

Department Biologie II
Anthropologie und Humangenetik
Ludwig-Maximilians Universität München

**Untersuchungen zur Zellkernarchitektur
in normalen und malignen hämatopoetischen
Zellen**



Alexandra C. Kölbl

Dissertation an der Fakultät für Biologie

Eingereicht am

15.03.2011

Untersuchungen zur Zellkernarchitektur in normalen und malignen hämatopoetischen Zellen

Dissertation an der Fakultät für Biologie, Department II
Der Ludwig-Maximilians Universität München (LMU)

Vorgelegt von
Dipl. Biol. Alexandra C. Kölbl

Gutachter:

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Zweitgutachter: PD Dr. Steffen Dietzel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2012

Meinen lieben Eltern

***„Ein wahrer Freund ist der,
der deine Hand nimmt,
aber dein Herz berührt“***

(Gabriel García Márquez)

Inhalt

I.	Einleitung	11
	1. Grundlagen der Arbeit	11
	2. Chromatin	11
	3. DNA-Kompaktierung und Zellkernarchitektur	13
	4. Anordnung von unterschiedlich exprimierten und regulierten DNA-Bereichen im Zellkern	17
	5. Beschreibung der relevanten Systeme	22
	5.1. Das CALM-AF10-System	22
	5.2. Messung der Genexpression	27
	5.3. Histonmodifikationen	30
	5.3.1. Me3-H3K4	31
	5.3.2. Me3-H3K9	32
	5.3.3. Me3-H3K27	32
	5.3.4. Literatur zu Histonmodifikationen	33
	5.4. Das Prinzip der "komplexen Sonden"	34
	5.4.1. Genomiphi	34
	5.4.2. DOP-PCR	35
	6. Zielsetzungen der einzelnen Teilbereiche	36
	6.1. Positionierung regulierter DNA-Abschnitte mittels CALM-AF10-System	36
	6.2. Histonmodifikationen	37
	6.3. „komplexe Sonden“	37
II.	Material und Methoden	39
	1. Zellkultur	39
	1.1. Subkultivierung von Suspensionszellen	39
	1.2. Subkultivierung von C2C12 und Fibroblasten	39
	1.3. Isolierung von Zellen aus Vollblut	40
	1.3.1. Isolierung von Lymphozyten	40
	1.3.2. Isolierung von Granulozyten/Monozyten	41
	1.3.3. Isolierung von Stammzellen aus Nabelschnurblut	41
	1.4. Differenzierung von Zelllinien	42

1.5. Herstellung von Metaphase-Präparaten	42
1.6. Fixierung für 3D-FISH	44
1.6.1. Fixierung von Suspensionszellen	44
1.6.2. Fixierung adhärenter Zellen	45
1.7. Fixierung für Immunfluoreszenz	46
1.8. Verwendete Zellen	47
2. Messung der Genexpression	49
2.1. RNA-Isolation	49
2.1.1. RNA-Isolation aus Suspensionszellen	49
2.1.2. RNA-Isolation aus adherenten Zellen	50
2.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung	51
2.3. Qualitätskontrolle der RNA	51
2.4. DNase Verdau	52
2.5. Reverse Transkription	53
2.6. Kontrolle der cDNA mittels GAPDH-PCR	54
2.7. Semiquantitative RT-PCR	56
2.7.1. Primerdesign	56
2.7.2. Semiquantitative PCR	57
2.7.3. Ablauf der semiquant. RT-PCR	58
2.7.4.. Auftrennung der PCR-Fragmente im Gel	59
2.8. LD-TaqMan PCR	60
3. FISH	62
3.1. 2D-FISH	62
3.2. 3D-FISH	63
3.3. Affymetrix Arrays und BAC Sonden	65
3.3.1. Vorkultur	66
3.3.2. Übernacht-Kultur	66
3.3.3. Minipräparation	67
3.3.4. Agarose-Testgel	68
3.3.5. Photometrische DNA-Bestimmung	69
3.3.6. DOP-PCR	69
3.3.6.1. Primäre DOP-PCR	70
3.3.6.2. Label-DOP-PCR	71

3.3.6.3. Amplifikation und Markierung für	
komplexe Sonden	72
3.3.6.3.1. Genomiphi	73
3.3.6.3.2. DOP-PCR	73
3.3.6.3.3. Nicktranslation	74
4. Immunfluoreszenzexperimente	75
4.1. Durchführung der Färbungen	75
4.2. Besonderheiten bei Stammzellen	76
5. Mikroskopie	77
5.1. Durchlichtmikroskopie	77
5.2. Epifluoreszenzmikroskopie	78
5.3. Konfokalmikroskopie	79
6. Bildbearbeitung	80
7. Auswertung der Bilddaten	81
III. Ergebnisse	82
1. CALM-AF10-Analysen	82
1.1. Arbeit mit dem Zelltyp DG75	82
1.2. Darstellung der Affymetrix-Daten	83
1.3. Auswahl der BAC-Klone	87
1.4. Semiquantitative RT-PCR	87
1.5. FISH-Experimente	95
1.5.1. Vorbereitungen für die FISH-Experimente	98
1.5.2. 2D-FISH	100
1.5.3. 3D-FISH	102
1.5.4. Radiale Verteilung der BAC-Signale im Interphase-Zellkern	102
1.5.5. Radiale Verteilung der BAC-Signale in den Chromosomenterritorien	107
1.6. Low Density Arrays	110
1.6.1. Auswahl der Gene	110
1.6.2. Ergebnisse der Arrays	110
1.6.3. Vergleich von Low Density Arrays vs. Affymetrix- Arrays	115
1.6.4. Berechnung der TES	115

2. Histonmodifikationen	117
2.1. me3-H3K4	117
2.1.1. Radiale Verteilung von me3-H3K4-Signalen in Nuclei normaler Zellen	117
2.1.2. Radiale Verteilung von me3-H3K4-Signalen in undifferenzierten und differenzierten Krebszellnuclei	120
2.2. me3-H3K9	123
2.2.1. Radiale Verteilung von me3-H3K9-Signalen in Nuclei normaler Zellen	123
2.2.2. Radiale Verteilung von me3-H3K9-Signalen in undifferenzierten und differenzierten Krebszellnuclei	126
2.2.3. Clusteranalyse von me3-H3K9-Signalen in normalen Zellen und Krebszelllinien	129
2.3. me3-H3K27	131
2.3.1. Radiale Verteilung von me3-H3K27-Signalen in Nuclei normaler Zellen	131
2.3.2. Radiale Verteilung von me3-H3K27-Signalen in undifferenzierten und differenzierten Krebszellnuclei	134
2.4. Statistik	137
2.4.1. Statistische Auswertung der Signalverteilungen innerhalb eines Zelltyps	137
2.4.2. Statistische Auswertung der Signalverteilungen der Zelltypen untereinander	139
3. „komplexe Sonden“	144
3.1. Verwendete Zellen und deren Differenzierung	144
3.2. DNA-Amplifikation mittels Genomiphi	149
3.3. DNA-Amplifikation mittels DOP-PCR	162

IV. Diskussion	170
1. Genpositionierung nach CALM-AF10-Aktivierung	170
1.1. Induktion der Zellen	170
1.2. Vergleich verschiedener Methoden zur Messung der Genexpression	171
1.2.1. Affymetrix-Daten vs. Semiquantitative RT-PCR	171
1.2.2. Semiquantitative RT-PCR vs. Low Density Arrays	172
1.2.3. Affymetrix-Daten vs. Low Density Arrays	173
1.3. FISH-Experimente und deren Deutung im Zusammenhang mit den Eigenschaften der Region	176
1.3.1. FISH-Experimente	176
1.3.2. Deutung der FISH-Ergebnisse im Zusammenhang mit den Eigenschaften der Region	177
1.4. Zusammenfassung und Ausblick	179
2. Histonmodifikationen	181
2.1. me3-H3K4	182
2.2. me3H3K9	183
2.3. me3H3K27	185
2.4. Zusammenschau der Ergebnisse	186
3. Herstellung „komplexe Sonden“	187
V. Zusammenfassung	190
VI. Referenzen	193
VII. Abbildungsverzeichnis	205
VIII. Abkürzungen	208
IX. Anhang →CD	
X. Chemikalien	210
XI. Danksagung	225

XII. Publikationen	227
XIII. Lebenslauf	228
XIV. Ehrenwörtliche Versicherung	229

I. Einleitung

1. Grundlagen der Arbeit

Dass verschiedene Zelltypen innerhalb eines Organismus unterschiedliche Aufgaben ausführen können, liegt daran, dass einzelne Gene unabhängig voneinander an- oder abgeschaltet sein können oder werden, je nach den, für diese Zelltyp nötigen, Erfordernissen. Die Regulierung des An- oder Abschaltens, der sog. Genexpression, ist ein komplexer Prozess, der auf mehreren verschiedenen Ebenen erfolgt und ist Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit.

Die Genexpression erfolgt im Wesentlichen auf drei verschiedenen Ebenen (van Driel et al. 2003):

- (1) Auf der Ebene der Einzelgene
- (2) Auf der Ebene des Chromatins
- (3) Auf der Ebene des Zellkerns

In der vorliegenden Arbeit geht es speziell um den dritten Punkt, die Positionierung verschiedener DNA- Bereiche im Zellkern, und zwar im Zellkern verschiedener Zelltypen aus Blut, wobei sowohl normale Zelltypen als auch maligne Blutkrebszelllinien, die zum Teil Vorläuferstufen darstellen und sich zu reiferen Zelltypen differenzieren lassen, mit Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) und Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender Konfokalmikroskopie, untersucht werden.

2. Chromatin

Die DNA ist ein Makromolekül, das in Form einer Doppelhelix (Watson und Crick, 1953) in der Zelle vorliegt. Für die Verpackung des, insgesamt ca. 2m langen DNA-Fadens in den nur ca. 10µm großen Zellkern ist allerdings eine Kompaktierung nötig (Igo-Memmes et al., 1982, Kornberg 1977), die durch die Windung des DNA-Moleküls um Histon-Proteine erreicht wird. Die Einheit von DNA und Histonen wird als Chromatin bezeichnet (Lodish, 2001; Alberts, 2005). Der Begriff Chromatin wurde 1880 von dem Zellbiologen W. Flemming eingeführt und sollte ursprünglich das Färbeverhalten des Zellkerns beschreiben (chromos, griechisch für Farbe).

Basierend auf mikroskopischen Betrachtungen von Geweben beschrieb Emil Heitz (1892-1965) bereits 1928 das Phänomen, dass während der Interphase nicht alle Chromosomen vollständig decondensieren und nannte diese Strukturen Heterochromatin. Er schloss ferner daraus, dass zwei Gruppen von Chromatin existieren und gab den Chromatinbereichen die während der Telophase zu verschwinden scheinen, den Namen Euchromatin (Heitz, 1928: Das Heterochromatin der Moose). Nur wenige Jahre später beschrieb Hans Muller das Phänomen des „Position effect variegation“ in *Drosophila*, was bedeutet, dass stillgelegte Gene in der Nähe des Heterochromatins zu finden sind (Muller et al. 1930). Knapp 40 Jahre später wurde von Brown der Begriff „fakultatives Heterochromatin“ geprägt (Brown et al. 1966), womit gemeint ist, dass alle Chromatinbereiche zu fakultativem Heterochromatin verpackt werden können.

Nach heute geltender Anschauung bezeichnet man die Chromatinbereiche als Heterochromatin, die auch im decondensiertem Zustand der Chromosomen gut färbbar bleiben. In Säugetierzellen erscheint das Heterochromatin demnach dunkler und ist oft mit der Kernhülle assoziiert (Lodish, 2001; Alberts, 2005).

Es können zwei Heterochromatinformen unterschieden werden. Das konstitutive Heterochromatin ist im Bereich der Zentromere lokalisiert. Es besteht aus kurzen Wiederholungssequenzen die keine Proteine kodieren. Beim fakultativen Heterochromatin handelt es sich u.a. um das inaktivierte X-Chromosom in weiblichen Zellen, das sog. Barr-Körperchen. Das fakultative Heterochromatin deckt des Weiteren die Bereiche des Zellgenoms ab, die nach erfolgter Zelldifferenzierung für die Funktion der differenzierten Zelle nicht mehr erforderlich sind. Mehrere Autoren gehen davon aus, dass es sich beim Heterochromatin um transkriptionell inaktive Chromatinbereiche handelt, die repetitive DNA-Elemente im Genom stabilisieren indem sie die Rekombination zwischen homologen Bereichen unterdrücken (Grewal et al., 1997; Guarente, 2000).

Das im Gegensatz zum Heterochromatin genreiche Euchromatin stellt dank seiner offenen Konfiguration den Großteil der transkriptionell aktiven Bereiche des Genoms dar (Lodish, 2001; Alberts, 2005).

Einige Eigenschaften der drei Formen des Chromatins werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

	Euchromatin	Fakultatives Heterochromatin	Konstitutives Heterochromatin
Kompaktierung	Dekondensiert	Kondensiert	Stark kondensiert
Replikationszeitpunkt	Früh	Mittel	Spät
Bandenzugehörigkeit	R-Banden	G-Banden	Dunkle G-Banden
Basengehalt	GC-reich	AT-reich	AT-reich
Gendichte	Genreich	Genarm	Sehr genarm
Charakteristische Sequenzen	SINEs	LINEs	Repetitive Sequenzen

Tabelle I.1.: Eigenschaften von Chromatin

In den letzten Jahren hat die Erforschung der dreidimensionalen Anordnung von Chromatin innerhalb des Zellkerns enorm an Bedeutung gewonnen, da zunehmend davon ausgegangen werden kann, dass die räumliche Positionierung einzelner Sequenzen nicht zufällig ist und mit der epigenetischen Regulierung zusammenhängt (van Driel et al. 2003).

3. DNA-Kompaktierung und Zellkernarchitektur

Um die Verpackung der DNA in den Zellkern zu ermöglichen, wird das DNA Molekül um Histon-Proteine gewunden. 146 bp der DNA sind dabei um ein Histon-Octamer, bestehend aus jeweils 2 H2a, H2b, H3 und H4 Proteinen, gewunden und werden von Histon H1 stabilisiert (Simpson et al. 1978). So entsteht eine Struktur, die als Perlschnur oder „beads on a string“ bezeichnet wird, und durch elektronenmikroskopische Bilder belegt ist (Olins et al. 1974). Früheren Vorstellungen zufolge wurde diese Perlschnur-Konformation nochmals in sich aufgewunden, so dass die 30 nm-Fiber, auch Solenoid-Struktur genannt, entsteht. Sie stellt den nächsten Schritt in Richtung der Kompaktierung des genetischen Material zu Metaphase-Chromosomen dar (s. Abb. I.1.), wofür dann eine 250-fache Kompaktierung im Vergleich zum Chromatin erreicht werden könnte (Belmont et al., 1999; Earnshaw and Bernal, 1991).

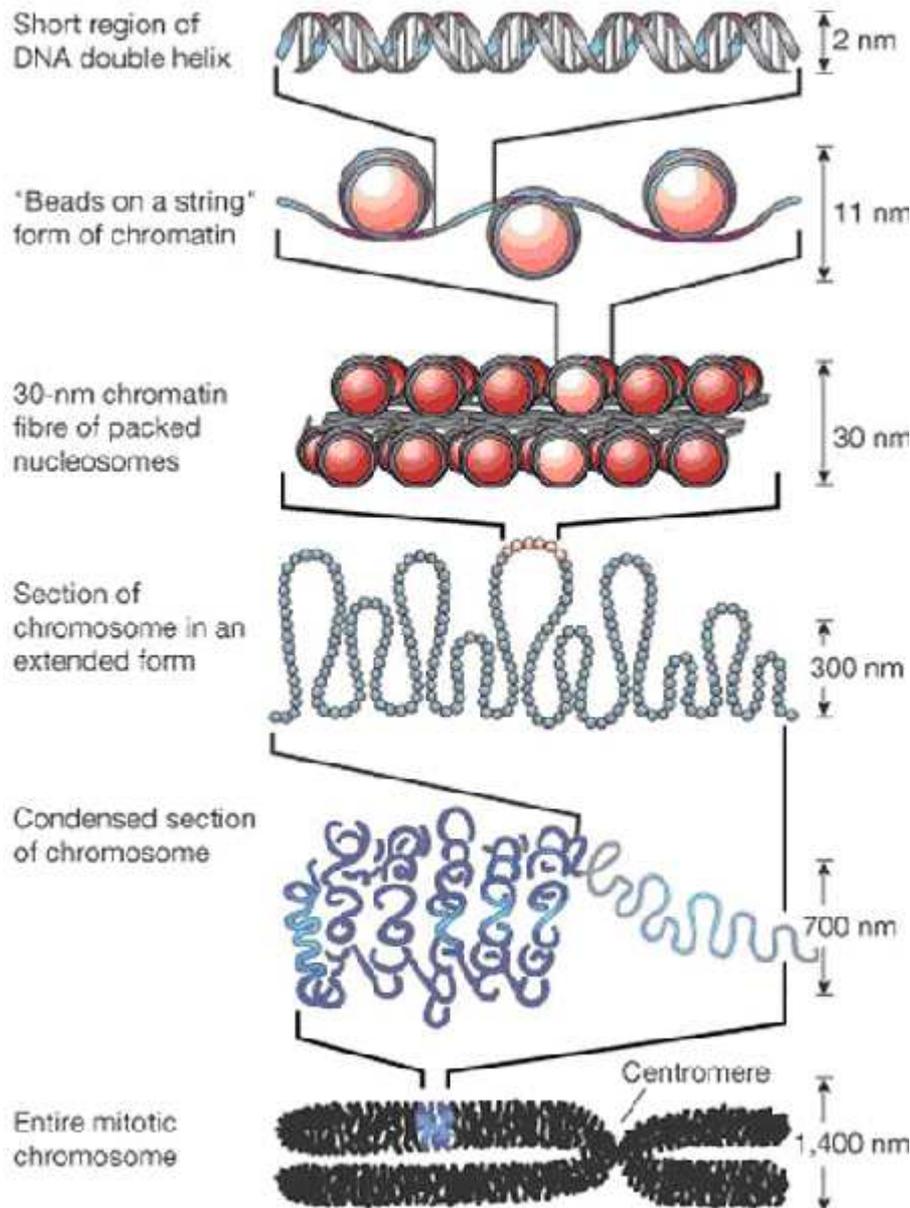


Abb. I.1.: Frühere Vorstellung der Kompaktierung von DNA ausgehend von der Doppelhelix bis hin zum Metaphase-Chromosom.
Quelle: www.gistsupport.org

Diese Form der Kompaktierung der DNA kann jedoch nur in vitro beobachtet werden, ist jedoch elektronenmikroskopisch nicht bewiesen (Cremer et al. 2011, Markaki et al. 2011). Mit Hilfe neuer biochemischer Methoden wie Chromatin Conformation Capture (3C, Dekker et al. 2002, Liebermann-Aiden et al. 2009) und neuer Mikroskopiertechniken Markaki et al. 2012, Rouquette et al. 2010, Strickfaden et al. 2012), die eine wesentlich höhere Auflösung der Strukturen zulassen, muss eine andere Form der DNA-Kompaktierung, die auch mit dem „Chromosome Territory – Interchromatin Compartment“ –Modell (CT-IC) zusammenhängt, postuliert werden. Darauf soll im Folgenden eingegangen werden.

Das Chromatin ist im Interphase-Zellkern in Chromosomenterritorien organisiert (Cremer 1985, Lichter et al. 1988, Pinkel et al. 1988). Bereits 1909 wurde von T. Boveri vermutet, dass die einzelnen, in der Mitose kondensierten und damit als einzelne Einheiten unterscheidbare Chromosomen auch im dekontensierten Zustand in der Interphase innerhalb des Zellkerns bestimmte distinkte Bereiche einnehmen. Indirekte, aber starke Evidenz für eine territoriale Anordnung von Chromosomen lieferten Beobachtungen aus in den 70er Jahren durchgeführten Experimenten, bei denen nach Mikrobestrahlung kleiner Kernkompartimente Reparaturprozesse nur an wenigen Chromosomen der nachfolgenden Metaphase erkennbar waren (Zorn, Cremer, et al., 1976; Zorn, Cremer, et al., 1979; Stack, Brown, et al., 1977), sowie Beobachtungen an Giemsa-gefärbten Zellkernen. Bewiesen wurde die territoriale Organisation durch Hybridisierungstechniken mit denen das einzige menschliche Chromosom in einer Hamster-Mensch-Hybridzelle als distinktes Territorium dargestellt werden konnte (Schardin et al., 1985) und wenig später mittels FISH durch den Einsatz chromosomenspezifischer DNA-Sonden (Lichter, et al., 1988). In der weiteren Erforschung des Chromatins entstand das Chromosomenterritorium-Interchromatin Kompartiment-(CT-IC)-Modell (Cremer et al, 2001), welches die verschiedenen Eigenschaften des Chromatins beschreibt. Nach diesem Modell (s. Abb. I.2.) befindet sich zwischen den CTs das Interchromatin Kompartiment, das man sich wie ein Kanalsystem vorstellen kann. Außerdem besagt das Modell folgendes:

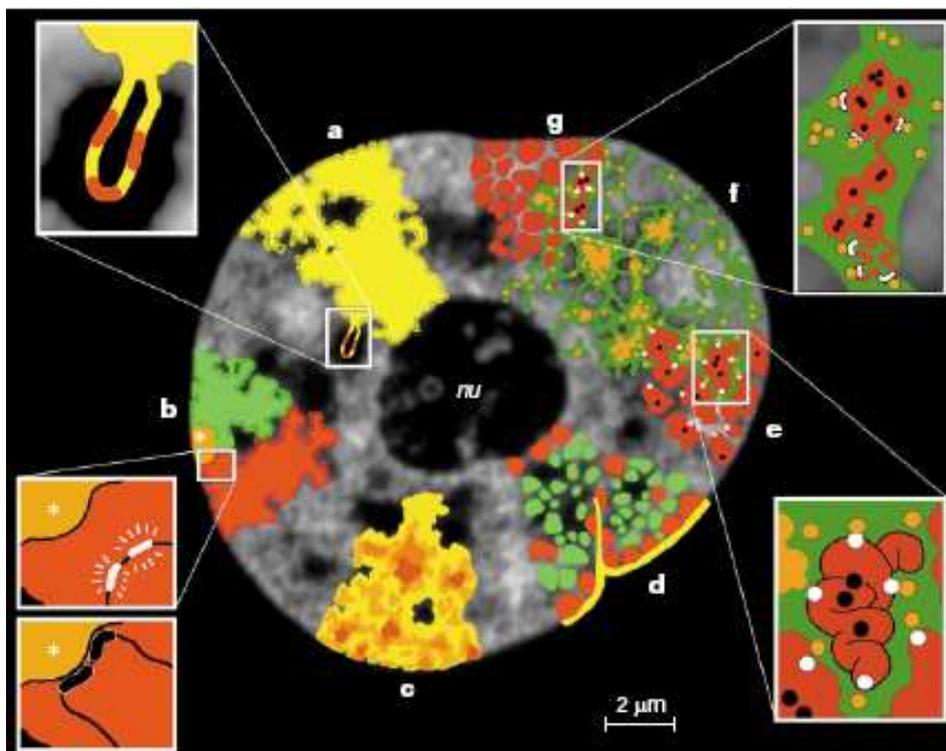


Abb. I.2.: Schematische Darstellung des CT-IC-Modells. Die einzelnen Punkte sind im nachfolgenden Text beschrieben.
Cremer et al. 2001

- (a) Die CTs besitzen komplex gefaltete Oberflächen, aus denen große Chromatin-Schleifen mit mehreren aktiven Genen (rot) in den IC-Raum ragen können.
- (b) CTs enthalten separate Domänen für den kurzen (p) und für den langen (q) Arm, sowie für das Centromer.
- (c) Gene, die aktiv transkribiert werden (weiß) sind vom centromerischen Heterochromatin entfernt. Rücken sie an das Heterochromatin heran (schwarz), führt dies zu deren Stilllegung. CTs besitzen eine unterschiedliche Chromatindichte (dunkelbraun = hohe Dichte, gelb = geringe Dichte), wobei das lockere Chromatin eher dazu neigt in den IC-Raum zu ragen.
- (d) Genarmes, spät replizierendes Chromatin (rot) befindet sich eher am Kernrand, nahe der Kernlamina (gelb), sowie an Einstülpungen derselben oder um den Nucleolus (nu) herum, während genreiches, früh replizierendes Chromatin (grün) zwischen den genarmen Bereichen liegt.
- (e) Es besteht eine Hierarchie in der Anordnung der Gene: aktive Gene (weiße Punkte) befinden sich an der Oberfläche der Chromatinfibern, wohingegen inaktive Gene (schwarze Punkte) eher im Inneren des Chromatins liegen.
- (f) Eine weitere Aussage des CT-IC-Modells ist, dass das Interchromatin-Kompartiment (grün) Komplexe (orange Punkte) und größere chromatinfreie Domänen (Ansammlung oranger Punkte) enthält, welche Proteine für Transkription, Splicing, DNA-Replikation und -Reparatur enthalten.
- (g) Die topologische Beziehung zwischen dem IC (grün) und aktiven und inaktiven Genen ist in diesem Modell folgendermaßen geregelt: die feinsten Verästelungen des IC enden zwischen Chromatindomänen (rot), die eine Größe von ~100 kb einnehmen. Hierbei befinden sich die aktiven Gene (weiße Punkte) an der Oberfläche dieser Domänen, wohingegen inaktive Gene (schwarze Punkte) im Inneren liegen. Diese ~100 kb-Chromatindomänen können auch in einer geschlossenen Konformation vorliegen, so dass sie vor der transkriptionellen Aktivierung zunächst in eine offene Konformation umgewandelt werden müssen (Cremer und Cremer, 2001).

Aufgrund neuerer Untersuchungen zur Zellkernarchitektur muss dieses Modell korrigiert werden. Die „beads-on-a-string“-Struktur wird demzufolge in Chromatindomänen (CDs) zusammengefasst. Die Chromatindomänen haben etwa die Größe von ca. 1Mb, also der Größe von Replication Foci. Die Chromatindomänen lagern sich in der Form sog. „Fractal Globules“ (Liebermann-Aiden et al. 2009, Cremer et al. 2010) zu den Chromosomenterritorien (CTs) zusammen. Die CTs sind vom Interchromatin-Compartment (IC) umgeben. Im IC, das an den Kernporen beginnt, befinden sich die Proteine für

Transkription, Replikation und DNA-Reparatur. Es durchzieht auch die CTs, die schwammartige Struktur besitzen, wie ein Fluss. Zwischen den CTs und dem IC befindet sich der sog. Perichromatin-Raum (PR). Die im PR liegenden DNA-Bereiche sind weniger stark kondensiert als in den Chromatindomänen innerhalb eines CTs, dort finden die Abläufe des DNA-Stoffwechsels statt (Cremer et al. 2012, Markaki et al. 2012). Ein looping out von Chromatinschleifen, das häufig in der Literatur postuliert wurde kann praktisch ausgeschlossen werden, da sich im Moment der DNA-Kondensierung in der Mitose Schwierigkeiten ergeben könnten.

4. Anordnung von unterschiedlich exprimierten und regulierten DNA-Bereichen im Zellkern

In der Literatur findet man häufig Hinweise darauf, dass die Anordnung von Chromatin im Zellkern nicht zufällig ist. So findet man eine größenabhängige Positionierung von Chromosomen in Fibroblasten-Kernen, wobei kleine Chromosomen in der Mitte, große Chromosomen an der Peripherie des Zellkerns liegen (Mahy et al. 2002a & b, Sun, 2000, Cremer, 2003, Bolzer, 2005). In Lymphozyten und anderen Zelltypen mit sphärischen bzw. nicht flach-elipsoiden Zellkernen ist die Anordnung jedoch abhängig von der Gendichte der Chromosomen. Die genreichen Chromosomen, wie z.B. das Chromosom 19, sind in Lymphozyten zur Mitte des Zellkerns hin orientiert, die genarmen Chromosomen liegen eher an der Zellkernperipherie (Cremer, 2003, Cremer 2004).

Auch der Expressionsstatus von Genen wurde häufig im Zusammenhang mit der Positionierung dieser Gene im Hinblick auf das Chromosomenterritorium und den gesamten Zellkern untersucht, führte jedoch zu kontroversen Ergebnissen.

So beschrieben Kurz et al. 1996 und Scheuermann et al. 2004, dass sich Gene, unabhängig vom transkriptionellen Status, bevorzugt an der Peripherie eines Territoriums befinden, während sich nicht exprimierte Sequenzen meist im Inneren des Territoriums befinden. Dietzel et al. untersuchten 1999 das ANT2- und ANT3-Gen und deren Lage auf dem aktiven und inaktiven X-Chromosom. Sie stellten fest, dass ANT2, welches der X-Inaktivierung unterworfen ist, auf dem inaktiven X-Chromosom deutlich weiter im Inneren des Territoriums liegt als auf dem aktiven X-Chromosom, wohingegen ANT3, das in der PAR-Region liegt und damit nicht der X-Inaktivierung unterworfen ist, auf beiden X-Chromosomen die gleiche Entfernung von der Oberfläche des Territoriums aufweist. ANT2 liegt auf dem inaktiven X-Chromosom auch weiter im Inneren des Territoriums als ANT3. Daraus schlossen Dietzel et al., dass aktive Gene näher an der Peripherie des Territoriums liegen, um mit

Transkriptionsfaktoren aus dem Interchromatin-Kompartiment in Kontakt zu kommen, was auch mit dem CT-IC-Modell in Einklang zu bringen ist (Cremer T., Cremer C. 2001). Somit ist die transkriptionelle Aktivität von Genen mit einer räumlichen Organisation des Zellkerns korreliert, nicht kodierende Sequenzen liegen eher im Inneren des Territoriums oder zufällig über das Territorium verteilt (Francastel, 2000). Weiterhin wurde beobachtet, dass Chromatinschleifen, die ein Cluster hoch exprimierter Gene enthalten, bzw. eine hohe Gendichte aufweisen, sogar einige Mikrometer aus dem Territorium herausragen können, womit diese aktiven Gene direkt im Interchromatinraum platziert werden und dort mit den benötigten Transkriptionsfaktoren in Kontakt kommen (Mahy, 2002b, Volpi, 2000, Williams, 2002).

Im Gegensatz dazu fanden Mahy et al. 2002a, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Position von ubiquitär exprimierten, gewebsspezifisch exprimierten und intergenischen DNA-Segmenten innerhalb eines Territoriums gibt. Sie untersuchten hierzu die WAGR-Region auf Chromosom 11p13, die einige ubiquitär exprimierte Gene, einige gewebsspezifisch exprimierte Gene und nicht kodierende Sequenzen enthält. Ebenso fanden sie keinen Unterschied in der Anordnung von gewebsspezifischen Genen zwischen dem Gewebe, in der das entsprechende Gen exprimiert wird und einem anderen Gewebe, in der das Gen inaktiv ist. Auch Dundr et al. beschrieben 2001, dass aktive Gene innerhalb eines Territoriums lokalisiert sind, was darauf hinweist, dass der Interchromatinraum die Territorien mit einem Netzwerk aus Kanälen durchzieht und somit Transkriptionsfaktoren auch in die Territorien hinein gelangen können. Daher müssten transkriptionell aktive Gene nicht zwangsläufig an der Peripherie des Territoriums liegen. Cluster aktiver Gene können jedoch in bestimmten Fällen auf Chromatinschleifen sitzen, die aus dem CT in das Interchromatin-Kompartiment ragen und auf diese Weise gut mit den Transkriptionsfaktoren, die sich in diesem Kompartiment befinden, in Kontakt treten (Mahy et al, 2002b; Volpi et al, 2000; Williams et al 2002, Galiova et al, 2004 und Chambeyron et al, 2005).

2007 konnten diese Aussagen von Küpper et al bestätigt werden, da auch sie eine sehr genreiche und stark exprimierte Region (11p15.5) in Fibroblasten fanden, die eine Chromatinschleife bildete, welche aus dem CT ragte.

Auch in Studien, die sich auf die Anordnung von α - und β -Globingenen in differenzierenden Zellen beziehen, konnten solche Loops beobachtet werden, denn die α -Globingene, die sich in genreicher Umgebung befinden, bilden Chromatinschleifen. Dies konnte für die β -Globingene, die sich eher in genarmen Regionen befinden, nicht bestätigt werden. Insgesamt

konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation beider Gene nicht mit ihrem Transkriptionsstatus korreliert (Brown et al, 2006).

Bei der Betrachtung auf Kern-Ebene stellt sich die Frage, wie die aktiven und inaktiven Gene im Zellkern verteilt sind. Genreiche Segmente weisen statistisch eine höhere Expression auf als genarme Bereiche, wodurch die Unterscheidung zwischen genreichen und aktiven Abschnitten nicht ohne Weiteres festzulegen ist.

Daher wird auch dieser Punkt in der Literatur kontrovers diskutiert. Allerdings herrscht bezüglich der Anordnung genreicher Segmente Einigkeit, da diese mehrmals im Kerninneren gefunden wurden. So wurden zum Beispiel Entdeckungen gemacht, die aussagen, dass Gene eher im Inneren des Kerns liegen, wobei nicht zwischen aktiven und inaktiven Genen unterschieden wurde. Außerdem konnte festgestellt werden, dass bestimmte Verteilungsmuster, die den Abstand zwischen Genlocus und Kernrand betreffen, sogar in differenzierenden Zellen und nach erfolgter DNA-Reparatur nach Bestrahlung erhalten bleiben (Skalnikova et al, 2000).

Untersuchungen an humanen Lymphozyten und Fibroblasten bestätigen dies, da sie ergaben, dass sich gedichte, hoch exprimierte Bereiche weiter im Kerninneren befinden als genarme, wenig bis gar nicht exprimierte Sequenzen. Daraus resultierte die Aussage, dass die Lage von Genen eher mit der Gendichte als mit der Expression korreliert (Küpper et al, 2007). Dass die Lokalisation bestimmter Gene keinen Einfluss auf ihre Expression hat, zeigten Untersuchungen an α - und β -Globingenen in erythroiden und nicht-erythroiden Zellen. Die Studien ergaben, dass das α -Globingen sich in beiden Zelltypen an derselben Stelle befand, obwohl es nur in erythroiden Zellen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu, veränderten die β -Globingene ihre Position. Im inaktiven Zustand befanden sie sich an centromerischem Heterochromatin, im aktiven Zustand dagegen waren sie von diesem Bereich entfernt (Baxter et al, 2002).

Weitere Studien, die ebenfalls die Expression der α - und β -Globingene jedoch nur in Erythroblasten betrafen, entsprechen diesen Beobachtungen. Die Expression dieser Gene ist einer starken Regulation unterworfen, um zu gewährleisten, dass ihre Proteine in gleichmäßigen Mengen produziert werden und damit ihre Expression auf bestimmte Entwicklungsstadien und Gewebe beschränkt bleibt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Gene in Bereichen des Kerns befinden, die von konstitutivem Heterochromatin entfernt sind. Diese heterochromatischen Bereiche liegen in Erythroblasten an der Kernoberfläche (Brown et al, 2001).

Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse einer neuen Arbeit, aus der hervorgeht, dass still gelegte Gene in der Kernperipherie zu finden sind und dort vor allem in der Nähe von heterochromatischen Bereichen. Aktive Gene befinden sich dagegen im Kernzentrum, wo auch die Expression stattfindet. Des Weiteren wurde gefunden, dass ko-regulierte Gene, sowie zelllinien-spezifische Gendomänen beieinander liegen (Kosak et al, 2007).

Gerade für die vorliegende Arbeit spielt auch die Positionierung von Genen nach einer Änderung des Expressionsstatus eine wichtige Rolle. Eine Änderung der Genexpression kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, wobei die Zelldifferenzierung häufig mit Genregulation in Verbindung gebracht wird, oder das Auftreten externer Stimuli.

Zunächst soll auf Untersuchungen eingegangen werden, die sich auf differenzierende Zellen konzentrieren.

Die Erforschung reifender Granulozyten zeigte, dass die Veränderung in der Genpositionierung, welche die Entwicklung der Zellen mit sich brachte, keine Auswirkungen auf die Expression hatte (Bartova et al, 2002).

Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen der T-Zell-Differenzierung in der Maus. Diese Differenzierung startet bei den doppelt negativen (DN)-Zellen (CD4 und CD8 negativ), die zu doppelt positiven (DP)-Zellen (CD4 und CD8 positiv) werden und welche sich dann in (CD4+CD8-)- und (CD4-CD8+)-Zellen auftrennen. Folgende Beobachtungen wurden gemacht: Bezüglich des CD4-Locus sah man keine Veränderungen zwischen DN- und DP-Zellen. In (CD4+)-Zellen lag der Locus weiter innen im Zellkern und in (CD8+)-Zellen eher in der Kernperipherie. Das bedeutet, dass die radiale Position nicht streng mit der Expression korreliert. Der CD8-Locus zeigt in den Vorläuferzellen DN und DP keine Veränderung und auch in den (CD4+)- und den (CD8+)-Zellen war keine Positionsänderung feststellbar. Dies bestätigt die Annahme, dass Position und Expression nicht streng korrelieren und daher Positionsänderungen nicht vorhersagbar sind (Kim et al, 2004).

Ähnliche Erkenntnisse erbrachten Untersuchungen, die an der Positionierung des Lysozymgens in verschiedenen hämatopoetischen Zellen des Huhns durchgeführt wurden. Dieses Gen, das sich auf Chromosom #1 befindet, wird während der Differenzierung hin zum reifen Makrophagen nach und nach aktiviert wird. Das Lysozymgen liegt in myeloiden Vorläuferzellen im Inneren des CTs, wohingegen es in späteren Differenzierungsstadien mehr in der Peripherie des Territoriums gefunden wird. Jedoch macht das Centromer des Chromosoms #1 eine ähnliche Positionsänderung durch. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Repositionierung von Genen während der Differenzierung eine Konsequenz der

Morphologieänderung des Territoriums sein könnte und nicht zwangsläufig mit der Veränderung der Expression zusammen hängt (Stadler et al, 2004).

Die Erforschung des Proteolipid (PLP)- und des Myelin-basic-Protein- (MBP)-Gens in Oligodendrozyten aus männlichen Ratten untermauerten diese Aussage nochmals. Die beiden Gene werden sowohl in der Differenzierung in vivo, als auch in vitro hochreguliert. PLP, das mit zunehmender Hochregulierung mehr Kontakt zu SC-35 Speckles zeigt, behält dennoch seine Position in einem ca. 1,5 μm breiten Streifen an der Kernperipherie, unabhängig vom Transkriptionsstatus. Außerdem zeigte sich keine Kolokalisation zwischen PLP und MBP, obwohl beide Gene in gleichem Maße hoch reguliert werden. (Nielsen et al, 2002).

Diese Erkenntnisse widersprechen den Ergebnissen, die Untersuchungen der HoxB-Cluster in Maus-ES-Zellen vor und nach der Behandlung mit Retinsäure, erbrachten. Anhand von FISH-Signalen wurde jeweils die Distanz des Gens zum nächstgelegenen Rand des CTs untersucht. In unbehandelten und somit undifferenzierten Zellen lagen HoxB1 und HoxB9 innerhalb des CTs (#11). Am vierten Tag nach der Retinsäure-Behandlung war HoxB1 aktiv und wurde außerhalb des CTs gefunden, HoxB9 dagegen war noch inaktiv und befand sich auch noch innerhalb des Territoriums. Am zehnten Tag nach der Behandlung war HoxB1 wieder inaktiv und wieder im CT, jedoch weiter außen als in unbehandelten Zellen. HoxB9 wurde an diesem Tag an der Grenze des CTs gefunden und zeigte auch einen Loop, der aber nicht ganz so stark war wie bei HoxB1. Bezogen auf den Zellkern wurden folgende Beobachtungen gemacht: HoxB1 wird an Tag 4 nach der Retinsäure-Behandlung weiter innen im Zellkern gefunden und kehrt später wieder an seine Ausgangsposition zurück und auch HoxB9 wandert zwischen Tag 4 und Tag 10 etwas in Richtung Kernmitte (Chambeyron et al, 2004).

In den Arbeiten, die im Folgenden beschrieben werden, wurden Reagenzien eingesetzt, die die Expression der untersuchten Gene aktivierten.

So zeigten Untersuchungen des MHC-Komplexes, die in verschiedenen menschlichen Zellen durchgeführt wurden, in Fibroblasten eine schwache bis keine Expression der dafür zuständigen Gene. Die Stimulation der Zellen mit IFN- γ jedoch erhöhte die Expression, was zu einem vermehrten Ausloopen der entsprechenden Chromatinbereiche führte. In der untersuchten lymphoblastoiden Zelllinie, in der die MHC-Gene konstitutionell aktiv sind, wurden noch mehr Loops gefunden als in Fibroblasten (Volpi et al, 2000).

Davon abweichende Resultate lieferten Beobachtungen der β -Globin ähnlichen Gene in K562-Zellen vor und nach der Stimulation mit Interleukin-3 (IL-3). Dieses bewirkt die Aktivierung des β -Globin-Gens. Innerhalb des Zellkerns wiesen die β -Globin ähnlichen Gene

sowohl vor, als auch nach der Stimulation eine ähnliche Positionierung auf. Allerdings wird das CT#11 und sein Centromer nach der Stimulation näher an die Peripherie gezogen und es treten Chromatinschleifen auf, die die β -Globin ähnlichen Gene tragen (Galiova et al, 2004).

5. Beschreibung der relevanten Systeme

Im Folgenden sollen die biologischen Systeme, die für die Arbeit benutzt wurden dargestellt und erläutert werden.

5.1. Das CALM-AF10 System

In der vorliegenden Arbeit wurde die regulationsabhängige Positionierung von Genen in einem Zellsystem untersucht, in die Expression des Onkogens CALM-AF10 angeschaltet werden kann. Das Vorhandensein des Genprodukts von CALM-AF10 hat Auswirkungen auf die Expression anderer Gene, von denen drei bezüglich ihrer Positionierung im Zellkern vor und nach CALM-AF10-Aktivierung, in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollen.

CALM-AF10 ist ein Fusionsgen, das durch Translokation der Chromosomen 10 und 11 (t(10;11)(p13;q14)) (Bohlander et al. 2000) entsteht und bei Patienten, die an verschiedenen Formen von Leukämien leiden, z.B. der akuten myeloblastischen Leukämie (AML), in akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) sowie in malignen Lymphomen nachgewiesen wurde. Da es sich hierbei um besonders aggressive Formen der Leukämie handelt, die bereits in jungen Jahren auftreten und nur geringe Überlebenseaussichten haben, ist es von klinischer Relevanz, mehr über die Wirkungsweise dieses Fusionsgens, das zuerst in der monozytischen Zelllinie U937 entdeckt wurde (Dreyling et al. 1996), auch auf andere Gene und deren Aktivität herauszufinden.

Zu den beiden Genen, die das Fusionsprodukt „CALM-AF10“ bilden ist folgendes zu sagen: Das CALM-Gen (Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia gene) liegt auf Chromosom 11 und codiert ein 652 AS großes Protein, das ubiquitär exprimiert wird und ein Homolog des Neuronen-spezifischen Adapterproteins 3 (AP-3) darstellt (Krause, 2006). Das Protein des CALM-Gens befindet sich vor allem im Zytoplasma, wo es mit dem Golgi-Apparat und der Zellmembran assoziiert ist, da es eine wichtige Rolle in der Clathrin-vermittelten Endozytose spielt. Das AF10-Gen (ALL 1 fused gene from chromosome 10) codiert ein 1027 AS großes Protein, das am N-terminalen Ende eine LAP/PHD-Finger-Domäne (LAP = Leukemia-associated-protein, PHD = plant homeodomain) besitzt, auf die eine Cystein-reiche Region (CRR), ein AT-hook, ein NLS (nukleares Lokalisationssignal) und ein C-terminales Oktapeptid/Leucin-zipper-Motiv (OMLZ) folgt. Aufgrund von Immunfärbungen weiß man,

dass sich das Protein im Zellkern aufhält, wo es vermutlich als Transkriptionsfaktor fungiert (Krause, 2006). Man findet AF10 auch als Fusionspartner des MLL-Gens und die zuvor erwähnte OMLZ-Domäne ist sowohl bei MLL-AF10, als auch bei CALM-AF10 für eine maligne Entwicklung verantwortlich (DiMartino et al, 2002). Außerdem interagiert AF10 über die OMLZ-Domäne mit der Histon-Methyltransferase hDOT1L, wodurch die Expression von Genen (z.B. Hoxa9) verstärkt wird, die mit der Leukämie-Entstehung in Zusammenhang stehen (Okada et al, 2005, 2006).

Über weitere Eigenschaften des CALM-AF10-Proteins ist bisher nur wenig bekannt, jedoch weiß man, dass es sich im Cytoplasma befindet und die Lokalisation des Proteins Ikaros verändert, welches mit AF10 interagiert (Greif et al, 2007).

Es gibt zwei Produkte der Fusion von CALM und AF10, CALM-AF10 und AF10-CALM, wobei es sich bei AF10-CALM lediglich um ein, am C-Ende abgeschnittenes, AF10-Protein handelt. Das Fusionsgen CALM-AF10 hingegen beinhaltet nahezu das gesamte CALM-Gen, sowie den größten Teil des AF10-Gens (s. Abb. I.3.).

Da man nur diese Form des Fusionsgens in Leukämiepatienten findet und nur sehr selten zusätzlich seine reziproke Form, ist es sehr wahrscheinlich, dass CALM-AF10 zur Krebsentstehung beiträgt.

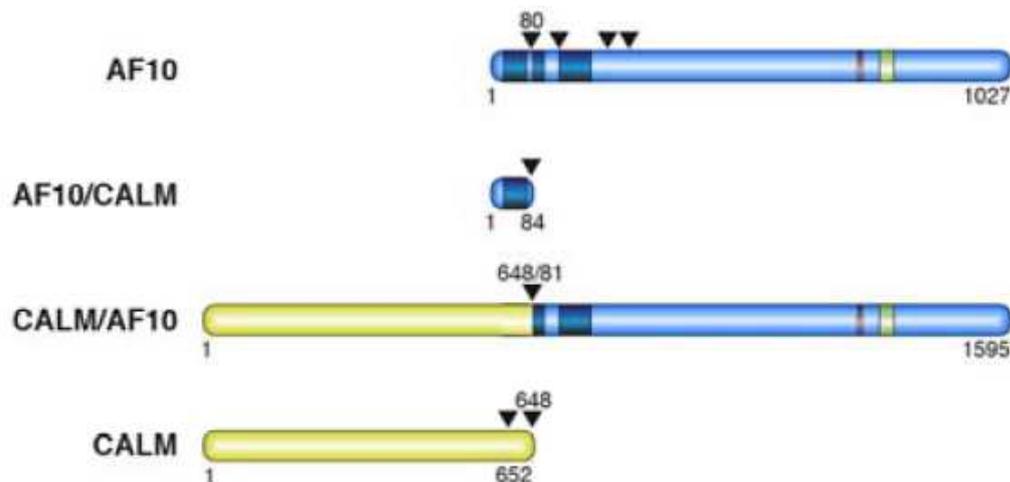


Abb. I.3.: Darstellung der Fusionsprodukte von CALM und AF10.

Das CALM-AF10-Fusionsgen konnte erfolgreich in den Vektor pRTS-1 (Bornkamm et al. 2005) kloniert werden, wodurch die Expression des Gens, mit Hilfe eines Tet on-Systems, induzierbar ist (s. Abb. I.4.).

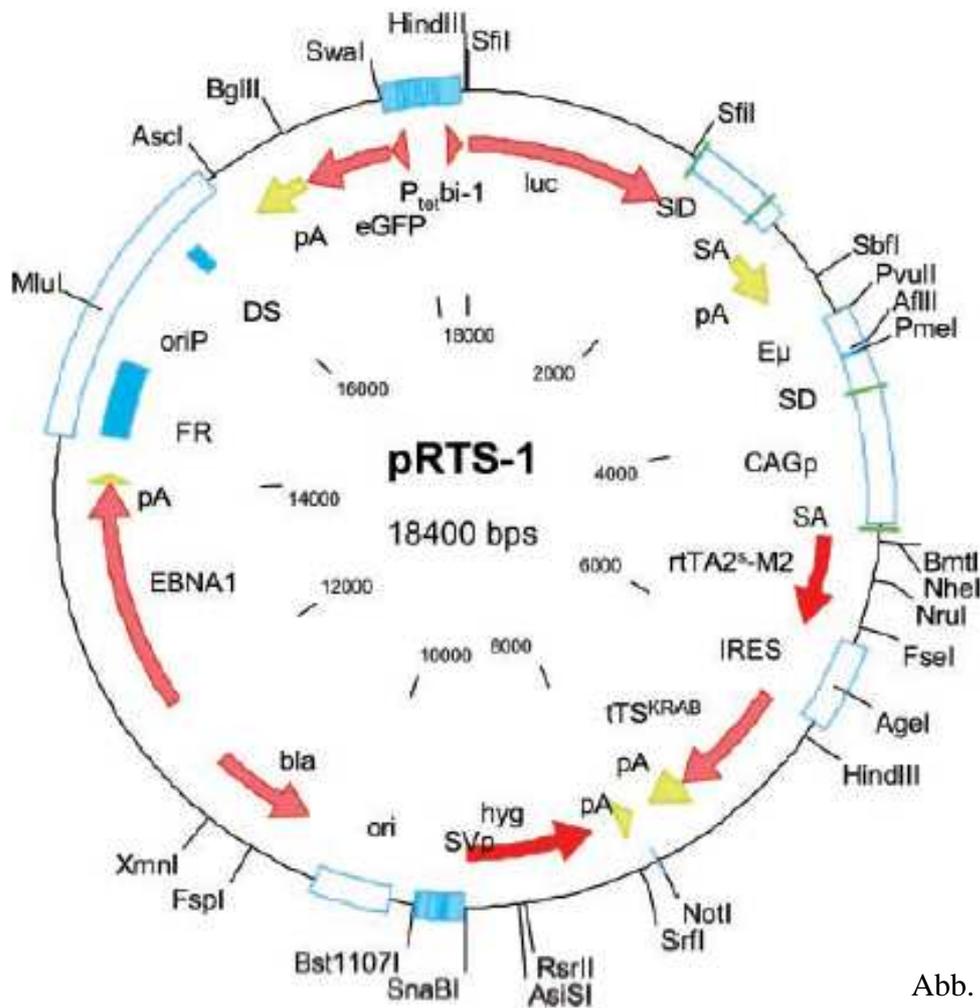


Abb. I.4.: Schematische Darstellung des Vectors pRTS-1.
Bornkamm et al. 2005

Dieser Vektor konnte von der AG Prof. Stefan Bohlander (Helmholtz-Zentrum, München) in verschiedene Zelllinien transfiziert werden. Unter anderem in die Pro-B-Zelllinie DG75, die aus einem Burkitt-Lymphom stammt (American type culture collection, www.atcc.org). Das CALM-AF10-Fusionsgen wird dabei, zusammen mit der Transkriptionsaktivierungsdomäne VP16, anstelle des in Abb. I.5. eingezeichneten Luciferase-Gens eingebaut.

Weiterhin trägt das Plasmid folgende, für die Funktion unerlässliche, Komponenten (s.Abb.I.5.):

Um eine Replikation des Plasmids überhaupt erst zu ermöglichen ist ein Replikationsursprung, ein sog. *ori*, nötig. Das Gen *EBNA-1*, das eine Komponente des Epstein Barr Virus darstellt ist dafür verantwortlich, dass das Plasmid in episomaler Form innerhalb

der Zellen vorliegt. Um Zellen mit Plasmid selektionieren zu können ist ein Puromycin-Resistenzgen, *PurR*, nötig. Einer der wichtigsten Bausteine des Plsmids ist der bidirektionale Promotor $P_{tet}bi-1$, der umrahmt von zwei Genen liegt, deren Expression er gleichzeitig aktiviert. Dieser Promotor lässt sich über ein tet-on-System (Tetracyclin-regulatable gene expression system) durch die Zugabe von Doxycyclin, einem Derivat des Tetracyclins induzieren. Die beiden Gene, die den Promotor umschließen sind das Fusionsgen *CALM-AF10* und *eGFP* (enhanced green fluorescent protein), wobei das Gen für eGFP als Markergen dient. Dieses ruft nämlich durch seine Expression eine Grünfärbung der Zellen hervor und zeigt somit an, dass auch das Fusionsgen CALM-AF10 aktiv ist.

Auf dem Plasmid befindet sich außerdem als zusätzlicher Regulator des tet-on-Systems, eine bicistronische Expressionskassette, die ohne das Vorhandensein von Doxycyclin den Repressor tTS^{KRAB} exprimiert. Dieser legt den bidirektionalen Promotor $P_{tet}bi-1$ still, was zur Folge hat, dass die Expression von eGFP und CALM-AF10 weitestgehend unterbunden wird. Gibt man den Zellen jedoch Doxycyclin zu, so wird die Expression des Repressors gestoppt und gleichzeitig die des Aktivators $rtTA2^s-M2$ aufgenommen. Dieser heftet sich an den Promotor und verstärkt die Expression von eGFP und CALM-AF10.

Zwischen dem bidirektionalen Promotor und CALM-AF10 liegt weiterhin die Transaktivierungsdomäne *VP16*, die die Expressionsrate der Zielgene von CALM-AF10 erhöht (Mulaw, 2009).

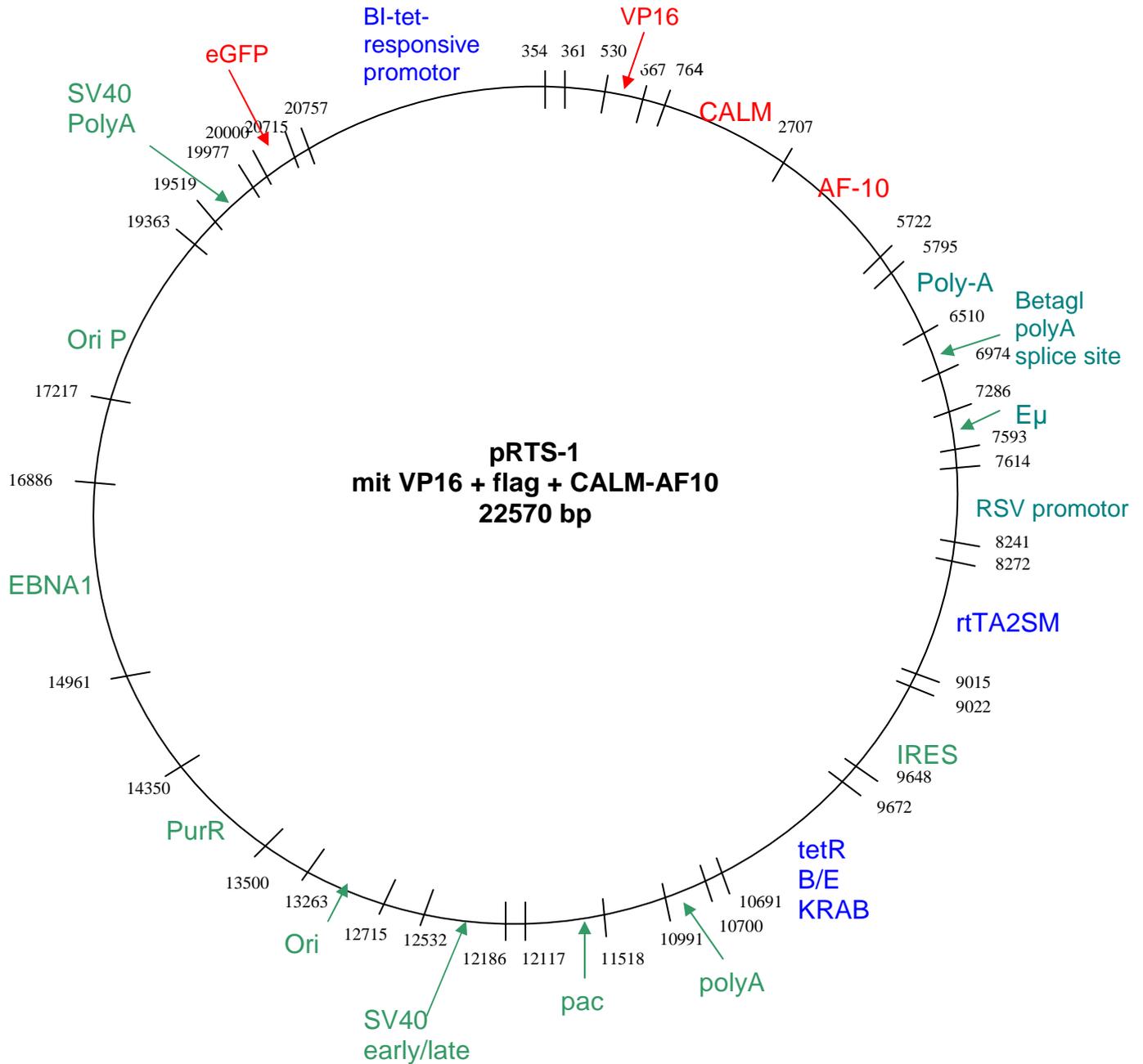


Abb.I.5.: Schematische Darstellung des modifizierten Vectors pRTS-1 mit dem CALM-AF10 Fusionsgen.

Diese Zellen mit dem so modifizierten Vektor bieten eine optimale Möglichkeit die Expression anderer Gene mit und ohne den Einfluss der Expression des Fusionsgens zu vergleichen.

Für diesen Teilbereich der Arbeit ist die Messung der Genexpression absolut unerlässlich, weshalb im Folgenden darauf eingegangen werden soll.

5.2. Messung der Genexpression

Um Aussagen über die Regulation von Genen machen zu können, ist es Voraussetzung, die Expression eines Gens in verschiedenen Zuständen der Zelle, z.B. vor bzw. nach Zugabe einer stimulierenden Substanz, zu kennen. Für die Messung von Genexpression gibt es im Wesentlichen drei verschiedene Methoden: Northern Blotting oder SAGE-Analysen (serial analysis of gene expression) sind dabei die mittlerweile überholten Methoden, da hierfür jeweils nur wenige Gene anhand von radioaktiv markierten Sonden untersucht werden konnten, und dafür hohe Kosten anfallen. Bei den beiden moderneren Methoden handelt es sich um die Gene Chip-Technologie und verschiedene PCR-basierte Methoden. Beides wurde im Rahmen der Arbeit angewendet, und die Ergebnisse verglichen.

Gene Chip Technologie

Die Gene Chip Technologie basiert darauf, dass eine Vielzahl kurzer DNA-Fragmente auf einer Quarz-Oberfläche chemisch synthetisiert wird, wobei genau bekannt ist, an welcher Stelle auf dem Quarz-Chip welches Oligonucleotid (dessen Sequenz genau bekannt ist) lokalisiert ist. Auf diesen Chip wird dann die fluoreszenzmarkierte Probe aus dem gewünschten Gewebe hybridisiert und detektiert. Damit ist es möglich tausende Proben gleichzeitig und mit hoher Genauigkeit zu untersuchen. Die Menge des emittierten Lichts ist dabei proportional zur Menge der gebundenen Probe.

Die Methode eignet sich sowohl zum Sequenzieren von DNA als auch zum Quantifizieren von mRNA-Mengen, und damit zur Bestimmung der Genexpression.

Die PCR-basierten Methoden zur Messung der Genexpression gehen von der genkodierenden mRNA aus. Ist ein Gen in einem bestimmten Zelltyp hoch exprimiert, ist viel mRNA für dieses Gen vorhanden, in der reversen Transkription, die zumeist Bestandteil der Methode ist, wird viel cDNA dieses Gens hergestellt, so dass für eine dann folgende genspezifische PCR viel Ausgangsmaterial zur Verfügung steht, so dass am Ende auch viel PCR-Produkt entstehen wird. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Arten dieser PCR-basierten Messung der Genexpression verwendet: (1) die semiquantitative RT-PCR und (2) TaqMan-PCR in Form von Low Density Arrays. Beide Methoden haben gemeinsam, dass zunächst aus dem zu untersuchenden Zelltyp die RNA isoliert werden, und in cDNA umgeschrieben werden muss. Da es drei Hauptarten von RNA, rRNA, tRNA und mRNA gibt, aber nur die mRNA genkodierend ist, sollte in der reversen Transkription nach Möglichkeit nur die mRNA in cDNA umgewandelt werden. Dazu bedient man sich der Besonderheit der mRNA, dass sie einen Poly-A-Schwanz besitzt, den die anderen RNA-Typen nicht haben. Die cDNA-Synthese, wofür das Enzym reverse Transkriptase verwendet

wird, wird also mit Oligo-dT-Primern durchgeführt, die genau an dieses Poly-A-Ende binden, und von dort aus die cDNA-Synthese beginnt. Nach Ablauf der reversen Transkription und Abverdau der ab diesem Zeitpunkt nicht mehr benötigten RNA durch zwei verschiedenen RNasen, wird dann je nach angewandeter Methode unterschiedlich fortgefahren. Auf beide Methoden soll im Folgenden kurz eingegangen werden:

(1) Semiquantitative RT-PCR

Die RT-PCR ist genspezifisch, da die verwendeten Primer genau auf das zu untersuchende Gen abgestimmt sind. Sie werden mit einer speziellen Software designed (z.B. Fast-PCR). Bei der Auswahl der Primer sollte darauf geachtet werden, dass der reverse Primer im 3'UTR-Bereich des Gens liegt, da dieser Abschnitt einen geringen GC-Gehalt aufweist, wenige repetitive Elemente und auch kaum Duplikationen enthält. Der forward Primer sollte im vorletzten Exon gesucht werden, so dass die Fragmentlänge des Produkts zwischen 200 und 500 bp liegt.

In die PCR wird die cDNA unverdünnt sowie als 1:10- und 1:100-Verdünnung eingesetzt, damit man in der später folgenden Gelelektrophorese einen Abfall in der Menge des spezifischen PCR-Produkts sehen kann. Das verwendete Gel muss einen höheren Agaroseanteil (~1,8 %) besitzen als andere Gele, damit es engmaschiger ist, da die entstehenden DNA-Fragmente sehr klein sind und auf diese Weise eine gute Auftrennung der Fragmente gewährleistet ist.

Sind bei der höchsten cDNA-Konzentration keine oder nur schwache Banden erkennbar, so spricht dies für eine sehr niedrige bzw. keine Expression des Target-Gens. Kann man dagegen bereits bei der niedrigsten Konzentration eine spezifische Bande erkennen, die mit steigender Konzentration stärker wird, dann wird das untersuchte Gen sehr hoch exprimiert.

Diese Methode ist, wie ihr Name schon sagt, nur semiquantitativ, weshalb zur genaueren Überprüfung der Genexpression eher die Real-Time-PCR dient.

(2) TaqMan-Real-Time PCR (Low density arrays)

Die Real-Time-PCR ermöglicht im Gegensatz zur zuvor beschriebenen Methode eine sehr genaue Quantifizierung der Genexpression.

Das Prinzip dieser Methode unterscheidet sich insofern von dem der semiquantitativen RT-PCR, als dass hier mit einem Farbstoff (z.B. SybrGreen) gearbeitet wird, der an doppelsträngiger DNA, also an die Produkte der PCR bindet. Bei jedem Zyklus wird die emittierte Fluoreszenz gemessen, die mit den neu synthetisierten PCR-Produkten, im Laufe der Reaktion ansteigt. Auf diese Weise entsteht eine Kurve, die den Anstieg der Fluoreszenz wiedergibt und anhand derer die Quantifizierung erfolgt (Vandesompele et al, 2002).

Eine Verbesserung dieser Methode konnte durch die Einführung einer zusätzlichen Sonde, namens TaqMan, erreicht werden, die der Anwendung auch ihren Namen gibt. Diese Sonde ist mit einem Reportermolekül und einem Quencher markiert und bindet an spezifische Stellen im zu untersuchenden Gen. Im Verlauf der PCR wird der Quencher durch eine Polymerase, die 5'-3'Exonuklease-Aktivität besitzt, abgetrennt. Dadurch steigt die Fluoreszenz des Reportermoleküls an. Der Vorteil dieser zusätzlichen Sonde besteht in der absolut spezifischen Fluoreszenz, die nur vom PCR-Produkt ausgeht.

Eine Anwendung dieser TaqMan-Assays findet sich in Low-Density Arrays. Diese folgen zwar dem gleichen Prinzip, allerdings in größerem Maßstab. Daher eignen sie sich besonders gut für die Untersuchung mehrerer Gene aus verschiedenen Zelllinien. Durchgeführt werden die LDAs mit Hilfe von Plastikplatten, die in kleine Kammern unterteilt sind (s. Abb. I.6). Pro Platte gibt es mehrere Bahnen, die von einem „Hauptast“ abzweigen. Da jede Kammer bereits einen spezifischen Primer und die TaqMan-Sonde enthält, muss in die obere Öffnung nur noch die jeweilige cDNA und der Mastermix gegeben werden, die sich von dort auf die einzelnen Kammern verteilen. Auf diese Weise können bis zu 384 Gene gleichzeitig untersucht werden.

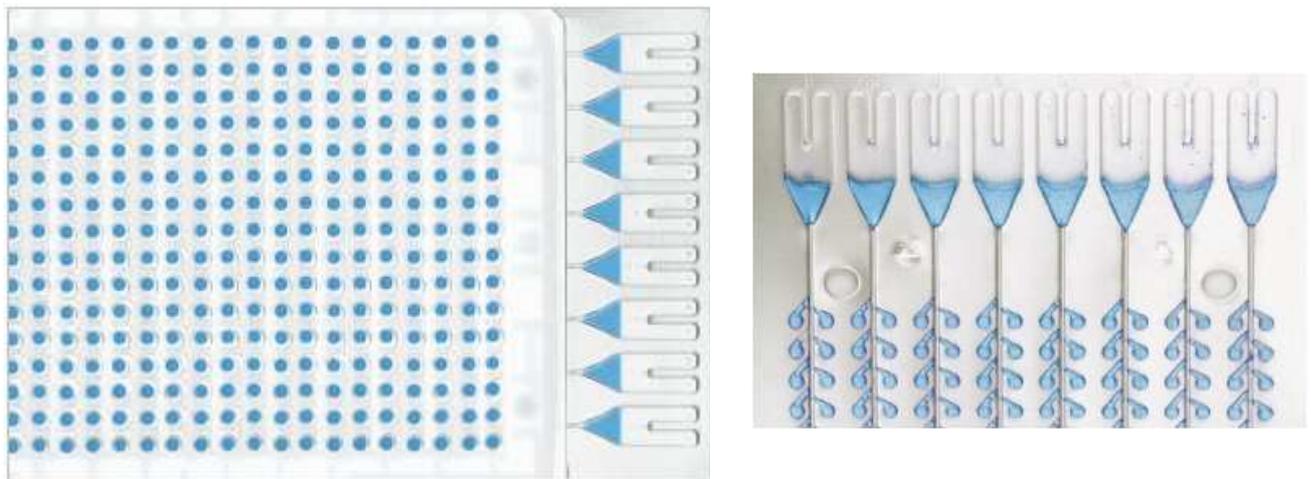


Abb. I.6.: Platten für Low Density Arrays
Quelle: Applied Biosystems

5.3. Histonmodifikationen

Histone sind evolutionär hochkonservierte Proteine. Dabei sind sowohl die Aminosäuresequenz als auch die Länge der Sequenzen sogar zwischen sehr verschiedenen Organismen annähernd gleich (DeLange, 1969a; DeLange, 1969b).

Alle Histonproteine besitzen eine C-terminale Domäne, über die Kontakt mit anderen Histonen oder DNA-Abschnitten möglich ist, und eine N-terminale Domäne, an denen Modifikationen stattfinden, die mit der Regulierung der Kompaktierung in Verbindung stehen und damit einen Teil der Epigenetik ausmachen (Arents et al., 1991). Der Begriff Epigenetik bedeutet eine Informationsweitergabe (Regulation der Genexpression) von einer Zelle an die Tochterzellen, wobei, im Gegensatz zur genetischen Informationsweitergabe, die Informationen nicht über die DNA-Sequenz codiert sind, sondern dem Chromatin in post-replikativer Modifikation aufgeprägt wurden (Kouzarides, 2007).

Gerade an H3 und H4 findet man solche Modifikationen, wobei unterschiedliche Aminosäure-Reste unterschiedliche Anzahlen und Arten an Modifikationen wie Methylierung, Acetylierung und Phosphorylierung tragen können (Paik and Kim, 1971). Insgesamt sind acht verschiedene Modifikationen bekannt, wobei die Methylierung bislang am besten untersucht ist.

Alle diese verschiedenen Modifikationen werden unter dem Begriff „Histoncode“ zusammengefasst (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000; Turner et al. 2000), der folgendes aussagt:

- Verschiedene Modifikationen an Histonschwänzen ermöglichen Interaktionen mit anderen Chromatin-assoziierten Proteinen
- Verschiedene Modifikationen an ein und demselben oder unterschiedlichen Histonschwänzen sind voneinander abhängig und erzeugen so verschiedene Kombinationen von Modifikationen, die zu einem einzigartigen biologischen Output führen
- Die verschiedenen Zustände von Chromatinstrukturen sind zum großen Teil abhängig von Histonmodifikationen

Damit hängen viele Prozesse, wie die Bildung von Eu- oder Heterochromatin, das An- und Abschalten von Genen, Zellteilung und –differenzierung etc. mit den Histonmodifikationen zusammen (Jenuwein and Allis, 2001).

Im Gegensatz zur Histon-Acetylierung, die ihre Effekte hauptsächlich durch die Veränderung der Ladungen erreicht (Gorisch et al., 2005), wirkt die Histon-Methylierung durch das Rekrutieren von anderen Proteinen, z.B. für Transkription, Splicing und Reparatur, an die DNA (Sims et al., 2003). Einzigartig für die Histon-Methylierung ist, dass sie verschiedene Wirkungen haben kann, was von der Methylierungsstelle und der Anzahl der angehängten Methylgruppen abhängt. So ist me³-H3K4 meist mit aktiven Genen assoziiert (Santos-Rosa et al., 2002) und me³-H3K9 ist häufig an stillgelegten Loci zu finden (Lachner and Jenuwein, 2002). Gerade die Trimethylierungen sind sehr stabil und werden oft von Zellgeneration zu Generation weitergegeben (Lachner et al., 2004; Reinberg et al., 2004). Daher sollen in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene trimethylierte Histonmodifikationen an Histon H3 in normalen und malignen hämatopoietischen Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Experimenten untersucht werden. Bei den untersuchten Modifikationen handelt es sich um me³-H3K4, me³-H3K9 und me³-H3K27, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll.

5.3.1. Me³-H3K4

Die genomweite Untersuchung von me³-H3K4 wurde zunächst mittels ChIP (Chromatin Immunopräzipitation)-Techniken in Mensch und Maus durchgeführt (Bernstein et al., 2005; Martens et al., 2005; Schneider et al., 2004; Schubeler et al., 2004). Es wurde herausgefunden, dass me³-H3K4 einen epigenetischen Marker für aktiv transkribierte Gene darstellt, sowohl in Tetrahymena, Hefen und höheren Eukaryonten (Dehe and Geli, 2006; Strahl et al., 1999, Ng et al., 2003, Schneider et al., 2004). Mit Bildung heterochromatischer Bereiche nimmt der trimethylierte Zustand jedoch ab, was aber in einem langsamen, mehrere Zellzyklen beanspruchenden Zeitraum abläuft (Katan-Khaykovich and Struhl, 2005). Auch wenn widersprüchliche Feststellungen über me³-H3K4 in der Literatur kursieren, z.B., dass me³-H3K4 eine Funktion in der aktiven Repression von Genaktivität hat (Shi et al., 2006), oder me³-H3K4 auch an inaktiven Globulinen gefunden wurde (Schneider et al., 2004), kann man jedoch allgemein sagen, dass me³-H3K4 ein Marker für aktiv transkribiertes Chromatin, also Euchromatin darstellt.

5.3.2. Me3-H3K9

Trimethyliertes H3K9 stellt in allen bislang untersuchten Organismen, von *S.pombe* bis hin zu höheren Säugetieren, einen Marker für das constitutive Heterochromatin dar (Lehnertz et al., 2003; Martens et al., 2005; Rea et al., 2000; Rice et al., 2003, Lachner et al., 2004) und ist häufig mit dem centromerischen Heterochromatin assoziiert (Zinner et al. 2007).

Dabei lässt sich die Funktion von me3-H3K9 über HP1 erklären. So bildet me3-H3K9 eine Bindestelle für die Chromodomäne von HP1, und rekrutiert die Histon-Methyltransferase Suv39h1, die wiederum weitere Methylgruppen überträgt und somit für die Bildung von weiteren heterochromatischen Bereichen verantwortlich ist (Aagaard et al., 1999, Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Weiterhin hat me3-H3K9 die Aufgabe den Fortgang der Mitose und die Segregation der Chromosomen voranzutreiben (Melcher et al., 2000).

5.3.3. Me3-H3K27

Trimethyliertes H3K27 erlangte einen Großteil seiner Berühmtheit durch die Verbindung mit fakultativen Heterochromatin, vor allem mit dem inaktiven X-Chromosom (Okamoto et al., 2004; Plath et al., 2003; Silva et al., 2003). In weiblichen Organismen wird eines der beiden X-Chromosomen während der Entwicklung in Form von fakultativem Heterochromatin stillgelegt, wodurch über 1000 Gene abgeschaltet werden (Lyon, 1999). Die Schlüsselposition im Vorgang der X-Inaktivierung ist dabei das X-Inaktivierungszentrum (XIC), das sicherstellt, dass nur eines der beiden Chromosomen stillgelegt wird. Das geschieht über die Expression der nicht-kodierenden XIST-RNA (Avner and Heard, 2001), die das zu inaktivierende X-Chromosom einhüllt, was eine Geninaktivierung nach sich zieht, die sich schließlich über das gesamte Chromosom erstreckt (Okamoto et al., 2004; Panning et al., 1997; Sheardown et al., 1997). Me3-H3K27 ist jedoch nicht Xi-spezifisch, sondern wird auch an anderen stillgelegte autosomalen Genen gefunden (Brinkman et al., 2006). Me3-H3K27 scheint auch bei der Entstehung von Laminopathien eine Rolle zu spielen. In Zellen von Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom-Patienten, die an übermäßig schneller Alterung bereits im Kindesalter leiden, wurde ein Verlust von me3-H3K27 am inaktiven X festgestellt (Shumaker et al., 2006). Im Gegensatz zu den anderen beiden hier beschriebenen Histonmodifikationen, tritt me3-H3K27 evolutionär erst später auf, denn Hefen haben noch kein me3-H3K27. es scheint erst im Zuge der Vielzelligkeit und mit Entwicklung des Polycomb-systems aufzutreten und für die Stabilität der Genexpression eine wichtige Rolle zu spielen (Lachner et al., 2004).

5.3.4. Literatur zu Histonmodifikationen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen zu Histonmodifikationen an Blutzellen durchgeführt, da man hierzu in der Literatur verschiedene Angaben über Vorkommen und Verteilung von Histonmodifikationen und ihre Positionierung im Zellkern findet.

Eine Studie (Baxter et al., 2004), beschreibt eine Hypomethylierung von Histonen in ruhenden im Vergleich zu zyklierenden Lymphozyten, die einen Indikator für die epigenetische Plastizität für diesen Zelltyp darstellen soll. In dieser Studie wurden Methylierungen von H3K4, H3K9, H3K27 und anderen Histonen untersucht und dabei ruhende mit cyclierenden Lymphozyten verglichen. Sie fanden heraus, dass in ruhenden B-Lymphozyten deutlich weniger me³-H3K9 auftritt als in solchen Zellen, die sich im Zellzyklus befinden. Dasselbe Ergebnis wurde für me³-H3K4 und me³-H3K9 gefunden. Dabei wurden sowohl Immunfluoreszenzfärbungen als auch Western Blottings eingesetzt. In cyclierenden B-Lymphozyten wurden die untersuchten Histon-Modifikationen in deutlich größerem Umfang gefunden. In Zusammenhang mit diesen Ergebnissen wird die verstärkte Reprogrammierungsfähigkeit der ruhenden Zellen gebracht, die auch in der Arbeit untersucht wurde. Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, dass während der Zelldifferenzierung Veränderungen in der Chromatinstruktur auftreten.

Im Jahre 2005 wurden zwei Studien mit kontroverserem Inhalt in Bezug auf die Histonmodifikationen in Granulozyten veröffentlicht. Lukasova et al. beschreiben dabei, dass me³-H3K9, das in CD34⁺ Vorläuferzellen durchaus nachzuweisen ist, ebenso wie in differenzierten Lymphozyten und Monozyten in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten fast nicht vorhanden sind. In Granulozyten von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie, in undifferenzierten und RA-differenzierten HL-60-Zellen ist diese Histonmodifikation allerdings sehr wohl zu finden, woraus geschlossen wird, dass die H3-Methylierung während der normalen Zelldifferenzierung dramatischen Veränderungen unterliegt. Dass die me³-H3K9-Methylierungen zu finden sind, wird damit erklärt, dass in diesen Zelltypen eine unvollständige DNA-Kompaktierung vorliegt, die mit der leukämischen Zellproliferation einhergeht.

Die andere Studie aus 2005, von Olins et al., untersucht Histonmodifikationen in normalen menschlichen und Mausgranulozyten mit Immunfärbung und Immunblotting-Techniken. Dabei wurde herausgefunden, dass sowohl me³-H3K9 als auch me³-H3K27 in humanen neutrophilen Granulozyten in gleichem Maße vorliegen wie in anderen normalen Blutzellen, beispielsweise Lymphozyten. Die Antikörper gegen tri-methylierte H3K9 und H3K27-

Modifikationen ließen sich in den Zellkernen als intensive fleckenartige Signale nachweisen, die in menschlichen Granulozyten vorzugsweise mit dem Heterochromatin kolokalisieren. Dies steht in starkem Gegensatz zu der vorher erwähnten Studie.

5.4. Das Prinzip der „komplexen Sonden“

Einer der wichtigsten Vorgänge innerhalb einer Zelle ist, dass die genetische Information in Proteine umgesetzt, also exprimiert wird. Da es jedoch unterschiedliche Zelltypen gibt, liegt es nahe, dass demnach auch unterschiedliche Gene verschieden stark exprimiert, also unterschiedlich viel mRNA gebildet, werden. Möchte man also visualisieren, wo in der Zelle Genexpression in besonders starkem Maße stattfindet, muss man die gebildete mRNA markieren und auf diesen Zelltyp oder auf Metaphasechromosomen dieses Zelltyps hybridisieren. Da RNA jedoch wenig stabil und besonders anfällig gegenüber überall auftretenden RNasen ist, wird die RNA, oder genauer gesagt die mRNA eines Zelltyps zunächst über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und dann mit verschiedenen Methoden amplifiziert und mit Haptenen oder Fluorochromen markiert. Somit können dann Hybridisierungsmixe erstellt werden, die genau das genetische Programm eines bestimmten Zelltyps wiedergeben, wobei natürlich hoch exprimierte Gene, von denen viel mRNA gebildet wird, stärkere Signale ergeben als weniger stark exprimierte Gene. Diese Hybridisierungsmixe können dann auf den gleichen Zelltyp gegeben werden, aus dem sie stammen und das entstehende Muster kann mit dem Muster desselben Hybridisierungsmixes auf einem anderen Zelltyp verglichen werden. Die aus der mRNA entstandenen Sonden werden als „komplex“ bezeichnet, da Menge und Art der Sonden nicht bekannt sind.

Für diesen Teilbereich der Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Amplifizierung und Markierung der cDNA verwendet, die nun beschrieben werden.

5.4.1. Genomiphi

Die Genomiphi ist eine äußerst effiziente Methode zur DNA-Amplifikation, die ausgesprochen einfach in der Handhabung, dafür jedoch nicht ganz billig ist. Sie beruht auf der Phi29 DNA-Polymerase, die hochprozessiv arbeitet und eine starke Strangverdrängungsaktivität hat. Außerdem werden zufällige Hexamer-Primer verwendet, so dass eine Amplifikation von sehr heterogenem Ausgangsmaterial, wie z.B. genomischer DNA, gewährleistet wird. So kann in der bei gleich bleibender Temperatur über Nacht ablaufenden Reaktion aus 1 ng DNA mehrere μg hergestellt werden. Dabei wird zunächst das Ausgangsmaterial bei 95°C denaturiert. Nach der Abkühlung der Proben auf 30°C wird erst

das Enzym zugegeben. Die Primer lagern sich an die komplementären Sequenzen in der Ausgangs-DNA an, die Polymerase kommt hinzu, die Polymerisation neuer DNA-Fragmente beginnt. Die bereits synthetisierten Fragmente werden durch sich neu an die DNA anlagernde Polymerasen abgehoben, so dass sehr schnell hintereinander weg DNA-Synthese stattfindet. Auch an den neu synthetisierten Strängen binden sofort wieder Primer, auch dort beginnt die Polymerisation neuer Fragmente. Der Arbeitsaufwand zum Ansetzen der Genomphi beträgt ca. 20 min, die Reaktion läuft über Nacht, dann wird die Polymerase, die sehr temperaturempfindlich ist, 10 min. bei 65°C inaktiviert, die DNA-Produkte können für weitere Reaktionen verwendet werden.

5.4.2. DOP-PCR

Die DOP-PCR (Telenius et al. 1992, Fiegler et al. 2003) hingegen beruht auf der Verwendung degenerierter Primer. Diese Primer ermöglichen die Amplifikation jeder beliebigen DNA-Sequenz. „degeneriert“ heißt dabei, dass der Primer im mittleren Abschnitt aus beliebig eingesetzten Nucleotiden besteht. Insgesamt besteht ein solcher Primer aus drei Bereichen: Am 3'Ende ist ein Bereich mit sechs spezifischen Nucleotiden zu finden, dann folgen die sechs unspezifischen Nucleotide, die in einem DNA-Template mehrere mögliche Bindungsstellen findet. Der 5' Bereich des Primers ist wieder mit spezifischen Nucleotiden ausgestattet, die erst später im Ablauf der PCR-Reaktion eine Rolle spielen. Die PCR läuft folgendermaßen ab:

Zunächst wird, wie in jeder PCR-Reaktion üblich, die Ausgangs-DNA denaturiert. Dann folgen 8 Zyklen mit niedriger Stringenz, die es dem degenerierten Primer ermöglichen, auch an nicht ganz passende Stellen zu binden, so dass von dort aus die ersten Produkte mittels der Taq-Polymerase entstehen. Diese Produkte tragen jeweils an den Enden die Sequenz der Primer. Dann folgen 35 sehr stringente PCR-Zyklen, in denen nur noch eine korrekte Bindung der Primer möglich ist, d.h. die Primer lagern sich an die endständigen Primersequenzen der bereits entstandenen Fragmente an. Diese Fragmente werden damit exponentiell vermehrt. Die so entstehenden Fragmente haben eine Länge von 200-2000 bp.

Nach der Amplifikation des DNA-Materials muss es mit Haptenen oder Fluorochromen markiert werden, um später auf Metaphase-Chromosomen oder in Interphase-Zellkernen nachgewiesen werden zu können. Auch für die Markierung der DNA gibt es zwei mögliche Methoden:

(1) Label-PCR

Die Label-PCR, die auf der DOP-PCR basiert, jedoch ohne niedrig stringente Zyklen, dafür aber mit markierten Nucleotiden gefahren wird.

(2) Nicktranslation

In der Nicktranslation wird die DNA lediglich markiert, es findet keine weitere Amplifikation mehr statt. Durch die DNase wird in einem Strang der Ausgangs-DNA ein Einzelstrangbruch erzeugt, an dem dann eine freie OH-Gruppe vorliegt. Ausgehend davon wird von der DNA-Polymerase ein neuer Strang aufgebaut, durch die Exonuclease-Aktivität der Polymerase wird ein Teil des alten Stranges abgebaut und erneuert. Bei der Erneuerung des Strangs werden markierte Nucleotide wie normale Nucleotide in die Sequenz mit eingebaut. Die entstehenden Fragmente sind 200-500 bp lang.

6. Zielsetzungen der einzelnen Teilbereiche

Im Nachfolgenden soll kurz dargestellt werden, was der Hintergrund der einzelnen Experimente ist

6.1. Positionierung regulierter DNA-Abschnitte mittels CALM-AF10-System

Die Änderung der radialen Positionierung einzelner Gene in Bezug auf Zellkern und Chromosomenterritorium nach Änderung der Expression dieser Gene sollte untersucht werden.

Da diese Untersuchungen wie in 5.1. dargestellt, in einem natürlichen System kaum möglich sind, wurden diese Untersuchungen an einem artifiziellen System durchgeführt. Dafür wurde die Burkitt-Lymphom-Zelllinie DG75 verwendet, in die ein Plasmid, das das CALM-AF10 Fusionsgen trägt, stabil einkloniert hat. Die Expression dieses Onkogens kann mittels Zugabe des Tetrazyklin-Derivats Doxycyclin angeschaltet werden, und hat dann einen regulatorischen Einfluss auf andere Gene im Genom der Zelle. Diese auftretende Änderung in der Genexpression wurde mit Affymetrix Arrays genomweit untersucht, besonders stark regulierte Gene werden dann für die weiteren Experimente ausgewählt. Die Genexpression wurde zusätzlich mittels semiquantitativer RT-PCR und Low Density Arrays überprüft. Im Weiteren sollte die Genpositionierung der ausgesuchten Gene in fixierten Interphase-Zellkernen mit der FISH-Technik untersucht, mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie und verschiedenen Auswertungsprogrammen ausgewertet anschließend gedeutet werden.

Ein Teil dieser Arbeit wurde von Daniela Weigl im Rahmen ihrer Diplomarbeit (2007-2008) unter meiner Anleitung durchgeführt. Sie kümmerte sich dabei hauptsächlich um die Auswahl

der BAC-Klone, die semiquantitative RT-PCR und die FISH-Experimente und deren Auswertung mit Hilfe von EDT.

6.2. Histonmodifikationen

In diesem Teil der Arbeit ging es um den Vergleich von Verteilungsmustern verschiedener Histonmodifikationen zwischen gesunden Blutzellen und Krebszelllinien, die aus verschiedenen Leukämien gewonnen wurden und in unterschiedlichen Differenzierungsstadien vorliegen.

Hier wurde nun die radiale Verteilung der Histonmodifikationen me³-H3K4, me³-H3K9 und me³-H3K27 untersucht. Dabei sollte zunächst festgestellt werden, ob die Modifikationen nachgewiesen werden können und weiterhin ob es Unterschiede in der radialen Verteilung zwischen den verschiedenen Histonmodifikationen gibt. Außerdem sollten Unterschiede in den Signalverteilungen zwischen normalen und malignen Zellen beobachtet und dokumentiert werden. Einige der untersuchten Krebszelllinien befinden sich weiterhin in sehr unreifen Differenzierungsstadien und können durch Zugabe verschiedener Chemikalien einen weiteren Schritt in der Differenzierung machen, wobei sich Änderungen in den Verteilungen der Histonsignale ergeben könnten. Diese sollten ebenfalls dargestellt werden. Als Referenz für die Signalverteilung wurde in allen Experimenten eine Färbung der Zentromere mit einem Crest-Antiserum durchgeführt. Alle Untersuchungen sollten mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Experimenten, deren Auswertung am konfokalen Mikroskop erfolgen sollte, ausgeführt werden.

Dieser Teil der vorliegenden Arbeit wurde teilweise im Rahmen einer von mir mitgeplanten und im Labor angeleiteten Diplomarbeit von Julia Merz (2007-2008) durchgeführt, wobei sie sich hauptsächlich um Färbung und Auswertung der normalen Zelltypen und der HL-60 Zellen kümmerte.

6.3. „Komplexe Sonden“

In diesem Teil der Arbeit soll versucht werden, durch Kombination verschiedener Methoden zur Amplifizierung und Markierung von (c) DNA komplexe Sonden aus verschiedenen Zelltypen von Mensch und Maus zu erstellen, auf Metaphase Chromosomen-Präparate zu hybridisieren und anschließend eine 3D-FISH auf Interphase-Zellkernen des gleichen oder eines anderen Zelltyps zu machen. Es sollten dann die Muster die komplexe Sonden aus verschiedenen Zelltypen auf Metaphase-Chromosomen ergeben, miteinander verglichen werden, wobei auch Hybridisierungen zwischen den Spezies Mensch und Maus betrachtet

werden sollten. Nach gelungenen 2D-Hybridisierungen sollten die gleichen Versuche und Vergleiche in 3D durchgeführt werden.

Alle drei Teilbereiche der Arbeit sollen letztendlich Aufschluss über die Anordnung von DNA-Segmenten mit unterschiedlicher Expression innerhalb des Zellkerns geben.

II. Material und Methoden

1. Zellkultur

Bei den, in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen, handelt es sich, mit Ausnahme von C2C12 und humanen Fibroblasten, um in Suspension wachsende Zelllinien oder direkt aus Blut isolierten Zellen.

1.1. Subkultivierung von Suspensionszellen

Material:

- Suspensionszellen
- RPMI + 10 % FCS + 1 % Penicillin / Streptomycin

Methode:

Aus 10 ml einer dichten Kultur (3×10^6 Zellen) werden ca. 9 ml entnommen und durch frisches Medium ersetzt.

1.2. Subkultivierung von C2C12 und Fibroblasten

Material:

- Wachsende Zellkultur
- PBS
- Trypsin / EDTA
- DME-Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin

Methode:

Von einer subkonfluenten Zellkultur wird das Medium abgegossen, die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit einigen Milliliter Trypsin/EDTA ca. 5 min. im Brutschrank inkubiert. Wenn sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst haben, werden sie mit Medium nochmals abgespült, ein Teil verworfen und der Rest mit frischem Medium aufgefüllt.

1.3. Isolierung von Zellen aus Vollblut

Die Isolierung von Zellen aus Vollblut erfolgt über Zentrifugation des Blutes in verschiedenen Dichtegradienten.

1.3.1. Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut

Lymphozyten können aus dem heparinisierten Blut gesunder Testpersonen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden. Sie können unter Einfluss von Phytohämagglutinin einige Tage in Kultur gehalten und zur Teilung angeregt werden.

Material:

- 12-20 ml frisch entnommenes Blut gesunder Probanden
- Heparin
- Ficoll-Paque
- Leukosep-Röhrchen
- Zentrifuge
- 1x PBS
- Phytohemagglutinin (PHA).
- RPMI 1640-Medium + 10 % BSA + 1 % Penicillin/Streptomycin

Methode:

Das frisch entnommene Blut wird in vorbereitete Falcon Röhrchen gegeben, in denen sich jeweils bereits ein Tropfen Heparin befindet, und über Kopf gemischt. 15 ml Ficoll Paque werden in ein Leukosep-Röhrchen gegeben und 30 min. bei 2000 rpm zentrifugiert, so dass sich unter dem Filter keine Luftblase mehr befindet. Dann können bis zu 30 ml Blut auf den Filter pipettiert und 10 min. bei 4000 rpm zentrifugiert werden. Erythrozyten, Monozyten und Granulozyten gelangen dabei durch den Filter nach unten. Die Lymphozyten bilden einen gut sichtbaren Ring, den sog. Buffy Coat, knapp oberhalb des Filters. Dieser kann mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt werden und wird in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Die Lymphozyten werden dreimal mit 1x PBS durch 10 minütige Zentrifugation bei 1000 rpm gewaschen. Anschließend können die Zellen fixiert werden, oder in eine mit Medium und PHA vorbereitete Kulturflasche gegeben und ca. 72 Std. in Brutschrank bei 38°C / 5 % CO₂ inkubiert werden. Danach befindet sich ein Großteil der Zellen in der S-Phase. Das Vorliegen der Zellen in der S-Phase kann später mittels BrdU-Färbung nachgewiesen werden (nicht gezeigt)

1.3.2. Isolierung von Granulozyten / Monozyten aus Vollblut

Auch die Granulozyten / Monozyten-Fraktion kann über Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque aus Vollblut isoliert werden. Allerdings haben diese Zelltypen eine geringe Lebensspanne und können nicht in Kultur genommen werden.

Material:

- Frisch entnommenes Blut gesunder Probanden
- Heparin
- Histopaque 1077
- Histopaque 1191
- Polystyrol-Röhrchen
- Zentrifuge
- 1x PBS

Methode:

Das frisch entnommene Blut wird in Falcon-Röhrchen gegeben in denen sich bereits ein Tropfen Heparin befindet und über Kopf gemischt. In Polystyrol-Röhrchen werden 3 ml Histopaque 1191 vorgelegt und vorsichtig mit 3 ml Histopaque 1077 überschichtet. Anschließend können bis zu 6 ml Blut vorsichtig darauf gegeben werden. Nach einer einstündigen Zentrifugation bei 2100 rpm (= 700 g) bildet sich auch hier ein deutlich sichtbarer Buffy Coat, der vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgenommen wird und in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt werden kann. Nach drei Waschschrritten mit 1x PBS bei 1000 rpm für 10 min. können die Zellen fixiert werden.

1.3.3. Isolierung von Stammzellen aus Nabelschnurblut, Erythrozytenlyse

Zunächst wird das heparinisierte Nabelschnurblut, das freundlicherweise von Claudia Nussbaum (Walter-Brendel-Zentrum München) isoliert und zur Verfügung gestellt wurde, über eine Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt, wie für humane Lymphozyten beschrieben (V.2.1.2).

Anschließend wird eine Erythrozytenlyse durchgeführt, da sich kindliche Erythrozyten im Sinkverhalten im Gradienten anders verhalten als erwachsene Erythrozyten, und somit nach der Gradientenzentrifugation noch eine leichte Kontamination vorhanden ist.

Material:

- Erythrozytenlysepuffer (0,01 M Natriumphosphat und 0,145 M Natriumchlorid, pH = 7,2)
- Zentrifuge
- Hanks Balanced Salt Solution

Methode:

Der Buffy Coat wird nach der Dichtegradientenzentrifugation vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen und in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt. Pro ml gewonnener Zellsuspension werden 6 ml Erythrozytenlysepuffer zugegeben und gemischt. Nach einer Inkubation von 7 min. bei Raumtemperatur wird die Suspension zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird noch 1-2 mal in Hanks gewaschen, dann können die Zellen wie Lymphozyten o.ä. für 3D fixiert, oder mit 10 % DMSO eingefroren werden.

1.4. Differenzierung von Zelllinien

Die Induktion der Differenzierung erfolgt über Zugabe folgender Chemikalien zum Medium

- DG75: Doxycyclin, Endkonz.: 500 ng/ml
- HL-60: Retinsäure: Stocklösung 1 mM, Endkonz.: 1 μ M, 6 Tage
- HL-60: Vitamin D3: Stocklösung 1 μ M, Endkonz.: 1 nM, 3 Tage
- U937: TPA: Stocklösung 80 mM, Endkonz. 100 μ M, 3 Tage
- K-562: TPA: Stocklösung 80 mM, Endkonz. 100 μ M, 3 Tage

Die Retrodifferenzierung der U937-.Zellen erfolgt durch Kultivierung über 3-4 Wochen mit normalem Medium, unter dem Mikroskop wird kontrolliert, wann die Zellen wieder beginnen sich abzusetzen.

1.5. Herstellung von Metaphase-Präparaten nach der Deng-Methode

Die Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur werden durch Zugabe von Colcemid in der Metaphase arretiert, mit 0,56 M KCl aufgebläht und ihre Strukturen mit Methanol-Eisessig fixiert. Dann wird die Zellsuspension auf Objektträger getropft. Dabei platzen die Zellwände auf und es werden die kondensierten Chromosomen von sich teilenden Zellen sichtbar.

Material:

- Wachsende Zellkultur
- Colcemid 10 μ g/ml

- 0,56 % KCl
- Zentrifuge
- Fixativ: Methanol – Eisessig (3:1)
- Objektträger
- Wasserbad 55°C
- Pasteur-Pipette
- Durchlichtmikroskop
- Ethanol 70 %, 100 %
- Trockenschrank
- 0,01 N HCl
- Pepsin
- 1x PBS

Methode:

Zu 50 ml einer wachsenden Zellkultur werden 0,5 ml Colcemid (Endkonzentration: 100 ng/ml) zugegeben und 40 min. im Brutschrank inkubiert, dann in ein Falcon-Röhrchen überführt und 10 min. bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird bis auf 5 ml abgenommen und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Dann werden vorsichtig 10 ml warme KCl-Lösung zugegeben und bis auf 30 ml aufgefüllt. Nach einer 15 minütigen Inkubation im Brutschrank werden die Zellen erneut 10 min. bei 1000 rpm abzentrifugiert, der Überstand wieder bis auf 5 ml abgenommen, das Pellet im Rest resuspendiert und 10 ml kaltes Fixativ zugegeben und wieder auf 30 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wird wieder 10 min. bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das resuspendierte Pellet in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Mit Fixativ wird auf 11 ml aufgefüllt und die Waschschriffe bis zu fünfmal wiederholt. Nach dem letzten Waschschriff wird soviel Fixativ zugegeben, dass die Lösung milchig-trüb ist und kann dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren werden.

Zum Auftropfen wird das Wasserbad auf 55°C vorgeheizt und die Objektträger in 100 % technischem Ethanol geputzt abgetrocknet und in einer Küvette sortiert. Die vorbereitete Zellsuspension wird auf Eis gestellt, drei Objektträger werden in einer Metallbox ohne Deckel ins Wasserbad gestellt und zwei Tropfen Zellsuspension auf jeden Objektträger gegeben. Die Objektträger werden 1 min. im Wasserbad getrocknet, die Metaphasen mit dem Durchlichtmikroskop kontrolliert und 1 Std in 70 % Ethanol gegeben. Dann werden die

Objektträger für 5 min. in 100 % igen Ethanol überführt, bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend 2 Std. in den Trockenschrank gestellt.

Gelegentlich ist es nötig, die Metaphase-Präparate durch Pepsinierung von Zellresten zu befreien, die eine Hybridisierung behindern würden. Dafür werden zunächst die Objektträger in eine leere Küvette gestellt und im Wasserbad angewärmt. Die Pepsinlösung wird vorbereitet. Dazu werden 100 ml 0,01 N HCl-Lösung im Wasserbad vorgewärmt und 50 µl Pepsin zugegeben. Diese Lösung wird zu den Objektträgern gegeben und 10 min. im Wasserbad inkubiert. Dann wird das Pepsin abgekippt und die Objektträger dreimal schnell mit 1x PBS gewaschen. Danach folgen 3 Waschschrte mit 1x PBS für 5 min. unter Schütteln. Anschließend werden die Präparate wieder in 70 % igen (10 min.) und 100 % (5 min.) Ethanol überführt und bei Raumtemperatur getrocknet.

1.6. Fixierung für 3D-FISH

Ziel der Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd ist einerseits, die Zellmembran und Kernmembran so durchlässig zu machen, dass die markierten Sonden eindringen können, aber gleichzeitig die 3D-Struktur soweit wie möglich zu erhalten.

1.6.1. Fixierung von Suspensionszellen

Material:

- Zellkultur
- Polylysin-beschichtete Deckgläser
- 1x PBS
- 0,3x PBS
- 4 % PFA in 0,3x PBS
- 0,05 % Triton X-100 in PBS
- 0,5 % Triton X-100 in PBS
- 20 % Glycerol
- Flüssiger Stickstoff
- 0,1 N HCl
- 2x SSC
- 50 % Formamid / 2x SSC

Methode:

Zellen, die in Suspension wachsen werden auf Polylysin-beschichtete Deckgläser gegeben und ca. 1 Std. im Brutschrank inkubiert um die Zellen auf den Deckgläsern anzuhafte. Anschließend werden die Deckgläser dreimal kurz mit 1x PBS gespült und für 1 min. in 0,3x PBS gegeben um ein Schrumpfen der Zellen zu vermeiden. Dann werden die Zellen 10 min. in 4 % Paraformaldehyd inkubiert und damit fixiert. Alle weiteren Schritte dienen dazu, die Zellmembranen für die Sonden durchlässig zu machen. Dazu werden die Zellen dreimal 5 min. in 0,05 % Triton X-100 inkubiert und anschließend für eine halbe Std. in 0,5 % Triton X-100 gegeben. Die Zellen werden dann für eine halbe Std. oder besser über Nacht in 20 % Glycerol gegeben und dann 4-6 mal in flüssigen Stickstoff getaucht bis die Deckgläser gefroren sind und auf einer Küchenrolle wieder aufgetaut. Dann werden die Zellen 7,5 min. in 0,1 N HCl gegeben und in 2x SSC gewaschen. In 50 % Formamid können die Zellen bis zur Verwendung in der 3D-FISH aufbewahrt werden.

1.6.2. Fixierung adhärenter Zellen

Die adhärenen Zellen müssen zunächst durch Behandlung mit Trypsin/EDTA vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst werden und auf die Deckgläser überführt werden, auf denen sie über Nacht im Brutschrank von selbst wieder anwachsen.

Material:

- Zellkultur
- Trypsin / EDTA
- DME-Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin
- Deckgläser
- Brutschrank
- 1x PBS
- 4 % PFA in 1x PBS
- 0,05 % Triton X-100 in PBS
- 0,5 % Triton X-100 in PBS
- 20 % Glycerol
- Flüssiger Stickstoff
- 0,1 N HCl
- 2x SSC
- 50 % Formamid / 2x SSC

Methode:

Aus der Zellkulturflasche wird das Medium abgenommen und verworfen, die Zellen werden mit 1x PBS gewaschen. Es werden einige Milliliter (abhängig von der Größe der Kulturflasche und der Dichte der Kultur) Trypsin zugegeben und die Zellen für einige Minuten zurück in den Brutschrank gestellt. Dann werden die Zellen durch Klopfen vom Zellkulturgefäß gelöst und in Medium aufgenommen, womit auch die Wirkung des Trypsins neutralisiert wird. Die abgelösten Zellen können jetzt in neue Kulturgefäße überführt werden, in denen sich bereits sterile Deckgläser befinden. In einigen Stunden, oder über Nacht setzen sich die Zellen dann auf den Deckgläsern ab und können dann wie für Suspensionszellen beschrieben fixiert werden, jedoch ohne die Notwendigkeit einer Behandlung mit 0,3x PBS.

1.7. Fixierung für Immunfluoreszenzfärbungen

Die Fixierung soll die dreidimensionale Struktur der Zellen / Zellkerne erhalten, die Zellen jedoch zugänglich für Antikörper machen.

Material:

- Polylysin-beschichtete Deckgläser
- 1x PBS
- 0,3x PBS
- 4 % PFA in 0,3x PBS
- 0,5 % Triton X-100 in PBS
- 0,01 % PBS-Tween 20

Methode:

Alle verwendeten Zelltypen befinden sich in Suspension, sie müssen daher vor der Fixierung auf den Deckgläsern anwachsen. Daher ist es nötig, die Deckgläser mit Polylysin zu beschichten, um den Zellen das Anheften zu ermöglichen. Ca. 2 ml Zellkultur werden auf ein beschichtetes Deckglas gegeben und 1 Std. im Brutschrank inkubiert. Dann werden die nicht angehefteten Zellen 3 mal kurz mit 1x PBS abgespült und die Deckgläser 1 min. in 0,3x PBS inkubiert um ein Schrumpfen der Zellen zu verhindern. Anschließend erfolgt die Fixierung der Zellen für 10 min. in 4 % PFA in 0,3x PBS, wobei während der letzten 2 min. 0,5 % Triton X-100 zugegeben wird um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Danach können die Zellen bis zur Verwendung in 0,1 % PBS-T im Kühlschrank aufbewahrt werden.

1.8. Verwendete Zellen

Die immortalisierte Burkitt-Lymphom-Krebszelllinie *DG75* kann über längere Zeit in Kultur gehalten werden. Dabei werden die Zellen jeden 2. bis 3. Tag gesplittet, damit die Kultur nicht zu dicht wird. Um Zellen zu selektieren, die den CALM-AF10 Vektor tragen wird dem Medium Puromycin zugesetzt, denn der Vektor trägt auch ein Puromycin-Resistenzgen und nur Zellen mit diesem Vektor können unter Selektion überleben. Die Aktivierung von CALM-AF10 erfolgt über die Zugabe von Doxycyclin zum Medium.

Humane Lymphozyten machen ca. 25-40 % der Leukozyten aus, was einer Zellzahl von 1500 bis 4000 Zellen/ml Blut entspricht. Sie erkennen Fremdkörper wie Bakterien und Viren und entfernen diese. Sie gehören zum adaptiven Immunsystem, d.h. sie durchlaufen nach der Bildung im Knochenmark eine „Prägung“ im Thymus, den Lymphknoten und der Milz. Man unterscheidet T-, B- und natürliche Killerzellen, wobei es bei den T-Zellen wiederum T-Killer- und T-Helferzellen, bei den B-Zellen Plasma- und Gedächtniszellen gibt. Ihre Lebensdauer beträgt mehrere Stunden bis einige Jahre.

Humane Granulozyten sind der Hauptbestandteil der Leukozyten, sie machen zwischen 45 und 75 % aus. Sie werden im Knochenmark gebildet, zirkulieren im Blut, können jedoch auch ins Gewebe einwandern. Sie gehören zum innate Immunsystem und haben eine Lebensdauer von 2-3 Tagen. Besonders auffällig ist die Zellkernform, die aus 2-5 zusammenhängenden Lobuli besteht. Man unterscheidet neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten.

Humane Monozyten zirkulieren als Vorläufer von Makrophagen und dendritischen Zellen im Blut und zerstören körperfremde Stoffe durch Phagozytose und aktivieren das erworbene Immunsystem durch Antigenpräsentation. Der Hauptspeicherort ist die Milz. Monozyten haben eine Lebensdauer von lediglich 1-3 Tagen, Makrophagen im Gewebe können mehrere Wochen oder Monate überleben. Der Anteil der Monozyten an den Leukozyten beträgt 3-8 %.

Bei *HL-60 Zellen* handelt es sich um eine Promyeloblasten-Zelllinie (Collins et al. 1977 & 1978, Gallagher et al. 1979), die aus dem Blut einer 36jährigen Frau mit akuter promyeloischer Leukämie gewonnen wurde. Der Karyotyp der Zelllinie ist variabel, wobei bestimmte Chromosomenverluste / -translokationen, wie z.B. der Verlust eines X-Chromosoms, häufiger beschrieben werden (Volpi et al. 1996, Liang et al. 1999, Cottier et al. 2004). Die Zelllinie kann mittels Zugabe verschiedener Chemikalien zur Differenzierung

gebracht werden, wobei sowohl die Differenzierung in Richtung der Granulozyten als auch in Richtung der Monozyten möglich ist (Ostrem et al. 1987). Außerdem zeigt die Zelllinie phagozytische Aktivität und Reaktion auf chemotaktische Stimuli und exprimiert das Onkogen *myc*. Die Subkultivierung der HL-60 Zellen erfolgt mit RPMI + 10 % FCS alle zwei bis drei Tage.

Die histiocytische Lymphom-Zelllinie *U937* (Sundstrom et al. 1976) wurde 1996 von Dreyling et al. beschrieben. Sie trägt eine t(10;11) (p13;q14) Translokation, die zur Entstehung des Onkogens *CALM-AF10* führt. Sie wurde aus dem Blut eines 37jährigen Mannes kaukasischer Herkunft gewonnen. Auch diese Zelllinie ist durch Zugabe verschiedener Chemikalien differenzierbar, geht dann jedoch immer in die monozytische Differenzierungsrichtung. Die Subkultivierung erfolgt ebenso wie bei HL-60 Zellen mit RPMI + 10 % FCS alle zwei bis drei Tage.

Klein et al. beschrieben 1976 die Zelllinie K-562 (Koeffler et al. 1980, Lozzio et al. 1979, Andersson et al. 1979, Lozzio et al, 1981), die aus dem Blut einer 53jährigen Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie hergestellt wurde. Die Zelllinie besitzt einen Karyotyp mit bis zu 15 Marker-Chromosomen und ist ausgesprochen undifferenziert. Die Differenzierung, die zumeist den granulozytischen Differenzierungsweg einschlägt, erfolgt spontan oder kann durch Zugabe von Chemikalien ausgelöst werden. Die Subkultivierung erfolgt wie bei HL-60 oder U937-Zellen.

Bei *RPMI-Zellen* handelt es sich um Plasmazytom-Zellen (Moore et al. 1968), die von einem 61-jährigen Patienten gewonnen wurden. Sie entspricht den B-Lymphozyten und kann nicht weiter differenziert werden. Der Karyotyp der Zelllinie ist äußerst instabil, mit 68-70 Chromosomen und zwei Marker-Chromosomen. Die Subkultivierung erfolgt wiederum wie für HL-60 und U937-Zellen beschrieben.

In der Nabelschnur eines Neugeborenen findet man eine deutlich größere Anzahl an Stammzellen als im normalen peripheren Blut, weshalb sich die Nabelschnur zur Stammzellgewinnung anbietet.

MEL ist eine B-Lymphozytenzelllinie der Maus. Sie wachsen in Kultur in RPMI1640 Medium mit 10 % FCS und werden alle 2 Tage subkloniert.

Bei *C2C12* Zellen handelt es sich um Muskelzellen (Yaffe et al. 1977), bzw. Myoblasten der Maus. Die Zelllinie differenziert schnell zu kontraktile Myotuben, vor allem wenn die Kulturen konfluent werden. Um das zu verhindern müssen die Zellen alle zwei Tage mit DMEM mit 10 % FCS subkultiviert werden

Fibroblasten sind Zellen im Bindegewebe, die an der Synthese der Extrazellulären Matrix beteiligt sind. Sie produzieren Kollagen, sind ortsständig und haben viele irreguläre Fortsätze, einen hellen, ovalen Zellkern mit deutlich sichtbarem Nucleolus.

2. Messung der Genexpression

Für die Messung der Genexpression muss zunächst aus dem zu untersuchenden Gewebe RNA isoliert, vermessen und auf ihre Qualität hin überprüft werden, dann in cDNA umgeschrieben werden und auch die cDNA einer Kontrolle unterzogen werden. Die cDNA kann dann in verschiedene Verfahren zur Analyse der Genexpression eingesetzt werden.

2.1. RNA-Isolation

2.1.1. RNA-Isolation aus Suspensionszellen

Die RNA wird mittels PeqLab Gold RNA Pure Reagenz aus den Zellen isoliert (Phenol-Chloroform-Isolation).

Material:

- 3×10^6 Zellen in Suspension, induziert und nicht-induziert
- PeqGold RNA Pure Reagenz
- Chloroform
- Zentrifuge
- Isopropanol
- 70 % Ethanol
- DEPDC-Wasser

Methode:

Die Zellsuspension wird in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 5 ml PeqGold -Reagenz resuspendiert. Anschließend wird das 0,2-fache Volumen Chloroform zugegeben, mit Hilfe des Vortex gut

gemischt und die Suspension schnellstmöglich auf 2 ml Eppendorf-Röhrchen verteilt. Die Röhrchen werden 10 min. bei 13000 rpm zentrifugiert, anschließend wird die klare Phase vorsichtig abgenommen (ohne die Proteinphase zu berühren), in 1 ml-Aliquots in 2 ml-Eppendorf-Röhrchen abgefüllt und jeweils 1 ml Isopropanol zugegeben. Die Lösung wird nochmals gut gemischt und über Nacht (mind. 1 Std.) bei -20°C inkubiert und dann 10 min. bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Danach wird der Ethanol möglichst restlos entnommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Je nach Größe des Pellets wird es in 10-20 µl DEPDC-Wasser gelöst.

2.1.2. RNA-Isolierung aus adhärennten Zellen

Material:

- 3 dichte T75-Kulturflaschen mit adhärennten Zellen
- 1x PBS
- PeqGold RNA Pure Reagenz
- Zellschaber
- Chloroform
- Zentrifuge
- Isopropanol
- 70 % Ethanol
- DEPDC-Wasser

Methode:

Das Medium aus den Zellkulturflaschen wird abgenommen und verworfen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Das PBS wird möglichst restlos entfernt und pro Flasche 5 ml PeqGold - Reagenz zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden durch Reiben mit dem Zellschaber vom Kulturgefäß gelöst und durch das PeqGold-Reagenz die Zellstrukturen aufgelöst. Diese Suspension wird in Falcon-Röhrchen überführt und weiterbehandelt wie Suspensionszellen.

2.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Aus der bei 260 nm gemessenen Absorption kann die RNA-Konzentration berechnet werden.

Material:

- Isolierte RNA 1:500 in TE
- Photometer
- Quarzküvette

Methode:

Die RNA wird 1:500 in TE-Puffer verdünnt (2 µl RNA, 998 µl TE-Puffer) und in eine Quarzküvette gegeben. Mit Hilfe des Photometers wird die Absorption der RNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen. Daraus lässt sich die Konzentration mit folgender Formel berechnen:

$$\frac{OD_{260nm} * 40 * 500}{1000} = \text{Konz. RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

40 ist hierbei ein RNA-spezifischer Faktor, 500 bezieht sich auf die Verdünnung.

2.3. Qualitätskontrolle mittels denaturierendem Gel

Die Qualität der RNA kann mittels denaturierendem Formaldehyd-Gel bestimmt werden. Durch die denaturierenden Bedingungen werden Sekundärstrukturen in der RNA aufgelöst und somit kann die RNA im Gel dargestellt werden. Dabei werden zwei Banden sichtbar: Die Bande der 28S-rRNA und die der 18S-rRNA. Ist die RNA in einem guten Zustand, d.h. nicht zu sehr von RNasen angegriffen, ist die obere, 28S-rRNA-Bande ca. doppelt so dick wie die weiter unten laufende 18S-rRNA Bande, es sollte möglichst kein Schmier zu sehen sein.

Material:

- RNase freie Agarose
- DEPDC-Wasser
- 10x MOPS-Puffer
- Formaldehyd
- Gelkammer
- Gelschlitten und -kamm
- Isolierte RNA ca. 1 µg

- Formamid
- Ethidiumbromid-Bad
- Auftragspuffer
- Spannungsgeber
- Geldokumentationssystem

Methode:

0,6 g Agarose werden in 43,5 ml DEPDC-Wasser unter Rühren und Aufkochen gelöst und bis auf Handtemperatur abkühlen lassen, dann werden 5 ml 10x MOPS und 1,5 ml Formaldehyd zugegeben und das Gel in den Schlitten gegossen.

Ca 1 µg der isolierten RNA in einem Volumen von max. 2,2 µl wird mit 5 µl Formamid, 1,7 µl Formaldehyd und 1 µl 10x MOPS-Puffer versetzt und 1 µl Ethidiumbromid zugegeben. Dann werden die Proben 15 min. bei 65°C auf dem Heizblock inkubiert kurz abkühlen lassen und 1 µl Auftragspuffer zugegeben. Die Proben können dann auf das erstarrte Gel geladen werden. Das Gel läuft bei 45 V, 100 mA ca. 1 Std., wobei ca. 2 mal während des Laufs unterbrochen werden muss um den 1x MOPS-Laufpuffer, in dem sich mit der Zeit ein pH-Gradient bildet, zwischen den beiden Kammern wieder auszutauschen. Nach dem Lauf wird das mehrmals Gel kurz für einige Sekunden in dest. Wasser gewaschen und kann dann anschließend in der Photoanlage fotografiert werden.

2.4. DNase-Verdau

Um DNA-Rest aus der isolierten RNA zu entfernen kann ein DNase-Verdau durchgeführt werden. Die verbleibende RNA wird anschließend über eine Quiaquick Säule gereinigt und die Konzentration neu bestimmt.

Material:

- Isolierte RNA ca.12 µg
- 2x DNase-Puffer
- DNase I
- RNA-easy-kit (Quiagen Nr. 127128054)
- β-Mercaptoethanol
- 100 % Ethanol

Methode:

Ca. 12 µg isolierte RNA werden mit DEPDC-Wasser auf 30 µl Volumen eingestellt, dann werden 30 µl 2x DNase-Puffer und 1 µl DNase zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wird die RNA mit dem RNeasy-Kit der Firma Quiagen folgendermaßen aufgereinigt:

Das Volumen wird mit 39 µl RNase freiem Wasser auf 100 µl eingestellt, dann werden 350 µl RLT-Puffer (frisch angesetzt: 1 ml RLT + 10 µl β-Mercaptoethanol) und 350 µl Ethanol zugegeben, durch pipettieren gemischt und auf die Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 15 sec. bei 10000 rpm wird der Auffangbehälter ausgetauscht, nochmals 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und nochmals 2 min. bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Auffangbehälter wird erneut ausgetauscht, 1 min. bei 13000 rpm zentrifugiert und anschließend zweimal 30 µl RNase freies Wasser auf die Säule pipettiert und jedes mal 1 min. bei 10000 rpm zentrifugiert.

2.5. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA in DNA, die sog. cDNA umgeschrieben. Um hauptsächlich die mRNA umzuschreiben benutzt man für die reverse Transkription Oligo-dT-Primer, die selektiv an den Poly-T-Schwanz der mRNA binden. Von dort aus findet dann die Synthese der cDNA statt. Nach der eigentlichen Reaktion wird die verbleibende RNA mittels RNasen (RNase A und H) verdaut, so dass nur einzelsträngige cDNA übrig bleibt, die dann in weiteren Reaktionen eingesetzt werden kann.

Material:

- 5 µg RNA
- Oligo-dT-Primer (500 µg/ml)
- dNTPs (jeweils 10 mM)
- 5x Erststrangpuffer
- 0,2 M DTT
- Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl)
- RNA Guard (21 U/µl)
- Heizblock
- RNase A
- RNase H

Methode:

5 µg RNA werden mit 1 µl dNTPs und 1 µl Oligo-dT-Primer versetzt und das Volumen mit DEPDC-Wasser auf 12 µl eingestellt. Die RNA-Sekundärstrukturen werden 5 min. bei 65°C gelöst. Dann wird der Erststrangpuffer, das DTT und das RNA-Guard Reagenz zugegeben und für 2 min. bei 42°C inkubiert um die Primer binden zu lassen. Dann wird erst die Reverse Transkriptase zugegeben und die Reaktion 50 min. bei 42°C laufen gelassen, bevor die Reverse Transkriptase 15 min. bei 70°C denaturiert und die RNA mit RNase A und H verdaut wird, wobei RNase A einzel- und doppelsträngige RNA- Fragmente, RNase H DNA-RNA-Hybride zerschneidet. Die cDNA kann dann in weitere Reaktionen eingesetzt werden.

2.6. Kontrolle der cDNA mittels GAPDH-PCR

GAPDH ist ein Enzym der Glycolyse, das ubiquitär in allen Zelltypen hoch exprimiert wird. Es eignet sich daher als Positiv-Kontrolle für die RNA und die Reverse Transkription.

Material:

- cDNA
- GAPDH-Primer (10 µM)
 - Forward Human 5'-tcaagggcatcctgggctacac
 - Reverse Human 5'-tcttcaaggggtctacatggca
 - Forward Maus 5'gcctggagaaacctgcca
 - Reverse Maus 5'catgtaggcatgaggtc
- PCR Puffer mit MgCl₂
- dNTPs (jeweils 2,5 mM)
- Taq-Polymerase
- PCR-Maschine
- 1,8 % iges Agarosegel
- Auftragspuffer
- 100 bp Größenmarker
- Gelkammer und –schlitten
- Spannungsgeber
- Ethidiumbromid-Bad
- Geldokumentationssystem

Methode:

Ein Mastermix (für 40 Reaktionen) aus 200 µl PCR-Puffer, 80 µl dNTPs und 1340 µl Wasser wird hergestellt und 1 µl der cDNA (in verschiedenen Verdünnungen: 1:1, 1:10, 1:100) mit 42 µl Mastermix, je 2,5 µl Forward- und Reverse-Primer und 0,5 µl Taq-Polymerase gemischt und in der PCR Maschine bei folgendem Programm inkubiert:

Humane Proben:

Temperatur /Zeit	Anzahl Zyklen
94°C, 2 min.	1
94°C, 30 sec. 61°C, 30 sec. 72°C, 45 sec	25
94°C, 30 sec. 61°C, 30 sec. 72°C, 5 min.	1

Maus-Proben:

Temperatur /Zeit	Anzahl Zyklen
94°C, 2 min.	1
94°C, 30 sec. 53°C, 30 sec. 72°C, 45 sec	25
94°C, 30 sec. 53°C, 30 sec. 72°C, 5 min.	1

Nach Ende des Programms werden 5 µl der PCR-Produkte mit 3 µl Auftragspuffer gemischt und in Reihenfolge der Verdünnungen auf das Agarose-Gel aufgetragen und ca. 75 min. bei 80 V, 100 mA laufen gelassen. Die erste und letzte Gelspur wird durch den Größenmarker belegt. Dann wird das Gel einige Minuten im Ethidium-Bromid-Bad gefärbt und kurz in klarem Wasser entfärbt, bevor es fotografiert wird. Es sollte sich eine deutliche Bande bei 337 bp (human) bzw. 276 bp (murin) zeigen, die mit steigender Konzentration der eingesetzten RNA dicker wird.

2.7. Semiquantitative RT-PCR

Für die semiquantitative RT-PCR werden für jedes zu untersuchende Gen spezifische Primer ausgesucht, mit denen dann, ausgehend von der cDNA, die PCR-Reaktion durchgeführt wird. Die cDNA wird dabei in verschiedenen Verdünnungen in die Reaktion eingesetzt, um einen Anstieg des PCR-Produktes im Gel mit der Konzentration der cDNA sehen zu können und daraus Rückschlüsse auf die Expression des Gens ziehen zu können. Ebenfalls wird die PCR-Reaktion mit der –RT Negativkontrolle und einer Wasser-Probe durchgeführt.

2.7.1. Primerdesign

Die Primer für die RT-PCR wurden mit Hilfe der Datenbank „ensembl“ und des Programms „FastPCR“ ausgesucht.

Zunächst sucht man in der Datenbank „ensembl“ die Sequenz des Gens, das mit der PCR quantifiziert werden soll. Der „reverse“- Primer sollte im 3'UTR-Bereich des Gens liegen, da dieser nicht sehr GC-reich ist, kaum repetitive Elemente enthält und wenige Duplikationen vorkommen. Der „forward“- Primer wird so gewählt, dass er im vorletzten Exon liegt. Die komplette Gensequenz wird in das FastPCR-Programm kopiert. Zusätzlich werden die Bereiche angegeben, aus denen die Primer stammen sollen.

Aus den vorgeschlagenen Primerkombinationen, wählt man die, deren Produkte eine Größe von 200-500 bp besitzen und deren Qualität über „100“ liegt.

Folgende Primer wurden verwendet:

Tabelle II.2.7: Verwendete Primer

Gen	Primersequenzen		Annealing-Temperatur	Fragmentgröße (bp)
	forward	reverse		
GAPDH	5' TCA AGG GCA TCC TGG GCT ACA C 3'	5' TCT TCA AGG GGT CTA CAT GGC A 3'	61°C	337 bp
CALM- AF10 (AG Cremer)	5' TTT GGC CCT GTA TCA GGA GCA CAG 3'	5' CAT GGA AAG CCT GTC GAC ATC CA 3'	59,2°C	286 bp
CALM- AF10 (AG Bohlander)	5' GCA ATC TTG GCA TCG GAA AT 3'	5' GCC TGT CGA CAT CCA TGT TT 3'	54,7°C	552 bp

GFP	5' CAG CTC GTC CAT GCC GAG AGT G 3'	5' ACA CCC TGG TGA ACC GCA TCG A 3'	60,3°C	359 bp
IFI44	5' TGC TCA CTC ATG TGG ATA GCA TGG 3'	5' GCC CAT AGC ATT CGT CTC AGA GCA G 3'	58,5°C	217 bp
BIRC4BP	5' AGC TGC TGA AAA TCA AAC TTC CAC G 3'	5' GCC CAA CGA ATA AAA CCC ATC ACC 3'	59,4°C	428 bp
RAP1A	5' AGA AAT CAT GTC TGC TGC TCT A 3'	5' TCT CCA GGG AAC TTG TGC AAA CCA 3'	56,7°C	197 bp
IFITM1	5' CAC CGT GAT CAA CAT CCA CAG CGA 3'	5' CCA GCA TTG CAC AGT GGA GTG CA 3'	60,0°C	360 bp
DEPDC1	5' GGA GAT GGA CTA TTT GCT CCT TTG C 3'	5' CAT GAT AGC CTT ACT GGA TAG CTG 3'	58,6°C	566 bp
CENPE	5' CTC CAA AGT CTC CTA AAG TGA CTG G 3'	5' GCT GCA CTA CAA CAT CAT TAC CAG G 3'	58,9°C	388 bp
LOC440338	5' CCT CGG TTG CTT CCT CAC CGA GCT G 3'	5' CTT GCC GGT GTT GAG CCA GAG C 3'	60,7°C	376 bp
SLC10A2	5' AAC ACG CAG CTA TGT TCC ACC ATC G 3'	5' AAT TGG GCC ACC AGT CAC TTG G 3'	60,0°C	419 bp

2.7.2. Semiquantitative PCR

Mit den selbst entworfenen und von der Firma MWG synthetisierten Primern wird eine PCR Reaktion mit 25 Zyklen und der, für ein Primerpaar spezifischen, Temperatur gefahren. Dann werden die PCR-Produkte im Agarosegel aufgetrennt.

In der ersten RT-PCR verwendet man zumeist Primer für das Haushaltsgen GAPDH, welches das Enzym Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase des Glucose-Stoffwechsels, codiert. Dieses dient als Positivkontrolle für die Reaktion und die Qualität der cDNA, da es erstens in jedem Zelltyp exprimiert wird und zweitens weil es sehr stark exprimiert wird (GAPDH hat in DG75-VP16 laut Affymetrix einen Expressionswert von 7900).

Die amplifizierten PCR-Produkte trägt man nun auf ein 1,8 % iges Agarosegel auf (s. III.3.5.2). Da man aufgrund der Primerwahl relativ kleine DNA-Fragmente (zwischen 200-500 bp) erhält, benötigt man ein recht engmaschiges Gel.

Wird das untersuchte Gen von dem eingesetzten Zelltyp exprimiert, so erhält man Banden spezifischer Größe in den Spuren, in denen die +RT-Ansätze (1:1, 1:10, 1:100) aufgetragen wurden.

2.7.3 Ablauf der semiquantitativen PCR

Material:

- Pharmacia PCR-Puffer (mit MgCl₂)
- dNTPs (2,5 mM each)
- H₂O bidest.
- Forward-Primer (10 µM)
- Reverse-Primer (10 µM)
- cDNA (1:1 / 1:10 / 1:100)
- Taq-Polymerase
- PCR-Maschine

Methode:

Zunächst wird folgender Mastermix angesetzt:

Reagenz	Menge
Pharmacia PCR-Puffer (mit MgCl ₂)	200 µl
dNTPs (2,5 mM each)	160 µl
H ₂ O bidest.	1340 µl

Für die PCR-Reaktion wird folgender Ansatz erstellt:

- 42,5 µl Mastermix
- 2,5 µl Forward-Primer (10 µM)
- 2,5 µl Reverse-Primer (10 µM)
- 1 µl cDNA (1:1 / 1:10 / 1:100)
- 0,5 µl Taq-Polymerase

In der PCR-Maschine wird das Programm eingestellt:

Temperatur /Zeit	Anzahl Zyklen
94°C, 3 min	1
94°C, 30 sec. XX°C, 30 sec. 72°C, 45 sec.	25
94°C, 30 sec. XX°C, 30 sec. 72°C, 5 min.	1

Die Annealing-Temperatur (XX) ist je nach Primerpaar verschieden.

2.7.4 Auftrennung der PCR-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese

Material:

- Agarose
- TAE-Puffer
- Auftragspuffer
- PCR-Reaktionen
- 100 bp-Marker
- Gelkammer
- Spannungsgeber
- Ethidiumbromid-Färbelösung
- Geldokumentationssystem

Methode:

1,8 % ige Agaroselösung (1,8 g Agarose auf 100 ml TAE-Puffer) aufkochen und in eine vorbereitete Gelkammer gießen, mit nur einem Kamm, da das Gel eine lange Laufzeit hat. Diese gewährleistet eine gute Auftrennung der Fragmente. 5 µl des PCR-Produktes werden mit 3 µl Auftragspuffer gemischt und in Reihenfolge der Konzentration der eingesetzten cDNA mit dem 100 bp Marker auf das Gel geladen. Das Gel läuft ca. 75 min. bei 80 V, 120 mA und wird dann gefärbt, gewaschen und fotografiert.

2.8. LD-Taq Man PCR

Das Prinzip der Taq-Man-PCR ist, dass für jedes Gen Forward- und Reverse-Primer als auch eine spezifische Taq-Man Sonde mit Reporter- und Quencher- Molekül in dem Reaktionsgefäß (in diesem Fall in den einzelnen Vertiefungen der Platte) vorliegen. Primer und Taq-Man Sonde binden an das zugegebene DNA-Template, die PCR-Reaktion beginnt, dabei wird der Quencher von der Taq-Man Sonde abgetrennt, der Reporter beginnt zu fluoreszieren. In der PCR-Maschine wird dann der Anstieg an Fluoreszenz über die Zyklen der PCR gemessen und mit der Expression ins Verhältnis gesetzt. Dabei wird 18S-rRNA als interne Kontrolle mitgeführt.

Mit Hilfe von Low-Density Arrays (LDAs) können bis zu 384 Gene gleichzeitig auf ihre Expression in einem bestimmten Zelltyp hin untersucht werden. Für die hier durchgeführten Experimente wurde eine Platte mit 96 gleichzeitig zu untersuchenden Genen gewählt, wobei jedes Gen 4mal pro Platte untersucht werden kann.

Die Platte wurde folgendermaßen belegt:

ACTB	RPL13A	AIPL1	FAM64A	PITPNM3	KIAA0753	TXNDC17	MED31	SLC13A5	XAF1	FBXO39	TEKT1
IFI44			LOC653486;								
L	IFI44	ELTD1	SCGB1C1	ODF3	BET1L	RIC8A	SIRT3	PSMD13	NLRP6	ATHL1	IFITM2
IRF7	MUPCDH	SCT	DRD4	DEAF1	C1orf103	TMEM77	CEPT1	DENND2D	CHI3L2	CHIA	C1orf88
MAN											
BA	UBE2D3	CISD2	NHEDC1	CENPE	TACR3	DIRAS3	RPE65	DEPDC1	TPP2	18S	LOC196541
ACTB	RPL13A	AIPL1	FAM64A	PITPNM3	KIAA0753	TXNDC17	MED31	SLC13A5	XAF1	FBXO39	TEKT1
IFI44			LOC653486;								
L	IFI44	ELTD1	SCGB1C1	ODF3	BET1L	RIC8A	SIRT3	PSMD13	NLRP6	ATHL1	IFITM2
IRF7	MUPCDH	SCT	DRD4	DEAF1	C1orf103	TMEM77	CEPT1	DENND2D	CHI3L2	CHIA	C1orf88
MAN											
BA	UBE2D3	CISD2	NHEDC1	CENPE	TACR3	DIRAS3	RPE65	DEPDC1	TPP2	18S	LOC196541
ACTB	RPL13A	AIPL1	FAM64A	PITPNM3	KIAA0753	TXNDC17	MED31	SLC13A5	XAF1	FBXO39	TEKT1
IFI44			LOC653486;								
L	IFI44	ELTD1	SCGB1C1	ODF3	BET1L	RIC8A	SIRT3	PSMD13	NLRP6	ATHL1	IFITM2
IRF7	MUPCDH	SCT	DRD4	DEAF1	C1orf103	TMEM77	CEPT1	DENND2D	CHI3L2	CHIA	C1orf88
MAN											
BA	UBE2D3	CISD2	NHEDC1	CENPE	TACR3	DIRAS3	RPE65	DEPDC1	TPP2	18S	LOC196541
ACTB	RPL13A	AIPL1	FAM64A	PITPNM3	KIAA0753	TXNDC17	MED31	SLC13A5	XAF1	FBXO39	TEKT1
IFI44			LOC653486;								
L	IFI44	ELTD1	SCGB1C1	ODF3	BET1L	RIC8A	SIRT3	PSMD13	NLRP6	ATHL1	IFITM2
IRF7	MUPCDH	SCT	DRD4	DEAF1	C1orf103	TMEM77	CEPT1	DENND2D	CHI3L2	CHIA	C1orf88

C13orf27	KDELC1	BIVM	ERCC5	SLC10A2	GAPDH	RPLP0	YWHAZ	POLR2A	TBP	HMBS	B2M
ALOX12	C17orf49;MGC71993	BCL6B	SLC16A11	CLEC10A	ASGR1	ASGR2	DLG4	ACADV L	DVL2	GIPC2	PTGFR
IFITM1	B4GALNT4	PKP3	SIGIRR	TMEM16J	PTDSS2	HRAS	RNH1	LRRRC56	C11orf35	RASSF7	KIAA1542
OVGP1	WDR77	ATP5F1	C1orf162	ADORA3	RAP1A	C1orf183	DDX20	KCND3	GADD45A	GNG12	UBC
C13orf27	KDELC1	BIVM	ERCC5	SLC10A2	GAPDH	RPLP0	YWHAZ	POLR2A	TBP	HMBS	B2M
ALOX12	C17orf49;MGC71993	BCL6B	SLC16A11	CLEC10A	ASGR1	ASGR2	DLG4	ACADV L	DVL2	GIPC2	PTGFR
IFITM1	B4GALNT4	PKP3	SIGIRR	TMEM16J	PTDSS2	HRAS	RNH1	LRRRC56	C11orf35	RASSF7	KIAA1542
OVGP1	WDR77	ATP5F1	C1orf162	ADORA3	RAP1A	C1orf183	DDX20	KCND3	GADD45A	GNG12	UBC
C13orf27	KDELC1	BIVM	ERCC5	SLC10A2	GAPDH	RPLP0	YWHAZ	POLR2A	TBP	HMBS	B2M
ALOX12	C17orf49;MGC71993	BCL6B	SLC16A11	CLEC10A	ASGR1	ASGR2	DLG4	ACADV L	DVL2	GIPC2	PTGFR
IFITM1	B4GALNT4	PKP3	SIGIRR	TMEM16J	PTDSS2	HRAS	RNH1	LRRRC56	C11orf35	RASSF7	KIAA1542
OVGP1	WDR77	ATP5F1	C1orf162	ADORA3	RAP1A	C1orf183	DDX20	KCND3	GADD45A	GNG12	UBC
C13orf27	KDELC1	BIVM	ERCC5	SLC10A2	GAPDH	RPLP0	YWHAZ	POLR2A	TBP	HMBS	B2M
ALOX12	C17orf49;MGC71993	BCL6B	SLC16A11	CLEC10A	ASGR1	ASGR2	DLG4	ACADV L	DVL2	GIPC2	PTGFR
IFITM1	B4GALNT4	PKP3	SIGIRR	TMEM16J	PTDSS2	HRAS	RNH1	LRRRC56	C11orf35	RASSF7	KIAA1542
OVGP1	WDR77	ATP5F1	C1orf162	ADORA3	RAP1A	C1orf183	DDX20	KCND3	GADD45A	GNG12	UBC

Tabelle IV.2.8.1. Belegung der LDA-Platten; oben: linker Teil der Platte, unten: rechter Teil der Platte (aus: LDA_CD, 729351_cardmap.xls)

18S-rRNA ist hierbei die interne Kontrolle, RPLP0, ACTB, B2M, GAPDH, TBP, POLR2A, UBC, YWHAZ und HMBS wurden als weitere Kontrollen verwendet.

Material:

- cDNA (aus 50 bzw. 100 ng Gesamt-RNA)
- TaqMan Array Plates, Format 96a
- TaqMan Gene Expression Mastermix
- Applied Biosystems 7900HT Fast System
- Platten-Versiegler
- Sorvall- Heraeus Multifuge 3L
- SDS 2.1 Software

Methode:

Pro Kanal der Platte werden 100 µl Mastermix/cDNA Mischung in das Reservoir pipettiert, die Platte 2 min. bei 10.000 rpm zentrifugiert um die Flüssigkeit auf alle Reaktionskammern zu verteilen, dann wird die Platte versiegelt, und die geleerten Reservoir abgeschnitten. Die Platte wird in das Applied Biosystems 7900HT Fast Gerät eingeführt und über die Software das Programm eingegeben und folgende PCR-Reaktion gestartet:

Temperatur / Zeit	Anzahl Zyklen
50°C, 2 min.	1
95°C, 10 min.	1
95°C, 15 sec. 60°C, 1 min.	40

Nach Ende des Laufs werden für jedes Gen die gemessenen Ct-Werte angegeben, die DeltaCt-Werte (Ct-Wert des Gens – Ct-Wert 18S rRNA) können berechnet werden, ebenso wie die DeltaDeltaCt-Werte (Vergleich Delta Ct Gen in uninduzierten und induzierten Zellen). Daraus kann anschließend die Expression der Gene berechnet werden (Livak et al. 2001).

3. Fluoreszenz in situ-Hybridisierung

Um zu testen, ob die ausgewählten BAC-Sonden an der richtigen Stelle auf Chromosom 1 hybridisieren wird zunächst eine 2D-FISH auf Metaphase-Präparaten durchgeführt. Anschließend können die markierten BAC-Sonden für 3D-FISH (Referenzen) auf Interphase-Zellkernen verwendet werden.

3.1. 2D-FISH

Die fluorochrom- bzw. hapten-markierten Sonden (BACs und Chromosomen-Paints) werden auf Metaphase-Präparate gegeben, die Sonden- und Ziel-DNA denaturiert und zum hybridisieren ins Wasserbad gegeben. Danach werden nicht gebundene Sonden abgewaschen und die gebundenen Sonden mit fluorochrom-markierten Antikörpern nachgewiesen.

Material:

- Markierte Sonden als Hybridisierungsmix
- Metaphasepräparate
- Deckgläser
- Fixogum
- Heizblock
- Wasserbad 38°C
- 2x SSC
- 0,1x SSC
- 4 % BSA in 2x SSC
- 2 % BSA in 2x SSC
- Primär- und sekundär-Antikörper (fluorochrom-markiert)
- 4x SSC-Tween 20
- DAPI
- Vectashield
- Nagellack

Methode:

Zunächst wird aus den zu untersuchenden und markierten Sonden ein Hybridisierungsmix hergestellt. Dazu werden die Sonden mit humaner Cot-DNA (2,5 facher Überschuss) vermischt und mit 2,5 x Vol. Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Dann werden die Hybridisierungsmixe 20 min. bei 13000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen das Pellet getrocknet und in 3,5 µl Formamid aufgenommen und ca. 2 Std bei 39°C geschüttelt. Wenn sich das Pellet vollständig gelöst hat können 3,5 µl Mastermix (Dextransulfat in SSC) zugegeben werden.

Der Mastermix wird dann bei 85°C im Wasserbad denaturiert und auf die Metaphasepräparate gegeben, mit einem Deckglas möglichst luftblasenfrei abgedeckt und mit Fixogum versiegelt. Das Präparat wird nochmals 2 min. bei 76°C auf dem Heizblock denaturiert bevor es über Nacht im 38°C Wasserbad inkubiert wird. Am nächsten Tag wird das Fixogum und das Deckglas entfernt, das Präparat 2x 5 min. in 2x SSC bei 38°C anschließend 3x 5 min. bei 60°C mit 0,1x SSC stringent gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch 20minütige Inkubation in 2 % BSA in SSC abgesättigt. Dann kann der erste Antikörper-Layer aufgebracht werden und 45 min. in einer dunklen Kammer bei 38°C einwirken gelassen. Nicht gebundener Antikörper wird dann bei 3 Waschschritten mit 4xSSC-T entfernt, bevor

der 2. Antikörper aufgebracht wird. Dann wird die DNA mit DAPI gegen gefärbt das Präparat luftgetrocknet und mit Vectashield und einem Deckglas eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

Die hier verwendeten Sonden wurden folgendermaßen markiert und nachgewiesen:

BAC-Klon	Gen	Makierung	1.Antikörper	2.Antikörper
RP11-358F02	DEPDC1	Biotin	Avidin-Alexa488	Goat α Avidin FITC
RP11-348L16	IFI44	DNP	Rabbit α DNP	Goat α rabbit Texas Red
RP11-705K13	RAP1A	Digoxigenin	Mouse α Dig	Goat α Mouse Cy5
---	#CT1	Cy3	---	---

3.2. 3D-FISH

Die 3D-FISH dient dazu, festzustellen an welcher Position in einem Interphase-Zellkern ein bestimmtes Gen, nachgewiesen durch eine BAC-Sonde, liegt. Der Ablauf der 3D-FISH unterscheidet sich nur unwesentlich von dem der 2D-FISH, so dass hier nur auf Unterschiede eingegangen wird.

Material:

- Markierte Sonden als Hybridisierungsmix
- 3D-fixierte Zellen
- Deckgläser
- Fixogum
- Heizblock, 76°C
- Wasserbad 38°C
- 2x SSC
- 0,1x SSC
- 4 % BSA in 2x SSC
- 2 % BSA in 2x SSC
- Primär- und sekundär-Antikörper (fluorochrom-markiert)
- 4x SSC-Tween 20
- DAPI

- Vectashield
- Nagellack

Methode:

Genauso wie für die 2D-FISH wird auch für die 3D-FISH zunächst ein Hybrdisierungsmix hergestellt, und auf die aus dem Formamid genommenen Zellpräparate gegeben, ohne dass diese austrocknen. Nach der Denaturierung von Sonden- und Ziel DNA auf dem Heizblock erfolgt die Inkubation im Wasserbad für 48 Std., bevor der Nachweis der Sonden wie in der 2D-FISH erfolgt. Nach der Gegenfärbung werden die Präparate jedoch nicht luftgetrocknet sondern sofort eingedeckelt.

3.3. Affymetrix-Arrays und BAC-Sonden

Zunächst wurde die Expression aller Gene im nicht-induzierten und induzierten Zustand der Zellen mittels Affymetrix-Arrays gemessen (AG Bohlander; Expressionstabellen s. Anhang). Ausgehend von diesen Messdaten wurden Gene zur Untersuchung mittels FISH ausgewählt, die einen mindestens dreifachen Unterschied in der Expression vor und nach der Induktion mit Doxycyclin aufwiesen. Für diese Gene wurden in der Datenbank „Ensembl“ (www.ensembl.org) BAC-Klone ausgewählt, die die Bereiche der ausgewählten Gene möglichst gut abdecken und auf denen möglichst wenig andere Gene liegen.

Folgende BAC-Klone wurden ausgewählt (die später für die Experimente verwendeten BAC-Klone sind bereits farbig unterlegt):

BAC	Position	Gen	Regulation lt. Affymetrix
RP11-348L16	1p31.1	IFI44, IFI44L	Hoch
RP11-609D21	17p13.1	BIRC4BP	Hoch
RP11-705K13	1p13.3	RAP1A	Hoch
RP11-437P23	11p15.5	IFITM1	Hoch
RP11-358F02	1p31.2	DEPDC1	Runter
RP11-291N5	4q24	CENPE	Runter
RP11-650A22	16p13.12	LOC440338	Runter
RP11-11L08	13q33.1	SLC10A2	Runter

Tabelle IV.3.3.1. bestellte BAC-Klone

Die BAC-Klone wurden bei BACPAC Ressources Center (<http://www.bacpac.chori.org>) bestellt. Die BAC-Klone werden in E.coli-Zellen in Agar geliefert und folgendermaßen weiterbehandelt:

3.3.1. Vorkultur

Um zunächst ein gutes Anwachsen der E.coli Zellen zu gewährleisten wird eine sog. Vorkultur angesetzt.

Material:

- LB-Medium
- Chloramphenicol 20 mg/ml
- Schüttler

Methode:

5 ml LB und 3,1 µl Chloramphenicol (Endkonz. = 12,5 µg/ml) werden in ein 15 ml Falcon Röhrchen vorgelegt, mit einer abgeflamten Impföse wird etwas Agar aus dem Röhrchen mit dem jeweiligen BAC entnommen und in das Medium gegeben. Die Kultur wird ca. 5 Std. bei 37°C geschüttelt.

3.3.2. Übernacht-Kultur

Um die E.coli-Zellen mit den BAC-Klonen in ausreichender Menge für die Minipräparation zur Verfügung zu haben wird aus der Vorkultur eine Übernachtkultur angesetzt.

Material:

- Vorkultur
- LB-Medium
- Chloramphenicol 20mg/ml.
- Schüttler

Methode:

35 ml LB-Medium werden mit 21,8 µl Chloramphenicol (Endkonz.= 12,5 µg/ml) versetzt und die Vorkultur wird zugegeben. Die Kultur wird über Nacht bei 37°C geschüttelt.

3.3.3. Minipräparation

Mit Hilfe der Minipräparation werden die E.coli-Zellen lysiert und deren DNA und Zellbestandteile ausgefällt, im Detail werden zunächst die Zellen im ersten Lysepuffer, der EDTA zur Bindung divalenter Kationen enthält, aufgenommen. Durch die Bindung der Kationen durch EDTA stehen sie nicht mehr als Cofaktor für die DNasen zur Verfügung, was gewährleistet, dass die DNA nicht durch DNasen angegriffen wird. Mit Zugabe des nächsten Puffers werden die Zellen lysiert und die DNA durch das NaOH denaturiert. SDS bindet an die, im Zelllysate vorhandenen, Proteine. Der dritte Lysepuffer bewirkt mit seinem sauren pH eine Neutralisierung des pH-Wertes der Lösung und damit eine Renaturierung der kleinen Plasmid-DNA, jedoch nicht der großen genomischen DNA. Durch die enthaltenen Kalium-Ionen werden die Proteine, auf Grund der Wechselwirkung der Kalium-Ionen mit SDS und der anschließenden Zentrifugation endgültig ausgefällt. Die BAC-DNA befindet sich nun im Überstand und kann durch Zugabe von Isopropanol gefällt und mit Ethanol gewaschen werden.

Vor der Minipräparation wird aus jedem Röhrchen etwas Material für einen Glycerinstock entnommen.

Material:

- 40 ml Übernachtskultur
- 50 % Glycerin
- Cryoröhrchen
- Zentrifuge Hettich, Eppendorf
- Lysepuffer 1 (50 mM Glucose, 2 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA)
- Lysepuffer 2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS)
- Lysepuffer 3 (1 M KAc, pH=5,2)
- 70 % und 100 % Ethanol
- Bidest. Wasser

Methode:

300 µl 50 % Glycerin werden in ein Cryoröhrchen vorgelegt und 300 µl E.coli-Kultur zugegeben. Die Röhrchen werden 1 Std. auf Eis inkubiert, dann auf -80°C überführt und aufbewahrt.

Der Rest der Übernachtskultur wird 10 min. bei 4000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1,2 ml Lysepuffer1 resuspendiert und auf 2 ml Eppendorf-

Röhrchen verteilt. Dann werden pro Eppendorf-Röhrchen 600 ml Lysepuffer 2 zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor 600 µl Lysepuffer 3 hinzugefügt werden. Die Suspensionen werden nochmals kurz gemischt und 5 min. auf Eis inkubiert. Dann wird 10 min. bei 13000 rpm zentrifugiert und die Röhrchen danach auf Eis gestellt. Der Überstand wird möglichst sauber entnommen und auf zwei Eppendorf-Röhrchen verteilt. Diesen Schritt wiederholen, wenn die Lösung nicht klar ist. Dann werden 0,8 ml Isopropanol zugegeben, gemischt und die Röhrchen 5 min. auf Eis gestellt. Dann werden die Lösungen 30 min. bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in 0,5 ml kaltem 70 % igen Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min. bei 13000 rpm wird der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet und anschließend in 50 µl bidest. Wasser aufgenommen.

3.3.4. Agarose-Testgel

Um die Qualität der isolierten DNA zu kontrollieren wird ein 1 % iges Agarosegel gefahren.

Material:

- Agarose 1 g /100 ml
- TAE-Puffer
- Schlitten
- Kamm
- Gelkammer
- Auftragspuffer
- λ-Größenmarker
- Spannungsgeber
- Ethidiumbromid-Bad
- Geldokumentationssystem

Methode:

1 g Agarose wird in 100 ml TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst, leicht abkühlen lassen und in den Gelschlitten mit Kamm gegossen. Wenn das Gel fest geworden ist, kann der Kamm entnommen werden und das Gel in der Kammer mit TAE-Puffer übergossen werden. Anschließend wird das Gel mit dem Größenmarker und den Proben beladen an den Spannungsgeber angeschlossen und ca. 20 min bei 130 V, 150 mA laufen gelassen. Danach wird das Gel für einige Minuten in das Ethidiumbromid-Bad gegeben und kurz in klarem

Wasser entfärbt. Anschließend werden die Signale unter UV-Licht im Geldokumentationssystem aufgenommen.

3.3.5. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Menge der isolierten DNA kann mittels Photometer bestimmt werden. Dazu wird die OD bei 260 nm gemessen und daraus die DNA-Konzentration ermittelt. Ebenso wird die OD bei 280 nm gemessen. Die OD bei 280 nm gibt die Menge an Protein an, die sich mit in der Lösung befindet, somit ist die Ratio OD₂₆₀/280 ein Maß für die Reinheit der isolierten DNA.

Material:

- Photometer
- TE-Puffer
- DNA
- Quarzküvette

Methode:

Um das Photometer zu eichen wird zunächst TE-Puffer in der Küvette gemessen. Anschließend werden 1:100 und 1:500-Verdünnungen der DNA in TE-Puffer gemessen. Nach jeder Messung wird die Küvette mit Wasser gespült.

3.3.6. DOP-PCR

Um die isolierte BAC-DNA zu amplifizieren wird die Methode der DOP-PCR angewandt (Fiegler et al. 2003, Telenius et al. 1992). Dabei werden Primer verwendet, die partiell, und zwar im mittleren Bereich, degeneriert sind, also dort bei der Synthese des Primers zufällige Nucleotide eingebaut werden. Damit ist gewährleistet, dass der Primer in einem gegebenen DNA-Abschnitt mehrere Bindungsstellen finden kann, was durch die 10 Zyklen niederer Stringenz begünstigt wird. Die hier verwendeten Primer unterscheiden sich von den, von Telenius et al. 1992 publizierten 6 MW-Primern, darin, dass die 6 Nucleotide am 3' der Primer so gewählt sind, dass sie menschliche DNA 6mal besser amplifizieren als E.coli-DNA. Jeder der verwendeten Primer amplifiziert dabei andere Sequenzen des Targets. Mit einer Mischung der Fragmente, die von den beiden Primern amplifiziert worden sind, erhält man eine recht vollständige Repräsentation des Targets (Fiegler et al., 2003).

Durch die geringe Annealing Temperatur können die Primer auch trotz einiger Fehlpaarungen an die DNA binden. Durch die vergleichsweise lange Extensionszeit wird die Entstehung

langer Fragmente begünstigt. In den anschließenden 30 Zyklen hoher Stringenz ist nur eine spezifische Primerbindung möglich und es kommt zu einer exponentiellen Vermehrung der Fragmente.

Um BAC-DNA zu amplifizieren werden zwei verschiedene Primer, DOP2 und DOP3 verwendet, für Chromosomen-Paints wird meist der 6MW-Primer verwendet. Die Primer haben folgende Sequenzen:

DOP2: 5'ccgactcgagnnnnnttaggag

DOP3: 5'ccgactcgagnnnnnttctag

6MW: 5'ccgactcgagnnnnnatgtgg

Zunächst wird die BAC-DNA mit primärer DOP-PCR amplifiziert, anschließend erfolgt die Label-PCR um die amplifizierten BAC-Sonden mit Fluorochromen oder Haptenen zu markieren.

3.3.6.1. Primäre DOP-PCR

Material:

- Isolierte BAC-DNA
- DOP2-Primer 20 µM
- DOP3-Primer 20 mM
- Puffer D
- Detergenz W1, 1 %
- dNTPs (jeweils 2,5 mM)
- Taq-Polymerase
- PCR-Maschine

Methode:

Für die PCR wird zunächst folgender Mastermix erstellt:

Reagenz	Menge
Puffer D	200 µl
Detergenz W1	100 µl
dNTPs	80 µl
DOP2/DOP3-Primer	100 µl
Wasser	140 µl

Für die PCR werden dann jeweils 48 µl Mastermix, 1 µl BAC-DNA und 0,5 µl Taq-Polymerase verwendet.

In der PCR-Maschine wird folgendes Programm eingestellt:

Temperatur/Zeit	Anzahl Zyklen
96°C, 3 min.	1
94°C, 1 min. 30 s 30°C, 2 min. 30 s 72°C, 3 min.	10
94°C, 1 min. 62°C, 1 min. 30 s 72°C, 2 min.	30
94°C, 1 min. 62°C, 1 min. 30 s 72°C, 8 min.	1

Anschließend wird der Erfolg der PCR mittels Agarose-Gel überprüft.

3.3.6.2. Label-DOP-PCR

Material:

- Primär DOP-amplifizierte BAC-DNA
- DOP2-Primer 20 µM
- DOP3-Primer 20 µM
- MgCl₂
- Cetus-II-Puffer
- ACG-Mix, je 2 mM
- dTTP, 1 mM
- fluorochrom- / hapten-markierte dUTPs, 1 mM
- Taq-Polymerase
- PCR-Maschine

Methode:

Auch für die Label-DOP-PCR wird ein Mastermix erstellt:

Reagenz	Menge
Cetus-II-Puffer	100 µl
MgCl ₂	80 µl
DOP2/3-Primer	100 µl
ACG-Mix	50 µl
dTTP	80 µl
Bidest. H ₂ O	900 µl

Für die PCR werden 46 µl Mastermix, 2 µl markiertes dUTP, 1 µl primär-amplifizierte DNA und 0,5 µl Taq-Polymerase verwendet.

Temperatur/Zeit	Anzahl Zyklen
94°C, 3 min.	1
94°C, 1 min. 56°C, 1 min. 72°C, 30 s	25
72°C, 5 min.	1

Anschließend wird der Erfolg der PCR und die Länge der entstandenen Sonden mittels Agarose-Gel überprüft. Sollten die Sonden zu lang sein (>500-1000 bp), wird die DNA mittels DNase-Verdau verkürzt.

3.3.6.3. Amplifikation und Markierung der DNA für komplexe Sonden

Um die mittels reverser Transkription hergestellte und überprüfte cDNA für 2D- bzw. 3D-FISH einzusetzen muss sie zunächst amplifiziert und mit Haptenen oder Fluorochromen markiert werden. Für die Amplifikation kommen als Methoden die Genomphi und die DOP-PCR in Frage, markiert werden können die Sonden mittels Nicktranslation oder mit einem weiteren PCR-Schritt, der Label-PCR.

3.3.6.3.1. Genomiphi

Die Genomiphi ist eine unspezifische, aber sehr effiziente Methode der DNA-Amplifikation. Dabei werden Random-Hexamer-Primer eingesetzt, die Polymerase arbeitet nach dem „Rolling-Circle“-Prinzip, wobei sehr viel Amplifikat gebildet wird. Diese Methode ist jedoch auch relativ kostspielig.

Material:

- cDNA
- Genomiphi-Kit
- PCR-Maschine
- Auftragspuffer
- 1% iges Agarosegel
- Größenstandard 1kb
- Ethidium-Bromid-Bad
- Geldokumentationssystem

Methode:

1 μ l cDNA wird mit 9 μ l Sample-Buffer gemischt und 3 min. bei 95°C denaturiert. Ein Mastermix aus 9 μ l Reaction-Buffer und 1 μ l Enzym pro Reaktion wird hergestellt und nach dem Abkühlen der Probe zugegeben. Anschließend wird der gesamte Reaktionsansatz 16 Std bei 32°C in der PCR.Maschine inkubiert und das Enzym anschließend 10 min. bei 65°C denaturiert, so dass die Reaktion gestoppt wird. 2 μ l Genomiphi-Produkt werden mit 3 μ l Auftragspuffer gemischt und auf ein 1% iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel, auf dem sich auch mindestens eine Spur mit λ - Marker befindet, läuft ca. 30 min. bei 120 V, 150 mA, wird dann im Ethidiumbromid-Bad gefärbt kurz entfärbt und fotografiert. Auf dem Gel sollte ein Schmier an DNA-Fragmenten zu sehen sein.

3.3.6.3.2. DOP-PCR

Mit Hilfe der primären DOP-PCR ist eine Amplifikation, mit der Label-DOP-PCR eine Amplifikation mit gleichzeitiger Markierung des eingesetzten Materials möglich.

Es kann allerdings auch nach der primären PCR eine Nicktranslation angeschlossen werden, ebenso kann eine Label-PCR direkt vom Ausgangsmaterial aus erfolgen.

3.3.6.3.3. Nicktranslation

Bei der Nicktranslation wird ein DNA-Fragment lediglich markiert, es erfolgt jedoch keine weitere Amplifikation. Die DNase fügt der eingesetzten DNA Doppelstrangbrüche zu, die DNA-Polymerase „repariert“ diese Brüche wieder, wobei ein Teil des noch intakten DNA-Stranges abgebaut und anschließend neu aufgebaut wird. In dem Neuaufbau werden sowohl normale als auch hapten- oder fluorochrom-markierte Nukleotide in den DNA-Strang eingebaut.

Material:

- DNA-Fragmente
- Nicktranslations-Puffer
- β -Mercaptoethanol
- Unmarkierte dNTPs
- Markierte dUTPs
- Dest. Wasser
- DNase I (1:250 mit dest. Wasser)
- DNA-Polymerase
- 15°C Wasserbad
- 1 % iges Agarosegel
- λ -Größenmarker
- Ethidiumbromid-Bad
- Geldokumentationssystem
- Stoppmix

Methode:

Je nach Konzentration der DNA-Fragmente (aus Gel abgeschätzt) werden einige μl in die Reaktion eingesetzt. Zugegeben werden 5 μl dNTPs, 5 μl β -Mercaptoethanol, 5 μl Nicktranslationspuffer und 2 μl markierte dUTPs. Das Volumen der Reaktion wird mit Wasser so eingestellt, dass nach Zugabe von 1 μl DNase I und 1 μl DNA-Polymerase 50 μl Reaktionsvolumen vorliegen. Der Ansatz wird 1,5 Std bei 15°C im Wasserbad inkubiert, dann werden 2 μl Nicktranslationsprodukt mit 3 μl Auftragspuffer versetzt und mit einem λ -Marker auf ein 1 % iges Agarosegel aufgetragen. Nach Gellauf (20 min. 120 V, 150 mA), Färben und fotografieren wird die Länge der entstandenen Produkte aus dem Gel abgeschätzt. Sind die so entstandenen Sonden zu lang für FISH-Experimente (ideal: 200-500 bp), kann

nochmals 1 µl 1:250 verdünnte DNase zugegeben werden und 7 min. bei Raumtemperatur inkubiert werden. Danach kann die Länge der Sonden erneut mittels Gel überprüft werden. Wenn die ideale Länge erreicht ist wird die Reaktion durch Zugabe des gleichen Volumens an Stoppmix angehalten werden und die Produkte können für die Herstellung von Hybridisierungsmixen verwendet werden.

Reagenz	Nach Label-PCR	Nach Nicktranslation
Markierte DNA	20 µl DOP2/3-Produkt	48 µl der NT
Kontrollsequenz (Paint oder BAC)	15 µl Paint, 20 µl DOP2/3-Produkt BAC	15 µl Paint, 20 µl DOP2/3-Produkt BAC
Cot-1-DNA	100 µl	100 µl
Ethanol	400 µl	400 µl

Tabelle II.2.1.: Label-PCR vs. Nicktranslation

Dabei waren die komplexen Sonden meist mit Digoxignin, die Paints bzw. der BAC mit Biotin markiert und wie folgt nachgewiesen:

Digoxigenin: Maus- α -Dig-Cy3

Biotin: Streptavidin Cy5, bzw. Avidin-Alexa488 mit Goat- α -Avidin FITC

4. Immunfluoreszenzexperimente

Für Immunfluoreszenzfärbungen werden Antikörper gegen spezielle zelluläre oder nukleäre Strukturen verwendet, die dann wiederum durch spezifische, fluorochrom-gekoppelte Antikörper nachgewiesen werden.

4.1. Durchführung der Färbungen

Es wurden für alle verwendeten Zelltypen mit Ausnahme der Nabelschnurblutzellen dieselben Antikörperkombinationen verwendet.

Material:

- Deckgläser mit fixierten Zellen
- 0,5 % Triton X-100 in PBS
- 4 % BSA in PBS-T
- 2 % BSA in PBS-T

- 0,01 % PBS-T
- 1. Antikörper: Rabbit- α - me3-H3K4 (1:500) oder Rabbit- α - me3-H3K9 (1:500) oder Rabbit- α - me3-H3K27 (1:500) und Crest-Antiserum (1:150)
- 2. Antikörper: Goat- α -Rabbit-FITC (1:100) Donkey- α -Human Cy3 (1:100)
- DAPI 5 μ g/ml
- Vectashield
- Nagellack

Methode:

Die Deckgläser mit den fixierten Zellen werden für 20 min. bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in 0,5 % TritonX-100 inkubiert und anschließend unspezifische Bindungsstellen durch 20 minütige Inkubation in 4% BSA in PBS-T abgesättigt. Dann wird die erste Antikörper-Lösung auf die Zellen gegeben und in einer feuchten Kammer im Wasserbad bei 38°C 1 Std. einwirken lassen. Nach zwei Waschschritten mit 0,01 % PBS-T wird die zweite Antikörperlösung auf die Zellen pipettiert und wieder in der feuchten Kammer 45 min. inkubiert. Der nicht gebundene Antikörper wird wiederum in zwei Schritten abgewaschen und die DNA 10 min. mit DAPI gegen gefärbt, das Deckglas wird dann mit einem Tropfen Vectashield auf einen Objektträger gegeben und mit Nagellack versiegelt.

4.2. Besonderheiten bei Stammzellen aus Nabelschnurblut

Um die Stammzellen aus den isolierten Blutzellen heraus zu kennen und selektiv nur diese mit dem Konfokalmikroskop aufzunehmen ist es nötig, die Stammzellen durch eine weitere Antikörperfärbung von den anderen Zellen zu unterscheiden. Dafür wird ein sog. Lineage-Cocktail verwendet, der mehrere FITC-markierte Antikörper beinhaltet, die verschiedene Zelltypen charakterisieren.

Dieser Cocktail beinhaltet Antikörper gegen folgende Epitope:

- CD2 (gegen T- und NK-Zellen)
- CD3 (gegen T- Zellen)
- CD14 (gegen Monozyten)
- CD16 (gegen Phagozyten)

- CD19 (gegen B-Zellen)
- CD56 (gegen NK-Zellen)
- CD235a (gegen erythroide Zellen)

Alle Zellen, die mit diesem Lineage-Cocktail nicht angefärbt werden, können als Stammzellen betrachtet werden. Durch die Verwendung des Lineage-Cocktails ist allerdings der FITC-Kanal belegt, so dass für die Anfärbung der Histonmodifikationen auf andere Farbkombinationen ausgewichen werden muss.

Material:

- S. 4.1.
- 1. Antikörper: Rabbit- α - me3-H3K4 (1:500) oder Rabbit- α - me3-H3K9 (1:500) oder Rabbit- α - me3-H3K27 (1:500) und Crest-Antiserum (1:150)
Lineage-Cocktail-FITC (1:10)
- 2. Antikörper: Goat- α -Rabbit-Texas Red (1:100)
Donkey- α -Human Cy5 (1:200)

Methode:

s. 4.1.

5. Mikroskopie

Die Mikroskopie ist sowohl für die Kontrolle der einzelnen Schritte der FISH-Prozedur aus auch am Ende zur Auswertung der Präparate von Nöten. Es wurden drei verschiedenen Arten von Mikroskopen verwendet: das Durchlichtmikroskop, das Epifluoreszenzmikroskop und das Konfokalmikroskop.

5.1. Durchlichtmikroskopie

Das Durchlichtmikroskop wird in der Zellkultur verwendet, um den Zustand und die Dichte einer Zellkultur zu bestimmen, außerdem wird damit die Qualität von Metaphasepräparaten und fixierten Zellen überprüft und geeignete Areale für die 2D- und 3D-Hybridisierung ausgewählt. Hierfür wurde das 20er Objektiv verwendet.

5.2. Epifluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Epifluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass ein bestimmtes Fluorochrom mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, und so auf ein höheres Energieniveau gelangen kann. Beim Rückfall auf das ursprüngliche Energieniveau wird Energie in Form von Licht emittiert. Die Anregungswellenlänge ist dabei immer kürzer, also energiereicher, als die emittierte Wellenlänge, denn beim Rückfall des Fluorochroms auf das ursprüngliche Energieniveau wird nicht die gesamte, sondern nur ein Teil der vorher aufgenommenen Energie wieder frei, der übrige Teil wird in Wärme umgewandelt.

Um so verschiedene Fluoreszenzsignale betrachten und auswerten zu können benötigt man mehrere Filter. Zunächst ist ein Anregungsfilter nötig, der das von einer Quecksilberlampe emittierte, weiße Licht so filtert, dass nur der gewünschte Anregungswellenlängenbereich auf das Objekt trifft. Durch einen dichromatischen Strahlenteiler (Teilerspiegel) werden die Anregungswellenlängen effizient auf das Präparat reflektiert und gleichzeitig nur die emittierten Wellenlängen durchgelassen. Durch einen Emissionsfilter werden die emittierten Wellenlängen nochmals gefiltert, so dass nur das emittierte Wellenlängenspektrum zum Detektor gelangt.

Folgende Filtersätze wurden verwendet:

Fluorochrom	Anregungs- wellenlänge	Emissions- wellenlänge	Anregungsfilter (BP) Strahlenteiler (FT) Emissionsfilter (LP)
DAPI	350 nm	450 nm	BP365 FT395 LP450-490
FITC	495 nm	520 nm	BP450-490 FT510 LP515-565
Cy3	550 nm	570 nm	BP546 FT580 LP590
Cy5	649 nm	670 nm	BP575-625 FT645 LP660-710

Tabelle II.5.1: Filtersätze des Epifluoreszenzmikroskops

Mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops werden 2D-FISH Präparate ausgewertet und 3D-FISH-Präparate auf ihre Qualität überprüft.

5.3. Konfokalmikroskopie

Die Konfokalmikroskopie dient zur Auswertung von 3D-FISH Präparaten. Damit können einzelne lichtoptische Schnitte in der Z-Ebene durch angefärbte Zellkerne aufgenommen werden.

Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie ähnelt vom Prinzip der Epifluoreszenzmikroskopie. Allerdings besitzt das konfokale Mikroskop spezielle Laser, die während des Scanvorgangs das anregende Licht bestimmter Wellenlänge erzeugen. Dieses wird durch eine Lochblende, die sich im Brennpunkt des Lichtstrahls befindet, auf die Fokusebene gelenkt. Von dort fällt das vom Fluorochrom emittierte Licht auf einen Strahlteiler, der es auf den Detektor, in diesem Fall, einen Photomultiplier, lenkt. Auch in

diesem Strahlengang befindet sich im Brennpunkt eine Lochblende, die verhindert, dass Licht außerhalb der Fokalebene auf den Detektor fällt. Dadurch werden Hintergrundsignale vermieden.

Der Photomultiplier wandelt die ankommenden Lichtsignale in elektronische Information um, welche mittels der Software LAS-AF (Leica Application Suite-Advanced Fluorescence) in Bildmaterial umgerechnet wird.

Die verschiedenen Fokusebenen des zu scannenden dreidimensionalen Objekts, (Zellkern), welche Punkt für Punkt aufgenommen wurden, werden auf diese Weise digital weiterverarbeitet. Man erhält also pro Kern mehrere zweidimensionale Bilder verschiedener Farbkanäle, die mittels ImageJ zu Stapeln der einzelnen Kanäle zusammengefügt werden können.

Folgende Parameter wurden in den Scan-Sessions angewendet:

Objektiv	HCX PL APO 63x 1.4 oil
Zoom	12,00
Lochblende	0.99
Voxel-Size	40x40x200 nm
Bildgröße	512x512
Z-Abstand	200 nm
Frame Average	4
Bildmodus	8-Bit

Tabelle II.5.2: Parameter des Konfoklamikroskops

6. Bildbearbeitung

Die mit dem Epifluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder verschiedener Farbkanäle wurden mittels Adobe® Photoshop® CS2, Version 9.0.2 in Helligkeit und Kontrast angepasst und zu RGB-Bildern zusammengefügt.

Die Einzelbilder eines Farbkanals aus 3D-FISH- Präparaten werden mit Image J zu Bildstapeln zusammengefügt und im Z-Shift korrigiert. Die Bildstapel eines Kerns können zu RGB-Bildstapeln zusammengesetzt.

7. Auswertung der Bilddaten

Material:

- Image J
- EDMT (Tobias Thormeyer)
- MS Excel
- Mathworks Matlab

Methode:

Zunächst werden die mit dem Konfokalmikroskop aufgenommenen Einzelbilder eines Farbkanals mittels Image J zu Bildstapeln zusammengesetzt und gleichzeitig der Z-Shift korrigiert. Anschließend werden Helligkeit und Kontrast eingestellt und für jeden Kanal Schwellwerte bestimmt. Aus Z-Projektionen der einzelnen Bildstapel eines Kerns kann mit dem „Image 5D“-Plugin ein Mehrfarben-Bild hergestellt werden.

Die einzelnen Bildstapel und die dazugehörigen Schwellwerte werden dann in das Auswertungsprogramm EDMT eingegeben. Das Programm, das unter einer Laufzeitumgebung von Matlab programmiert wurde, vermisst dann die Abstände aller Voxel eines Signals zum Rand der Referenzstruktur, also zum Rand des Zellkerns oder des Chromosomenterritoriums. Signale mit ähnlichen Abständen werden in Gruppen zusammengefasst. So ergeben sich für bestimmte Abstände zu einer Referenzstruktur prozentuale Signalverteilungen, die vom Programm ausgegeben werden und mittels Excel als Graph dargestellt werden können.

Die Statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgt ebenfalls mit Hilfe von Matlab. Es wird der Mann-Whitney-Test angewendet, um signifikante Unterschiede in der Verteilung der BAC-Signale in Bezug auf den Zellkernrand, herauszufinden

III. Ergebnisse

1. CALM-AF-10-Analysen

Der Ergebnisteil zu den Versuchen bezüglich der Genregulation nach CALM-AF10-Aktivierung lässt sich in verschiedene Teilbereiche unterteilen, die hier in der zeitlichen Abfolge der durchgeführten Experimente dargestellt werden. Die zeitliche Abfolge der Experimente wird hier verwendet, um die im Laufe der Experimente aufgetretene Problematik zu verdeutlichen.

Die Teilbereiche sind:

1. Arbeit mit dem Zelltyp DG-75
2. Darstellung der Affymetrix-Daten
3. Auswahl der BAC-Klone
4. Semiquantitative RT-PCR
5. 2D- und 3D-FISH
6. Low Density Arrays

1.1. Arbeit mit dem Zelltyp DG75

Für die Experimente zur Untersuchung des Einflusses von CALM-AF10 auf die genomweite Expression und die dadurch bedingte Änderung in der Genpositionierung wurde eine Burkitt-Lymphom-Zelllinie (DG-75) verwendet, die ein stabil einkloniertes Plasmid mit dem Onkogen CALM-AF10 trägt. Die Expression von CALM-AF10 wird durch die Zugabe von Doxycyclin angeschaltet, ebenso wie die Expression von GFP, denn beide Gene stehen unter der Kontrolle eines bidirektionalen Promotors.

Die Aktivierung von der CALM-AF10 Expression wurde freundlicherweise von Medhanie Mulaw im Labor der Arbeitsgruppe Bohlander (Helmholtz-Zentrum München) durchgeführt. Dort wurde Induktionsraten von 98-99 % erzielt (s. Abb.III.1.1.), so dass die Zellen problemlos für die 3D-FISH und die vorhergehenden Experimente verwendet werden konnten.

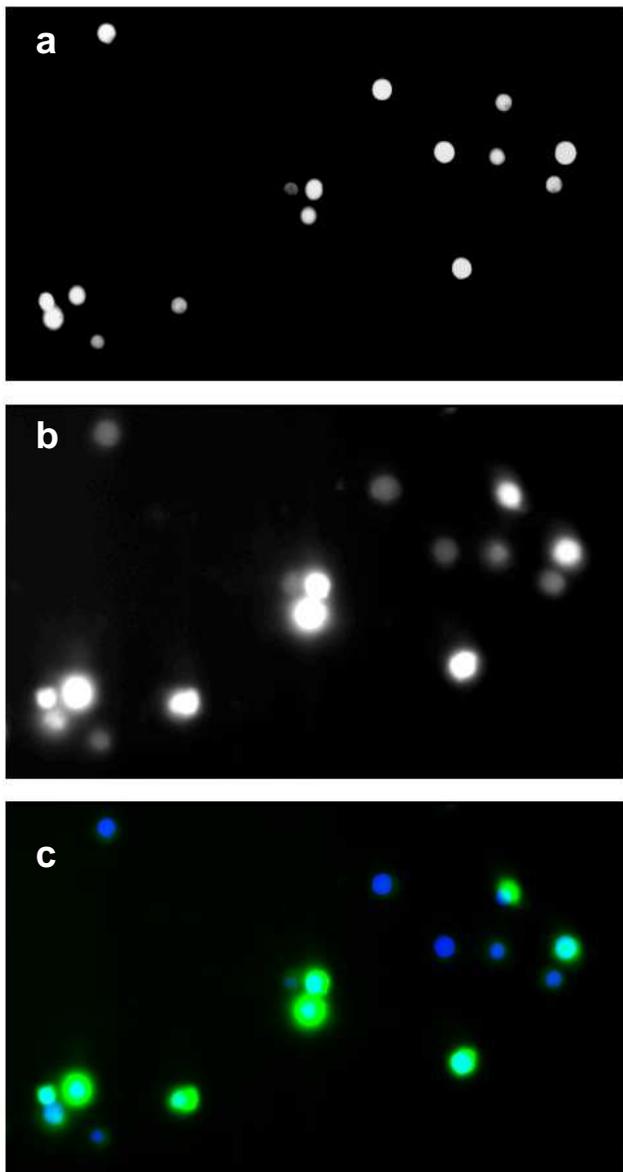


Abb. III.1.1.: DG75-Zellen
24 Std. nach Gabe von
Doxycyclin im Labor der AG
Bohlander.
a: DAPI
b: GFP
c: Überlagerung von a und b.

1.2. Darstellung der Affymetrix-Daten

Untersuchungen zur genomweiten Genexpression wurden mittels Affymetrix-Arrays durchgeführt. Es wurde Zellmaterial ohne Induktion mit Doxycyclin, und 24 bzw. 72 Std. nach Induktion untersucht. Listen für alle bekannten Gene liegen im Anhang der Arbeit vor. In der nachfolgenden Tabelle sind die wichtigsten Daten der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene und deren Nachbargene dargestellt. Dabei bedeutet der „Baseline Mean“ einen Mittelwert aus den Kontrollproben und der 0 h-Probe, der „Experiment Mean“ berechnet sich aus der Expression nach 24 Std. und 72 Std. Inkubation mit Doxycyclin und der „Fold Change“ gibt die Änderung der Expression an. Dabei bedeuten negative Werte eine

Herunterregulierung der Genexpression, positive Werte jedoch eine Erhöhung der Expression nach der Gabe von Doxycyclin.

Tabelle III.1. 1.: Tabelle der untersuchten Gene und deren Nachbarschaften. Die untersuchten Gene sind farbig unterlegt. Ein positiver Fold Change gibt eine Steigerung der Expression nach CALM-AF-10 Induktion an, ein negativer ein Absinken der Genexpression.

Gene	Affymetrix Nummer	Baseline Mean	Expression nach 24h Doxycyclin	Fold Change
GADD45A	203725_at	807,89	515,48	-1,57
GNG12	212294_at	10,07	10,53	1,05
	222834_s_at	9,75	10,59	1,09
	1555240_s_at	9,44	7,5	-1,26
DIRAS3	215506_s_at	11,37	15,64	1,38
RPE65	207107_at	8,77	2,08	-4,22
DEPDC1	220295_x_at	364,89	87,56	-4,17
	222958_s_at	519,51	134,53	-3,86
	232278_s_at	587,52	756,18	-3,76
GIPC2	219970_at	4,69	2,73	-1,72
PTGFR	207177_at	7,5	2,83	-2,65
	1555097_a_at	11,18	9,45	-1,18
IFI44L	204439_at	137,45	3027,13	22,02
IFI44	214059_at	70,76	245,58	3,47
	214453_s_at	247,91	2036,76	8,22
	1561050_a_at	5,02	10,97	2,18
ELTD1	219134_at	6,26	4,49	-1,39
C1orf103	220235_s_at	618,11	736,98	1,19
TMEM77	225228_at	484,86	334,41	-1,45
	225230_at	1985,62	2408,17	1,21
	236883_at	118,88	210,04	1,77
	240442_at	28,26	38,03	1,35
CEPT1	219375_at	1204,93	1653,86	1,37
	236327_at	25,89	35,6	1,37
	239797_at	81,31	71,08	-1,14

III. Ergebnisse

	1561884_at	28,86	32	1,12
DENND2D	221081_s_at	320,72	354,26	1,1
	235986_at	16,05	11,43	-1,4
CHI3L2	213060_s_at	2824,94	2208,94	-1,28
CHIA	220630_s_at	23,4	23,23	-1,01
C1orf88	228100_at	22,54	15,28	-1,47
OVGP1	205432_at	113,23	219,17	1,94
WDR77	201420_s_at	820,81	460,88	-1,78
	201421_s_a	469,57	222,16	-2,11
ATP5F1	211755_s_at	4831,56	4800,71	-1,01
	242398_x_at	23,98	22,64	-1,06
C1orf162	228532_at	36,44	48,1	1,32
ADORA3	206171_at	6,41	6,07	-1,06
	223660_at	7,4	3,96	-1,87
	237904_at	1,9	4,94	2,6
RAPIA	202362_at	1950,45	1928,33	-1,01
	239409_at	130,49	144,98	1,11
	240215_at	1,15	1,04	-1,11
	243527_at	41,42	39,44	-1,05
	1555339_at	454,87	5290,56	11,63
	1555340_x_at	861,5	8070,94	9,37
C1orf183	220476_s_at	45,99	47,67	1,04
	229382_at	2,73	1	-2,73
	229608_at	33,36	22,71	-1,47
	241809_at	23,08	15,98	-1,44
	1557479_at	9,79	7,37	-1,33
DDX20	223331_s_at	632,48	756,16	1,2
	224315_at	437,05	523,77	1,2
KCND3	211301_at	4,16	1,63	-2,54
	211827_s_at	3,56	5,66	1,59

1.3. Auswahl der zu untersuchenden Gene und BAC-Klone

Ausgehend von den Affymetrix-Listen wurden Gene für die Untersuchung der räumlichen Positionierung im Zellkern folgendermaßen ausgewählt: Die Bedingung für die Auswahl eines Gens war, dass es eine mindestens dreifache Änderung in der Expression vom uninduzierten im Vergleich zum induzierten Zustand zeigte. Dabei heißt ein positiver „fold change“, dass die Expression eines Gens ansteigt, ein negativer Wert würde bedeuten, dass die Expression des Gens schwächer wird. Mit Hilfe der Ensembl- und NCBI- Datenbanken wurden zu den ausgewählten Genen BAC-Klone ausgesucht, auf denen möglichst wenig andere Gene zusätzlich liegen sollten. Es wurden folgende 8 BAC-Klone ausgewählt und bei BACPAC bestellt:

BAC	Position	Gen	„Fold Change“
RP11-348L16	1p31.1	IFI44, IFI44L	6,14 bzw. 17,09
RP11-609D21	17p13.1	BIRC4BP	4,41
RP11-705K13	1p13.3	RAP1A	3,4
RP11-437P23	11p15.5	IFITM1	3,15
RP11-358F02	1p31.2	DEPDC1	-3,35
RP11-291N5	4q24	CENPE	-3,54
RP11-650A22	16p13.12	LOC440338	-6,24
RP11-11L08	13q33.1	SLC10A2	-9,62

Tabelle III.1.2: Tabelle der untersuchten Gene und den zugehörigen BAC-Sonden. Farblich markiert sind die später in den FISH-Experimenten verwendeten BAC-Klone.

1.4. Semiquantitative RT-PCR

Um die Affymetrix – Daten über Expression der ausgewählten Gene nochmals zu überprüfen wurde zunächst eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde die RNA aus induzierten und nicht induzierten Zellen isoliert, im Gel auf mögliche Denaturierung hin überprüft (s. Abb. III.1.2.), die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA photometrisch bestimmt (s. Tabelle III.1.3.) und in cDNA umgewandelt.

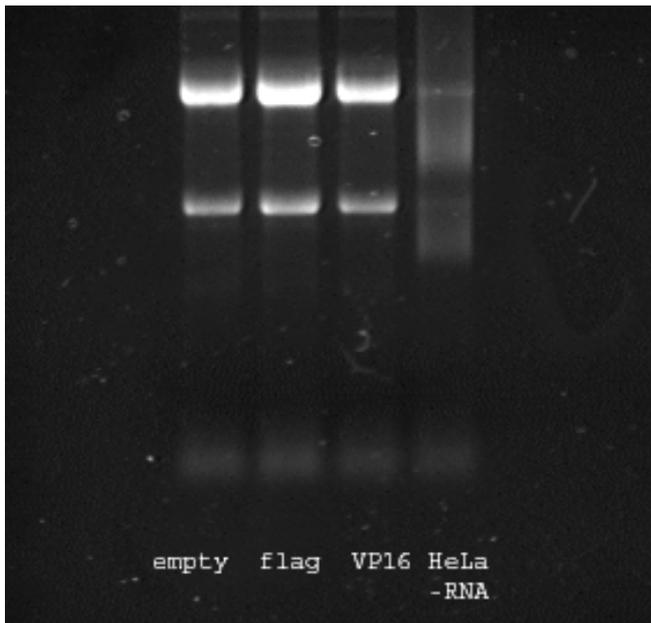


Abb. III.1.2.: RNA isoliert aus drei verschiedenen Zelltypen (DG-75 empty, DG75-Flag und DG75-VP16, mit der gearbeitet wurde). 1 µg einer HeLa-RNA läuft als Kontrolle und zur Abschätzung der DNA-Menge mit, wobei die Kontroll-RNA in diesem Fall bereits stark degradiert ist. Die anderen drei RNAs zeigen sehr schöne 28S (obere Bande) und 18S (untere Bande) rRNAs und weisen keine Anzeichen einer Degradierung auf.

	VP16 uninduziert (1:500)	VP16 induziert (1:500)
OD 260 nm	0,006	0,008
Ratio (Reinheit der RNA von Protein)	1,722	1,851
Konzentration	0,12 µg/µl	0,16 µg/µl

Tabelle III.1.3.: Konzentration und Reinheit der isolierten RNAs.

Aus der OD kann die Konzentration mittels Formel berechnet werden, die Ratio wird vom Gerät angegeben. Die Ratio sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen, um die RNA weiterverwenden zu können.

Aus der RNA wird mittels SuperScript II-Reverse Transkriptase-Reaktion cDNA hergestellt, die dann in die semiquantitative RT-PCR eingesetzt werden kann. Dafür wurden weiterhin mittels „Fast-PCR“ Primer für jedes zu untersuchende Gen ausgesucht.

Die Primer werden mit verschiedenen cDNA-Konzentrationen (1:1, 1:10, 1:100) in die PCR-Reaktion eingesetzt und nach dem PCR-Lauf mit 25 Zyklen auf ein 1,8 % iges Agarosegel aufgetragen. Ebenso werden die –RT-Negativkontrollen behandelt und mitgeführt. Die aufgrund der verwendeten Primer erwarteten Fragmente sollten mit zunehmender eingesetzter cDNA-Konzentration im Gel stärkere Banden ergeben. Zunächst wird jedoch eine PCR mit dem Haushaltsgen GAPDH durchgeführt. Dieses Kontrollgen ist in allen Zelltypen hoch exprimiert und gibt deutliche Banden bei 337 bp (s. Abb.III.1.3.).

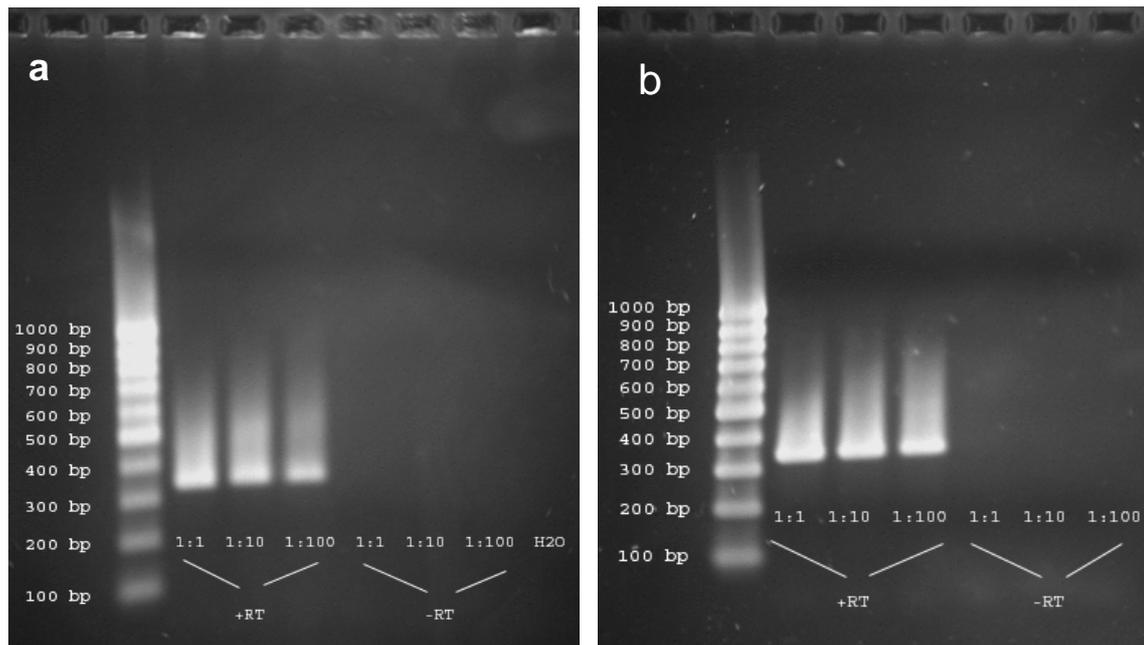


Abb. III.1.3: Semiquantitative PCR-Reaktion für GAPDH mit cDNA aus uninduzierten (a) und induzierten (b) Zellen. Der Anstieg in der Bandenstärke ist zu erkennen, die –RT-Negativkontrolle und die Wasserkontrolle ergeben kein Signal.

Nachdem die Kontrolle mit GAPDH anzeigt, dass die, aus der isolierten RNA gewonnene, cDNA in Ordnung sind, können weitere PCR-Reaktionen angesetzt und durchgeführt werden. Nach GAPDH wurde die Expression von CALM-AF10 überprüft. Allerdings zeigten sich hier in der Positiv-Probe uninduzierter Zellen und in der –RT-Negativkontrolle sowohl in uninduzierten als auch in induzierten Zellen Banden, (s. Abb. III.1.4.), die Wasserkontrolle ist dennoch erwartungsgemäß negativ, d.h. es zeigt sich hier keine Bande.

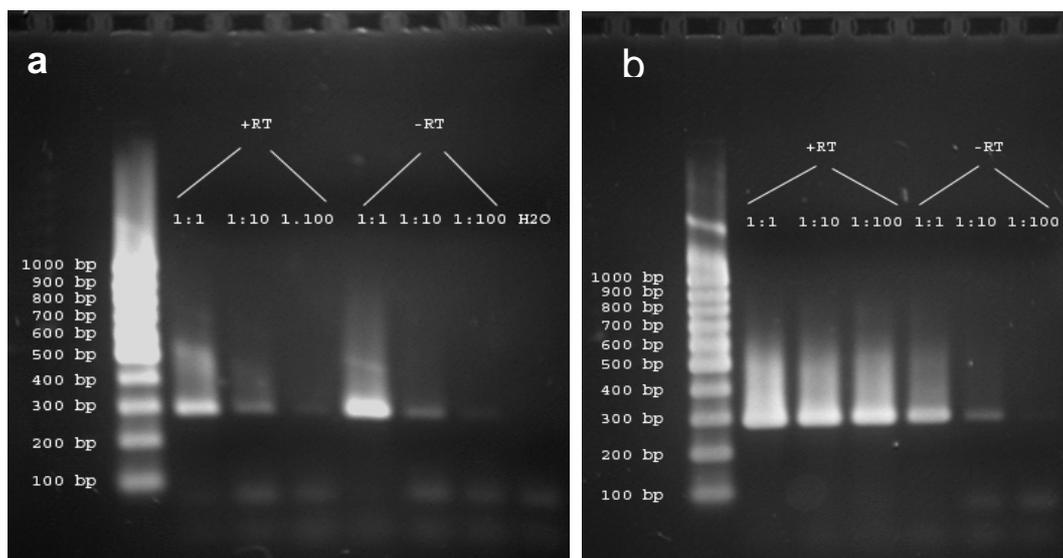


Abb. III.1.4.: Semiquantitative PCR-Reaktion für CALM-AF10 mit cDNA aus uninduzierten (a) und induzierten (b) Zellen. In der –RT-Negativkontrolle sind Banden zu sehen.

Bei den Banden, die sich für CALM-AF10 in der Negativkontrolle bzw. auch in den Positiv-Proben zeigen kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um DNA-Verunreinigungen der RNA handelt, die auch während der cDNA-Synthese mittels reverser Transkription unbeschadet blieben, da die Primer für CALM-AF10 nicht wie alle anderen Primer über ein Intron hinweg designed werden konnten.

Daher wurde vor der reversen Transkription eine DNase-Behandlung der isolierten RNA durchgeführt, um noch vorhandene DNA zu entfernen. Nach der DNase-Behandlung wird die RNA über eine RNeasy-Säule aufgereinigt und anschließend für die reverse Transkription verwendet.

Nach der reversen Transkription wurde so verfahren, wie oben beschrieben und die PCR-Produkte wurden wiederum auf ein Agarosegel aufgetragen (s. Abb. III.1.5.). Nach dem DNase Verdau ist deutlich zu sehen, dass die Banden in der Positiv-Probe der uninduzierten Zellen und in beiden Negativkontrollen deutlich schwächer wurden, jedoch nicht vollständig verschwunden waren.

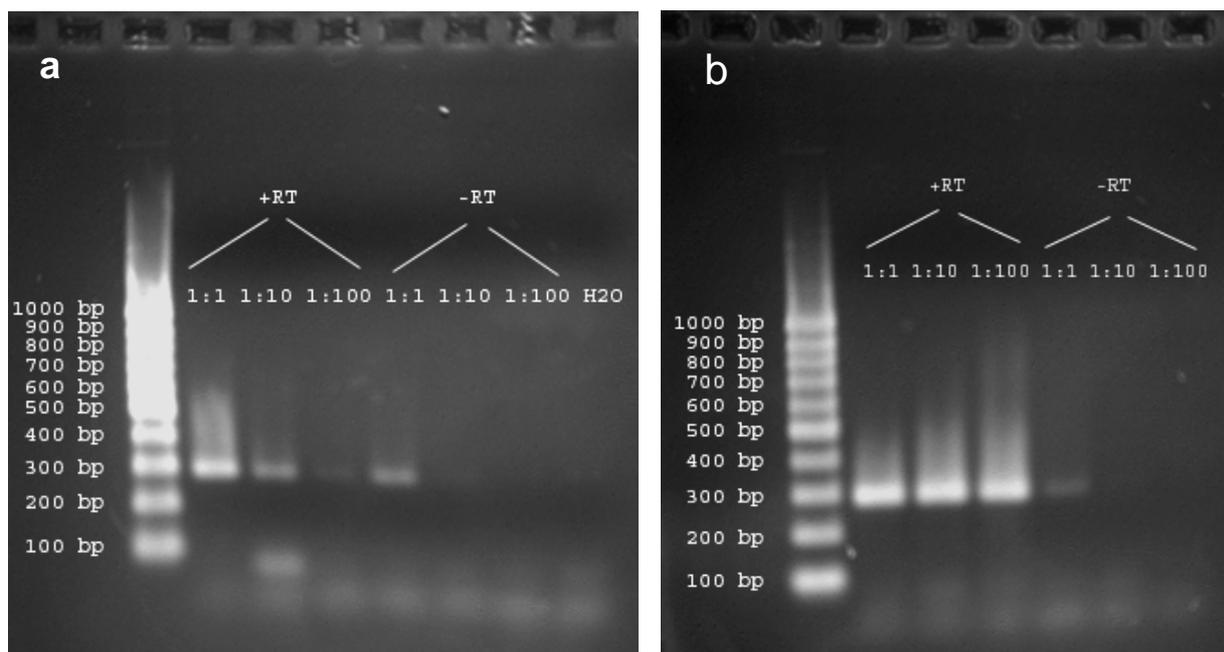


Abb. III.1.5.: Semiquantitative PCR-Reaktion für CALM-AF10 mit cDNA aus uninduzierten (a) und induzierten (b) Zellen nach DNase Verdau. In der Positiv-Probe der uninduzierten Zellen und der Negativ-Kontrolle beider Zelltypen sind noch zu deutliche Banden zu erkennen.

Um diese Tatsache zu überprüfen wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Bohlander ebenfalls eine semiquantitative RT-PCR gegen CALM-AF-10 durchgeführt, allerdings mir

etwas anderen Primern (s. Tabelle III.1.7.). Im Gel zeigten sich hier keine Banden in den uninduzierten Zellen und in den Negativ-Kontrollen (s. Abb. III.1.6.).

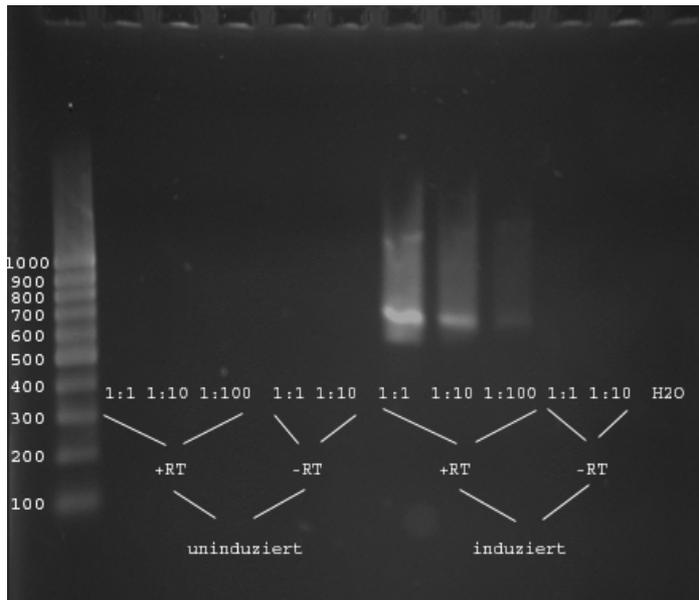


Abb. III.1.6.: Semiquantitative PCR-Reaktion für CALM-AF10 durchgeführt von Medhanie Mulaw, AG Bohlander, Helmholtz-Zentrum München. Hier zeigen sich nur in der Positiv-Probe der induzierten Zellen die erwarteten Banden von 552 bp.

Es kann also nach der semiquantitativen RT-PCR mit CALM-AF-10 davon ausgegangen werden, dass die Induktion der Zellen erfolgreich war, und CALM-AF-10 nach der Gabe von Doxycyclin exprimiert wird.

Anschließend wurden die Gene, die laut Affymetrix-Daten einer herauf- bzw. herab-Regulation durch CALM-AF10 unterliegen, untersucht.

Für die hochregulierten Gene wurden dabei folgende Ergebnisse erzielt:

IFI44 ist ein Gen, das eine deutlich schwächere Expression zeigt als z.B. GAPDH, eine schwache Hochregulation ist jedoch im Gel zu erkennen (s.Abb.III.1.7.)

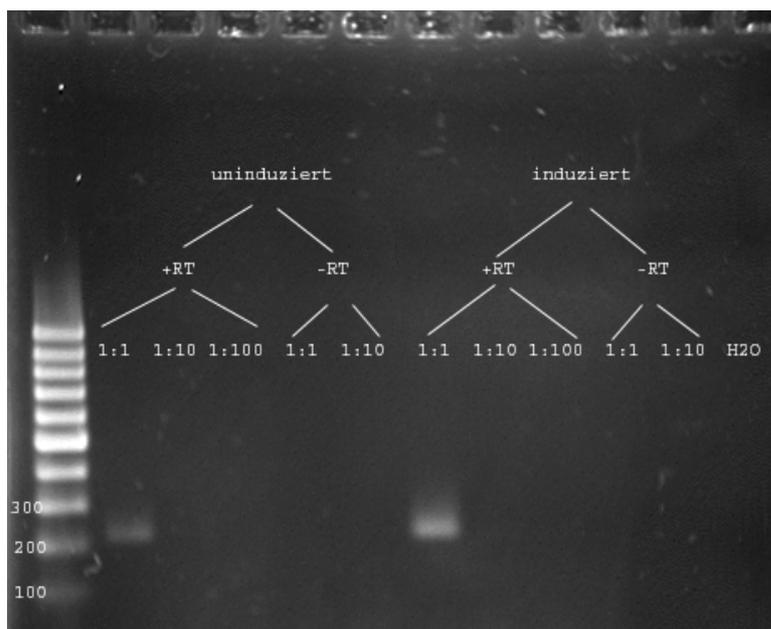


Abb. III.1.7.: Semiquantitative PCR-Reaktion für IFI44 mit cDNA aus uninduzierten und induzierten Zellen. Der Anstieg in der Bandenstärke ist zu erkennen, die -RT-Negativkontrolle und die Wasserkontrolle ergeben kein Signal.

Als zweites, durch CALM-AF10 hochreguliertes Gen wurde BIRC4BP untersucht. Auch dieses Gen zeigt eine deutlich schwächere Expression als GAPDH, jedoch ist auch hier eine schwache Hochregulation erkennbar.

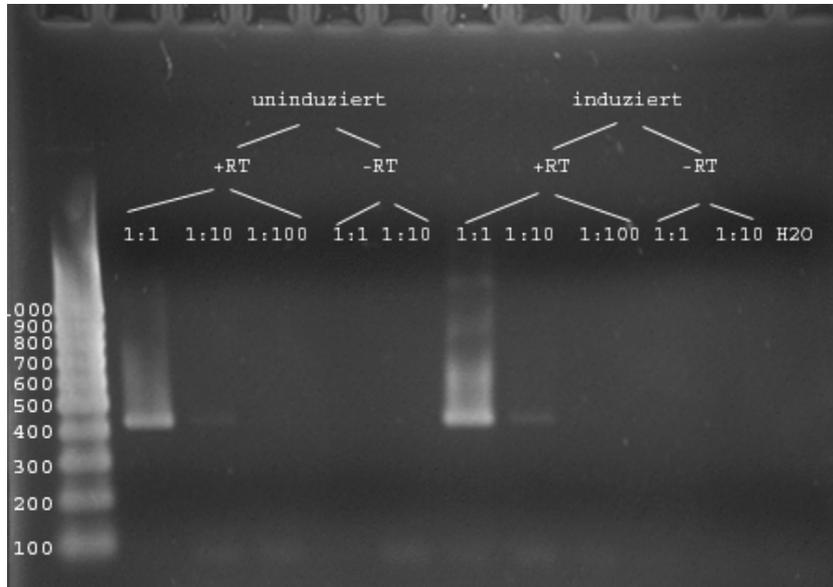


Abb. III.1.8.: Semiquantitative PCR-Reaktion für BIRC4BP mit cDNA aus uninduzierten und induzierten Zellen. Der Anstieg in der Bandenstärke zwischen uninduzierten und induzierten Zellen ist zu erkennen, die –RT-Negativkontrolle und die Wasserkontrolle ergeben kein Signal.

Auch RAP1A zeigt eine ähnliche Expression wie IFI44 und BIRC4BP, eine schwache Hochregulation ist auch hier erkennbar (s. Abb.III.1.9.).

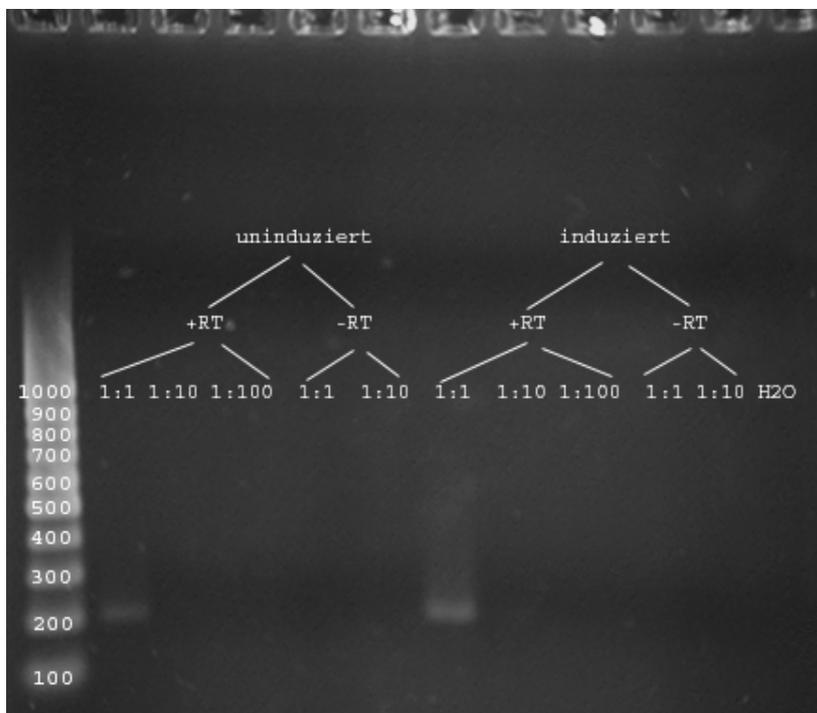


Abb. III.1.9: Semiquantitative PCR-Reaktion für RAP1A mit cDNA aus uninduzierten und induzierten Zellen. Der Anstieg in der Bandenstärke ist zu erkennen, die –RT-Negativkontrolle und die Wasserkontrolle ergeben kein Signal.

Die Untersuchung der Expression bzw. deren Regulation mittels semiquantitativer PCR zeigt bei IFITM1 eine stärkere Expression als bei den drei vorher untersuchten Genen, allerdings

scheint die Expression zwischen uninduzierten und induzierten Zellen stabil zu bleiben, bzw. geht evtl. sogar leicht zurück (s. Abb. III.1.10.).

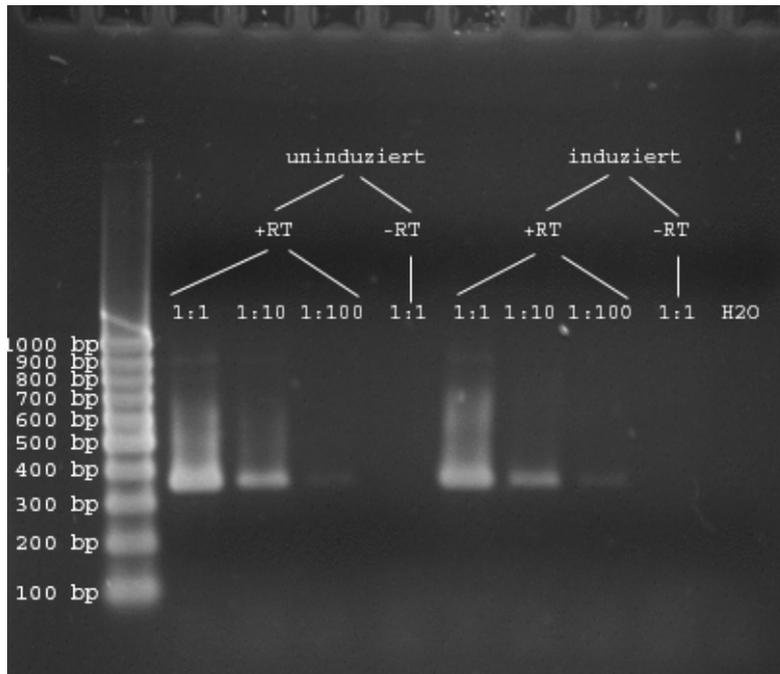


Abb. III.1.10: Semiquantitative PCR-Reaktion für IFITM1 mit cDNA aus uninduzierten und induzierten Zellen. Die Bandenstärke zwischen uninduzierten und induzierten Zellen bleibt relativ ähnlich, geht evtl. sogar leicht zurück. Negativkontrolle und Wasserkontrolle sind negativ.

Für DEPDC1, das laut Affymetrix-Daten herunterreguliert werden sollte, zeigt in uninduzierten und induzierten Zellen annähernd ähnliche Bandenstärken, es scheint als wären die Banden aus den induzierten Zellen etwas stärker ausgeprägt, was nicht für eine Herunterregulation spricht (s. Abb. III.1.11.)

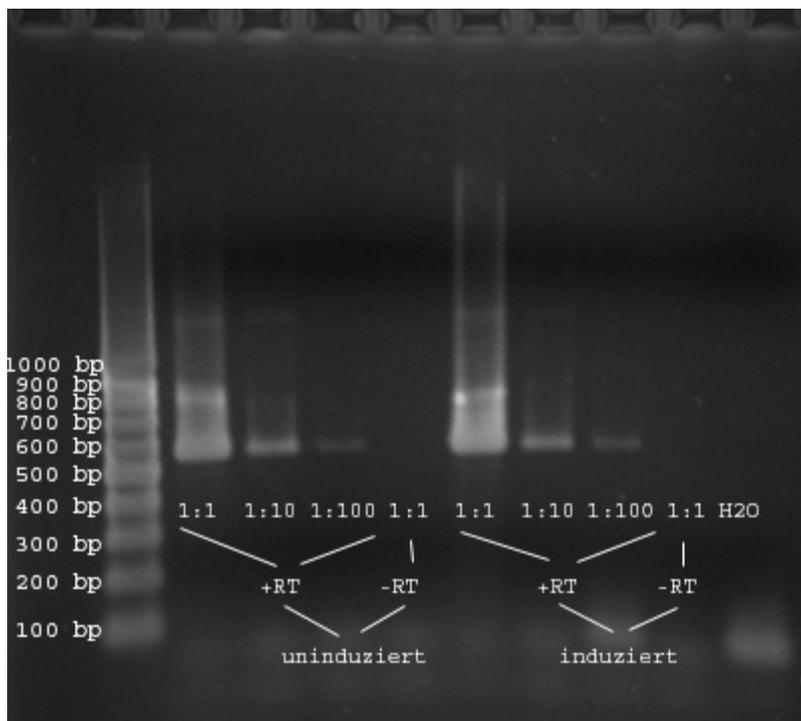


Abb. III.1.11.: Semiquantitative PCR-Reaktion für DEPDC1 mit cDNA aus uninduzierten und induzierten Zellen. Die Banden in den induzierten Zellen scheinen etwas stärker zu sein als die in den uninduzierten Zellen, was gegen eine Herunterregulation zu sprechen scheint.

Denselben Trend, der bereits bei DEPDC1 erkennbar wird, zeigt sich auch für CENPE. Auch hier ist die PCR-Bande in den induzierten Zellen stärker ausgeprägt als in den uninduzierten Zellen (s. Abb. III.1.12.)

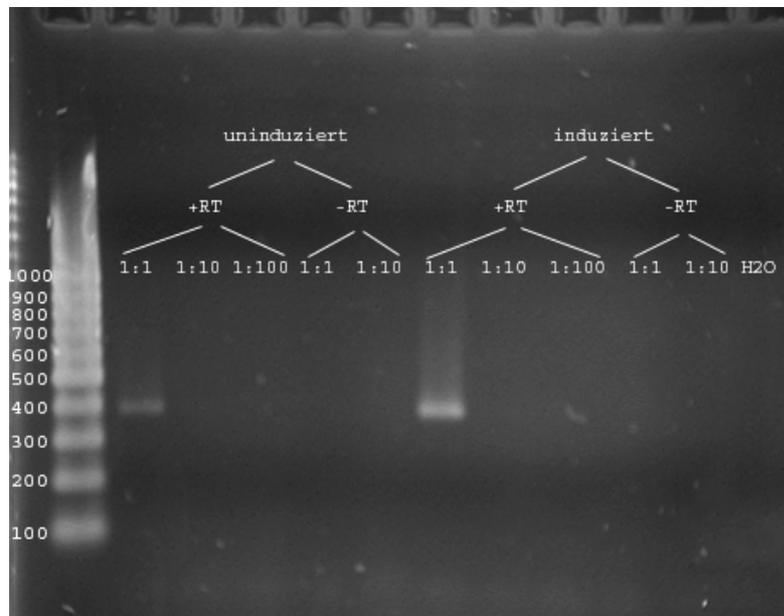


Abb. III.1.12.: Semiquantitative PCR-Reaktion für CENPE mit cDNA aus uninduzierten und induzierten Zellen. Die Banden in den induzierten Zellen scheinen etwas stärker zu sein als die in den uninduzierten Zellen, was gegen eine Herunterregulation zu sprechen scheint.

Für die beiden anderen herunterregulierten Gene, LOC440338 und SLC10A2 konnte trotz mehrmaliger Durchführung der PCR-Reaktion kein Ergebnis gewonnen werden, da sich im Gel keine Banden zeigten. Möglicherweise liegt die Expression der beiden Gene unter der Sensitivitätsgrenze der PCR.

Nachdem die Affymetrix-Daten und die semiquantitative RT-PCR zum Teil widersprüchliche Ergebnisse erbrachten, wurde beschlossen, die Expression mittels Real-Time PCR zu überprüfen. Da auch die Expression von Nachbargenen einen Einfluss auf die Positionierung eines Gens haben kann, wurde eine TaqMan-PCR im Stil von Low Density Arrays geplant. Für eine LDA-Karte mit 96 gleichzeitig zu untersuchenden Genen, wurden jeweils die Nachbargene in einem Radius von 600 kb, ausgehend vom zu untersuchenden Gen, gewählt. Weiterhin wurde die Platte mit 10 Haushaltsgenen zur Kontrolle belegt. Da jedoch die Lieferzeit für diese Platte ausgesprochen lang ist, wurden die weiteren Experimente (FISH) ausgehend von den Affymetrix-Daten bereits vor der Durchführung der LD-Arrays fertig gestellt. Im Rahmen dieser Arbeit, in der die Experimente in ihrer zeitlichen Reihenfolge dargestellt werden sollen, werden nun auch die FISH-Experimente und deren Auswertung vorangestellt, auf die Ergebnisse der LDAs wird dann im folgenden eingegangen.

1.5. FISH-Experimente

Alle BAC-Sonden wurden zunächst mittels 2D-FISH auf ihre korrekte Hybridisierung hin untersucht. Dann wurden drei Gene, die alle auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 liegen, und deren BAC-Klone alle korrekte Hybridisierung zeigten, für die 3D-FISH ausgewählt. Von diesen drei Genen ist laut Affymetrix-Daten ein Gen, DEPDC1, herunterreguliert, die anderen beiden, IFI44 und RAP1A, sind hochreguliert (s Abb. III.1.13.).

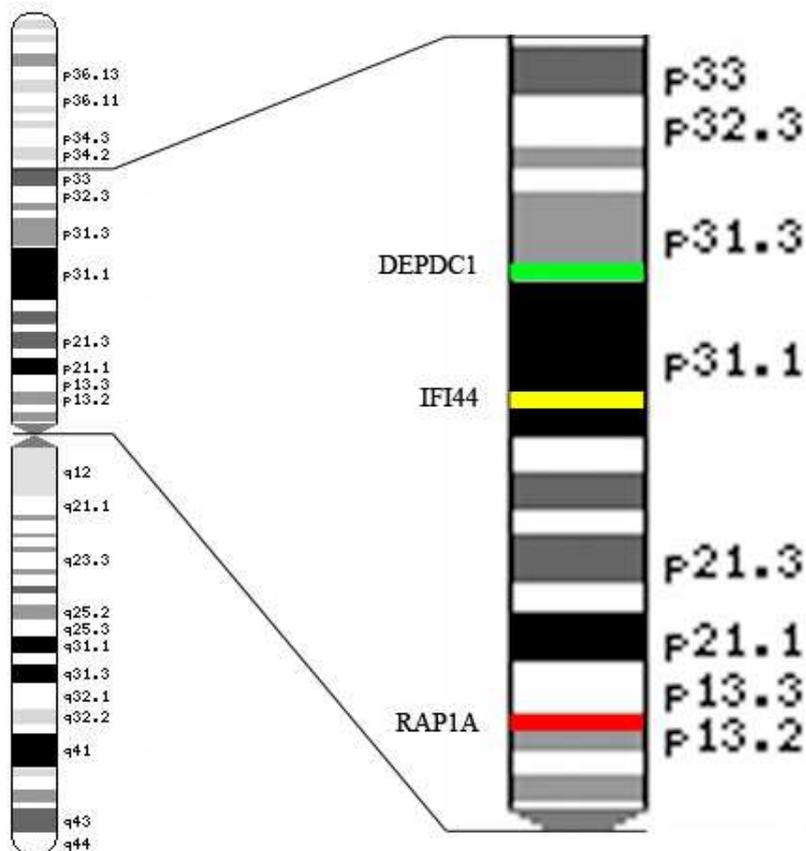


Abb. III.1.13.: Ideogramm von Chromosom 1 mit Vergrößerung des Abschnitts, auf dem die ausgewählten BAC-Klone hybridisieren.

Die Tabellen zeigen die ausgewählten Gene, deren Expression laut Affymetrix-Arrays zum Zeitpunkt der Induktion (= Baseline Mean), nach 24 und 72 Std. und den daraus berechneten „Fold Change“.

Gene	VP16 0 Std. (baseline mean)	VP16 24 Std.	VP16 72 Std.	Fold Change
DIRAS3	14,45	15,64	11,58	-1,05
GPR177	4,01 / 19,72 / 6,42	8,62 / 9,68 / 2,43	2,04 / 9,73 / 1,77	1,31 / -2,03 / -3,05
RPE65	8,9	2,08	6,98	-2,02
DEPDC1	382,75 / 544,99 / 601,31	87,56 / 134,53 / 156,18	141,81 / 216,4 / 234,59	-3,35 / -3,11 / -3,08

Tabelle III.1.4.: Gene im Umkreis von 600 kb um DEPDC1. Das hellgrün unterlegte Feld zeigt ein Gen an, das mit DEPDC1 auf dem zugehörigen BAC-Klon zu finden ist. Das negative Vorzeichen beim „Fold Change“ gibt an, dass das Gen herunterreguliert wird.

Gene	VP16 0 Std. (baseline mean)	VP16 24 Std.	VP16 72 Std.	Fold Change
GIPC2	6,55	2,73	1,93	-2,83
PTGFR	5,67/9,53	2,83/9,45	5,02/11,78	-1,45/1,09
IFI44L	165,58	3027,13	2626,49	17,06
IFI44	307,01 / 82,99 / 6,55	2036,76 / 245,58 / 10,97	1728,84 / 502,43 / 10,72	6,14 / 4,51 / 1,66
ELTD1	4,78	4,49	3,69	-1,19

Tabelle III.1. 5.: Gene im Umkreis von 600 kb um IFI44. Das hellgelb unterlegte Feld zeigt ein Gen an, das mit IFI44 auf dem zugehörigen BAC-Klon zu finden ist.

Gene	VP16 0 Std. (baseline mean)	VP16 24 Std.	VP16 72 Std	Fold Change
C1orf103	627,31	736,98	691,98	1,14
TMEM77	483,46 / 1889,03 / 122,07 / 27,6	334,41 / 2408,17 / 210,04 / 38,03	518,48 / 1696,77 / 147,69 / 24,88	-1,13 / 1,09 / 1,46 / 1,13
CEPT1	1209,76 / 26,21 / 77,59 / 28,67	1653,86 / 35,6 / 71,08 / 32	1329,69 / 25,67 / 56,97 / 28,99	1,23 / 1,18 / - 1,2 / 1,06
DENND2D	284,82 / 12,17	354,26 / 11,43	333,78 / 13,35	1,21 / -1
CHI3L2	2344,01	2208,53	1985,71	-1,12
CHIA	20,38	23,23	15,13	-1,07
C1orf88	20,1	15,28	10,95	-1,53
OVGP1	116,26	219,17	138,39	1,54
WDR77	822,73 / 465,58	460,88 / 222,16	841,75 / 452,95	-1,26 / -1,38
ATP5F1	4919,78 / 19,44	4800,71 / 22,64	5581,67 / 6,78	1,05 / -1,32
C1orf162	40,87	48,1	54,31	1,24
ADORA3	7,36 / 7,44 / 1,64	6,07 / 3,96 / 4,94	16,57 / 13,93 / 7,63	1,55 / 1,18 / 3,83
RAP1A	2660 / 142,05 / 1694,34 / 1934,47 / 1,21 / 43,44	8070,94 / 144,98 / 5290,56 / 1928,33 / 1,04 / 39,44	9998,64 / 179,59 / 8064,22 / 1836,51 / 5,08 / 45,58	3,4 / 1,15 / 3,94 / -1,02 / 2,2 / -1,02
C1orf183	42,73 / 2,41 / 31,54 / 23,99 / 11,55	47,67 / 1 / 22,71 / 15,98 / 7,37	35,15 / 1,96 / 50,74 / 38,47 / 10,57	-1,04 / -1,59 / 1,16 / 1,13 / -1,25
DDX20	658,48 / 484,46	756,16 / 523,77	691,63 / 636,33	1,1 / 1,2
KCND3	3,72 / 3,44	1,63 / 5,66	7,4 / 1,77	1,21 / 1,04

Tabelle III.1.6.: Gene im Umkreis von 600 kb um RAP1A. Das hellrot unterlegte Feld zeigt ein Gen an, das mit RAP1A auf dem zugehörigen BAC-Klon zu finden ist.

1.5.1. Vorbereitungen für die FISH-Experimente

Zunächst wurden die BAC-Sonden mittels Minipräp aus den E.coli-Zellen isoliert, die Konzentration und Ratio photometrisch (s. Tabelle III.1.7.) bestimmt und die BAC-DNAs auf einem Agarosegel (s. Abb. III.1.14.) überprüft.

Gen (BAC)	1:100		1:500	
	Ratio	Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	Ratio	Konz. [$\mu\text{g/ml}$]
IFI44 („H1“)	1,793	7505,0	1,719	8855,7
BIRC4BP („H2“)	1,786	1882,3	1,791	2318,5
RAP1A („H3“)	1,883	3587,8	1,805	4274,3
IFITM1 („H4“)	2,026	1549,6	1,816	2062,0
DEPDC1 („R1“)	1,959	2057,7	1,814	2914,3
CENPE („R2“)	1,867	5473,7	1,806	6205,9
LOC440338 („R3“)	1,950	2051,4	1,810	2515,8
SLC10A2 („R4“)	1,850	3992,5	1,775	4720,0

Tabelle III.1.7.: Konzentration und Ratio der isolierten BAC-DNAs. Die für die FISH-Experimente ausgewählten BACs sind bereits farblich unterlegt, die Arbeitsnamen der BAC-Sonden sind in Anführungszeichen mit angegeben.

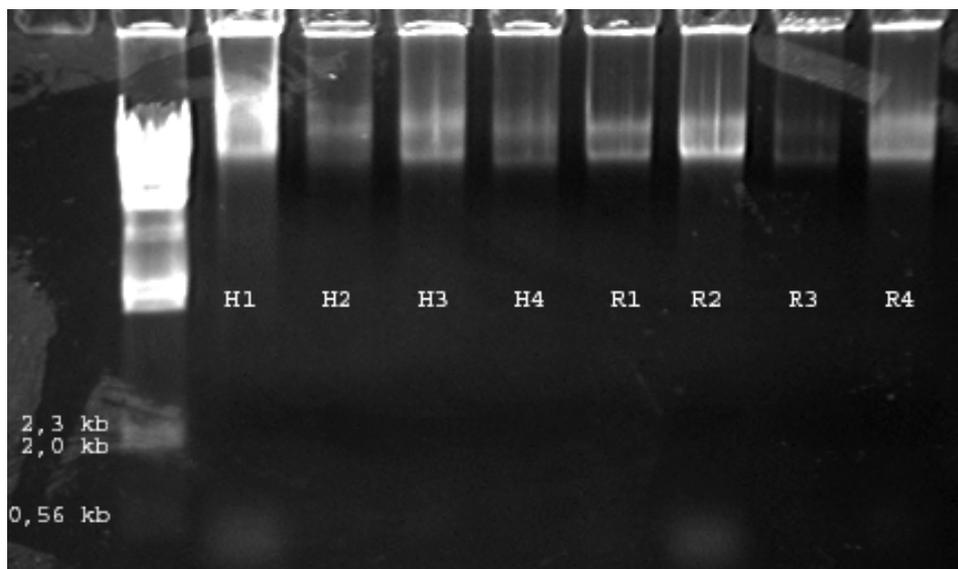


Abb. III.1.14.: Kontrolle der isolierten BAC-DNAs auf einem Agarosegel. Deutliche Unterschiede in der Isolierungseffizienz sind sichtbar und zeigen sich auch in der photometrisch gemessenen Expression.

Nach der Isolierung und Kontrolle der BAC-DNAs wurde die DNA mittels primärer DOP-PCR amplifiziert (s. Abb. III.1.15.) und mittels Label-PCR markiert (s. Abb. III.1.16.). Dann wurden alle BAC-Sonden einzeln, mit dem zugehörigen Chromosomenpaint, hybridisiert und die Korrektheit der Hybridisierung mittels Epifluoreszenzmikroskopie überprüft (s. III.1.17.)

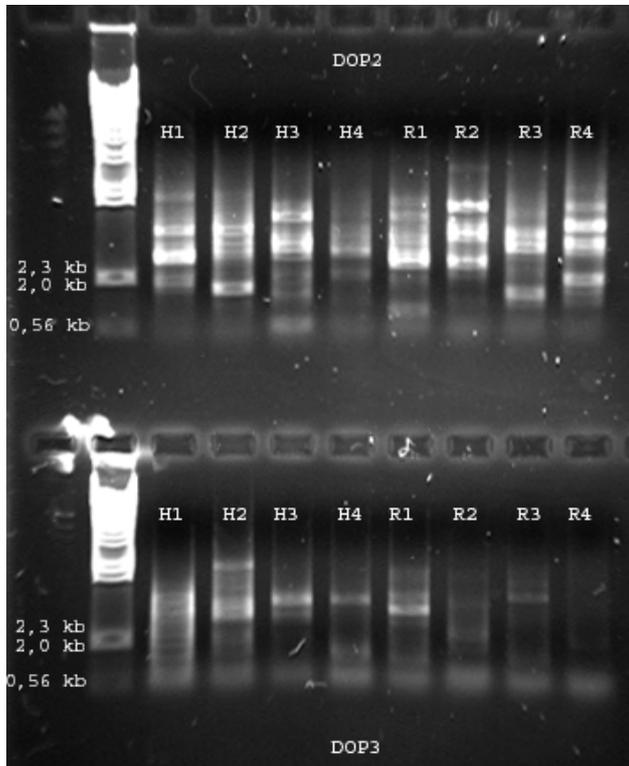


Abb. III.1.15.: Amplifikation der BAC-DNAs mittels primärer DOP-PCR. Auf dem oberen Kamm sind die DOP2-Proben, auf dem unteren Kamm die DOP3-Proben aufgetragen.

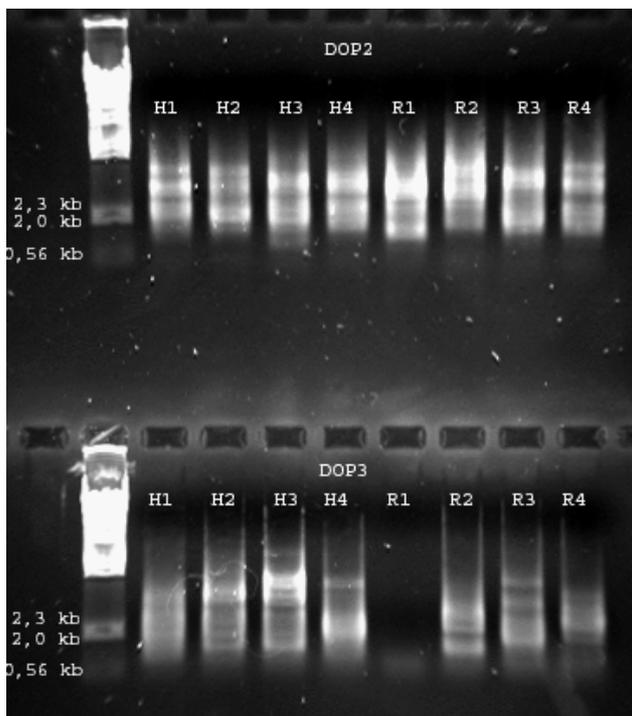


Abb. III.1.16.: Markierung der BAC-DNAs mittels Label- DOP-PCR. Auf dem oberen Kamm sind die DOP2-Proben, auf dem unteren Kamm die DOP3-Proben aufgetragen. Alle BAC-Sonden wurden mit Digoxigenin, die Paints mit Tamra direkt markiert (nicht auf der Abbildung zu sehen). Die Markierung von R1 hat nicht funktioniert und wurde gesondert nachgeholt und auf dem Gel überprüft.

Mit den markierten BAC-DNAs und den Paint-Sonden wurden Hybridisierungsmixe hergestellt, und auf menschlichen Metaphasepräparaten getestet. Dabei wurde Digoxigenin mit einem FITC-markierten Sheep- α -Dig-Antikörper nachgewiesen. Die Abbildung III.1.18. zeigt eine korrekte Hybridisierung, die Abbildungen III.1.19. und III.1.20. zeigen nicht korrekte Hybridisierungen, d.h. die BAC-Sonde hybridisiert nicht an der erwarteten Stelle.

1.5.2. 2D-FISH

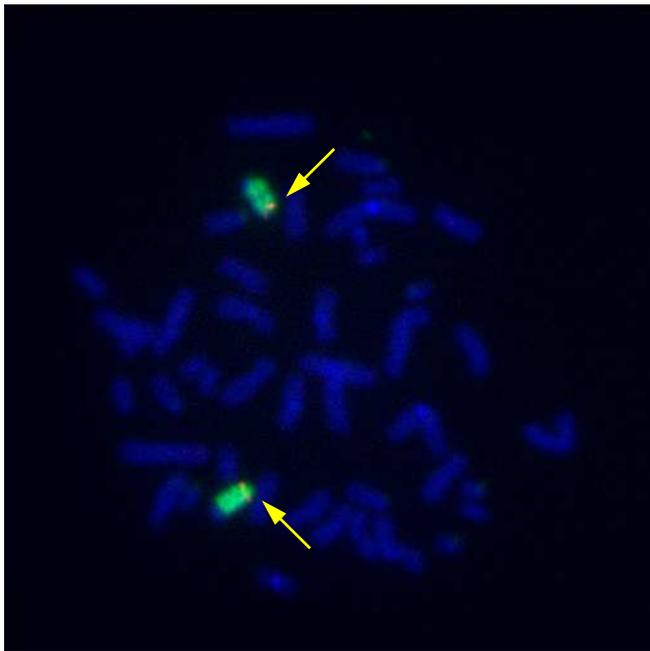


Abb. III.1.17.: korrekte Hybridisierung (Pfeil) des BACs für das SLC10A2-Gens auf dem Chromosom 13.
Blau: DAPI, Grün: Chromosomenpaint, Rot: BAC-Sonde

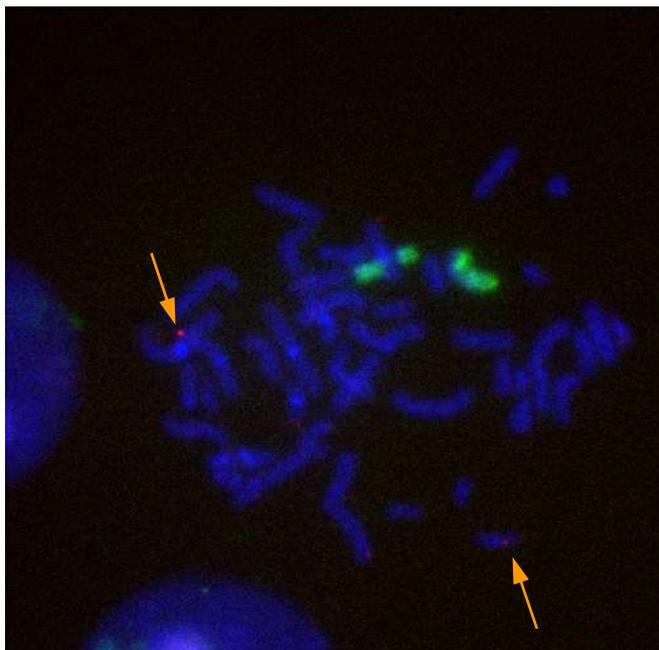


Abb. III.1.18.: BAC-Sonde für IFITM1 und Paint für Chromosom 11. BAC hybridisiert auf einem anderen Chromosom als erwartet (Pfeil).
Blau: DAPI, Grün: Chromosomenpaint, Rot: BAC-Sonde

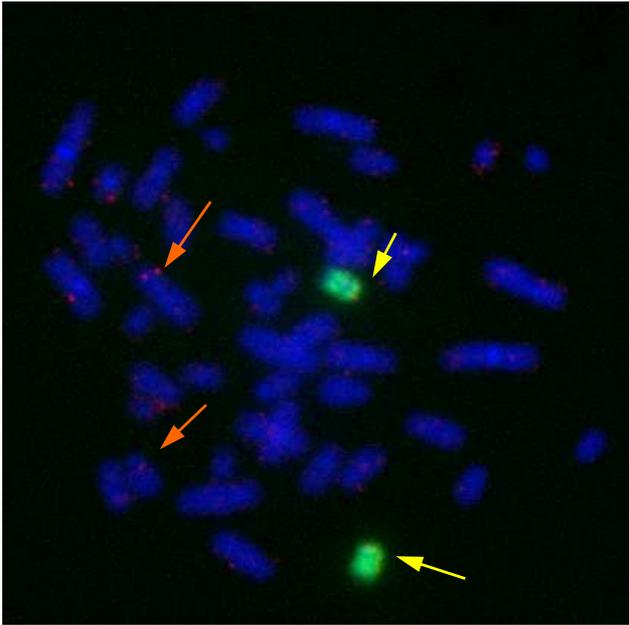


Abb. III.1.19.: BAC-Sonde für BIRC4BP und Paint für Chromosom 17. Starke Kreuzhybridisierung der BAC-Sonde mit anderen Chromosomen (korrekte Hybridisierung: gelbe Pfeile, Kreuzhybridisierungen: orange Pfeile). Blau: DAPI, Grün: Chromosomenpaint, Rot: BAC-Sonde

Die ausgewählten BAC-Sonden für Chromosom 1 zeigten alle eine korrekte Hybridisierung und wurden Biotin mit (DEPDC1), DNP (IFI44) und Digoxigenin (RAP1A) markiert und mit entsprechenden Sekundärantikörpern nachgewiesen. Der Paint für Chromosom 1 wurde wiederum mit Tamra direkt markiert.

Die Hybridisierung auf Metaphasechromosomen zeigte folgendes Ergebnis (Abb. III.1.20.)

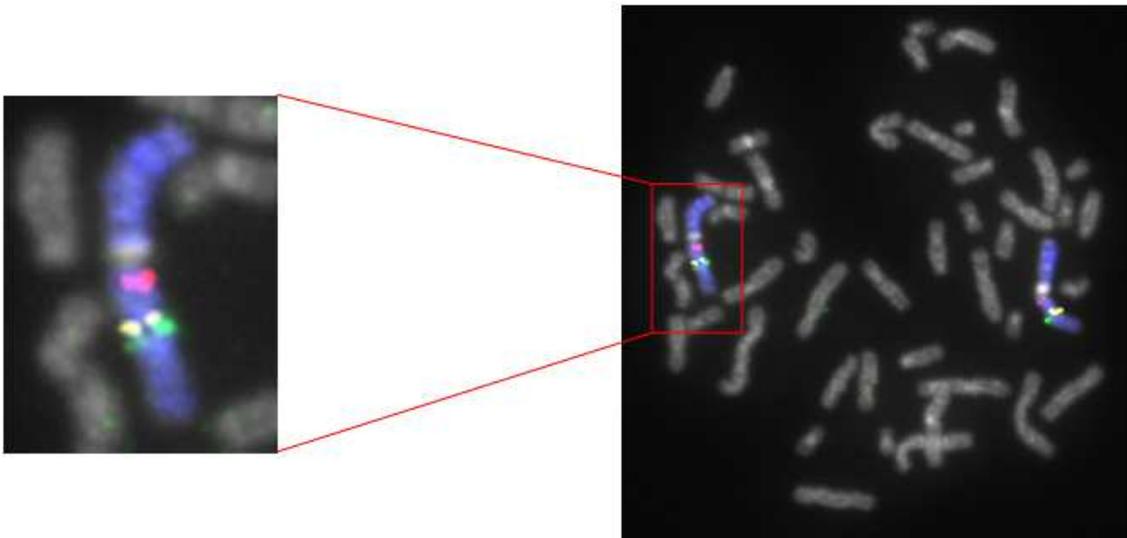


Abb. III.1.20.: 2D-FISH der ausgewählten BAC-Sonden für Chromosom 1. Blau: DAPI, Grün: DEPDC1, Gelb: IFI44, Rot: RAP1A.

1.5.3. 3D-FISH

Nach erfolgreicher 2D-Hybridisierung wurde der Hybmix mit den drei BAC-Sonden für Chromosom 1 für 3D-FISH auf uninduzierten und induzierten Interphase-Zellkernen verwendet (s. Abb. III.1.21.).

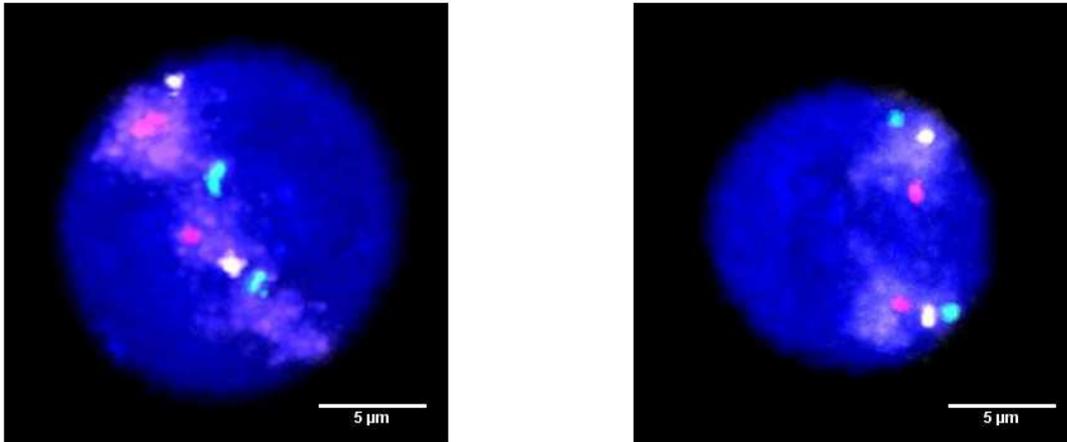


Abb. III.1.21.: 3D-FISH der ausgewählten BAC-Sonden für Chromosom 1 auf Interphase-Zellkernen uninduzierter und induzierter Zellen. Blau: DAPI, Grün: DEPDC1, Gelb: IFI44, Rot: RAP1A, Orange: CT#1. Es handelt sich um Z-Projektionen der Einzelbilder, die Zellkerne der induzierten Zellen sind etwas kleiner als die der uninduzierten Zellen.

1.5.4. Radiale Verteilung der BAC-Signale im Interphase-Zellkern

Nach erfolgter 3D-FISH wurden am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop Bildstapel einzelner Zellkerne ($n = 26$) in verschiedenen Z-Ebenen und den verschiedenen Farbkanälen aufgenommen. Die Einzelbilder eines Farbkanals werden mit Image J zu Bildstapeln zusammengefügt, Schwellwerte bestimmt und in das Auswertungsprogramm EDMT eingelesen. Das Programm wertet den Abstand aller Signalvoxel zum Referenzkanal hin aus. Die Ergebnisse können in Excel folgendermaßen dargestellt werden (s. Abb. III.1.22. und III.1.23.)

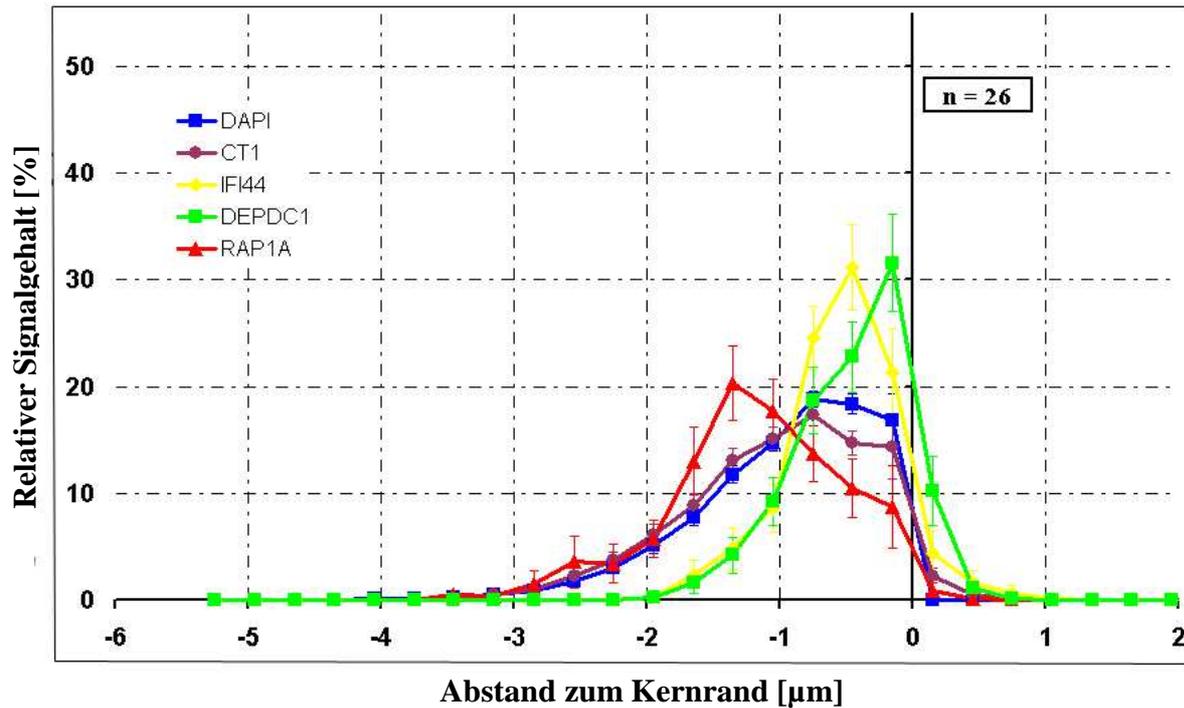


Abb. III.1.22.: Radiale Signalverteilung in Interphase-Zellkernen uninduzierter Zellen. DEPDC1 und RAP1A sind deutlich weiter am Zellkernrand gelegen als RAP1A.

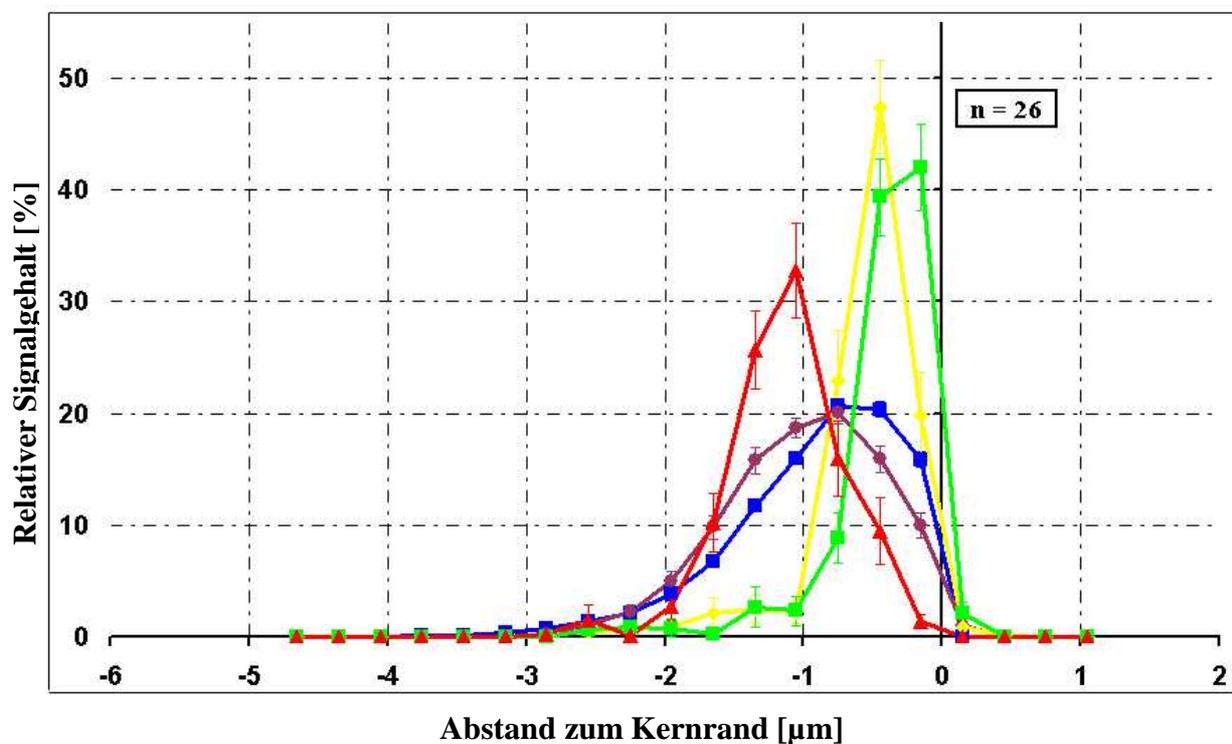


Abb. III.1.23.: Radiale Signalverteilung in Interphase-Zellkernen induzierter Zellen. DEPDC1 und RAP1A sind deutlich weiter am Zellkernrand gelegen als RAP1A, jedoch ist die Signalverteilung deutlich schmäler und damit die einzelnen Spitzen deutlich höher, was mit der geringeren Größe der Zellkerne zusammenhängen könnte.

Bereits beim Betrachten der 3D-FISH-Bilder fällt auf, dass der BAC für RAP1A in allen Zellkernen, unabhängig vom Induktionsstatus, deutlich weiter zur Zellkernmitte hin orientiert liegt, als die anderen beiden BAC-Signale. Daher wurden per Hand die Signale aller drei BAC-Sonden in uninduzierten und induzierten Zellkernen in Bezug auf ihre Nähe zum Zellkernrand hin ausgezählt. Dabei ergab sich folgendes (s. Abb. III.1.24. und III.1.25.)

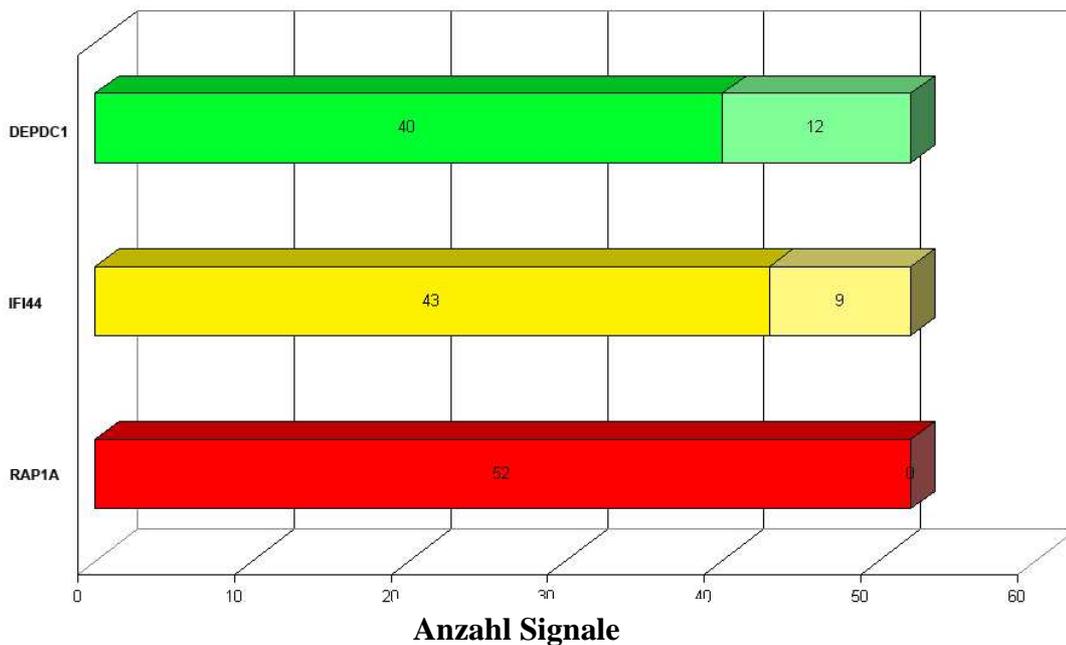


Abb. III.1.24.: Per Hand ausgezählte Signalverteilung der BAC-Sonden im Bezug zum Zellkernrand in uninduzierten Zellen. RAP1A ist nie an der Kernperipherie zu finden.

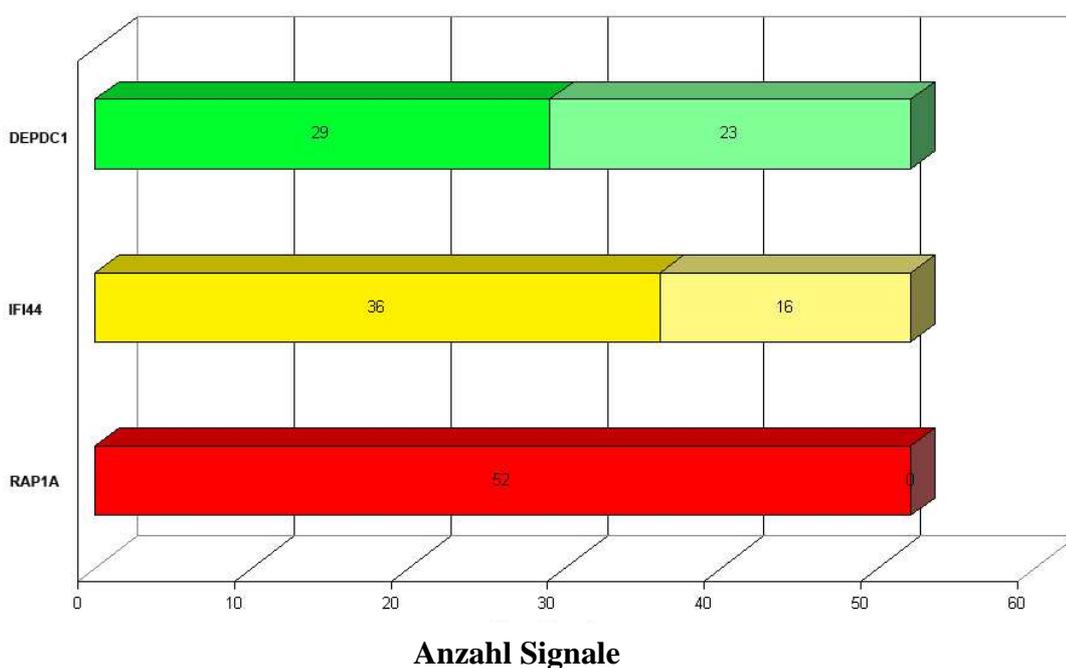


Abb. III.1.25.: Per Hand ausgezählte Signalverteilung der BAC-Sonden im Bezug zum Zellkernrand in induzierten Zellen. RAP1A ist nie an der Kernperipherie zu finden.

Weiterhin wurde mittels Matlab statistisch überprüft, ob die Signalverteilungen innerhalb einer Zellkernpopulation, d.h. uninduzierten und induzierten Zellen, und zwischen den beiden betrachteten Populationen unterschiedlich oder gleich sind. Dafür wurden der Kolmogorow-Smirnov-Test und der Wilcoxon Rank-SumTest angewendet (s. Tabellen III.1.8.- III.1.12.).

	DAPI	CT #1	DEPDC1	IFI44	RAP1A
DAPI					
CT #1	Nicht sig. p=0,2903				
DEPDC1	Significant p=3,1x10 ⁻¹⁹	Significant p=3,9x10 ⁻¹²			
IFI44	Significant p=2,8x10 ⁻³⁹	Significant p=8,5x10 ⁻⁴⁸	Significant p=1,3x10 ⁻¹⁰⁶		
RAP1A	Significant p=8,6x10 ⁻⁵⁴	Significant p=4,8x10 ⁻⁶³	Significant p=5,7x10 ⁻¹²²	Significant p=7,2x10 ⁻⁴	

Tabelle III.1.8.: Kolmogorow-Smirnow-Test der Ähnlichkeit der Signalverteilungen in uninduzierten Zellen

	DAPI	CT #1	DEPDC1	IFI44	RAP1A
DAPI					
CT #1	Nicht sig. p=0,2885				
DEPDC1	Significant p=0,0047	Significant p=0,0067			
IFI44	Significant p=7,3x10 ⁻⁶	Significant p=1,8x10 ⁻⁵	Significant p=1,1x10 ⁻⁶		
RAP1A	Significant p=5,0x10 ⁻⁷	Significant p=1,0x10 ⁻⁶	Significant p=2,9x10 ⁻⁷	Significant. p=0,035	

Tabelle III.1.9.: Wilcoxon-Rank-Sum Test (Median-Test) der Ähnlichkeit der

Signalverteilungen in uninduzierten Zelle

	DAPI	CT #1	DEPDC1	IFI44	RAP1A
DAPI					
CT #1	Significant $p=1,2 \times 10^{-4}$				
DEPDC1	Significant $p=8,6 \times 10^{-38}$	Significant $p=5,8 \times 10^{-17}$			
IFI44	Significant $p=1,2 \times 10^{-48}$	Significant $p=3,1 \times 10^{-81}$	Significant $p=9,2 \times 10^{-171}$		
RAP1A	Significant $p=2,6 \times 10^{-92}$	Significant $p=6,5 \times 10^{-133}$	Significant $p=5,7 \times 10^{-8}$	Significant $p=5,3 \times 10^{-23}$	

Tabelle III.1.10.: Kolmogorow-Smirnow-Test der Ähnlichkeit der Signalverteilungen in induzierten Zellen

	DAPI	CT #1	DEPDC1	IFI44	RAP1A
DAPI					
CT #1	Significant $p=0,0173$				
DEPDC1	Significant $p=1,8 \times 10^{-5}$	Significant $p=3,3 \times 10^{-2}$			
IFI44	Significant $p=2,9 \times 10^{-6}$	Significant $p=3,6 \times 10^{-7}$	Significant $p=1,0 \times 10^{-7}$		
RAP1A	Significant $p=1,1 \times 10^{-6}$	Significant $p=3,1 \times 10^{-7}$	Significant $p=4,2 \times 10^{-3}$	Significant $p=5,7 \times 10^{-8}$	

Tabelle III.1.11.: Wilcoxon-Rank-Sum Test (Median-Test) der Ähnlichkeit der Signalverteilungen in uninduzierten Zellen.

Tabelle III.1.12.: Vergleich zwischen uninduzierten und induzierten Zellen

Vergleichenes Signal	Kolmogorow-Smirnow-Test		Wilcoxon Rank Sum Test	
	Verteilung	P-Wert	Verteilung	P-Wert
DAPI	Gleichverteilt	p=0,068	Gleichverteilt	p=0,20
Chromosom 1	Gleichverteilt	p=0,6738	Gleichverteilt	p=0,7627
BAC-Sonde für IFI44	Gleichverteilt	p=0,6738	Gleichverteilt	p=0,7978
BAC- Sonde für RAP1A	Gleichverteilt	p=0,258	Gleichverteilt	p=0,528
BAC-Sonde für DEPDC1	Gleichverteilt	p=0,138	Gleichverteilt	p=0,6341

1.5.5. Radiale Verteilung der BAC-Signale in den Chromosomenterritorien

Um die Verteilung der BAC-Signale innerhalb der Chromosomenterritorien zu untersuchen wurden mittels Image J einzelne Territorien mit einer Bildgröße von 256x256 Pixel ausgeschnitten und mit EDMT die Abstände der BAC-Signale zur Territoriumsgrenze bestimmt (s. Abb. III.1.26. und III.1.27.)

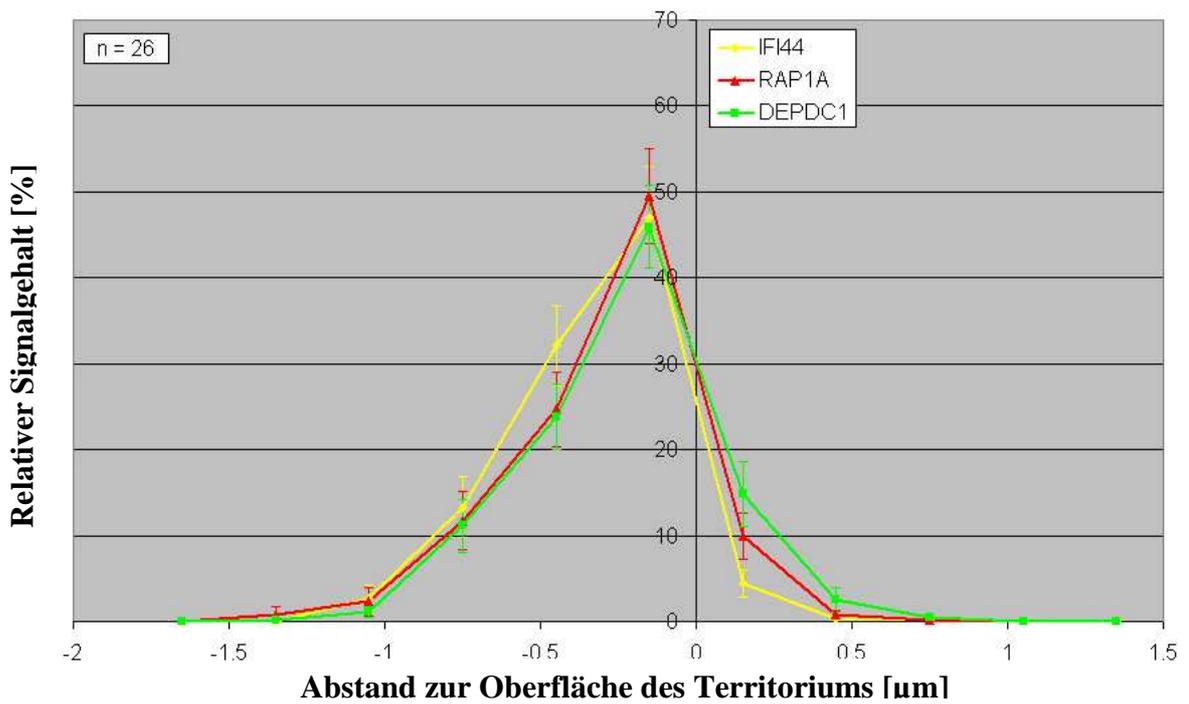


Abb. III.1.26.: Verteilung der BAC-Signale innerhalb der Territorien in Zellkernen uninduzierter Zellen

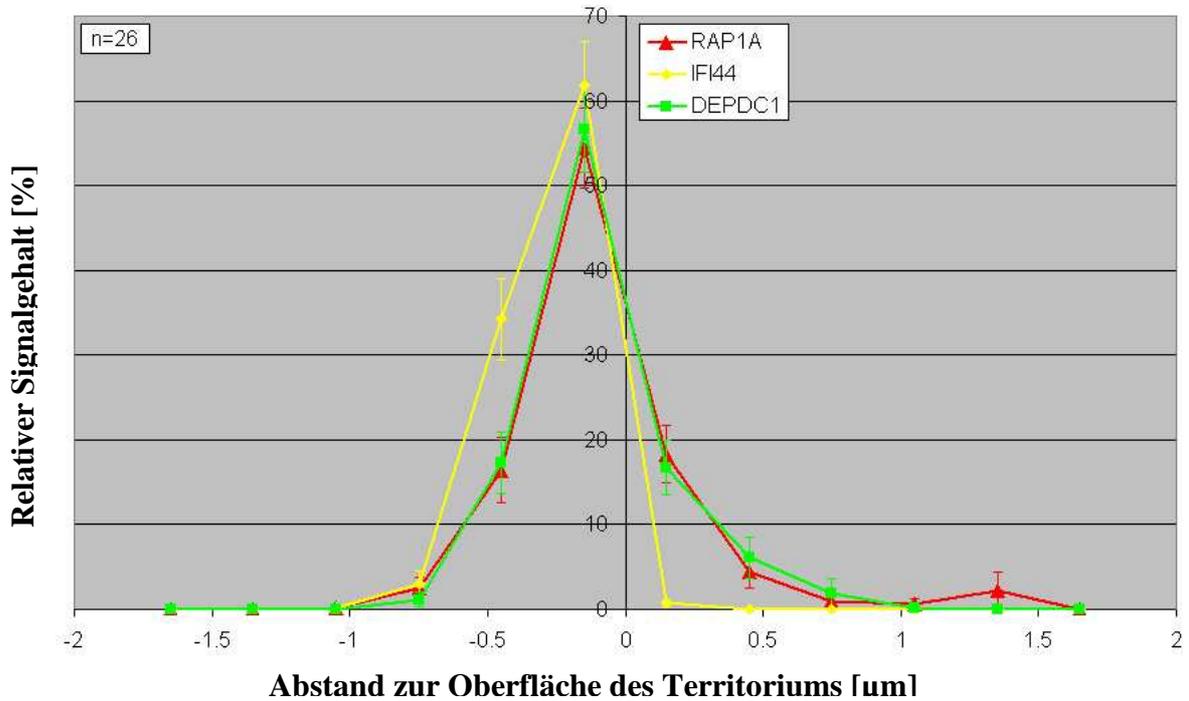


Abb. III.1.27.: Verteilung der BAC-Signale innerhalb der Territorien in Zellkernen induzierter Zellen

Auch für die BACs in Bezug auf das Chromosomenterritorium wurden mittels Matlab statistische Unterschiede in den Signalverteilungen analysiert. Sowohl in den uninduzierten als auch in den Induzierten Zellen ist kein Unterschied in den Signalverteilungen der BAC-Sonden innerhalb einer Zellpopulation ausfindig zu machen (s. Tabelle III.1.13. und III.1.14.)

	DEPDC1	IFI44	RAP1A
DEPDC1			
IFI44	Kein Unterschied p=0,161		
RAP1A	Kein Unterschied p=0,638	Kein Unterschied p=0,225	

Tabelle III.1.13.: Unterschiede in BAC-Signalverteilungen in uninduzierten Zellen

	DEPDC1	IFI44	RAP1A
DEPDC1			
IFI44	Kein Unterschied p=0,204		
RAP1A	Kein Unterschied p=0,225	Kein Unterschied p=0,959	

Tabelle III.1.14.: Unterschiede in BAC-Signalverteilungen in induzierten Zellen

Die Signalverteilungen der einzelnen BAC-Sonden zwischen den betrachteten Zellpopulationen sind allerdings voneinander verschieden (s. Tabelle III.1.15.)

BAC-Sonde	Verteilung in uninduzierten vs. Induzierten Zellen	P-Wert
DEPDC1	Unterschiedlich	0,001
IFI44	Unterschiedlich	0,002
RAP1A	Unterschiedlich	0,007

Tabelle III.1.15: Unterschiede in BAC-Signalverteilungen zwischen den untersuchten Zellpopulationen

1.6. Low Density Arrays

Ausgehend von den Daten der Affymetrix-Arrays wurden acht Gene mit „Fold Changes“ ≥ 3 , von denen letztendlich nur 3 Gene, die auf Chromosom 1 lokalisieren, für die FISH-Experimente gewählt wurden. Für diese drei Gene sollen nun die Ergebnisse der Real-Time PCR dargestellt werden.

1.6.1. Auswahl der Gene

Mit Hilfe der Ensembl- Datenbank wurden um die zu untersuchenden Gene Fenster von 600 kb Radius angelegt (also wurden insgesamt die Gene in einem Bereich von 1,2 Mb untersucht).

Weiterhin wurden 10 Haushaltsgene als Kontrolle für die angewandte Methode ausgewählt. Dafür wurden mehrere Publikationen herangezogen (Lossos et al. 2003; Szabo et al. 2004; de Kok et al. 2005) und darauf geachtet, dass die Kontrollgene bereits in den Affymetrix-Arrays konstante Expressionswerte zeigten.

Kontrollgen	Chromosomale position	Fold Change lt. Affymetrix
RPLP0	12q24.23	1,06
Actb	7p22.1	-1,02
B2M	15q21.1	1,16
TBP	6q27	-1,21
18S		---
GAPDH	12p13.31	1; 1,05; 1,04
POLR2A	17p13.1	-1,03
UBC	12q24.31	-1,37-1,17
YWHAZ	8q22.3	1,04; 1,09
HMBS	11q23.3	-1,06

Tabelle III.1.16.: Ausgewählte Kontrollgene und deren „Fold Changes“ lt. Affymetrix-Arrays

1.6.2. Ergebnisse der Arrays

Nach erfolgtem PCR-Lauf wird von der SDS-Software bereits die Δ -CT-Werte für jedes einzelne Gen berechnet, d.h. die Differenz zwischen dem CT-Wert eines Gens und dem CT-Wert der jeweiligen 18S-rRNA, die als Bezugsgröße gilt. Je geringer also der Δ -CT-Wert eines Gens ausfällt, umso höher kann die Expression des Gens eingeschätzt werden.

Weiterhin kann man vom Programm bereits den $\Delta \Delta$ -CT-Wert für ein Gen in zwei unterschiedlichen Populationen berechnen lassen, der dann letztendlich angibt, ob das Gen herauf oder herunterreguliert wird (Livak et al. 2001).

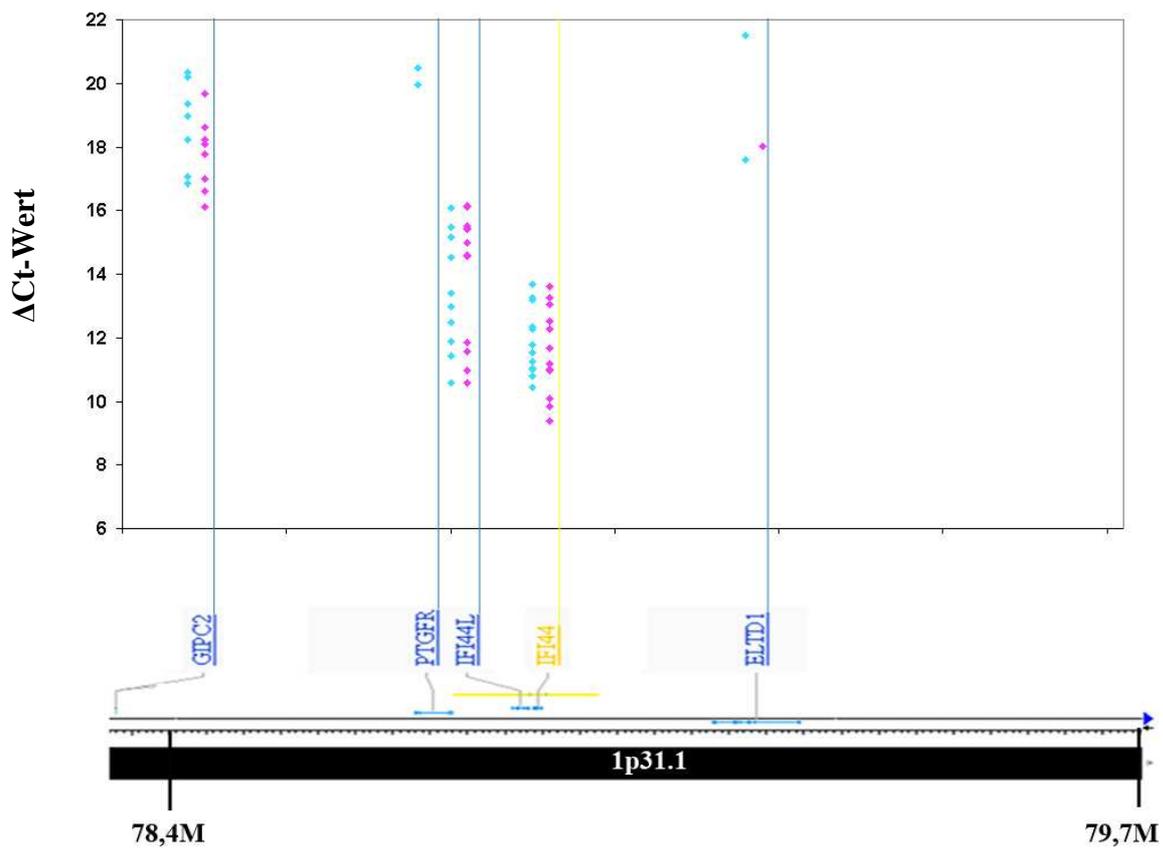
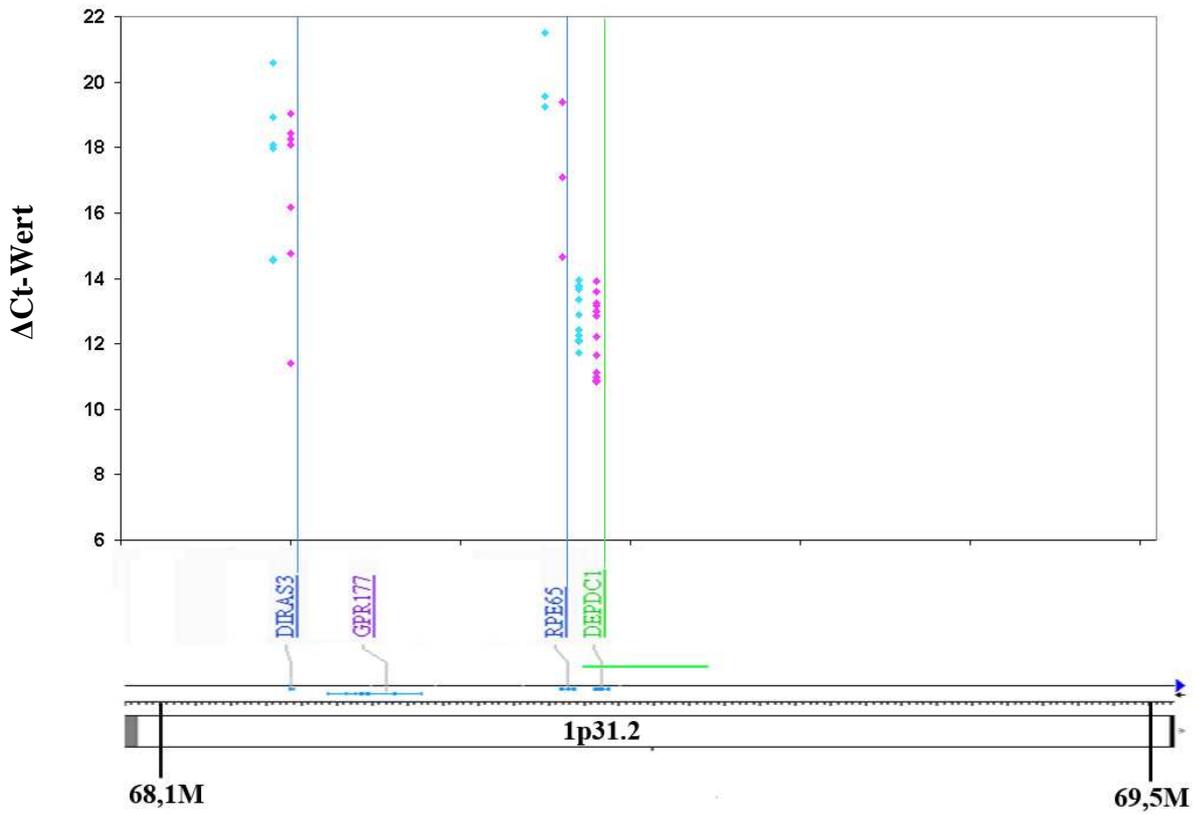
Tabelle III.1.17.: Auszug aus den Daten der Low Density Arrays. Die ausführliche Tabelle ist im Anhang auf CD zu finden. Es ist hier nur eine RNA und jeweils nur eine 50 ng und 100 ng Probe dargestellt. Zunächst wird der CT-Wert angegeben, dann der Δ CT Wert gegen 18S berechnet. Der $\Delta\Delta$ CT-Wert bezieht sich auf die Expressionswerte einer Referenz-RNA. RQ bedeutet relative Quantifizierung. Ist dieser Wert >1 bedeutet dies eine Hochregulierung, ist der Wert <1 wird das Gen herabreguliert. Farblich markiert sind die untersuchten Gene in den jeweiligen Farben und die Kontroll-Gene in blau.

Gene	Av CT RNA1		Av Δ CT RNA1		$\Delta\Delta$ CT RNA1		RQ RNA1		Av RQ
	1-50 ng	2-100 ng	1- 50 ng	2-100 ng	1- 50 ng	2-100 ng	1- 50 ng	2-100 ng	
DIRAS3	Undet.	29.35	21.04	11.40	0.44	-3.16	0.74	8.96	3.06
RPE65	Undet.	Undet.	21.04	22.05		2.48		0.18	57.40
DEPDC1	29.79	28.93	10.83	10.98	-1.42	-1.13	2.67	2.19	2.00
18S	18.96	17.95							
GAPDH	22.99	21.98	4.03	4.02	-2.49	-0.48	5.61	1.40	2.50
RPLP0	21.94	20.85	2.98	2.90	-2.25	-0.23	4.75	1.17	2.04
YWHAZ	26.72	26.86	7.76	8.90	-2.80	-0.64	6.98	1.56	2.88
POLR2A	26.69	25.95	7.73	8.00	-2.85	-1.33	7.20	2.52	3.15
TBP	30.19	29.60	11.23	11.65	0.63	-1.12	0.65	2.18	1.29
HMBS	27.76	26.80	8.80	8.85	-1.41	-0.52	2.66	1.44	1.56
B2M	23.19	22.37	4.23	4.42	-1.36	-1.17	2.56	2.25	2.14
ACTB	21.56	21.12	2.60	3.17	-0.67	-0.44	1.59	1.35	1.16

GIPC2	35.57	34.96	16.61	17.01	-2.36	-3.36	5.14	10.24	15.32
PTGFR	Undet.	Undet.	21.04	22.05					
IFI44L	29.53	29.53	10.57	11.57	-0.02	-0.32	1.02	1.25	1.17
IFI44	28.35	28.04	9.40	10.09	-1.39	-0.91	2.62	1.88	1.76
ELTD1	Undet.	Undet.	21.04	22.05	3.44		0.09		
C1orf103	30.07	29.27	11.11	11.32	0.51	-1.87	0.70	3.66	2.49
TMEM77	Undet.	27.59	21.04	9.64	10.79	-0.95	0.00	1.93	1.48
CEPT1	Undet.	28.34	21.04	10.39	11.90	-0.87	0.00	1.83	0.93
DENND2 D	28.55	34.52	9.59	16.57	-5.89	-0.49	59.41	1.41	15.65
CHI3L2	32.82	33.45	13.86	15.50	-2.34	-0.83	5.06	1.77	2.25
CHIA	27.00	Undet.	8.04	22.05	-10.44	4.37	1391.2	0.05	348.4
C1orf88	34.54	36.11	15.58	18.16	-8.07	-2.16	267.90	4.46	86.01
OVGP1	30.41	31.57	11.45	13.61	9.89	-0.83	0.00	1.78	1.18
WDR77	Undet.	27.77	21.04	9.82	13.46	-0.10	0.00	1.07	0.76
ATP5F1	27.83	26.89	8.87	8.94	-11.09	-1.23	2173.8	2.35	544.9
C1orf162	Undet.	32.11	21.04	14.16	5.44	-1.44	0.02	2.72	2.00
ADORA 3	Undet.	36.92	21.04	18.97		-0.15		1.11	
RAP1A	Undet.	29.94	21.04	11.99	14.28	-0.99	0.00	1.98	1.18
C1orf183	33.59	31.95	14.63	14.00	-9.01	-1.36	515.28	2.57	130.3
DDX20	28.89	28.28	9.93	10.33	-1.64	-0.54	3.11	1.46	1.76
KCND3	36.00	Undet.	17.04	22.05	2.55		0.17		

Für die drei untersuchten Gene und deren Umgebungen lassen sich die Δ Ct-Werte folgendermaßen darstellen:

a)



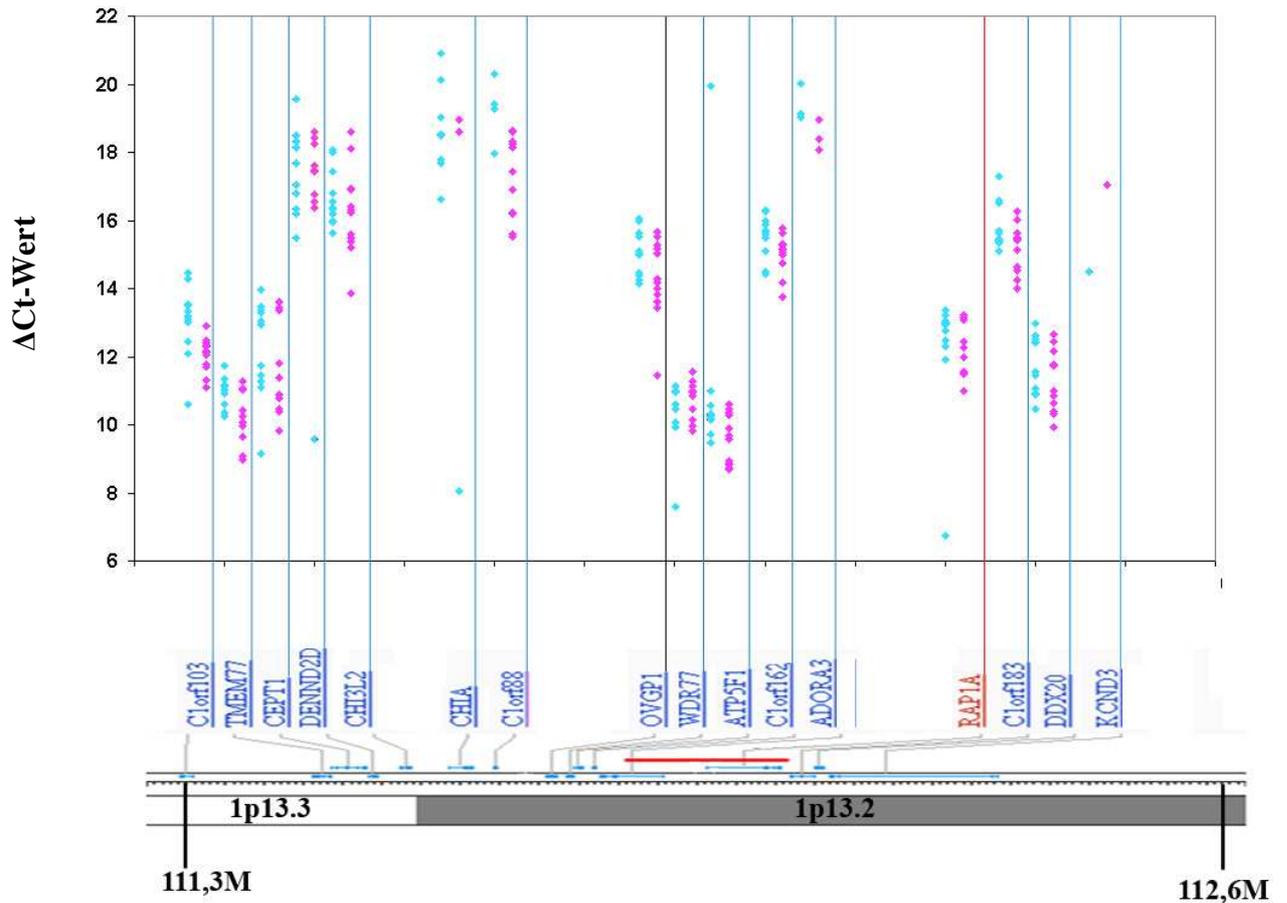


Abb. III.1.28.: Darstellung der ΔCt -Werte für die drei untersuchten Genregionen. a) DEPDC1, b) IFI44, c) RAPIA

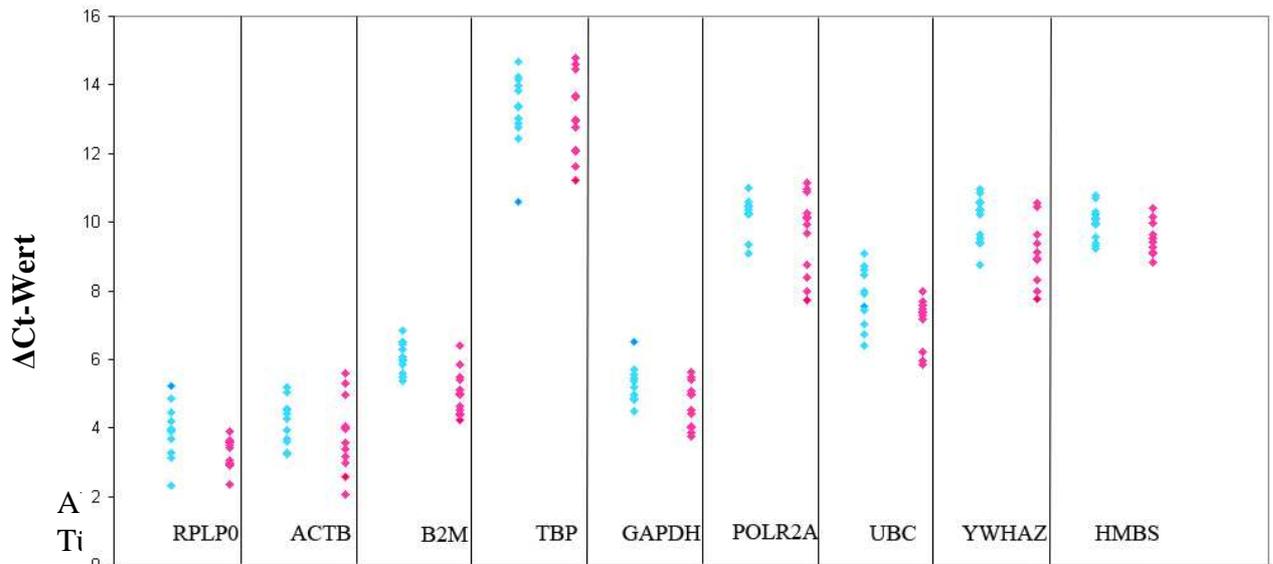


Abb. III.1.29.: Darstellung der ΔCt -Werte der untersuchten Haushaltsgene. Türkis: Werte aus uninduzierten Zellen, Rosa: Werte aus induzierten Zellen

1.6.3. Vergleich von Low Density Arrays vs. Affymetrix- Arrays

Vergleicht man die Ergebnis der Affymetrix- Arrays mit denen der Low-Density Arrays stellt man gravierende Unterschiede fest. So unterscheiden sich einige Gene nicht nur in der festgestellten Expression, sondern auch in der Regulation. Nur für wenige Gene zeigen beide Methoden denselben Trend an.

Wäre man also bei der Auswahl der Gene und BAC-Sonden für die FISH-Experimente von den Resultaten der Low-Density-Arrays ausgegangen, wären andere Gene gewählt worden.

1.6.4. Berechnung der TES

Um eine Aussage über die Genpositionierung innerhalb des Zellkerns machen zu können, die die Expression, die Genlänge und Gendichte einer bestimmten Region zusammenfasst, wurde die „Total Expression Strength“ (TES) berechnet.

Dafür wurde zunächst laut Ensembl-Datenbank die Länge des ungespligten Gens bestimmt, dann die Expressionsstärke folgendermaßen bestimmt:

$$S = \frac{Mi1 + Mi2 + \dots + Min}{n}, \text{ wobei } M = n \cdot 1/2^{\Delta CT}$$

$$TES = (L \cdot S)_{Gen1} + (L \cdot S)_{Gen2} + \dots + (L \cdot S)_{Genn}$$

Genname	Nicht induziert				Induziert			
	Av. ΔCT	S	L [bp]	L*S TES	Av. ΔCT	S	L [bp]	L*S TES
<i>Kontrollen</i>								
GAPDH	5.24	28.25x10 ⁻⁰³	5079	143.50	4.68	42.95 x10 ⁻⁰³	5079	218.15
RPLP0	3.91	76.42 x10 ⁻⁰³	5704	435.90	3.31	105.85 x10 ⁻⁰³	5704	603.80
YWHAZ	10.05	1.05 x10 ⁻⁰³	35965	37.83	9.20	2.04 x10 ⁻⁰³	35965	73.56
POLR2A	10.16	0.96 x10 ⁻⁰³	31431	30.32	9.67	1.68 x10 ⁻⁰³	31431	30.32
TBP	13.27	0.14 x10 ⁻⁰³	19685	2.77	13.07	0.15 x10 ⁻⁰³	19685	3.05
HMBS	9.96	1.06 x10 ⁻⁰³	9872	10.49	9.52	1.44 x10 ⁻⁰³	9872	14.27
B2M	5.99	16.41 x10 ⁻⁰³	23834	391.27	5.03	33.34 x10 ⁻⁰³	23834	794.77
ACTB	4.24	58.77 x10 ⁻⁰³	4645	273.02	3.80	90.86 x10 ⁻⁰³	4645	422.08
UBC	7.81	04.81 x10 ⁻⁰³	10144	48.81	6.99	8.99 x10 ⁻⁰³	10144	91.26

<i>DEPDC1-locus</i>								
DIRAS3	17.45	7.72×10^{-05}	6869	0.05	16.59	3.58×10^{-05}	6869	0.25
RPE65	20.10	2.69×10^{-07}	22327	0.0060	17.05	3.92×10^{-06}	22327	0.08
DEPDC1	12.97	0.14×10^{-03}	23026	3.31	12.28	0.26×10^{-03}	23026	6.08
TES				3,36				6,41
<i>IFI44-locus</i>								
GIPC2	18.71	2.00×10^{-06}	92720	0.18	17.76	3.90×10^{-06}	92720	0.36
IFI44L	13.20	0.18×10^{-03}	23596	4.33	13.97	0.16×10^{-03}	23596	3.87
IFI44	11.88	0.33×10^{-03}	15441	5.10	11.56	0.49×10^{-03}	15441	7.58
ELTD1	19.55	4.46×10^{-07}	120408	0.05	18.01	3.15×10^{-07}	120408	0.03
TES				9,68				11,85
<i>RAP1A-locus</i>								
C1orf103	13.05	0.15×10^{-03}	17954	2.80	12.05	0.24×10^{-03}	17954	4.46
TMEM77	10.93	0.48×10^{-03}	23960	11.72	10.13	0.92×10^{-03}	23960	22.23
CEPT1	12.18	0.35×10^{-03}	46675	16.42	11.57	0.41×10^{-03}	46675	19.25
DENND2D	17.40	6.57×10^{-06}	18428	0.12	16.70	0.11×10^{-03}	18428	2.09
CHI3L2	16.64	1.10×10^{-05}	16979	0.18	16.25	1.81×10^{-05}	16979	0.30
CHIA	18.64	2.30×10^{-06}	30900	0.07	15.19	0.31×10^{-03}	30900	9.78
C1orf88	19.24	6.41×10^{-07}	7585	0.0048	17.26	8.02×10^{-06}	7585	0.06
OVGP1	15.04	3.23×10^{-05}	14661	0.47	14.28	7.36×10^{-05}	14661	1.07
WDR77	10.34	0.98×10^{-03}	10517	10.40	10.63	0.62×10^{-03}	10517	6.58
ATP5F1	11.09	0.76×10^{-03}	13978	10.68	9.57	1.47×10^{-03}	13978	20.59
C1orf162	15.53	2.29×10^{-05}	5840	0.13	15.00	3.04×10^{-05}	5840	0.17
ADORA3	19.39	3.78×10^{-07}	81825	0.03	18.47	7.10×10^{-07}	81825	0.05
RAP1A	12.25	0.89×10^{-03}	172461	153.72	12.15	0.22×10^{-03}	172461	39.10
C1orf183	15.81	1.72×10^{-05}	10883	0.18	15.19	2.64×10^{-05}	10883	0.28
DDX20	11.75	0.31×10^{-03}	13145	4.09	11.37	0.45×10^{-03}	13145	6.02
KCND3	14.48	3.62×10^{-06}	219693	0.79	17.04	6.17×10^{-07}	219693	0.13
TES				211,86				132,25

Tabelle III.1.18.: Berechnung der TES für die untersuchten Gene bzw. Genregionen

2. Histonmodifikationen

Die Ergebnisse aus den Immunfluoreszenz-Experimenten lassen sich in drei Teilen, die den untersuchten Histonmodifikationen entsprechen, darstellen. Begonnen wird mit der Auswertung der Signalverteilung von me3-H3K4, dann werden die Ergebnisse der me3-H3K9 Immunfluoreszenz und die dazugehörige Clusteranalyse dargestellt und zum Schluss wird auf die Signalverteilung von me3-H3K27 eingegangen. Nach der Darstellung der Signale und der Signalverteilungen wird noch eine statistische Analyse der Signalverteilungen angeführt.

2.1.me3-H3K4

2.1.1. Radiale Verteilung von me3-H3K4-Signalen in Nuklei normaler Zellen

Die Signale der Immunfluoreszenz gegen me3-H3K4, also gegen transkriptionell aktives Chromatin oder Euchromatin, finden sich in Zellkernen normaler Blutzellen über den ganzen Zellkern verteilt, lediglich der Zellkernrand weist eine geringere Signaldichte auf. Me3-H3K4 weist keine besondere Signaldichte an bestimmten Stellen auf, die Nukleoli sind meist jedoch frei von Signalen.

Die radiale Auswertung der Signale zeigt den selben Trend an: im Vergleich zu den meist randständigen Zentromeren, dargestellt durch den Crest-Antikörper, findet sich das me3-H3K4-Signal deutlich weiter innen im Zellkern (s. Abb. III.2.1.). Dabei weisen ruhende Lymphozyten und Granulozyten eine sehr ähnliche Signalverteilung auf, mit einem Maximum an Signaldichte bei ca. 1 μm . Lymphozyten in der S-Phase und Stammzellen aus Nabelschnurblut zeigen ebenfalls recht ähnliche Verteilungen der me3-H3K4-Signale, jedoch sind die Signalkurven nochmals deutlich flacher, d.h. das Signal ist über eine größere Fläche bzw. über ein größeres Volumen verteilt. Gerade bei den zyklierenden Lymphozyten ist aber auch die größte Zellkerngröße im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelltypen zu finden. Granulozyten und Monozyten weisen deutlich kleinere Zellkerne auf und die Kerne von Nabelschnurblutzellen und ruhenden Lymphozyten besitzen mittlere Größe. Die Monozyten weisen in Bezug auf das me3-H3K4 Signal eine Art Sonderstellung auf: Zwar hat das me3-H3K4-Signal einen relativ hohen Peak bei 1,5 μm vom Rand entfernt, jedoch weisen sie auch eine relativ breite Signalverteilung auf.

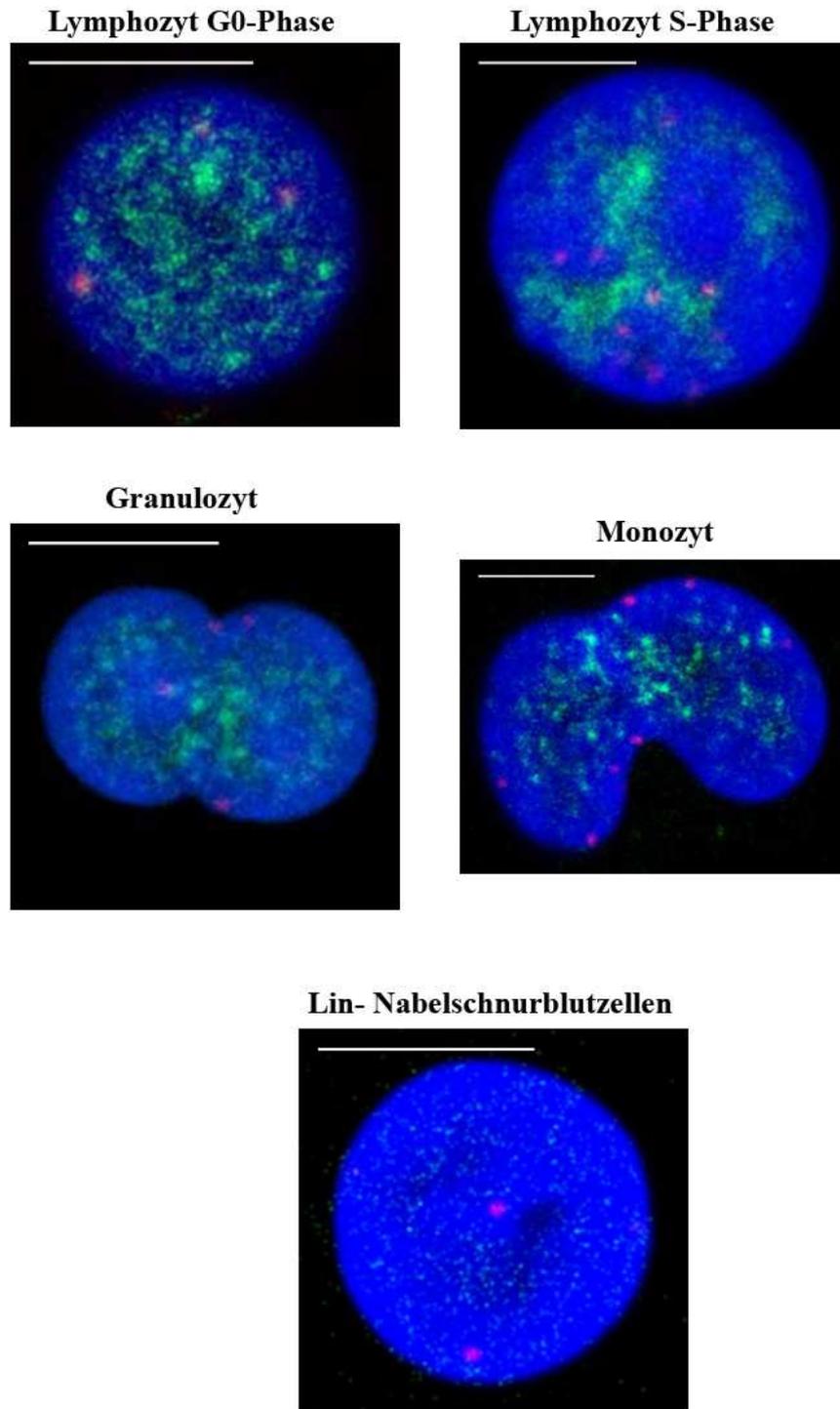
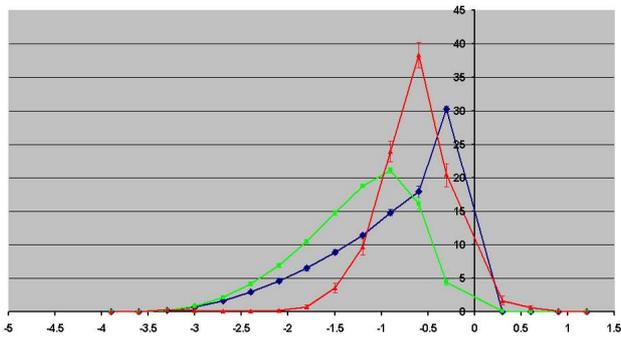
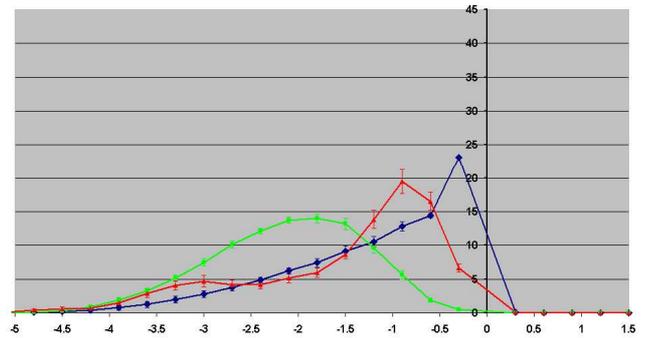


Abb.III.2.1.: Konfokalbilder von me3-H3K4 Immunfluoreszenzexperimenten mit normalen weiblichen humanen Zellkernen. Es handelt sich um Einzelbilder aus mittleren Schnittebenen. Das Vorliegen der S-Phase bei Lymphozyten wurde mittels BrdU-Färbung bestätigt (nicht gezeigt). Blau: DAPI, Grün: me3-H3K4, Rot: Crest-Signal. Skalierungsbalken: 5 μ m.

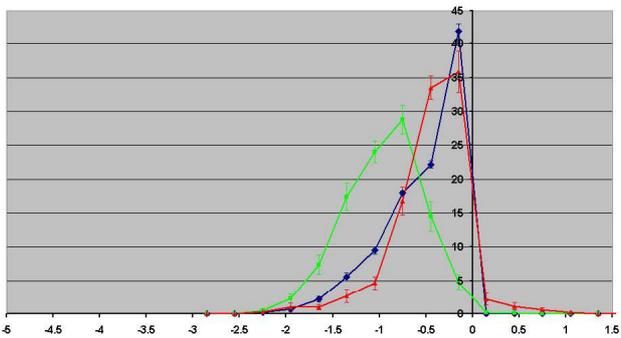
Lymphozyten G0-Phase



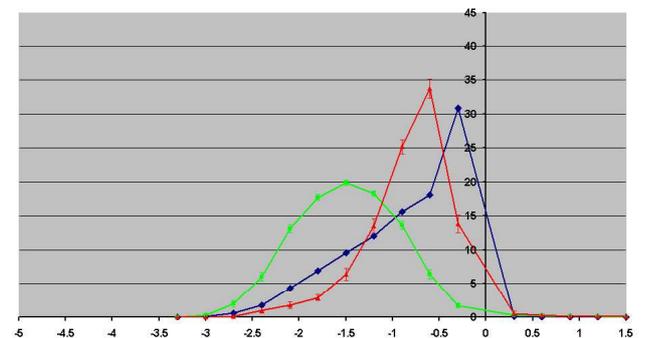
Lymphozyten S-Phase



Granulozyten



Monozyten



Rel. Signal Gehalt [%]

Lin- Nabelschnurblutzellen

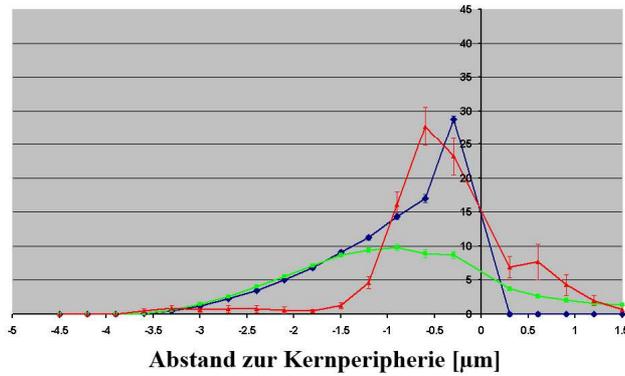


Abb. III.2.2.: EDMT-Auswertung der Signalverteilungen von me3-H3K4 in normalen Zellkernen.

Blau: DAPI, Grün: me3-H3K4, Rot: Crest-Signal.

N = 25.

2.1.2. Radiale Verteilung von me₃-H3K4-Signalen in undifferenzierten und differenzierten Krebszellnuclei

Wie schon in den Zellkernen der normalen Zellen, findet man auch in den Zellen der Krebszelllinien, meist sogar unabhängig vom Differenzierungsstatus, das me₃-H3K4-Signal über den gesamten Zellkern verteilt. Die Veränderung der Zellkernform hat also in den meisten Fällen keinen Einfluss auf die Positionierung des aktiven Chromatins. Eine Ausnahme bilden die TPA-differenzierten K562-Zellen, in denen das Signal näher an der Kernperipherie zu finden ist.

Die EDMT-Auswertung der Signalverteilung zeigt weiterhin, dass die Signalverteilung in undifferenzierten und differenzierten HL-60-Zellen sehr ähnlich ist, jedoch ein Unterschied zu den mit VD3-differenzierten HL-60-Zellen besteht, in denen die Signalkurve deutlich weiter zur Zellkernmitte hin ausgerichtet ist. Diese Signalkurve ähnelt mehr der Kurve der U937-Zellen, die in allen untersuchten Differenzierungszuständen relativ gleich bleiben. Der Unterschied, der in den K-562-Zellen nach der Differenzierung mit TPA bereits in den Konfokalbildern auffällt, ist auch in der Auswertung wieder zuerkennen. Auch hier nähert sich die Kurve des me₃-H3K4-Signals stark an die Kurve der Zentromer-Signale an, gelangt also näher an die Kernperipherie.

Das Signal, das me₃-H3K4 in RPMI8226-Zellen zeigt, ist am ehesten mit dem Signal aus zyklierenden Lymphozyten bzw. Stammzellen vergleichbar. Ebenso ähneln die Signale von undifferenzierten und RA-differenzierten HL-60-Zellen stark den Signalen der normalen Granulozyten und die Signalverteilungen in normalen Monozyten weisen Ähnlichkeiten mit den U937-Zellen aller Differenzierungsstufen und den VD3-differenzierten HL-60-Zellen auf. Die Signale, die me₃-H3K4 in undifferenzierten K-562-Zellen zeigt lassen einen Vergleich mit zyklierenden Lymphozyten bzw. Stammzellen zu TPA-differenzierte K562-Zellen scheinen sich eher wie normale Granulozyten zu verhalten, was Hinweise auf die Differenzierungsstufen geben könnte.

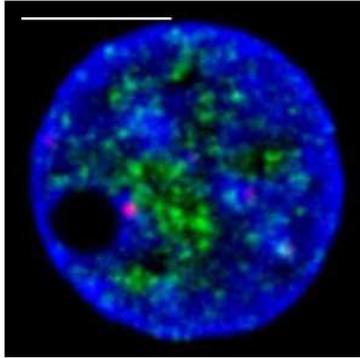
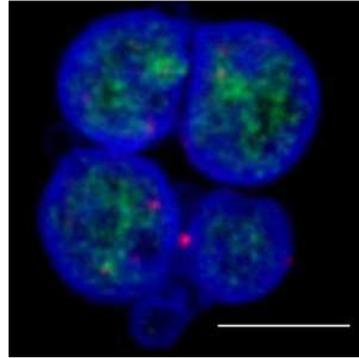
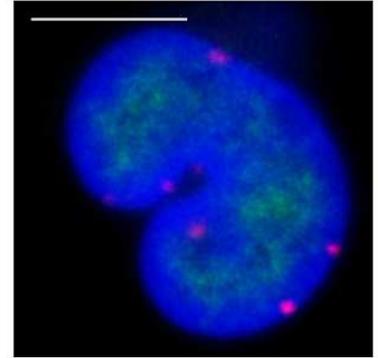
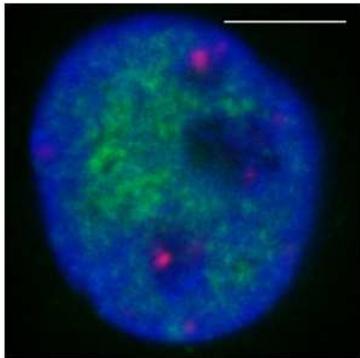
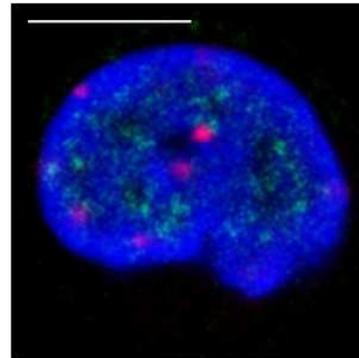
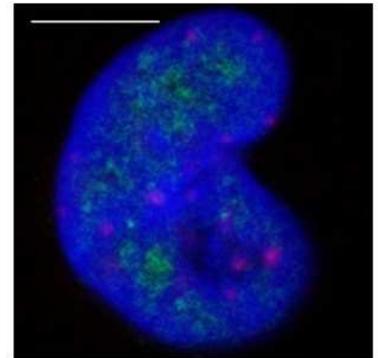
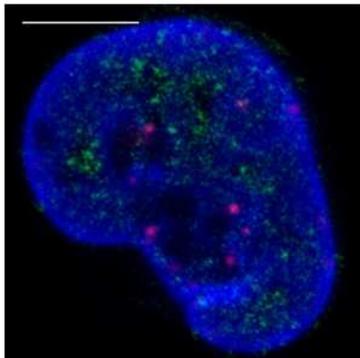
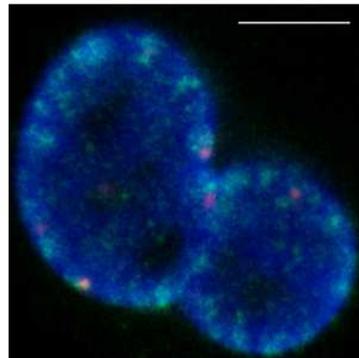
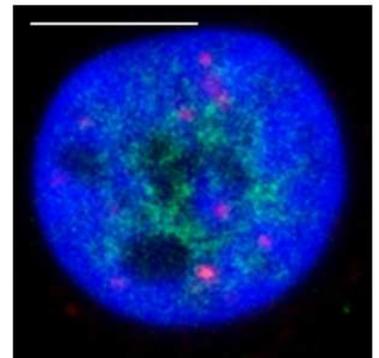
Undifferenzierte HL-60-Zellen**RA-differenzierte HL-60-Zellen****VD3-differenzierte HL-60-Zellen****Undifferenzierte U937-Zellen****TPA-differenzierte U937-Zellen****Retrodifferenzierte U937-Zellen****Undifferenzierte K562-Zellen****TPA-differenzierte K562-Zellen****RPMI 8226 Zellen**

Abb. III.2.3.: Konfokalbilder von me3-H3K4 Immunfluoreszenzexperimenten mit undifferenzierten und differenzierten Zellkernen von Krebszelllinien. Es handelt sich um Einzelbilder aus mittleren Schnittebenen. Blau: DAPI, Grün: me3-H3K4, Rot: Crest-Signal. Skalierungsbalken: 5 μm .

III. Ergebnisse

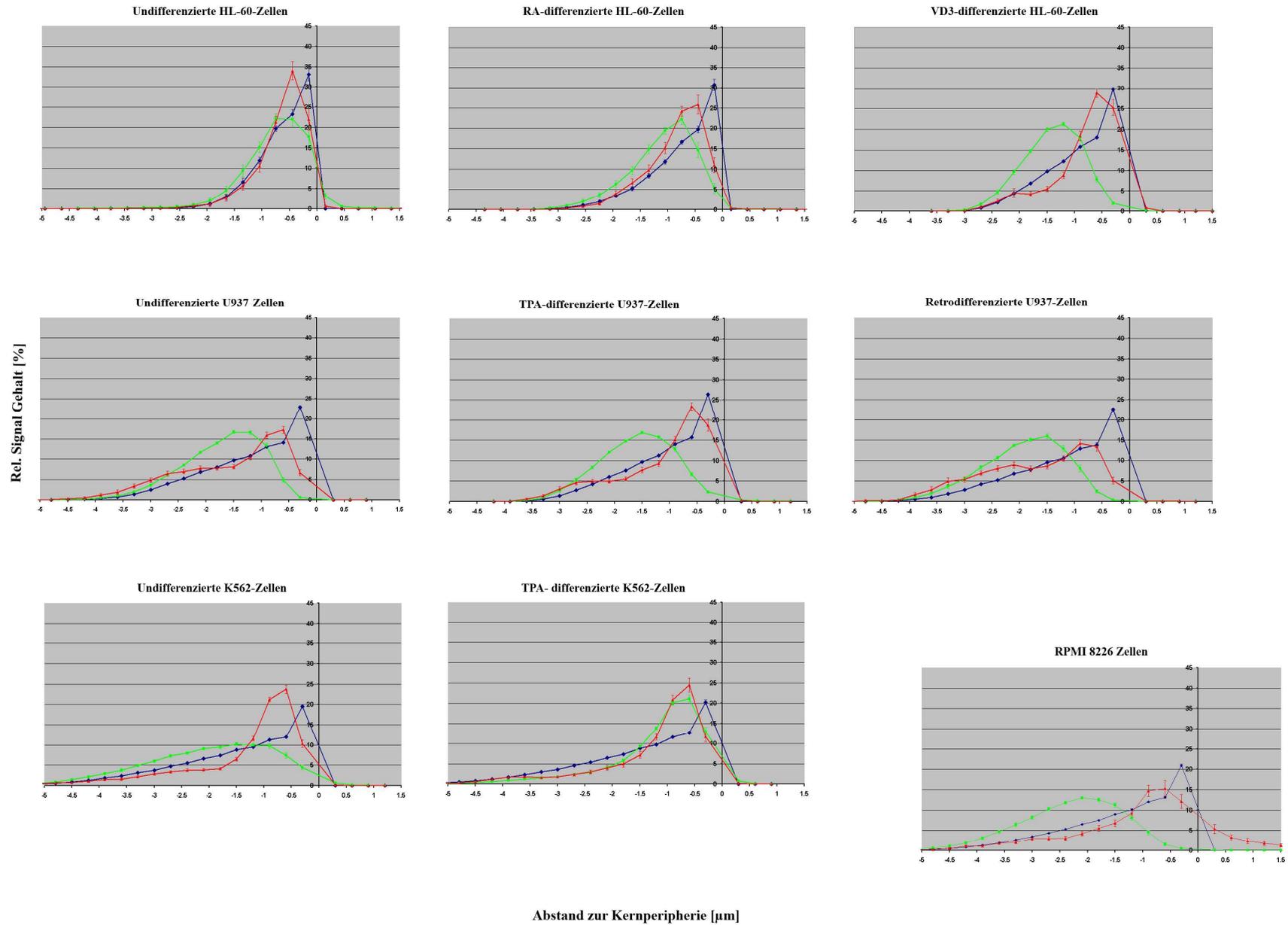


Abb. III.2.4.: EDMT-Auswertung der Signalverteilungen von me3-H3K4 in Zellkernen undifferenzierter und differenzierter Krebszellen.
 Blau: DAPI, Grün: me3-H3K4, Rot: Crest-Signal. N = 25.

2.2. me3-H3K9

2.2.1. Radiale Verteilung von me3-H3K9-Signalen in Nuklei normaler Zellen

Im Vergleich zum me3-H3K4-Signal, das über den ganzen Zellkern verstreut erscheint, ist das me3-H3K9-Signal an einigen wenigen Stellen im Zellkern geballt zu finden. Dabei befinden sich diese Stellen häufig an der Kernperipherie und meist unmittelbar benachbart zu einem Crest-Signal (s. Abb. III.2.5.).

Die Nähe der Signal-Cluster zu den Crest-Signalen zeigt sich auch deutlich in den EDMT-Auswertungen der radialen Signalverteilungen. Meist sind die Kurven für Crest und für me3-H3K9 sehr ähnlich, und auch die Zelltypen untereinander ähneln sich stark in der Signalverteilung. Die einzige Ausnahme bilden, wie bereits bei me3-H3K4, die stimulierten Lymphozyten, die auch hier einen deutlich flacheren Kurvenverlauf zeigen, allerdings auch insgesamt die größten Kerne besitzen. Die Signalverteilung in den Stammzellen ist in diesem Fall deutlich unterschiedlich von der in den zyklierenden Lymphozyten (s. Abb. III.2.6.).

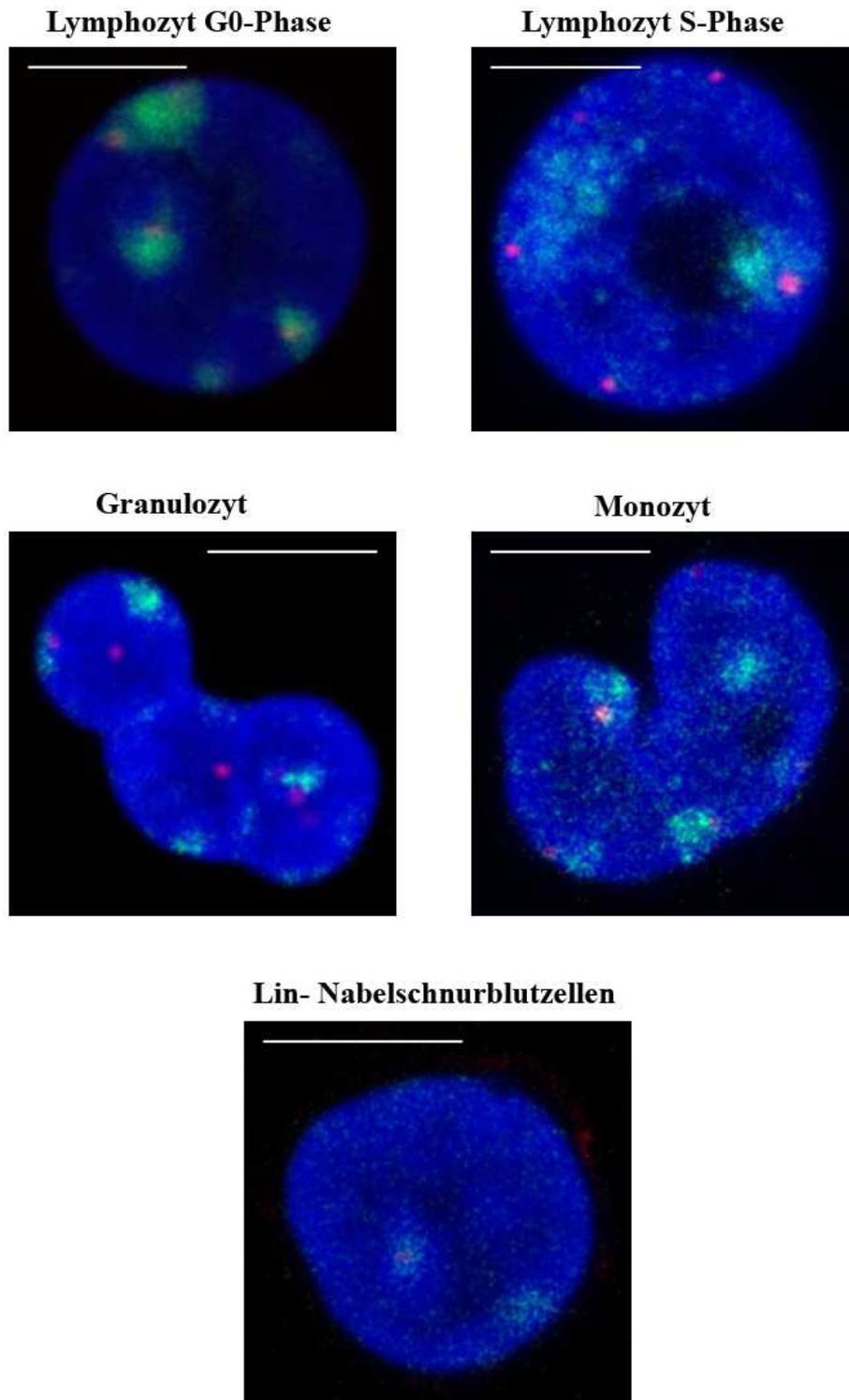


Abb. III.2.5.: Konfokalbilder von me3-H3K9 Immunfluoreszenzexperimenten mit normalen weiblichen Zellkernen. Es handelt sich um Einzelbilder aus mittleren Schnittebenen. Blau: DAPI, Grün: me3-H3K9, Rot: Crest-Signal. Skalierungsbalken: 5 μ m.

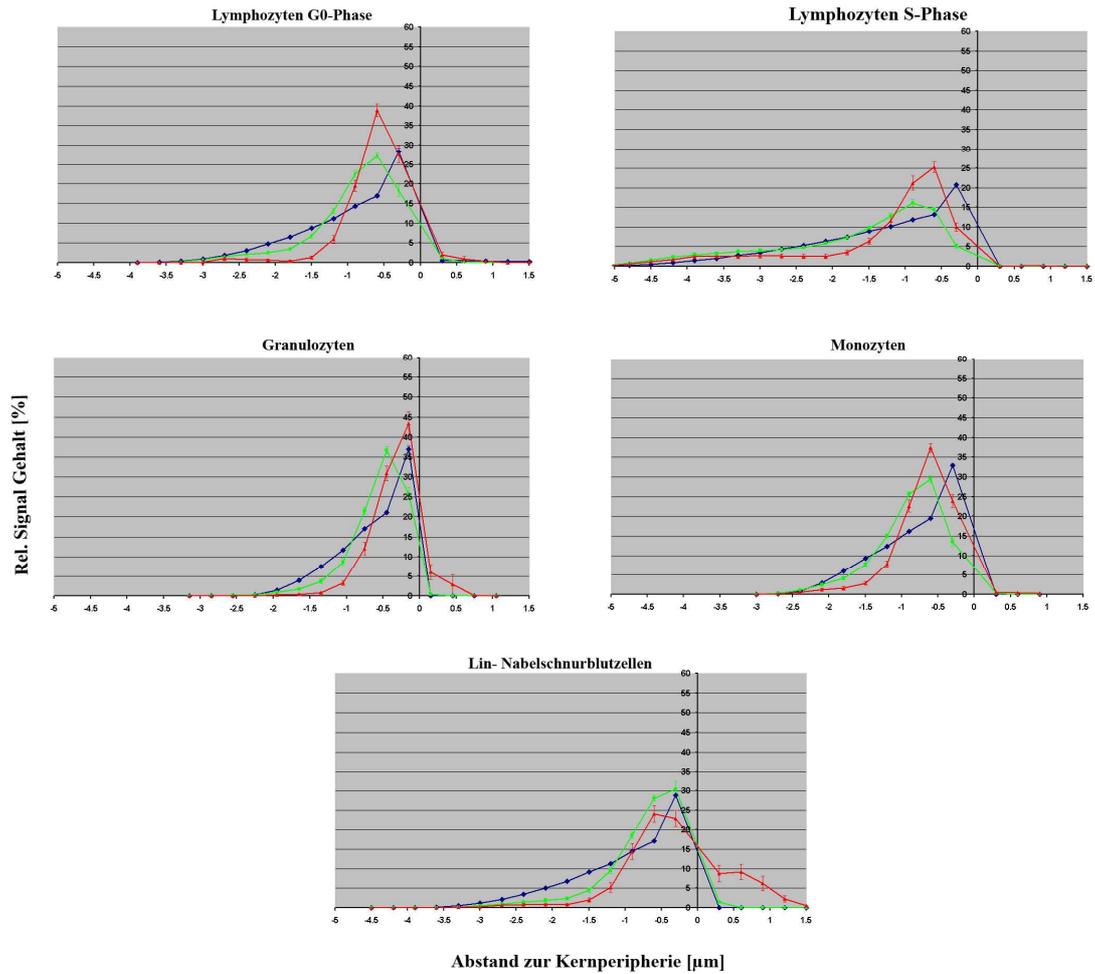


Abb. III.2.6.: EDMT-Auswertung der Signalverteilungen von me3-H3K9 in normalen Zellkernen.

Blau: DAPI, Grün: me3-H3K9, Rot: Crest-Signal. N = 25.

2.2.2. Radiale Verteilung von me3-H3K9-Signalen in undifferenzierten und differenzierten Krebszellnuklei

In den untersuchten Krebszelllinien ist zwar noch eine Ballung des me3-H3K9-Signals zu sehen, meist ist die Ballung jedoch nicht ganz so ausgeprägt wie in den normalen Zellkernen. Am deutlichsten ist dieser Unterschied in den RA-differenzierten HL-60-Zellen zu sehen. Hier ist annähernd keine Ballung mehr zu sehen, im Gegensatz zu den mit VD3 differenzierten HL-60 Zellen. Bei den U937-Zellen ist im Laufe der Differenzierung und Retrodifferenzierung keine nennenswerte Veränderung in der Signalstruktur auszumachen. In den K562-Zellen dagegen scheint im Laufe der Differenzierung das Signal mehr an die

Kernperipherie zu gelangen, was am stärksten in den RPMI8226-Zellen zu sehen ist, in denen sich die heterochromatischen Bereiche, markiert durch me3-H3K9, weit an die Peripherie zurückziehen (s. Abb. III.2.7.)

In der radialen Auswertung der Signalverteilungen mittels des EDMT-Programms wird auch bei den Krebszelllinien die Randständigkeit des konstitutiven Heterochromatins deutlich. Die Signalverteilungen der undifferenzierten und RA-differenzierten HL-60-Zellen ähneln sich auch hier wieder sehr stark und bilden einen Gegensatz zu allen anderen untersuchten Zelltypen, in denen eine weitaus flachere Signalverteilung zu finden ist, wobei diese Zelltypen auch etwas größere Zellkerne haben, als die HL-60-Zellen. Die undifferenzierten und RA-differenzierten HL-60-Zellen gleichen in ihrer Signalverteilung am meisten den normalen Granulozyten-Nuklei, alle anderen untersuchten Krebszellnuklei ähneln dagegen eher den zyklierenden Lymphozyten. (s. .Abb. III.2.8.)

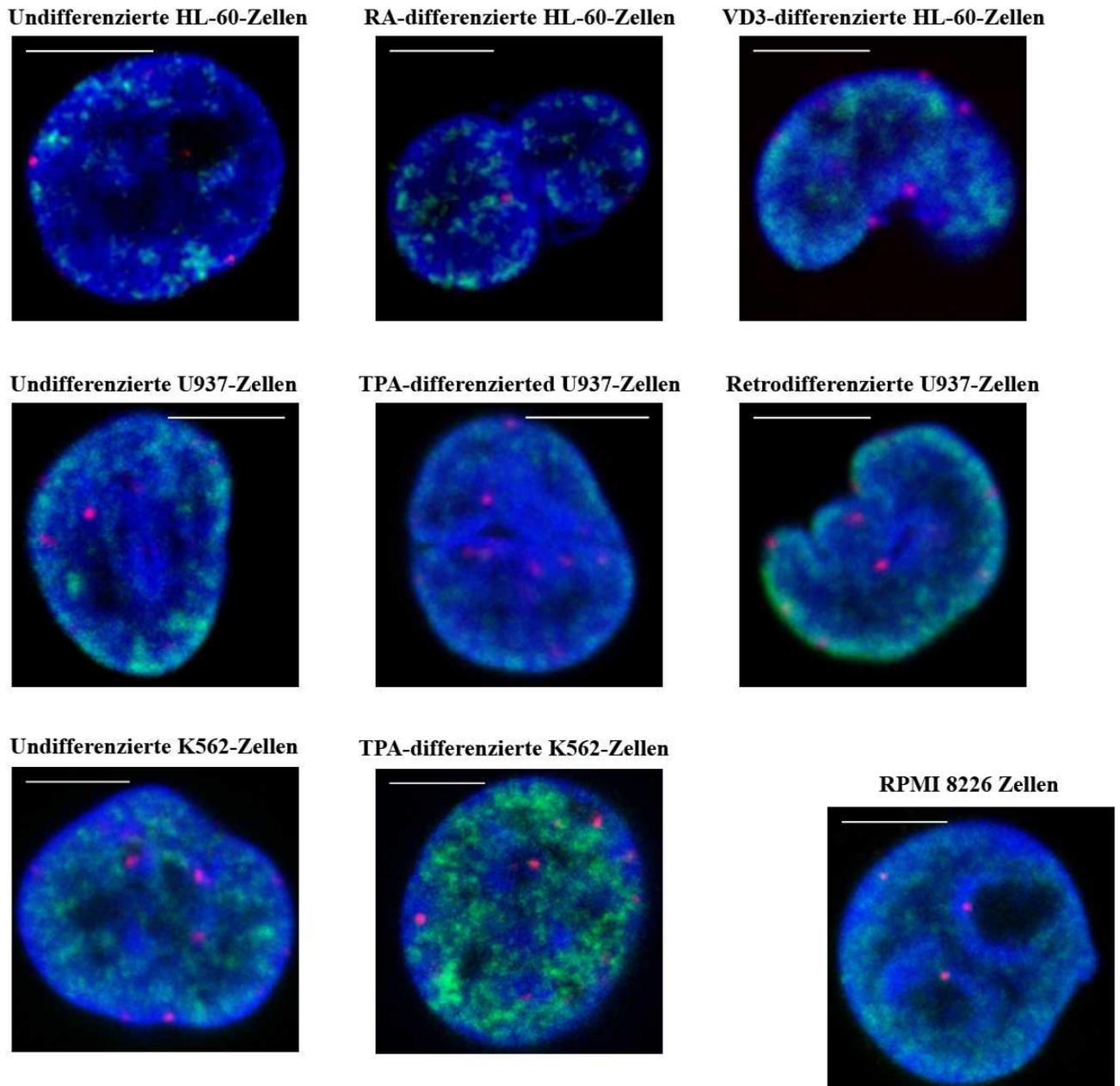


Abb. III.2.7.: Konfokalbilder von me³-H3K9 Immunfluoreszenzexperimenten mit undifferenzierten und differenzierten Zellkernen von Krebszelllinien. Es handelt sich um Einzelbilder aus mittleren Schnittebenen. Blau: DAPI, Grün: me³-H3K9, Rot: Crest-Signal. Skalierungsbalken: 5 μ m.

III. Ergebnisse

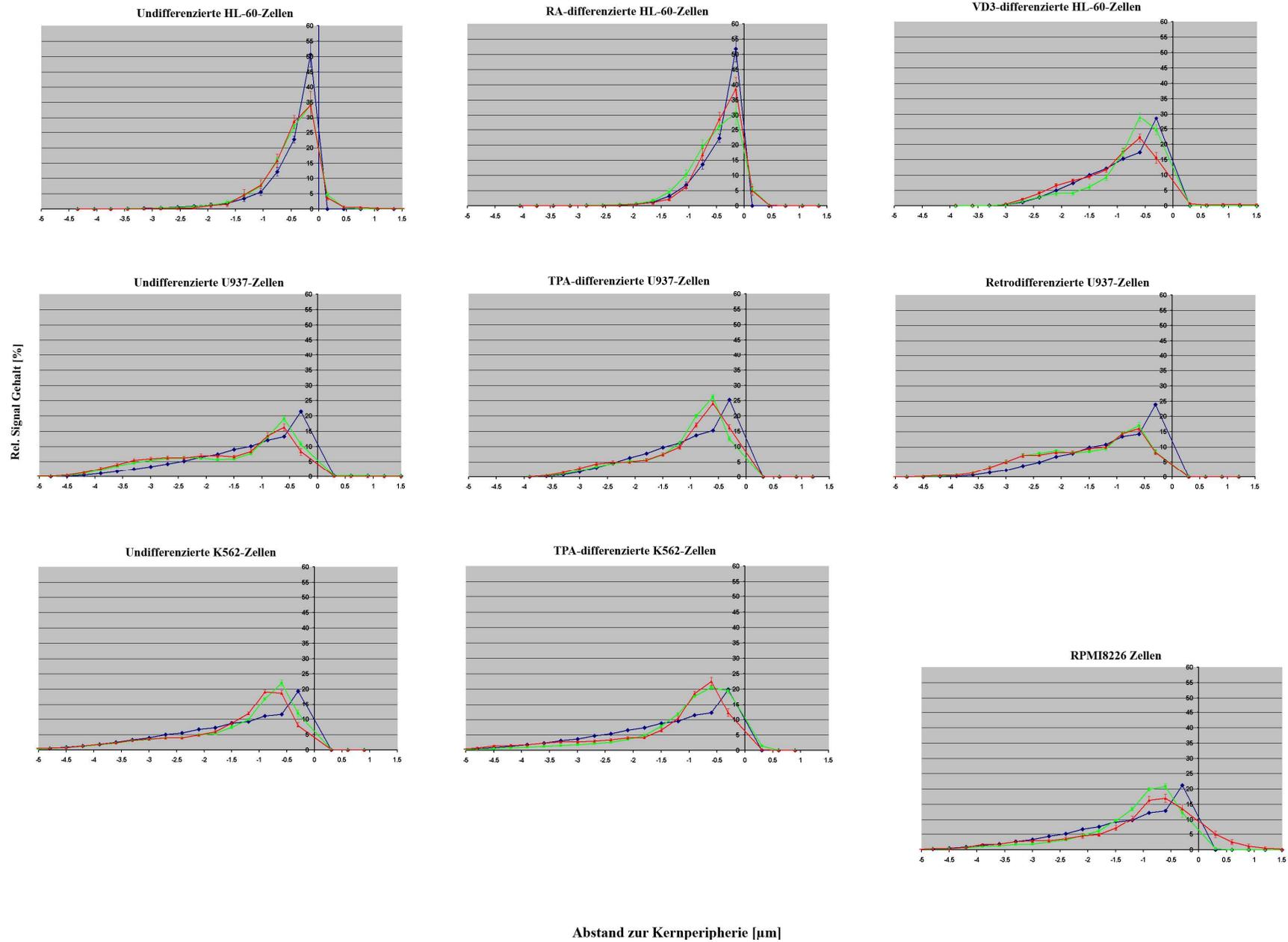


Abb. III.2.8.: EDMT-Auswertung der Signalverteilungen von me3-H3K9 in Zellkernen undifferenzierter und differenzierter Krebszellen. Blau: DAPI, Grün: me3-H3K9, Rot: Crest-Signal. N = 25.

2.2.3. Clusteranalyse von me3-H3K9-Signalen in normalen Zellen und Krebszelllinien

Mit Hilfe eines eigens für diese Anwendung programmierten Software-Tools (T. Thormeyer, 2007) wurde untersucht, wie stark die me3-H3K9-Signale zusammenballen. Dazu wurde die Anzahl der Signalcluster, also Regionen mit deutlicher Häufung der Signale im Vergleich zum restlichen Zellkern, und deren Größe gemessen und gegeneinander in einer Excel Datei in ein Diagramm aufgetragen (s. Abb. III.2.9.).

In den untersuchten normalen Zelltypen lässt sich eine Ähnlichkeit zwischen den ruhenden Lymphozyten und den Granulozyten, jeweils mit wenigen großen Clustern, und zwischen zyklierenden Lymphozyten und Monozyten, mit vielen kleineren Objekten, feststellen. Die Stammzellen sind zwischen den beiden Gruppen zu finden, sie haben eine mittlere Anzahl mittelgroßer Ballungen.

In den Krebszelllinien ist im Vergleich zu den normalen Zelltypen bereits ein fast zehnfacher Unterschied in der Größe der Cluster zu finden. So sind in den normalen Zelltypen die größten Cluster ca. 400 Voxel groß, in den Krebszelllinien sind Cluster einer Größe von 4000 Voxel durchaus vorhanden (einige extremere Werte in der Größe der Signale in den Krebszellen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht im Diagramm dargestellt, da sich der Trend in Größe / Anzahl der Objekte auch so bereits abschätzen lässt.)

In den U937-Zellen ist auch mit Differenzierung und Retrodifferenzierung kein großer Unterschied in Anzahl / Größe der Signal-Ballungen zu erkennen. In den HL-60-Zellen ist ein leichter Trend zu sehen: bei der Differenzierung mit RA werden die Cluster mehr, dafür jedoch etwas kleiner, und nach der Differenzierung mit VD3 sind nur noch wenige, eher kleine Objekte zu sehen. Den stärksten Unterschied nach der Differenzierung zeigen die K-562-Zellen, die zunächst viele kleine Cluster haben, und nach der Differenzierung nur noch wenig große Objekte zeigen. Die RPMI 8226-Zellen haben insgesamt relativ wenige, jedoch große Signale.

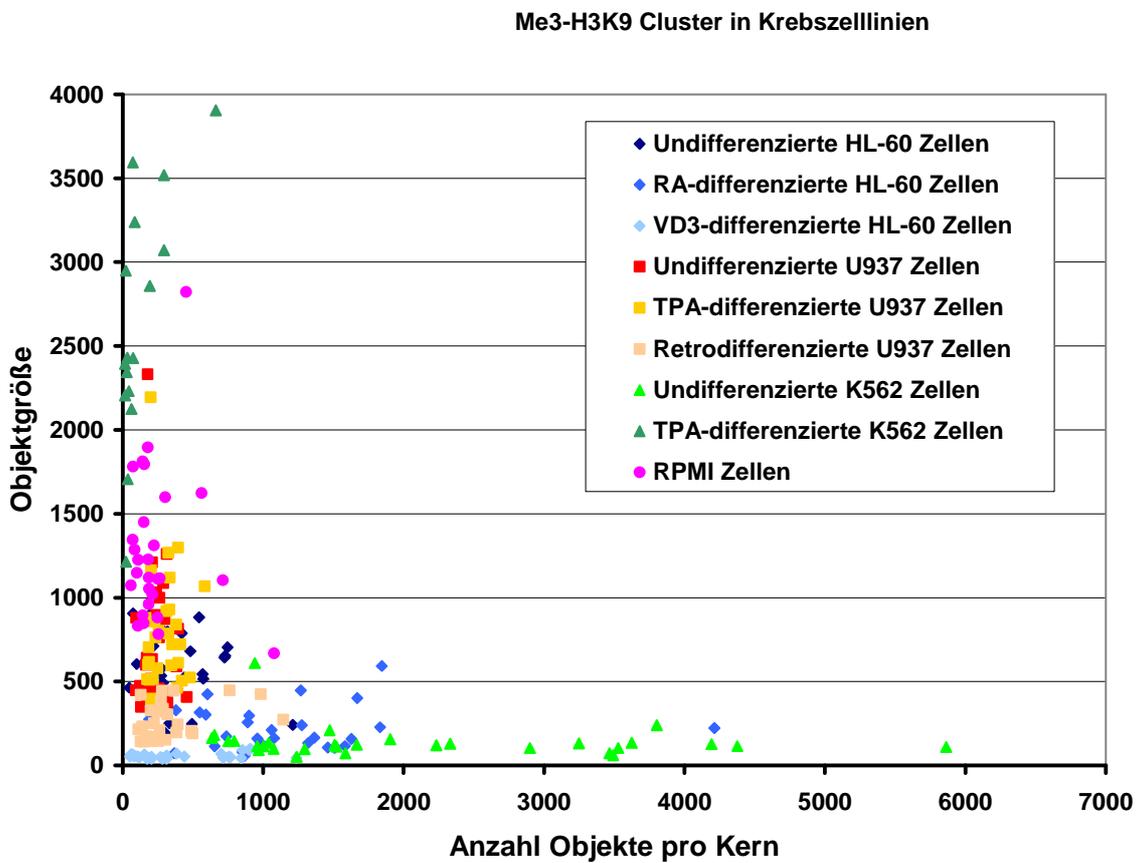
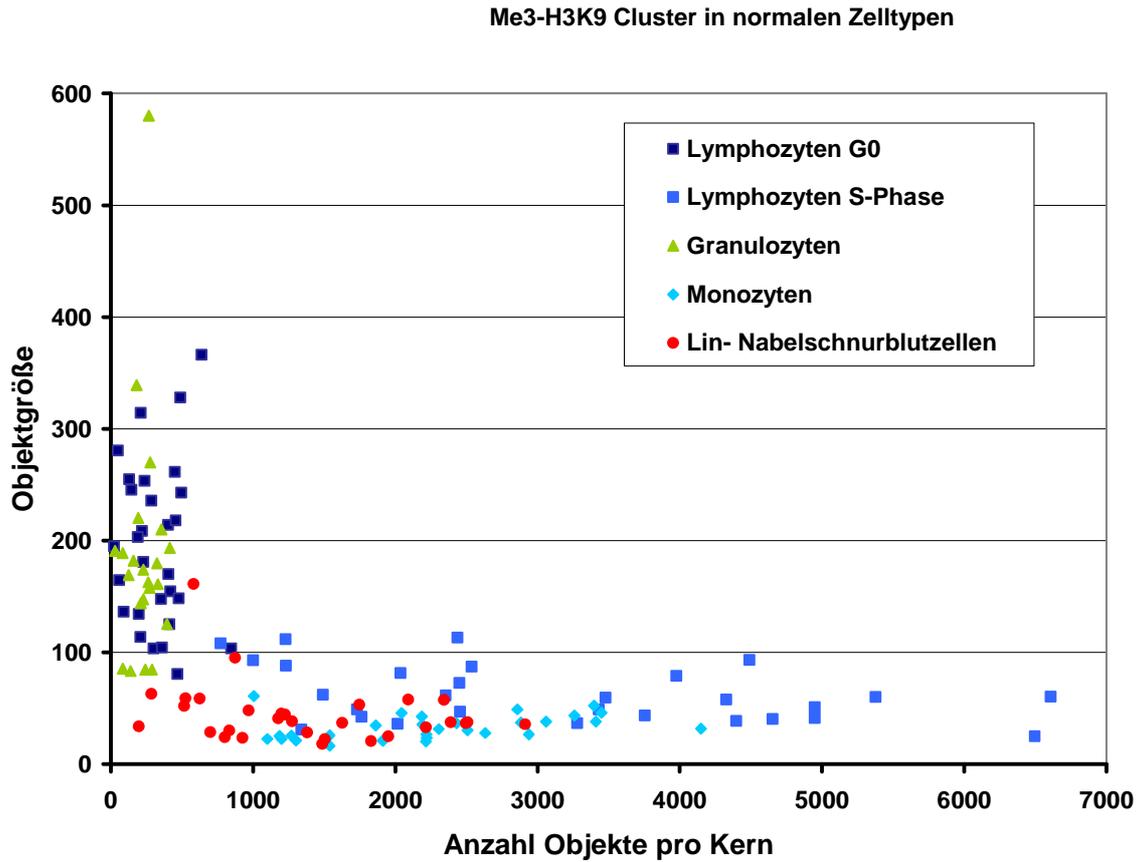


Abb.III.2.9.: Clusteranalyse von me3-H3K9-Signalen in normalen (oben) und Krebszellen (unten) vor und nach der Differenzierung.

2.3.me3-H3K27

2.3.1. Radiale Verteilung von me3-H3K27-Signalen in Nuklei normaler Zellen

Me3-H3K27, der Marker für das fakultative Heterochromatin, färbt in normalen weiblichen Zellen das inaktive X-Chromosom an, was auch in Abb. III.2.10. jeweils deutlich zu sehen ist. Im Vergleich zu den weiblichen Zellen wurden für Granulozyten und Monozyten auch männliche Zellen untersucht um festzustellen, ob es Unterschiede in der radialen Signalverteilung gibt. Die Signale, abgesehen vom inaktiven X, sind meist verstreut über den gesamten Zellkern, ohne besondere Präferenzen für bestimmte Bereiche (s. Abb. III.2.10.). Bei den Stammzellen ist kein inaktives X-Chromosom zu sehen, es müsste sich daher um ein männliches Individuum gehandelt haben, aus dessen Nabelschnur das Blut zur Isolierung der Stammzellen gewonnen wurde.

In der radialen Signalverteilung ist auch für diesen Marker die flachste Signalverteilung für die zyklierenden Lymphozyten, mit den insgesamt größten Zellkernen zu finden. Auch die männlichen Monozyten weisen eine relativ flache Signalkurve auf, bei ebenfalls recht großen Zellkernen. Alle anderen untersuchten Zelltypen weisen sehr ähnliche Signalverteilungskurven auf, die weder so weit in der Zellkernmitte liegen wie die von me3-H3K4, noch so weit am Kernrand zu finden sind wie die von me3-H3K4. Es ist auch keine so starke Nähe zu den Crest-Signalen zu erkennen wie für me3-H3K9.

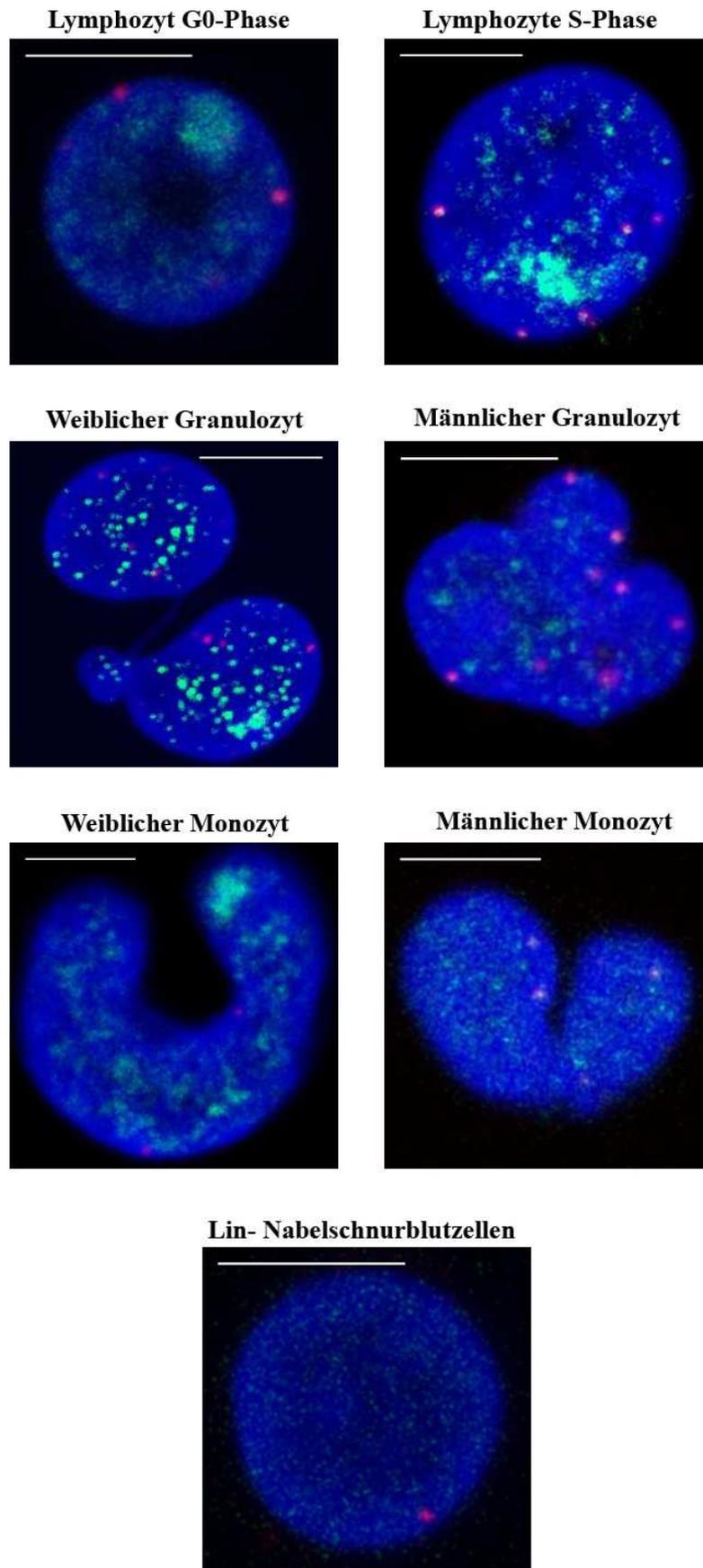


Abb. III.2.10.: Konfokalbilder von me3-H3K27 Immunfluoreszenzexperimenten mit normalen Zellkernen (Lymphozyten wurden aus weiblichen Individuen gewonnen). Es handelt sich um Einzelbilder aus mittleren Schnittebenen. Blau: DAPI, Grün: me3-H3K27, Rot: Crest-Signal.

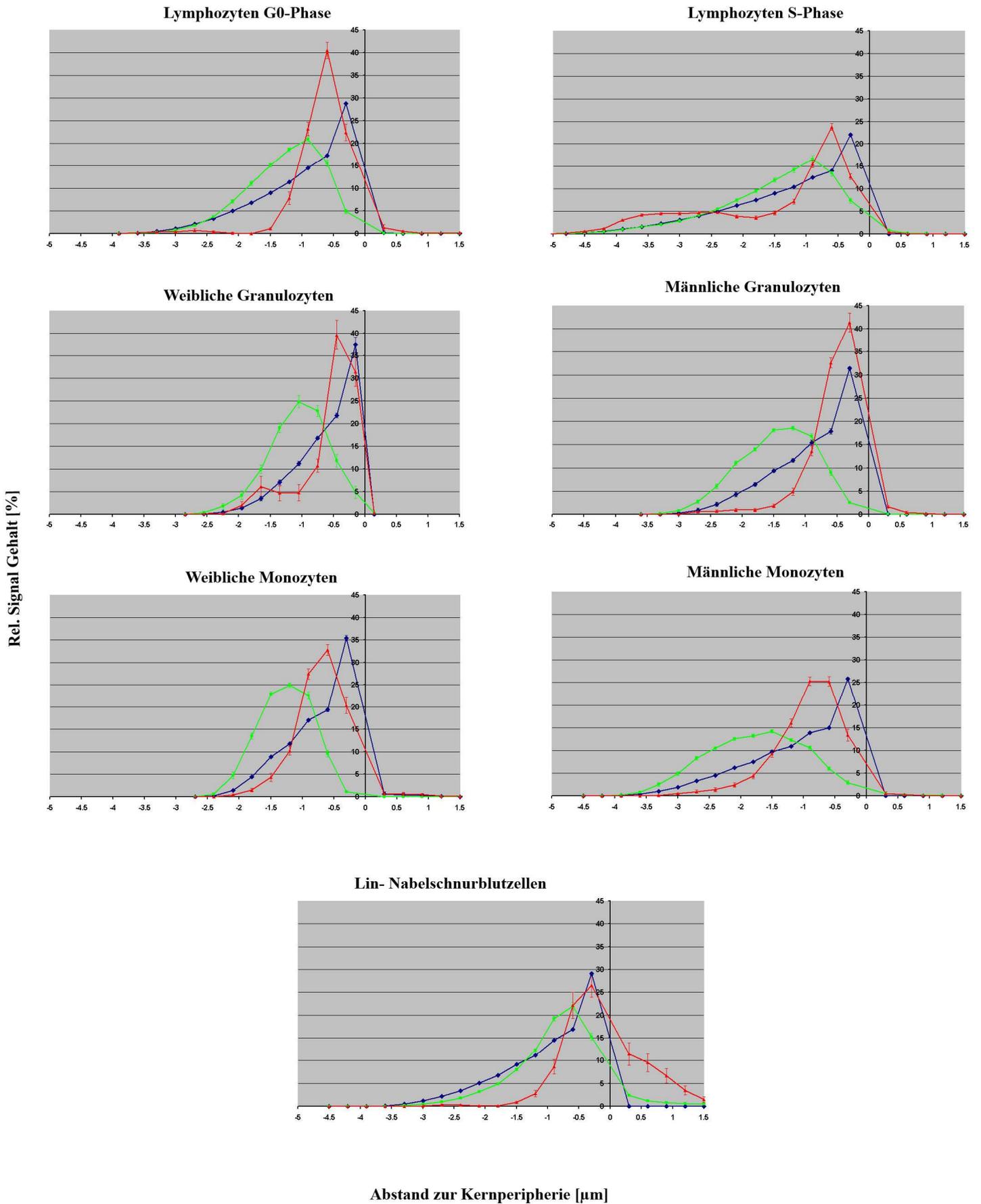


Abb. III.2.11.: EDMT-Auswertung der Signalverteilungen von me3-H3K27 in normalen Zellkernen.

Blau: DAPI, Grün: me3-H3K27, Rot: Crest-Signal. N = 25.

2.3.2. Radiale Verteilung von me³-H3K27-Signalen in undifferenzierten und differenzierten Krebszellnuclei

In den Krebszelllinien ist nach der Immunfluoreszenzfärbung mit me³-H3K27 kein inaktives X-Chromosom zu sehen, was daran liegt, dass die weiblichen Zelllinien, HL-60 und K562, starken chromosomalen Veränderungen unterliegen, wobei oft ein X-Chromosom verloren geht (Volpi et al. 1996, Liang et al. 1999, Cottier et al. 2004, Koeffler et al. 1980, Lozzio et al. 1979, Andersson et al. 1979, Lozzio et al, 1981). Insgesamt ist das me³-H3K37-Signal in den Krebszellen deutlich mehr am Kernrand zu finden als in den normalen Zelltypen. Dieser Trend ist in den undifferenzierten und RA-differenzierten HL-60-Zellen etwas deutlicher als in den VD3-differenzierten HL-60 Zellen und den U937-Zellen. In den RPMI 8226- und K562-Zellen ist sogar noch mehr Signal in der Kernmitte zu finden (s. Abb. III.2.12.)

Dieser Trend ist auch in der Untersuchung der radialen Verteilung zu erkennen. Auch zeigt sich hier wieder, dass in den größeren Zellkernen (U937, K562, RPMI8226) eine flachere Signalverteilungskurve zu Stande kommt als in den deutlich kleineren HL-60-Zellen.

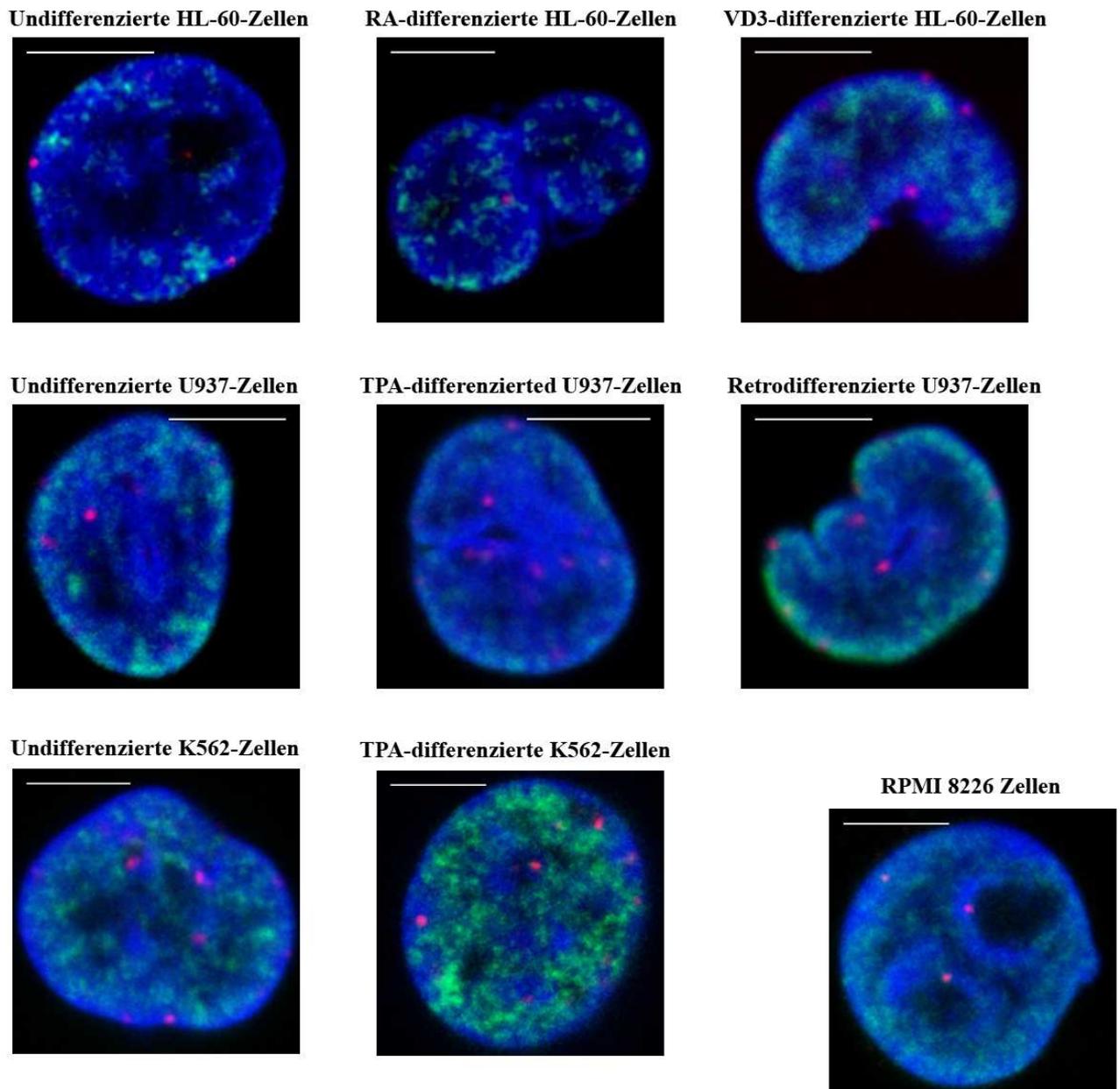


Abb. III.2.12.: Konfokalbilder von me3-H3K27 Immunfluoreszenzexperimenten mit undifferenzierten und differenzierten Zellkernen von Krebszelllinien. Es handelt sich um Einzelbilder aus mittleren Schnittebenen. Blau: DAPI, Grün: me3-H3K27, Rot: Crest-Signal. Skalierungsbalken: 5 μm.

III. Ergebnisse

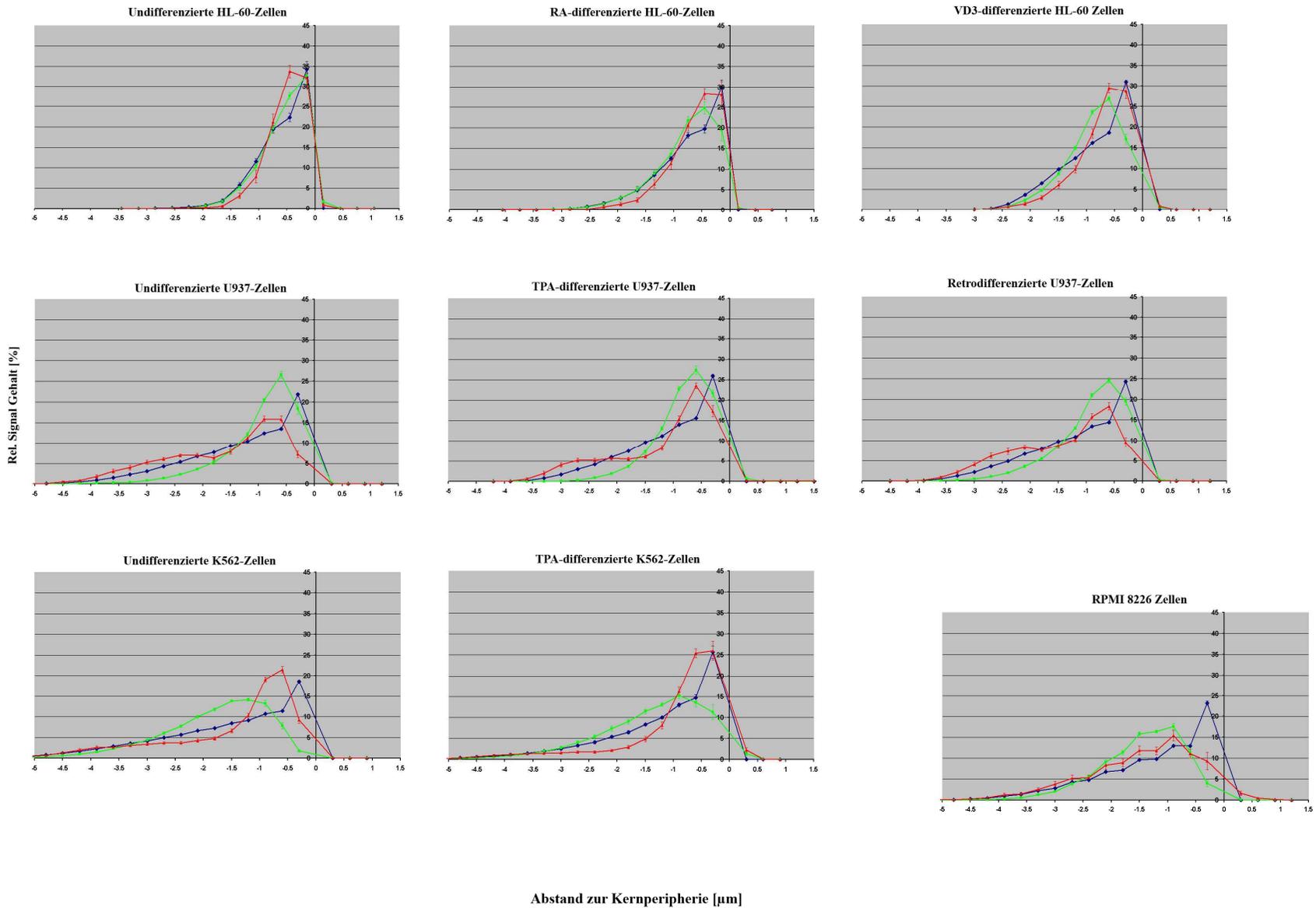


Abb. III.2.13.: EDMT-Auswertung der Signalverteilungen von me3-H3K27 in Zellkernen undifferenzierter und differenzierter Krebszellen.

Blau: DAPI, Grün: me3-H3K27, Rot: Crest-Signal. N = 25.

2.4. Statistik

2.4.1. Statistische Auswertung der Signalverteilungen innerhalb eines Zelltyps

Zunächst wurde untersucht, wie sich die radiale Verteilung der Signale innerhalb eines Zelltyps unterscheiden (s. Tabelle III.2.1.). Auffällig ist hierbei, dass es zwischen me3-H3K9 und DAPI und zwischen me3-H3K9 und Crest häufig keinen signifikanten Unterschied gibt, was wieder zeigt, dass me3-H3K9 meist ein eher randständiges Signal ist. In einigen Zelltypen, aber deutlich seltener als für me3-H3K9 werden statistische Ähnlichkeiten in den Signalverteilungen von me3-H3K4 bzw. me3-H3K27 und Crest gefunden, selten treten Ähnlichkeiten zwischen DAPI und me3-H3K4 und me3-H3K27 auf. Weiterhin ist auffällig, dass die Signale zwischen den undifferenzierten und den RA-differenzierten HL-60-Zellen, und in etwas geringerem Maße, auch bei den RPMI 8226-Zellen, am wenigsten statistisch signifikant verschieden sind.

	DAPI- H3K4	Crest- H3K4	DAPI-H3K9	H3K9-Crest	DAPI- H3K27	H3K27- Crest
Quiesc. Lymph.	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	No Diff.; p = 0,225	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001
Cycl. Lymph.	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,002	Sig. Diff.; p = 0,001	No Diff.; p = 0,166
Granulo. Female	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,025	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001
Granulo. Male					Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001
Mono. Female	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	No Diff.; p = 0,243	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001
Mono. Male					Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001
HL-60 undiff	No Diff.; p = 0,628	No Diff.; p = 0,187	No Diff.; p = 0,720	No Diff.; p = 0,786	Sig. Diff.; p = 0,003	No Diff.; p = 0,877
HL-60 RA- diff.	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,014	No Diff.; p = 0,416	No Diff.; p = 0,174	No Diff.; p = 0,077	No Diff.; p = 0,118
HL-60 VD3- diff.	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	No sig. Diff.; p = 0,093	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,005	Sig. Diff.; p = 0,001
U937 undiff.	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,002	No Diff.; p = 0,117	Sig. Diff.; p = 0,031	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001
U937 TPA- diff.	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,040	No Diff.; p = 0,751	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001
U937 Retrodiff.	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,002	Sig. Diff.; p = 0,001	No Diff.; p = 0,976	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001
K562 undiff.	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,008	No Diff.; p = 0,900	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001
K562 TPA- diff.	Sig. Diff.; p = 0,001	No Diff.; p = 0,715	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,008	Sig. Diff.; p = 0,017	Sig. Diff.; p = 0,001
RPMI 8226	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001	No Diff.; p = 0,608	No Diff.; p = 0,099	No Diff.; p = 0,496
Lin- UCB	Sig. Diff.; p = 0,001	No Diff.; p = 0,429	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,003	Sig. Diff.; p = 0,001	Sig. Diff.; p = 0,001

Tabelle III.2.1.: Unterschiede in den Signalverteilungen innerhalb der einzelnen untersuchten Zelltypen. N = 25.

2.4.2. Statistische Auswertung der Signalverteilungen der Zelltypen untereinander

Weiterhin wurde mittels Sigma Stat analysiert, ob es Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten in den Signalverteilungen zwischen verschiedenen Zelltypen gibt.

Für me3-H3K4 (s. Tabelle III.2.2.: Signalverteilungen innerhalb der einzelnen untersuchten Zelltypen) gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen ruhenden Lymphozyten, Granulozyten und RA-differenzierten HL-60-Zellen. Zyklisierende Lymphozyten zeigen dagegen Ähnlichkeiten zu undifferenzierten K562-Zellen und RPMI8226-Zellen, Granulozyten zeigen eine Ähnlichkeit zu RA-differenzierten HL-60-Zellen. Monozyten hingegen weisen keine signifikanten Unterschiede in der Signalverteilung im Vergleich zu undifferenzierten und differenzierten U937-Zellen auf, ebenso ähneln sich RA- und VD3-differenzierte HL-60-Zellen. Weitere Ähnlichkeiten finden sich zwischen undifferenzierten HL-60-Zellen und TPA-differenzierten K562-Zellen, zwischen undifferenzierten und TPA-differenzierten U937-Zellen und zwischen Retrodifferenzierten U937-zellen und undifferenzierten K562-Zellen.

Me3-H3K9 zeigt Ähnlichkeiten in der Signalverteilung zwischen ruhenden Lymphozyten und Monozyten und TPA-differenzierten K562-Zellen, zwischen cyclisierenden Lymphozyten und retrodifferenzierten U937-Zellen, sowie zwischen Granulozyten und undifferenzierten und RA-differenzierten HL-60 Zellen und Stammzellen. Monozyten hingegen ähneln VD3-differenzierten HL-60-Zellen und TPA-differenzierten K-562-Zellen, undifferenzierte HL-60-Zellen zeigen Ähnlichkeiten mit RA-differenzierten HL-60-zellen und Stammzellen, und folglich zeigen auch RA-differenzierte HL-60-Zellen Ähnlichkeiten zu Stammzellen. VD3-differenzierte HL-60 Zellen weisen keine signifikanten Unterschiede zu TPA-differenzierten U937-Zellen, zu TPA-differenzierten K562-Zellen und zu RPMI8226-Zellen auf. Interessant ist, dass undifferenzierte U937-zellen ihrem retrodifferenzierten Gegenstücken ähnlich sind, und auch den undifferenzierten K562-zellen ähneln. TPA-differenzierte U937-Zellen wiederum ähneln TPA-differenzierten K562-Zellen und RPMI 8226-Zellen

Für me3-H3K27 schließlich fällt auf, dass weibliche Monozyten ruhenden und cyclisierenden Lymphozyten und weiblichen Granulozyten ähneln, männlichen Granulozyten jedoch nicht. Weiterhin ähneln cyclisierende Lymphozyten weiblichen und männlichen Granulozyten. Auch für TPA-differenzierte K562-Zellen werden Ähnlichkeiten mit ruhenden und zyklisierenden Lymphozyten, männlichen und weiblichen Granulozyten und weiblichen Monozyten, jedoch auch wieder nicht mit männlichen Monozyten gefunden. Ebenso verhalten sich die RPMI8226-Zellen, mit dem unterschied, dass sie keine Ähnlichkeit zu ruhenden

Lymphozyten zeigen. RA-differenzierte HL-60-Zellen ähneln in der Signalverteilung den VD3-differenzierten HL-60-Zellen als auch allen Differenzierungsformen der U937-Zellen und auch den Stammzellen. Die mit VD3 differenzierten HL60-Zellen ähneln dagegen nur den undifferenzierten und retrodifferenzierten U937-Zellen. Die undifferenzierten U937-Zellen zeigen Ähnlichkeiten mit den beiden anderen Differenzierungszuständen und den Stammzellen, wohingegen die TPA-differenzierten U937-Zellen lediglich den Stammzellen gleichen. Eine weitere Ähnlichkeit besteht zwischen den TPA-differenzierten K562-Zellen und den RPMI8226-Zellen.

III. Ergebnisse

H3K4	Quiesc. Lymph.	Cycl. Lymph.	Granulo-cytes	Mono-cytes	HL-60 undiff.	HL-60 RA-diff.	HL-60 VD3-diff	U937 undiff	U937 TPA-diff	U937 Retro-diff	K562 undiff.	K562 TPA-diff	RPMI 8226	Lin-UCB
Quiesc. Lymph.		Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,514	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,163	Sig.Diff.; P=0,003	Sig.Diff.; P=0,001						
Cycl. Lymph.			Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,070	Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,072	Sig.Diff.; P=0,001							
Granulo-cytes				Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,067	Sig.Diff.; P=0,004	Sig.Diff.; P=0,001						
Mono-cytes					Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,739	No diff.; P=0,371	Sig.Diff.; P=0,001				
HL-60 undiff.						Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,249	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,031					
HL-60 RA-diff.							No diff.; P=0,704	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,002	Sig.Diff.; P=0,001				
HL-60 VD3-diff								Sig.Diff.; P=0,001						
U937 undiff									No diff.; P=0,261	Sig.Diff.; P=0,001				
U937 TPA-diff										Sig.Diff.; P=0,001				
U937 Retro-diff											No diff.; P=0,121	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001
K562 undiff.												Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,004	Sig.Diff.; P=0,001
K562 TPA-diff.													Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,002
RPMI 8226														Sig.Diff.; P=0,001
Lin-UCB														

Tabelle III.2.2.: Vergleich von me3-H3K4 in den untersuchten Zelltypen, N = 25.

III. Ergebnisse

H3K9	Quiesc. Lymph.	Cycl. Lymph.	Granulocytes	Mono-cytes	HL-60 undiff.	HL-60 RA-diff.	HL-60 VD3-diff	U937 undiff.	U937 TPA-diff	U937 Retro-diff	K562 undiff	K562 TPA-diff	RPMI 8226	Lin-UCB
Quiesc. Lymph		Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001	No Diff.; P=0,824	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,012	Sig.Diff.; P=0,046	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,007	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,501	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,002
Cycl. Lymph.			Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,010	Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,181	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001				
Granulocytes				Sig.Diff.; P=0,001	No Diff.; P=0,058	No Diff.; P=0,944	Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,919						
Mono-cytes					Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,005	No diff.; P=0,65	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,004	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,469	Sig.Diff.; P=0,002	Sig.Diff.; P=0,001
HL-60 undiff						No Diff.; P=0,647	Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,051						
HL-60 RA-diff							Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,002	Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,743				
HL-60 VD3-diff								Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,888	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,014	No diff.; P=0,204	No diff.; P=0,471	Sig.Diff.; P=0,001
U937 undiff									Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,198	No diff.; P=0,340	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,003	Sig.Diff.; P=0,001
U937 TPA-diff										Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,071	No diff.; P=0,170	Sig.Diff.; P=0,001
U937 Retro-diff											Sig.Diff.; P=0,038	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,001
K562 undiff												Sig.Diff.; P=0,001	Sig.Diff.; P=0,033	Sig.Diff.; P=0,001
K562 TPA-diff													Sig.Diff.; P=0,008	Sig.Diff.; P=0,001
RPMI 8226														Sig.Diff.; P=0,001
Lin-UCB														

Tabelle III.2.3.: Vergleich von me3-H3K9 in den untersuchten Zelltypen. N = 25.

III. Ergebnisse

H3K27	Quiesc. Lymph	Cycl. Lymph.	Granu. female	Granu. male	Mono. female	Mono. male	HL-60 undiff.	HL-60 RA-diff.	HL-60 VD3-diff	U937 undiff	U937 TPA-diff	U937 Retro-diff	K562 undiff	K562 TPA-diff	RPMI 8226	Lin-UCB	
Quiesc. Lymph.		Sig. Diff.; P=0,027	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	No Diff.; P=0,191	Sig. Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,464	Sig. Diff.; P=0,032	Sig. Diff.; P=0,001								
Cycl. Lymph.			No Diff.; P=0,190	No Diff.; P=0,069	No Diff.; P=0,144	Sig. Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,660	No diff.; P=0,804	Sig. Diff.; P=0,001								
Granu. female				Sig. Diff.; P=0,001	No Diff.; P=0,913	Sig. Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,767	No diff.; P=0,163	Sig. Diff.; P=0,001								
Granu. male					Sig. Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,112	No diff.; P=0,160	Sig. Diff.; P=0,001									
Mono. female						Sig. Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,941	No diff.; P=0,162	Sig. Diff.; P=0,001								
Mono. male							Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,014	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001						
HL-60 undiff								Sig. Diff.; P=0,002	Sig. Diff.; P=0,001								
HL-60 RA-diff										No diff.; P=0,679	No diff.; P=0,648	No diff.; P=0,375	No diff.; P=0,488	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,583
HL-60 VD3-diff										No diff.; P=0,802	Sig. Diff.; P=0,022	No diff.; P=0,673	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,060	
U937 undiff											No diff.; P=0,183	No diff.; P=0,515	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,284	
U937 TPA-diff												Sig. Diff.; P=0,012	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	No diff.; P=0,673	
U937 Retrodiff													Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,031	
K562 undiff														Sig. Diff.; P=0,002	Sig. Diff.; P=0,001	Sig. Diff.; P=0,001	
K562 TPA-diff															No diff.; P=0,615	Sig. Diff.; P=0,001	
RPMI 8226																Sig. Diff.; P=0,001	
Lin-UCB																	

Tabelle III.2.4.: Vergleich von me3-H3K27 in den untersuchten Zelltypen. N = 25.

3. „komplexe Sonden“

Als letzter Teilbereich werden nun die Ergebnisse aus den Versuchen zur Erstellung „komplexer Sonden“ dargestellt.

Die „komplexen Sonden“ wurden aus verschiedenen menschlichen Zellen und Maus-Zelllinien hergestellt, auf Metaphase-Präparate hybridisiert und dann zum Teil für 3D-Analysen verwendet. Dabei wurden für die Herstellung zwei verschiedene DNA-Amplifikationsmethoden mit gewissen Abwandlungen in der Weiterbearbeitung des Materials verwendet. Somit gliedert sich der Ergebnisteil in folgende drei Teile:

1. Verwendete Zellen und deren Differenzierung
2. DNA-Amplifikation mittels Genomiphi
3. DNA-Amplifikation mittels DOP-PCR

3.1. Verwendete Zellen und deren Differenzierung

Für die durchgeführten Experimente wurden zwei normale humane Zelltypen, Fibroblasten und Lymphozyten und die promyeloische Leukämie-Zelllinie HL-60. Diese Zelllinie, die im undifferenzierten Zustand lymphoblastische Morphologie besitzt, kann durch Zugabe von 1 μ M Retinsäure über einen Zeitraum von sieben Tagen in eine granulozyten-ähnliche Morphologie mit lobulierten Zellkernen überführt werden. Diese Differenzierung ist innerhalb einer Zellpopulation nahezu vollständig, d.h. ca.98 % der Zellen weisen nach der Behandlung mit Retinsäure Zellkerne mit 2-5 Lobuli auf. In Abb. III.3.1. ist eine Differenzierungsreihe gezeigt.

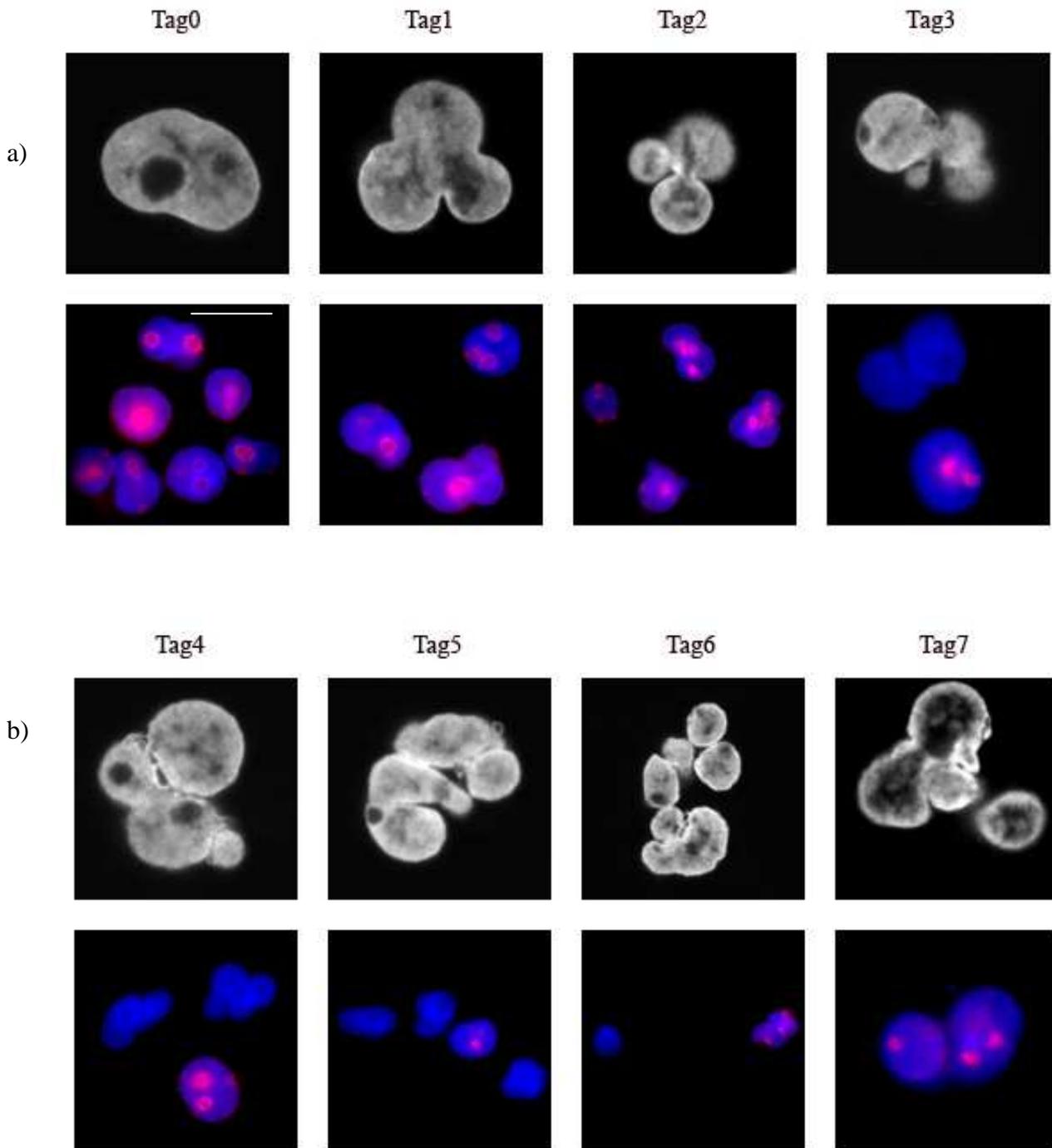


Abb. III.3.1.: Differenzierung von HL-60-Zellen mit Retinsäure. a) Tag 0-3 der Differenzierung, b) Tag 4-7 der Differenzierung. die obere Bildreihe zeigt jeweils mittlere Bildausschnitte aus konfokalen Bildstapeln eines Zellkerns im DAPI-Kanal. Die untere Reihe zeigt mit dem Epifluoreszenzmikroskop aufgenommene Bilder von DAPI und Ki-67 als Überlagerung (DAPI = blau, Ki-67 = rot).

Weiterhin wurden zwei Mauszelllinien für die Untersuchungen verwendet. Bei C2C12 handelt es sich um eine Myoblasten-Zelllinie, die im undifferenzierten Zustand in der Morphologie humaner Fibroblasten ähneln und entweder durch zu große Zelldichte oder Zugabe von Pferdeserum zum Nährmedium anstelle von fötalem Kälberserum in die Differenzierung zu Myotuben übergeht (Abb. III.3. 2.).

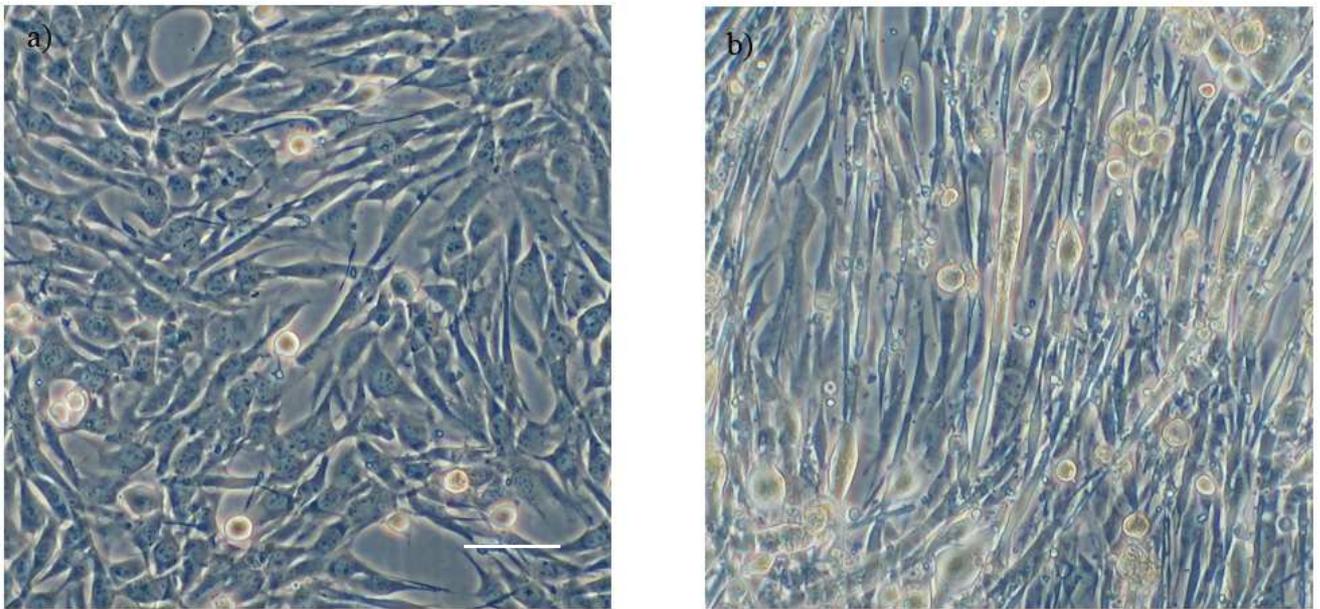


Abb. III.3.2.: Differenzierung von C2C12-Zellen. a) undifferenzierte Myoblasten, b) 7 Tage differenzierte Myotuben. Skalierungsbalken = 10 μm . Lichtmikroskopische Aufnahme.

Bei MEL-Zellen handelt es sich um eine Erythroleukämie-Zelllinie der Maus, in der durch Zugabe von HMBA die Expression von β -Globin angeschaltet werden kann, was jedoch an der lymphoiden Morphologie der Zellen nichts ändert.

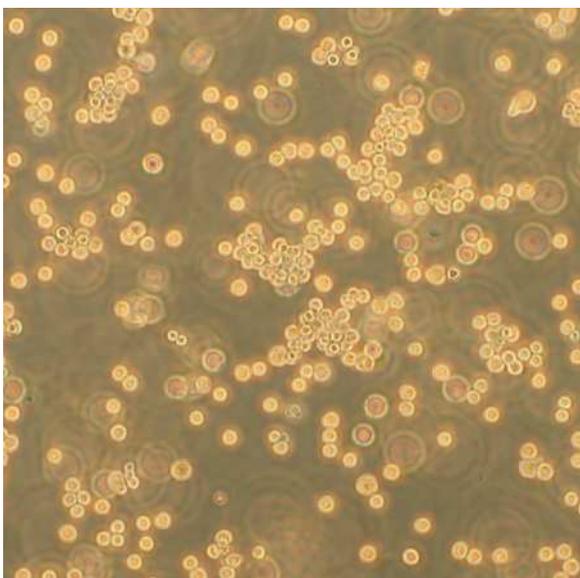


Abb. III.3.3.: MEL-Zellen mit lymphoider Morphologie. Skalierungsbalken = 10 μm . Lichtmikroskopische Aufnahme.

Aus allen beschriebenen Zelltypen wurde RNA isoliert, die isolierte RNA-Menge wurde photometrisch bestimmt und die Qualität der RNA wurde auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel überprüft.

RNA	Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Ratio
Humane Lymphozyten	3,13	1,7998
Humane Fibroblasten	5,49	1,850
HL-60 undifferenziert	2,85	1,832
HL-60 differenziert mit RA	1,24	1,795
MEL undifferenziert	8,56	1,880
MEL differenziert mit HMBA	11,2	1,888
C2C12 undifferenziert	7,22	1,869
C2C12 differenziert mit Pferdeserum	4,82	1,841

Tabelle III.3.1.: Konzentration und Ratio der isolierten RNAs

Es wurde hauptsächlich mit der RNA aus den differenzierten MEL-Zellen weitergearbeitet, da hier die größte RNA-Menge vorlag. Für die Herstellung humaner komplexer Sonden wurde meist Fibroblasten-RNA verwendet, da sie aus adhärennten Zellen am leichtesten zu gewinnen ist

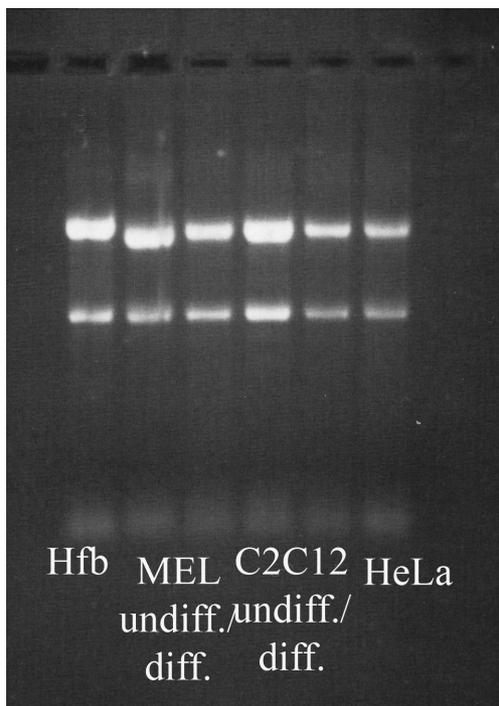


Abb. III.3.4.: Denaturierendes RNA-Formaldehyd-Gel zur RNA-Isolation. Die Gele der übrigen RNA-Isolationen zeigen ähnliche Muster, werden also hier nicht gezeigt. HeLa RNA in $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ wird als Kontrolle mitgeführt. Die RNAs zeigen deutliche 28S- und 18S-Banden und weisen keine Denaturierung durch RNasen auf.

Aus den RNAs wurden mittels reverser Transkription cDNA hergestellt.

Mit einer RT-PCR gegen Maus- β -Hämoglobin wurde überprüft, ob die Induktion mit HMBA funktioniert hat.

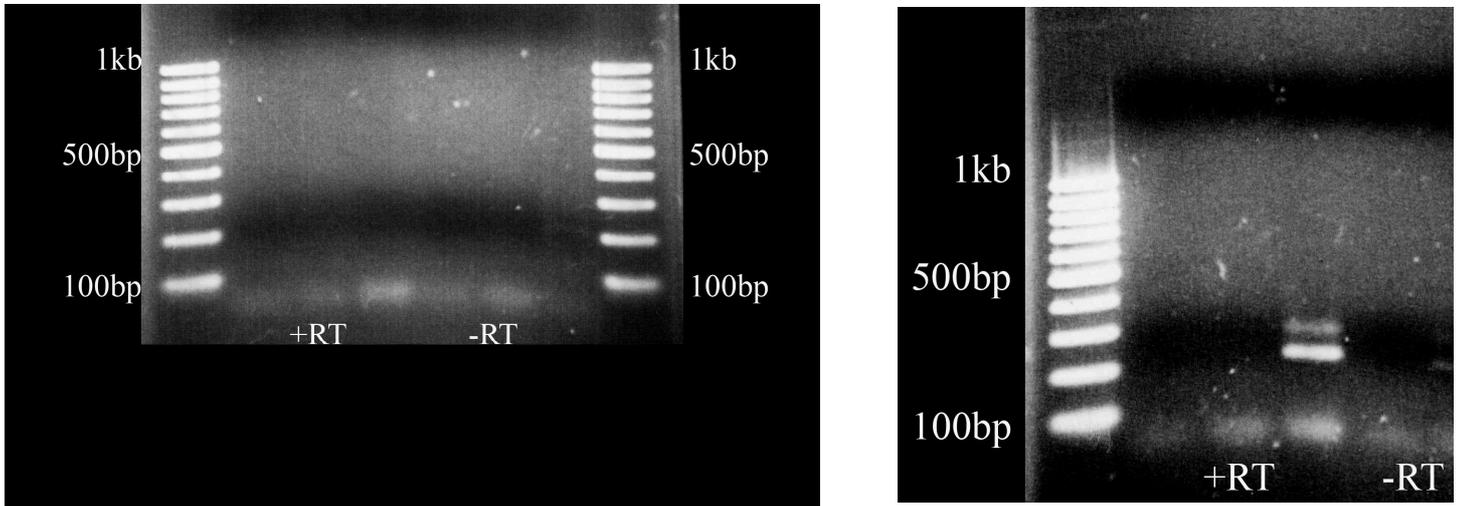


Abb. III.3.5.: RT-PCR gegen Mmu Hbb-1. a) undifferenzierte Zellen, cDNA aus +RT und -RT in 1:100, 1:10 und 1:1, b) differenzierte Zelle, cDNA aus +RT in 1:100, 1:10, 1:1, aus -RT in 1:1. Erwartete 286 bp-Bande tritt auf, Induktion war erfolgreich.

Weiterhin wurden die entstandenen cDNAs mittels GAPDH-PCR überprüft, wie folgendes Beispiel-Gel zeigt:

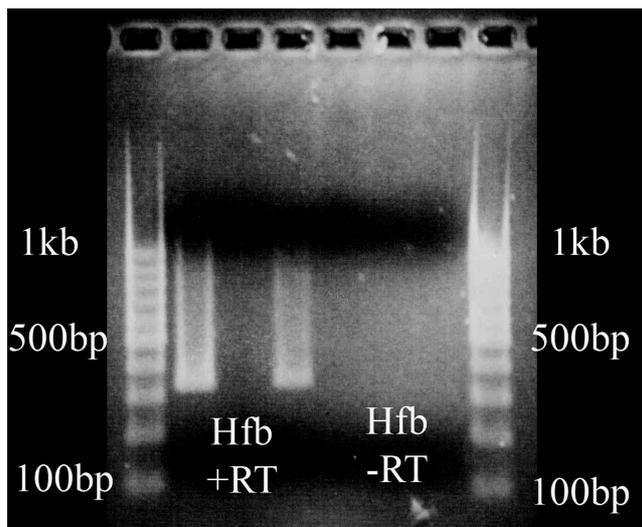


Abb. III.3.6.: Kontroll-GAPDH-PCR für die cDNA aus humanen Fibroblasten. Die cDNAs aus + und - RT werden jeweils in den Verdünnungen 1:1, 1:10 und 1:100 in die PCR-Reaktion eingesetzt und in dieser Reihenfolge auf das Gel aufgetragen. In diesem Gel ist bei +RT 1:10 ein Pipettierfehler passiert.

3.2. DNA-Amplifikation mittels Genomphi

Um die cDNA mit FISH auf Metaphasechromosomen oder Interphase-Zellkernen nachweisen zu können, muss zunächst eine Amplifikation, dann eine Markierung der cDNA stattfinden. Für die Amplifikation wurde die Methode der Genomphi, für die Markierung die Nicktranslation verwendet und die Ergebnisse im Folgenden dargestellt.

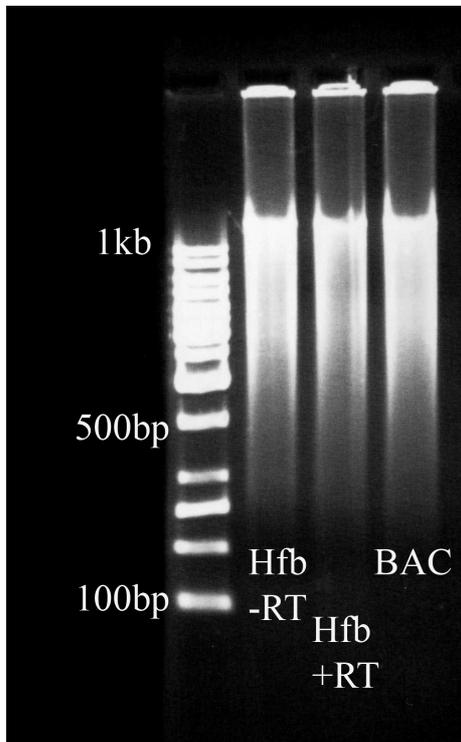


Abb. III.3.7.: Beispiel Gel für eine geglückte Genomphi-Reaktion. Als Größenstandard wird ein 1 kb-Marker verwendet. Es zeigt sich ein DNA-Schmier in einem Bereich von 2 kb-200 bp, der keinen nennenswerten Unterschied zwischen + und -RT zeigt, weiterhin zeigt sich kein Unterschied zwischen cDNA und BAC-DNA.

Von der, mit Genomphi amplifizierten, cDNA werden 2 µl in die Nicktranslation eingesetzt. Nach Ablauf der Nicktranslation wird die Größe der entstandenen Produkte auf einem Agarosegel überprüft, und, falls nötig, nochmals ein DNase-Verdau angesetzt um die Produkte in die für FISH günstigere Größe (500 bp-200 bp) zu bringen.

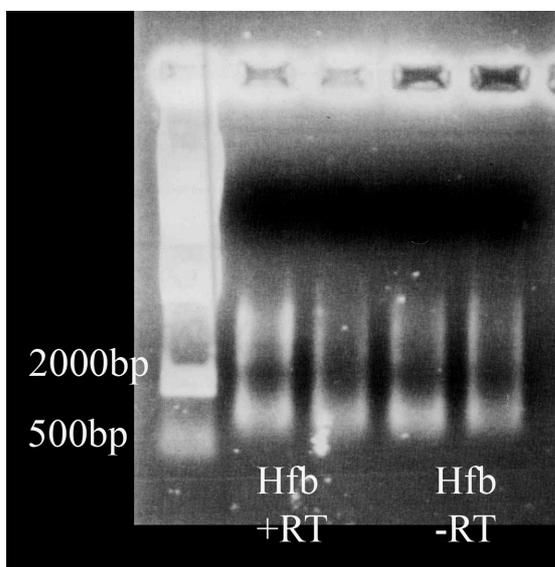


Abb. III.3.8.: Beispiel-Gel für eine Nicktranslation aus + und -RT-Ansätzen aus Fibroblasten cDNA (jeweils 2 Spuren). Als Größenstandard wird ein λ -Marker verwendet. Die hier gezeigten Produkte sind für die Verwendung in der FISH noch etwas zu lang.

Aus den Produkten der Nicktranslation werden zusammen mit einer Kontroll-Sequenz (z.B. BAC-DNA oder Chromosomen-Paint, die bereits getestet sind und in der Hybridisierung gut funktionieren) Hybmixe hergestellt und zunächst auf Metaphase-Präparaten hybridisiert. Nach der Detektion der Signale werden die Präparate unter dem Epifluoreszenzmikroskop betrachtet und Bilder der einzelnen Farbkanäle aufgenommen.

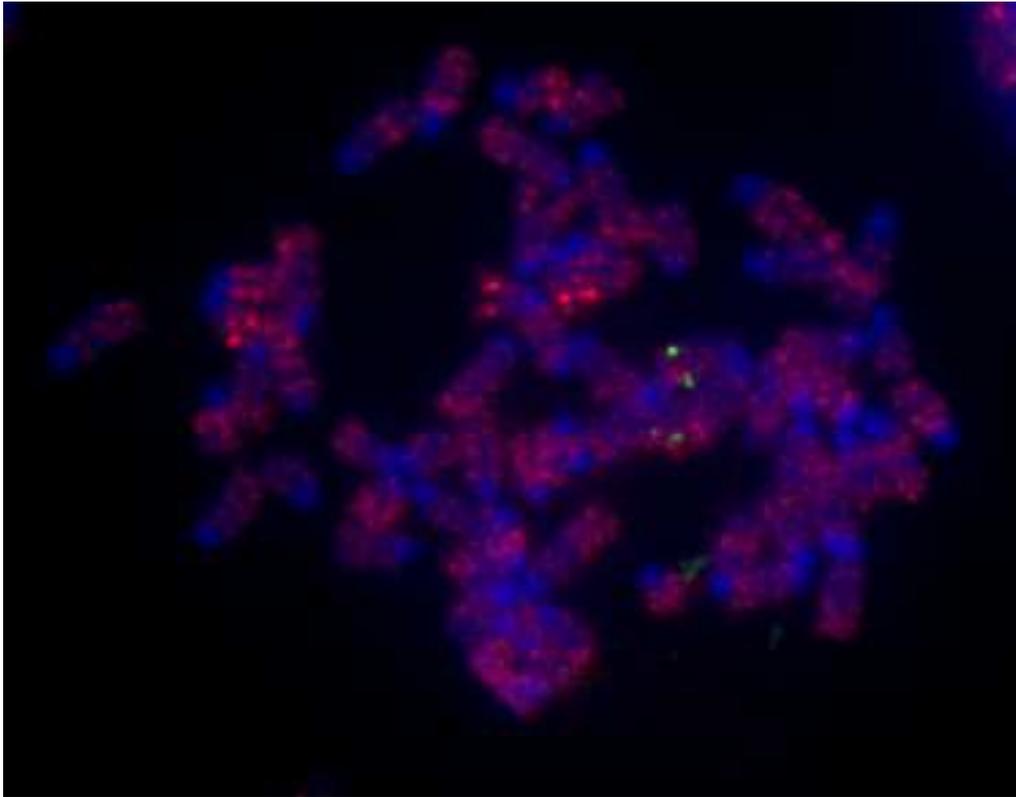


Abb. III.3.9.: +RT
Sonde aus
differenzierten
MEL-Zellen auf
Maus-Metaphase-
Chromosomen. Es
sind deutliche
Signale im Bereich
der
Chromosomenarme
zu erkennen.
Blau: DAPI, Rot:
komplexe Sonde,
Grün: BAC als
Hybridisierungskon-
trolle.
Überlagerung der
einzelnen
Farbkanäle

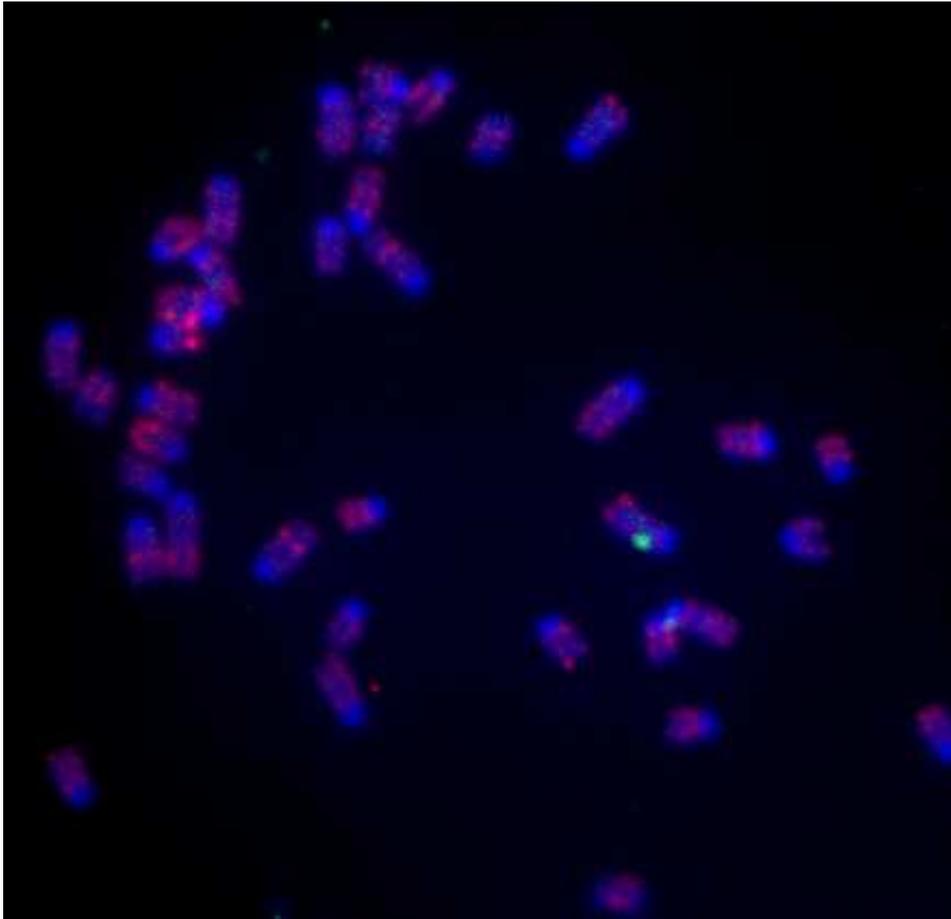
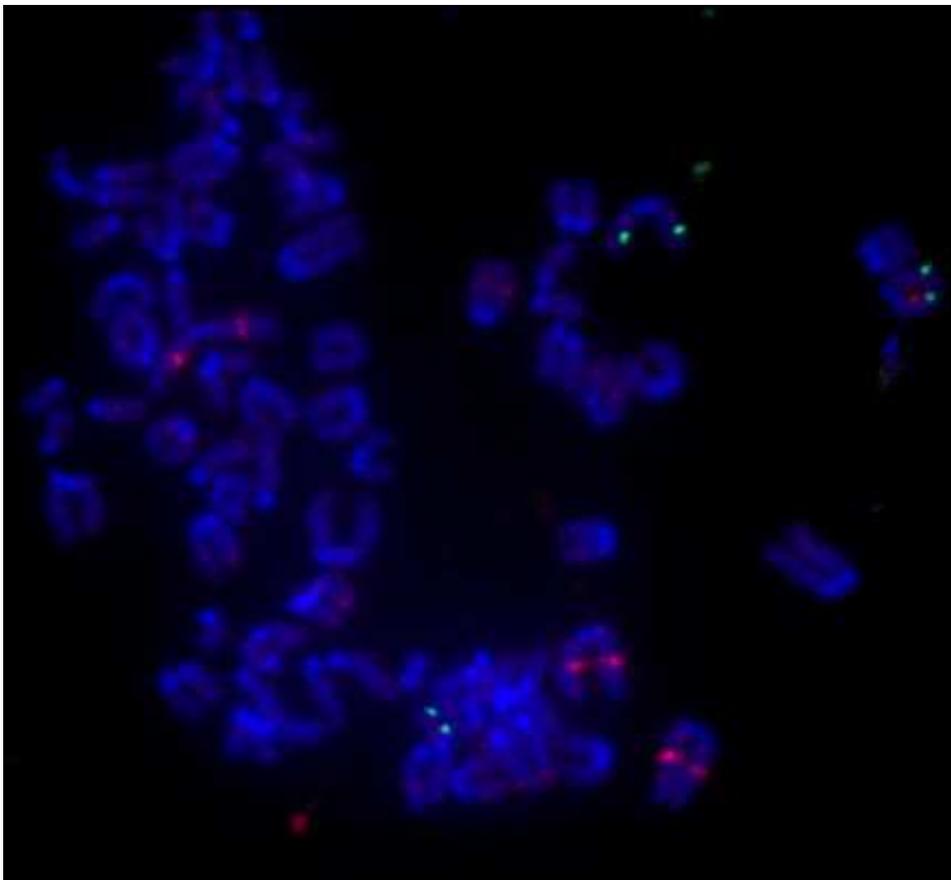


Abb. III.3.10.:
a) +RT-Sonde aus differenzierten MEL-Zellen auf Maus-Metaphase-Chromosomen. Es sind deutliche Signale im Bereich der Chromosomenarme zu erkennen.



b) –RT Kontrolle aus differenzierten MEL-Zellen auf Maus-Metaphase-Chromosomen. Es sind nur einzelne Signale erkennbar, bei denen es sich, auch aufgrund der Signalpositionen, um rRNA Gene handeln könnte.
Blau: DAPI, Rot: komplexe Sonde, Grün: BAC als Hybridisierungskontrolle.
Überlagerung der einzelnen Farbkanäle

Dieselbe Vorgehensweise wurde dann auch an cDNA aus menschlichen Fibroblasten getestet. Auch hier zeigte sich ein ähnliches Ergebnis:

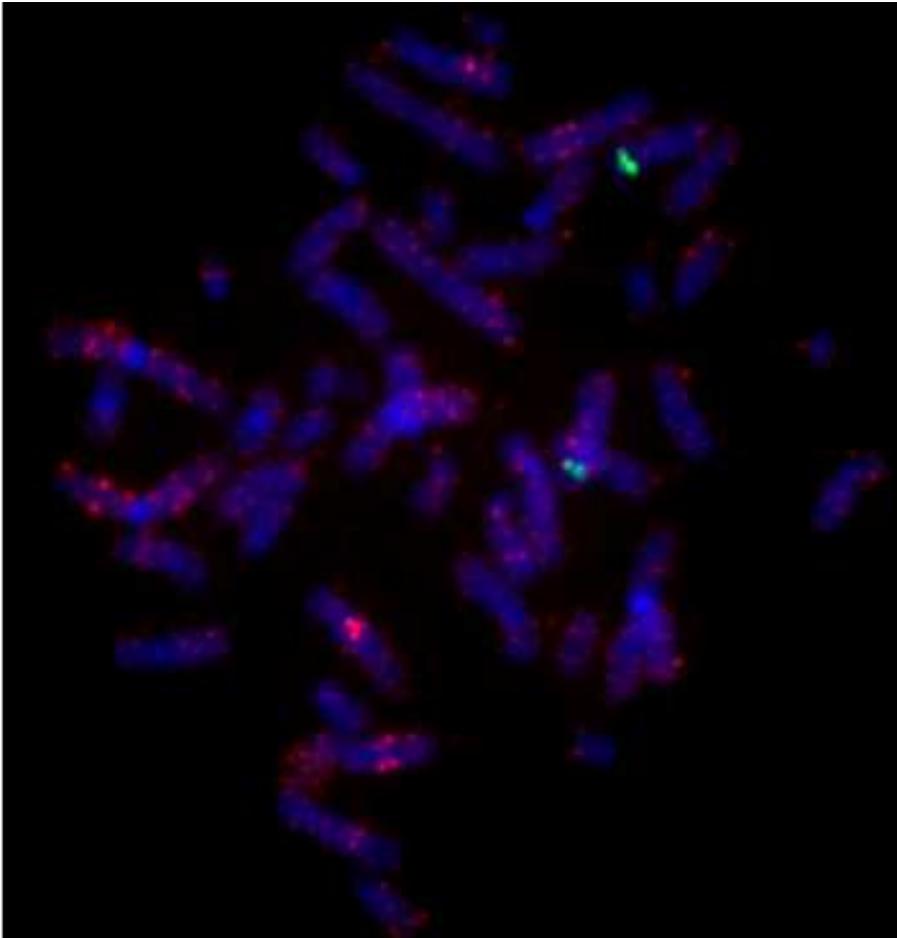
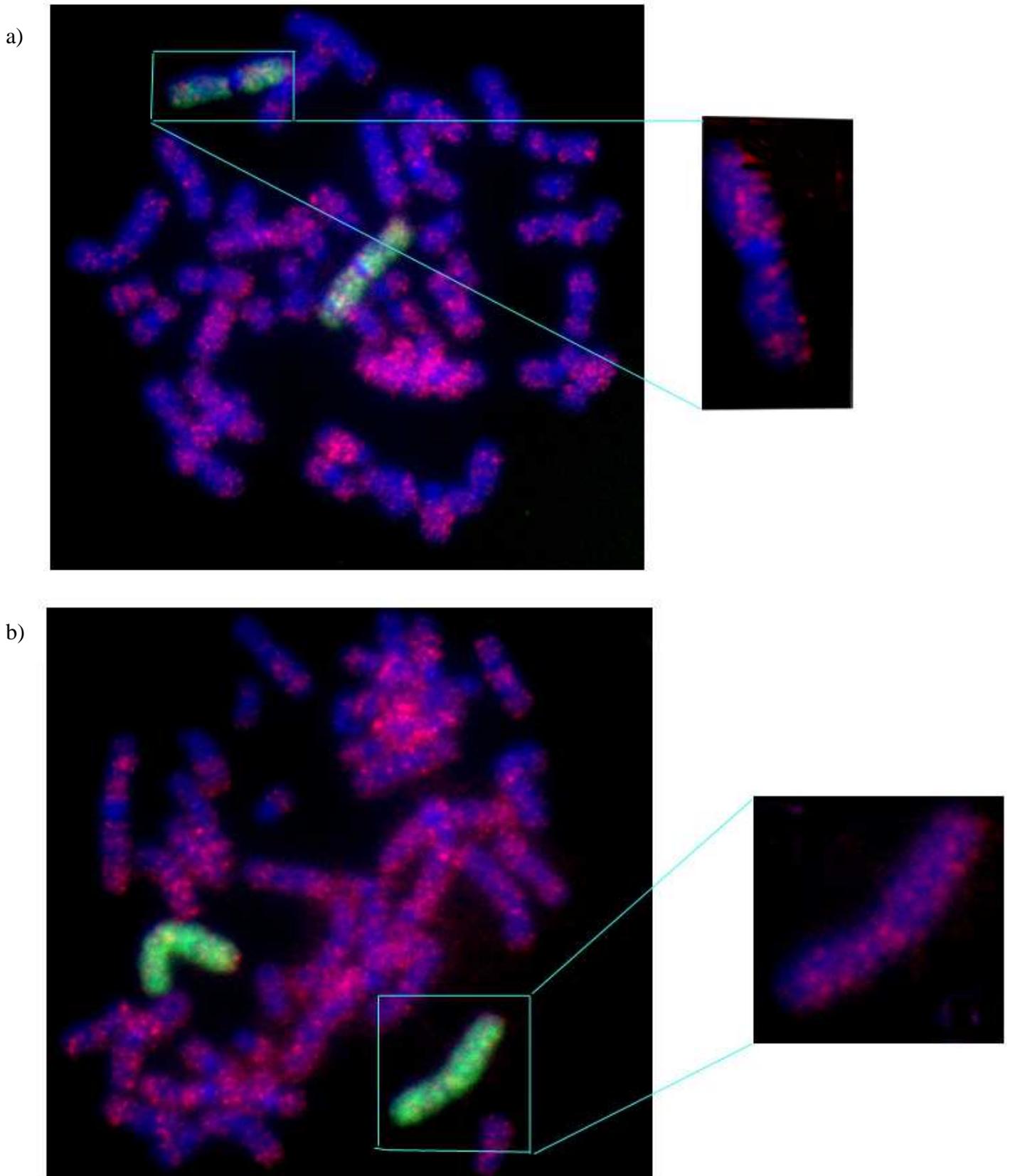


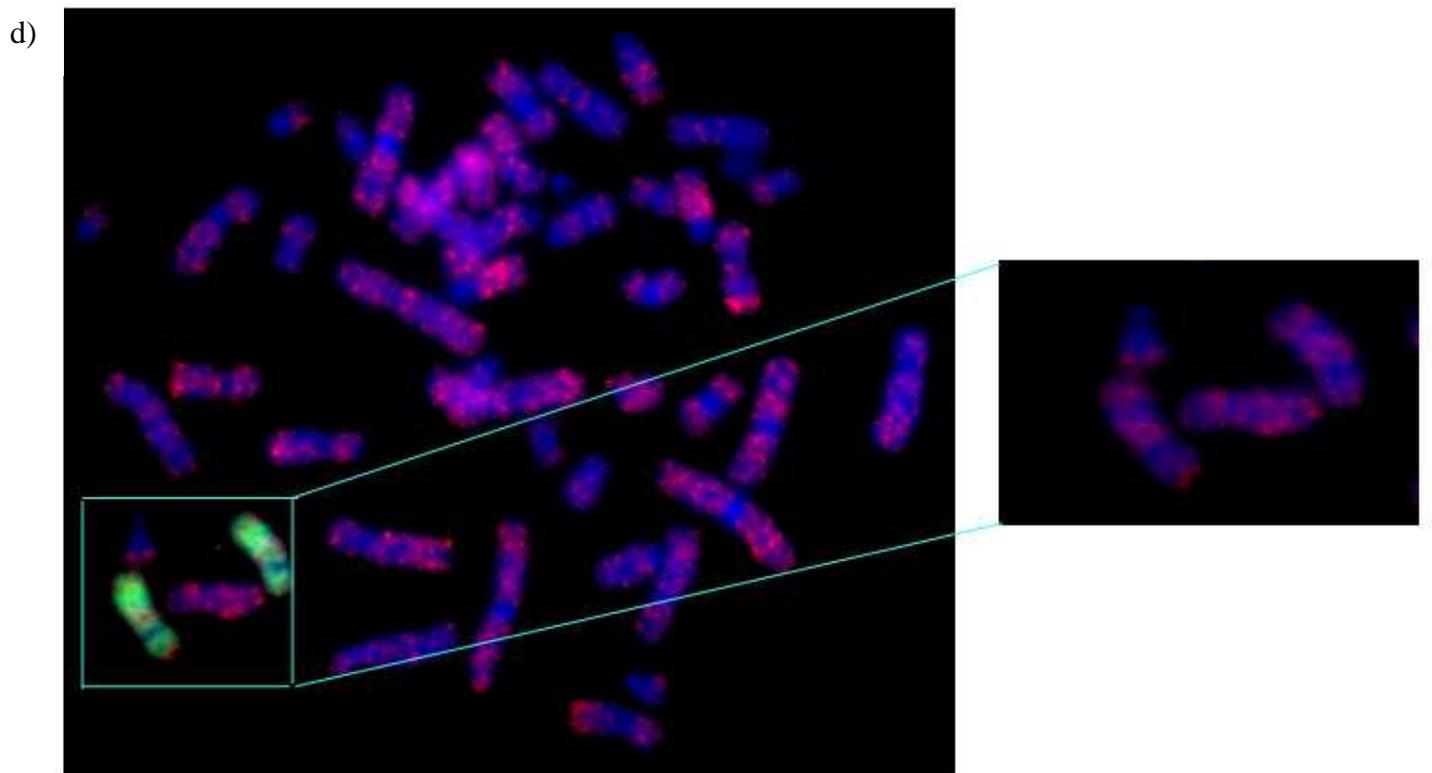
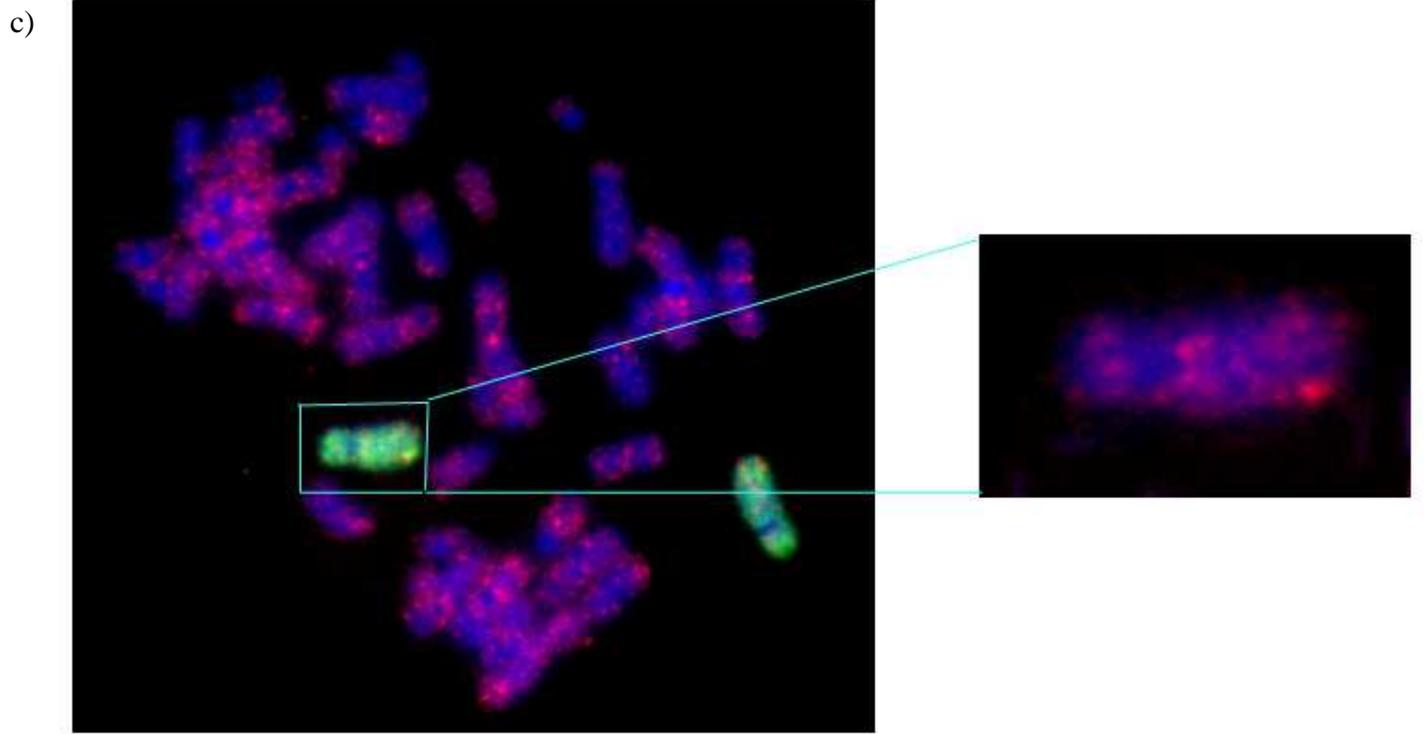
Abb. III.3.11.:
komplexe Sonden aus
humanen Fibroblasten
(rot) auf Metaphase-
Chromosomen (blau).
BAC als
Hybridisierungskon-
trolle (grün).

Im Anschluss an diese ersten Vorversuche, die den Erwartungen entsprechend verlaufen waren, wurde getestet, ob sich menschliche Chromosomen mit Hilfe der komplexen Sonden „bändern“ lassen, wie es z.B. auch für Alu-Sonden der Fall ist. Für die komplexen Sonden müssten sich Bänderungen entsprechend der Gendichte und der Genexpression der Chromosomen ergeben.

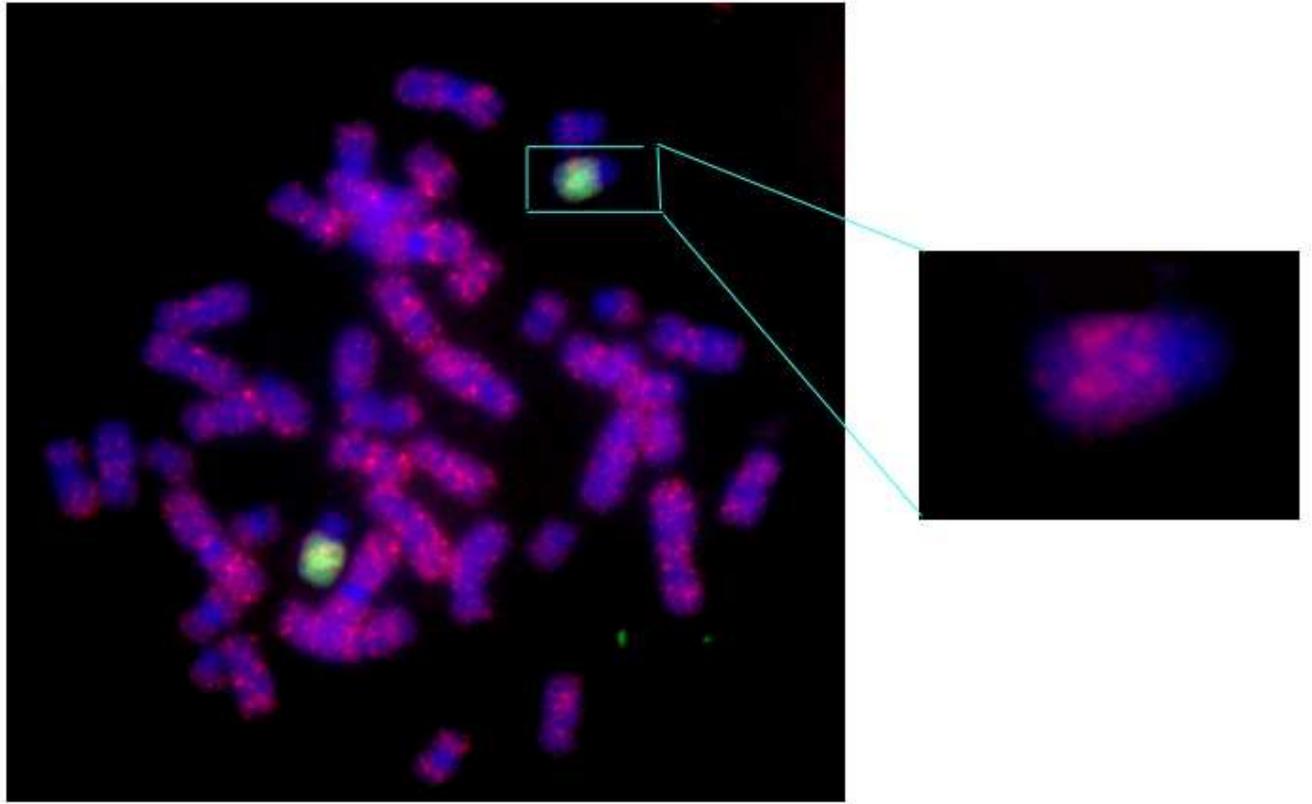
Abb. III.3.12.: Bänderungsmuster einiger menschlicher Chromosomen mit cDNA aus Fibroblasten. a) Chromosom 1, b) Chromosom 2, c) Chromosom 5, d) Chromosom 12, e) Chromosom 15, f) Chromosom 20.

Blau: DAPI-Färbung der Chromosomen, grün: Chromosomen-Paints, rot: komplexe Sonde

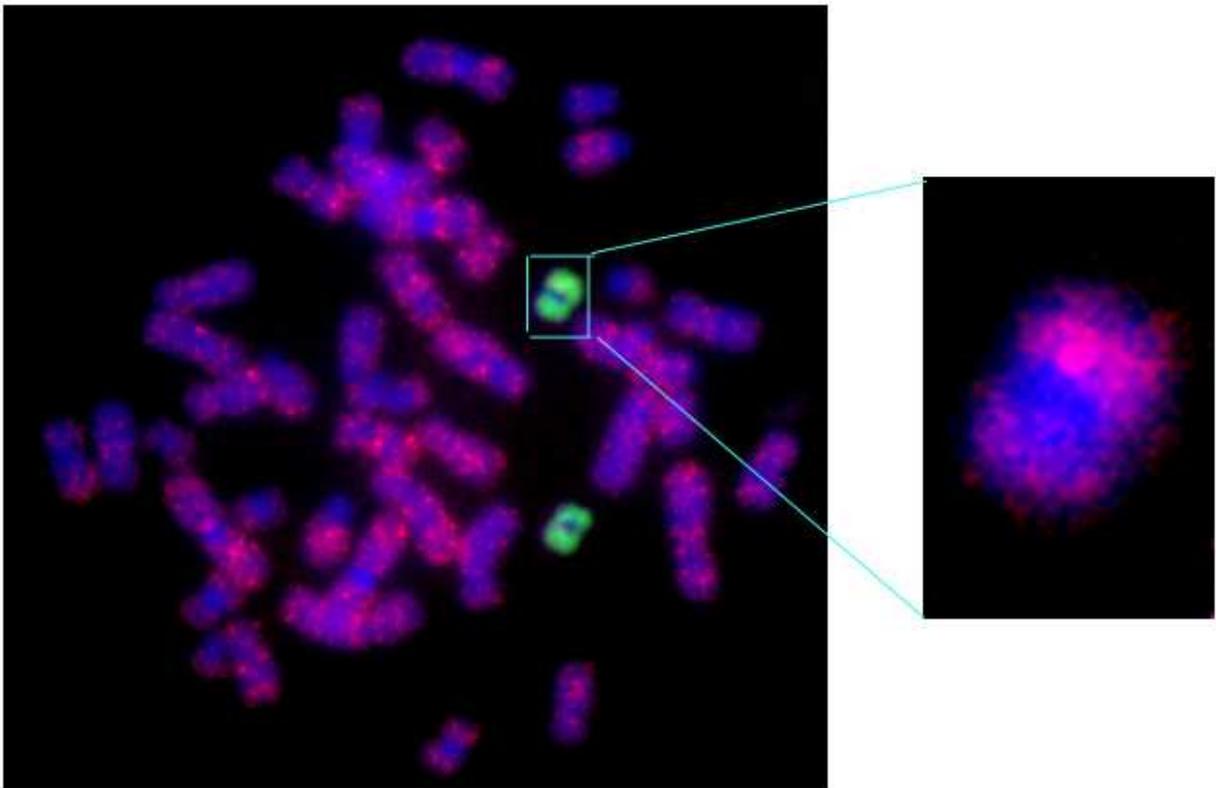




e)



f)



Eine weitere Überlegung war, dass sich die komplexen Sonden aus zwei sehr verschiedenen Zelllinien im entstehenden Bänderungsmuster zumindest zum Teil unterschiedlich sein müssten, dass jedoch auch Bereiche auftreten sollten, die von den komplexen Sonden gleichmäßig angefärbt werden sollten, nämlich die Bereiche, in denen die Haushaltsgene lokalisieren.

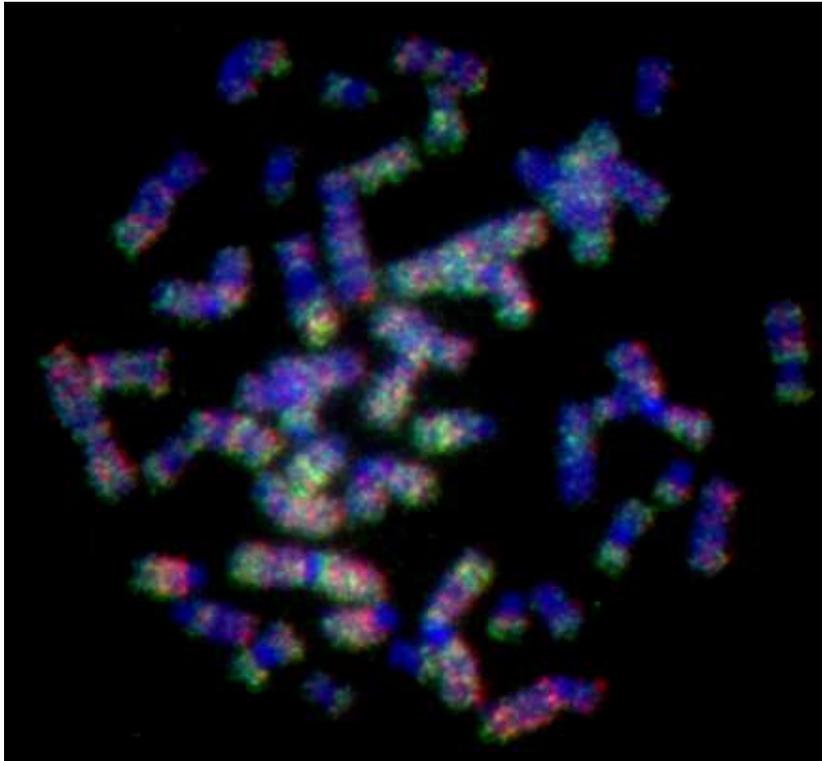
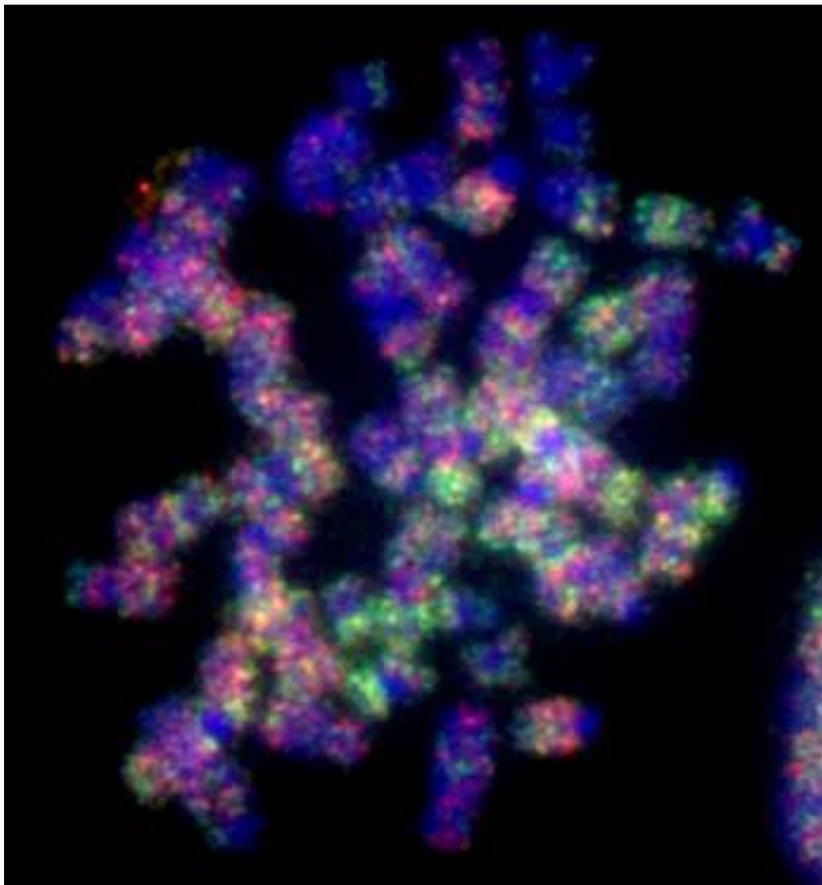


Abb. III.3.13.: Gleichzeitige Hybridisierung von cDNA aus humanen Fibroblasten und Lymphozyten auf Metaphase-Chromosomen.

Die meisten Bereiche sind von beiden komplexen Sonden gleichmäßig angefärbt, zelltyp-spezifisch angefärbte Bereiche sind mit dieser Auflösung nicht zu erkennen. Blau: Metaphase-Chromosomen, Grün: cDNA aus humanen Fibroblasten, Rot: cDNA aus humanen Lymphozyten.



Ebenfalls wurde eine Hybridisierung der komplexen Sonden auf 3D-fixierten Interphase Zellkernen menschlicher Fibroblasten und Lymphozyten durchgeführt. Die Signale der komplexen Sonden liegen dabei zum größten Teil in der Zellkernmitte.

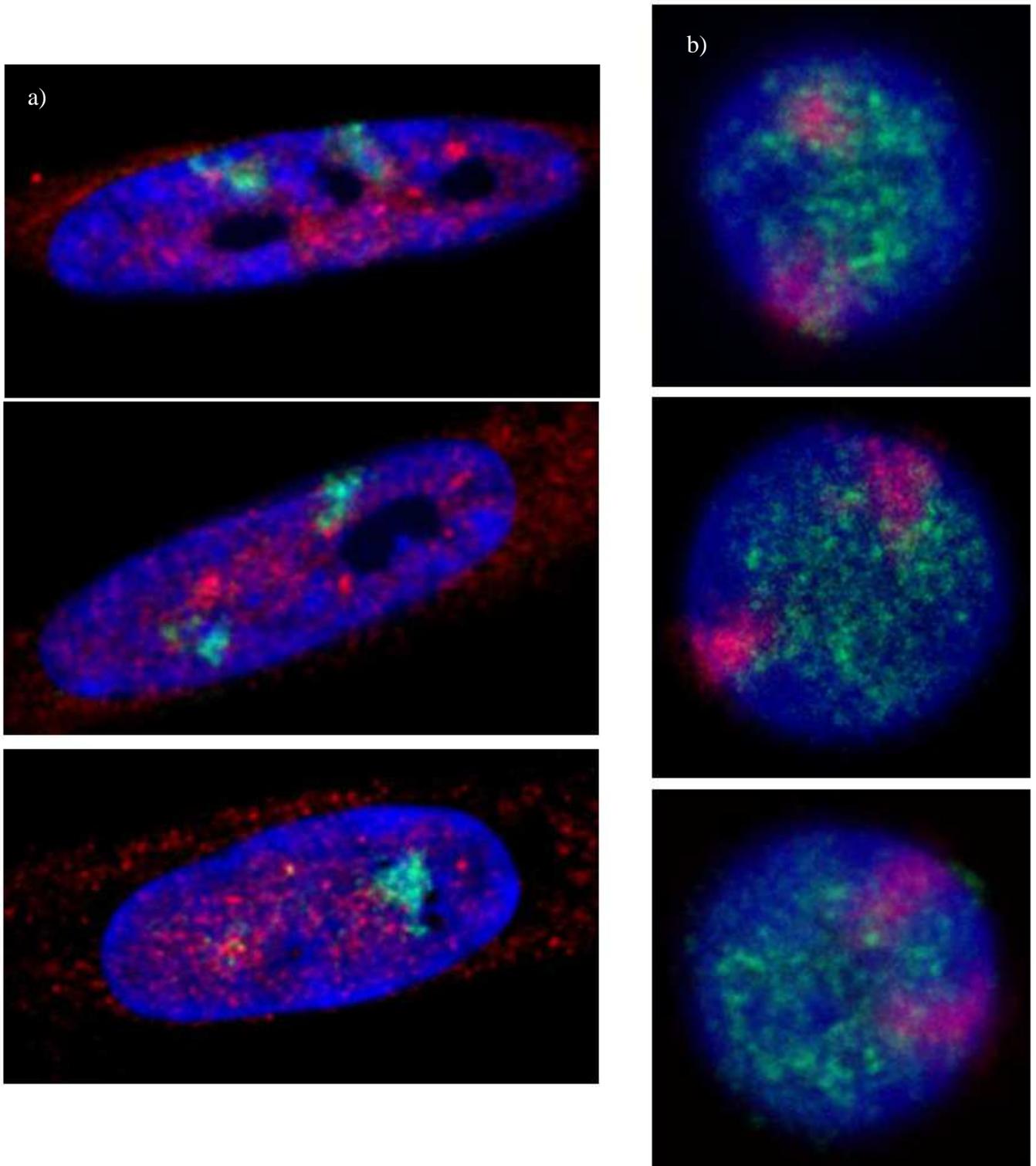


Abb. III.3.14.: 3D-Hybridisierung komplexer Sonden auf a) menschliche Fibroblasten-Zellkerne und b) menschliche Lymphozyten-Zellkerne. a) Blau: DAPI-Gegenfärbung, Grün: #12-paint, Rot: Komplexe Sonde; b) Blau: DAPI-Gegenfärbung, Grün: Komplexe Sonde, Rot: #12-paint

Im Anschluss an diese Versuche sollten komplexe Sonden aus undifferenzierten und differenzierten HL-60-Zellen gewonnen und durch gleichzeitige Hybridisierung miteinander verglichen werden, um festzustellen, ob sich Unterschiede im Expressionsmuster vor und nach der Differenzierung ergeben. Dabei ergab sich jedoch das Problem, dass, sowohl für Sonden aus undifferenzierten als auch aus differenzierten Zellen, in der Negativkontrolle (-RT) annähernd genauso viel Signal zu sehen war, wie im normalen +RT-Ansatz (s. Abb. III.3.15.)

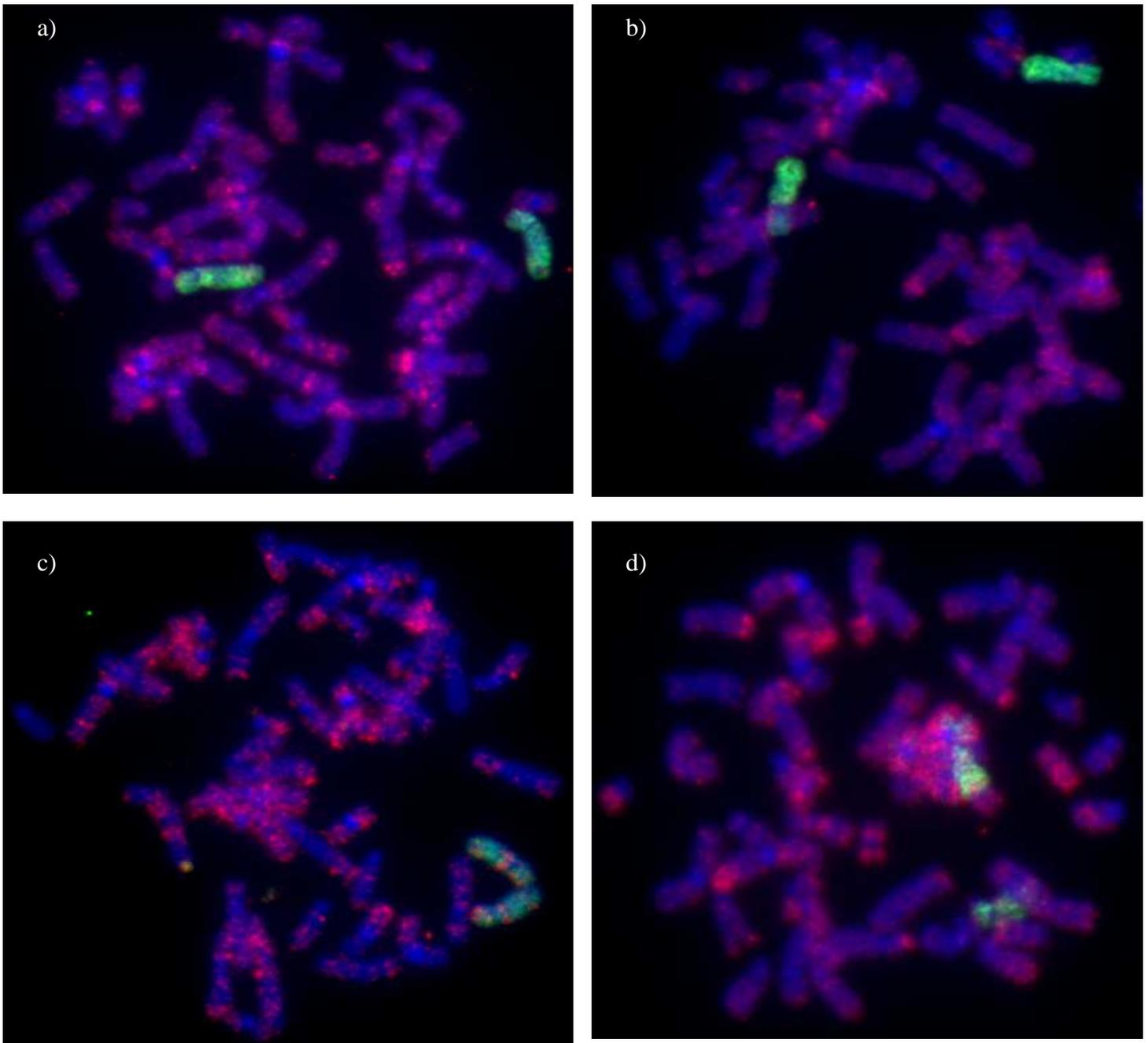


Abb. III.3.15.: Komplexe Sonden aus HL-60-Zellen. a) undifferenziert +RT, b) undifferenziert -RT, c) differenziert +RT, d) differenziert -RT. Blau: Metaphase Chromosomen, Rot: Komplexe Sonde, Grün: #12-Paint.

Um sicherzugehen, dass es sich bei den Signalen in der Negativkontrolle nicht um DNA-Verunreinigungen der RNA handelt, wurde nach der RNA-Isolation ein DNase I Verdauung durchgeführt, und die RNA mittels des RNeasy-Kits von Qiagen von den DNA-Fragmenten und Nukleotiden befreit.

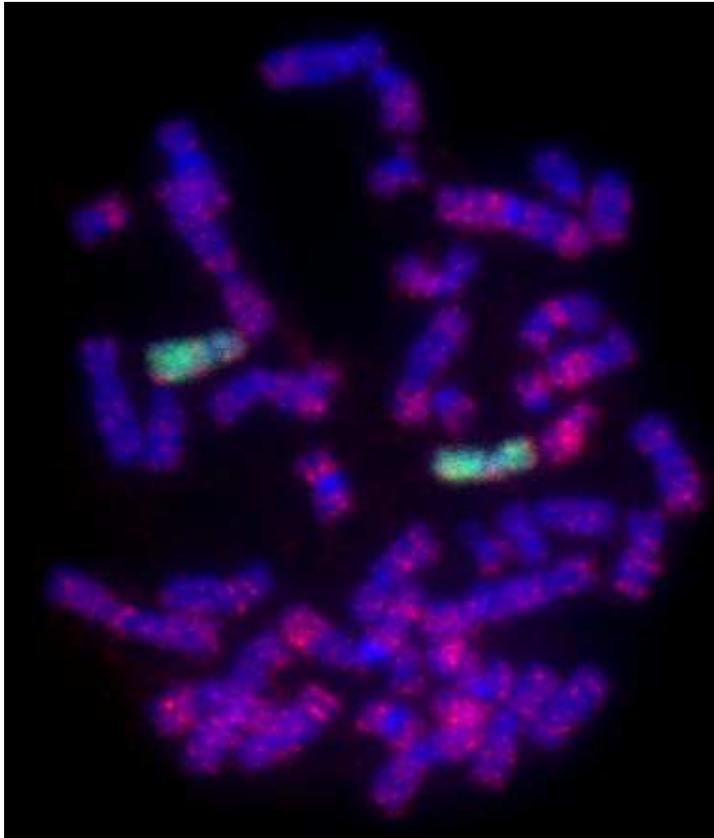
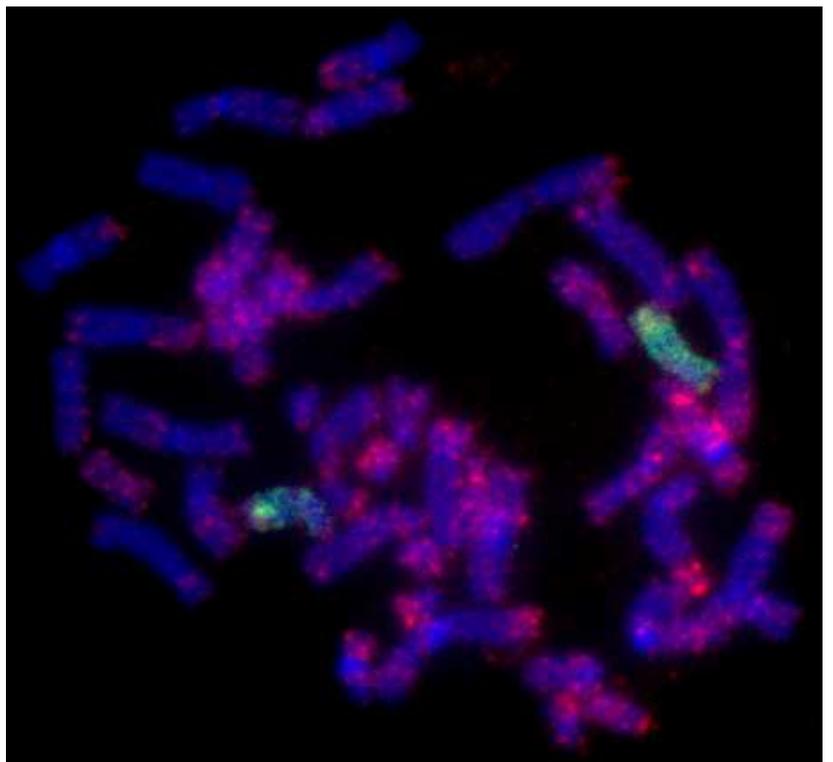
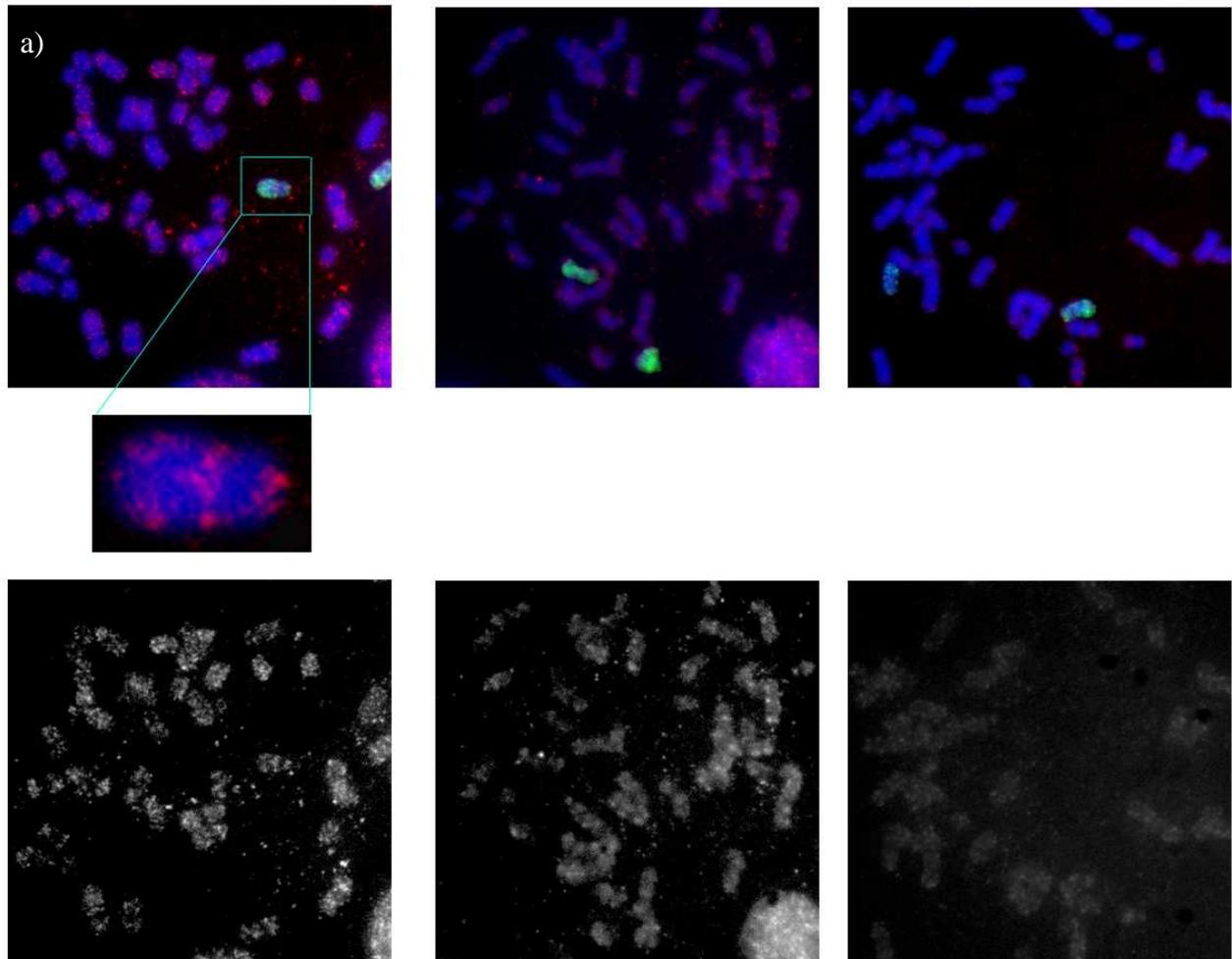


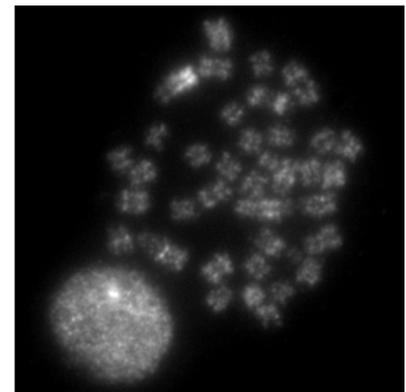
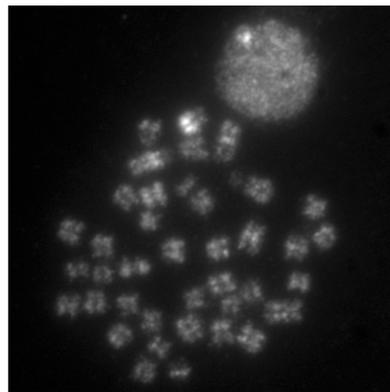
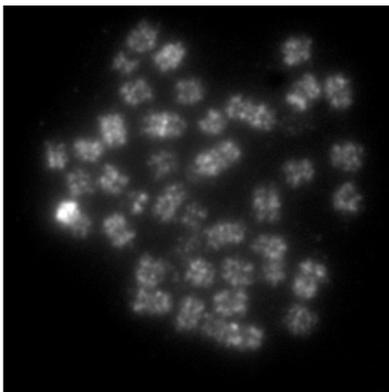
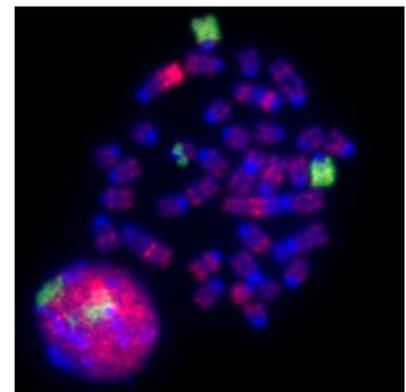
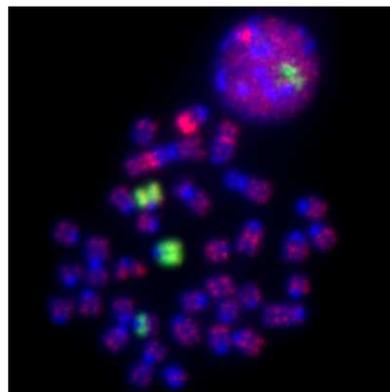
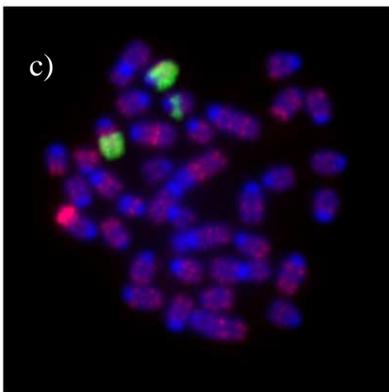
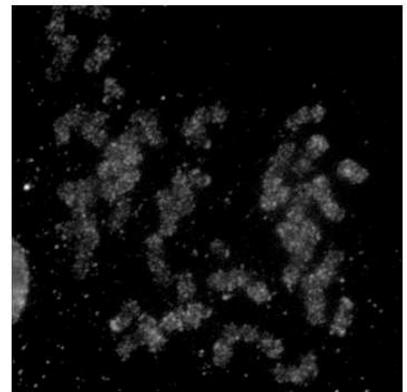
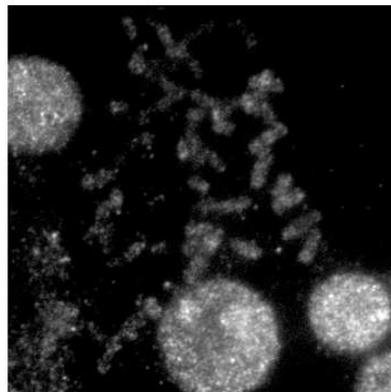
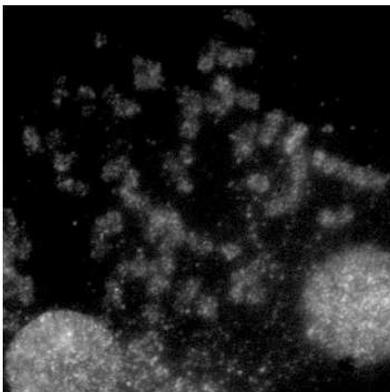
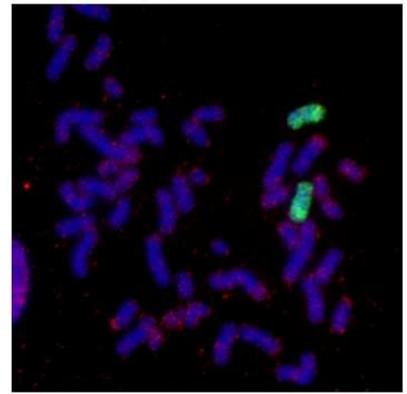
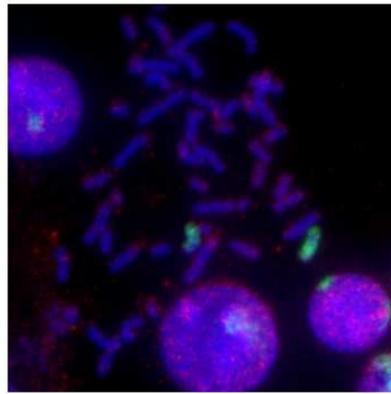
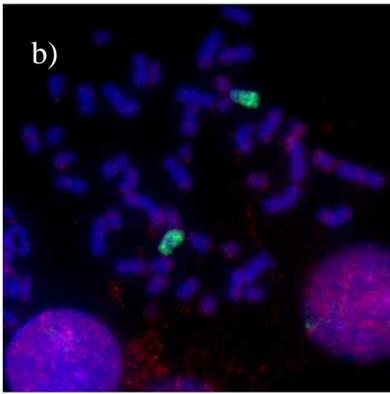
Abb. III.3.16.: +RT Ansatz aus undifferenzierten HL-60-Zellen. RNA wurde vor der reversen Transkription mit DNase I behandelt und mit RNeasy Kit aufgereinigt. Blau: Metaphase Chromosomen, Rot: Komplexe Sonde, Grün: #12-Paint.

Abb. III.3.17.: -RT Ansatz aus undifferenzierten HL-60-Zellen. RNA wurde vor der reversen Transkription mit DNase I behandelt und mit RNeasy Kit aufgereinigt. Blau: Metaphase Chromosomen, Rot: Komplexe Sonde, Grün: #12-Paint.



Die Wiederholung der Versuche, mit frischer cDNA aus HL-60 und humanen Fibroblasten, wie auch aus differenzierten MEL-Zellen, auch viele Monate nach den ersten Versuchen, brachte keine Verbesserung. Die Negativkontrollen zeigten weiterhin ein fast genauso starkes Signal wie die +RT-Sonden, wie die Abbildung III.3.18. zeigt:





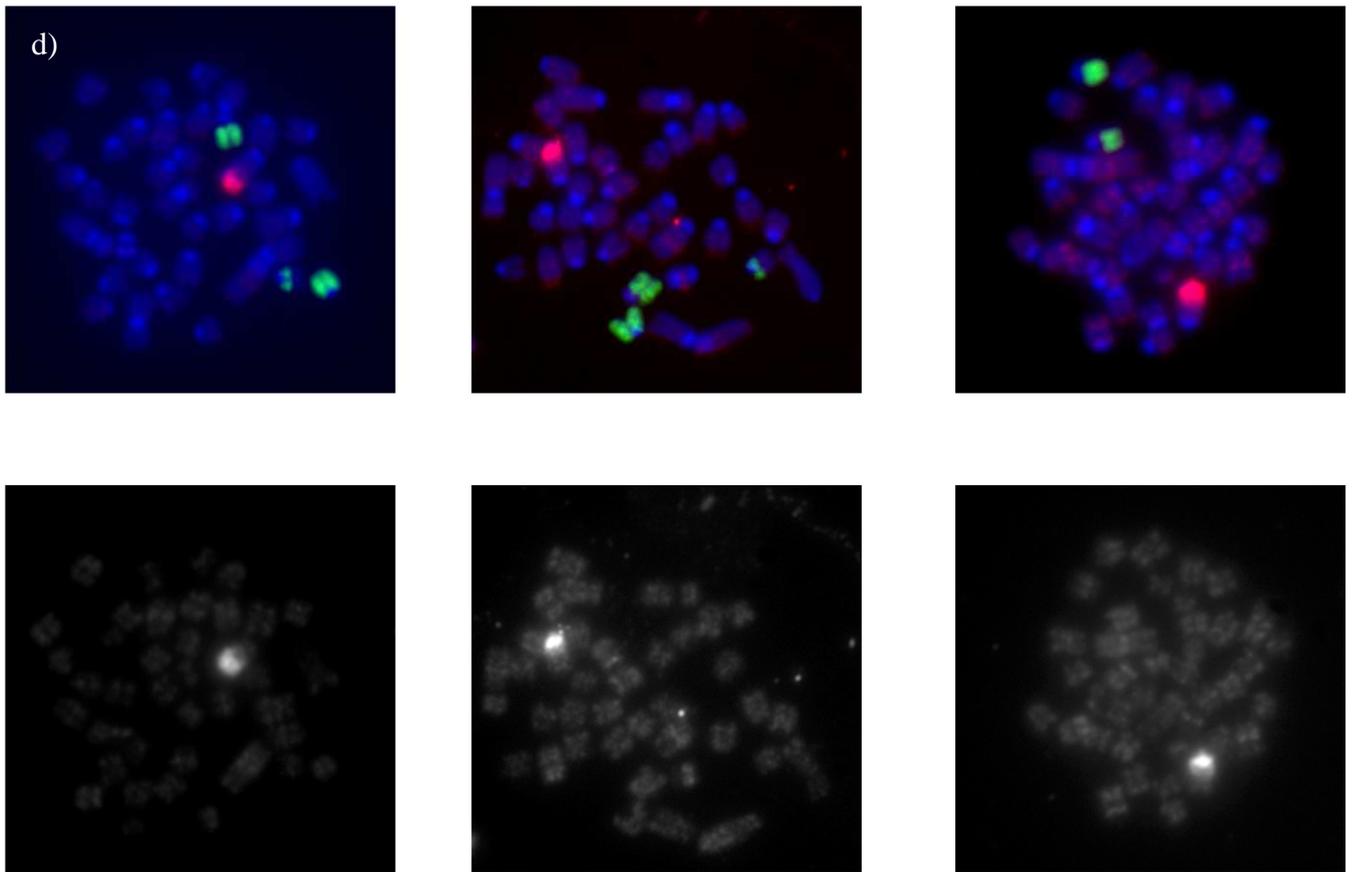


Abb. III.3.18.: Wiederholung der Herstellung von komplexen Sonden aus Mensch und Maus mit Genomphi und Nicktranslation. a) Humane Fibroblasten, +RT, b) Humane Fibroblasten –RT, c) MEL +RT, d) MEL –RT. Zur Verdeutlichung der Signalstärke von +RT und –RT-Sonden ist in der jeweils unteren Reihe der Farbkanal der komplexen Sonde als Graubild mit angefügt. Blau: Metaphase-Chromosomen, Rot: Komplexe Sonde, Grün: Chromosomen Paint (#12 Mensch, siehe auch vergrößerte Darstellung in a), #11 Maus).

3.3. DNA-Amplifikation mittels DOP-PCR

Die starken Signale in den Negativkontrollen führten zu der Überlegung, ob durch die Genomphi evtl. Reste von RNA so sehr amplifiziert werden, dass es zu den Signalen in den Negativkontrollen kommt. Daher wurde, wie im Folgenden beschrieben, verschiedene Ansätze der DNA-Amplifikation mit DOP-PCR und verschiedenen Markierungsansätzen getestet. Hierfür wurde cDNA aus menschlichen Fibroblasten verwendet.

Zunächst wurde versucht die cDNA mittels primärer DOP-PCR zu amplifizieren und dann mit einer Label-DOP-PCR zu markieren.

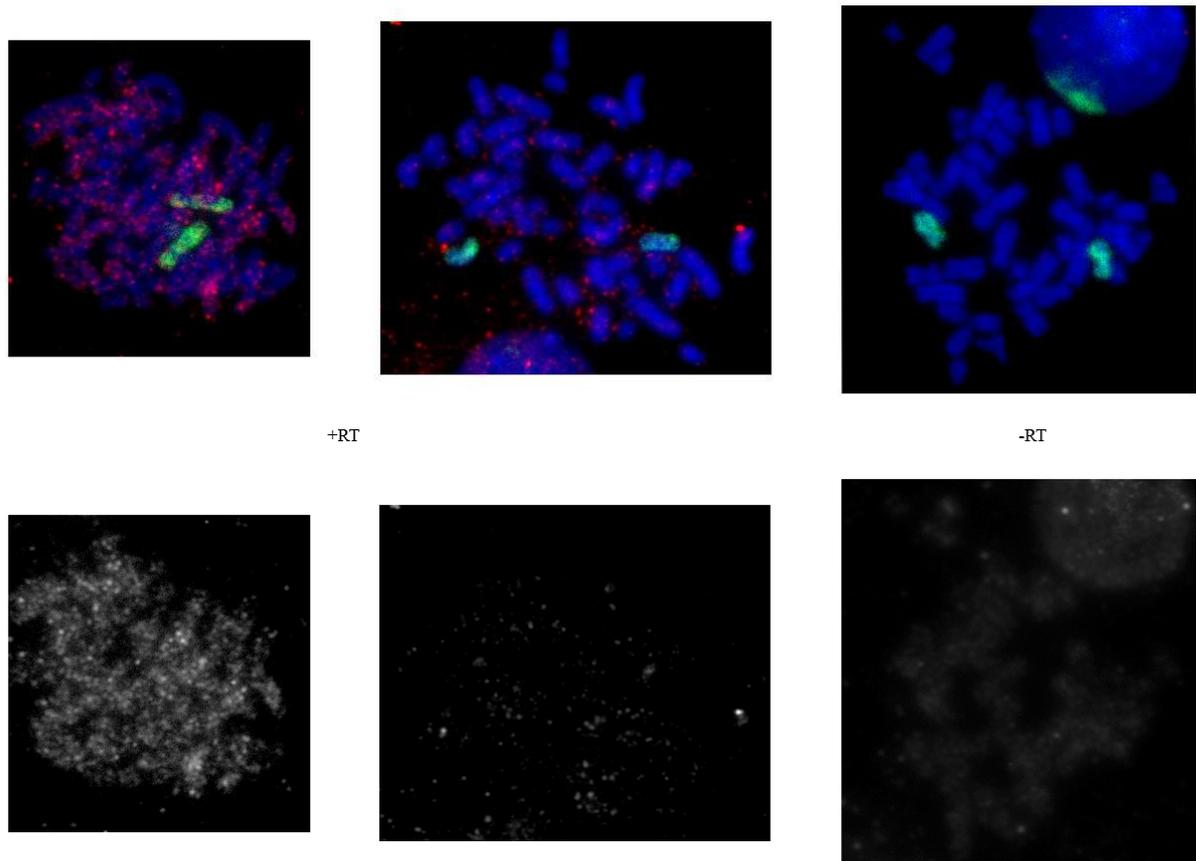


Abb. III.3.19.: cDNA-Amplifikation mit primärer DOP-PCR und Label DOP-PCR. Die ersten beiden Bilder zeigen +RT-Ansätze, das dritte Bild zeigt einen –RT-Ansatz. Blau: Metaphase-Chromosomen, Rot: Komplexe Sonde, Grün: #12-Paint. Die untere Reihe zeigt jeweils das Graubild des Farbkanals der komplexen Sonde.

Wie die Bilder in Abb. III.3.19. zeigen, ist die +RT-Sonde wenig konstant in der Signalstärke und gerade im Graubild der Negativkontrolle zeigt sich, dass auch hier Signal vorhanden ist, was lediglich in der Überlagerung der Farbkanäle wenig zum tragen kommt.

Als nächstes wurde versucht, das primäre DOP-PCR-Produkt über eine Quiagen-Säule aufzureinigen, bevor die Label-PCR durchgeführt wird, um übrige Primer und Nucleotide aus dem Ansatz herauszubekommen. In einem weiteren Schritt wurde auch das Produkt der Label-PCR über eine Quiagen-Säule aufgereinigt, bevor der Hybridisierungsmix angesetzt wird.

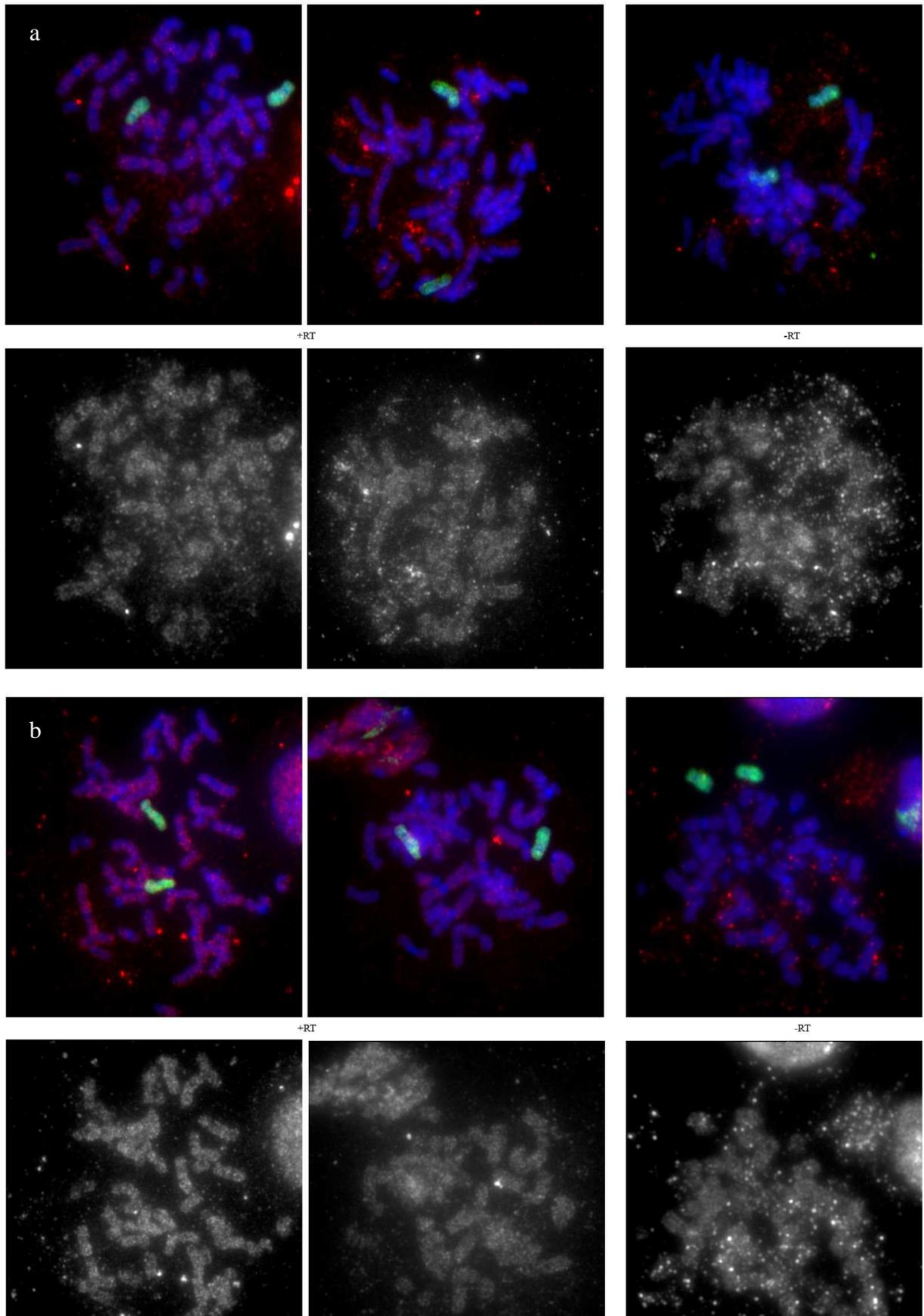


Abb. III.3.20.: Aufreinigung der Produkte aus Primärer DOP-PCR (a) und Label-DOP-PCR (b) über Quiagen-Säule. Blau: Metaphase Chromosomen, Rot: komplexe Sonde, Grün: #12-Paint. Die untere Bildreihe zeigt jeweils das Graubild des Farbkanals der komplexen Sonde.

Als weiteres Vorgehen wurde dann die cDNA, ohne vorhergehende Primäre DOP-PCR, einer Label-PCR unterzogen, um wieder einer zu starken Amplifikation von RNA oder Primern aus dem Wege zu gehen.

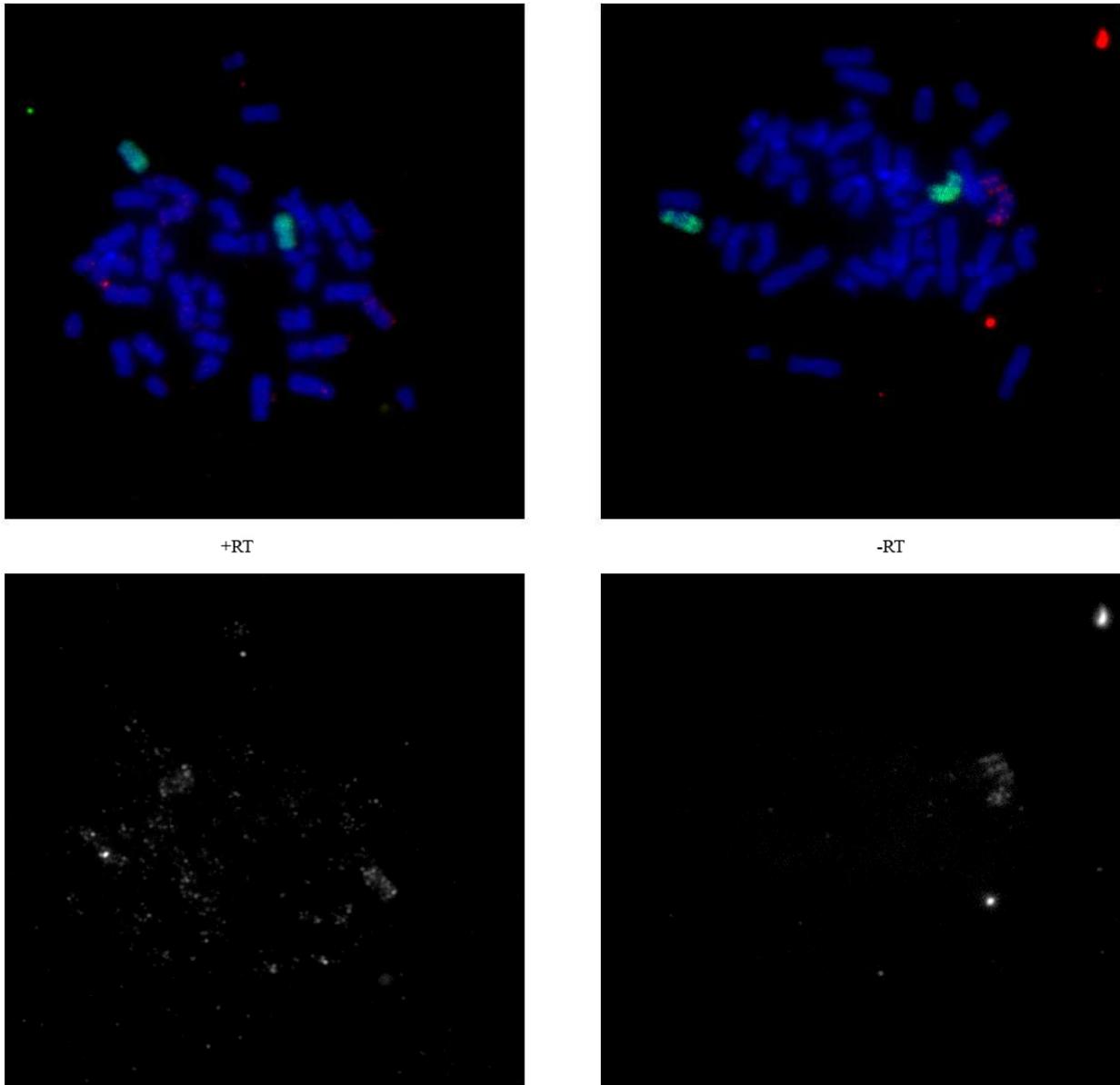


Abb. III.3.21.: Amplifikation der cDNA nur durch Label-PCR. Blau: Metaphase Chromosomen, Rot: komplexe Sonde, Grün: #12-Paint. Die untere Bildreihe zeigt jeweils das Graubild des Farbkanals der komplexen Sonde.

Bei Durchführung der Label-PCR ohne vorhergehende primäre Amplifikation scheint jedoch das Signal auch im +RT-Ansatz zu schwach zu werden, die Negativ-Kontrolle ist jedoch auch nicht völlig ohne Signal. Daher wurde die Überlegung angestellt, nach der primären DOP-

PCR eine Nicktranslation durchzuführen, um die Amplifikation während der Label-PCR zu umgehen.

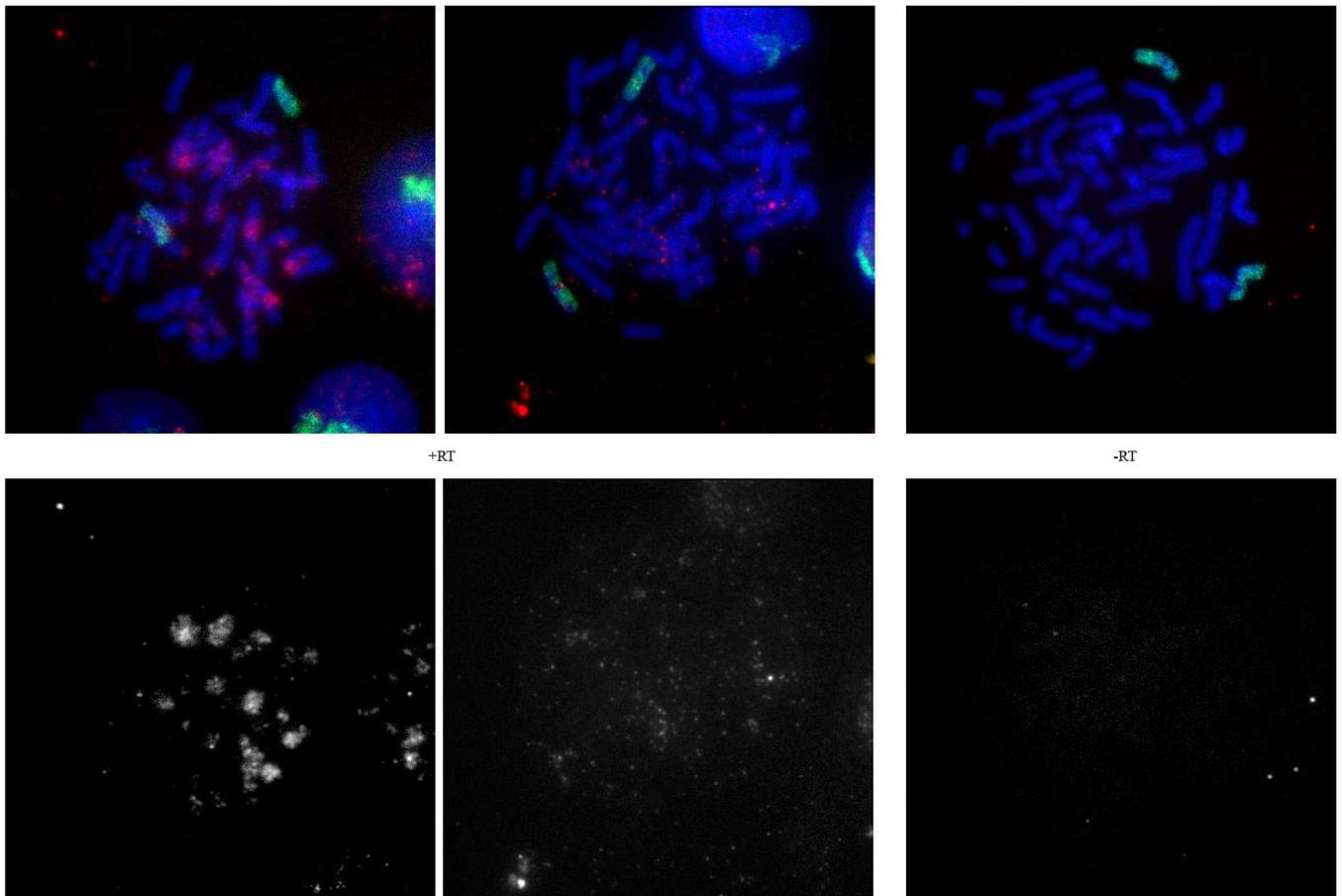


Abb. III.3.22. Durchführung von Nicktranslation nach primärer DOP-PCR. Blau: Metaphase Chromosomen, Rot: komplexe Sonde, Grün: #12-Paint. Die untere Bildreihe zeigt jeweils das Graubild des Farbkanals der komplexen Sonde.

Zuletzt wurde versucht die primäre DOP-PCR nur mit 5, 10, 15, 20 oder 25 hochstringenten Zyklen laufen zu lassen und danach die Label-PCR anzuschließen.

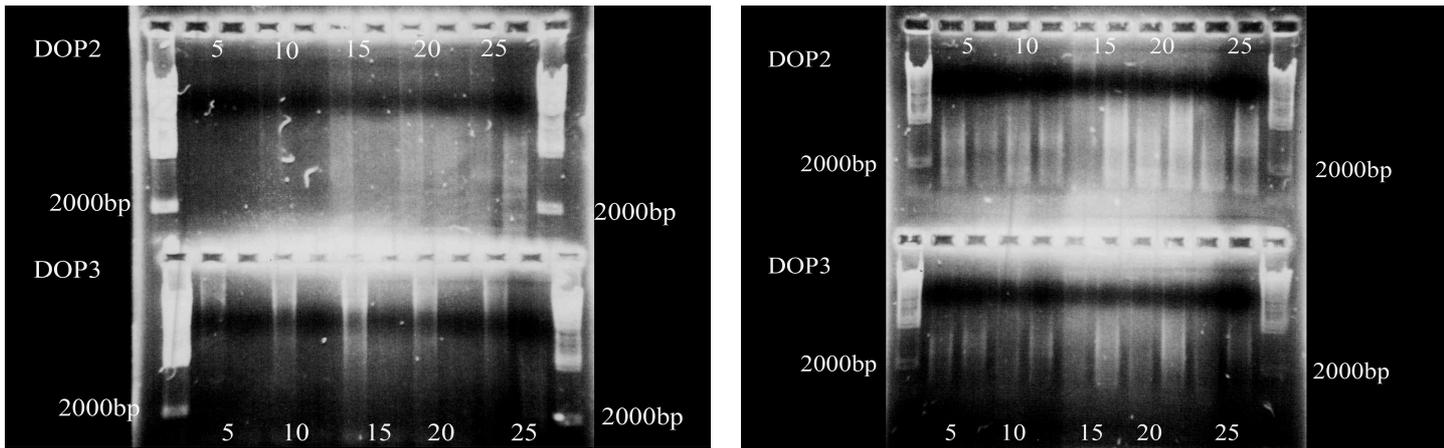


Abb. III.3.23.: Gele der primären (links) und Label-DOP-PCR (rechts). Es sind jeweils +RT und -RT in den Spuren nebeneinander aufgetragen. Die Zahlen oben bzw. unten geben die Anzahl der gefahrenen primären DOP-PCR-Zyklen an. Die -RT Negativkontrolle tritt in der primären PCR erst ab Zyklus 15-20 auf.

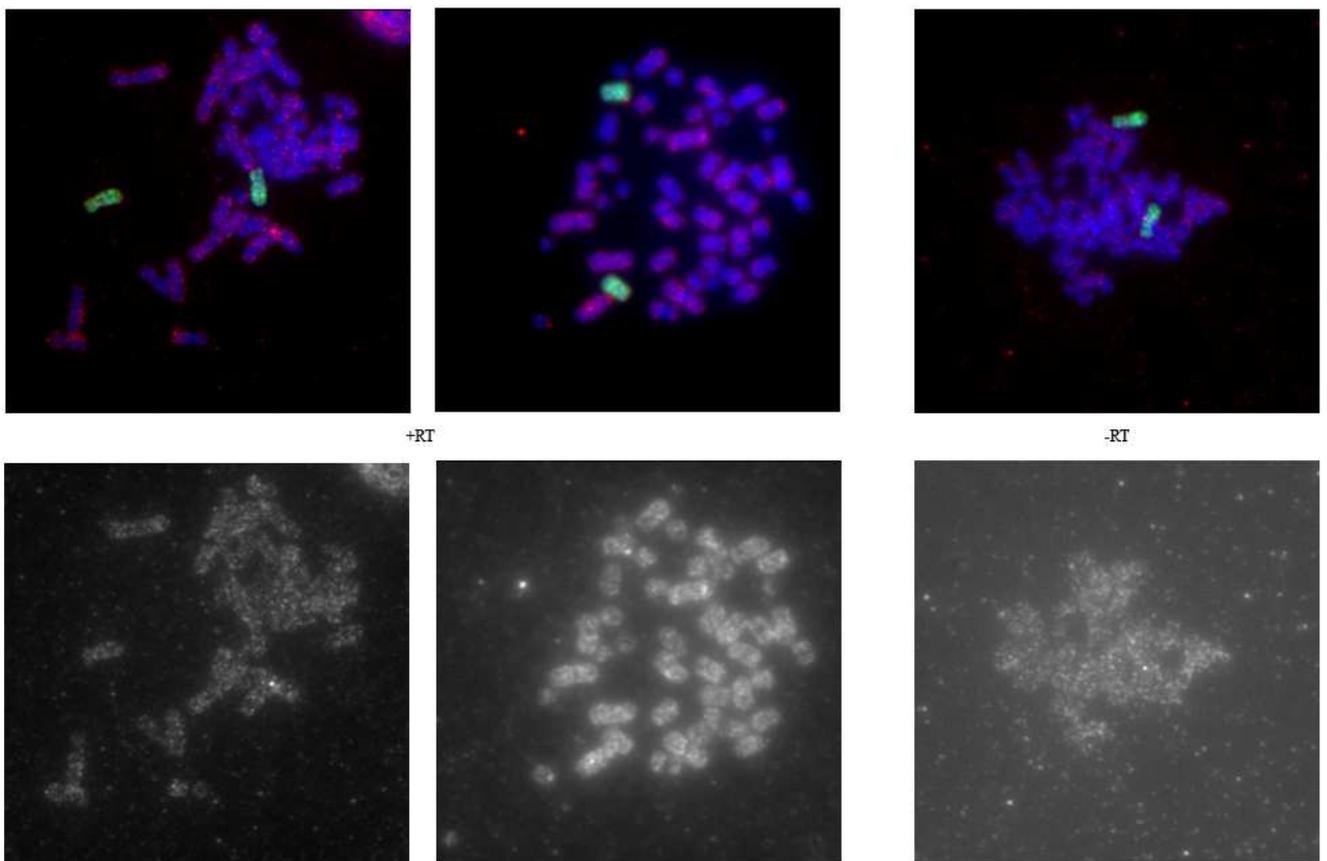


Abb. III.3.24.: 2D-Hybridisierung der mit 5 stringenten DOP-PCR-Zyklen hergestellten Sonden. Blau: Metaphase Chromosomen, Rot: komplexe Sonde, Grün: #12-Paint. Die untere Bildreihe zeigt jeweils das Graubild des Farbkanals der komplexen Sonde.

In der Hybridisierung zeigen sich bereits im Ansatz mit 5 Zyklen primärer DOP-PCR starke Signale in der Negativkontrolle, die eigentlich nicht einmal bei steigender Zyklenzahl zu erwarten sind.

Für die Maus wurden die Versuche nicht in dem Maße durchgeführt wie mit den menschlichen Sonden, jedoch sind auch keine abweichenden Ergebnisse zu erwarten, wie beispielhaft an einer Bildzusammenstellung einer komplexen Sonde der Maus, amplifiziert mit DOP-PCR und markiert mit Label-PCR, gezeigt werden soll (s. Abb. III.3.25.)

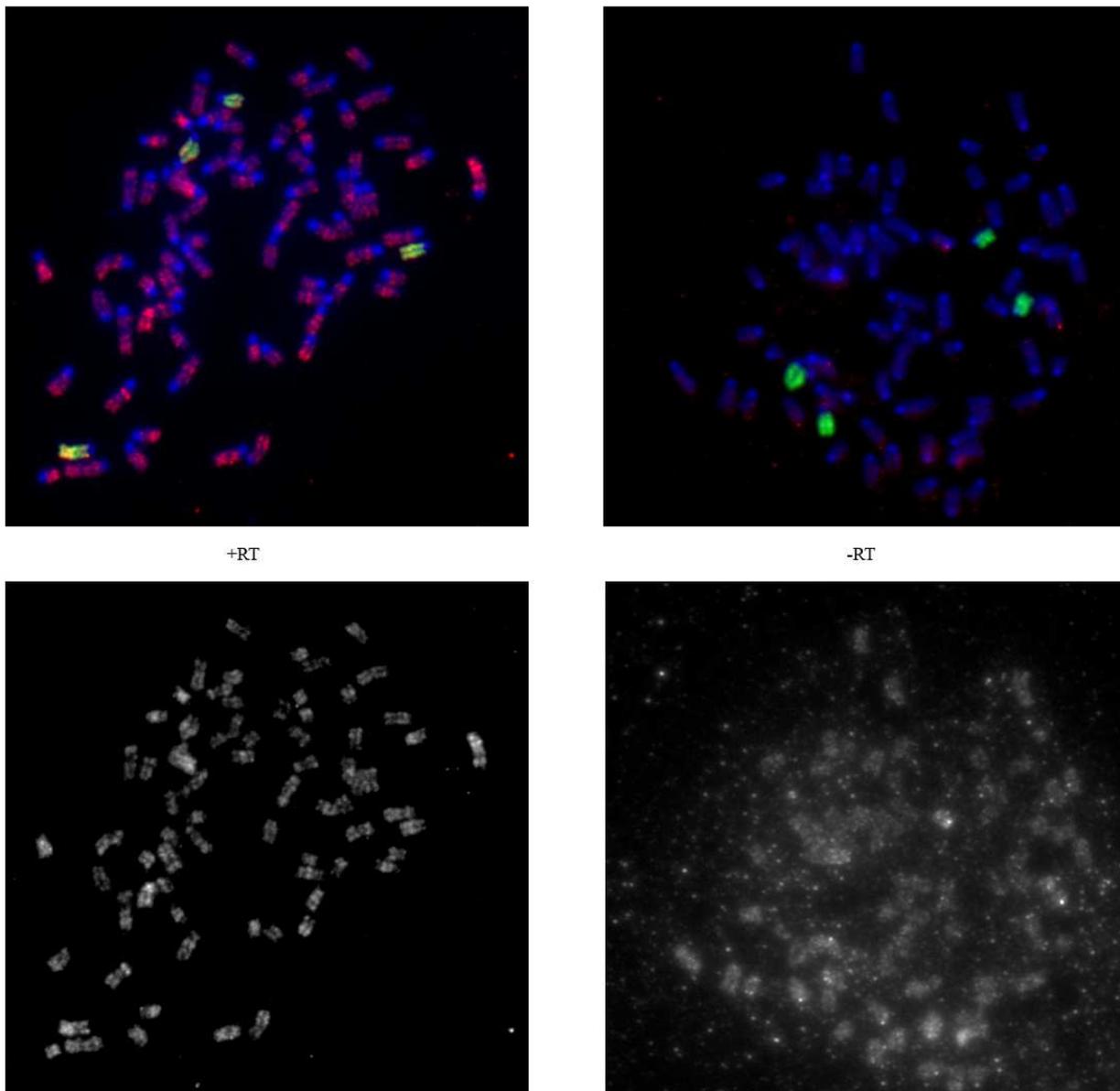


Abb. III.3.25.: Durchführung von primärer und label DOP-PCR mit cDNA aus differenzierten MEL-Zellen. Blau: Metaphase Chromosomen, Rot: komplexe Sonde, Grün: #11-Paint. Die untere Bildreihe zeigt jeweils das Graubild des Farbkanals der komplexen Sonde.

Nachdem das Problem der Negativkontrollen mit starkem Signal bereits in den 2D-Ansätzen, trotz aller Bemühungen und Versuche, nicht in den Griff zu bekommen war wurden keine weiteren 3D-Analysen durchgeführt.

IV. Diskussion

Wie auch im Ergebnisteil werden nun die drei großen Teilbereiche der Arbeit getrennt voneinander behandelt und später in der abschließenden Betrachtung zusammengeführt.

1. Genpositionierung nach CALM-AF10-Aktivierung

Wie schon der Ergebnisteil zu den CALM-AF10-Analysen lässt sich auch die Diskussion in mehrere thematisch zusammengehörende Punkte gliedern:

1. Induktion der Zellen
2. Vergleich verschiedener Methoden zur Messung der Genexpression
3. FISH-Experimente und deren Deutung im Zusammenhang mit den Eigenschaften der Region
4. Zusammenfassung und Ausblick

1.1. Induktion der Zellen

Die Induktion des, auf einem stabil transfizierten Plasmid vorliegenden CALM-AF10 Gens, kann über die gleichzeitige Induktion von GFP kontrolliert werden, da beide Gene unter der Kontrolle eines bidirektionalen Promotors stehen. Alle Zellen, in denen CALM-AF10 durch die Gabe von Doxycyclin angeschaltet wurde, sollten grüne Fluoreszenz zeigen. In unserem Labor konnte jedoch lediglich eine Induktionseffizienz von 40-50 % erreicht werden, was für spätere FISH-Experimente, bei denen dann lediglich induzierte Zellen betrachtet werden sollen, ungenügend ist, da die grüne Fluoreszenz während der FISH-Prozedur verloren geht. Da im Labor der AG Prof. Stefan Bohlander (Helmholtz-Zentrum München), in der die Zelllinie generiert wurde, eine Induktionseffizienz von 98-99 % erreicht wird, wurden uns freundlicherweise diese Zellen im induzierten Zustand zur Verfügung gestellt, was andere zeitaufwendigere Maßnahmen unnötig machte. Diese Effizienz ist ausreichend um nachher in der FISH davon ausgehen zu können, dass jede Zelle induziert war und somit einfach jede beliebige Zelle mit dem Konfokalmikroskop aufgenommen werden kann.

1.2. Vergleich verschiedener Methoden zur Messung der Genexpression

1.2.1. Affymetrix-Daten vs. Semiquantitative RT-PCR

Die Untersuchung der Genexpression mittels Affymetrix-Chips war bereits im Labor der AG Bohlander in mehreren Replikaten durchgeführt worden und die Daten wurden uns zur Verfügung gestellt. Anhand dieser Expressionslisten wurden Gene zur weiteren Untersuchung ausgewählt, die eine mindestens dreifache Änderung in der Expression vor und nach Induktion von CALM-AF10 mittels Doxycyclin aufwiesen. Die Expression der so ausgewählten Gene wurde dann noch mit der im Labor der AG Cremer bereits etablierten Methode der semiquantitativen RT-PCR überprüft.

Vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen wurde ein Test der Methode mit GAPDH durchgeführt. Dieses ubiquitär hoch exprimierte Haushaltsgen zeigt eine deutliche Bande bei 337 bp, was genau der spezifisch erwarteten Bande entspricht, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Methode als solches funktioniert.

Als nächstes sollte mit dieser Methode die Expression von CALM-AF10 gemessen werden. Erwartet hätten wir Banden lediglich in der Positiv-Probe der induzierten Zellen, jedoch zeigten beim ersten Versuch uninduzierte und induzierte Zellen deutliche, wenn auch mit 286bp spezifische Banden, zusätzlich traten die Banden auch in der Negativ-Kontrolle auf. Das wies auf eine starke Verunreinigung der RNA mit DNA hin, vor allem, da das untersuchte Gen auf dem, stabil in die Zelle transfizierten, Plasmid liegt und somit ein künstliches Gen ohne Introns ist. Weiterhin besteht natürlich gerade bei Plasmid-DNAs die Gefahr, dass sie mit der RNA ausgefällt werden (s. PeqLab-Handbuch). Im nächsten Versuch wurde daher vor der reversen Transkription eine DNase-Verdau durchgeführt und die RNA mittels Quiagen-System aufgereinigt. Mit dieser Behandlung wurden die Banden in uninduzierten Zellen und in den Negativkontrollen deutlich schwächer, verschwanden jedoch nicht ganz. Eine mit anderen Primern im Labor Bohlander durchgeführte RT-PCR brachte lediglich in der Positiv-Probe der induzierten Zellen die erwartete 552 bp-Bande, es kann also von einer gelungenen Induktion ausgegangen werden. Für unsere weiteren Experimente lässt sich daher schließen, dass ein DNase-Verdau vor der Durchführung weiterer PCRs unbedingt notwendig ist.

Im Folgenden wurden die von uns ausgewählten Gene untersucht. Dabei ist für IFI44, BIRC4BP und RAP1A eine schwache Hochregulation der Expression erkennbar, auffällig ist jedoch der Unterschied in den Bandenstärken zwischen GAPDH (Expression lt. Affymetrix um 8000) und RAP1A (Expression lt. Affymetrix 8070). So zeigt GAPDH in allen drei

cDNA- Verdünnungen deutliche Banden, für RAP1A sind nur in der Spur, für die unverdünnte cDNA verwendet wurde, schwache Banden zu sehen. Für IFITM1 ist keine besondere Änderung der Expression zwischen uninduzierten und induzierten Zellen zu sehen, möglicherweise kann man eher einen leichten Rückgang der Expression beobachten. Für die beiden herunterregulierten Gene, DEPDC1 und CENPE ist auf den Agarosegelen eher ein minimaler Anstieg in der Expression zu beobachten, für die beiden anderen herunterregulierten Gene konnte mittels semiquantitativer RT-PCR keine Aussage gemacht werden, da trotz wiederholter Versuche keine Banden auf den Gelen zu sehen waren. Möglicherweise ist die Expression dieser beiden Gene so gering, dass die RNA- bzw. cDNA-Menge nicht für die PCR als Template ausreicht.

Die auftretenden Unterschiede zwischen den Affymetrix-Daten und den Ergebnissen der RT-PCR fordern natürlich eine Erklärung. Dabei kommen hauptsächlich zwei Gründe in Frage: Zum einen basiert die Methode der Affymetrix-Chips auf der Hybridisierung von cDNA an Oligonukleotide, die auf der Chip-Oberfläche befestigt sind, wobei es für ein Gen durchaus mehrere Oligonukleotide geben kann, die dann auch für spezielle Spleiss-Varianten dieses Gens charakteristisch sind, und man findet in den Expressionsliste oft für ein Gen mehrere „Probe Sets“ und damit auch sich zum Teil stark unterscheidende Genexpressionswerte, wodurch nicht immer mit Gewissheit gesagt werden kann welche Expression das Gen in einen bestimmten Zelltyp zum Zeitpunkt der Untersuchung aufgewiesen hat. Daher ist eigentlich die Untersuchung der Genexpression mit semiquantitativer RT-PCR eine genauere Methode zum Nachweis der Genexpression, aber auch diese Methode ist nicht frei von Nachteilen. Hier können sich bereits kleine Pipettierfehler bemerkbar machen, DNA-Verunreinigungen der RNA können das Ergebnis beeinflussen (s.o.). Weiterhin gibt es keine Möglichkeit, die Spezifität der bestellten Primer zu testen, so dass auch dieser Methode nicht völlig vertraut werden kann.

Um nun die Genexpression bzw. die Änderungen in der Expression genauer zu untersuchen muss eine Real-Time PCR durchgeführt werden.

1.2.2. Semiquantitative RT-PCR vs. Low Density Arrays

Nachdem in unserem Fall die Expression einiger Gene und die Gene in deren Nachbarschaften untersucht werden sollen, bot es sich an, sog. Low Density Arrays der Firma Applied Biosystems durchzuführen. Hierbei handelt es sich um eine TaqMan PCR, die durch die verwendete TaqMan Sonde zusätzlich zu den genspezifischen Primern, eine sehr hohe Spezifität für das zu untersuchende Gen bietet. Der Nachteil der Methode besteht sicherlich in

der langen Lieferzeit, die daher stammt, dass die einzelnen bestellten Primer auf ihre Spezifität hin geprüft und die Platten den Kundenwünschen entsprechend belegt werden, und im sehr hohen Kostenfaktor.

Die, mit Hilfe der Low Density Arrays, untersuchten Haushaltsgene zeigen, wie nicht anders zu erwarten, eine relativ konstante Expression zwischen den untersuchten Zellpopulationen, was die Zuverlässigkeit der Methode widerspiegelt. Die beiden, später auch in den FISH-Experimenten, untersuchten Gene, die hochreguliert sein sollten, IFI44 und RAP1A, haben in den Low Density Arrays RQ- Werte um 1, d.h. zeigen keine besonders starke Regulation, ein Trend, der auch mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR gefunden wurde.

Für das Gen IFITM1 ist mittels RT-PCR keine starke Änderung der Genexpression zu finden, eher wird die Expression etwas schwächer und dieser Trend lässt sich wiederum mit den LDAs bestätigen, denn auch hier treten einige RQ-Werte unter 1 auf, die eine geringfügige Herabregulation anzeigen. Für BIRC4BP, das bei Applied Biosystems unter dem Namen XAF1 geführt wird, zeigt in den Gelbanden der semiquantitativen RT-PCR einen minimalen Anstieg in der Expression, und zwei der drei Average-RQ-Werte der LDAs deuten ebenfalls auf eine Hochregulierung hin. Lediglich ein Wert lässt auf eine geringe Herabregulierung schließen.

Das laut Affymetrix-Daten herunterregulierte Gen DEPDC1 wird, wie im Gel und in den Daten aus den LDAs eher geringfügig hochreguliert, und genau das gleiche zeigt sich auch für CENPE. Die anderen beiden untersuchten Gene, LOC440338 und SLC10A2 kann im Vergleich von semiquantitativer PCR und LDAs keine Aussage gemacht werden, da für beide Gene die RT-PCR kein Ergebnis erbrachte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die semiquantitative RT-PCR und die Daten aus den Low Density Arrays meist den gleichen Trend in der Genregulation angeben, und somit ein relativ verlässliches System zur Messung der Genexpression darstellen. Für die Expressionsdaten an sich bedeutet dieses Ergebnis, dass die mit Hilfe von PCR-basierten Techniken gewonnenen Daten relativ zuverlässig sind, da sie mit zwei Methoden bestätigt werden können.

1.2.3. Affymetrix-Daten vs. Low Density Arrays

Nachdem im Vergleich zwischen Affymetrix-Daten und semiquantitativer RT-PCR Unterschiede in der Regulation einiger Gene auftreten, die semiquantitative RT-PCR und die LDAs jedoch häufiger ähnliche Trends in der Genexpression angeben, sollen nun auch noch die Affymetrix- und LDA-Daten verglichen werden.

Vergleicht man zunächst die drei Gene, die später auch für die FISH-Experimente herangezogen wurden so fällt auf, dass in den Affymetrix-Daten für DEPDC1 immer eine Herabregulierung zu finden ist, die LDAs geben jedoch immer eine Hochregulierung der Genexpression für dieses Gen an. Eine Übereinstimmung der beiden Datensätze ist für IFI44 zu finden. Dieses Gen wird von beiden Datenquellen als „hochreguliert“ angegeben. RAPIA ist den LDA-Daten zu Folge mehr oder weniger stark hochreguliert, die Affymetrix-Daten geben für dieses Gen jedoch gewaltige Unterschiede von starker Hochregulation bis schwacher Herabregulierung der Genexpression an.

Für die mit beiden Methoden untersuchten Nachbargene ergeben sich folgende Feststellungen: Im Bereich von DEPDC1 konnte ein Gen (GNG12) aufgrund zu schwacher Expression nicht mit der Methode der Low Density Arrays untersucht werden. Für DIRAS3 geben beide Methoden eine Steigerung der Genexpression nach der Gabe von Doxycyclin an, für die beiden anderen Gene, GADD45A und RPE65 sind die Expressionstrends jedoch völlig gegenläufig. Laut Affymetrix-Daten werden beide Gene herabreguliert, in den LDAs weisen beide Gene RQ-Werte >1 auf, sind also als hochreguliert zu betrachten. Für ELTD1, das einzige Gen das im untersuchten Bereich downstream von IFI44 liegt, konnte wiederum aufgrund zu schwacher Expression mittels LDAs keine Regulation festgestellt werden. GIPC2 zeigt unterschiedliche Regulierungstrends, je nach betrachteter Methode, laut Affymetrix Daten ist das Gen herabreguliert, die LDAs ergeben jedoch lediglich RQ-Werte >1 , was auf Hochregulierung hinweist. Für PTGFR ergeben wieder beide Methoden den gleichen Trend, das Gen scheint trotz schwacher Expression herabreguliert zu werden. Eine Unstimmigkeit in den beiden Methoden findet man wieder für IFI44L, das in den Affymetrix-Daten eine der stärksten Hochregulierungen überhaupt zeigt, in den Daten der LDAs jedoch lediglich sehr schwach hochreguliert (ein RQ-Wert wenig >1), eher stark herabreguliert (zwei RQ-Werte deutlich <1) scheint. In der genreichen Region um RAPIA findet man bei 15 untersuchten Genen zwei, die mit beiden Methoden denselben Regulationstrend aufweisen (C1orf103 und DDX20, beide hochreguliert). Für zwei Gene kann aufgrund zu schwacher Expression keine Aussage gemacht werden (ADORA3, KCND3), für drei Gene ergeben die Methoden völlig gegensätzliche Trends (CHI3L2, C1orf188, ATP5F1), die Gene sind jeweils laut Affymetrix-Daten herabreguliert, laut Low Density Arrays hochreguliert. Bei den anderen acht Genen ergibt mindestens eine Methode unterschiedliche Regulierungstrends, so dass über die wirkliche Regulierung keine Aussage gemacht werden kann.

Diese beiden Datensätze unterscheiden sich also stark in Bezug auf die gemachten Aussagen, was es schwierig macht verlässliche Aussagen zu machen. Für den Fortgang der Experimente

und deren Auswertung muss man sich also für eine der beiden Methoden entscheiden, der man mehr Vertrauen entgegenbringt und die weiteren Aussagen darauf beziehen.

Aus den Vergleichen der Methoden zur Messung der Genexpression kann man also den Schluss ziehen, dass die PCR-basierten Techniken zur Messung der Genexpression verlässlichere Ergebnisse bieten, wenn auch die absolute Quantifizierung der Expression einzelner Gene nicht immer möglich ist (semiquantitative RT-PCR). Jedoch ist es mit den PCR-basierten Techniken nicht möglich, eine genomweite Analyse der Genexpression durchzuführen, also ist es grundsätzlich am sinnvollsten, sich erst mittels Gene-Chip-Analysen einen Überblick über die Genexpression und deren Änderung aufgrund externer Stimuli zu verschaffen, diese Daten aber dann noch mal sorgfältig mit PCR-Methoden zu überprüfen. Hierfür bietet sich natürlich die Methode der TaqMan Real-Time PCR an, da so mit relativ geringem Arbeitsaufwand viele Gene gleichzeitig untersucht werden können. Die Nachteile dieser Methode sind aber die immensen Kosten, die für die Messung der Genexpression anfallen und die langen Lieferzeiten für die LDA-Platten. Letzteres wurde dieser Arbeit zum Verhängnis: Da Teile der Arbeit als Diplomarbeit von Daniela Weigl (2008) durchgeführt wurden, musste mit den FISH-Experimenten begonnen werden, bevor die Ergebnisse der LDAs vorlagen. Daher wurde für die Auswahl der BAC-Klone von den Affymetrix-Daten ausgegangen und somit nicht die idealen Gene für die FISH-Analyse gewählt.

1.3. FISH-Experimente und deren Deutung im Zusammenhang mit den Eigenschaften der Region

1.3.1. FISH-Experimente

Zunächst wurde mittels 2D-FISH überprüft, ob die bestellten BAC-Klone die richtigen sind, bzw. an der richtigen Stelle im Genom hybridisieren. Denn bei der Bestellung und Auslieferung der BAC-Klone kann es zu Roboter- und Computerfehlern kommen und so passiert es in 5-10 % der Fälle, dass falsche Klone ausgeliefert werden, die dann an anderen Stellen im Genom binden, kreuzhybridisieren oder gar nicht für FISH funktionieren. Bei den von uns bestellten BAC-Klone traf das für zwei der acht Klone zu.

Drei der BAC-Klone, die in der 2D-FISH positives Hybridisierungsverhalten zeigten, wurden, ausgehend von den Affymetrix-Daten, für die 3D-FISH ausgewählt. Nach der Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung und der Detektion der Signale wurden mit dem Konfokalmikroskop aus jeder Population willkürlich Bilder von ca. 30 Zellkernen aufgenommen. Es wurden aus jedem Farbkanal Einzelbilder im Abstand von 200 nm in der Z-Ebene aufgenommen und anschließend zu Bildstapeln zusammengefügt, der Z-Shift korrigiert und die Helligkeit angepasst. Diese Bildstapel werden mit den jeweiligen Schwellwerten in das Auswertungsprogramm eingelesen und die Ergebnisse mittels Excel dargestellt. Da das Setzen der Schwellwerte manuell passieren muss, ist hier innerhalb der Experimente immer eine gewisse Angreifbarkeit vorhanden. Um das zu umgehen, sollten die Schwellwerte also möglichst von einer Person bei möglichst gleich bleibenden Lichtverhältnissen und ohne längere Pausen gesetzt werden und wenn möglich von einer anderen, unabhängigen Person überprüft werden. Dies wurde im vorliegenden Fall durchgeführt. Die radiale Position der drei BAC-Sonden wird dann in Bezug auf den Zellkernrand und den Rand des Chromosomenterritoriums hin untersucht und statistisch auf Unterschiede in der Signalverteilung hin überprüft.

In Bezug auf den Zellkern sind zwischen uninduzierten Zellen und induzierten Zellen keine großen Unterschiede in der Verteilung der Signale festzustellen. So ist RAP1A das Gen, das am weitesten in der Zellkernmitte liegt und DEPDC1 liegt am weitesten am Zellkernrand. IFI44 liegt näher bei DEPDC1, also auch eher an der Peripherie des Zellkerns. Auch eine per Hand bzw. per Auge durchgeführte Auszählung der Signale in z-Projektionen konfokaler Bilder ergibt, dass das BAC-Signal von RAP1A nie Kontakt zum Kernrand hat, IFI44 und DEPDC1 dagegen schon, wobei DEPDC1 häufiger an der Kernperipherie zu finden ist als IFI44. Dieser Trend ist in uninduzierten und induzierten Zellen feststellbar. Sowohl der

Kolmogorow-Smirnow Test als auch der Wilcoxon Rank Sum Test beweisen eine Gleichverteilung aller Signale zwischen uninduzierten und induzierten Zellen. Der einzig feststellbare Unterschied ist, dass die Signalverteilung in den induzierten Zellen etwas weniger flach, dafür aber mit höheren Werten auf der Y-Achse verläuft, was aber an den etwas kleineren Zellkernen liegen könnte, was ja auch in den Konfokal-Bildern der 3D-FISH und an den Signalverteilungen von DAPI festzustellen ist. Denn bei der Betrachtung der Konfokalbildern fällt auf, dass die Zellkerne der uninduzierten Zellen etwas größer sind als die der induzierten Zellen. Anscheinend führt die Induktion von CALM-AF10 in den DG-75 Zellen zu einer Verkleinerung des gesamten Zellkerns. Vergleicht man die Signale innerhalb einer Zellkernpopulation untereinander, findet man in den uninduzierten Zellen mit beiden statistischen Tests keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung von CT und DAPI, in den induzierten Zellen ist so ein Unterschied jedoch feststellbar, was auch für eine Änderung der Zellkernform spricht. Die BAC-Signale unterscheiden sich alle, mit einer einzigen Ausnahme (uninduzierte Zellen, Wilcoxon Rank Sum Test, IFI44 und RAPIA), statistisch signifikant voneinander und von CT und DAPI, was bedeutet, dass alle BAC-Sonden, und damit auch die darauf liegenden Gene, gleichmäßige Abstände zueinander und zu den Kernstrukturen haben.

Innerhalb des Territoriums zeigen alle BAC-Sonden in ihrer Zellpopulation eine Gleichverteilung der Signale an der Peripherie des Territoriums, die auch statistisch belegt werden kann, jedoch zeigen sich Unterschiede in den Signalverteilungen zwischen den beiden Zellpopulationen. Auch hier fallen wieder die weniger flachen Kurven, mit höheren Werten auf der Y-Achse in der Population der induzierten Zellen auf, d.h. die Veränderung der Zellkernform zieht auch eine Änderung der Form des Territoriums nach sich. Die Unterschiede der Verteilungen der einzelnen BAC-Signale zwischen uninduzierten und induzierten Zellen werden nochmals durch die Statistik belegt.

1.3.2. Deutung der FISH-Ergebnisse im Zusammenhang mit den Eigenschaften der Region

Um eine Aussage darüber machen zu können, wie sich die untersuchten Gene nach der Induktion von CALM-AF10 mittels Doxycyclin verhalten, müssen die über die radiale Genpositionierung und die Genexpression gewonnenen Daten nun miteinander in Verbindung gebracht werden, wobei auch andere Parameter, wie die Gendichte einer Region und deren GC-Gehalt nicht außen vor bleiben dürfen (Küpper et al. 2007).

RAP1A, das in beiden untersuchten Zellpopulationen am weitesten in der Mitte des Zellkerns zu finden ist, weist den höchsten GC-Gehalt und die höchste Gendichte im 2 Mb und 5 Mb-Window auf, DEPDC1 weist dagegen die niedrigste Gendichte und den niedrigsten GC-Gehalt auf und ist am weitesten an der Kernperipherie zu finden. Die Werte in Bezug auf Gendichte und GC-Gehalt von IFI44 ähneln eher denen von DEPDC1 als denen von RAP1A, und IFI44 ist deutlich näher am Kernrand, also in der Nähe von DEPDC1 zu finden als in der Kernmitte bei RAP1A. Die Genexpression eines Gens, als auch die Änderung in der Genexpression an sich scheint in diesem Fall nur einen sehr geringen Einfluss auf die radiale Positionierung der Gene zu haben, was mit den Ergebnissen von Küpper et al. 2007 im Einklang steht. Weiterhin korrelieren diese Ergebnisse mit denen von Nielsen et al. 2002, die die Lokalisation des PLP-Gens während der Zelldifferenzierung untersuchten und trotz Änderung im transkriptionellen Status des Gens keine Änderung in der radialen Positionierung fanden. Kim et al. 2004 bestätigten diese Behauptungen mit ihren Untersuchungen. Mit unseren Experimenten konnten außerdem die Resultate von Baxter et al. (2002) in Bezug auf die Verteilung aktiver und inaktiver Gene innerhalb des Zellkerns bestätigt werden. Nach unseren Experimenten kann allerdings den Daten von Kosak et al. 2007 in sofern nicht zugestimmt werden, da sich in unserem Fall an der Zellkernperipherie nicht nur stillgelegte Gene befinden, da sowohl DEPDC1 als auch IFI44 eine messbare Expression aufweisen. Ebenso wenig können mit unseren Daten die Behauptungen von Chambeyron et al. 2004 bestätigt werden, die eine Veränderung der Positionierung induzierter Gene innerhalb des Zellkerns finden.

Um die Gendichte und Expression einer bestimmten Region besser einschätzen und damit die Positionierung einer Region innerhalb des Zellkerns besser erklären zu können, wurde die sog. „Transcription Expression Strength“(TES) entwickelt. Die TES hat den höchsten Wert für RAP1A, das Gen, das sich am weitesten in der Kernmitte befindet und den niedrigsten Wert für DEPDC1, das mit großer Häufigkeit am Zellkernrand lokalisiert, für die Region um IFI44 ergibt sich eine TES, die ähnlich, jedoch etwas größer ist als die für DEPDC1, was sich auch in der Positionierung des Gens widerspiegelt.

Die BAC-Signale befinden sich in Bezug auf das Chromosomenterritorium, unabhängig von Gendichte, GC-Gehalt oder Expressionsstärke weitestgehend an dessen Rand, was mit den Befunden von Cremer et al. 2001 und 2010 korreliert, demzufolge sich zwischen den einzelnen Chromosomenterritorien das sog. Interchromatinkompartiment befindet, in dem sich viele Transkriptionsfaktoren befinden. Aktive Gene sind nach dieser Theorie an der Peripherie des Territoriums bzw. im Perichromatinraum zu finden, da dort die

Transkriptionsfaktoren einen guten Zugang haben. Im Weiteren sind unsere Ergebnisse auch mit den Befunden von Verschure et al. 1999 im Einklang, die aktive Loci meist an der Oberfläche der Territorien fanden. Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von Chambeyron et al. 2004, die eine Bewegung aktivierter Loci an die Peripherie des Territoriums, ja sogar ein Looping out von Chromatinschleifen in das Interchromatin-Kompartiment, finden konnten. Bei Nachlassender Aktivität wurde von der Arbeitsgruppe ein Rückzug der Loci in das Innere des Territoriums festgestellt. Ein, wie in der Arbeit von Chambeyron beschriebenes, Looping out wird auch in einigen weiteren Publikationen untersucht (Volpi et al. 2000, Mahy et al. 2002b, Williams et al. 2002, Galiova et al. 2004), allerdings handelt es sich bei den ausloopenden Bereichen jeweils um besonders Gendichte Bereiche mit hoher Expression, was ein Grund dafür sein könnte, dass in unserem Fall kein Looping out Ereignis auftrat. Aber auch neueren Vorstellungen im Hinblick auf das CT-IC-Modell, tritt ein „looping out“ nicht zwangsläufig auf. Denn das Auftreten großer Loops, die sogar CTs durchziehen, würde bei der DNA-Kondensierung in der Mitose zu Schwierigkeiten führen (Cremer et al. 2011).

1.4. Zusammenfassung und Ausblick

Betrachtet man die Ergebnisse und deren Auswertung, so findet man eine, von der Genexpression und -regulation unabhängige Positionierung verschiedener Genorte. Die Positionen der Loci scheinen vielmehr von diversen anderen Faktoren wie dem GC-Gehalt und der Gendichte abhängig zu sein, was bereits in einer früheren Arbeit herausgefunden wurde (Küpper et al. 2007), und diese in weiten Teilen bestätigt.

Eine zuverlässige haltbare Messung der Genexpression scheint aber mit Schwierigkeiten behaftet zu sein, wie sich in dieser Arbeit herausstellte. Die zuverlässigsten und sensitivsten Daten zur Genexpression, oder vielmehr zur Genregulation erhält man über die Real-Time PCR, also in diesem Fall über die Low Density Arrays. Da es sich hier um eine Form der TaqMan PCR handelt kann man von einer hohen Genauigkeit der Ergebnisse ausgehen, was sich auch an der, über mehrere Proben gleichmäßige Expression der Haushaltsgene zeigt. Weiterhin spricht für die Real-time PCR als zuverlässige Methode zur Quantifizierung der Genexpression, dass die auch die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR in den meisten Fällen denselben Trend aufweisen. Große Unterschiede bestehen jedoch im Vergleich der beiden PCR-basierten Methoden zu den Affymetrix Arrays. Diese basieren lediglich auf der Bindung von markierter cDNA an mehr oder weniger spezifische Oligonucleotide, die auf der Array-Matrix befestigt sind. Dabei gibt es für ein Gen oft mehrere „passende“ Oligos, die aber zum Teil Spleiss-Varianten des Gens darstellen und möglicherweise in dem untersuchten

Zelltyp überhaupt nicht oder nur in sehr geringer Menge gebildet werden, was zu irreführenden Ergebnissen führt. Jedoch bieten die Affymetrix Arrays den Vorteil, dass mit einem Durchlauf die gesamte Expression der im Genom bekannten Loci dargestellt werden kann, und somit überhaupt erst einen Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen darstellt. Wäre für die vorliegende Arbeit von den Daten der Low Density Arrays ausgegangen worden, wären für die FISH mit Sicherheit andere Gene gewählt worden, als die, die aufgrund der Affymetrix Daten ausgesucht wurden. Hier kommt aber der Nachteil der Low Density Arrays zum Tragen, nämlich die sehr lange Lieferzeit. Für die Durchführung der FISH-Experimente konnte nicht länger gewartet werden, da eine Diplomarbeit im Rahmen dieses Projekts fertig gestellt werden sollte (Weigl, 2008). Auch wurde der semiquantitativen RT-PCR nicht genug Vertrauen geschenkt.

Würde man nun wieder versuchen die Expression regulierter Gene in einem solchen System wie dem hier vorliegenden zu untersuchen, könnte man schon von den Affymetrix Daten ausgehen, sollte aber nicht willkürlich Gene wählen sondern nach bestimmten hoch- oder herunterregulierten Funktionen und den daran beteiligten Genen, z. B. für Apoptose, suchen und lieber aus solchen Bereichen besonders stark regulierte Gene auswählen, und die Expression bzw. Regulation der Gene ausreichend überprüfen, bevor die FISH-Experimente durchgeführt werden.

2. Histonmodifikationen

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der radialen nukleären Verteilung von bestimmten Histon-Modifikationen, die einen Einfluß auf die Genregulation haben, indem sie den Kondensierungsgrad des Chromatins beeinflussen. So ist Acetylierung zum Beispiel ein Transkriptionsaktivator, da durch Histon-Acetylierung die Kondensierung des Chromatins gelockert wird, es entstehen sog. offene Chromatindomänen, Histon-Phosphorylierung hat einen Einfluss auf die Mitose (Lachner et al. 2003). Die Methylierung von Histonschwänzen, die meist an Lysin-Resten von H3 und H4 auftritt, dagegen kann verschiedene Auswirkungen auf die Chromatinkonformation haben, je nachdem an welcher Stelle die Methylierung auftritt und wie viele Methylgruppen angehängt werden (Lachner et al. 2003).

Es wurden drei verschiedene Varianten der Methylierung von Histon 3 untersucht, und zwar me³-H3K4, ein Marker für transkriptionell aktives Chromatin, also Euchromatin (Santos-Rosa et al. 2002), me³-H3K9, ein Marker für konstitutives Heterochromatin (Lachner and Jenuwein, 2002), in dem keine oder fast keine Transkriptionsaktivität vorhanden ist und me³-H3K27, welches im fakultativen Heterochromatin auftritt (Okamoto et al., 2004; Plath et al., 2003; Silva et al., 2003), und das je nach Zelltyp verschiedene Transkriptionsaktivitäten zeigt. Die Signalverteilungen dieser drei Histon-H3-Modifikationen und zusätzlich einem Crest-Signal, mit dem zentromerisches Heterochromatin nachgewiesen wird, wurden in normalen Leukozyten, also ruhenden und zyklierenden Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten, die direkt aus dem peripheren Blut gesunder Probanden gewonnen wurden, und in einigen Blutkrebszelllinien in Bezug auf die Signalverteilung im Zellkern untersucht. Die Krebszelllinien sind alle so immortalisiert, dass sie längere Zeit in Kultur gehalten werden können, bei einigen der untersuchten Zelllinien (HL-60, U937, K-562) handelt es sich um relativ unreife Stadien von Blutzellen, sie können durch Zugabe verschiedener Chemikalien zur Differenzierung gebracht werden. Lediglich die untersuchte RPMI 8226-Zelllinie kann nicht weiter differenziert werden. Weiterhin wurden aus dem Nabelschnurblut eines gesunden Kindes Stammzellen isoliert und auch in ihnen die radiale Verteilung von Signalen von Histonmodifikationen untersucht. Diese Zellen wurden, zusätzlich zur Immunfluoreszenz für den Nachweis der Histonmodifikationen, durch einen Antikörper-Cocktail von anderen Zelltypen unterschieden.

Im Gegensatz zu den von Baxter et al. 2004 und Lukasova et al. 2005 gemachten Beobachtungen finden wir annähernd gleiche Signalverteilungen in allen untersuchten Zelllinien.

Aufgrund der gemachten Untersuchungen bietet sich eine natürliche Dreiteilung der Diskussion an, wobei in jedem der Punkte eine der untersuchten Modifikationen abgehandelt wird, am Ende ist es jedoch auch nötig eine gewisse Zusammenschau der Ergebnisse zu machen, also wird die Diskussion folgendermaßen gegliedert:

- 1) me3-H3K4
- 2) me3-H3K9
- 3) me3-H3K27
- 4) Zusammenschau der Ergebnisse

2.1. me3-H3K4

Bei der bloßen Betrachtung der Konfokal-Bilder und Bildstapel fällt auf, dass das dreifach-methylierte H3K4, das ja die Verteilung von transkriptionell aktivem Chromatin anzeigt, über den gesamten Zellkern verteilt ist, lediglich die Bereiche ganz am Rand des Zellkerns scheinen ausgespart zu werden, es werden keine Häufungen von Signalen an einer bestimmten Stelle beobachtet. Dies ist mit einer einzigen Ausnahme in allen beobachteten Zelltypen, normal oder aberrant, undifferenziert oder differenziert der Fall. Die Ausnahme stellen die TPA-differenzierten K562-Zellen dar, in denen sich mehr randständiges gebündeltes Signal zeigt. Hier ist auch die Signalverteilungskurve deutlich von den Kurven der anderen Zelltypen verschieden: Für die meisten der beobachteten Zelltypen zeigt me3-H3K4 eine Positionierung deutlich weiter in der Zellkernmitte als das Crest-Signal, das als Marker für zentromerisches Heterochromatin meist randständig ist, und auch im Vergleich zur DAPI-Kurve, die zum Kernrand hin stark ansteigt, zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Dieser Unterschied ist jedoch in den besagten TPA-differenzierten K562-Zellen nicht zu beobachten und ist in undifferenzierten und RA-differenzierten HL-60 Zellen weitaus weniger deutlich als in allen anderen Zelltypen. Die Ähnlichkeit von DAPI und Crest zu me3-H3K4 wird für die undifferenzierten HL-60-Zellen auch aus der Statistik deutlich, für die TPA-differenzierten K-562-Zellen ist statistisch kein Unterschied zwischen der Histonmodifikationsverteilung und Crest zu sehen, wie auch in den Lin-Nabelschnurblutzellen.

Die Unterschiede in den Verteilungen von DAPI und Crest zur me³-H3K4-Modifikation lassen sich damit erklären, dass me³-H3K4 an aktivierte Promotoren bindet (Santos-Rosa et al. 2002), und sich diese häufig in der Kernmitte befinden (Skalnikova et al. 2000, Brown et al. 2001, Küpper et al. 2007). Ist dies nicht der Fall, wie in den HL-60, K-562- oder den Nabelschnurblutzellen, liegt meist eine bestimmte Ursache vor. Diese könnte beispielsweise sein, dass es sich bei den HL-60-Zellen und auch den K562-Zellen um so „unreife“ Zellstadien handelt (Collins et al. 1977 & 1978, Gallagher et al. 1979, Koeffler et al. 1980, Lozzio et al. 1979, Andersson et al. 1979, Lozzio et al., 1981) wie bei den Nabelschurblutzellen, und in diesen noch eine andere Chromatinkonformation, zumindest im Bezug auf Euchromatin, vorliegt.

Vergleicht man normale Zelltypen mit den undifferenzierten und differenzierten Krebszelllinien so fällt auf, dass es anscheinend im Zuge der Differenzierung zu solchen Umlagerungen in der Chromatinstruktur kommt, dass Krebszelllinien nach der Differenzierung ihren gesunden „Counterparts“ stärker ähneln als noch vor der Differenzierung. Dies wird für die HL-60-Zellen am deutlichsten. So führt die Differenzierung von HL-60-Zellen mit Retinsäure zu einer Entwicklung der Zellen in Richtung Granulozyten, durch Zugabe von Vitamin D₃ wird jedoch der Differenzierungsweg in Richtung der Monozyten eingeschlagen (Collins et al. 1987; Ostrem et al. 1987). Und so findet man im hier verwendeten System zum Teil keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RA-differenzierten HL-60- Zellen und Granulozyten, zwischen Monozyten und VD₃-differenzierten HL-60-Zellen und Monozyten und TPA-differenzierten U937-Zellen, die auch der monozytischen Entwicklungslinie folgen (Collins et al. 1987; Dreyling et al. 1996), und schließlich zwischen VD₃-differenzierten HL-60-Zellen und TPA-differenzierten U937-Zellen. Weiterhin gibt es keine statistisch nachweisbaren Unterschiede in Signalverteilungen auf, die jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein scheinen.

2.2. me³-H3K9

Im Gegensatz zu me³-H3K4 sind die me³-H3K9-Signale, sowohl bei Betrachtung der Bilder und Bildstapel als auch in den Signalverteilungskurven, meist deutlich näher an der Kernperipherie zu finden, und dort liegen sie meist als größere Signalbündel vor. An bzw. in diesen Signalansammlungen findet man meist auch die Crest-Signale, was leicht erklärt werden kann, da es sich bei me³-H3K9 um den Marker für konstitutives Heterochromatin handelt, und solche transkriptionell inaktiven Regionen meist an der Kernperipherie zu finden sind (Skalnikova et al. 2000, Brown et al. 2001). Die ähnlichen Signalverteilungen zwischen

DAPI bzw. Crest und me3-H3K9 finden sich auch in der Statistik wieder: So ähneln sich die DAPI- und Histonmodifikationskurven in ruhenden Lymphozyten, Monozyten allen Formen der HL-60-Zellen und den undifferenzierten U937-Zellen, Crest und me3-H3K9 ähneln sich in undifferenzierten und differenzierten HL-60-Zellen, TPA- und retrodifferenzierten U937-Zellen, undifferenzierten K562 und RPMI 8226-Zellen. So viele Ähnlichkeiten treten bei keiner der anderen untersuchten Modifikationen auf. Da es bei der reinen Betrachtung der konfokalen Bildstapel schien, als gäbe es Unterschiede in Anzahl und Größe der me3-H3K9-Cluster wurde ein spezielles Tool entwickelt, mit dem Voxel-Größe und Anzahl der Cluster gemessen werden können. Dabei ergaben sich stark verschiedene Ergebnisse für normale Zelltypen und Krebszelllinien: In den Krebszelllinien finden sich deutlich mehr Signale als in den normalen Zelltypen bei gleicher Signalgröße. Bei Betrachtung der Signalcluster in den normalen Zellen findet man ähnliche Cluster in ruhenden Lymphozyten und Granulozyten (wenige große Cluster) und Monozyten und zyklierenden Lymphozyten (viele kleine Cluster), die Nabelschnurblutzellen liegen genau zwischen diesen beiden großen Gruppen, was ihrem Vorläufer-Status gerecht wird. In den Krebszelllinien findet man eher wenig große Signalcluster, ein starker Differenzierungseffekt ist für die K562-Zellen zu erkennen. Hier werden aus zunächst vielen kleinen Signalen nach der Differenzierung mit TPA wenig große Signale. Ein solch dramatischer Unterschied ist für keine der anderen untersuchten Zelllinien feststellbar, was bedeutet, dass die Differenzierung von K562-Zellen mit großen Änderungen in der Chromatinstruktur einhergeht.

Bei Betrachtung der Signalverteilungen zwischen normalen Zelltypen und Krebszelllinien gibt es auch für me3-H3K9 auffällige Besonderheiten. Auch hier ähneln die normalen Granulozyten den undifferenzierten und RA-differenzierten HL-60-Zellen, was wieder auf die Differenzierung in Richtung Granulozyten bei retinsäure-behandelten HL-60-Zellen hinweist. Monozyten dagegen zeigen statistische Ähnlichkeiten zu Vitamin D3-differenzierten HL-60-Zellen, was die Ergebnisse der me3-H3K4-Methylierung belegt. Retrodifferenzierte U937-Zellen zeigen Ähnlichkeit zu ihren undifferenzierten „Counterparts“ was dafür spricht, dass während der Differenzierung mit TPA Änderungen in der Chromatinstruktur auftreten, die dann zum Teil, jedenfalls für me3-H3K9, im Zuge der Retrodifferenzierung wieder rückgängig gemacht werden. Weiterhin ähneln sich undifferenzierte U937-Zellen und undifferenzierte K562-Zellen, genauso, wie sich deren TPA-differenzierte Formen ähneln, die wiederum den Monozyten ähneln, woraus geschlossen werden kann, dass es sich hier um zwei Differenzierungen in Richtung der Monozyten handelt (Dreyling et al. 1996).

2.3. me3-H3K27

Die Signalverteilungen zeigen sowohl im Bildmaterial als auch in den Kurven große Unterschiede zwischen den untersuchten Zelltypen, was aber relativ einfach mit der Tatsache erklärt werden kann, dass es sich bei me3-H3K27 um den Marker für fakultatives Heterochromatin handelt, und in jedem Zelltyp andere Gene „an“- bzw. „abgeschaltet“ sind. Allerdings kann bei Betrachtung der Signalverteilungskurven festgestellt werden, dass die me3-H3K27-Signale zwischen denen von me3-H3K4 und me3-H3K9 liegen, was jedem Zelltyp die Möglichkeit gibt, schnell auf externe Stimuli zu reagieren, und fakultativ inaktivierte Gene und Genbereiche nach außen oder innen verlagern kann (Trojer et al. 2007). Statistische Ähnlichkeiten zu DAPI- und Crest- Kurven sind nur für RA-differenzierte HL-60-Zellen und RPMI 8226-Zellen bzw. zusätzlich noch für zyklierende Lymphozyten und undifferenzierte HL-60-Zellen zu finden.

Bei me3-H3K27 handelt es sich um den Marker für fakultatives Heterochromatin, d.h. dass es Unterschiede in der Signalverteilung zwischen männlichen und weiblichen Zellen geben sollte, da nur weibliche Zellen ein inaktives X-chromosom besitzen. Um dies zu überprüfen wurden von einigen Zelltypen männliche und weibliche Zellen untersucht, der erwartete Unterschied zeigte sich jedoch nicht besonders deutlich nur in den männlichen Monozyten im Vergleich zu den weiblichen, nicht jedoch für die auch untersuchten männlichen und weiblichen Granulozyten.

Im Vergleich der verschiedenen Zelltypen untereinander findet man zwar einige Ähnlichkeiten in den Signalverteilungen, wie z.B. zwischen RA- und VD3-differenzierten HL-60-Zellen und undifferenzierten und TPA-differenzierten U937-Zellen, die beobachteten Unterschiede und Ähnlichkeiten sind jedoch nicht so richtungsweisend wie für die anderen untersuchten Histonmodifikationen. Diese Tatsache jedoch passt auch zu der Erklärung, dass fakultatives Heterochromatin in gewisser Weise einen „flexiblen“ Charakter hat und sich zwischen den verschiedenen Zelltypen am meisten unterscheidet, je nach dem welche Gene gerade transkribiert oder nicht transkribiert werden sollen (Trojer et al. 2007). Diese genetische Flexibilität gibt der Zelle die Möglichkeit auf externe Stimuli zu reagieren, was gerade für Zellen im Blutssystem, die an der Immunabwehr beteiligt sind, wie die hier untersuchten Leukozyten, extrem wichtig ist.

2.4. Zusammenschau der Ergebnisse

Vergleicht man die verschiedenen Signalverteilungskurven miteinander fällt als erstes auf, dass die Histonmodifikationen in den PHA-stimulierten Lymphozyten die flachsten Kurven zeigen, diese Zellen jedoch auch die größten Zellkerne besitzen. Behandlung von Lymphozyten mit PHA führt zu einem Anstieg der Menge großer unreifer Zellen (Lozzio et al. 1971), was hiermit auch durch die Betrachtung der Histonmodifikationen deutlich wird.

Für me³-H3K4 und me³-H3K9 zeigen sich immer wieder Anhaltspunkte für gewisse Entwicklungslinien in denen sich die Zellen befinden, weiterhin sind oft Differenzierungseffekte erkennbar. Me³-H3K27 zeigt demgegenüber eine stärkere Variabilität, die jedoch gerade im Immunsystem von entscheidender Bedeutung ist.

Eine Hypomethylierung bestimmter Zellen / Entwicklungsstadien, wie bei Baxter et al. 2004 bzw. Lukasova et al. 2005 beschrieben, konnte hier jedoch nicht festgestellt werden.

Aus den Experimenten kann insgesamt geschlossen werden, dass die hier untersuchten differenzierbaren Krebszelllinien gute Modellsysteme für die zukünftige Krebsforschung darstellen. Die Erforschung von Differenzierungswegen kann weiterhin in der Diabetes- und Krebsforschung und –diagnose weitere Anwendung finden (Miao et al. 2006).

3. Herstellung „komplexer Sonden“

Die Überlegung hinter dem Prinzip der komplexen Sonden ist, direkt aus den Zellen, aus der Transkription der für diesen Zelltyp benötigten Gene, Sonden für 2D- und 3D-FISH zu gewinnen und mit diesen Sonden auf den Ausgangszelltyp zurückzugehen und die so entstandenen Hybridisierungsmuster mit denen, die mit der gleichen Sonde in anderen Zelltypen entstehen, zu vergleichen und damit Aufschluss über die Anordnung von aktiv transkribierten Sequenzen zu erhalten.

Nach wie vor bleibt unklar, warum die Versuche zunächst so funktionierten, wie man es nach der Theorie erwartet hätte, also mit eindeutigen Signalen in den +RT-Ansätzen und deutlich signalschwächeren, wenn nicht sogar fast signalfreien –RT-Negativkontrollen und ab einem bestimmten Moment, ohne dass eine Änderung an irgendeiner Stelle innerhalb des Protokolls vorgenommen wurde, nicht mehr funktionierten und in den Negativkontrollen deutliche Signale auftraten, die auch mit Anwendung verschiedenster Methoden zu Amplifikation und Markierung der cDNA nicht zu beseitigen waren. Die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse war also nicht mehr gegeben und das weitere Verfolgen dieser Versuchsansätze hätte den Rahmen der Arbeit, sowohl hinsichtlich des Zeitfaktors als auch hinsichtlich des Kostenfaktors weitaus gesprengt, weshalb davon abgesehen wurde, diese Versuchsreihen weiter durchzuführen.

Diese Entscheidung fällt, gerade nach den anfänglich erzielten Ergebnissen in der Maus, und den immer wieder reproduzierbaren Bandenmustern für verschiedenste menschliche Chromosomen, nicht leicht. Denn die, sich auf den Metaphase Chromosomen ergebenden, Muster stimmen mit auch mit den RIDGEs (Caron et al. 2001, Verschure et al 1999, s. Abb. IV.1.), den „Regions of increased gene expression“, überein. Weiterhin wäre die Untersuchung der Signalverteilung in den 3D-Hybridisierungen, in denen sich die Signale über das Zellkerninnere verteilen, die Randbereiche jedoch weitestgehend signalfrei sind (ähnlich dem me3-H3K4-Signal), und in denen sich für die Fibroblasten sogar zeigt, dass RNAs in das Cytoplasma transportiert werden (was in Lymphozyten weniger deutlich wird, da Lymphozyten nur sehr wenig Zytoplasma besitzen), recht vielversprechend gewesen.

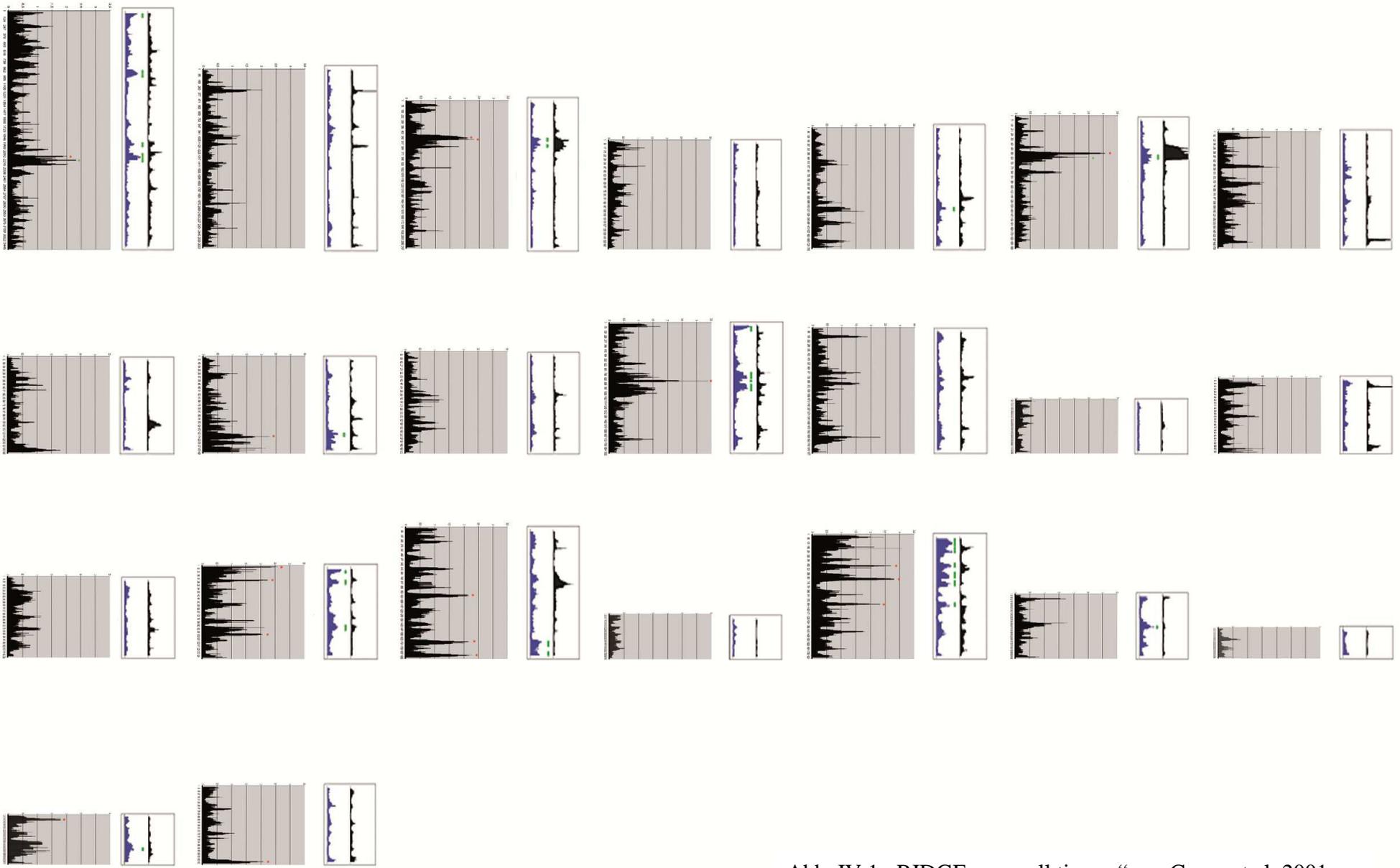


Abb. IV.1.: RIDGEs aus „all tissues“ aus Caron et al. 2001

In der Nachbetrachtung der Versuche bleibt lediglich, weitere Überlegungen anzustellen, warum die Negativkontrollen nicht wenigstens annähernd „signalfrei“ zu bekommen waren und ausgehend davon über weitere Versuche nachzudenken, um zu diesem Ziel zu gelangen.

Da für die –RT Negativkontrollen keine reverse Transkriptase zugegeben wird, also keine Transkription stattfindet, und dennoch ein Signal entsteht, muss auch in den –RT Ansätzen etwas vorliegen, was dann in der Genomiphi oder der DOP-PCR mit amplifiziert wird. Möglicherweise ist der RNase Verdau, der im Anschluß an die reverse Transkription durchgeführt wird, nicht vollständig genug, so dass noch RNA-Fragmente vorliegen, die dann mit amplifiziert werden. Dass es sich bei den vorliegenden Fragmenten nicht um DNA-Reste handelt, wurde mit der Durchführung des DNase I -Verdaus ausgeschlossen. Auch noch, in den Reaktionen vorliegende Primer, sowohl Oligo-dTs, als auch Random-Hexamere oder DOP-Primer könnten so stark mit amplifiziert und elongiert werden, dass sie für einen Teil des Signals verantwortlich sind. Deutlich wird aus den Versuchen, dass die Genomiphi eine noch effektivere und sensiblere Methode zur Amplifikation von DNA ist als die DOP-PCR, denn in der DOP-PCR ist die Negativkontrolle meist etwas signalschwächer als in den Genomiphi-Ansätzen. Man müsste also im weiteren über eine noch feinere Abstimmung der DNA-Amplifikation nachdenken, um genau das richtige Maß an DNA-Vervielfältigung zu bekommen, dass die Positivprobe ein deutliches Signal zeigt, die Negativkontrolle jedoch weitestgehend frei von Signalen bleibt. Dies dürfte jedoch äußerst schwierig sein, da die „perfekte“ Amplifikation für jeden neue cDNA, wenn nicht sogar für jeden einzelnen Ansatz neu festgestellt werden müsste.

Abschließend sei gesagt, dass die „komplexen Sonden“ ein interessanter Ansatz sind, um mehr über die Anordnung exprimierter Sequenzen herauszufinden, dass jedoch noch viel Arbeit und Zeit in die reproduzierbare Verwirklichung dieses Systems fließen muss.

V. Zusammenfassung

In der abschließenden Zusammenfassung sollen nun die, aus den drei Einzelteilen gezogenen Schlüsse, in Zusammenhang gestellt werden.

Im Zellkern einer jeden Zelle besteht eine gewisse Ordnung der darin vorhandenen DNA und Proteine. Diese Ordnung wird unter dem Begriff „Zellkernarchitektur“ zusammengefasst. In der vorliegenden Arbeit ging es um die nähere Betrachtung einiger Aspekte der Zellkernarchitektur. Diese Aspekte betrafen 1. die Anordnung von Genen, 2. die Anordnung von Chromatin mit Hilfe unterschiedlicher Histonmodifikationen und 3. die Anordnungen von Chromosomenabschnitten, die mit komplexen messenger RNA-Sonden hybridisiert werden.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mittels 3D FISH die dreidimensionale Positionierung von drei auf dem Chromosom 1 lokalisierten Genen in Zellkernen der Burkitt-Lymphom Zelllinie DG75 bestimmt. Diese Zelllinie wurde von Stefan Bohlander zur Verfügung gestellt und enthielt einen induzierbaren episomalen Vektor für das CALM-AF 10 Gen. Messungen der Genexpression, die in der Bohlander Gruppe mit Hilfe eines Affymetrix-Chips durchgeführt wurden, zeigten das die Induktion des Transgens zu genomweiten Veränderungen der Expressionsmuster hunderter Gene in dieser Zelllinie führten. Die für die 3D FISH Experimente ausgewählten Markergene zeigten nach der Induktion eine signifikant veränderte Expression. Dennoch änderte sich die radiale Positionierung dieser Gene, darunter versteht man die mehr innere oder mehr periphere Position der Gene, nicht. Dieses Ergebnis schien zuerst darauf hinzuweisen, dass die Transkriptionsstärke keine bedeutsamer Faktor im Hinblick auf die radiale Positionierung ist. Die Befunde der Affymetrix-Chip Analyse für diese Gene konnten jedoch in einer anschließende Untersuchungen der Genexpression mit Real-Time-PCR nicht bestätigt werden, obwohl der Vergleich von Affymetrix-Chip und Real-Time-PCR Daten insgesamt eine klare Korrelation zwischen den Datensätzen zeigte. Bei Diskrepanzen gehen wir davon aus, dass Real-Time-PCR die zuverlässigeren Ergebnisse liefert. Bei der hier durchgeführten Real-Time-PCR Untersuchung wurden auch die Expressionsstärken aller in einer Nachbarschaft von etwa 1 Mbp um die Markergene annotierten Gene ermittelt. Dieses Fenster wurde gewählt, weil Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Thomas Cremer und anderen Gruppen gezeigt haben, dass ~1 Mbp Chromatindomänen die Basisstruktur der Chromatinorganisation darstellen. Als Maß für die gesamte Genexpression einer Chromatindomäne wurde eine „Total Expression Strength“ (TES) berechnet. Dieser Wert basiert auf den Real-Time-PCR Werten der annotierten Gene und berücksichtigt auch die Länge der ungespleisssten RNA, die von einem Gen transkribiert

wird. Dabei zeigte sich, dass das Markergen in der Domäne mit dem höchsten TES Wert am weitesten innen im Zellkern lokalisiert ist. Dieser Befund unterstützt Befunde aus der wissenschaftlichen Literatur, dass die radiale Positionierung von individuellen Genen von Eigenschaften der lokalen Umgebung abhängt. Da sich die Nachbarschaft der untersuchten Markergene nicht nur im Hinblick auf die TES Werte sondern auch im Hinblick auf die Dichte der dort annotierten Gene und den GC-Gehalt unterscheidet, bleibt offen, welcher dieser Parameter als Prädiktor für die zu erwartende radiale Position individueller Gene eine entscheidende Rolle spielt. Möglich ist auch, dass alle Parameter zusammenwirken oder dass je nach den speziellen Umständen einer Untersuchung verschiedene Parameter die radiale Positionierung eines Gens bevorzugt beeinflussen. Die Stabilität der radialen Positionierung der Markergene trotz einer genomweiten Veränderung des Genexpressionsmusters nach CALM-AF 10 Induktion stimmt mit Befunden verschiedener Arbeitsgruppe überein, die für einen hohen Grad an räumlicher Stabilität der Chromatinanordnung während der Interphase sprechen; ~1 Mbp Chromatindomänen zeigen dementsprechend meist nur sehr begrenzte lokale Bewegungen ($<0.5 \mu\text{m}$). Im zweiten Teil der Arbeit wurden drei verschiedene Modifikationen des Histons H3 untersucht, wobei die drei Modifikationen einen Nachweis für die verschiedenen Chromatintypen, Euchromatin (me₃-H3K4), konstitutives (me₃-H3K27) und fakultatives Heterochromatin (me₃-H3K27) darstellen. Für die Untersuchungen wurden verschiedene menschliche Leukozyten, Stammzellen aus dem Nabelschnurblut und einige Blutkrebszelllinien, die durch Zugabe verschiedener Chemikalien zur Differenzierung gebracht werden können, herangezogen. Festgestellt wurde dabei, dass das transkriptionell aktive Euchromatin deutlich weiter im Inneren des Zellkerns zu finden ist als die beiden Typen des weniger aktiv transkribierten Heterochromatins, wobei das konstitutive Heterochromatin am weitesten außen, am Rand des Zellkerns, liegt. Bei der Differenzierung der Krebszelllinien, z.B. die promyeloische Leukämiezelllinie HL-60, die mit Retinsäure in Richtung der Granulozyten, mit Vitamin D3 in Richtung der Monozyten differenziert werden kann, in reifere Stadien zeigten sich auch Veränderungen in der Signalverteilung der Histonmodifikationen. Die „gereiften“ Krebszellen wiesen oft eine Signalverteilung auf, die der in normalen Zellen ähnlicher war, als ihrer Ausgangszelllinie.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit sollten sog. „komplexe Sonden“ aus der RNA, genau genommen der mRNA einer Zellpopulation hergestellt werden, um damit in FISH-Experimenten transkriptionell aktive Bereiche zu markieren. Dazu wurde aus den in Frage kommenden Zellen RNA isoliert, die mRNA mit reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, diese amplifiziert, mit Fluorochromen oder Haptenen markiert und daraus

Hybridisierungsmixe hergestellt, die für 2D und 3D Analysen verwendet werden sollten. Nach anfänglich funktionierenden Versuchen trat jedoch das Problem auf, dass die Negativkontrolle (Reaktionsansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase) stets ein Signal ähnlich dem der Positivprobe zeigte, und nicht zu beseitigen war, unabhängig davon welche Amplifikationsmethode und welche Möglichkeiten der DNA-Markierung gewählt wurden. Es wurde daher beschlossen die Versuchsserie abzuschließen, da ein weiteres verfolgen der Ziele zu zeit- und kostenintensiv gewesen wäre.

Aus allen drei Teilen kann also geschlossen werden, dass GC-Gehalt und Gendichte für die Positionierung von DNA-Sequenzen im Zellkern wichtig sind, was frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe bestätigt, über die Rolle der Genexpression kann jedoch letztendlich keine zuverlässige Aussage gemacht werden. Zwar scheinen transkriptionell aktive Bereich weiter innen im Zellkern zu liegen, wie aus den Histon-Analysen deutlich wird, jedoch liefern die anderen beiden Teile der Arbeit hierzu keine Ergebnisse, die eine haltbare Aussage zulassen.

VI. Referenzen

Aagaard, L., G. Laible, et al. (1999). "Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier *Su(var)3-9* encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31." EMBO J **18**(7): 1923-1938.

Andersson, L. C., M. Jokinen, et al. (1979). "Presence of erythrocytic components in the K562 cell line." Int J Cancer **24**(4): 514.

Arents, G., R. W. Burlingame, et al. (1991). "The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10148-10152.

Avner, P. and E. Heard (2001). "X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation." Nat Rev Genet **2**(1): 59-67.

Bannister, A. J., P. Zegerman, et al. (2001). "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain." Nature **410**(6824): 120-124.

Bartova, E., S. Kozubek, et al. (2002). "Nuclear structure and gene activity in human differentiated cells." J Struct Biol **139**(2): 76-89.

Baxter, J., M. Merckenschlager, et al. (2002). "Nuclear organisation and gene expression." Curr Opin Cell Biol **14**(3): 372-376.

Baxter, J., S. Sauer, et al. (2004). "Histone hypomethylation is an indicator of epigenetic plasticity in quiescent lymphocytes." EMBO J **23**(22): 4462-4472.

Belmont, A. S., G. Li, et al. (1999). "Visualization of large-scale chromatin structure and dynamics using the lac operator/lac repressor reporter system." Methods Cell Biol **58**: 203-222.

Bernstein, B. E., M. Kamal, et al. (2005). "Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse." Cell **120**(2): 169-181.

Bernstein, E. and C. D. Allis (2005). "RNA meets chromatin." Genes Dev **19**(14): 1635-1655.

- Bohlander, S. K., V. Muschinsky, et al. (2000). "Molecular analysis of the CALM/AF10 fusion: identical rearrangements in acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma patients." Leukemia **14**(1): 93-99.
- Bolzer, A., G. Kreth, et al. (2005). "Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes." PLoS Biol **3**(5): e157.
- Bornkamm, G. W., C. Berens, et al. (2005). "Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system." Nucleic Acids Res **33**(16): e137.
- Boveri, T. (1909). "Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität." Archiv für Zellforschung **3**: 181-286.
- Brinkman, A. B., T. Roelofsen, et al. (2006). "Histone modification patterns associated with the human X chromosome." EMBO Rep **7**(6): 628-634.
- Brown, A. M., D. K. Mayfield, et al. (2001). "The gene structure and minimal promoter of the human agouti related protein." Gene **277**(1-2): 231-238.
- Brown, J. M. (1977). "The shape of the dose-response curve for radiation carcinogenesis. Extrapolation to low doses." Radiat Res **71**(1): 34-50.
- Brown, J. M., J. Leach, et al. (2006). "Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active." J Cell Biol **172**(2): 177-187.
- Brown, S. W. (1966). "Heterochromatin." Science **151**(709): 417-25.
- Caron, H., B. van Schaik, et al. (2001). "The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains." Science **291**(5507): 1289-1292.
- Chambeyron, S. and W. A. Bickmore (2004). "Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription." Genes Dev **18**(10): 1119-1130.
- Collins, A. J., C. D. Bloomfield, et al. (1978). "Acute promyelocytic leukemia. Management of the coagulopathy during daunorubicin-prednisone remission induction." Arch Intern Med **138**(11): 1677-1680.
- Collins, S. J. (1987). "The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression." Blood **70**(5): 1233-1244.

- Collins, S. J., R. C. Gallo, et al. (1977). "Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture." Nature **270**(5635): 347-349.
- Collins, S. J., F. W. Ruscetti, et al. (1978). "Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(5): 2458-2462.
- Cottier, M., A. Tchirkov, et al. (2004). "Cytogenetic characterization of seven human cancer cell lines by combining G- and R-banding, M-FISH, CGH and chromosome- and locus-specific FISH." Int J Mol Med **14**(4): 483-495.
- Cremer, C. and J. W. Gray (1982). "DNA content of cells with generalized chromosome shattering induced by ultraviolet light plus caffeine." Mutat Res **94**(1): 133-42.
- Cremer, C., T. Cremer, et al. (1976). "Effects of laser uv-microirradiation ($\lambda = 2573 \text{ \AA}$) on proliferation of Chinese hamster cells." Radiat Res **66**(1): 106-121.
- Cremer, M., K. Kupper, et al. (2003). "Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei." J Cell Biol **162**(5): 809-820.
- Cremer, M., J. von Hase, et al. (2001). "Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells." Chromosome Res **9**(7): 541-567.
- Cremer, M., R. Zinner, et al. (2004). "Three dimensional analysis of histone methylation patterns in normal and tumor cell nuclei." Eur J Histochem **48**(1): 15-28.
- Cremer M., Y. Markaki et al. (2012). "Chromatin in the cell nucleus: Higher-order Organisation." In: eLS Cell Biology.
- Cremer, T. and C. Cremer (2001). "Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells." Nat Rev Genet **2**(4): 292-301.
- Cremer, T., K. Kupper, et al. (2004). "Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function." Biol Cell **96**(8): 555-567.
- Cremer T., Y. Markaki et al. (2011). "Chromosome Territory Organization within the nucleus." Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine: Epigenetic Regulation and Epigenomics. Second Edition.

Crick, F.H.C. (1958). „On Protein Synthesis.“ Symposium of the Society for Experimental Biology 12: 138-163.

Crick F.H.C. (1970). „Central Dogma of Molecular Biology.“ Nature 227: 561-563

Crick F.H.C. (1962). „The Genetic Code.“ Scientific American 207(4): 66-74

Crick F.H.C. (1966). „The Genetic Code III.“ Scientific American 215(4): 55-62

Dehe, P. M., B. Dichtl, et al. (2006). "Protein interactions within the Set1 complex and their roles in the regulation of histone 3 lysine 4 methylation." J Biol Chem **281**(46): 35404-35412.

De Wit E., W. de Laat (2012). "a decade of 3C technologies: insights into nuclear organization." Genes Dev. 2012 (26): 11-24.

Dietzel, S., K. Schiebel, et al. (1999). "The 3D positioning of ANT2 and ANT3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity." Exp Cell Res **252**(2): 363-375.

DiMartino, J. F., P. M. Ayton, et al. (2002). "The AF10 leucine zipper is required for leukemic transformation of myeloid progenitors by MLL-AF10." Blood **99**(10): 3780-3785.

Dreyling, M. H., J. A. Martinez-Climent, et al. (1996). "The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4804-4809.

Dundr, M. and T. Misteli (2001). "Functional architecture in the cell nucleus." Biochem J **356**(Pt 2): 297-310.

Earnshaw, W. C. and R. L. Bernat (1991). "Chromosomal passengers: toward an integrated view of mitosis." Chromosoma **100**(3): 139-146.

Fiegler, H., P. Carr, et al. (2003). "DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones." Genes Chromosomes Cancer **36**(4): 361-374.

Francastel, C., D. Schubeler, et al. (2000). "Nuclear compartmentalization and gene activity." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(2): 137-143.

- Galiova, G., E. Bartova, et al. (2004). "Nuclear topography of beta-like globin gene cluster in IL-3-stimulated human leukemic K-562 cells." Blood Cells Mol Dis **33**(1): 4-14.
- Gallagher, R., S. Collins, et al. (1979). "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia." Blood **54**(3): 713-733.
- Gorisch, S. M., M. Wachsmuth, et al. (2005). "Histone acetylation increases chromatin accessibility." J Cell Sci **118**(Pt 24): 5825-5834.
- Greif, P. A., B. Tizazu, et al. (2008). "The leukemogenic CALM/AF10 fusion protein alters the subcellular localization of the lymphoid regulator Ikaros." Oncogene **27**(20): 2886-2896.
- Grewal, N., S. Nagpal, et al. (1997). "Ligand-induced receptor dimerization may be critical for signal transduction by choriogonadotropin." Biophys J **73**(3): 1190-1197.
- Guarente, L. (2000). "Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging." Genes Dev **14**(9): 1021-1026.
- Heitz, E. (1928). "Das Heterochromatin der Moose. I." Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik **69**: 762-818.
- Igo-Kemenes, T., W. Horz, et al. (1982). "Chromatin." Annu Rev Biochem **51**: 89-121.
- Jenuwein, T. (2001). "Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases." Trends Cell Biol **11**(6): 266-273.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-1080.
- Katan, M., R. Rodriguez, et al. (2003). "Structural and mechanistic aspects of phospholipase Cgamma regulation." Adv Enzyme Regul **43**: 77-85.
- Kim, S. H., M. C. Kook, et al. (2004). "Optimal conditions for the retrieval of CD4 and CD8 antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues." J Mol Histol **35**(4): 403-408.

- Koeffler, H. P. and D. W. Golde (1980). "Human myeloid leukemia cell lines: a review." Blood **56**(3): 344-350.
- Kornberg, R. D. (1977). "Structure of chromatin." Annu Rev Biochem **46**: 931-954.
- Kosak, S. T., D. Scalzo, et al. (2007). "Coordinate gene regulation during hematopoiesis is related to genomic organization." PLoS Biol **5**(11): e309.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.
- Kupper, K., A. Kolbl, et al. (2007). "Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression." Chromosoma **116**(3): 285-306.
- Kurz, A., S. Lampel, et al. (1996). "Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories." J Cell Biol **135**(5): 1195-1205.
- Lachner, M. and T. Jenuwein (2002). "The many faces of histone lysine methylation." Curr Opin Cell Biol **14**(3): 286-298.
- Lachner, M., R. Sengupta, et al. (2004). "Trilogies of histone lysine methylation as epigenetic landmarks of the eukaryotic genome." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **69**: 209-218.
- Lehnertz, B., Y. Ueda, et al. (2003). "Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin." Curr Biol **13**(14): 1192-1200.
- Liang, J. C., Y. Ning, et al. (1999). "Spectral karyotypic study of the HL-60 cell line: detection of complex rearrangements involving chromosomes 5, 7, and 16 and delineation of critical region of deletion on 5q31.1." Cancer Genet Cytogenet **113**(2): 105-109.
- Lichter, P., T. Cremer, et al. (1988). "Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9664-9668.
- Lieberman-Aiden et al. (2009). "Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome". Science **326**(289):289-293

- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lossos, I. S., D. K. Czerwinski, et al. (2003). "Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies." Leukemia **17**(4): 789-795.
- Lozzio, B. B. (1971). "Hematopoietic alterations produced by long-term treatment with phytohemagglutinin." Experientia **27**(9): 1080-1081.
- Lozzio, B. B. and C. B. Lozzio (1979). "Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line." Leuk Res **3**(6): 363-370.
- Lozzio, B. B., C. B. Lozzio, et al. (1981). "A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin." Proc Soc Exp Biol Med **166**(4): 546-550.
- Lukasova, E., Z. Koristek, et al. (2005). "Methylation of histones in myeloid leukemias as a potential marker of granulocyte abnormalities." J Leukoc Biol **77**(1): 100-111.
- Lyon, M. F. (1999). "Imprinting and X-chromosome inactivation." Results Probl Cell Differ **25**: 73-90.
- Mahy, N. L., P. E. Perry, et al. (2002). "Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH." J Cell Biol **159**(5): 753-763.
- Mahy, N. L., P. E. Perry, et al. (2002). "Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories." J Cell Biol **157**(4): 579-589.
- Markaki Y., M. Günkel et al. (2011). "Functional nuclear organisation of transcription and DNA Replication: a topographical marriage between chromatin domains and the interchromatin compartment" Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology. LXXV.
- Markaki Y., D. Smeets et al. (2012). "The potential of 3D-FISH and super resolution structured illumination microscopy for studies of 3D nuclear architecture. Bioessays.
- Martens, J. H., R. J. O'Sullivan, et al. (2005). "The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome." EMBO J **24**(4): 800-812.
- Melcher, M., M. Schmid, et al. (2000). "Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression." Mol Cell Biol **20**(10): 3728-3741.

Miao, C. Y., H. H. Xie, et al. (2006). "Blood pressure variability is more important than blood pressure level in determination of end-organ damage in rats." J Hypertens **24**(6): 1125-1135.

Moore, G. E. and H. Kitamura (1968). "Cell line derived from patient with myeloma." N Y State J Med **68**(15): 2054-2060.

Ng, H. H., D. N. Ciccone, et al. (2003). "Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1820-1825.

Nielsen, J. A., L. D. Hudson, et al. (2002). "Nuclear organization in differentiating oligodendrocytes." J Cell Sci **115**(Pt 21): 4071-4079.

Okada, Y., Q. Feng, et al. (2005). "hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis." Cell **121**(2): 167-178.

Okada, Y., Q. Jiang, et al. (2006). "Leukaemic transformation by CALM-AF10 involves upregulation of Hoxa5 by hDOT1L." Nat Cell Biol **8**(9): 1017-1024.

Okamoto, I., A. P. Otte, et al. (2004). "Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development." Science **303**(5658): 644-649.

Olins, A. L. and D. E. Olins (1974). "Spheroid chromatin units (v bodies)." Science **183**(4122): 330-332.

Olins, D. E. and A. L. Olins (2005). "Granulocyte heterochromatin: defining the epigenome." BMC Cell Biol **6**: 39.

Ostrem, V. K. and H. F. DeLuca (1987). "The vitamin D-induced differentiation of HL-60 cells: structural requirements." Steroids **49**(1-3): 73-102.

Ostrem, V. K., W. F. Lau, et al. (1987). "Induction of monocytic differentiation of HL-60 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D analogs." J Biol Chem **262**(29): 14164-14171.

- Ostrem, V. K., Y. Tanaka, et al. (1987). "24- and 26-homo-1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential activity in inducing differentiation of human leukemia cells HL-60 in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(9): 2610-2614.
- Paik, W. K. and S. Kim (1971). "Protein methylation." Science **174**(5): 114-119.
- Panning, B., J. Dausman, et al. (1997). "X chromosome inactivation is mediated by Xist RNA stabilization." Cell **90**(5): 907-916.
- Pinkel, D., J. Landegent, et al. (1988). "Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 9138-9142.
- Plath, K., J. Fang, et al. (2003). "Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation." Science **300**(5616): 131-135.
- Pombo, A., P. Cuello, et al. (1998). "Regional and temporal specialization in the nucleus: a transcriptionally-active nuclear domain rich in PTF, Oct1 and PIKA antigens associates with specific chromosomes early in the cell cycle." EMBO J **17**(6): 1768-1778.
- Rabl, C. (1885). "Über Zelltheilung." Morphologisches Jahrbuch 10: 214-330.
- Riggs, A. D. and P. A. Jones (1983). "5-methylcytosine, gene regulation, and cancer." Adv Cancer Res 40: 1-30.
- Rea, S., F. Eisenhaber, et al. (2000). "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases." Nature **406**(6796): 593-599.
- Reinberg, D., S. Chuikov, et al. (2004). "Steps toward understanding the inheritance of repressive methyl-lysine marks in histones." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **69**: 171-182.
- Rice, J. C., S. D. Briggs, et al. (2003). "Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains." Mol Cell **12**(6): 1591-1598.
- Rouquette, J., C. Cremer et al. (2010). "Functional nuclear architecture studied by microscopy: present and future" International Review of Cell and Molecular Biology, Volume 282.
- Santos-Rosa, H., R. Schneider, et al. (2002). "Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3." Nature **419**(6905): 407-411.

Schardin, M., T. Cremer, et al. (1985). "Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories." Hum Genet **71**(4): 281-287.

Scheuermann, M. O., J. Tajbakhsh, et al. (2004). "Topology of genes and nontranscribed sequences in human interphase nuclei." Exp Cell Res **301**(2): 266-279.

Schneider, R., A. J. Bannister, et al. (2004). "Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes." Nat Cell Biol **6**(1): 73-77.

Schubeler, D., D. M. MacAlpine, et al. (2004). "The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote." Genes Dev **18**(11): 1263-1271.

Sheardown, S. A., S. M. Duthie, et al. (1997). "Stabilization of Xist RNA mediates initiation of X chromosome inactivation." Cell **91**(1): 99-107.

Shumaker, D. K., T. Dechat, et al. (2006). "Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(23): 8703-8708.

Silva, J., W. Mak, et al. (2003). "Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes." Dev Cell **4**(4): 481-495.

Simpson, R. T. (1978). "Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones." Biochemistry **17**(25): 5524-5531.

Sims, R. J., 3rd, K. Nishioka, et al. (2003). "Histone lysine methylation: a signature for chromatin function." Trends Genet **19**(11): 629-639.

Skalnikova, M., S. Kozubek, et al. (2000). "Spatial arrangement of genes, centromeres and chromosomes in human blood cell nuclei and its changes during the cell cycle, differentiation and after irradiation." Chromosome Res **8**(6): 487-499.

Spector, D. L. (2001). "Nuclear domains." J Cell Sci **114**(Pt 16): 2891-2893.

Stadler, S., V. Schnapp, et al. (2004). "The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation." BMC Cell Biol **5**(1): 44.

Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-45.

Strahl, B. D., R. Ohba, et al. (1999). "Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14967-14972.

Strickfaden H., T. Cremer et al. (2012). "Higher order chromatin organization and dynamics". Genome organization and function in the Cell nucleus, First edition. Wiley VCH

Sun, H. B., J. Shen, et al. (2000). "Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei." Biophys J **79**(1): 184-190.

Sundstrom, C. and K. Nilsson (1976). "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)." Int J Cancer **17**(5): 565-577.

Szabo, A., C. M. Perou, et al. (2004). "Statistical modeling for selecting housekeeper genes." Genome Biol **5**(8): R59.

Telenius, H., N. P. Carter, et al. (1992). "Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer." Genomics **13**(3): 718-725.

Telenius, H., A. H. Pelmeur, et al. (1992). "Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes." Genes Chromosomes Cancer **4**(3): 257-263.

Trojer, P. and D. Reinberg (2007). "Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature?" Mol Cell **28**(1): 1-13.

Turner, B. M. (2000). "Histone acetylation and an epigenetic code." Bioessays **22**(9): 836-845.

van Driel, R., P. F. Fransz, et al. (2003). "The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels." J Cell Sci **116**(Pt 20): 4067-4075.

Vandesompele, J., K. De Preter, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.

Verschure, P. J., I. van Der Kraan, et al. (1999). "Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories." J Cell Biol **147**(1): 13-24.

Volpi, E. V., E. Chevret, 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.

Volpi, E. V., R. Vatcheva, et al. (1996). "More detailed characterization of some of the HL60 karyotypic features by fluorescence in situ hybridization." Cancer Genet Cytogenet **87**(2): 103-106.

Williams, R. R., S. Broad, et al. (2002). "Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei." Exp Cell Res **272**(2): 163-175.

Yaffe, D. and O. Saxel (1977). "A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation." Differentiation **7**(3): 159-166.

Zinner, R., H. Albiez, et al. (2006). "Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones." Histochem Cell Biol **125**(1-2): 3-19.

VII. Abbildungsverzeichnis

- Abb. I.1.: Frühere Vorstellung der DNA-Kompaktierung ausgehend von der Doppelhelix bis hin zum Metaphase-Chromosom
- Abb. I.2.: Schematische Darstellung des CT-IC-Modells
- Abb. I.3.: Darstellung der Fusionsprodukte von CALM und AF10
- Abb. I.4.: Schematische Darstellung des Vectors pRTS-1
- Abb. I.5.: Schematische Darstellung des modifizierten Vectors pRTS-1 mit dem CALM-AF10 Fusionsgen
- Abb. I.6.: Platten für Low Density Arrays
- Abb. III.1.1.: DG75-Zellen 24 Std. nach Gabe von Doxycyclin im Labor der AG Bohlander
- Abb. III.1.2.: RNA isoliert aus drei verschiedenen Zelltypen
- Abb. III.1.3.: Semiquantitative PCR-Reaktion für GAPDH
- Abb. III.1.4.: Semiquantitative PCR-Reaktion für CALM-AF10
- Abb. III.1.5.: Semiquantitative PCR-Reaktion für CALM-AF10 nach DNase Verdau
- Abb. III.1.6.: Semiquantitative PCR-Reaktion für CALM-AF10 durchgeführt von Medhanie Mulaw, AG Bohlander
- Abb. III.1.7.: Semiquantitative PCR-Reaktion für IFI44 mit cDNA aus uninduzierten und induzierten Zellen
- Abb. III.1.8.: Semiquantitative PCR-Reaktion für BIRC4BP mit cDNA aus uninduzierten und induzierten Zellen
- Abb. III.1.9.: Semiquantitative PCR-Reaktion für RAP1A mit cDNA aus uninduzierten und induzierten Zellen
- Abb. III.1.10.: Semiquantitative PCR-Reaktion für IFITM1 mit cDNA aus uninduzierten und induzierten Zellen
- Abb. III.1.11.: Semiquantitative PCR-Reaktion für DEPDC1 mit cDNA aus uninduzierten und induzierten Zellen
- Abb. III.1.12.: Semiquantitative PCR-Reaktion für CENPE mit cDNA aus uninduzierten und induzierten Zellen
- Abb. III.1.13.: Ideogramm von Chromosom 1 mit Vergrößerung des Abschnitts, auf dem die ausgewählten BAC-Klone hybridisieren
- Abb. III.1.14.: Kontrolle der isolierten BAC-DNAs auf einem Agarosegel
- Abb. III.1.15.: Amplifikation der BAC-DNAs mittels primärer DOP-PCR
- Abb. III.1.16.: Markierung der BAC-DNAs mittels Label- DOP-PCR
- Abb. III.1.17.: korrekte Hybridisierung (Pfeil) des BACs für das SLC10A2-Gens auf dem Chromosom 13
- Abb. III.1.18.: BAC-Sonde für IFITM1 und Paint für Chromosom 11
- Abb. III.1.19.: BAC-Sonde für BIRC4BP und Paint für Chromosom 17. Starke Kreuzhybridisierung der BAC-Sonde mit anderen Chromosomen
- Abb. III.1.20.: 2D-FISH der ausgewählten BAC-Sonden für Chromosom 1
- Abb. III.1.21.: 3D-FISH der ausgewählten BAC-Sonden für Chromosom 1 auf Interphase-Zellkernen uninduzierter und induzierter Zellen
- Abb. III.1.22.: Radiale Signalverteilung in Interphase-Zellkernen uninduzierter Zellen
- Abb. III.1.23.: Radiale Signalverteilung in Interphase-Zellkernen induzierter Zellen
- Abb. III.1.24.: Per Hand ausgezählte Signalverteilung der BAC-Sonden im Bezug zum Zellkernrand in uninduzierten Zellen
- Abb. III.1.25.: Per Hand ausgezählte Signalverteilung der BAC-Sonden im Bezug zum Zellkernrand in induzierten Zellen
- Abb. III.1.26.: Verteilung der BAC-Signale innerhalb der Territorien in Zellkernen uninduzierter Zellen

- Abb. III.1.27.: Verteilung der BAC-Signale innerhalb der Territorien in Zellkernen induzierter Zellen
- Abb. III.1.28.: Darstellung der Δ -CT-Werte für die drei untersuchten Genregionen
- Abb. III.1.29.: Darstellung der Δ -CT-Werte der untersuchten Haushaltsgene
- Abb. III.2.1.: Konfokalbilder von me3-H3K4 Immunfluoreszenzexperimenten
- Abb. III.2.2.: EDMT-Auswertung der Signalverteilungen von me3-H3K4 in normalen Zellkernen
- Abb. III.2.3.: Konfokalbilder von me3-H3K4 Immunfluoreszenzexperimenten mit undifferenzierten und differenzierten Zellkernen von Krebszelllinien
- Abb. III.2.4.: EDMT-Auswertung der Signalverteilungen von me3-H3K4 in Zellkernen undifferenzierter und differenzierter Krebszellen
- Abb. III.2.5.: Konfokalbilder von me3-H3K9 Immunfluoreszenzexperimenten mit normalen weiblichen Zellkernen
- Abb. III.2.6.: EDMT-Auswertung der Signalverteilungen von me3-H3K9 in normalen Zellkernen
- Abb. III.2.7.: Konfokalbilder von me3-H3K9 Immunfluoreszenzexperimenten mit undifferenzierten und differenzierten Zellkernen von Krebszelllinien
- Abb. III.2.8.: EDMT-Auswertung der Signalverteilungen von me3-H3K9 in Zellkernen undifferenzierter und differenzierter Krebszellen
- Abb. III.2.9.: Clusteranalyse von me3-H3K9-Signalen in normalen und Krebszellen vor und nach der Differenzierung
- Abb. III.2.10.: Konfokalbilder von me3-H3K27 Immunfluoreszenzexperimenten mit normalen Zellkernen
- Abb. III.2.11.: EDMT-Auswertung der Signalverteilungen von me3-H3K27 in normalen Zellkernen
- Abb. III.2.12.: Konfokalbilder von me3-H3K27 Immunfluoreszenzexperimenten mit undifferenzierten und differenzierten Zellkernen von Krebszelllinien
- Abb. III.2.13.: EDMT-Auswertung der Signalverteilungen von me3-H3K27 in Zellkernen undifferenzierter und differenzierter Krebszellen
- Abb. III.3.1.: Differenzierung von HL-60-Zellen mit Retinsäure
- Abb. III.3. 2.: Differenzierung von C2C12-Zellen
- Abb. III.3.3.: MEL-Zellen mit lymphoider Morphologie
- Abb. III.3.4.: Denaturierendes RNA-Formaldehyd-Gel zur RNA-Isolation
- Abb. III.3.5.: RT-PCR gegen Mmu Hbb-1
- Abb. III.3.6.: Kontroll-GAPDH-PCR für die cDNA aus humanen Fibroblasten
- Abb. III.3.7.: Beispiel Gel für eine geglückte Genomphi-Reaktion
- Abb. III.3.8.: Beispiel-Gel für eine Nicktranslation aus + und –RT-Ansätzen aus Fibroblasten cDNA
- Abb. III.3.9.: +RT Sonde aus differenzierten MEL-Zellen auf Maus-Metaphase-Chromosomen
- Abb. III.3.10.: a) +RT-Sonde aus differenzierten MEL-Zellen auf Maus-Metaphase-Chromosomen; b) –RT Kontrolle aus differenzierten MEL-Zellen auf Maus-Metaphase-Chromosomen
- Abb. III.3.11.: komplexe Sonden aus humanen Fibroblasten auf Metaphase-Chromosomen
- Abb. III.3.12.: Bänderungsmuster einiger menschlicher Chromosomen mit cDNA aus Fibroblasten
- Abb. III.3.13.: Gleichzeitige Hybridisierung von cDNA aus humanen Fibroblasten und Lymphozyten auf Metaphase-Chromosomen
- Abb. III.3.14.: 3D-Hybridisierung komplexer Sonden auf a) menschliche Fibroblasten-Zellkerne und b) menschliche Lymphozyten-Zellkerne

- Abb. III.3.15.: Komplexe Sonden aus HL-60-Zellen
- Abb. III.3.16.: +RT Ansatz aus undifferenzierten HL-60-Zellen. RNA wurde vor der reversen Transkription mit DNase I behandelt und mit RNeasy Kit aufgereinigt
- Abb. III.3.17.: -RT Ansatz aus undifferenzierten HL-60-Zellen. RNA wurde vor der reversen Transkription mit DNase I behandelt und mit RNeasy Kit aufgereinigt
- Abb. III.3.18.: Wiederholung der Herstellung von komplexen Sonden aus Mensch und Maus mit Genomiphi und Nicktranslation
- Abb. III.3.19.: cDNA-Amplifikation mit primärer DOP-PCR und Label DOP-PCR
- Abb. III.3.20.: Aufreinigung der Produkte aus Primärer DOP-PCR
- Abb. III.3.21.: Amplifikation der cDNA nur durch Label-PCR
- Abb. III.3.22.: Durchführung von Nicktranslation nach primärer DOP-PCR
- Abb. III.3.23.: Gele der primären und Label-DOP-PCR
- Abb. III.3.24.: 2D-Hybridisierung der mit 5 stringenten DOP-PCR-Zyklen hergestellten Sonden
- Abb. III.3.25.: Durchführung von primärer und label DOP-PCR mit cDNA aus differenzierten MEL-Zellen
- Abb. IV.1.: RIDGEs aus „all tissues“ aus Caron et al. 2001

VIII. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AF10	ALL 1 fused gene from chromosome 10
AG	Arbeitsgruppe
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
α	anti-
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CALM	Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia gene
CD	Cluster of differentiation
cDNA	copyDNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
CT	Chromosomenterritorium
Ct	Cycle over Threshold
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPDC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNP	Dinitrophenol
dNTP	desoxy-Nucleotidtriphosphat
DOP	Degenerierte Oligonucleotidprimer
EDMT	Enhanced Distance Measurement Tool
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat - Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
IC	Interchromatin Kompartiment
kb	Kilobase
Konz.	Konzentration

LB	Luria Bertani
LDA	Low Density Array
mA	Milliampere
Mb	Megabase
MHC	Major histocompatibility complex
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
NT	Nicktranslation
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RA	Retinsäure
RGB	Rot-Grün-Blau
Rpm	Umdrehungen pro min.
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RQ	Relative Quantifizierung
RT	Real Time bzw. reverse Transkription
sec.	Sekunde
SSC	Sodium Saline Citrate
Std.	Stunde
TAE	Tris-acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus DNA-Polymerase
TPA	Phorbol – 12- myristate 13-acetate
TE	Tris-EDTA
Triton X-100	Octylphenoldecaethylenglycolether
Tween 80	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UTR	Untranslated region
V	Volt
VD3	1-25-Dihydroxyvitamin D3

X. Chemikalien- und Laborbedarfsliste

Chemikalien	Firma
Agar, select	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agarose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agarose SeaKem ME	FMC Rockland, Maine, USA
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
BSA (für SSC-Lösungen)	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
BSA (für PBS-Lösungen)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloramphenicol (Stock: 20 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAPI, 5 μ g/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dextransulfat	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Doxycyclin 50 mg/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fetales Kälberserum	Seromed Biochrom, Berlin
Histopaque 1191, 1077	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formamid	Merck, Darmstadt
Gel-loading-Puffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glucose	Fluka AG, St. Gallen, Schweiz
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Braun, Melsungen
Heparin	Braun, Melsungen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat (KAc)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck, Darmstadt

Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natronlauge, 1N	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin / Streptomycin	Seromed Biochrom, Berlin
Pepton	Gerbu, Gaiberg
PeqLab Gold	PeqLab, Erlangen
Phytohemagglutinin	Braun, Melsungen
Polylysin-Hydrobromid, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Puromycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Quiaquick Kit	Qiagen
Retinsäure (1 mM)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNeasy Kit	Qiagen
RPMI 1640 Medium	Calbiochem, Darmstadt
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt
Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim, Krefeld
TPA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris-HCl, pH = 8,0	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Calbiochem, Darmstadt
1,25-Dihydroxy-Vitamin D3	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Enzyme	Firma
DNase I	Roche, Mannheim
DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Gene Expression Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, CA
Genomiphi-Kit	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Pepsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNaseA, 1%	Roche, Mannheim
RNaseH	USB Corporation, Cleveland Ohio
RNA Guard (RNase Inhibitor)	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig

Superscript II Reverse Transkriptase (RNaseH-)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Taq-Polymerase	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig

Nukleotide, Primer, DNA	Firma
6 MW-Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg
Biotin-16-dUTP	Home labeled
Human Cot-1 DNA	Gibco-BRL, Karlsruhe
Digoxigenin-16-dUTP	Home labeled
DNP-16-dUTP	Home labeled
dNTPs (2,5 mM each)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
DOP2-Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg
DOP3-Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg
dTTP (1 mM)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
dATP (100 mM)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
dCTP (100 mM)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
dGTP (100 mM)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Gene Ruler 100 bp-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
Lambda/HindIII-Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Low Density Array-Platten	Applied Biosystems, Foster City, CA
Oligo-dTs	MWG Biotech AG, Ebersberg
PCR-Primer (genspezifisch)	MWG Biotech AG, Ebersberg
Tamra-16-dUTP	Home labeled

Antikörper und Fluorochrome	Firma
Antifade Medium Vectashield	Vector, Burlingame CA, USA
Donkey α Human-Cy3	Dianova, Hamburg
Avidin-Alexa-488	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Goat α Avidin-FITC	Vector, Burlingame CA, USA
Goat α Mouse-Cy5	Dianova, Hamburg

Goat α Rabbit-Texas Red	Dianova, Hamburg
Human α Centromer	Euroimmun, Lübeck
Lineage Cocktail	eBioscience, San Diego
Mouse α Dig-Cy5	Dianova, Hamburg
Rabbit α DNP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rabbit α H3K4-me3	Abcam, Camebridge
Rabbit α H3K9-me3	Upstate, Lake Placid
Rabbit α H3K27-me3	Abcam, Camebridge
Sheep α Dig-FITC	Dianova, Hamburg
Streptavidin-Cy5	FMC Rockland, Maine, USA

Reagenzien für PCR	Firma
5x Erststrangpuffer	Invitrogen, Groningen, Niederlande
5x Puffer D	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Cetus II-Puffer	Roche, Mannheim
Detergenz W1	Gibco BRL, Karlsruhe
MgCl ₂	Roche, Mannheim
PCR-Puffer 10x	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig

Puffer / Lösungen	Bestandteile	Anmerkungen
ACG-Mix (2 mM each)	dATP (100 mM) dCTP (100 mM) dGTP (100 mM) H ₂ O bidest.	20 μ l dATP 20 μ l dCTP 20 μ l dGTP 940 μ l H ₂ O
Agarose Gel (1 %)	1 % Agarose in TAE Puffer	2 g in 200 ml TAE Puffer, in der Mikrowelle aufkochen bis die Lösung klar ist, heiß gießen

Agarose Gel (1,8 %)	1,8 % Agarose in TAE Puffer	3,6 g in 200 ml TAE Puffer, in der Mikrowelle aufkochen bis die Lösung klar ist, heiß gießen
Alkalischer Lysispuffer 1	50 mM Glucose 2 mM Tris-HCl-Lösung, pH=8,0 10 mM EDTA-Lösung, pH=8,0	<u>50 ml Ansatz:</u> 2,5 ml 1M Glucose 100 µl Tris-HCl 1 ml 0,5M EDTA ad 50 ml mit H ₂ O dest.
Alkalischer Lysispuffer 2	0,2 M NaOH 1 % SDS H ₂ O dest.	<u>100 ml Ansatz:</u> 20 ml 1M NaOH 10 ml 10% SDS 70 ml H ₂ O dest.
Alkalischer Lysispuffer 3	3M KAc Essigsäure pH=5,2	<u>100 ml Ansatz:</u> 29,44 g KAc 100 ml H ₂ O pH mit Essigsäure auf 5,2 einstellen
Antikörperverdünnungslösung (in PBS-T)	2 % BSA in PBS-T	<u>50 ml Ansatz:</u> 1 g BSA 50 ml PBS-T
Antikörperverdünnungslösung (in SSC-T)	2 % BSA in 4xSSC-T	<u>50 ml Ansatz:</u> 1 g BSA 50 ml 4xSSC-T
Blockierungslösung (in PBS/T)	4 % BSA in PBS/T	<u>100 ml Ansatz:</u> 4g BSA 100 ml PBS/T
Blockierungslösung (in SSC/T)	4 % BSA in 4xSSC/T	<u>100 ml Ansatz:</u> 4 g BSA 100 ml 4xSSC/T

DAPI-Färbelösung (0,05 µg/ml)	DAPI-Stammlösung (500 µg/ml)	10 µl DAPI-Stammlösung in 100 ml 4x SSC/T
DEPC-Wasser	DEPC H ₂ O dest.	<u>1 l Ansatz:</u> 1000 ml H ₂ O dest. 1 ml DEPC unter der Abzugshaube lösen, 30-45 min rühren, autoklavieren
dTTP (1 mM)	dTTP (100 mM) H ₂ O bidest.	10 µl dTTP 990 µl H ₂ O
2xDNase-Puffer I für DNA- Verdau	Tris-HCl, pH 7,5 1 M MgCl ₂ DEPC-behandeltes Wasser	<u>1 ml Ansatz:</u> 80 µl Tris-HCl, pH 7,5 12 µl MgCl ₂ (1M) 908 µl DEPC- behandeltes Wasser
Doxycyclin	Doxycyclin H ₂ O dest.	<u>Stock-Solution(50mg/ml):</u> 46 mg Doxycyclin 920 µl H ₂ O dest. <u>1:100-Verdünnung</u> <u>(0,5 mg/ml):</u> 10 µl Stock-Solution 990 µl H ₂ O dest.
Ethanol (70 %)	Ethanol (100 %) H ₂ O dest.	<u>100 ml Ansatz:</u> 70 ml 100 % Ethanol 30 ml H ₂ O dest.
Ethanol (80 %)	Ethanol (100 %) H ₂ O dest.	<u>100 ml Ansatz:</u> 80 ml 100 % Ethanol 20 ml H ₂ O dest.
Formamid-Lösung (50 %) in 2xSSC	Formamid 2x SSC	<u>1 l Ansatz:</u> 500 ml Formamid 500 ml 2xSSC

Glycerin-Lösung (20 %)	Glycerin 1xP BS	<u>200 ml Ansatz:</u> 160 ml 1xPBS 40 ml Glycerin
HCl-Lösung (0,1 N)	1N HCl H ₂ O dest.	<u>200 ml Ansatz:</u> 20 ml 1N HCl 180 ml H ₂ O dest.
Hybridisierungs-Mastermix	20 % Dextransulfat in 2xSSC	8 g Dextransulfat in 40 ml 2xSSC lösen, vortexen, mit 0,45 µm Filter filtrieren
Label-ACG-Mix (2 mM each)	je 100 mM dATP, dCTP, dGTP	<u>500 µl Ansatz:</u> je 10 µl ATP, CTP, GTP 470 µl PCR-H ₂ O
Luria-Bertani-Nährmedium	NaCl Hefe-Extrakt Peptone	10 g NaCl 5 g Hefe-Extrakt 10 g Peptone ad 1 l H ₂ O bidest. pH auf 7,0 einstellen, Medium autoklavieren
Methanoleisessig	Methanol : Eisessig 3:1	750 ml Methanol und 250 ml Eisessig
50 mM MgCl₂-Lösung	1xPBS 1M MgCl ₂	<u>200 ml Ansatz:</u> 190 ml 1xPBS 10 ml MgCl ₂
MOPS-Puffer (10x)	3-Morpholino-Propan- sulfonsäure Na-Acetat EDTA	200 mM 3-Morpholino- Propan-sulfonsäure 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA mit 10 M NaOH auf pH 7,0 einstellen, lichtgeschützt

NT-Puffer	1 M Tris-HCl (pH7,5) 1 M MgCl ₂ BSA	<u>100 ml Ansatz:</u> 50 ml 1M Tris-HCl 50 mg BSA 45 ml H ₂ O
Paraformaldehyd-Lösung (1 %)	Paraformaldehyd 0,3xPBS	1 g PFA-Pulver unter aufkochen in 100ml PBS lösen, bis Lösung klar wird. Anschließend abkühlen.
Paraformaldehyd-Lösung (4 %)	Paraformaldehyd 0,3x PBS	4 g PFA-Pulver unter aufkochen in 100 ml PBS lösen, bis Lösung klar wird. Anschließend abkühlen.
PBS-Puffer	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄	<u>20x PBS:</u> 320 g NaCl 8 g KCl 57,6 g Na ₂ HPO ₄ 9,6 g KH ₂ PO ₄ ad 2 l H ₂ O bidest. mit HCl auf pH 7,4 einstellen, 1x PBS Aliquots autoklavieren
0,3 x PBS	1x PBS H ₂ O dest.	<u>500 ml Ansatz:</u> 350 ml H ₂ O dest. 150 ml 1xPBS
PBS/T-Puffer (0,01 % Tween)	1x PBS Tween 20	<u>1 l Ansatz:</u> 1000 ml 1xPBS 100 µl Tween 20

Pepsin-Lösung	H ₂ O dest. 1 M HCl Pepsin	<u>100 ml Ansatz:</u> 99 ml H ₂ O dest. 1 ml 1M HCl 20 µl Pepsin vorwärmen auf 37°C
Polylysin-Lösung	Polylysin H ₂ O bidest.	4 ml H ₂ O bidest. 500 µl Polylysin
RPMI 1640 Komplettmedium	RPMI 1640 Medium FCS Penicillin/Streptomycin Puromycin	450 ml RPMI 50 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 250 bzw. 500 µl Puromycin
SSC-Puffer (pH 7,0)	150 mM NaCl 15 mM Na-Citrat	350,6 g NaCl 176,4 g Na-Citrat ad 2 l H ₂ O bidest. mit NaOH pH 7,0 einstellen, 4x, 2x, 0,1x SSC- Aliquots verdünnen und autoklavieren
SSC/T-Puffer (0,2 % Tween)	4x SSC Tween 20	<u>1 l Ansatz:</u> 1000 ml 4xSSC 2 ml Tween 20
TAE-Puffer (pH 8,0)	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA	<u>50x TAE:</u> 242 g Tris 18,6 g EDTA 57,1 ml Eisessig ad 1 l H ₂ O bidest.

TE-Puffer	Tris, pH 7,8 1 mM EDTA	<u>50 ml Ansatz:</u> 500 µl Tris, pH 7,8 100 µl EDTA 49,4 ml bidest H ₂ O
TritonX-100-Lösung (0,05 %)	1x PBS TritonX-100	<u>1 l Ansatz:</u> 1000 ml 1xPBS 500 µl TritonX-100
TritonX-100-Lösung (0,5 %)	1x PBS TritonX-100	<u>200 ml Ansatz:</u> 199 ml 1xPBS 1 ml TritonX-100

Geräte	Typ	Hersteller
Brutschrank		Memmert, Schwabach
CO₂-Inkubator	Typ B5060	Heraeus, Hanau
Dampfsterilisator	Varioklav	H+P Labortechnik GmbH
Fotoanlage		MWG Biotech, Ebersberg
Gelkammern	Easy Cast #D1A	Owl, Portsmouth, USA
Heizblocks	Thermoblock TDB-120 Thermomixer 5436 Thermomixer comfort	G.Kister; Eppendorf, Hamburg; Eppendorf, Hamburg
Inkubatoren	Certomat® HK Certomat® R TH25	B.Braun Biotech, Göttingen; B.Braun Biotech, Göttingen; Bachhofer
Microfluidic Card Sealer		Applied Biosystems, Foster City, CA
PCR-Maschine	Techne Progene	Thermo-DUX, Wertheim
Photoanlage		MWG Biotech, Ebersberg

Photometer	Gene Quant II	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Real-Time PCR Gerät	ABI Prism 7900HT	Applied Biosystems, Foster City, CA
Spannungsgeber	E835	Consort
Sterilbank	Airflow	Biohit
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Biocel	Millipore, Schwalbach
Zentrifugen	Biofuge pico Centrifuge 5415C Rotanta/S Mikro 120 Vacuumconcentrator Multifuge 3L	Heraeus, Hanau; Eppendorf, Hamburg; Hettich, Tuttlingen; Hettich, Tuttlingen; Bachhofer, Reutlingen; Hettich, Tuttlingen;

Sonstige Geräte	
Abzugshaube	Kleine Tischzentrifuge
Bunsenbrenner für Sterilbank	Kühlschrank +4°C
Eismaschine	Magnetrührer (beheizbar)
Gefrierschrank -20°C	Mikrowelle
Gefrierschrank -80°C	pH-Meter
Hotblock	Pipettierhilfe (elektrisch)
Präzisionswaage	UV-Lampe für Sterilbank
Schüttler	Vortexer
Stickstofftank	Wasserbäder, 25°C, 37°C, 60°C, 80°C

Hilfsmittel	Anmerkung	Hersteller
Cryotubes	1,8 ml	Greiner Bio One, Frickenhausen
Deckgläser	8x8 mm, 12x12 mm, 22x22 mm, 24x60 mm, 76x26 mm	Superior Menzel-Gläser Schubert & Weiss, München

Eppendorf-Reaktionsgefäße	2 ml; 1,5 ml; 1,5 ml ambra; 1,5 ml mit Schraubdeckel;	Schubert & Weiss, München Eppendorf, Hamburg
Falcon Gewebekulturflaschen	250 ml, 75 cm ² 50 ml, 25 cm ²	Greiner Bio One, Frickenhausen
Falconröhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner Bio One, Frickenhausen
Fixogum Montagekleber		Marabuwerke, Tamm
Glasflaschen	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott
Glaskolben	250 ml, 300 ml, 500 ml	Schott
Glaspipetten	1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Costar®, Fernwald
Küvetten	Für 10 Objektträger	Schubert & Weiss, München
LeucoSep Tubes	50 ml	Greiner Bio One, Frickenhausen
Objektträger	76x26 mm	R. Langenbrink
PCR-Reaktionsgefäße	0,5 ml	Molecular Bio Products™, San Diego, USA
Petrischalen	94/16 mm	Greiner Bio One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Weiß, Blau, Gelb Mit Filter (1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl)	Molecular Bio Products, San Diego, USA; Greiner Labortechnik Greiner Bio One, Frickenhausen
Quadri PERM® plus	für 4 Deckgläser 76x26 mm	Heraeus, Hanau
Quarzküvette	108B-QS-1000	Hellma, Müllheim
Transferpipetten	3 ml	Greiner Bio One, Frickenhausen

Software	Hersteller
EDMT	Tobias Thormeyer
FastPCR 3.3.127 FastPCR Professional 5.1.82 beta 2	Institute of Biotechnology, Helsinki, Finnland
MetaVue 6.2r2	Universal Imaging Corp.
LAS-AF	Leica
SDS Version 2.1	Applied Biosystems, Foster City, CA

Mikroskop/Zubehör	Typ	Hersteller
Durchlicht- /Phasenkontrastmikroskop	Axiovert 25C	Zeiss, Jena
Objektive	CP Achromat x5 / 0,12 CP Achromat x10 / 0,25 Ph1 LD Achrostigmat x20 / 0,3 Ph1 Achrostigmat x40 / 0,55 Ph2	Zeiss, Jena
Epifluoreszenzmikroskop	Axiophot2	Zeiss, Jena
Objektive	Plan-Neofluar 16x / 0,5 Plan-Neofluar 40x oil / 1,3 Plan-Neofluar 63x oil / 1,4 Plan-Neofluar 100x oil / 1,3	Zeiss, Jena
Fluoreszenzfilter	DAPI (BP 365, FT 395, LP 450-490 nm) FITC (BP 450-490, FT 510, LP 515-565 nm) Cy3 (BP 546, FT 580, LP 590 nm) Cy5 (BP 575-625, FT 645, LP 660-710 nm) Triple-Filter (TBP 400/495/570, FT 410/505/585, TBP 460/530/610)	Zeiss, Jena

CCD-Kamera		Photometrics Camera, Rope Scientific
Epifluoreszenzmikroskop	Axiovert200M	Zeiss, Jena
Objektive	A-Plan 10x / 0,5 Plan-Neofluar 40x oil / 1,3 Plan-Neofluar 63x oil / 1,4 Plan-Neofluar 100x oil / 1,3	
Fluoreszenzfilter	DAPI (BP 365, FT 395, LP 450-490 nm) FITC (BP 450-490 nm, FT 510, LP 515-565 nm) Cy3 (BP 546, FT 580, LP 590 nm) Cy5 (BP 575-625, FT 645, LP 660-710 nm) Triple-Filter (TBP 400/495/570, FT 410/505/585, TBP 460/530/610)	
CCD-Kamera		SPOT v4.0 CCD Camera System
Confocales Laser Scanning Mikroskop	Leica SP5	Leica, Wetzlar
Objektive	HCX PL APO 63x 1,4 Oil	Leica, Wetzlar
Fluoreszenzfilter	Argon-Laser: 100 mW 458, 476, 488, 496, 514 nm HeNe-Laser: 2 mW 594 nm (orange) HeNe-Laser: 10 mW 633 nm (rot) DPSS-Laser: 10 mW 561 nm (grün) Diode: 50 mW 405 nm	Leica, Wetzlar

Bildverarbeitende Software	Hersteller
Adope Photoshop 7.0	Adobe Systems, Inc.
Matlab 2007b (Lizenz: Tobias Thormeyer)	Mathworks, USA
EDMT	Tobias Thormeyer, LMU München
ImageJ 1.4.1	National Institutes of Health, USA
WCIF ImageJ	National Institutes of Health, USA

XI. Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Cremer für die Möglichkeit bedanken, eine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen und für das damit entgegen gebrachte Vertrauen in meine Arbeit.

Bei PD. Dr. Steffen Dietzel möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens, und die Betreuung und Hilfe während der ganzen Zeit bedanken.

Ein herzliches Dankeschön auch an Dr. Marion Cremer, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und sich immer die Zeit genommen hat zu helfen.

Großer Dank geht auch an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Bohlander (Helmholtzzentrum München), vor allem an Dr. Medhanie Mulaw für die Zusammenarbeit im CALM-AF-10 Projekt, als auch an Dr. Claudia Nussbaum, Anna Gloning und Dr. Stefan Wallner (Walter-Brendel-Zentrum München) für die Bereitstellung des Nabelschnurblutes bzw. die Hilfe bei der FACS-Analyse.

Weiterhin möchte ich meinen beiden Diplomandinnen, Daniela Weigl und Julia Merz-Lange für ihren Fleiß und die schöne Zeit danken. Daniela hat sich im Rahmen ihrer Diplomarbeit mit der Auswahl der BAC-Klone für die CALM-AF-10-Experimente, sowie der Durchführung der semiquantitativen Real-Time-PCR, den FISH-Experimenten und deren Auswertung befasst, Julia hat die Immunfluoreszenzfärbungen zur Untersuchung von Histonmodifikationen an normalen und HL-60 Zellen durchgeführt und ausgewertet.

Ein Dankeschön geht natürlich auch an die gesamte Arbeitsgruppe, vor allem an Doris Illner für ihre Hilfsbereitschaft, aber auch an alle anderen Mitglieder, die immer eine freundliche Arbeitsatmosphäre geschaffen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Tobias Thormeyer für die Hilfe und die loyale Unterstützung.

Ein Dankeschön auch an meine Oma für ihre Unterstützung.

Der allergrößte Dank aber geht an meine Eltern für ihre Unterstützung und ihren unerschütterlichen Glauben an mich, und natürlich für Kira und Chany, die der allerbeste Ausgleich zu so manchem Stress sind.

XII. Publikationen

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

Katrin Küpper, **Alexandra Kölbl**, Dorothee Biener, Sandra Dittrich, Johann von Hase, Tobias Thormeyer, Heike Fiegler, Nigel P. Carter, Michael R. Speicher, Thomas Cremer, Marion Cremer
Chromosoma 116 (3): 285-306; 2007

Manuskript in Vorbereitung:

- Nuclear positioning of genes and chromatin neighborhood: Environment matters

Alexandra C. Kölbl, Daniela Weigl, Medhanie Mulaw, Tobias Thormeyer, Stefan K. Bohlander, Thomas Cremer, Steffen Dietzel

Manuskript im Anhang der Arbeit, aus zeitlichen Gründen nicht näher verfolgt:

- Histone H3 methylation in normal and malignant hematopoiesis

Kölbl, A.C., Merz, J., Thormeyer, T., Illner, D., Nussbaum, C., Gloning, A., Cremer M., Cremer, T., Dietzel, S.

XIII. Lebenslauf

Name: Alexandra C. Kölbl

Geburtsdatum: 20.11.1980

Adresse: Laubanerstraße 11
82205 Gilching



Schule: 1987-1991 Arnoldus-Grundschule Gilching

1991-2000 Christoph-Probst Gymnasium Gilching
Abiturnote: 1,4

2000-2005 Studium der Biologie an der LMU München
Diplomnote: 1,0

Thema der Diplomarbeit: „*Räumliche Anordnung von exprimierten vs. nicht-exprimierten DNA-Abschnitten in Bezug auf das Chromosomenterritorium*“

2006-2009 Doktorarbeit in der AG Prof. Dr. T.Cremer, Department Biologie II, Anthropologie und Humangenetik, LMU München
Thema der Dissertation: „*Untersuchungen zur Zellkernarchitektur in normalen und malignen hämatopoietischen Zellen*“

Arbeit: Seit 01.01.2010 Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München

Sprachen: Deutsch, Englisch, Spanisch

Interessen: Reiten; Ausbildung zum Trainer C und B

Ehrenwörtliche Versicherung

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

München, den 15.03.2011

Alexandra Kölbl

Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

München, den 15.03.2011

Alexandra Kölbl