜBERSICHT EINIGER ENTSCHEIDENDER EXPERIMENTE ZUM NACHWEIS VON CHROMOSOMENTERRITORIEN ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 100 JAHREN.....	8
ABB. 2: ÜBERSICHT ÜBER DAS CT-IC MODELL UND ANDERE MODELLE.....	11
ABB. 3: M-FISH ANALYSE VON DLD1- ZELLEN.....	49
ABB. 4: KARYOTYP VON HeLa GOLD ZELLEN.....	50
ABB. 5: 2D- FISH METAPHASENPRÄPARAT VON KELLY- ZELLEN.....	53
ABB. 6: KARYOTYP VON MCF 7- ZELLEN.....	54
ABB. 7: KARYOTYP VON RPE1- ZELLEN.....	55
ABB. 8: MONITORING VON DLD1- ZELLEN ÜBER 3 TAGE.....	72
ABB. 9: ARBEITSWEISE MONITORING.....	73
ABB. 10: TAQMAN SONDEN.....	79
ABB. 11: qPCR VALIDIERUNGSKURVE.....	80
ABB. 12: PCR- ZYKLEN qPCR.....	81
ABB. 13: FUNKTIONSWEISE VON 2D RRD:.....	83
ABB. 14: DIPLOIDES KARYOGRAMM MIT DEN VERWENDETEN SONDEN:.....	93
ABB. 15: ERGEBNIS DLD1- ZELLEN.....	94
ABB. 16: ERGEBNIS AFC- ZELLEN.....	95
ABB. 17: ERGEBNIS HFB.....	96
ABB. 18: ERGEBNIS HMEC.....	97
ABB. 19: ERGEBNIS HeLa- ZELLEN.....	98
ABB. 20: MEDIANE ZUR RADIALEN ANORDNUNG.....	99
ABB. 21: MEDIANE HeLa ZELLEN.....	100
ABB. 22: MEDIANVERGLEICH INTERPHASE- METAPHASE.....	102
ABB. 23: REGRESSIONSANALYSE INTERPHASE- METAPHASE.....	103
ABB. 24: ERGEBNISSE FIBROBLASTEN+ SAC.....	105
ABB. 25: ERGEBNISSE HAMSTERFIBROBLASTEN+ HCV.....	107
ABB. 26: ERGEBNISSE MAUSA9 ZELLEN+ HCV.....	108
ABB. 27: ERGEBNISSE MAUS PRIMÄRE FIBROBLASTEN+ HCV.....	109
ABB. 28: ERGEBNIS KELLY ZELLEN MIT HSR.....	111
ABB. 29: ERGEBNISSE RADIALE VERTEILUNG VON ZENTROMEREN IN HUMANEN FIBROBLASTEN.....	114
ABB. 30: 3D- REKONSTRUKTION EINER METAPHASENPLATTE MIT ZENTROMERSIGNALEN.....	115
ABB. 31: MEDIANE DER RADIALEN ZENTROMERVERTEILUNG.....	116
ABB. 32: RADIALE VERTEILUNG VON ZENTROMEREN IN KELLY ZELLEN (NACH LIEBHART 2009).....	117
ABB. 33: BEISPIEL FÜR BEVORZUGTE ASSOZIATIONEN VON ZENTROMEREN.....	119
ABB. 34: REGRESSIONSANALYSE ZENTROMERASSOZIATIONEN.....	121
ABB. 35: ÄHNLICHKEITEN ZWISCHEN TOCHTERZELLEN.....	123
ABB. 36: ELONGATION IN DER FRÜHEN G ₁ UND RESULTIERENDE WINKEL.....	124
ABB. 37: ERGEBNISSE MONITORING- EXPERIMENTE.....	126
ABB. 38: BEISPIELKERNE MONITORING.....	128
ABB. 39: RADIALE VERTEILUNG IN LEBENDZELLVERSUCHEN.....	130
ABB. 40: MUSTERZERSTÖRUNG WÄHREND DER PROMETAPHASE.....	132
ABB. 41: ÄNDERUNG DER CHROMATINANORDNUNG AB DER METAPHASE.....	133
ABB. 42: SA-B-GAL TEST BEI HeLa ZELLEN.....	136
ABB. 43: LAGE DER BAC- KLONE AUF CHROMOSOM 19.....	137
ABB. 44: TEST DER BAC- SONDEN AUF CHROMOSOM 19.....	138
ABB. 45: 3D REKONSTRUKTION VON HeLa KERN MIT BACs.....	139
ABB. 46: ASSOZIATION MIT DEM NUKLEOLUS NACH 4 TAGEN BRdU- INKUBATION IN HeLa ZELLEN.....	141
ABB. 47: ABSTÄNDE ZUM NUKLEOLUS NACH 4 TAGEN BRdU- INKUBATION IN HeLa ZELLEN.....	142
ABB. 48: SA-B-GAL TEST IN HeLa ZELLEN NACH 4 UND 6 TAGEN BRdU- INKUBATION.....	143
ABB. 49: KI-67 FÄRBUNG VON HeLa- ZELLEN.....	144
ABB. 50: ASSOZIATION MIT DEM NUKLEOLUS NACH 6 TAGEN BRdU- INKUBATION IN HeLa ZELLEN.....	146
ABB. 51: ABSTÄNDE VON PSG ZUM NUKLEOLUS NACH 6 TAGEN BRdU- INKUBATION IN HeLa ZELLEN.....	147
ABB. 52: ABSTÄNDE VON AN51 ZUM NUKLEOLUS NACH 6 TAGEN BRdU- INKUBATION IN HeLa ZELLEN.....	147
ABB. 53: ABSTÄNDE VON AN16 ZUM NUKLEOLUS NACH 6 TAGEN BRdU- INKUBATION IN HeLa ZELLEN.....	148
ABB. 54: KATEGORISIERTE ABSTÄNDE ZWISCHEN PSG UND AN51 SIGNALEN NACH 6 TAGEN BRdU- INKUBATION IN HeLa ZELLEN.....	149
ABB. 55: SA- B- GAL TEST IN IMR90-ZELLEN IN EINER FRÜHEN UND SPÄTEN PASSAGE.....	150
ABB. 56: SAHF IN IMR90-ZELLEN.....	151
ABB. 57: ASSOZIATION MIT DEM NUKLEOLUS IN IMR90-ZELLEN EINER FRÜHEN UND SPÄTEN PASSAGE.....	151
ABB. 58: ABSTÄNDE DER BACs ZUM NUKLEOLUS IN IMR90-ZELLEN EINER FRÜHEN UND SPÄTEN PASSAGE....	152

ABB. 59: LAGE DER BACs AUF HSA 1	153
ABB. 60: TEST DER BACs VON HSA1 AUF HLY- METAPHASENPRÄPARATEN	153
ABB. 61: ASSOZIATION DER BACs VON HSA1 MIT DEM NUKLEOLUS IN IMR90-ZELLEN EINER FRÜHEN UND SPÄTEN PASSAGE.....	154
ABB. 62: ABSTÄNDE DER BACs AUF HSA1 ZUM NUKLEOLUS IN IMR90-ZELLEN EINER FRÜHEN UND SPÄTEN PASSAGE	155
ABB. 63: ÖSTROGENSTIMULATION VON MCF 7 ZELLEN.....	157
ABB. 64: FISH- EXPERIMENTE AUF MCF 7- ZELLEN NACH STIMULATION MIT ÖSTROGEN	159
ABB. 65: ERGEBNISLOT FIBROBLASTEN G ₀ UND PROMETAPHASENROSETTEN	165
ABB. 66: ERMITTELTE MEDIANE VON SACs UND HCVs IN INTERPHASE UND METAPHASE	171
ABB. 67: <i>MITOTIC PRESET</i> MODEL AUS SUN ET AL (2000).....	172
ABB. 68: KORRELATION ZWISCHEN INTERPHASE UND METAPHASE.....	173
ABB. 69: ASSOZIATION DER VEKTOREN MIT DER KERNPERIPHERIE.....	174
ABB. 70: SCHEMA DER VERTEILUNG VON ZENTROMEREN	182
TABELLE 1: VERWENDETE ZENTROMERSONDEN, MARKIERUNG UND NACHWEIS.....	70
TABELLE 2: SIGNIFIKANZEN DER CT POOLS IN INTERPHASEKERNEN UND METAPHASENPLATTEN	101
TABELLE 3: SIGNIFIKANZEN KELLY ZELLEN	112
TABELLE 4: SIGNIFIKANZEN DER RADIALEN ZENTROMERVERTEILUNG	116
TABELLE 5: PROZENTUALE ANTEILE VON ZENTROMERASSOZIATIONEN.....	120
TABELLE 6: ASSOZIATION MIT DEM NUKLEOLUS NACH 4 TAGEN BRdU- INKUBATION IN HeLa ZELLEN	140
TABELLE 7: ANZAHL VON SENESZENTEN ZELLEN MITTELS KI-67 FÄRBUNG.....	145
TABELLE 8: ASSOZIATION MIT DEM NUKLEOLUS NACH 6 TAGEN BRdU- INKUBATION IN HeLa ZELLEN	145
TABELLE 9: ASSOZIATION MIT DEM NUKLEOLUS IN IMR90-ZELLEN EINER FRÜHEN UND SPÄTEN PASSAGE	151
TABELLE 10: ASSOZIATION DER BACs VON HSA1 MIT DEM NUKLEOLUS IN IMR90-ZELLEN EINER FRÜHEN UND SPÄTEN PASSAGE.....	154

10. Publikationen

Journal Artikel:

4D CHROMATIN DYNAMICS IN CYCLING CELLS: THEODOR BOVERI'S HYPOTHESES REVISITED

Hilmar Strickfaden, **Andreas Zunhammer**, Silvana van Koningsbruggen, Daniela Köhler and Thomas Cremer
Volume 1, Issue 3 May/June 2010 Pages 284 – 297
DOI: 10.4161/nucl.1.3.11969

CHROMOSOME TERRITORY ORGANIZATION WITHIN THE NUCLEUS

Thomas Cremer, Yolanda Markaki, Barbara Hübner, **Andreas Zunhammer**, Martin Hess, Lothar Schermelleh, Marion Cremer, Christoph Cremer

Akzeptiert von Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine

Poster Präsentationen:

SIZE DEPENDENT RADIAL DISTRIBUTION OF INTERPHASE CHROMOSOMES IN FIVE HUMAN CELL TYPES WITH ELLIPSOIDAL NUCLEI

Andreas Zunhammer, Daniela Köhler, Irina Solovei, Boris Joffe and Thomas Cremer

1st Life Science PhD Symposium, **Munich Interact, München 2007**

UND

2nd Marie Curie-Genome Architecture in Relation to Disease Meeting (MC-GARD), **Interplay among genetics, epigenetics and non-coding RNAs**

Madrid, Spanien 2008

CHANGES OF CHROMOSOME ARRANGEMENTS IN CYCLING CELLS: THEODOR BOVERI'S MODEL (1909) REVISITED

Hilmar Strickfaden, **Andreas Zunhammer**, Daniela Köhler and Thomas Cremer

3rd Marie Curie-Genome Architecture in Relation to Disease Meeting (MC-GARD), **Higher order genome architecture**
Edinburgh, Schottland 2009

12. Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Thomas Cremer ganz herzlich dafür bedanken, in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen und für die Bereitstellung des Themas. Ich möchte ihm auch danken dafür, dass neben der ganzen Forschung auch die Menschlichkeit im Vordergrund steht, meiner Meinung nach Voraussetzung für eine sehr lehrreiche und angenehme Zeit.

Vielen Dank an Angelika Böttger für die Übernahme der Zweitkorrektur und auch allen anderen Gutachtern für ihre Zeit.

Marion Cremer möchte ich danken für die guten Ratschläge und Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen und für die Organisation und Bändigung der ganzen Rasselbande.

Irina Solovei und Boris Joffe danke ich für die zeitweise Betreuung und einige der Ideen, die in dieser Arbeit umgesetzt wurden.

Einen herzlichen Dank natürlich an das ganze Labor. Das Besondere an der Arbeitsgruppe ist die familiäre Atmosphäre gewesen, die Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit aller Mitglieder und Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Aber auch die zahlreichen sozialen offiziellen und inoffiziellen, z.T. spontanen Events wie Grillparties, Miesbachfeste, die Feierabendbiere und Campusfeste (extended), die unzähligen Geburtstags- und Ein/Ausstandskuchen, Balkonactions, zwei unvergessliche Konferenzen in Madrid und Edinburgh,... haben zum besonderen Betriebsklima beigetragen. So war es nie langweilig und es hat geholfen, die Enttäuschung über so manch missglücktes Experiment besser zu ertragen. Zuerst möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die den steinigen Weg zum Dr. rer nat schon vor mir gegangen sind: Heiner Albiez für die Betreuung meiner Diplomarbeit; Daniela Köhler für die Unterstützung mit eADS und uff- technische Leidensgenossin; Claudia Dahlem für ihre Rolle als AG- Mama und für die leckeren Zucchinirollchen; Florian Grasser für die Vorbildfunktion, was Zielstrebigkeit und Schnelligkeit betrifft und noch bei Claudia Hepperger, Katrin Teller, Roman Zinner und Katrin Küpper.

Meinen Lab- Buddies: Hilli: für die Unterstützung in gemeinsamen Projekten und der ansteckenden Begeisterung für Wissenschaft, für die zahlreichen gemeinsamen Nightsessions am Mikroskop mit musikalischer und/oder kulinarischer Untermalung und für seinen ungezählt unter Beweis gestellten, unverwechselbaren Charme und die Sprüche. Bei Jens, meinem dienstältesten Mitstreiter. Für die strikte Einhaltung der Essenszeiten, die Kickerpartien, dass er seine Praktika generös mit mir geteilt hat, die jahrelange Begleitung bei den „Kaffeepausen“ und für alle sonstigen Hochs und Tiefs, die wir gemeinsam erlebt haben.

Bei meinen „Leidensgenossen“ der jüngeren Vergangenheit: Alex (immer freundlich und hilfsbereit), Doris (für die zahlreichen Papervorschläge und ihren Einsatz gegen meinen Unterzucker), Barbara (für die zahlreichen Gespräche und die Organisation vieler Dinge), Yolanda (hat definitiv Leben in die Bude gebracht, Bravo Yola!), Kathi (für die Volleyballfachgespräche und die kleinen Leckereien zwischendurch), Peffi (Super Kickerpartnerin), Katrella Pflegbercht (für ihre immer gute Laune, literweise Lachtränen, zahlreiche witzige Links und fürs Korrekturlesen), Dani Smeets (keinem konnte man beim Kickern so schön und so einfach den Hintern versohlen ;-), Nina (dass ich ihr die Mystik hinter „The Hoff“ zeigen konnte).

Meinen Diplomandeninnen und Forschungspraktikantinnen Isi, Evi, Natascha und Martina danke ich für eine sehr lehr-reiche Erfahrung. Isi (Isabel Liebhart) und Evi (Evelin Radulovic) im Besonderen, da sie wesentlich zu den Ergebnissen der Arbeit beigetragen haben.

Bei unseren nicht-wissenschaftlichen Helfern Heidi für die Monk-artige Laborpflege, Carolin Bleese für die Hilfe bei Designfragen, Ming Zhao dafür, dass sie mir immer meine Amazon-Päckchen hochgetragen hat.

Und natürlich möchte ich mich auch bei allen sonstigen Mitarbeitern bedanken, die im Laufe der Zeit da waren: Christian (er hatte ja leider so was von recht). Bei Jaques, Mariana, Sandro, Corella und Roy, trotz meiner fußballbedingten Vorurteile sehr, sehr nette Kollegen. Steffen, Jürgen, Stefan (vielen Dank für das Gutachten), Micha, Robert, Sabine, Stan, Charlotte, Yana, Vio, Julia, Dani, Simon, Süleyman, Corni, Sandy, Gustavo, Pablo (Bravo Pablo, no? Apparently!), Caroline, Radka, Verena, Nadine, Teffi, den gesamten Grupe- Groupies, den charmanten Gastgeberinnen in den letzten Wochen von der AG Böttger und bei allen, die ich vergessen habe.

Zum Schluß möchte ich mich bei meiner Familie bedanken für den Rückhalt in den letzten Jahren und auch bei Rike und Momo für ihre Unterstützung in vielen schwierigen Situationen.

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Materialien und Quellen durchgeführt habe.

München, den 15.06.2011

.....Andreas Zunhammer

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 15.06.2011

.....Andreas Zunhammer